

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Der Einfluss der Immunmodulatoren R848 und Alum auf die angeborene
Immunantwort humaner dendritischer Zellen gegen *Aspergillus fumigatus***



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Carola Klessen

aus Bautzen

Würzburg, September 2014

Referent	Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler
Koreferent	Prof. Dr. med. Thorsten Walles
Dekan	Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Oma Renate

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Immunsystem des Menschen	1
1.1.1.	Das unspezifische Immunsystem	1
1.1.2.	Zytokine	3
1.2.	Professionell Antigenpräsentierende Zellen	6
1.2.1.	Monozyten	6
1.2.2.	Dendritische Zellen	7
1.3.	Oberflächenmoleküle des angeborenen Immunsystems	10
1.3.1.	Cluster of Differentiation	10
1.3.2.	Toll-like-Rezeptoren	11
1.3.3.	C-Typ Lektin-Rezeptoren	15
1.4.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	17
1.4.1.	Organismus und Pathologie	17
1.4.2.	Invasive Aspergillose	20
1.5.	Immunmodulatoren	26
1.5.1.	Resiquimod	26
1.5.2.	Alum	28
1.6.	Zielsetzung	29
2.	Material und Methoden	31
2.1.	Material	31
2.1.1.	Pilzstamm	31
2.1.2.	Reagenzien	31
2.1.3.	Puffer, Lösungen und Medien	32
2.1.3.1.	Pufferlösungen für ELISA	32
2.1.3.2.	Pufferlösungen für die FACS-Analyse	33
2.1.3.3.	Medien	33
2.1.4.	Antigene	33
2.1.5.	Antikörper	33
2.1.5.1.	FACS-Antikörper	33
2.1.5.2.	ELISA-Antikörper	34

Inhaltsverzeichnis

2.1.6.	Reaktionskits	34
2.1.7.	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.8.	Geräte	35
2.1.9.	Software	35
2.2.	Methoden	36
2.2.1.	Zellkulturelle Methoden	36
2.2.1.1.	Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen	36
2.2.1.2.	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer	36
2.2.1.3.	Magnetische Zellseparation von CD14 ⁺ -Zellen	38
2.2.1.4.	In vitro Generation von moDCs	39
2.2.2.	Zellbiologische Methoden	40
2.2.2.1.	Stimulation von iDCs mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	40
2.2.2.2.	Stimulation von iDCs mit Lipopolysaccharid	40
2.2.2.3.	Stimulation von iDCs mit Resiquimod	40
2.2.2.4.	Stimulation von iDCs mit Alum	41
2.2.2.5.	Zytokin-ELISA	42
2.2.2.5.1.	TNF- α	42
2.2.2.5.2.	IL-6	44
2.2.2.5.3.	IL-10	45
2.2.2.5.4.	IL-1 β	45
2.2.2.5.5.	CCL-20, CXCL-10	46
2.2.2.6.	Fluoreszenzassoziierte Zellsortierung (FACS)	47
2.2.3.	Statistische Auswertung	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Analyse des Einflusses von Alum auf die Zytokinproduktion pilzstimulierter humaner iDCs auf Proteinebene	52
3.1.1.	TNF- α	53
3.1.2.	IL-6	54
3.1.3.	IL-10	55
3.1.4.	IL-1 β	55
3.1.5.	CXCL-10	57
3.1.6.	CCL-20	57

Inhaltsverzeichnis

3.2.	Analyse des Einflusses von R848 auf die Zytokinproduktion pilzstimulierter humaner iDCs auf Proteinebene	58
3.2.1.	TNF- α	59
3.2.2.	IL-6	61
3.2.3.	IL-10	62
3.1.4.	IL-1 β	64
3.1.5.	CXCL-10	65
3.1.6.	CCL-20	67
3.3.	Analyse des Einflusses von R848 und <i>Aspergillus fumigatus</i> auf die Maturation humaner iDCs	68
4.	Diskussion	75
<hr/>		
4.1.	Regulation der Zytokinsekretion und Maturation pilzkonfrontierter dendritischer Zellen unter Behandlung mit R848	76
4.2.	Einfluss von Alum auf die Zytokinproduktion pilzkonfrontierter dendritischer Zellen	84
4.3.	Spenderabhängige Abweichungen in den durchgeführten Experimenten	85
5.	Zusammenfassung	87
<hr/>		
6.	Literaturverzeichnis	89
<hr/>		
	Abbildungsverzeichnis	110
	Abkürzungen	112
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem des Menschen

In unserer Umwelt befinden sich zahlreiche Krankheitserreger, wie zum Beispiel Bakterien, Viren und Pilze, denen der menschliche Organismus täglich ausgesetzt ist. Um seine Integrität zu wahren und einen effektiven Schutz vor Infektionserregern zu gewähren, bedarf es eines komplexen Abwehrsystems.

Als erste Schutzbarriere und nicht-immunologische Abwehr besitzt der menschliche Körper physikalische, chemische und mikrobiologische Mechanismen. Als mechanische Barriere dienen unter anderem Haut, Schleimhäute und Flimmerhärchen der Atemwege (Chaplin 2006). Die physiologische Mikroflora des Menschen, sowie zahlreiche chemische Stoffe, wie beispielsweise das Enzym Lysozym in Tränenflüssigkeit und Speichel, antibakterielle Peptide, sogenannte Defensine, Fettsäuren der Haut und ein niedriger pH-Wert des Magensafts, sollen ebenfalls ein Eindringen des Erregers in den Körper verhindern (Renz-Polster 2008).

Gelingt es den Mikroorganismen dennoch, diese Hindernisse zu durchbrechen, kommt es zu einer Immunreaktion unseres Körpers.

Die daraus resultierende Immunantwort ist zu einem Teil angeboren, jedoch Antigen-unpezifisch und zu einem anderen Teil erworben und damit Antigen-spezifisch. Zelluläre und humorale Komponenten beider Systeme ergänzen sich und gewähren durch dieses einzigartige Zusammenwirken den Erhalt der individuellen Integrität.

Für das Verständnis dieser Arbeit wird im Folgenden auf das angeborene Immunsystem näher eingegangen.

Das spezifische (= adaptive) Immunsystem, das sich gezielt gegen spezifische Antigene richtet und auf der Arbeit von T- und B-Lymphozyten, sowie humoraler Mediatoren basiert, ist nicht Gegenstand dieser Arbeit und wird daher nicht weiter beschrieben.

1.1.1. Das unspezifische Immunsystem

Die angeborene Immunität bildet den phylogenetisch älteren Teil des Immunsystems (Hoffmann und Akira 2013). Es bildet die initiale Komponente der Immunantwort

Einleitung

(Fearon und Locksley 1996, Hoffmann und Akira 2013). Im Gegensatz zum spezifischen Immunsystem, wird das unspezifische Immunsystem direkt aktiviert und reagiert somit sehr schnell, was jedoch eine mangelnde Erregerspezifität mit sich bringt (Chaplin 2006). Die Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), sowie die natürlichen Killerzellen bilden das Grundgerüst des angeborenen Immunsystems (Chaplin 2006). Ergänzend dazu fungieren verschiedene Plasmaproteine, wie das Komplementsystem, Zytokine, Akute-Phase-Proteine und Lysozym als humorale Mediatoren (Medzhitov und Janeway 1997; Renz-Polster 2008).

In den letzten Jahren widmete sich die Forschung verstärkt dem angeborenen Immunsystem (Takeda und Akira 2005). Lange Zeit lag der Fokus auf den Antigen-spezifischen Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten, die durch somatische Rekombination „über ein hochdiverses Repertoire an individuellen, klonalen Antigenrezeptoren“ verfügen (Kamradt und Ferrari-Kühne 2011). Im Gegensatz dazu besitzen die Zellen des angeborenen Immunsystems sogenannte keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors = PRRs*) (Janeway und Medzhitov 2002), die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns = PAMPs*) erkennen (Medzhitov und Janeway 1997). Diese PAMPs sind ausschließlich essentielle Bestandteile von Mikroorganismen, wie zum Beispiel das Lipopolysaccharid, Peptidoglykan, Lipoprotein, DNA, sowie einzel- und doppelsträngige RNA, die dem Immunsystem erlauben, zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden (Janeway und Medzhitov 2002; Aderem und Ulevitch 2000; Medzhitov und Janeway 1997). Da diese PAMPs für die Erreger lebensnotwendig sind, ist es ihnen nicht möglich, sich mittels Mutation dem Erkennen durch PRRs zu entziehen (Janeway, Charles A Jr 2013).

Die Mustererkennungsrezeptoren werden aufgrund ihrer Lokalisation in drei Gruppen eingeteilt (Janeway und Medzhitov 2002). Sie werden sowohl auf der Oberfläche von Zellen oder im Zytoplasma exprimiert, oder liegen als sekretorische Form vor (Janeway und Medzhitov 2002). So wirken beispielsweise die löslichen PRRs CRP und SAP, die zur Familie der Pentraxine gehören, durch Bindung an Phosphorylcholin auf der Oberfläche von Bakterien als Opsonine (Gewurz et al. 1982; Schwalbe et al. 1992). Die transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLR) und C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) werden in dem Kapitel 1.3. näher beschrieben. Die NOD-like Rezeptoren (NLR), die der

Erkennung von Bakterien dienen und die RIG-I-like Rezeptoren (RLR), die vor allem dsRNA-Viren identifizieren, befinden sich in dem Zytoplasma von Immunzellen (Hoffmann und Akira 2013):

Die über die Mustererkennungsrezeptoren vermittelte Phagozytose und Induktion zahlreicher inflammatorischer Zytokine nimmt eine zentrale Stellung in der frühen unspezifischen Immunantwort ein (Suresh und Mosser 2013) . Zum anderen sind sie essentiell für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Janeway 1989).

Wie bereits erwähnt, hat sich die Forschung in den letzten Jahren vermehrt dem angeborenen Immunsystem gewidmet und konnte neue wegweisende Erkenntnisse gewinnen (Takeda und Akira 2005). So konnte gezeigt werden, dass bei der unspezifischen Immunantwort reife NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen Charakteristika eines immunologischen Gedächtnisses aufzeigen (Quintin et al. 2014). Diese Funktion wurde bisher nur dem adaptiven Immunsystem in Form von Gedächtniszellen zugeschrieben. Jedoch konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Gedächtnis-NK-Zellen („*memory-like NK cells*“) nach einer Restimulation vermehrt IFN- γ produzieren (Cooper et al. 2009).

1.1.2. Zytokine

Zytokine sind eine große Gruppe immunregulatorischer Proteine und Glykoproteine, die unter anderem von Immunzellen gebildet werden. Sie besitzen als Mediatoren der zellulären Kommunikation eine autokrine, parakrine, und selten auch endokrine Wirkung (Loppnow 2001). Diese kann sowohl synergistischer oder antagonistischer Natur sein (Loppnow 2001). Zytokine verfügen über eine große Variabilität in Bildung, Wirkung (Pleiotropismus) und Funktion (Mutschler 2008). Eine zentrale Rolle wird ihnen bei der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort zugesprochen. Die Einteilung der Zytokine erfolgt nach ihren funktionellen Charakteristika in fünf Hauptgruppen:

- Interferone (IFN)
- Interleukine (IL)
- koloniestimulierende Faktoren (CSF)
- Tumornekrosefaktoren (TNF)
- Chemokine

Einleitung

Allen Zytokinen ist gemein, dass sie über eine hohe Affinität zu ihrem Rezeptor verfügen und somit „schon in sehr niedrigen Konzentrationen (ng/ml bis pg/ml) biologisch aktiv“ sind (Loppnow 2001). Ihre Bildung erfolgt bei akutem Bedarf. Über transmembranäre Zytokinrezeptoren wird die Informationsweitergabe vermittelt, die meist zur Transkription neuer Gene führt und unter anderem das Wachstum, die Aktivierung und die Differenzierung von Lymphozyten, die Aktivierung der Hämatopoese, sowie die Induktion von Apoptose umfassen (Löffler 2007).

Die in dieser Arbeit gemessenen Zytokine werden im Folgenden in ihrer Funktion näher beschrieben.

Die Bildung des vorwiegend von monozytären Zellen sezernierten Zytokins Interleukin-1 beta (IL-1 β) wird von zahlreichen mikrobiellen Antigenen induziert (Dinarello 1996; Dinarello 1998). Es wird als inaktive Vorstufe (pro-IL-1 β) freigesetzt und mittels aktivierter Caspase-1 (oder IL-1 β -converting enzyme) gespalten und aktiviert (Dinarello 1998). Eine vermehrte Expression von IL-1 β kann bei viralen, bakteriellen, fungalen und parasitären Erkrankungen nachgewiesen werden (Dinarello 1996). Es löst Fieber aus und führt zu einem Anstieg von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten (Tewari et al. 1990). Zudem induziert es die Produktion von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen (Dinarello 1996). Die Stimulation humaner Monozyten mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen bewirkt die Aktivierung der Caspase-1 und die Bildung von IL-1 β (Saïd-Sadier et al. 2010).

An der Bildung des proinflammatorischen Interleukin-6 sind sowohl immunologische Zellen wie Monozyten, B- und T-Lymphozyten, als auch Keratinozyten und Endothelzellen beteiligt (Kishimoto et al. 1995). So konnte anhand eines Mausmodells zur Pathophysiologie allergischer Asthmaerkrankungen gezeigt werden, dass das IL-6 Gen in Lungenepithelzellen kontinuierlich exprimiert wird und bei Pilzkontakt (β -Glucan) zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Produktion führt (Neveu et al. 2011). Als pleiotropes Zytokin wirkt es als Differenzierungsfaktor für B- und T-Zellen, sowie als Aktivierungsfaktor für T-Zellen (Hirano 1998; Mutschler 2008). In Entzündungsprozessen hat es als endogenes Pyrogen und Initiator der Akute-Phase-Reaktion eine wichtige Funktion (Löffler 2007) und findet daher in der klinischen Medizin als Sepsisparameter Verwendung (Naffaa et al. 2013).

Einleitung

Das antiinflammatorische Interleukin-10 (IL-10) wirkt als Schlüsselmolekül modulierend in Entzündungsprozessen, indem es überschießende Immunantworten verhindert (Woiciechowsky et al. 1999). Es wirkt hemmend auf die Produktion pro-entzündlicher Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IL-12 und hemmt die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen und CD80/CD86 (D'Andrea et al. 1993; Fiorentino et al. 1991). Bei der Pathogenese einer invasiven Aspergillose nach einer allogenen Stammzelltransplantation konnten protektive Einzelnukleotid-Polymorphismen in der Promotorregion des IL-10 ermittelt werden (Seo et al. 2005).

Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) wird vorwiegend von aktivierten Makrophagen und Monozyten sezerniert, in besonderem Maße nach der Stimulation mit LPS (Mannel et al. 1980). Es fördert die Differenzierung von Makrophagen (Vassalli 1992) und erhöht gemeinsam mit IFN- γ die Expression von MHC-II-Komplexes auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen (van Deuren et al. 1992). Es steigert zudem die zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen (Ostensen et al. 1987). Als proinflammatorisches Zytokin induziert es die Bildung der Akute-Phase-Proteine (Löffler 2007) und ist entscheidend an der Bildung von Fieber und des septischen Schock beteiligt (Mannel und Echtenacher 2000). Der Kontakt mit *Aspergillus*-Hyphen induziert in Monozyten unter anderem die Produktion von TNF- α (Loeffler et al. 2009).

Die große Gruppe der Chemokine zeichnet sich dadurch aus, dass sie die Chemotaxis verschiedener Zellen steuert (Fernandez und Lolis 2002). Sie lassen sich anhand struktureller Merkmale in vier Klassen einteilen, die CXC-, CC-, C- und CX3C-Familie (Allen et al. 2007). Das Chemokin CCL-20, auch liver and activation-regulated chemokine (LARC) genannt, wirkt auf Lymphozyten und in schwächerer Form auf Granulozyten chemotaktisch, jedoch nicht auf Monozyten (Hieshima et al. 1997). CCL-20 ist ein spezifischer Ligand des Rezeptors CCR6 (Baba et al. 1997). Im Hinblick auf die Immunantwort bei einer invasiven Aspergillose sind die Chemokine CCL-20 und CXCL-10 von besonderer Bedeutung. Bei einer Konfrontation humaner Monozyten mit *Aspergillus fumigatus* ist eine erhöhte Expression des Chemokins CCL-20 zu beobachten, das als möglicher Hauptregulator einer Immunantwort bei einer *Aspergillus*-Infektion fungiert (Loeffler et al. 2009).

Das pleiotrope Chemokin CXCL-10 wird von Monozyten, Granulozyten, epithelialen und endothelialen Zellen gebildet und durch IFN- γ induziert, was ihm den Namen

interferon- γ -induced protein (IP-10) verliert (Luster und Ravetch 1987). CXCL-10 bindet spezifisch an seinen Rezeptor CXCR3 (Loetscher et al. 1996). Es begünstigt das Zellwachstum und die Zellproliferation (Aksoy et al. 2006). Sowohl bei viralen und bakteriellen Infektionen, sowie bei Erkrankungen durch Pilze oder Protozoen, kommt es zu einer gesteigerten Expression von CXCL-10 (Liu et al. 2011b). So konnte gezeigt werden, dass das Risiko, nach einer allogenen Stammzelltransplantation an invasiver Aspergillose zu erkranken, durch Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) in dem CXCL-10-Gen entscheidend beeinflusst wird (Mezger et al. 2008b).

1.2. Professionell antigenpräsentierende Zellen

Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen alle kernhaltigen Körperzellen, die mittels MHC-Klasse-I-Molekül auf ihrer Oberfläche endogene Peptide zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen präsentieren (Hahn 2009).

Die Gruppe der Professionell antigenpräsentierenden Zellen, vornehmlich Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten, ist in der Lage, neben MHC-I via MHC-Klasse-II-Moleküle, aufgenommene Antigene T-Zellen zu präsentieren und somit die adaptive Immunantwort zu initiieren.

1.2.1. Monozyten

Monozyten entwickeln sich im roten Knochenmark unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) aus dem Monozyten-Makrophagen-Dendriten-Precursor (MDP) (Friedman 2002). Erst kürzlich konnte in Mäusen eine eigene monozytäre Vorläuferzelle identifiziert werden („*common monocyte progenitor, cMoP*“), die sich aus dem MDP entwickelt (Hettinger et al. 2013). Monozyten werden zusammen mit der Vorläuferzelle des Knochenmarks, sowie den Gewebemakrophagen dem Mononukleär-phagozytären Systems (MPS) zugeordnet (van Furth et al. 1972). Neben dem typischen Oberflächenmarker CD14, können Monozyten auch das Markerantigen CD16 exprimieren und lassen sich so in drei Gruppen einteilen (Passlick et al. 1989):

Einleitung

- CD14⁺⁺ CD16⁻ (klassische Monozyten)
- CD14⁺⁺ CD16⁺ (intermediäre Monozyten)
- CD14⁺ CD16⁺⁺ (nicht-klassische Monozyten)

Unter inflammatorischen Bedingungen wandern im Blut zirkulierende Monozyten unter dem Einfluss der Chemokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) und Fraktalkin in das Gewebe ein und differenzieren sich dort unter dem Einfluss verschiedener Zytokine zu Makrophagen oder dendritischen Zellen (Ancuta et al. 2003). So bewirken der Wachstumsfaktor GM-CSF und das Zytokin IL-4 *in vitro* die Weiterentwicklung zu dendritischen Zellen (*monocyte-derived DCs* = *moDCs*) (Sallusto 1994), hingegen bewirkt der Einfluss von M-CSF die Differenzierung zu Makrophagen (Chapuis et al. 1997).

Als phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen sind Monozyten an der Bekämpfung fungaler Infektionen von großer Bedeutung. Sie sind beteiligt an der direkten Vernichtung von *Aspergillus fumigatus*-Konidien (Serbina et al. 2009) und Hyphen (Diamond et al. 1983). Die Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Konidien induziert die Sekretion zahlreicher Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α , IL-1 β , IL-8 und CCL20 (Serbina et al. 2009; Cortez et al. 2006).

1.2.2. Dendritische Zellen

Seit der Entdeckung dendritischer Zellen im Jahr 1973 durch den Nobelpreisträger Dr. Ralph Steinmann und Kollegen (Steinman und Cohn 1973), wurde diese Zelllinie in den letzten Jahren in ihrer Funktion und Entwicklung detailliert erforscht (Satpathy et al. 2012).

Als Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem sind sie für die Initiierung und den Ablauf einer geregelten und effektiven Immunantwort gegen Pathogene unentbehrlich. So konnte gezeigt werden, dass DC-defiziente Mäuse nicht in der Lage sind, eine effiziente Immunantwort mittels zytotoxischer T-Zellen gegen *Listeria monocytogenes* zu erbringen (Jung et al. 2002).

Dendritische Zellen werden ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle, des MDP (Fogg et al. 2006) und einer gemeinsamen Vorläuferzelle (*common dendritic cell*

Einleitung

precursor, CDP) (Naik et al. 2007; Onai et al. 2010) kontinuierlich im Knochenmark gebildet. Aus dem gemeinsamen Vorläufer CDP entwickeln sich sowohl reife plasmazytoide DCs (pDCs), die das Knochenmark verlassen und sich in sekundären lymphatischen Organen ansiedeln, als auch Vorläufer-cDCs (pre-cDCs), die in lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe einwandern und dort ihre Differenzierung zu cDCs abschließen (Satpathy et al. 2012). Diese Subpopulationen (pDCs und cDCs, alternativ auch mDCs) unterscheiden sich unter anderem in der Expression ihrer Oberflächenmarker, sowie ihrer Funktion.

Plasmazytoide Dendritische Zellen zeichnen sich durch die rasche Produktion großer Mengen an Interferon- α (IFN- α) via TLR7 und TLR9 aus (Kadowaki et al. 2001) und sind an der frühen Antwort auf virale Infektionen beteiligt (Perussia et al. 1985; Cella et al. 1999). Die Beteiligung plasmazytoider DCs an der Abwehr von Pilzinfektionen ist noch nicht hinreichend geklärt. In vitro konnte gezeigt werden, dass pDCs nach Kontakt mit *Aspergillus fumigatus* DNA IFN- α und TNF- α sezernieren und das Wachstum des Pilzes stoppen (Ramirez-Ortiz et al. 2008; Ramirez-Ortiz et al. 2011).

Klassische DCs sind hocheffektiv phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen, die in der Milz und in den Lymphknoten angesiedelt sind. Unreife Dendritische Zellen (*immature DCs = iDCs*), die sich in peripheren Geweben befinden, exprimieren auf ihrer Oberfläche in einem nur geringen Ausmaß MHC-II-Moleküle, zeichnen sich aber durch eine hohe Endozytosefähigkeit aus (Cella et al. 1997). Nach Antigenkontakt reifen sie aus und migrieren in lymphatisches Gewebe. Die Maturation (= Reifung) beinhaltet die vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen (Cella et al. 1997) und costimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 und CD40 (Banchereau et al. 2000), sowie den Verlust ihrer Endozytoseaktivität (Garrett et al. 2000). Durch die Präsentation des aufgenommenen Antigens sind sie potente Aktivatoren naiver T-Zellen. Die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor, MHC-Molekülen und costimulatorischen Molekülen aktiviert CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen (Banchereau und Steinman 1998). Die Interaktion zwischen DCs und naiven T-Zellen ist somit für die Initiierung der adaptiven Immunantwort essentiell.

Die unter inflammatorischen Bedingungen aus Monozyten differenzierten dendritischen Zellen (*monocyte-derived-DCs = moDCs*) bilden ein äußerst wichtiges Reservoir antigenpräsentierender Zellen (Naik et al. 2006). MoDCs induzieren über die Aktivierung von CD4⁺-Zellen eine TH1-Antwort (Leon et al. 2007) und sind in der Lage, zytotoxische

Einleitung

CD8⁺-Zellen mittels Kreuzpräsentation zu stimulieren (Le Borgne et al. 2006). An einem Mausmodell konnten Hohl und Kollegen die erhebliche Bedeutung von moDCs in der Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* zeigen (Hohl et al. 2009). Während einer respiratorischen Infektion mit *Aspergillus fumigatus* wurde ein signifikanter Anstieg von moDCs in der Lunge infizierter Mäuse gemessen, die für die Aufnahme der *Aspergillus*-Konidien und Transport derselben zu den drainierenden Lymphknoten verantwortlich waren (Hohl et al. 2009). In einer weiteren Versuchsreihe in Bezug auf die T-Zell-Aktivierung, konnten sie in Monozyten-depletierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nach einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien eine 100-fach geringere Expansion von CD4⁺-T-Zellen messen (Hohl et al. 2009).

Dendritische Zellen besitzen abhängig von der Subpopulation verschiedene PRRs, die für das Erkennen pilzspezifischer Strukturen von Bedeutung sind (Tab.1).

PRR	PAMP	Pathogen
Dectin-1/TLR	Zymosan, β -Glucan	<i>Candida albicans</i>
Dectin-1	β -Glucan	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
Dectin-2	α -Mannane	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i>
DC-SIGN	Mannosereiche Glykoproteine	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
Mannose-Rezeptor	Fucose, terminale Mannose	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i>
TLR2	Zymosan, Phospholipomannan	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
TLR3	dsRNA	<i>A. fumigatus</i>
TLR4	Mannane, LPS	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. neoformans</i>
TLR7	ssRNA	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i>
TLR9	CpG-reiche DNA	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. neoformans</i>

Tab. 1: Beispiele für Mustererkennungsrezeptoren dendritischer Zellen. Verschiedene PRRs dendritischer Zellen für das Erkennen pilzspezifischer Strukturen (modifiziert nach Ramirez-Ortiz und Means 2012)

Einleitung

Aufgrund der essentiellen Rolle dendritischer Zellen bei der Immunabwehr von Pilzinfektionen, wurde in den letzten Jahren verstärkt an der Entwicklung DC-basierter antifungaler Impfstoffe gearbeitet (Liu et al. 2011a; Stevens et al. 2011). So gelang es Bacci und Kollegen in Mäusen durch die Verabreichung mit Candida-RNA-beladener DCs eine protektive Immunantwort zu erreichen (Bacci et al. 2002). Mit Candida albicans infizierte Mäuse, die im Vorfeld eine subkutane Injektion transfizierter DCs erhalten hatten, zeigten eine signifikante Reduktion des Pilzbefalls in Vergleich zu nicht geimpften Mäusen, die aus der messbaren Induktion einer T_H1 -Antwort resultierte (Bacci et al. 2002).

1.3. Oberflächenmoleküle des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren eine Vielzahl an Rezeptoren und Oberflächenmoleküle, die ihnen erlauben, Pathogene zu erkennen, Immunantworten auszulösen und mit anderen Zellen zu kommunizieren. Bestimmte Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex = MHC) dienen zudem der Identifikation körpereigener Zellen.

1.3.1. Cluster of Differentiation

Durch das von Köhler und Milstein 1975 entwickelte Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper (Kohler und Milstein 1975) wurden in den letzten Jahren eine große Anzahl von Antikörpern generiert, die sich gegen Oberflächenstrukturen von Leukozyten richten (Zola 2007). Viele Leukozyten-Oberflächenantigene werden von mehr als einem Antikörper detektiert, so dass es notwendig war, eine einheitliche Nomenklatur festzulegen (Zola et al. 2005). Die erstmals 1982 in Paris stattfindende „Human Leukocyte Differentiation Antigens“ (HLDA)- Konferenz fasste Antikörper, die das gleiche Merkmal erkennen, in Gruppen, sog. „Cluster“ zusammen (Zola et al. 2005). Die dazugehörige „Cluster of Differentiation“-Nomenklatur umfasst mittlerweile über 300 Moleküle (HCDM 2014). Kenntnisse über bestimmte Oberflächenmerkmale immunologischer Zellen eröffnen neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie zahlreicher Erkrankungen. Durch die Generierung monoklonaler Antikörper gegen CD-

Antigene ist es beispielsweise möglich, Immunzellen zu spezifizieren und ihren Reifungsgrad zu beurteilen (Zola 2007). Dies findet zum Beispiel bei der Immuntypisierung der Akuten Lymphatischen Leukämie Anwendung. Durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene lassen sich die Tumorzellen der B-oder T-Zelllinie zuordnen und ihre Differenzierung bestimmen (Hoelzer 2013; Herold 2013).

Dendritische Zellen exprimieren nach Antigenkontakt unter anderem die costimulatorischen Moleküle CD40, das der B-Zell-Aktivierung dient, sowie CD80 und CD86, die für die Aktivierung von T-Lymphozyten essentiell sind. Der Oberflächenmarker CD83 kennzeichnet reife DCs und wird daher auch als „Reifemarker“ bezeichnet (Zhou und Tedder 1995).

1.3.2. Toll-like-Rezeptoren

Wie bereits unter 1.1.1. beschrieben, stellen Toll-like-Rezeptoren (TLR) einen wichtigen Bestandteil keimbahnkodierter Mustererkennungsrezeptoren dar.

Nach der Entdeckung der Toll-Like-Rezeptoren 1985 in der Taufliege *Drosophila melanogaster*, konnten Lemaitre und Kollegen Ende des 20. Jahrhunderts zeigen, dass diese Rezeptoren entscheidend zu der Immunantwort gegen Pilzinfektionen beitragen (Lemaitre et al. 1996). 1997 wurde ein humanes Homolog des Toll-Rezeptors analysiert, welches heute als TLR4 bekannt ist (Medzhitov et al. 1997). Seitdem wurden bis heute 13 Toll-like-Rezeptoren in Säugetieren identifiziert, davon konnten beim Menschen bislang nur 10 TLR beschrieben werden (TLR1 bis TLR10) (Takeda und Akira 2005).

Die auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 erkennen hauptsächlich mikrobielle Lipide, Lipoproteine und Proteine, die intrazellulär exprimierten Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 binden und erkennen mikrobielle Nukleinsäuren (Kawai und Akira 2011).

Toll-like-Rezeptoren besitzen eine aus Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin rich repeats* = LRRs) bestehenden extrazelluläre und eine zytoplasmatischen Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne, die Ähnlichkeiten zur IL-1 Rezeptorfamilie zeigt (Chaudhary et al. 1998). Die folgende Tabelle (Tab.2) gibt einen aktuellen Überblick über ausgewählte Liganden humaner Toll-like-Rezeptoren.

Einleitung

Rezeptor	Ligand	Spezies
TLR1	Triacyl-Lipopeptid	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Lipoteichonsäure Peptidoglykan Lipoproteine/Lipopeptide Lipoarabinomannan Zymosan β -Glucan Mannan	Grampositive Bakterien Grampositive Bakterien Verschiedene Erreger Mykobakterien Pilze Pilze Pilze
TLR3	dsRNA	Viren
TLR4	LPS Fusionsproteine Pneumolysin Taxole Heat Shock Protein (HSP) 60 Fibrinogen	Gramnegative Bakterien Respiratorische Synzytial-Viren (RSV) <i>Streptococcus pneumoniae</i> Pflanzen Wirtsorganismus (endogen) Wirtsorganismus (endogen)
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl-Lipopeptid Lipoteichonsäure Zymosan	Gramnegative Bakterien, Mycoplasmen Grampositive Bakterien Pilze
TLR7	ssRNA RNA Imidazole (u.a. Resiquimod) Loxoribine	Viren Bakterien Synthetische Stoffe Synthetische Stoffe
TLR8	ssRNA Resiquimod	Viren Synthetischer Stoff
TLR9	CpG DNA Hemozoin	Bakterien, Viren <i>Plasmodium falciparum</i>
TLR10	noch nicht bekannt	noch nicht bekannt

Tab. 2: Humane Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden (modifiziert nach Takeda und Akira 2005; Kawai und Akira 2010)

Einleitung

Einige TLRs benötigen für das Erkennen von PAMPs weiterer Co-Rezeptoren oder Bindungs-Moleküle. TLR4 bildet mit dem Molekül MD2 auf der Zelloberfläche einen Komplex, der für das Erkennen und Binden von LPS zuständig ist (Shimazu et al. 1999). Im Serum bildet LPS mit dem LPS-bindenden-Protein (LBP) eine Einheit, die von dem löslichen Protein CD14 dem TLR4-MD2-Rezeptorkomplex zugeführt wird (Jack et al. 1997; Jiang et al. 2005).

Der Rezeptor TLR2 bildet Heterodimere mit den strukturell ähnlichen TLR1 und TLR6 und kann so, je nach Heterodimer, Triacyl-Lipopeptide (TLR2-TLR1) oder Diacyl-Lipopeptide (TLR2-TLR6) erkennen (Takeuchi et al. 1999; Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002).

Nach der Bindung des entsprechenden Liganden werden Signalkaskaden in Gang gesetzt. An die TIR-Domäne des TLR angelagerten Adaptormoleküle bestimmen den Signalweg. Derzeit sind fünf Adaptorproteine bekannt: MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (*MYD88-adaptor-like protein = MAL*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und SARM1 (*sterile- α - and armadillo-motif-containing protein 1*) (O'Neill, Luke A J et al. 2003). Abhängig von den verwendeten Adaptormolekülen können zwei Signalwege (siehe Abb.1) unterschieden werden: zum einen der MyD88-abhängige und zum anderen der MyD88-unabhängige (auch TRIF-Signalweg genannt) (Takeda und Akira 2005).

Alle Toll-like-Rezeptoren, mit Ausnahme des TLR3, verwenden den MyD88-Signalweg (Brown et al. 2011). Die MyD88-unabhängige Kaskade konnte nur bei TLR3 und TLR4 beschrieben werden (Brown et al. 2011; Kawai und Akira 2007; Takeda und Akira 2005). Für TLR4 sind beide Signalwege beschrieben worden (Kawai et al. 2001). So kann die LPS vermittelte Maturation dendritischer Zellen auch MyD88-unabhängig erfolgen (Kaisho et al. 2001; Kawai et al. 2001). Die Induktion des über TLR vermittelten MyD88-Signalweges und folgende T_H1-Antwort sind essentiell für die Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus* (Pasare und Medzhitov 2004; Rivera et al. 2006).

Um eine überschießende Immunantwort zu verhindern, existieren auch hier zahlreiche regulierende Mechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass das Adaptormolekül SARM in der Lage ist, TRIF zu inhibieren (Carty et al. 2006). Ein weiterer Regulator der TLR-Signalkaskaden ist das Protein SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*), welches das

Einleitung

Adaptormolekül TIRAP enzymatisch verändert und somit die über TLR2 und TLR4 vermittelten Signalwege blockiert (Mansell et al. 2006).

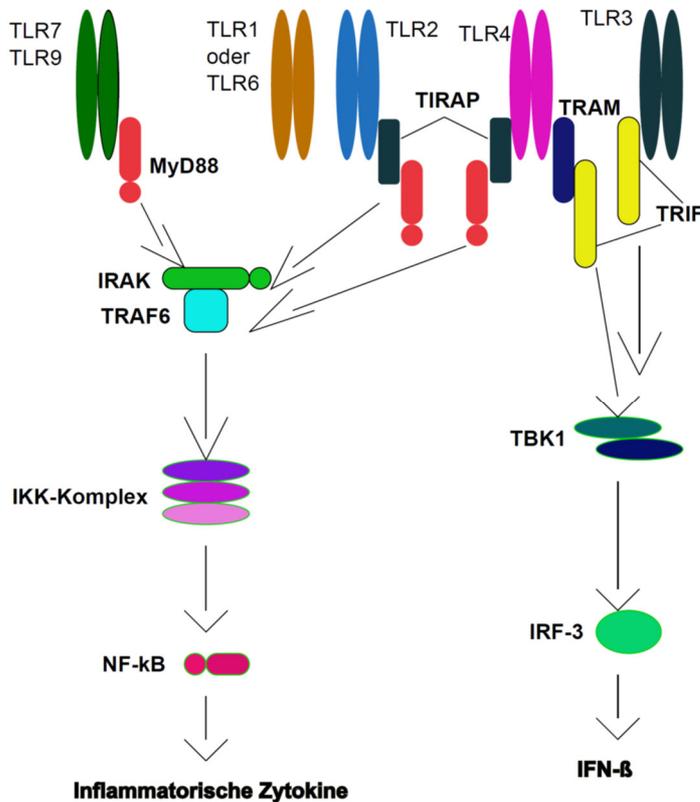


Abb. 1: Signalkaskaden der Toll-like-Rezeptoren. In dem MyD88-abhängigen Weg assoziiert MyD88 mit der TIR-Domäne des TLR und rekrutiert IRAK, welches TRAF6 aktiviert. Dies führt zur Bildung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKK α , IKK β und NEMO/IKK γ , der zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B führt und der daraus resultierenden Bildung proinflammatorischer Zytokine. Über das Adaptormolekül TRIF wird die MyD88-unabhängige Signalkaskade aktiviert, welches über TBK1 eine Aktivierung von IRF-3 bewirkt, der nach Translokation in den Kern als Transkriptionsfaktor die Expression von IFN- β induziert (modifiziert nach Takeda und Akira 2005)

Toll-like-Rezeptoren werden sowohl auf Immunzellen, als auch auf nicht-lymphatischem Gewebe exprimiert, wobei Phagozyten das größte Spektrum aufweisen (Zarembler und Godowski 2002) Das TLR-Expressionsmuster humaner DCs ist von der Subpopulation abhängig. Klassische DCs exprimieren außer TLR9 alle Toll-like-Rezeptoren (Schreibelt

et al. 2010). Auf der Oberfläche von moDCs dominieren TLR2 und TLR4, hingegen zeigen pDCs eine vermehrte Expression von TLR7 und TLR9 (Schreibelt et al. 2010). Die Beteiligung von TLR2 und TLR4 an der Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* konnte in diversen Studien belegt werden (Bellocchio et al. 2004; Braedel et al. 2004; Meier et al. 2003). Nun konnte auch die Beteiligung von TLR1 als Heterodimer mit TLR2 an der Erkennung und Immunantwort gegen *A. fumigatus* mittels humaner Zelllinien experimentell belegt werden (Rubino et al. 2012). Respiratorische Zellen, die in vitro mit dsRNA, extrahiert aus *Aspergillus fumigatus* Konidien, inkubiert wurden, zeigten eine über TLR3 vermittelte Produktion von IFN- β und CXCL10 (Beisswenger et al. 2012). Dass einige Toll-like-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen *A. fumigatus* spielen, zeigt sich dadurch, dass einige Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in TLR-Genen das Risiko für Pilzinfektionen beim Menschen erhöhen. Analysen ergaben, dass SNPs der Gene für TLR1 und TLR6, sowie TLR4 mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer invasiven Aspergillose bei Stammzelltransplantierten Patienten verbunden sind (Kesh et al. 2005; Bochud et al. 2008).

1.3.3. C-Typ Lektin Rezeptoren

C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR), als Teil der PRRs, repräsentieren eine große Familie sowohl löslicher, als auch transmembraner Rezeptoren, die Kohlenhydrate calcium-abhängig mittels einer extrazellulären Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (*carbohydrate recognition domain* = CRD) binden (Zelensky und Gready 2005). Es existieren ebenfalls C-Typ Lektin-ähnliche Domänen (*C-type lectin-like domains* = CTLD), die der CRD strukturell entsprechen und neben Kohlenhydraten auch Proteine und Lipide erkennen (Drickamer 1999; Zelensky und Gready 2005).

C-Typ Lektin Rezeptoren sind für die pilzspezifische Immunabwehr unentbehrlich. Der Rezeptor Dectin-1 (*dendritic-cell-associated C-type lectin-1; CLEC-7a*) wird unter anderem von DCs, Makrophagen, Neutrophilen und Monozyten exprimiert und fungiert als Rezeptor für β -(1,3)-Glucan, ein pilzspezifischer Zellwandbestandteil (Brown und Gordon 2001; Plato et al. 2013). Zudem exprimieren DCs auf ihrer Zelloberfläche in beträchtlichen Maße den Rezeptor DC-SIGN (*Dendritic cell specific intracellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin*) (Hernanz-Falcon et al. 2001), der

Einleitung

den Zellwandbestandteil Galaktomannan des Pilzes *Aspergillus fumigatus* bindet (Serrano-Gomez et al. 2004). DC-SIGN fungiert als Adhäsionsmolekül in der Aktivierung naiver T-Zellen (Geijtenbeek et al. 2000).

Dectin-1 induziert über den Syk-Signalweg die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF, IL-6, IL-10 (Gringhuis et al. 2011) und vermittelt die Aufnahme des Liganden per Phagozytose und dessen Abtötung durch reaktive Sauerstoffspezies („respiratory burst“) (Underhill et al. 2005). Zudem fördert Dectin-1 die Zytokinvermittelte CD4⁺-Differenzierung zu T_H1 und T_H-17 (Gringhuis et al. 2009).

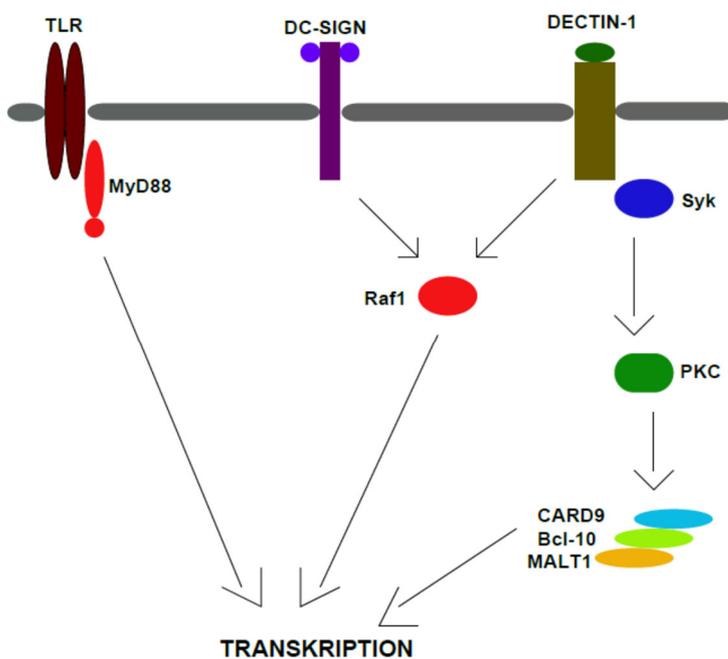


Abb. 2: Signalwege ausgewählter transmembranärer CLR. Dectin-1 induziert über seinen zytoplasmatischen Anteil die Aktivierung der Syk-Kinase, die wiederum die ProteinkinaseC (PKC) und über den CARD9-Bcl-10-MALT1-Komplex den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Außerdem kann Dectin-1, wie auch DC-SIGN die Raf1-Kinase aktivieren, die andere Signalwege, unter anderem die TLR-Signalkaskade und Syk-Weg modulieren und über die Regulierung von NF- κ B die Produktion proinflammatorischer Zytokine beeinflussen kann. (modifiziert nach Hardison und Brown 2012)

Gantner und Kollegen konnten *in vitro* zeigen, dass Dectin-1 gemeinsam mit TLR2 in Makrophagen und dendritischen Zellen die Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-12 aktiviert (Gantner et al. 2003).

An der Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* ist Dectin-1 maßgeblich beteiligt. In Dectin-1-defizienten Mäusen war die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in Antwort auf *Aspergillus fumigatus* signifikant reduziert und die Sterblichkeit der Dectin-1-defizienten Mäuse drastisch erhöht (Werner et al. 2009). In einer zwischen 2004 und 2011 durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von SNPs in den Genen von Dectin-1 und DC-SIGN zu einer erhöhten Anfälligkeit hämatologischer Patienten gegenüber einer invasiven Aspergillose führt (Sainz et al. 2012).

1.4. *Aspergillus fumigatus*

1.4.1. Organismus und Pathologie

Der zur Abteilung der Ascomyzeten (= Schlauchpilze) gehörende Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist ein ubiquitär vorkommender Saprophyt, der sich von totem organischem Material ernährt (Hahn 2009). Sehr häufig ist er in Biotonnen, Kompost, Blumenerde und Tapeten zu finden. Daher ist es in vielen Krankenhäusern untersagt, Topfpflanzen in Krankenzimmern vor allem immungeschwächter Patienten zu belassen. Als thermotoleranter Pilz ist es ihm möglich, bei Temperaturen zwischen 12° und 65°C zu wachsen (Kwon-Chung und Sugui 2013). Die Gattung *Aspergillus*, auch Gießkannenschimmel genannt, zeichnet sich durch aspergillförmige (lat. *aspergillum*; *aspergere* = bespritzen) Sporenträger aus (Brakhage 1999). Die Bezeichnung *fumigatus* leitet sich von dem lateinischen Wort *fumus* (=Rauch) ab und beschreibt die blaugrüne Farbe des Pilzes, die durch das Pigment 1,8-Dihydroxynaphtalin-Melanin in den Konidien hervorgerufen wird (Tsai et al. 1999).

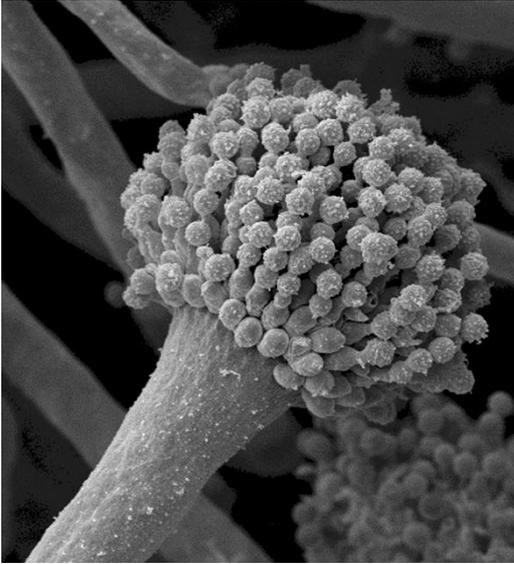


Abb. 3:
*Elektronenmikroskopische Aufnahme des Pilzes *Aspergillus fumigatus*. Auf diesem Bild ist ein Konidiophor mit zahlreichen Konidien abgebildet (mit freundlicher Genehmigung des HKI Jena, SPP 1160).*

Die Vermehrung des Pilzes *Aspergillus fumigatus* erfolgt asexuell mittels umweltresistenter Sporen (= Konidien). Unter dem Einfluss von Wasser und Nährstoffen keimen die Sporen aus und bilden Hyphen. Nach Ausbildung eines Hyphengeflechtes, auch Myzel genannt, entwickeln sich an dessen Oberfläche Konidiophoren, die an ihrem Ende ein konidientragendes Vesikel aufweisen. Die Freisetzung dieser neu gebildeten Konidien erfolgt durch Wind oder Erschütterungen. Untersuchungen haben ergeben, dass jeder Mensch täglich mehrere hundert Konidien einatmet, die aufgrund ihrer geringen Größe von 2-3 μm leicht in die Alveolen der Lunge gelangen können (Latge 1999). Für immunkompetente Menschen stellt dies allerdings keine Gefahr dar, da das angeborene Immunsystem die eingedrungenen Sporen sofort eliminiert.

Als opportunistisch-pathogener Pilz verursacht er beim Menschen Aspergillosen. Dazu gehören Allergien, wie z.B. die allergische bronchopulmonale Aspergillose, oder das Aspergillom, welches eine lokale Absiedelung des Pilzes in vorbestehende Hohlräume (wie z.B. Zysten, Nasennebenhöhlen, Lungenkavernen) bezeichnet. Weitere Manifestationen einer *Aspergillus*-Infektion sind die invasive Aspergillose (IA), sowie extrapulmonale Erkrankungen, wie zum Beispiel eine Keratitis, Sinusitis oder Endokarditis. Besonders immunsupprimierte Patienten, sowie Patienten mit vorgeschädigten Atemorganen stellen eine Hochrisikogruppe für Aspergillosen dar. Mit der stetig steigenden Zahl immunsupprimierter Patienten (z.B. durch eine chemotherapeutische Behandlung oder nach einer Stammzelltransplantation) und dem

Einleitung

immer häufigeren Einsatz immunsuppressiver Medikamente, hat der Pilz *Aspergillus fumigatus* in den letzten Jahren als opportunistischer Keim weitreichend an Bedeutung gewonnen (Wald et al. 1997). Obwohl seine Sporen nur einen minimalen Anteil aller sich in der Luft befindlichen Sporen ausmachen, in der sich u.a. auch Sporen anderer *Aspergillus*-Arten befinden, verursacht vorwiegend *Aspergillus fumigatus* invasive Aspergillosen (Morgan et al. 2005). Dies lässt darauf schließen, dass *A. fumigatus* im Gegensatz zu anderen *Aspergillus*-Arten, bestimmte Virulenzfaktoren besitzt, die ihn zu einem opportunistischen Krankheitserreger werden lassen. Während seines Wachstums produziert *A. fumigatus* zahlreiche toxische Moleküle und Enzyme, wie zum Beispiel das potente Mykotoxin Gliotoxin (Gardiner und Howlett 2005; Kwon-Chung und Sugi 2009). Das immunsuppressiv wirkende Toxin hemmt die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (Mullbacher und Eichner 1984), inhibiert die Aktivierung und Proliferation von T- und B-Lymphozyten und führt in Makrophagen und Monozyten den Zelltod durch Apoptose herbei (Waring et al. 1988; Stanzani et al. 2005). Serinproteasen und Metalloproteasen begünstigen durch Zerstörung der Lungenmatrix die Invasion dieses Erregers (Markaryan et al. 1994; Kolattukudy et al. 1993). Mittels sezernierter Katalasen und das in den Konidien enthaltene Pigment Melanin schützt sich der Keim vor reaktiven Sauerstoffspezies (Paris et al. 2003; Jahn et al. 1997; Jahn et al. 2000). *Aspergillus fumigatus*-Konidien besitzen eine hydrophobe Außenschicht, bestehend aus dem Protein RodA (*Rodlet Protein*), die einen Phagozytoseschutz darstellt, da sie fungale Zellwandbestandteile wie β -Glucan, Chitin oder Galaktomannan maskiert und die Sporen so vor dem Erkennen durch PRRs schützt (Thau et al. 1994; Amanianda et al. 2009a). In experimentellen Versuchen konnte nun gezeigt werden, dass RodA einen Schutz des Pilzes vor der über Dectin-1 und Dectin-2 vermittelten Immunantwort bietet und so das Überleben des Erregers sichert (Carrion, Steven de Jesus et al. 2013). Die Rodlet-Schicht ist zudem an der Adhäsion der Pilzsporen an die Kollagenfasern des Lungengewebes beteiligt (Thau et al. 1994). Als potente Thrombozyten-Aktivatoren (Rødland et al. 2010) bewirken die *Aspergillus*-Hyphen eine Koagulationsnekrose mit verminderter Perfusion des infizierten Parenchyms (Balloy et al. 2005). Radiologisch imponiert diese Läsion als sogenanntes „halo sign“ (Hof-Zeichen), ein milchglasartiger hämorrhagischer Hof mit geringerer Dichte um ein solide erscheinendes Infiltrat (nekrotisches Gewebe mit *A. fumigatus*-Hyphen) (Tunnicliffe et al. 2013). *Aspergillus fumigatus* besitzt zudem

zahlreiche ABC-Transporter (= *ATP-bindende Kasette*), die als Efflux-Pumpen eine Aufgabe in der Zell-Detoxifizierung („*multidrug resistance*“) erfüllen (Tobin et al. 1997; Nascimento et al. 2003).

Die große Bandbreite seiner Pathogenitätsfaktoren sichert somit sein Überleben und Agieren auch unter schlechten Bedingungen. Das Entstehen einer invasiven Aspergillose hängt somit von der Interaktion wirtsspezifischer Faktoren (Integrität des Wirtsorganismus), als auch von mikrobiellen Faktoren (Virulenzfaktoren) ab.

1.4.2. Invasive Aspergillose

Die invasive Aspergillose (IA) stellt eine sehr ernste, potentiell lebensbedrohliche Erkrankung dar. Sie wird hauptsächlich durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen, aber auch andere Mitglieder der Gattung *Aspergillus*, wie zum Beispiel *Aspergillus flavus* oder *Aspergillus terreus* können dieses Krankheitsbild verursachen (Morgan et al. 2005; Pagano et al. 2006). Durch den weitverbreiteten Einsatz von Chemotherapeutika und immunsuppressiver Medikamente stieg die Inzidenz in den letzten 20 Jahren drastisch an. Studien zufolge erhöhte sich der Anteil der IA an den Mykosen in diesem Zeitraum von 17% auf 60% (Chamilos et al. 2006a). Die Mortalität einer IA von Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation, sowie bei einer Beteiligung des ZNS kann bis zu 94% betragen (Denning und Stevens 1990).

Der Ausgangspunkt in der Genese der invasiven Aspergillose ist die Immunschwäche, die durch Neutropenie, Transplantationen (vor allem Stammzelltransplantationen), hämatologische Malignome, Chemotherapie, langfristige Hochdosiskortikoidtherapie, chronisch-granulomatöse Erkrankung oder AIDS verursacht werden kann (Kousha et al. 2011). So erkrankten 5-25% der Patienten, die an einer akuten Leukämie leiden, zusätzlich an einer IA (Latge 1999). Nach einer allogenen Stammzelltransplantation beträgt die kumulative Inzidenz 2,3%, das Risiko nach einer autologen HSCT (*Hematopoietic stem cell transplantation* = hämatopoetische Stammzelltransplantation) ist dagegen relativ gering, nur etwa 0,5% (Morgan et al. 2005). Eine gleichzeitige Infektion mit CMV (Cytomegalievirus) erhöht das Risiko nach einer allogenen HSCT an einer invasiven Aspergillose zu erkranken (Nichols et al. 2002).

Wie bereits beschrieben, werden die *Aspergillus*-Konidien aerogen übertragen und

Einleitung

eingeatmet. Exogene Streu- und Infektionsquellen sind unter anderem kontaminiertes Wasser, Topf- und Zimmerpflanzen, kontaminierte Nahrungsmittel oder Baumaßnahmen (Lass-Flörl und Dierich 2004). In den Alveolen der menschlichen Lunge kommt es zu einer Adhäsion der Sporen an die Basallamina des Lungengewebes (Bromley und Donaldson 1996) und die Auskeimung der Konidien. Nach Ausbildung zahlreicher Hyphen, beginnt der Pilz invasiv in das Lungengewebe einzuwachsen und in Lungengefäße einzubrechen (Kradin und Mark 2008). Diese Angioinvasion ist ein zentrales Merkmal in der IA-Pathogenese, einhergehend mit Blutungen und thrombotischen Ereignissen. Die daraus resultierende Streuung erfolgt per continuitatem oder hämatogen in extrapulmonale Organe, wie Gehirn, Nieren, Haut, Herz oder Leber (Denning 1998).

Die klinischen Zeichen einer invasiven Aspergillose sind unspezifisch und einer Bronchopneumonie sehr ähnlich. Die Lunge stellt den Primärfokus der Erkrankung dar. Bedingt durch die Myzelbildung und das ausgeprägte angioinvasive Verhalten des Pilzes, sind zu Beginn in Verbindung mit therapierefraktärem Fieber pulmonale Symptome wie produktiver Husten, Dyspnoe, Hämoptysen und pleuritische Schmerzen zu beobachten (Soubani 2002). Sehr selten (< 7%) kommt es zur Ausbildung einer Pseudomembranösen Aspergillus Tracheobronchitis (PMATB), die durch Ulzerationen und nekrotische Veränderungen der Trachea und angrenzender Bronchien, bedingt durch die Invasion des Erregers *Aspergillus*, gekennzeichnet ist (Kemper et al. 1993). In vereinzelt Fällen können auch andere Organsysteme den Ausgangspunkt einer IA darstellen. So wurde eine primäre kutane Aspergillose durch Inokulation von *Aspergillus flavus* mittels eines intravenösen Katheters beschrieben (Allo et al. 1987).

Eine gefürchtete Komplikation der IA ist die zerebrale Aspergillose. Sie tritt in 10-20% der Fälle (Denning 1998) mit einer Mortalitätsrate von bis zu 94% auf (Denning und Stevens 1990). In der Mehrzahl der Fälle ist die Entstehung einer zerebralen Aspergillose durch die hämatogene Dissemination des Erregers bedingt. Infolge der ausgeprägten Angioinvasion kommt es zu intrazerebralen Blutungen und thrombotischen Ereignissen mit folgender Infarzierung und Nekrose des betroffenen Gewebes (Boes et al. 1994). Die klinische Symptomatik ist auch hier sehr unspezifisch und nicht pathognomonisch für eine zerebrale Aspergillose. So treten Cephalgien, Meningismus, therapierefraktäres

Einleitung

Fieber, Übelkeit, Erbrechen, zerebrale Krampfanfälle und fokale neurologische Defizite auf (Jantunen et al. 2003; Boes et al. 1994; Walsh et al. 1985).

Für eine positive Prognose und das Überleben einer IA ist eine frühzeitige Therapie unerlässlich. So war ein später Therapiebeginn (10 Tage nach Auftreten der ersten klinischen Symptome) mit einer Mortalitätsrate von 90% verbunden, die durch einen frühen Einsatz antimykotischer Medikamente auf 41% reduziert werden konnte (Eiff et al. 1995).

Die sichere Diagnosestellung einer invasiven Aspergillose gestaltet sich trotz der Weiterentwicklung und Erforschung zahlreicher Methoden immer noch schwierig. Eine definitive und sichere Diagnose kann nur über einen histopathologischen und mikroskopischen Nachweis von *Aspergillus*-Hyphen in Biopsien, die mittels Thorakoskopie oder Thorakotomie gewonnen wurden gestellt werden (Kousha et al. 2011). Dies gelingt meist nur post mortem, da die Gewinnung der Proben mit einem sehr hohem Risiko für den schwerkranken Patienten verbunden ist.

Bei Verdacht auf eine invasive Aspergillose wird die computertomographische Untersuchung mittels HRCT (*high resolution computerised tomography*)-Scan empfohlen (DGHO 2014). So können im Frühstadium der IA kleine pleura- und gefäßnahe noduläre Infiltrate mit einem milchglasartig getrübbtem Randsaum („*halo signs*“) und in späteren Stadien eine radiographische Luftsichel („*air-crescent sign*“), bezeichnend für nekrotische Veränderungen mit beginnender Einschmelzung, nachgewiesen werden (Caillot et al. 2001a). Diese sind zwar nicht pathognomonisch für eine IA, aber im Kontext der klinischen Symptomatik, Immunstatus und anderen Befunden dennoch wegweisend (Caillot et al. 2001b; Barton 2013; Tunnicliffe et al. 2013; Kawel et al. 2011).

Die Anzucht des Erregers aus Patientenmaterial (Sputum, Bronchoalveoläre Lavage) ist möglich, gelingt jedoch nur selten und verfügt über eine sehr geringe Sensitivität (Tarrand et al. 2003; Barton 2013). Eine positive Kultur differenziert nicht zwischen Kolonisation und Infektion.

Eine über den Zeitraum von 15 Jahren durchgeführte retrospektiven Autopsie-Studie legte dar, dass nur 25% der invasiven Pilzinfektionen zu Lebzeiten mittels konventioneller kultureller Methoden diagnostiziert wurden (Chamilos et al. 2006b).

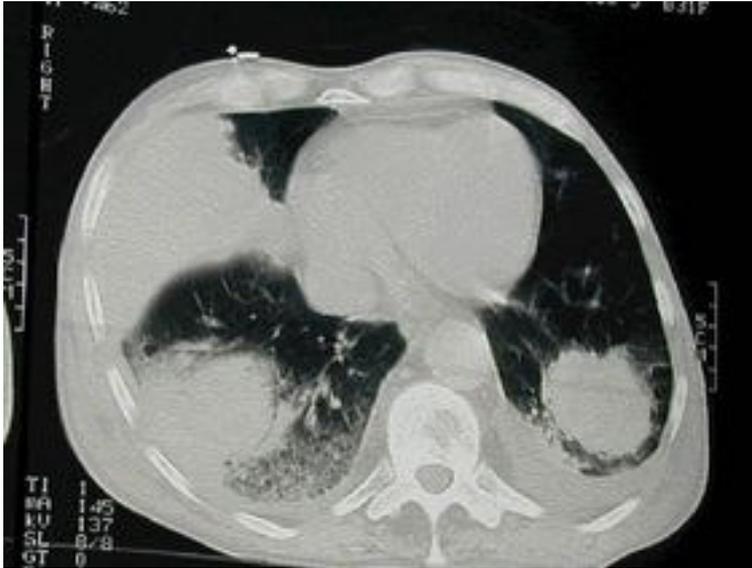


Abb. 4: Invasive pulmonale Aspergillose mit Halo-Zeichen im CT-Thorax (mit freundlicher Genehmigung des Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin III, Kardiologie, Angiologie, Pneumologie)

Die Bestimmung pilzspezifischer Zellwandbestandteile, wie Galaktomannan (GM) und beta-(1,3)-d-glucan (BDG) im Serum oder BAL des Patienten ist ebenfalls möglich (Miyazaki et al. 1995; Stynen et al. 1992). So hat sich der Nachweis von Galaktomannan (GM) in der BAL in zahlreichen Studien als ein sensitiver diagnostischer Marker im frühen Stadium der IA erwiesen und wird klinisch eingesetzt (Nguyen et al. 2011; Hsu et al. 2010; Guo et al. 2010), jedoch können unter einer Therapie mit Piperacillin-Tazobactam falsch positive Ergebnisse auftreten (Sulahian et al. 2003). In einer retrospektiven Studie zur Diagnose invasiver Pilzkrankungen hämatologischer Patienten mittels BDG-Test konnte bei zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen eine Spezifität und Sensitivität von 98,9% und 49,6% erreicht werden (Lamoth et al. 2012). In Kombination mit weiteren diagnostischen Methoden kann dieser Test in der Diagnosefindung hilfreich sein.

Der Einsatz PCR-basierter Methoden zum Nachweis von *Aspergillus*-DNA in BAL-Flüssigkeit und Serum von Patienten ist Gegenstand aktueller Forschungen und zeigt sich als ein schnell durchführbares und sensitives Verfahren (Khot et al. 2008). Jedoch konnte

Einleitung

diese Nachweismethode noch nicht als Routinetest etabliert werden, da bis heute keine standardisierten und validierten Protokolle existieren (Steinbach 2013).

Um einen Standard in der Diagnostik invasiver Pilzkrankungen zu erhalten, hat die European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSD) Konsensus-Gruppe verbindliche Richtlinien erstellt (Pauw et al. 2008). Nach diesen Kriterien, die sich aus patientenbezogenen, klinischen und mykologischen Faktoren zusammensetzen, kann die Diagnose einer möglichen, wahrscheinlichen oder erwiesenen IA gestellt werden.

Eine rechtzeitige und zuverlässige Diagnose der invasiven Aspergillose ist jedoch in der klinischen Praxis immer noch zeitaufwendig und schwierig. Jedoch muss eine antimykotische Therapie beim ersten Verdacht bzw. Hinweis begonnen werden, da hierdurch die Letalität deutlich gesenkt werden kann (Caillot et al. 1997). So wird die Einleitung einer antimykotischen Therapie bei neutropenischen Patienten mit refraktärem Fieber unter einer antibiotischen Therapie nach 3-5 Tagen empfohlen (Mousset et al. 2014). Diese empirische Therapie ist jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen auf Seiten des Patienten und massiven Kosten verbunden (Luong et al. 2013). Eine präemptive Therapie ist derzeit aufgrund der fehlenden Sensitivität und/oder Spezifität diverser Untersuchungsmethoden nicht zu empfehlen.

Nach der derzeit gültiger Leitlinie für die Therapie der invasiven Aspergillose bei Patienten mit hämatologischer und onkologischer Grunderkrankung gilt Voriconazol als Mittel der Wahl (Herbrecht et al. 2002; Walsh et al. 2008). Bei Nichtansprechen, Unverträglichkeit oder Resistenz kann liposomales Amphotericin B, Amphotericin B Lipidkomplex, Caspofungin, Micafungin, Posaconazol und Itraconazol als Alternativtherapeutikum gegeben werden (DGHO; Zhang et al. 2014). Die Medikation sollte in der gesamten Neutropeniephase und bis zur kompletten Remission erfolgen (Mousset et al. 2014).

Eine 2002 durchgeführte Vergleichsstudie zur Therapie invasiver Aspergillosen ergab klinische Erfolgsraten (komplettes oder partielles Ansprechen) 12 Wochen nach Studienbeginn von 52,8% in der Voriconazol-Gruppe und 31,6% im Amphotericin B-Arm (Herbrecht et al. 2002). Nach 12 Wochen überlebten signifikant mehr Patienten in

Einleitung

der Voriconazol-Gruppe, nämlich 71% vs. 58% der Vergleichsgruppe (Herbrecht et al. 2002).

Jedoch wurden in den letzten Jahren zunehmend *Aspergillus fumigatus*-Isolate mit Resistenzen gegen Azol-Antimykotika beschrieben (Robert Koch-Institut (RKI)). Diese Resistenz wird unter anderem durch verschiedene Mutationen und Tandem-Repeats in der Promotorregion des Gens *cyp51A* von *Aspergillus fumigatus*, das für das Enzym Lanosterol-14- α -Demethylase kodiert, verursacht (Vermeulen et al. 2013; Verweij et al. 2009). Azol-Antimykotika hemmen dieses Enzym und blockieren dadurch die Synthese des essenziellen Zellwandbausteins Ergosterol. Paul und Kollegen untersuchten den möglichen Zusammenhang der Expression von ABC-Transportern bei *Aspergillus fumigatus* und einer Azolresistenz (Paul et al. 2013). *Aspergillus fumigatus*-Mutanten, die das kodierende Allel für die spezifischen ABC-Transporter nicht besaßen, zeigten sich Azol-sensitiv (Paul et al. 2013). Auf Empfehlung des Robert-Koch-Institutes sollte daher vor einer anstehenden antimykotischen Therapie eine Resistenztestung bei allen *Aspergillus-fumigatus*-Isolaten durchgeführt werden (Robert Koch-Institut (RKI)). Eine chirurgische Intervention bei einer IA ist ebenfalls möglich. Eine Teilresektion der Lunge wird vor allem bei Patienten mit massiven Hämoptysen oder Befall der großen pulmonalen Gefäße durchgeführt (Walsh et al. 2008). Der Einsatz verschiedener Immuntherapeutika wie GM-CSF, Interferone oder Zytokine führte bisher nicht zum erhofften Erfolg und konnte die Prognose immunsuppressiver Patienten mit einer IA nicht merklich verbessern.

Zudem leistet die Prophylaxe auch einen wichtigen Beitrag. Dies beinhaltet beispielsweise den Einsatz bestimmter raumluftechnischer Anlagen zur Sporenreduktion, sowie die Unterbringung der Patienten in Isolierzimmern mit regelmäßiger Desinfektion (Lass-Flörl und Dierich 2004). Risikopatienten wird eine Chemoprophylaxe mit Posaconazol oder Voriconazol empfohlen, jedoch sollte die Behandlung bei einer *Aspergillus*-Infektion mit einem aus einer anderen Klasse stammenden Antimykotikum erfolgen (Mousset et al. 2014; DGHO). In einer Vergleichsstudie konnte der prophylaktische Nutzen von Posaconazol demonstriert werden. So war die Inzidenz und die Mortalität der IA in der mit Posaconazol vorbehandelten Gruppe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe niedriger (Michallet et al. 2011).

Ende 2014 wird von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) eine neue Leitlinie zur Diagnose und Therapie invasiver Aspergillosen verabschiedet, da „neue diagnostische Verfahren, neue Antimykotika und in jüngerer Vergangenheit abgeschlossene Therapiestudien [...] eine systematischen Evaluation der klinischen Daten und Empfehlungen für die klinische Praxis erforderlich“ machen (AWMF).

1.5. Immunmodulatoren

Der Begriff Immunmodulation bezeichnet die Beeinflussung des Immunsystems mittels Stimulation oder Suppression. Es können körpereigene und körperfremde Immunmodulatoren (*Immune Response Modifier*, IRM) unterschieden werden (Mutschler 2008). Die vom Körper synthetisierten Zytokine (siehe 1.1.2.) finden in der Therapie zahlreicher Erkrankungen Anwendung. So werden beispielsweise die rekombinant hergestellten Interferone unter anderem bei der Behandlung der chronischen Hepatitis B und C, der Multiplen Sklerose und Chronisch-myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt (Herold 2013). Die Gruppe der körperfremden Immunmodulatoren beinhaltet zum einen pflanzliche Stoffe, wie die Substanz *Echinacea purpurea*, die zur vorbeugenden und unterstützenden Therapie grippaler Infekte eingesetzt wird, sowie zahlreiche synthetische Substanzen, wie zum Beispiel die Immunsuppressiva Tacrolimus, Azathioprin und Methotrexat, sowie die beiden in dieser Arbeit eingesetzten Verbindungen Resiquimod und Alum (Mutschler 2008).

1.5.1. Resiquimod

Bereits in den 1980er Jahren entwickelte das Pharmaunternehmen 3M Pharmaceuticals® niedermolekulare Verbindungen, die eine antivirale Wirkung gegenüber Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) aufwiesen (Bernstein und Harrison 1989). Diese Familie der Imidazoquinoline, einschließlich Imiquimod und Resiquimod besitzt ein ausgeprägtes immunstimulatorisches Potential (Gibson et al. 2002). 2002 konnte gezeigt werden, dass der Effekt von Imiquimod auf Immunzellen über TLR7 vermittelt wird, während Resiquimod (R848) diese Wirkung über TLR7 und TLR8 vermittelt (Hemmi et al. 2002;

Einleitung

Jurk et al. 2002). Resiquimod stellt ein potenteres und löslicheres Analogon von Imiquimod dar und induziert im Vergleich zu Imiquimod eine 50 bis 100-fach gesteigerte Zytokinantwort (Tomai et al. 1995). Die immunstimulatorische Wirkung wird dabei intrazellulär durch Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalwegs erzielt (Hemmi et al. 2002). Resiquimod induziert bei dendritischen Zellen die Produktion zahlreiche Zytokine wie IL-6, IL-12, TNF- α , und IFN- γ (Ahonen et al. 1999). Auch die Maturation und Differenzierung humaner DCs wird von R848 beeinflusst (Assier et al. 2007; Ahonen et al. 1999). Darüber hinaus regt Resiquimod B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion und vereinzelt zum Klassenwechsel an (Bishop et al. 2000; Tomai et al. 2000). R848 ist zudem in der Lage die über TH1 vermittelte Zytokinantwort (IFN- γ) zu steigern und gleichzeitig der TH2-Antwort entgegenzuwirken (Wagner et al. 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Resiquimod über TLR8 regulatorische T-Zellen (Suppressor-T-Zellen) inhibieren kann (Peng et al. 2005). Diese herausragenden Fähigkeiten der Imidazoquinolin-Familie, insbesondere Resiquimod, das angeborene und adaptive Immunsystem zu aktivieren, versucht man sich auf dem Gebiet der Immuntherapie zu Nutze zu machen. Sein Analogon Imiquimod wird bereits erfolgreich in der Klinik als topisches Medikament bei der Behandlung von Feigwarzen, aktinischer Keratosen und Basalzellkarzinomen eingesetzt (Karve et al. 2008; A Gaspari et al. 2009; Schulze et al. 2005; Hengge und Cusini 2003). Resiquimod befindet sich derzeit noch in verschiedenen klinischen Studien. In einer 2008 durchgeführten Studie zur topischen Therapie aktinischer Keratosen mittels Resiquimod-Gel kam es bei 77–90% der Patienten zu einer Remission, jedoch waren im Vergleich zu Imiquimod mehr systemische Nebenwirkungen wie Fatigue, Myalgien, Arthralgien und Rigor zu beobachten (Szeimies et al. 2004). In zahlreichen Studien konnten antitumorale Effekte, wie Hemmung der Angiogenese, Verstärkung der NK-Zellen-vermittelten Zytotoxizität, sowie die direkte Apoptose maligner Zellen mittels Stimulation von TLR7 und TLR8 gezeigt werden (Adams 2009; Kawai und Akira 2007, 2011).

Resiquimod verfügt zudem über eine antivirale Aktivität, indem es unter anderem mittels IFN- γ die Virusreplikation infizierter Zellen stoppt und mit Hilfe von IL-12 zytolytische T-Zellen aktiviert (Hahn 2009). Eine Phase-IIa-Studie zur Therapie chronischer Hepatitis C Infektionen durch oral verabreichtes Resiquimod musste trotz einer transienten Reduktion der Viruslast, wegen schwerer Nebenwirkungen beendet werden (Funk et al.

2014). Diese teils massiven systemischen Nebenwirkungen sind durch die höhere Zytokinausschüttung durch Resiquimod im Vergleich zu Imiquimod zu erklären (Tomai et al. 1995).

Eine mögliche Verwendung von Resiquimod als Adjuvans in Impfstoffen wird zurzeit getestet und stellt einen sehr hoffnungsvollen und viel versprechenden Ansatz dar. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass Resiquimod als Vakzin-Adjuvans gekoppelt an Ovalbumin (OVA) eine TH1 abhängige Antwort mit gesteigerter IgG2-Produktion fördert und TH2 abhängiges IgE senkt (Vasilakos et al. 2000). Eine weitere Vakzinierungsstudie untersuchte die Wirkung von Imiquimod und Resiquimod als Adjuvans in Verbindung mit einem DNA-Vakzin. Resiquimod zeigte in einer 10-fach niedrigeren Dosis im Vergleich zu Imiquimod eine CD4⁺ - und CD8⁺-spezifische T-Zell-Antwort mit einer gesteigerten Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 (Thomsen et al. 2004). So konnte ebenfalls eine aktuell durchgeführte Studie die Wirksamkeit von Resiquimod in Verbindung mit CpG-ODN (CpG-Oligonukleotide; ein TLR9-Ligand) als Adjuvantien in Kombination mit dem *Schistosoma japonicum* DNA-Vakzin pVAX1-Sj26GST demonstrieren (Wang et al. 2013). Die Kombination von Resiquimod und CpG führte in pVAX1-Sj26GST-vakzinieren Mäusen zu einer erhöhten IgG- und IgG2a-Antwort und einer vermehrten Produktion von IFN- γ und TNF- α , sowie einer Reduktion regulatorischer T-Zellen (Wang et al. 2013).

1.5.2. Alum

Seit über 80 Jahren werden Aluminiumsalze in Form von Aluminiumhydroxid als Adjuvantien in Impfstoffen eingesetzt (Aimanianda et al. 2009b). Alexander T. Glenny und Kollegen beschrieben erstmals 1926 die adjuvanten Eigenschaften von Aluminium (Alum) (Glenny et al. 1926). Sie zeigten, dass mit Kaliumaluminiumsulfat präzipitiertes Diphtherie-Toxoid eine höhere Antikörperproduktion im Vergleich zu löslichem Toxoid zeigt (Glenny et al. 1926). Seitdem finden Aluminiumverbindungen in zahlreichen Impfstoffen als Adjuvantien Verwendung (Hogenesch 2012). Die Wirkweise von Aluminium ist in vielen Bereichen noch nicht ausreichend geklärt, allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass Alum eine TH2-abhängige Produktion von IL-4 und IL-5 stimuliert und IgE und IgG1 induziert (Gupta 1998; Aimanianda et al. 2009b; Marrack et

al. 2009). Außerdem zeigen antigenpräsentierende Zellen mittels Alum-Stimulus eine erhöhte Antigenaufnahme und -präsentation (Ghimire et al. 2012). Alum wird von phagozytierenden Zellen aufgenommen und führt über eine lysosomale Destabilisierung zur Zerstörung der Zelle und Freisetzung von DNA (Hornung et al. 2008). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese über Alum freigesetzte DNA die Antigenpräsentation dendritischer Zellen fördert und deren Interaktion mit $CD4^+$ -Zellen verlängert (McKee et al. 2013).

Der erstmals von Glenny beschriebene Depoteffekt (Glenny et al. 1926) wird für die adjuvante Wirkungsweise von Aluminium als wichtig angesehen. Hutchison und Kollegen konnten jedoch an einem Mausmodell zeigen, dass die Entfernung der Injektionsstelle 2 Stunden nach der Applikation von Antigen plus Alum keine Auswirkung auf die Antikörperproduktion und T-Zell-Antwort hatte (Hutchison et al. 2012).

Bislang galt das Aluminium als ein sicheres Adjuvans. In den letzten Jahren ist Aluminium aufgrund seiner bekannten Neurotoxizität (Krewski et al. 2007) wiederholt mit negativen Schlagzeilen behaftet. Dennoch lassen laut aktueller Sicherheitsinformation des Paul-Ehrlich-Instituts „wissenschaftliche Daten [...] nicht auf eine Gefährdung von Kindern oder Erwachsenen durch eine subkutane Immuntherapie mit aluminiumhaltigen Adjuvanzen schließen“ (PEI 2014).

1.6. Zielsetzung

Durch beträchtliche Fortschritte in der Medizin und dem damit verbundenen demographischen Wandel ist ein stetiger Anstieg immunsuppressiver Patienten zu beobachten. Diese Risikogruppe ist aufgrund ihres Immunstatus für Infektionskrankheiten besonders anfällig. So konnten zwar durch Impfprogramme und den Einsatz antimikrobieller Substanzen klassische Infektionskrankheiten wesentlich zurückgedrängt werden, doch die Zahl opportunistischer invasiver Mykosen, vornehmlich bei immunsupprimierten Patienten, nahm kontinuierlich zu (Rolston 2001). So ist auch die invasive Aspergillose, trotz der sich immer weiter verbessernden Diagnostik und Behandlung, eine immer noch sehr ernstzunehmende und mit hoher

Einleitung

Mortalität verbundene Erkrankung. In der Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* bedingten Infektionen kommt den dendritischen Zellen, im speziellen den aus Monozyten generierten dendritischen Zellen eine bedeutsame Funktion zu. Diese durch DCs aktivierte Immunantwort wird unter anderem über Toll-like-Rezeptoren vermittelt und resultiert in einer messbaren Produktion zahlreicher Zytokine und Aktivierung des adaptiven Immunsystems. In vorangegangenen Studien konnte die Wirkungsweise von Resiquimod auf dendritische Zellen über die Bindung an TLR7 und TLR8 demonstriert werden (Hemmi et al. 2002; Jurk et al. 2002; Ahonen et al. 1999).

In dieser vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Resiquimod und Alum auf humane moDCs bei einer *Aspergillus*-Infektion untersucht. Es wurden humane moDCs mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen stimuliert und die Zytokinproduktion in An- und Abwesenheit von Resiquimod und Alum mittels Enzymimmunoassay gemessen. Dabei war von besonderem Interesse, ob die beiden Immunmodulatoren einen Einfluss auf die Zytokinproduktion humaner moDCs haben. Desweiteren wurde der Einfluss von Resiquimod auf die Maturation humaner moDCs bei einer *Aspergillus*-Infektion analysiert. Es erfolgte die Inkubation von moDCs mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen und die anschließende durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 im Vergleich zu moDCs, die zusätzlich mit R848 inkubiert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Immunmodulatoren Resiquimod und Alum die Immunantwort bei einer *Aspergillus*-Infektion verstärken und somit als potentielle effektive Adjuvantien in der Immuntherapie Verwendung finden können.

2. Material

2.1.1. Pilzstamm

Aspergillus fumigatus- Stamm: ATCC 46645

Konzentration $1 \times 10^8 / \mu\text{l}$

Der Stamm wurde dankenswerter Weise von dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Reagenzien

RPMI- Medium 1640	GIBCO, Invitrogen Corp. (Karlsruhe, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Roth (Karlsruhe, D)
Gentamyinsulfat (Refobacin 80mg)	Merck (Darmstadt, D)
HBSS Hanks' Balanced Salt (1 x)	GIBCO, Invitrogen Corp. (Karlsruhe, D)
EDTA 0.5 M (pH 8)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Biocoll separating solution	Biochrom AG (Berlin, D)
Trypanblau (0,4 %)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Lipopolysaccharid (100 $\mu\text{g/ml}$)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Resiquimod [R848] (125 $\mu\text{g/ml}$)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Potassium aluminium sulfate [Alum](1mg/ml)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Tween 20	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
10x PBS	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Ampuwa – steriles Wasser	Fresenius (Bad Homburg, D)
Trizma-Base 99,9 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Streptavidin- HRP	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Substrat Reagent Pack	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Material

2.1.3. Puffer, Lösungen und Medien

2.1.3.1. Pufferlösungen für ELISA

ELISA-Wasch-Puffer	1 l 1x PBS 0,05 % Tween-20 pH 7,4
ELISA-Assay-Puffer	8,0 g NaCl 1,13 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl 5 g BSA 1 ml Tween 20 ad 1 l mit Aqua demin. (pH 7,4)
Streptavidin- Puffer	200 ml 1x PBS 1% BSA
Erstantikörper- Puffer	1x PBS
Zweitantikörper- Puffer	20 mM Trizma Base 150 mM NaCl 0,1% BSA
ELISA-Standard- Puffer	50 ml 1x PBS 0,1% BSA
ELISA- Stopp- Lösung	1M Schwefelsäure
Substratlösung	5 ml Reagenz A + 5 ml Reagenz B (1 : 1)

Material

2.1.3.2. Pufferlösungen für die FACS-Analyse

FACS-Flow/ Clean/ Rinse	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACS-Waschpuffer	HBSS + 10% FCS

2.1.3.3. Medien

<i>Aspergillus fumigatus</i> - Medium	500 ml RPMI 1640 + 5% FCS
PBMC-Medium	500 ml RPMI 1640 + 10% FCS + 1,5 ml Refobacin
Monozyten-Medium	500 ml RPMI 1640 + 10% FCS + 1,5 ml Refobacin
Hanks-Medium	500 ml HBSS + 2ml EDTA + 10% FCS

2.1.4. Antigene

GM-CSF (250 µg pulverisiert in 1 ml HBSS)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
IL-4 (10 µg pulverisiert in 1 ml HBSS)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinantes humanes CXCL10	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinantes humanes CCL20	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinantes humanes IL-1 β	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinantes humanes IL-6	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinantes humanes IL-10	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1. FACS-Antikörper

Mouse IgG _{2a} FITC	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Mouse IgG ₁ PE	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Anti-human-CD-14-FITC	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Material

Anti-human-CD-1a-FITC	DakoCytomation (Eching, D)
PE Mouse Anti-human-CD-80	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
PE Mouse Anti-human-CD-83	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
PE Mouse Anti-human-CD-86	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
PE Mouse Anti-human-CD-40	Beckman Coulter (Krefeld, D)

2.1.5.2. ELISA-Antikörper

Monoclonal anti-human CCL20 / CXCL10	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Biotinylated anti-human CCL20 / CXCL10	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Monoclonal anti-human IL-10	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Biotinylated anti-human IL-10	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Monoclonal anti-human IL-1 β	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Biotinylated anti-human IL-1 β	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Monoclonal anti-human IL-6	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Biotinylated anti-human IL-6	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.6. Reaktionskits

CD14 MicroBeads (human)	Miltenyi Biotech (Berg.-Gladb., D)
Human TNF- α Cyto-Set (ELISA)	Biosource (Darmstadt, D)

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

MACS Trennsäulen (LS-Säulen)	Miltenyi Biotech (Berg.-Gladb., D)
96 Well ELISA medium-binding-Microplatte	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
ELISA-Plattenklebefolien	R&D Systems (Minneapolis, USA)
6, 24 und 48 Well Zellkulturplatten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellschaber	SPL Life Sciences (Korea)
T-75 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
15 ml und 50 ml Tubes	Falcon / BD (Heidelberg, D)
FACS- Röhren 5 ml	Falcon / BD (Heidelberg, D)

Material

Pasteurpipetten (steril einzelverpackt, 3ml)	Hartenstein (Würzburg, D)
Serologische Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Multikanalpipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym (Hess. Oldendorf, D) StarLab (Ahrensburg, D)
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Neubauerkammer	Hartenstein (Würzburg, D)

2.1.8. Geräte

Brutschrank HERAcell 240	Thermo/Kendro (Schwerte, D)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, D)
ELISA-Reader	BioRad GmbH (Hercules, USA)
FACSCalibur	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gefrierschrank -20 C	Liebherr (Ulm, D)
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotech (Berg.-Gladb., D)
Magnetrührer Monotherm	Variomag (Schwerte, D)
Mikroskope Eclipse 50i, TS 100	Nikon (Düsseldorf, D)
pH-Meter pH211	Hanna Instruments (Michigan, USA)
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann (Eberstadt, D)
Präzisionswaage GF-2000	A&D Instruments (Tokyo, J)
Sterilwerkbank Herasafe HS 18	Kendro Laboratory (Hanau, D)
Wasserbad Memmert WB 7	Memmert (Nürnberg, D)
Multifuge 3S und 3S-R	Kendro Laboratory (Hanau, D)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (N. York, USA)

2.1.9. Software

FlowJo v.10	TreeStar Inc. USA
Microplate Manager	BioRad (Hercules, USA)
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corp. (Redmond, USA)
Statistica v. 10	StatSoft, Inc. (USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturelle Methoden

2.2.1.1. Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Zur Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs = peripheral blood mononuclear cells) aus dem Blut wurden sogenannte Zapfen aus der transfusionsmedizinischen Abteilung des Uniklinikum Würzburg aufgearbeitet. Diese Zapfen enthalten ein Leukozytenkonzentrat gesunder Blutspender, welches bei der Leukozytendepletion von Blutpräparaten aufgefangen wird.

Der Inhalt des Zapfens eines Blutspenders wird mit Hanks-Medium auf 100 ml aufgefüllt und gemischt. Von diesem Gemisch werden jeweils 25 ml langsam auf 20 ml raumtemperatur-warmes Biocoll-Reagenz pipettiert. Dieses Biocoll-Reagenz enthält Ficoll[®], ein Polysucrosepolymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 Dalton, welches die Blutzellen mit Hilfe der Zentrifugation nach ihrem Dichtegradienten auftrennt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse und bei Raumtemperatur haben sich die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen dem Plasma und dem Biocoll-Reagenz gesammelt, während sich die Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten am Boden des Röhrchens abgesetzt haben. Mit einer sterilen Pasteurpipette wird nun die Interphase jedes Gradientenröhrchens abgenommen, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und dieses mit Hanks-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 1300 rpm und 4°C. Nach diesem Waschschrift wird der Überstand dekantiert, das Zellpellet aufgeschabt, mit 50 ml Hanks-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgt eine erneute Resuspendierung des Pellets mit 50 ml Hanks-Medium.

2.2.1.2. Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer werden die PBMCs quantifiziert. Diese Kammer besteht aus einem speziellen Objektträgerglas für die Durchlichtmikroskopie, auf dessen Kammerboden ein besonderes Zählgitter eingraviert ist. Dieses spezielle Zählgitter

Methoden

besteht aus neun großen Quadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm^2 . Die vier Eckquadrate sind nochmals in 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von $0,25 \text{ mm}$ unterteilt.

Zur Vorbereitung der Zählkammer wird das Deckglas vorsichtig auf die zuvor angefeuchteten Stege der Kammer geschoben bis sogenannte „Newtonringe“ zu sehen sind, die den korrekten Sitz des Deckglases anzeigen und so die Tiefe der Neubauer-Zählkammer auf $0,1 \text{ mm}$ eingestellt ist. Somit beträgt das Volumen eines jeden der vier großen Eckquadrate $0,1 \mu\text{l}$, welche sich aus der Multiplikation der Fläche von 1 mm^2 mit der Tiefe von $0,1 \text{ mm}$ ergibt.

Es werden $10 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit Hanks-Puffer 1:2 verdünnt. Anschließend erfolgt eine 1:2-Verdünnung mit dem Azofarbstoff Trypanblau. Dieser dient hier der Vitalitätsprüfung, um nicht vitale Zellen, die den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen, von der Zellzählung ausschließen zu können.

Mit der gefärbten Zellsuspension wird nun die Zählkammer beschickt, indem man vorsichtig am Rand des Deckglases einen Tropfen der Zellsuspension pipettiert, der sich durch die Kapillarkräfte in die Kammer saugt.

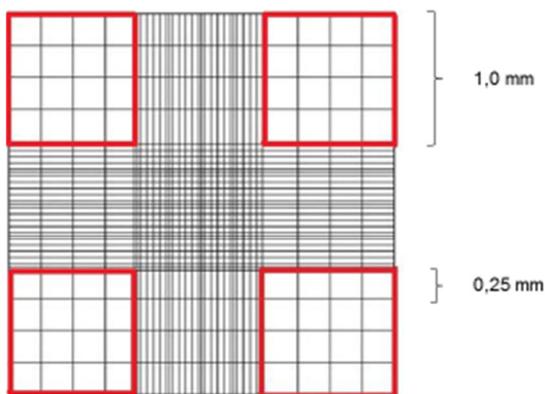


Abb. 5: Zählgitter einer Neubauer-Kammer

Es werden nun die vier äußeren Eckquadrate ausgezählt (rot markierte Quadrate in Abb. 5) und aus den vier Zählungen der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Multiplikation des Mittelwertes, Verdünnungsfaktor, Kammerfaktor und

Gesamtvolumen. Der Kammerfaktor beträgt $1/10^4$ (um von dem Einschlussvolumen auf 1 ml umzurechnen).

2.2.1.3. Magnetische Zellseparation von CD14⁺-Zellen

Die verschiedenen Leukozytenklassen tragen auf ihrer Oberfläche Differenzierungsantigene, die eine Aufgliederung und Charakterisierung der Zellen erlauben. Hier hat sich das CD-System („*cluster of differentiation*“) für die Bezeichnung von Leukozyten-Markerantigenen durchgesetzt. Dieses Merkmal findet in der folgenden Zellseparation mittels MACS[®]-System (*Magnetic Activated Cell Sorting*) Anwendung. Dabei werden Magnetpartikel-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenantigene, sogenannte Microbeads eingesetzt. Die hier zu isolierenden Monozyten besitzen auf ihrer Oberfläche das Antigen CD14 und sind somit CD14-positiv. Gibt man nun CD14-Microbeads zu einer Zellsuspension, binden diese Antikörper an das spezifische Oberflächenantigen der Monozyten. Diese Zellsuspension wird auf eine Trennsäule pipettiert, die einen Kern aus Stahlwolle (magnetische Matrix) enthält und auf einem Ständer mit integriertem Magneten platziert wird. Die mit den CD14-Microbeads beladenen Zellen werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen passieren. Durch Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können anschließend die separierten Zellen eluiert werden.

Im Anschluss an die oben beschriebene Zellzählung berechnet man die benötigte Anzahl an MACS[®]-Säulen. Für eine effiziente Zelltrennung werden maximal $2,5 \times 10^8$ Zellen pro Trennsäule eingesetzt, d.h. durch Division der Gesamtzellzahl der PBMCs durch die maximale Anzahl der Zellen pro Säule erhält man die Menge der einzusetzenden MACS[®]-Säulen.

Die PBMC-Zellsuspension wird bei 1300 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 850 µl Hanks-Puffer pro benötigter Säule resuspendiert. Diese Zelllösung wird nun auf 50 ml-Falcons, entsprechend der Säulenzahl, aufgeteilt und nach Zugabe von jeweils 150 µl CD14⁺-Microbeads 15 min bei 4°C inkubiert.

LS-Trennsäulen (*LS-Separating Columns*) werden in den MACS[®]-Separator eingesetzt und einmal mit jeweils 3 ml kaltem Hanks-Puffer vorgespült.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit Hanks-Puffer gewaschen, das Pellet mit jeweils 2000 µl Hanks-Puffer resuspendiert und diese Suspension anschließend auf die vorgespülten Trennsäulen pipettiert. Nachdem die Zellsuspension die Trennsäule durchlaufen hat, wird die Säule drei Mal mit Hanks-Puffer gewaschen. Nach diesem Waschschrift befinden sich nun nur noch CD14⁺ Zellen in der Trennsäule. Um diese zu eluieren, entnimmt man die Säule aus dem MACS[®]-Separator und somit aus dem Magnetfeld und setzt sie jeweils auf ein 15 ml-Tube. Durch Zugabe von jeweils 2 ml Hanks-Puffer auf jede Säule kann man nun die positiv selektierten CD14⁺ Monozyten mit einem zugehörigen Stempel in das Tube drücken. Im Anschluss werden die Monozyten mittels der Neubauer-Zählkammer quantifiziert (siehe 2.2.1.2.).

2.2.1.4. In vitro Generation von moDCs

In vitro können Monozyten mit Hilfe bestimmter Zytokine stimuliert und zu unreifen moDCs generiert werden (Romani et al. 1996).

Dazu sät man in 6-Well-Zellkulturplatten jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 3 ml Monozyten-Medium aus. Zur Stimulation der Monozyten gibt man pro Well 1,2 µl GM-CSF (250 µg / ml), sowie 3 µl IL-4 (10 µg / ml) zu. Es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C / 5% CO₂ für sieben Tage. Alle zwei Tage wird ein Wechsel des Monozyten-Mediums vorgenommen. Dazu entnimmt man aus jedem Well 1 ml Medium, sammelt dies in einem Falcon und zentrifugiert es 10 min. bei 1300 rpm. Das Pellet wird in frischem Monozyten-Medium mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren in den oben genannten Konzentrationen resuspendiert und davon jeweils 1 ml pro Well verteilt.

Nach sieben Tagen können die moDCs geerntet werden. Dazu löst man die Zellen mit einem Zellschaber und sammelt sie in einem 50 ml Falcon. Eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 1300 rpm pelletiert die Zellen. Nach einer Resuspension mit Hanks-Puffer können die Zellen ausgezählt werden (siehe 2.2.1.2.).

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Stimulation von iDCs mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen

Die Keimschläuche des ATCC 46645 *Aspergillus*-Stammes wurden freundlicherweise von dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Keimschläuche erfolgt in einem *Aspergillus fumigatus*-Medium bei -20°C. Keimschläuche stellen eine Übergangsform in der Entwicklung von Hyphen aus Konidien dar.

Nach erfolgter Zellzählung werden die moDCs auf einer 24-Well-Platte in einer Konzentration von jeweils 1×10^6 Zellen / ml Monozyten-Medium ausgesät. Zur Stimulation der Zellen werden pro Well im Doppelansatz 1×10^6 *A. fumigatus*-Keimschläuche pipettiert (MOI = 1) und anschließend mit einer unstimulierten Kontrolle, die als Negativkontrolle dient, für 3 und 6 Stunden im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die mit einem Zellschaber gelösten Zellen und das Medium in vorbereitete Eppendorf-Tubes überführt und für 5 min. bei 5400 rpm zentrifugiert. Der Überstand kann nun für weitere Versuche bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.2. Stimulation von iDCs mit Lipopolysaccharid

Auf einer 24-Well-Platte werden pro Well 1×10^6 moDCs in 1 ml Monozyten-Medium ausgesät. Die Stimulation erfolgt mit 10 µl Lipopolysaccharid (100 µg / ml) im Doppelansatz pro Well, so dass sich eine Konzentration von 1 µg / ml ergibt. Auch hier wird eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Die Zellen werden für 3 und 6 Stunden im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wird der abzentrifugierte Überstand bei -20°C gelagert. Die Stimulierung der moDCs mit Lipopolysaccharid (1µg / ml) dient als Positivkontrolle.

2.2.2.3. Stimulation von iDCs mit Resiquimod (R848)

Jeweils 1×10^6 moDCs werden auf einer 24-Well-Platte in 1 ml Monozyten-Medium ausgesät und mit Resiquimod in einer Konzentration von 1 µg / ml beimpft. Parallel

werden Zellen simultan mit Resiquimod (1 µg / ml) und Keimschläuchen (MOI = 1), sowie mit Resiquimod (1 µg / ml) und Lipopolysaccharid (1 µg / ml) stimuliert. Alle Stimulationen erfolgen im Doppelansatz und werden mit einer unstimulierten Kontrolle für 3 und 6 Stunden im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wird der gewonnene Überstand bei -20°C gelagert.

2.2.2.4. Stimulation von iDCs mit Alum

Auf einer 24-Well-Platte werden jeweils 1 x 10⁶ moDCs in 1 ml Monozyten-Medium ausgesät und mit Alum in einer Konzentration von 1 µg / ml stimuliert. Auch hier erfolgen parallel dazu simultane Stimulationen der Zellen mit Alum (1 µg / ml) und Keimschläuchen (MOI = 1), sowie Alum (1 µg / ml) und Lipopolysaccharid (1 µg / ml). Die Doppelansätze und die unstimulierte Kontrolle werden bei 37 °C / 5% CO₂ für 6 Stunden inkubiert und die abzentrifugierten Überstände anschließend bei -20°C gelagert. Aufgrund der gewählten Zellkulturplatten ist es möglich, die unter 2.2.2.1. bis 2.2.2.3., bzw. 2.2.2.4. beschriebenen Stimulationen mit den moDCs eines Spenders gleichzeitig durchzuführen. Dazu legt man sich folgendes Stimations- und Pipettierschema zurecht (Abb. 6), alternativ zu Resiquimod kann Alum (1µg / ml) eingesetzt werden:

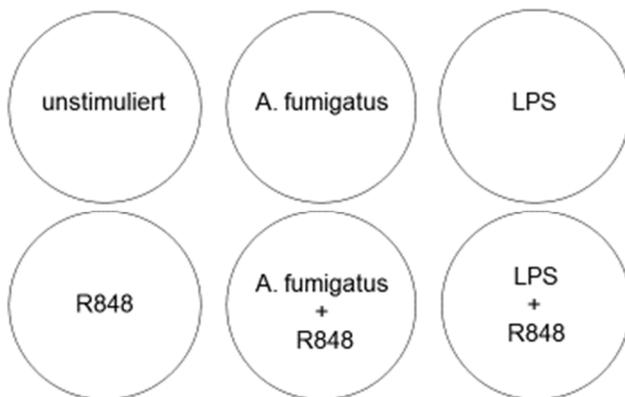


Abb. 6: Stimulationsschema. Ausschnitt aus einer 24-Well-Platte

2.2.2.5. Zytokin-ELISA

Zum Nachweis bestimmter Zytokine in Zellkulturüberständen wird in dieser Arbeit der enzymgekoppelte Immunosorbent Assay (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay, ELISA) angewandt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Proportionalität des nachzuweisenden Proteins (Antigenmenge) mit einer enzymatischen Farbreaktion. Bei den hier durchgeführten Sandwich-ELISAs werden 2 Antikörper eingesetzt. Der erste spezifische monoklonale Antikörper (engl. coat antibody) richtet sich gegen das zu bestimmende Antigen und ist an eine Festphase, in diesem Fall eine Mikrotiterplatte, gebunden. Durch Zugabe der Probe bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex aus. Durch einen anschließenden Waschschriff werden nicht oder unspezifisch gebundenen Antigene entfernt, um falsch positive Reaktionen zu vermeiden. Zur Detektion wird ein enzymgekoppelter polyklonaler Sekundär-Antikörper (*detection antibody*) zugegeben, der sich gegen den Primär-Antikörper richtet und an diesen bindet. Die Zugabe eines entsprechenden Testsubstrates führt zu einer Farbreaktion. Diese Enzymaktivität kann photometrisch erfasst werden und ist proportional zur nachzuweisenden Antigenmenge. Die Antigenkonzentration kann mit einer mitgeführten Standardverdünnungsreihe quantifiziert werden.

2.2.2.5.1. TNF- α

Für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ELISA wurde das Human TNF- α Cytoset der Firma Biosource verwendet. Bei diesem Test handelt es sich um einen *double-antibody-sandwich-ELISA*, da das Enzym in diesem Fall nicht an den Sekundär-Antikörper gebunden ist. Hierfür wird ein weiterer enzymgekoppelter Antikörper eingesetzt, der sich gegen den spezifischen Sekundär-Antikörper richtet. Dieses Verfahren wird angewandt, wenn für das zu bestimmende Antigen keine enzymgekoppelten Antikörper verfügbar sind.

Nach Zubereitung der Lösungen und Puffer (siehe 2.1.3.1.) wird eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem Erstantikörper (anti-Human-TNF- α) beschichtet. Der TNF- α -Antikörper wird mit Coating-Puffer gemischt (2 μg / ml) und davon je 100 μl in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Es erfolgt eine Inkubation der abgedeckten Platte bei 4°C über

Nacht. Am nächsten Tag wird die Platte zweimal mit jeweils 200 μl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 300 μl Assay-Puffer pro Well 1 h bei RT geblockt. Es folgt ein zweimaliger Waschschrift. Es wird eine Standard-Verdünnungsreihe mit Assay-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Tubes nach folgendem Schema pipettiert:

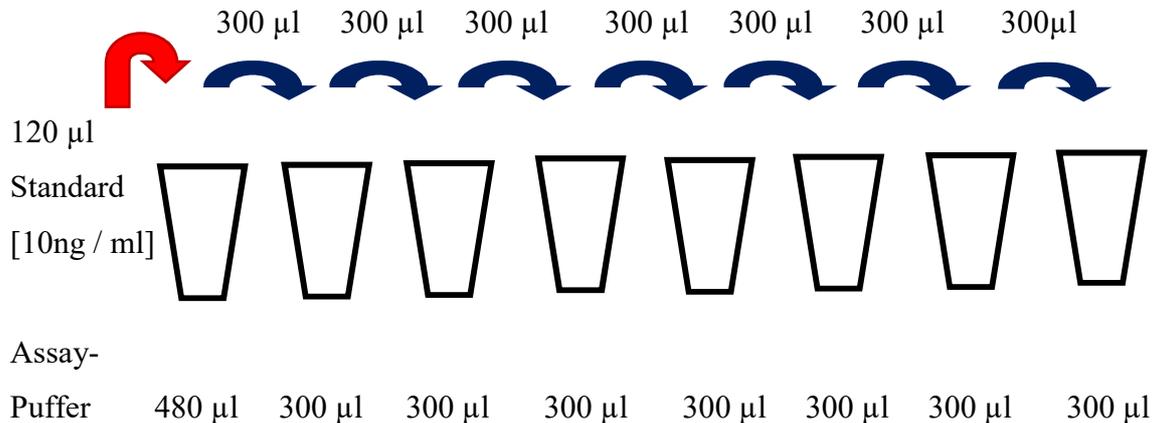


Abb. 7: Pipettierschema der Standard-Verdünnungsreihe des TNF- α -ELISA

Man erhält so absteigende Standardkonzentrationen: 1000 pg / ml, 500 pg / ml, 250 pg / ml, 125 pg / ml, 62,5 pg / ml, 31,25 pg / ml und 15,625 pg / ml.

Anschließend wird die Mikrotiterplatte mit den Proben, der Standardreihe und der Negativkontrolle (Blank) versetzt. Im Doppelansatz werden jeweils 100 μl Überstand (stimulierte Proben wurden 1:100 mit Assay-Puffer verdünnt), Standard oder Assay Puffer (Blank) pipettiert und sofort mit 50 μl Detection Antikörper (320 ng / ml) zu jeder Probe inkubiert. Die abgedeckte Platte wird für 2 Stunden bei RT und 700 rpm geschüttelt. Nach fünfmaligem Waschen werden 100 μl der Working Streptavidin-HPR-Lösung (1:625-Verdünnung in Assay-Puffer) in jedes Well pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT und 700 rpm wird fünfmal gewaschen und anschließend 100 μl TMB-Substrat (Chromogenlösung) pro Well pipettiert. Da das TMB-Substrat lichtempfindlich ist, muss die 30-minütige Inkubation auf dem Schüttler im Dunkeln erfolgen. Die Farbreaktion wird mit jeweils 100 μl Stop-Lösung abgestoppt. Die photometrische Bestimmung der Extinktion im ELISA-Reader erfolgt sofort im Anschluss bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Die Konzentrationen der einzelnen Proben werden anhand der Standardwerte in Microsoft Excel ermittelt.

2.2.2.5.2. IL-6

Nach der Verdünnung der Erstantikörper-Stock-Lösung (500 µg / ml) mit sterilem PBS, pipettiert man 100 µl des angesetzten Erstantikörpers (2 µg / ml) in jedes Well einer medium-binding-Microplatte und lässt die versiegelte Platte über Nacht bei 4°C inkubieren. Am nächsten Tag wird die Platte dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 300 µl Blocking-Lösung pro Well 2 Stunden bei 600 rpm und RT geschüttelt. Drei Waschschritte folgen.

Für die benötigte Standardreihe pipettiert man 4 µl der Standard-Stocklösung (10 µg / ml) zu 996 µl Standardpuffer und erhält so Standard 1 mit einer Konzentration von 40 ng / ml. In 10 Eppendorftubes wird eine absteigende Standardreihe (500 µl Schritte) (siehe 2.2.2.5.1.) erstellt. Diese 11 Standards enthalten Konzentrationen von 40 ng / ml (Std 1), 20 ng / ml (Std 2), 10 ng / ml (Std 3) bis 0,04 ng / ml (Std 11). Nun pipettiert man im Doppelansatz jeweils 100 µl des Standardpuffers (Blank), der Standardproben und der Überstände in die entsprechenden Wells der Mikroplatte und lässt sie abgedeckt 2 Stunden auf dem Schüttler (600rpm) bei RT inkubieren. Nach dreimaligen Waschen gibt man in jedes Well (außer Blank) 100 µl Zweitantikörper (100 ng / ml). In die Blank-Wells gibt man nur 100 µl Zweitantikörper-Puffer. Nach 2 h Inkubation bei 600 rpm und RT, sowie einem sich anschließenden dreimaligen Waschgang, pipettiert man in jedes Well (außer Blank) 100 µl Streptavidin-gekoppeltes Enzym (Verdünnung 1:200) und inkubiert die abgedeckte Platte für 20 Minuten bei 600 rpm und RT. Im Anschluss wird die Platte erneut dreimal gewaschen und mit 100 µl pro Well der Substratlösung versehen. Es ist zu beachten, dass die Substratlösung sehr lichtempfindlich ist und die abgedeckte Platte daher für 3-10 Minuten und Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wird. Nach Abschluss der Inkubationszeit pipettiert man 50 µl Stop-Lösung in jedes Well und bestimmt sofort mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Substraktionskorrektur bei 570 nm die Extinktion. Die Auswertung aller Proben erfolgt mittels Standartwerte in Microsoft Excel mit gleichzeitiger Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung.

2.2.2.5.3. IL-10

Für diesen ELISA wird ebenfalls eine medium-binding-Microplatte verwendet, die man mit 100 µl pro Well des Erstantikörpers (2 µg / ml) beschichtet und über Nacht versiegelt bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte drei Mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 300 µl Blocking-Lösung pro Well abgedeckt bei 600 rpm und RT geschüttelt. Im Anschluss folgt ein dreimaliger Waschgang. Es wird eine Standardverdünnungsreihe nach dem gleichen Prinzip wie unter 2.2.2.5.2. beschrieben, hergestellt. Im Doppelansatz werden jeweils 100 µl des Standardpuffers (Blank), der Standardproben und der Überstände in die entsprechenden Wells der Mikroplatte pipettiert und auf dem Schüttler (600rpm) bei RT 2h inkubiert. Nach drei Waschschritten wird mit jeweils 100 µl Zweitantikörper (0,1 µg / ml) (außer Blank) inkubiert. In die Blank-Wells werden jeweils 100 µl Zweitantikörper-Puffer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 600 rpm und RT, sowie einem dreimaligen Waschschritt, pipettiert man in jedes Well (außer Blank) 100 µl Streptavidin-gekoppeltes Enzym (51 µl Streptavidin-Stock + 10149 µl Streptavidin-Puffer) und lässt die abgedeckte Platte für 20 Minuten bei 600 rpm und RT schütteln. Nach drei Waschschritten wird in jedes Well 100 µl Substratlösung gegeben. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Substrates wird die Platte für 20 Minuten im Dunkeln und Raumtemperatur inkubiert werden. Nach der Zugabe von jeweils 50 µl Stopp-Lösung erfolgt die sofortige Bestimmung der Extinktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Substraktionskorrektur bei 570 nm. Die Auswertung aller Proben erfolgt mittels Standardwerte in Microsoft Excel mit gleichzeitiger Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung.

2.2.2.5.4. IL-1β

Zunächst wird eine 96-Well- medium-binding-Microplatte mit 100µl des IL-1β-Erst-Antikörpers (2 µg / ml) beschichtet und versiegelt bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschritt wird die Platte 2 h mit 300 µl Blockinglösung bei 600 rpm geblockt und im Anschluss drei Mal gewaschen.

Methoden

Ausgehend von einer Konzentration von 40 ng / ml wird eine Standardverdünnungsreihe hergestellt (siehe 2.2.2.5.2.). Anschließend werden wieder im Doppelansatz jeweils 100 µl der Überstände, Standards und Standardpuffers (Blank) auf die Platte aufgetragen und für 2 h bei 600 rpm und RT inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift werden 100 µl des Zweit-Antikörpers in einer Konzentration von 4 µg / ml aufgetragen (außer Blank, dort werden 100 µl Zweitantikörperpuffer pipettiert) und für 2 Stunden versiegelt bei RT geschüttelt. Im Anschluss wird erneut drei Mal gewaschen und 100 µl des Streptavidin-gekoppelten Enzyms in jedes Well gegeben. Die Platte wird für 20 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Nach drei Waschschriften erfolgt die Zugabe von 100 µl Substratlösung und die anschließende Inkubation im Dunkeln für 30 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit pipettiert man 50 µl Stop-Lösung und misst die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Substraktionskorrektur bei 570 nm. Die Auswertung aller Proben erfolgt mittels Standardwerte in Microsoft Excel mit gleichzeitiger Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung.

2.2.2.5.5. CCL-20, CXCL-10

Zur Detektion der Chemokine CCL20 und CXCL10 wird jeweils eine 96-well-Microtiterplatte mit 2 µg/ ml CCL20 oder CXCL10 über Nacht bei RT ge-coated. Die Waschschriften erfolgten immer dreimal mit je 300 µl Waschpuffer. Nach dem ersten Waschschrift wird 2 h mit 300 µl Blockinglösung bei 600 rpm geblockt und anschließend drei Mal gewaschen.

Es erfolgt die Herstellung einer Standardreihe nach dem oben beschriebenen Prinzip (siehe 2.2.2.5.2.). Im Doppelansatz werden 100 µl der Überstände, Standards und Standardpuffers (Blank) auf die Platte aufgetragen. Die Überstände der Proben LPS, R848/Alum + KS, sowie R848/Alum + LPS werden für den CXCL-10-ELISA mit Standardpuffer 1:2 verdünnt. Nach 2 h Schütteln bei 600 rpm und RT und einem Waschschrift wurden je 100 µl Zweitantikörper mit der Konzentration 4 µg / ml für CCL20 und 0,4 µg / ml für CXCL10 in jedes Well (außer Blank, dort werden 100 µl Zweitantikörperpuffer pipettiert) gegeben und erneut 2 h geschüttelt (600 rpm). Nach einem Waschschrift wird 20 min mit 100 µl Streptavidin-gekoppeltem Enzym auf dem Schüttler (600 rpm) inkubiert. Anschließend wird gewaschen und nach der Zugabe von

100 µl Substratlösung für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 50 µl Stopp-Lösung in jedes Well pipettiert und die sofortige Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Substraktionskorrektur bei 570 nm vorgenommen. Die Auswertung aller Proben erfolgt mittels Standardwerte in Microsoft Excel mit gleichzeitiger Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung.

2.2.2.6. Fluoreszenzassoziierte Zellsortierung (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das die quantitative Bestimmung und Analyse von Zellen ermöglicht. Das Prinzip der FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) besteht in dem Sortieren fluoreszenzmarkierter Zellen nach ihrer Färbung. So lassen sich unter anderem Oberflächenantigene, intrazelluläre Proteine, Rezeptoren und DNA quantitativ bestimmen. Grundlage dieser Zellsortierung ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper erreicht wird. Fluoreszenzmarkierte Einzelzellen werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl in einer Messkammer („*Flow Cell*“) hintereinander an einem gebündelten Laserstrahl mit bestimmter Wellenlänge vorbeigeführt. Dabei werden die Zellen durch einen monochromatischen Laserstrahl angeregt und erzeugen dabei ein für jeden Zelltyp spezifisches Streulicht, sowie eine Fluoreszenz der Antikörper-gekoppelten Fluorophore. Diese werden mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen. Die Menge des emittierten Streulichtes ist dabei von der Größe und Granularität der Zelle abhängig. Das im geringeren Winkel gestreute Licht, auch Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) genannt, beschreibt die Zellgröße. Die Zellgranularität wird durch die Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC), die im 90°-Winkel zur FSC steht, erfasst.

Im Gegensatz zu dem ausgestrahlten Streulicht absorbieren die fluoreszierenden Antigen-Antikörper-Komplexe Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Die dadurch angeregten Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben und geben beim Zurückfallen auf das Ursprungsniveau Energie in Form von Photonen ab. Die Menge der emittierten Photonen wird detektiert und ist proportional zur Menge der jeweils gebundenen Antikörper.

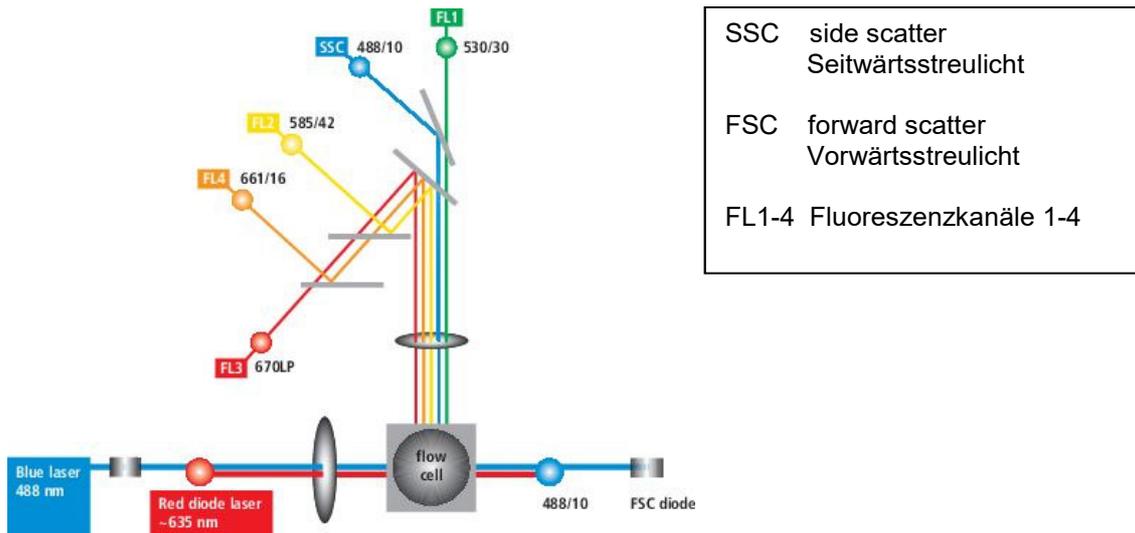


Abb. 8: Aufbau des BD FACSCalibur™. In diesem Gerät werden zwei Laser verwendet, ein gekühlter Argon-Laser [488 nm] und ein roter Diodenlaser [635 nm]. Dadurch können gleichzeitig bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und analysiert werden (mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences).

Auf Grund der unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe, die von den vier Fluoreszenzkanälen des hier verwendeten Gerätes FACSCalibur™ (BD Biosciences) erfasst werden, können gleichzeitig bis zu vier verschiedenen Farbstoffen eingesetzt und gemessen werden. Die dabei emittierten Lichtsignale werden in elektronische Signale umgesetzt.

In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet.

<i>Fluoreszenzfarbstoff</i>	<i>Exzitationsmaximum [nm]</i>	<i>Emissionsmaximum [nm]</i>	<i>Laser</i>	<i>Fluoreszenzkanal</i>
FITC	494	520	Argon	FL 1
PE	496	578	Argon	FL 2

Tab. 3: spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) (BD Biosciences).

Methoden

Da sich die Emissionsspektren dieser beiden Farbstoffe teilweise überschneiden, kommt es zu einer spektralen Überlappung. Daher muss zwischen FITC und PE mittels Software kompensiert werden, um die Messergebnisse nicht zu verfälschen.

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgt mit der Software „FlowJo[®]“. Zur grafischen Darstellung der Messdaten können Histogramme und Dot Plots verwendet werden. Durch das Auswählen einer bestimmten Region in einem Dot Plot, dem sog. „Gaten“, ist es möglich, eine Zellpopulation genauer zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden moDCs in einem Ansatz für 6 und in einem weiteren Ansatz für 12 Stunden bei 37°C/5% CO₂ mit *Aspergillus*-Keimschläuchen, Lipopolysaccharid und Resiquimod stimuliert und die Expression verschiedener Oberflächenmarker gemessen. Dazu werden auf einer 24-Well-Platte jeweils 1x10⁶ moDCs in 1 ml Monozyten-Medium ausgesät. Die Stimulation erfolgt auch hier nach dem bereits unter 2.2.2.4. beschriebenen Schema (Abb. 6) für 6 und 12 h.

Nach Ablauf der Stimulationszeit werden die Zellen geerntet und in 2 ml Eppendorf-Tubes für 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit jeweils 1 ml FACS-Waschpuffer resuspendiert und erneut für 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach der anschließenden Resuspension mit 1 ml FACS-Waschpuffer, werden pro Ansatz jeweils 200 µl auf FACS-Röhrchen verteilt. Nun wird mit folgenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern zweifach gefärbt:

CD 1a-FITC / CD40-PE

CD 1a-FITC / CD80-PE

CD14-FITC / CD83-PE

CD14-FITC / CD86-PE

Der Oberflächenmarker CD1a dient dem Nachweis dendritischer Zellen und CD14 als Monozytenmarker.

Es werden 2 µl des entsprechenden Antikörpers zu jedem Ansatz gegeben. Zusätzlich werden eine Isotypkontrolle (Negativkontrolle), sowie die Kontrollen für FITC und PE pipettiert:

IgG_{2a}-FITC / IGg1-PE

CD1a-FITC

CD40-PE

Die Ansätze werden 30 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend zweimal mit jeweils 1 ml FACS-Waschpuffer gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 350 µl FACS-Waschpuffer werden die Proben am FACSCalibur™ gemessen.

Die Auswertung erfolgt mit der Software „FlowJo®“. Aufgrund der überlappenden Emissionsspektren der Farbstoffe FITC und PE bei einer Zweifachfärbung muss eine Kompensation erfolgen. Mittels positiver und negativer Kontrollproben wird mit Hilfe von FlowJo eine Kompensationsmatrix erstellt, in der die Subtraktion der jeweils überschneidenden Signale erfolgt. Im Anschluss an die Kompensation werden die einzelnen Proben ausgewertet und als Dot Plots dargestellt. Die Proben werden in dem Dot Plot auf eine x-Achse (FITC) und eine y-Achse (PE) abgebildet und jede Zelle als Punkt (dot) repräsentiert. Die Population der Isotypkontrolle (Negativkontrolle) liegt zu $\geq 99\%$ im linken unteren Quadranten. Die Bestimmung der noch vorhandenen Dots erfolgt in Relation dazu.

2.2.3. Statistische Auswertung

Für die vorliegende Arbeit wurden eine Stichprobengröße von $n \geq 2$ verwendet.

Die in dieser Arbeit eingesetzten DCs stammen von verschiedenen Spendern und zeigen daher unterschiedlich starke Reaktionen auf die entsprechenden Stimuli. Eine parametrische Auswertung dieser Daten setzt eine Gleichverteilung der gewonnenen Daten voraus. Da eine Stichprobengröße von $n \approx 2$ in dieser Arbeit eine Prüfung dieser Verteilung unnötig, aber auch nichtig macht, werden mit Hilfe des Programms Statistica® (Version 10) nicht-parametrische statistische Verfahren angewandt (Kruskal-Wallis-Test: Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen, Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen) und zur grafischen Darstellung Box-Plots erstellt. Auf Grund der geringen Stichprobengröße kann eine parameterfreie Auswertung keine zufriedenstellenden Werte erbringen, so dass für die Analyse der gewonnenen Daten auf Mittelwerte und Standardabweichungen zurückgegriffen wird. Auf Grund der starken

Methoden

Streuung der Werte und der relativ geringen Stichprobengrößen ist es weder sinnvoll, parametrische, noch nicht-parametrische statistische Verfahren anzuwenden und somit dienen die Trends der in dieser Arbeit erhobenen Daten als Hinweis für weitere Untersuchungen. Signifikante Aussagen erfordern eine größere Stichprobenanzahl an Spendern und eine genaue Repetition dieser Versuche.

Zunächst wurde das arithmetische Mittel mit dem Programm Microsoft Excel® berechnet.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

n = Anzahl der Beobachtungswerte

x = Beobachtungswerte

Auf der Grundlage der ermittelten Mittelwerte wurde die empirische Standardabweichung mit Excel® berechnet. Die Standardabweichung beschreibt die Streubreite eines Merkmals um sein arithmetisches Mittel.

$$\sigma_x = \sqrt{\text{Var}(X)}$$

Var(x) = Varianz der Wertemenge

Die grafische Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung erfolgte mit Hilfe von Histogrammen in Excel.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des Einflusses von *Aspergillus fumigatus* und Alum auf die Zytokinproduktion humaner iDCs auf Proteinebene

Das Erkennen von *Aspergillus fumigatus* und bakteriellem Lipopolysaccharid mittels PRRs führt über die Aktivierung von Signalkaskaden unter anderem zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine. Um einen Einfluss des Immunmodulators Alum auf diese Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden moDCs von drei unterschiedlichen Spendern mittels IL-4 und GM-CSF aus CD14⁺-Zellen generiert (siehe 2.2.1.) und mit *Aspergillus-fumigatus*-Keimschläuchen (MOI = 1), LPS (1 µg / ml) und Alum (1 µg / ml) für 6 Stunden stimuliert (siehe 2.2.2.). In den dabei gewonnenen Mediumüberständen wurden mittels Zytokin-ELISAs die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, sowie der Chemokine CXCL-10 und CCL-20 bestimmt (siehe 2.2.2.5.).

Die unstimulierten Proben dienten als Negativkontrolle, die mit LPS stimulierten Proben als Positivkontrolle.

Anhand der jeweils mitgeführten Standardreihe konnte mit dem Programm Microplate Manager® eine Standardkurve mit der 4-Parameter-Logistik erstellt und die Konzentrationen der Messwerte anhand dieser Kurve ausgewertet werden. Mit Microsoft Excel wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller drei Spender wurden, wenn möglich, zusammengefasst und grafisch in einem Histogramm dargestellt. Die zu vergleichenden Proben wurden in drei Gruppen eingeteilt.

unstimuliert	+ / - Alum
<i>A. fumigatus</i>	+ / - Alum
LPS	+ / - Alum

3.1.1. TNF- α

Da die Immunantwort auf mikrobielle Erreger, in diesem Fall *Aspergillus fumigatus* und bakterielles Lipopolysaccharid, neben anderen Zytokinen zu einer vermehrten TNF- α -Sekretion führt, wurde ein möglicher Einfluss des Immunmodulators Alum auf die TNF- α -Expression überprüft. So wurden die Überstände von drei unterschiedlichen Spendern gemessen und die Proteinkonzentration von TNF- α bestimmt.

Wie in Abb. 9. dargestellt, bewirkt die Stimulation mit Alum keine Beeinflussung der TNF- α -Expression. Zwar lag die TNF- α -Konzentration pilzstimulierter Zellen mit 0,3 ng / ml deutlich über der Proteinkonzentration der Positivkontrolle (0,08 ng / ml), wurde jedoch tendenziell nach Zugabe von Alum in beiden Ansätzen nicht beeinflusst. So zeigten die mit *A. fumigatus* stimulierten DCs, wie auch die Positivkontrolle nach einer Ko-Stimulation mit Alum keine Unterschiede in der TNF- α -Konzentration. Dies konnte auch im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden. Die alleinige Stimulation mit Alum bewirkte eine Zytokinausschüttung, die lediglich mit 1,0 ng / ml über der Proteinmenge unstimulierter Zellen lag.

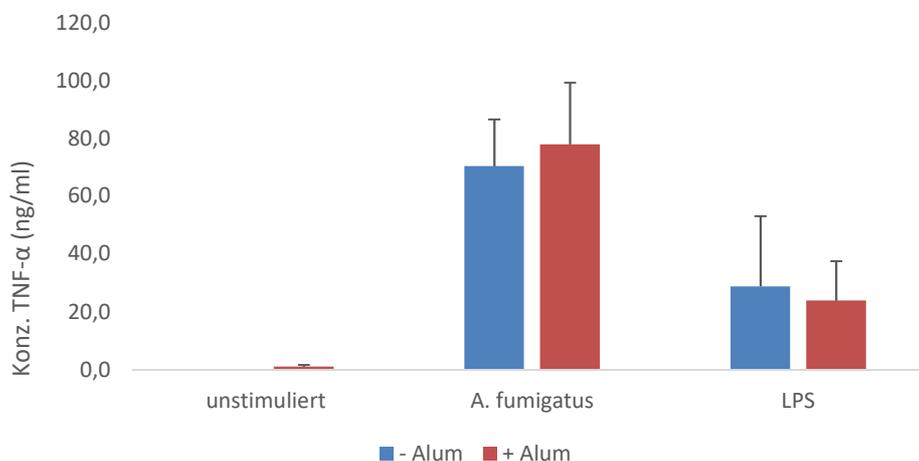


Abb. 9. TNF- α -Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Die Grafik zeigt das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.1.2. IL-6

Auch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6, das zusammen mit TNF- α in der frühen Phase einer Immunantwort sezerniert wird, wurde durch Alum nicht beeinflusst (Abb. 10). *Aspergillus fumigatus* erwies sich in diesem Ansatz als deutlich schwächerer Induktor unreifer DCs zur Sekretion von IL-6 (2,2 ng / ml) im Vergleich zur Positivkontrolle, die nach Stimulation mit LPS einen Wert von 16,8 ng / ml erreichte. Auch die Ko-Stimulation mit Alum zeigte in den gemessenen IL-6-Konzentrationen pilzstimulierter DCs keinen Trend, auch in der Positivkontrolle ist ein Einfluss nicht ersichtlich.

Auch bei der Negativkontrolle konnte Alum nach einer 6-stündigen Stimulation keine IL-6-Produktion induzieren und lag mit einer Konzentration von 0,02 ng / ml auf dem Niveau unstimulierter Zellen (0,02 ng / ml).

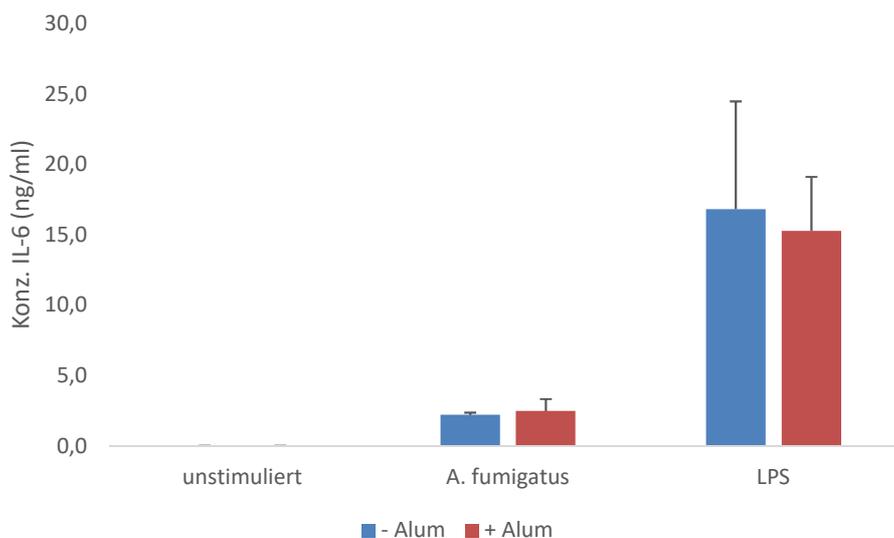


Abb. 10. IL-6- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Die Grafik zeigt das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.1.3. IL-10

Die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zeigte bei allen drei Spendern keine durch Alum induzierten Veränderungen (Abb. 11.). Alum bewirkte bei alleiniger Stimulation keine IL-10-Ausschüttung, was mit der Proteinkonzentration in den Überständen unstimulierter Zellen kongruierte. Die durch *Aspergillus fumigatus* induzierte IL-10-Produktion wurde durch Alum weder positiv noch negativ beeinflusst. Auch in der Positivkontrollgruppe (LPS) konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von Alum auf Proteinebene gemessen werden.

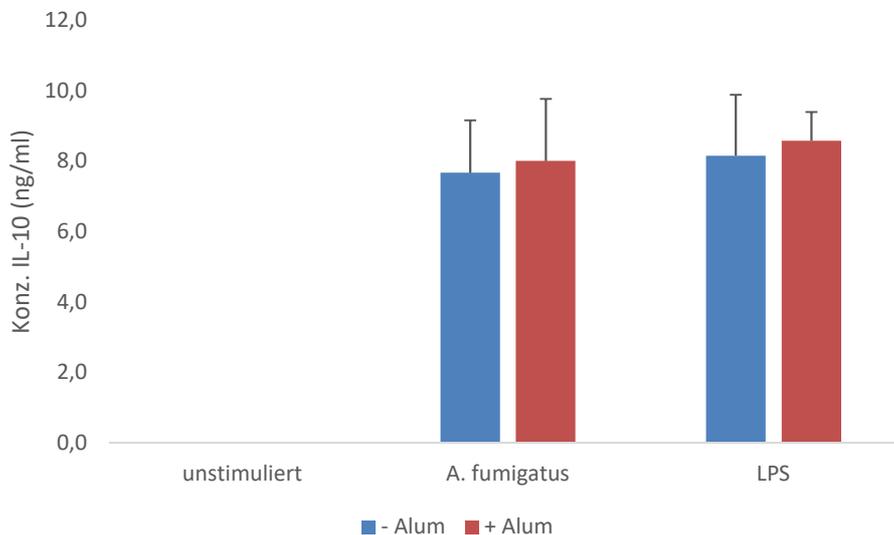


Abb. 11. IL-10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Die Grafik zeigt das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.1.4. IL-1 β

Bei der Auswertung des pilzspezifischen Zytokins IL-1 β unterschieden sich die Spender in dem Ausmaß ihrer Sekretion, so dass Spender 1 gesondert von den Spendern 2 und 3 ausgewertet und dargestellt wurde (Abb. 12).

Ergebnisse

Bei allen drei Spendern zeigte sich *Aspergillus fumigatus* als potenter IL-1 β -Induktor. So sezernierten pilzstimulierte DCs IL-1 β -Konzentrationen von 0,3 ng / ml (Spender 2 und 3) bis 1,4 ng / ml (Spender 1), die im Vergleich zur Positivkontrolle mit 0,08 ng / ml (Spender 2 und 3) bis 0,1 ng/ml (Spender 1) deutlich höher waren (Abb. 12.).

Die Messwerte von Spender 2 und 3 ergaben jedoch keine nennenswerten Unterschiede in den gemessenen IL-1 β -Konzentrationen in Abhängigkeit von Alum (Abb. 12. A). Nach alleiniger Stimulation mit Alum konnte IL-1 β , wie auch bei der Negativkontrolle in den Überständen nicht nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle ergab die gleichen Konzentrationen des Zytokins vor und nach Stimulation mit Alum. Pilzstimulierte Zellen sezernierten Alum-unabhängige IL-1 β -Mengen.

Bei Spender 1 lag die Alum-induzierte IL-1 β -Menge naiver DCs (0,0 ng / ml) unterhalb der Konzentration unstimulierter Zellen (0,09 ng / ml). Hingegen zeigte sich bei der gleichzeitigen Stimulation von *A. fumigatus* und Alum eine 2,2-fache Reduktion der IL-1 β -Sekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit *A. fumigatus*. Dieser Einfluss wurde auch durch die Positivkontrolle mit einer 1,6-fachen Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung in Anwesenheit von Alum bestätigt (Abb. 12.B).

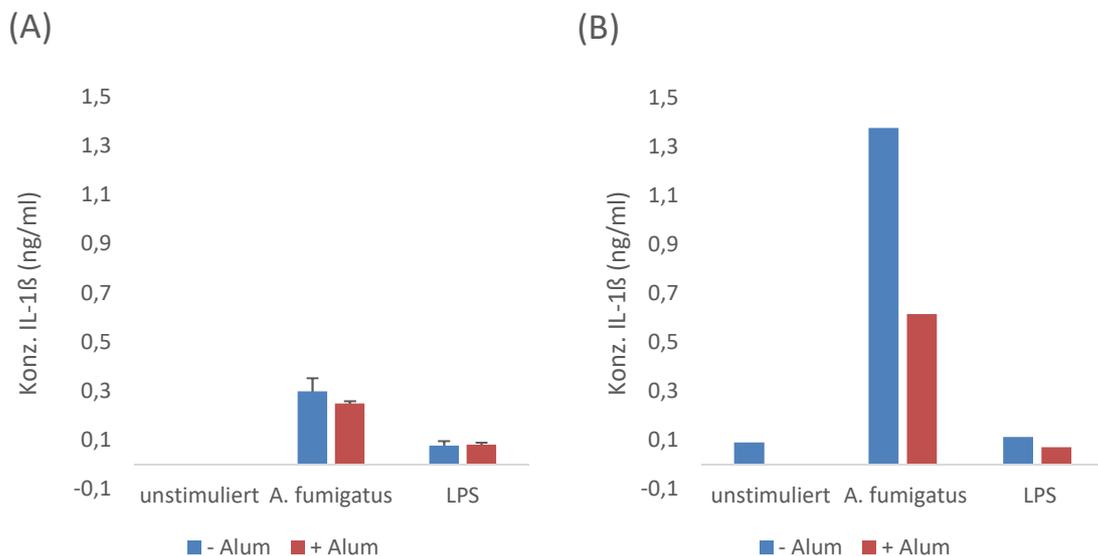


Abb. 12. IL-1 β -Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Dargestellt sind hier die Daten der Spender 2 und 3 (A) und des Spenders 1 (B). Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; n = 2 (A), n = 1 (B); Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1.5. CXCL-10

Die Sekretion des pilzspezifischen Chemokins CXCL10 wurde bei keinem der drei Spender durch Alum beeinflusst (Abb. 13.). Die Alum-induzierte CXCL10-Menge lag deutlich unterhalb der Konzentration unstimulierter Zellen. Die Positivkontrolle erzielte in diesem Versuch mit 3,1 ng / ml merklich höhere CXCL10-Konzentrationen als pilzstimulierte Zellen (0,8 ng / ml), zeigte aber, wie auch mit *Aspergillus fumigatus* stimulierte DCs keine prägnanten Unterschiede in den CXCL10-Konzentrationen in Abhängigkeit von Alum.

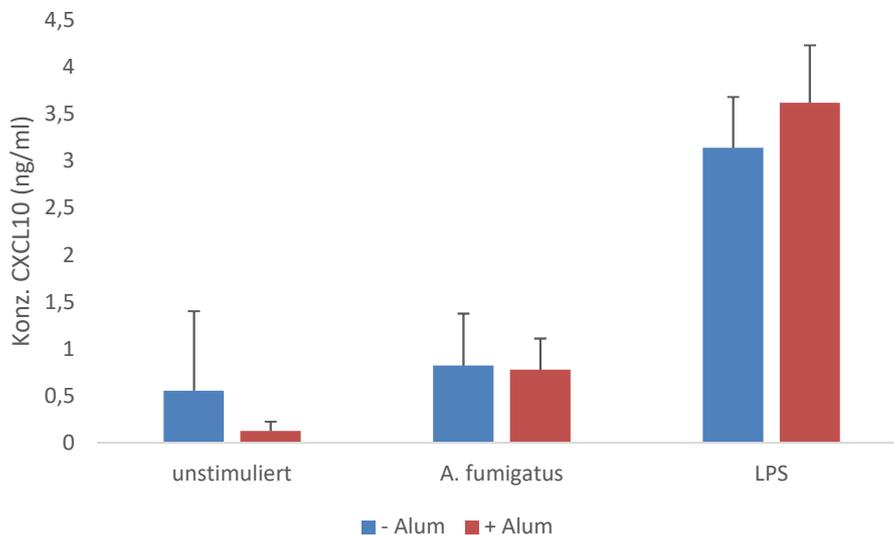


Abb. 13. CXCL10-Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Die Grafik zeigt das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; n = 3; Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1.6. CCL-20

Das Verhalten des pilzspezifischen Chemokins CCL20 konnte durch Alum ebenfalls nicht beeinflusst werden. In den Überständen unstimulierter DCs, sowie nach alleiniger Stimulation unreifer Zellen mit Alum konnte das Zytokin CCL20 nicht nachgewiesen werden (Abb. 14.). *Aspergillus fumigatus* konnte eine vergleichsweise höhere CCL20-

Ergebnisse

Ausschüttung bewirken als eine Stimulation mit LPS, dagegen zeigten beide Ansätze eine Alum-vermittelte tendenzielle Reduktion der Zytokinproduktion um 0,25 ng / ml (*A. fumigatus*) und 0,19 ng / ml (LPS).

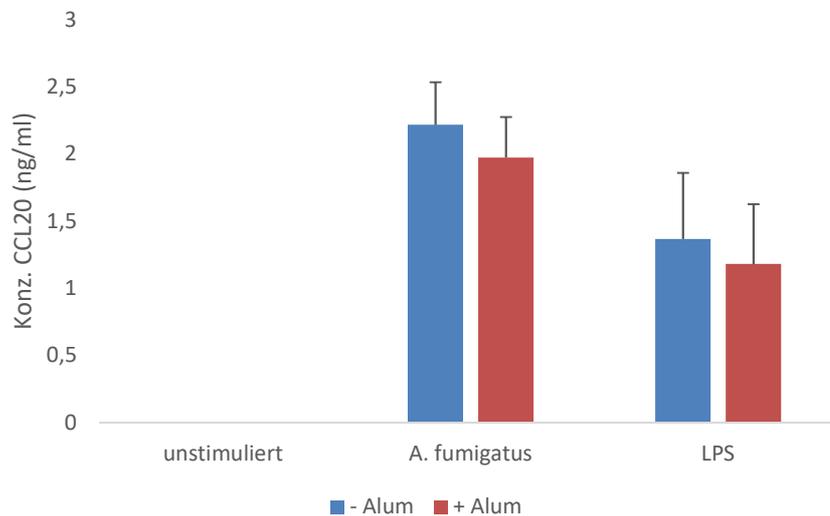


Abb. 14. CCL20- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum. Die Grafik zeigt das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; n = 3; Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2. Analyse des Einflusses von *Aspergillus fumigatus* und R848 auf die Zytokinproduktion humaner iDCs auf Proteinebene

Als TLR7- und TLR8-Agonist induziert Resiquimod (R848) die Expression zahlreicher inflammatorischer Zytokine. Um einen möglichen Effekt auf die Immunantwort bei einer *Aspergillus fumigatus*-Infektion zu untersuchen und einen eventuell zeitlichen Zusammenhang zu sehen, wurden moDCs von drei Spendern mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF aus CD14⁺-Zellen generiert (siehe 2.2.1.) und mit *Aspergillus-fumigatus*-Keimschläuchen (MOI = 1), LPS (1 μ g / ml) und R848 (1 μ g / ml) für jeweils 3 und 6 Stunden stimuliert. Die dabei gewonnenen Mediumüberstände wurden für die Analyse der Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CXCL10 und CCL20) mittels ELISA eingesetzt

Ergebnisse

(siehe 2.2.2.5.). Die unstimulierten Proben dienten als Negativkontrolle, die mit LPS stimulierten Proben als Positivkontrolle.

Nach dem Erstellen einer Standardkurve mit der 4-Parameter-Logistik und der Ermittlung der Konzentrationen der Messwerte, wurden mit Microsoft Excel die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Daten der drei Spender wurden grafisch in einem Histogramm dargestellt. Die zu vergleichenden Proben wurden auch hier in drei Gruppen eingeteilt.

unstimuliert	+ / - R848
<i>A. fumigatus</i>	+ / - R848
LPS	+ / - R848

3.2.1. TNF- α

Bei Entzündungsreaktionen und Infektionen werden von den Immunzellen hohe Level an TNF- α sezerniert, so auch als Antwort auf *Aspergillus fumigatus* und LPS. Da Resiquimod die TNF- α -Bildung gleichfalls induziert, wurde überprüft, ob R848 einen möglichen additiven Effekt auf die Bildung dieses Zytokins ausübt.

Wie bereits bei der Versuchsreihe mit Alum beschrieben, rief *Aspergillus fumigatus* auch hier eine im Vergleich zur Positivkontrolle höhere TNF- α -Ausschüttung hervor. Exemplarisch für diese Messreihe dient der Spender 3, der in Abbildung 15. grafisch dargestellt ist. Das Verhalten der Spender 1 und 2 entsprach dem des hier beschriebenen Spenders 3, es ergaben sich aber Unterschiede im dem Ausmaß der Zytokinsekretion.

Bei alleiniger Stimulation mit R848 ist erst nach 6 Stunden ein Effekt nachweisbar. So stieg die TNF- α -Konzentration von 0,0 ng / ml (3 Stunden) auf 4,2 ng /ml (6 Stunden). Die TNF- α -Sekretion pilzstimulierter DCs war in Anwesenheit von R848 bereits nach 3 Stunden um das 3,6-fache erhöht (Abb. 15.A) und zeigte nach 6 Stunden eine Steigerung um den Faktor 8,6 (Abb. 15.B). Diesen additiven Effekt von R848 konnte mit der Positivkontrolle bestätigt werden. In diesem Ansatz führte die Ko-Stimulation mit R848 zu einer 3,9-fach (3 h) und 2,0-fach (6 h) erhöhten TNF- α -Ausschüttung.

Ergebnisse

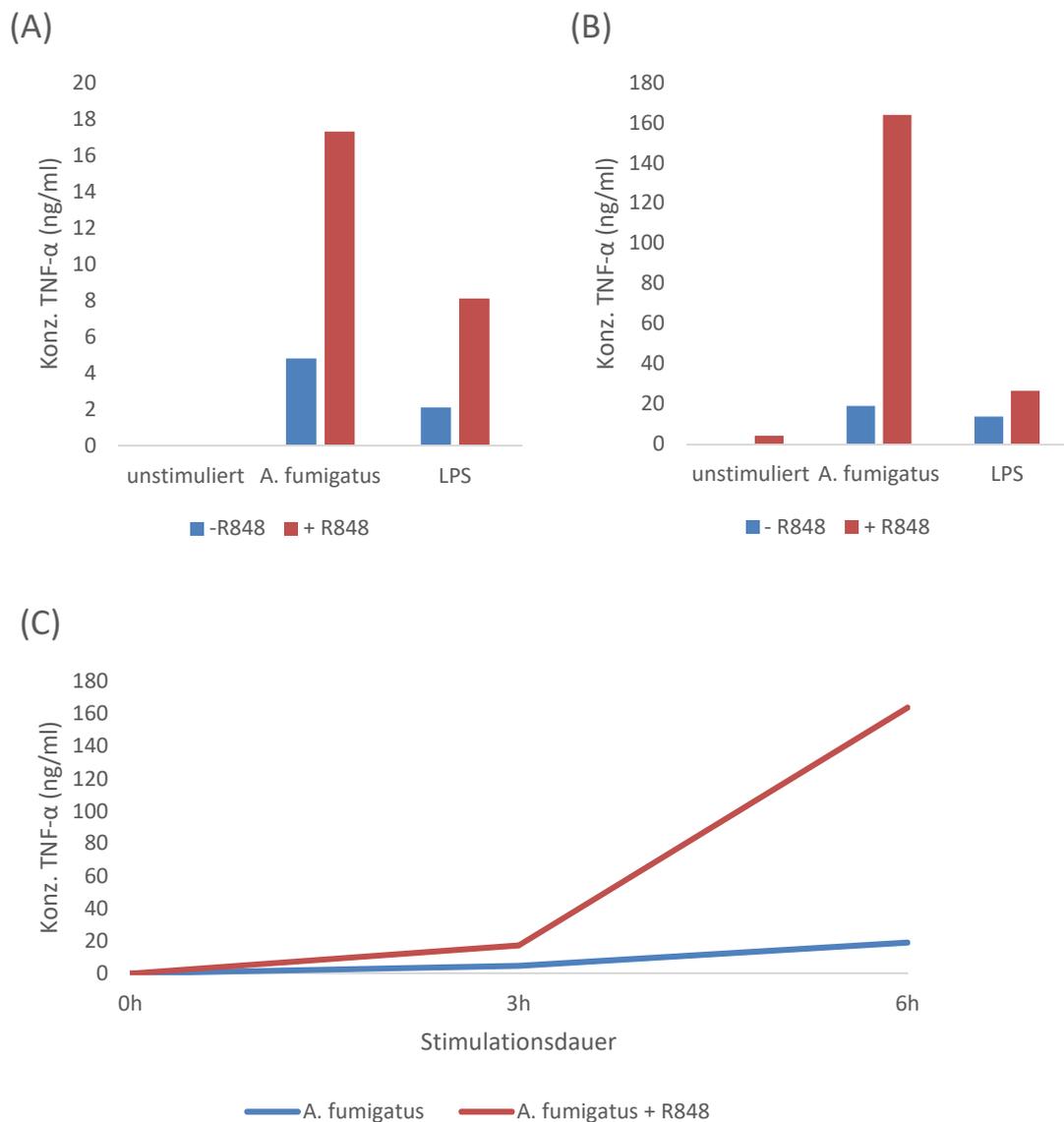


Abb. 15. TNF- α -Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten des Spenders 3 nach 3h (A) und 6h (B) Stimulation mit R848. Grafik C zeigt den Einfluss von R848 abhängig von der Stimulationsdauer des Spenders 3; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle.

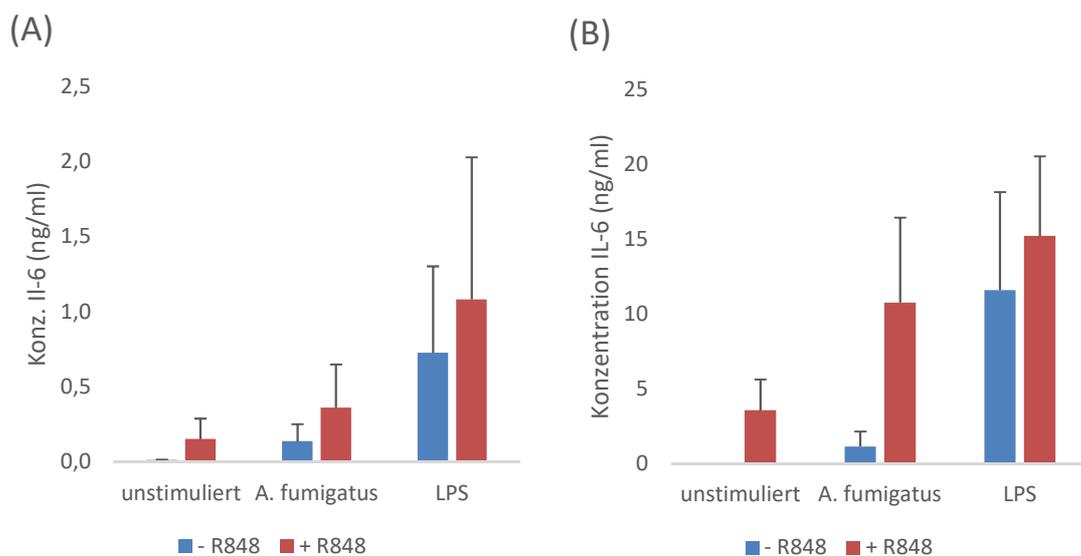
Vergleicht man nun die Zytokinwerte der alleinigen Stimulation mit R848 mit den Werten der Ko-Stimulationen, dann zeigt sich, dass R848 in Verbindung mit *Aspergillus fumigatus* oder LPS weitaus höhere TNF- α -Werte erzielte. Die Abbildung 15.C

Ergebnisse

verdeutlicht, dass die durch R848 verstärkte, durch *Aspergillus* induzierte Ausschüttung von TNF- α mit der Stimulationsdauer zunahm.

3.2.2. IL-6

Der Einfluss von R848 auf eine *Aspergillus fumigatus* vermittelte IL-6-Expression sollte im Folgenden untersucht werden. Auch hier zeigte sich bereits nach 3 Stunden ein Resiquimod-abhängiger positiver Trend (Abb. 16.A). R848 konnte eine IL-6-Produktion in naiven DCs bewirken und erreichte Konzentrationen von 0,15 ng / ml (3 h) bis 3,56 ng / ml (6 h) (Abb. 16.B). Die Positivkontrolle, die verglichen mit *A. fumigatus* höhere IL-6-Level erreichte, wies in Anwesenheit von R848 eine um den Faktor 1,5 (3 h), bzw. 1,3 (6 h) gesteigerte IL-6-Antwort auf. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei pilzstimulierten DCs. So konnte R848 bereits nach 3 Stunden die in den Überständen von *Aspergillus fumigatus* stimulierten Zellen gemessene IL-6-Konzentration von 0,14 ng /ml um das 2,6-fache auf 0,36 ng /ml und nach 6 Stunden um das 9,5-fache steigern. Außerdem zeigte sich, dass sich der additive Effekt von Resiquimod mit der Dauer der Stimulation verstärkt (Abb. 16.C.).



Ergebnisse

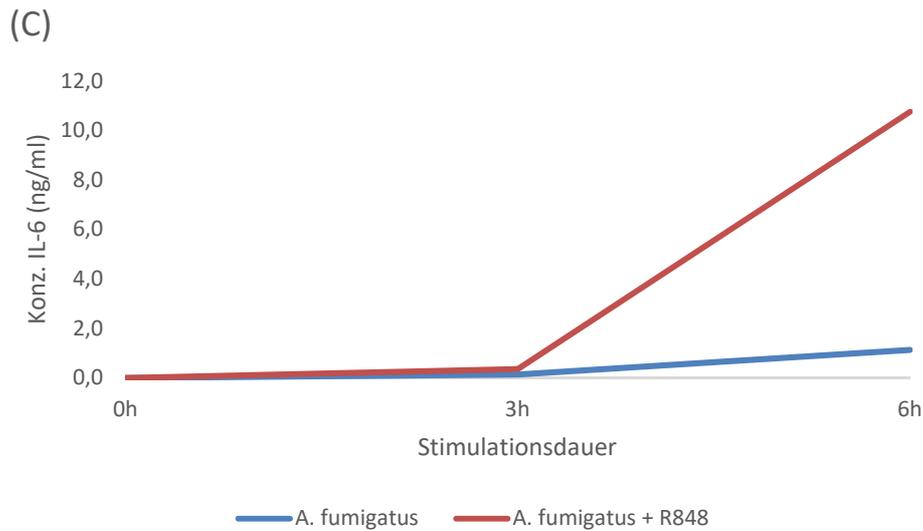


Abb. 16. IL-6- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten aller drei Spender nach 3h (A) und 6h (B) Stimulation mit R848. Grafik C zeigt den Einfluss von R848 abhängig von der Stimulationsdauer; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2.3. IL-10

Die Expression des regulatorischen antiinflammatorischen Zytokin IL-10 wurde im Folgenden auf die Beeinflussbarkeit durch R848 untersucht.

Bei der Auswertung der 3 Stunden-Werte konnten nur Spender 2 und 3 herangezogen werden, da bei Spender 1 in keinem Überstand IL-10 detektiert wurde. Beide Spender zeigten zwar das gleiche Verhalten, jedoch schwankten die Ergebnisse in dem Ausmaß der Sekretion sehr, so dass die Ergebnisse eines Spenders, in diesem Fall Spender 2, exemplarisch als Grafik dargestellt wurden (Abb. 17.).

Die Stimulation mit R848 führte bei naiven DCs zu einer IL-10-Ausschüttung, die nach 3 Stunden 0,02 ng / ml betrug und nach 6-stündiger Stimulation mit einer Konzentration von 3,0 ng / ml die Ergebnisse unstimulierter Zellen überstieg. Die Positivkontrolle lieferte nach 3 Stunden Stimulation in Abwesenheit von R848 eine IL-10-Konzentration von 0,07 ng / ml, die unter R848-Einfluss um 0,01 ng / ml vermindert war und zeigte nach 6 Stunden eine durch R848 vermittelte 1,5-fach erhöhte IL-10-Ausschüttung. Pilzstimulierte DCs reagierten auf R848 mit einer tendenziell gesteigerten IL-10-

Ergebnisse

Antwort, was sich nach 6 Stunden in einer Konzentrationserhöhung von 7,2 ng / ml (ohne R848) auf 9,9 ng / ml (mit R848) messen ließ.

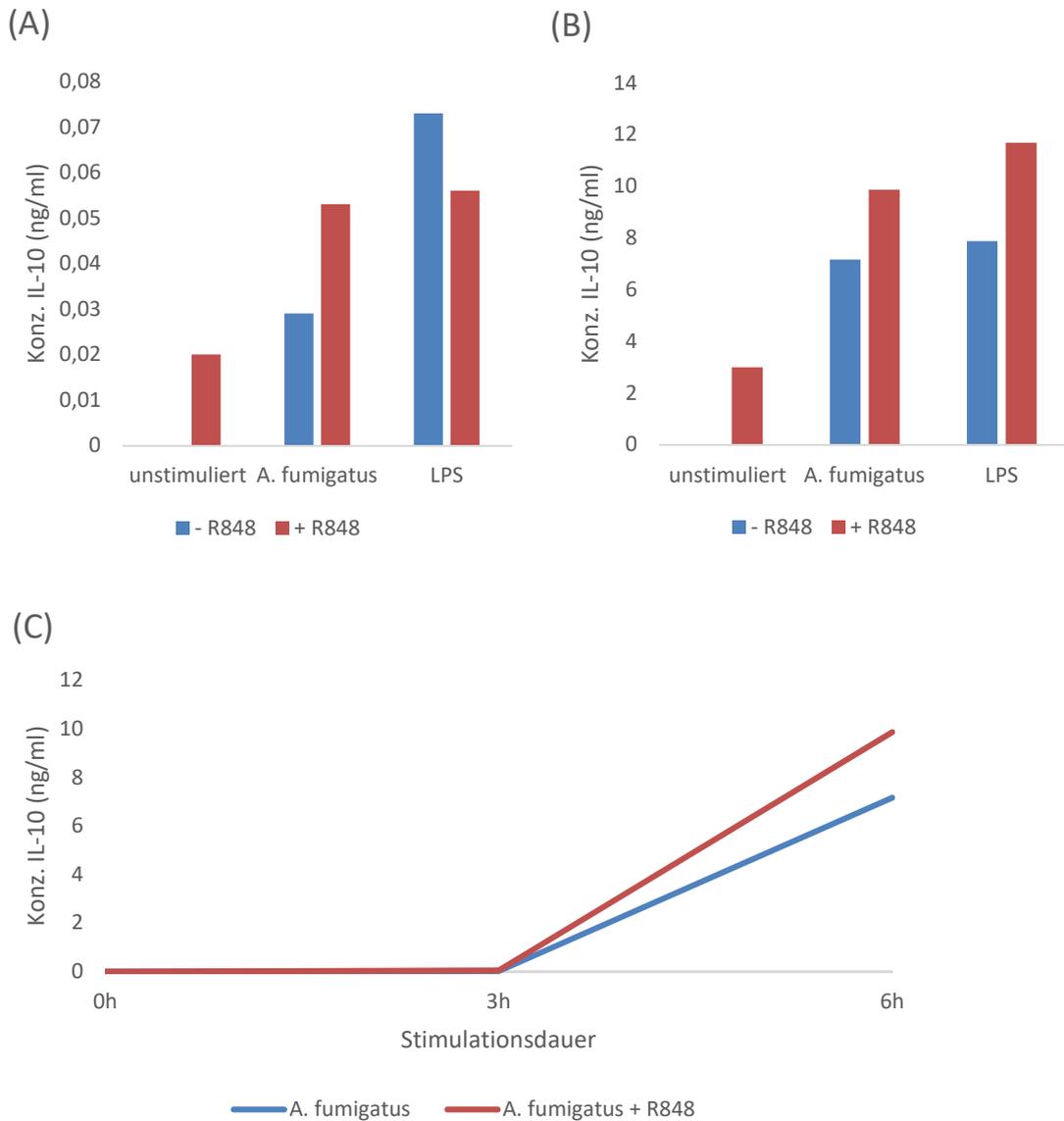


Abb. 17. IL-10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit A. fumigatus und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten des Spenders 2 nach 3h (A) und nach 6h (B) Stimulation mit R848. Grafik C zeigt den Einfluss von R848 abhängig von der Stimulationsdauer bei Spender 2; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle.

Ergebnisse

In der Grafik 17.C ist der zeitliche Verlauf der IL-10-Sekretion in An- und Abwesenheit von R848 dargestellt. So ist zwar eine zeitabhängige Sekretion des Zytokins feststellbar, die aber im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Zytokinen TNF- α und IL-6, keine wesentlichen durch R848-vermittelten Unterschiede aufweist.

Spender 1 und 3 verhielten sich in den Messungen tendenziell gleich wie der hier dargestellte und beschriebene Spender 2.

3.1.4. IL-1 β

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird bei zahlreichen mikrobiellen Infektionen freigesetzt. So reagieren DCs bei Kontakt mit *Aspergillus fumigatus* mit einer gesteigerten Expression von IL-1 β , was in diesem Versuch gezeigt werden konnte. Auch hier kam es zu spenderabhängigen Schwankungen in den Ergebnissen. Spender 3 zeigte das gleiche Verhalten wie die beiden anderen Spender, sezernierte jedoch deutlich niedrigere IL-1 β -Mengen, so dass nur Spender 1 und 2 grafisch dargestellt wurden (Abb. 18.).

Wie die Abbildung 18 zeigt, konnten in den Überständen naiver DCs im Gegensatz zur Negativkontrolle nach einer Stimulation mit R848 geringe Konzentrationen des Zytokins nachgewiesen werden. Dieser Wert zeigte aber keine zeitabhängige Veränderung. Bei der Positivkontrolle zeigte sich in Anwesenheit von R848 nach 3 Stunden eine 1,4-fache Erhöhung der IL-1 β -Menge, die nach 6 Stunden auf das 12-fache angestiegen war. Dieses R848-getriggerte Verhalten zeigte sich auch bei pilzstimulierten DCs. So konnte nach 3 Stunden in Abhängigkeit von R848 eine 9,6-fach gesteigerte IL-1 β -Ausschüttung, die nach 6 Stunden weiterhin um das 3,1-fache erhöht war, gemessen werden. Die Abbildung 18.C verdeutlicht den zeitlichen Verlauf der IL-1 β -Sekretion. Nach 3 Stunden Stimulationsdauer ist eine R848-abhängige IL-1 β -Ausschüttung bei pilzstimulierten DCs zu sehen.

Ergebnisse

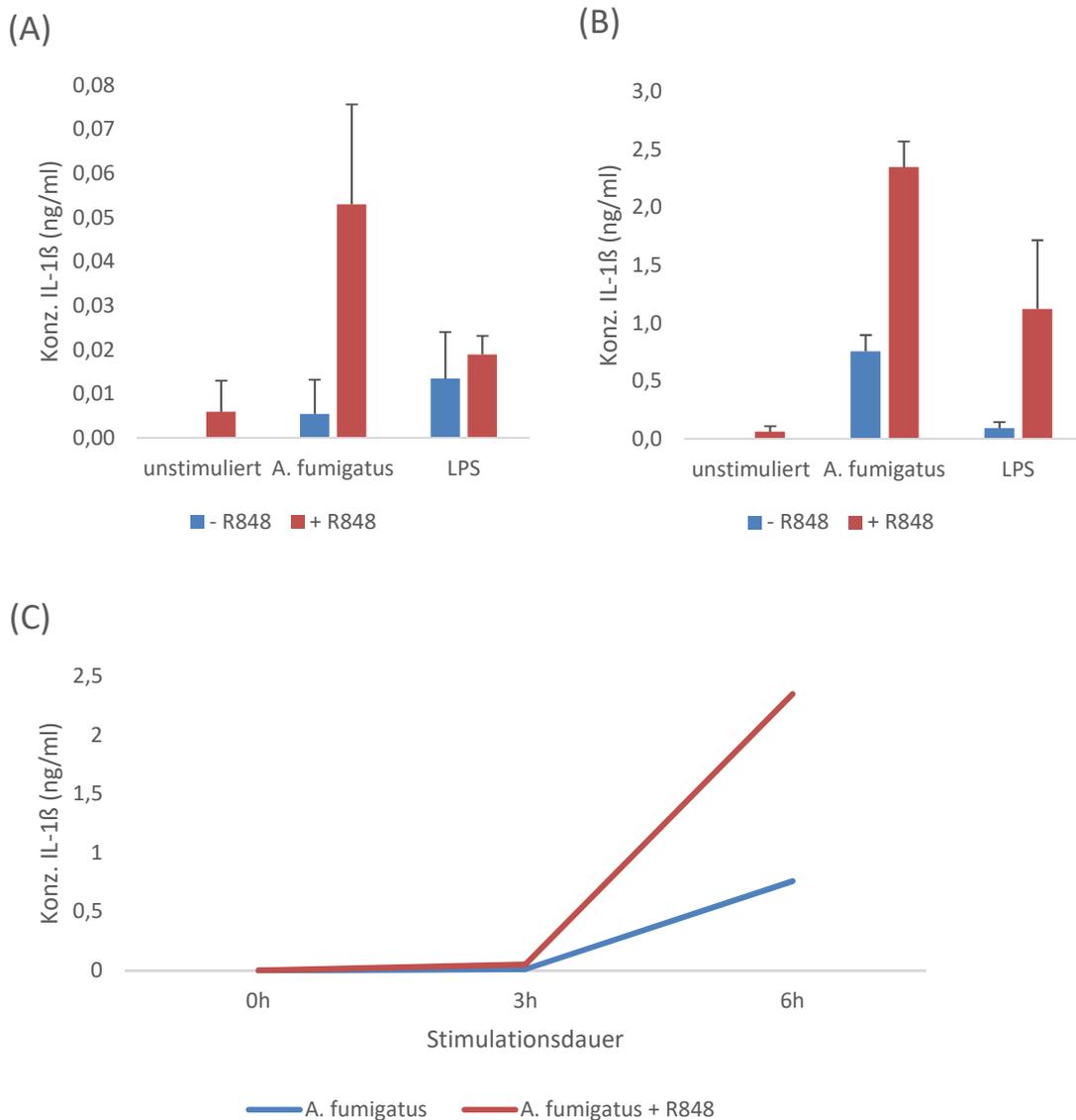


Abb. 18. IL-1 β - Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten der Spender 1 und 2 nach 3h (A) und 6h (B). Grafik C zeigt den Einfluss von R848 abhängig von der Stimulationsdauer bei Spender 1 und 2; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 2$; Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1.5. CXCL-10

Bei diesem Versuch konnte die CXCL10-Konzentration nur von den 6 Stunden-Überständen bestimmt werden, da das Material der 3 Stunden-Überstände für diese Messung nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Die Stimulation neuer

Ergebnisse

Spender-DCs für die 3 Stunden-Werte wäre möglich gewesen, dieses Material hätte aber auf Grund unterschiedlicher Spender für den direkten Vergleich (3 h - 6 h) nicht eingesetzt werden können.

Da CXCL10 bei Pilzinfektionen vermehrt exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Abwehr derselben spielt, wurde in diesem Ansatz überprüft, ob Resiquimod diese Zytokinantwort modifizieren kann.

Bei der Auswertung der Messdaten wurde Spender 3 auf Grund seiner geringeren CXCL10-Expression ausgenommen und gesondert dargestellt (Abb. 19.B), um die Messwerte von Spender 1 und 2 nicht zu verfälschen.

Wie in Abbildung 19 ersichtlich wird, induzierte R848 bei naiven DCs die Bildung von CXCL10, dessen Spiegel mit 1,8 ng / ml (Spender 1 und 2), bzw. 1,2 ng / ml (Spender 3) deutlich über der Negativkontrolle lagen. Die Positivkontrolle lieferte in Bezug auf R848 spenderabhängige Ergebnisse. So wurden in den Überständen der Positivkontrolle von Spender 1 und 2 eine R848-abhängige Reduktion von CXCL10 um 0,9 ng / ml gemessen. Spender 3 dagegen wies einen gegensätzlichen Trend auf. Demnach wurde nach Zugabe von Resiquimod eine um 0,5 ng/ml leicht erhöhte Konzentration an CXCL10 gemessen.

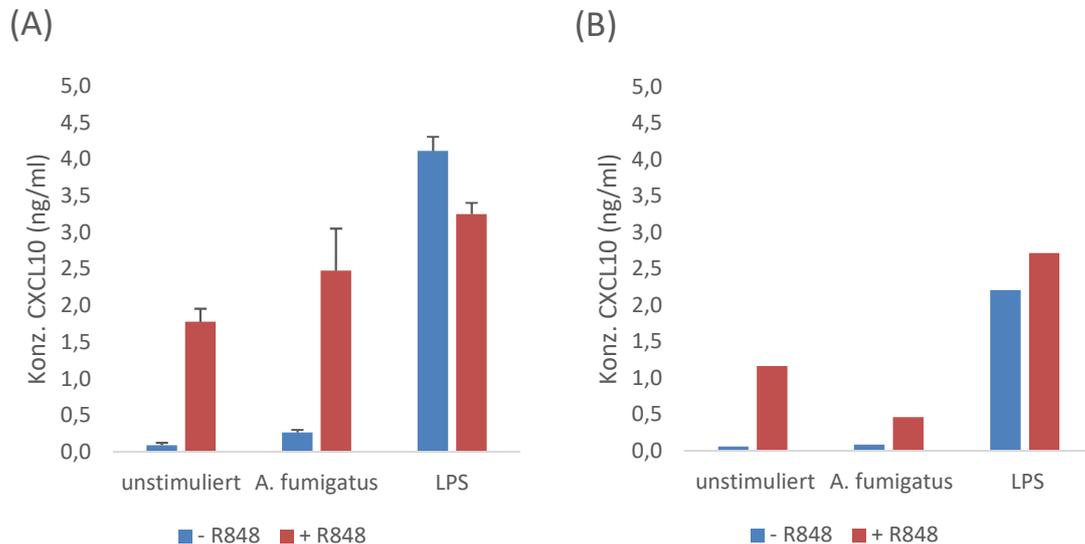


Abb. 19. CXCL10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten von Spender 1 und 2 (A) und Spender 3 (B) nach 6 h Stimulation mit R848; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 2$ (A), bzw. $n=1$ (B); Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Ergebnisse

Mit *A. fumigatus* stimulierte DCs der Spender 1 und 2 reagierten bei zusätzlicher R848-Stimulation mit einer 9,2-fach gesteigerten CXCL10-Ausschüttung. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei den Zellen des Spenders 3 in einer um den Faktor 5,3-gesteigerten CXCL10-Antwort bei gleichzeitiger Stimulation pilzkonfrontierter DCs mit R848.

3.1.6. CCL-20

Auch bei der Bestimmung der CCL20-Konzentrationen konnten, wie bei CXCL10 nur die 6-Stunden-Werte ausgewertet werden, da nicht ausreichend Material der 3-Stunden-Überstände vorhanden war.

Da das Chemokin CCL20 als möglicher Hauptregulator bei einer *Aspergillus*-Infektion fungiert, war es von Interesse, ob Resiquimod diese Reaktion positiv beeinflussen kann. Wie Abbildung 20 zeigt, führte die Stimulation naiver DCs mit R848 zu einer CCL20-Ausschüttung und erreichte eine Konzentration von 0,3 ng / ml. In der Negativkontrolle war kein CCL20 nachweisbar. Bei der Positivkontrolle konnte in Anwesenheit von R848 ein leichter Anstieg der CCL20-Produktion mit einer Differenz von 0,3 ng / ml beobachtet werden.

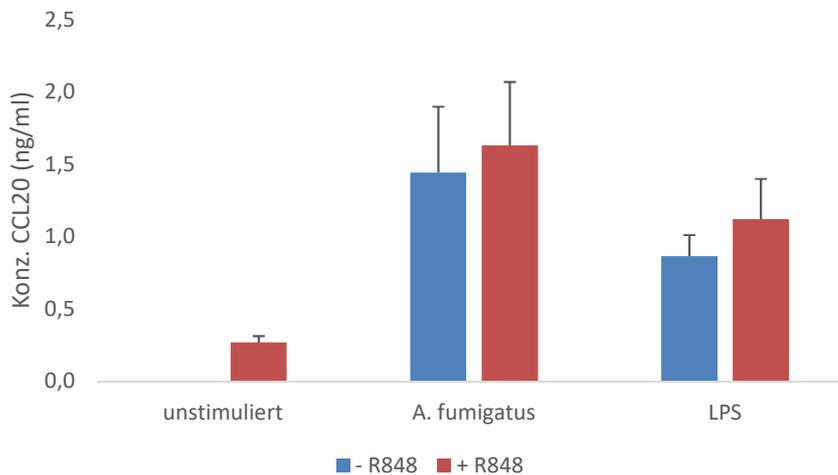


Abb. 20. CCL20- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Die Grafiken zeigen das Verhalten aller drei Spender. Stimulationszeit = 6 h; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle, n = 3. Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Pilzstimulierte Zellen wiesen im Vergleich zur Positivkontrolle höhere CCL20-Werte auf, der Effekt von R848 auf die Zytokinproduktion war jedoch auch in diesem Ansatz gering und zeigte sich in einer um lediglich 0,2 ng / ml erhöhten CCL20-Konzentration.

3.3. Analyse des Einflusses von R848 und *Aspergillus fumigatus* auf die Maturation humaner iDCs

Die Ergebnisse der Zytokinexpression Alum-stimulierter DCs legen die Vermutung nahe, dass die modulatorische Bedeutung von Alum in Bezug auf humane DCs tendenziell gering ist und daher Testungen von Alum als möglicher dendritischer Reifungsmodulator zu vernachlässigen sind.

Um eine denkbare Wirkung von Resiquimod auf die Reifung pilzinfizierter dendritischer Zellen zu überprüfen, wurden moDCs von drei unterschiedlichen Spendern mittels IL-4 und GM-CSF aus CD14⁺-Zellen generiert (siehe 2.2.1.) und mit *Aspergillus-fumigatus*-Keimschläuchen (MOI = 1), LPS (1 µg / ml) und R848 (1 µg / ml) für jeweils 6 und 12 Stunden stimuliert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit spezifischen Antikörpern, die sich gegen die Oberflächenmoleküle CD1a, CD14, CD40, CD80, CD83 und CD86 richten und mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und PE gekoppelt sind. Nach der Messung der Proben am FACS Calibur-Gerät wurden die Daten mittels der Software FlowJo[®] ausgewertet (siehe 2.2.2.6.).

Mit Hilfe der FACS-Analyse war es möglich die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle unreifer DCs in Reaktion auf *Aspergillus fumigatus* und Resiquimod quantitativ zu bestimmen und das Expressionsmuster während ihrer Reifung zu beurteilen. So konnte zum einen der Anteil für den jeweiligen Oberflächenmarker positiver DCs an der Gesamtzahl lebender Zellen und gleichzeitig auch die MFI (*mean fluorescence intensity* = mittlere Fluoreszenzintensität) berechnet werden. Diese ist ein Maß für die Anzahl gebundener Fluoreszenzfarbstoffmoleküle pro Zelle und beschreibt den Grad der Expression des detektierten Oberflächenmarkers. Unreife moDCs (= unstimulierte DCs) wurden in jedem Ansatz als Negativkontrolle mitgeführt. Mit LPS-stimulierte moDCs dienten als Positivkontrolle.

Um zu zeigen, dass in diesem Experiment moDCs getestet wurden, dienten die Marker CD1a und CD14. Diese wurden in der jeweiligen Zweifachfärbung (siehe 2.2.2.6.)

Ergebnisse

eingesetzt. Erwartungsgemäß waren nur noch ein sehr geringer Teil, nämlich 0,072% aller eingesetzten Zellen durch die über IL-4 und GM-CSF vermittelte Differenzierung Monozyten (CD14⁺).

Als Beispiel für die prozentuale Verteilung CD40-, CD80-, CD83- und CD86-positiver Zellen nach 6 und 12 Stunden Stimulation mit *A. fumigatus*, R848 und LPS dient die Tabelle 4, die auf Grundlage der Werte des Spenders 2 erstellt wurde. Das tendenzielle Verhalten der DCs von Spender 1 und Spender 3 entsprach den Zellen von Spender 2.

	CD40		CD80		CD83		CD86	
	6h	12h	6h	12h	6h	12h	6h	12h
unstimuliert	99,7	99,9	27,3	36,4	2,1	1,2	18,9	10,5
<i>A. fumigatus</i>	97,6	99,6	41,1	61,2	5,9	4,7	53,1	69,1
LPS	99,6	99,8	57,3	91,1	7,6	8,31	69,6	97,4
R848	99,7	99,8	57,9	93,2	9,4	7,1	45,1	98,2
<i>A. fum.</i> + R848	99,8	99,9	62,6	93,5	7,5	8,9	83,9	97,6
LPS + R848	99,6	99,9	57,1	93,5	6,1	4,6	70,9	98,0

Tab. 4. Anteil der positiven DCs in Prozent in Bezug auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen nach 6 h und 12 h Stimulation. Aufgeführt sind die Werte des Spenders 2 in Prozent; unstimulierte DCs = Negativkontrolle; mit LPS stimulierte DCs = Positivkontrolle

Im Vergleich zur Negativkontrolle ist eine beginnende Ausreifung stimulierter DCs zu erkennen. Bei den unstimulierten DCs betrug der Anteil CD40⁺-Zellen bereits 99,7% und blieb während der Stimulationen unverändert.

Die alleinige Stimulation mit Resiquimod führte bereits nach 6 Stunden im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer Zunahme an CD80⁺-(+ 2-fach), CD83⁺-(+ 4,5-fach) und CD86⁺-(+ 2,4-fach) DCs. Nach 12-stündiger Stimulation mit R848 zeigte sich eine 2,5-fache (CD80⁺) und 5,9-fache (CD83⁺) Zunahme positiver DCs. Die um den Faktor 9,4 gesteigerte Anzahl an CD86⁺-Zellen stellte das maximal gemessene Ergebnis nach 12 Stunden dar. Die Positivkontrolle zeigte bei beiden Zeitpunkten in Abhängigkeit von Resiquimod keine nennenswerten Unterschiede in der prozentualen Verteilung von

Ergebnisse

CD80⁺- und CD86⁺-Zellen. Der Anteil CD83⁺-DCs war in Anwesenheit von R848 nach 6 und 12 Stunden hingegen um das 1,3-fache (6 h), bzw. 1,8-fache (12 h) reduziert.

Vergleicht man bei der Konfrontation dendritischer Zellen mit *A. fumigatus* nun den Anteil positiver Zellen in Abhängigkeit von R848 so konnte ein positiver Trend beobachtet werden. Die Ko-Stimulation dendritischer Zellen mit *A. fumigatus* und R848 führte nach 6 Stunden zu einer einheitlichen Zunahme an CD80⁺-(+ 1,5-fach), CD83⁺-(+ 1,3-fach) und CD86⁺-(+ 1,6-fach) DCs im Vergleich zu DCs, die nicht mit R848 stimuliert worden waren. Diese Tendenz blieb nach einer 12-stündigen Stimulation in etwa gleich, wie die Abbildung 21 verdeutlicht.

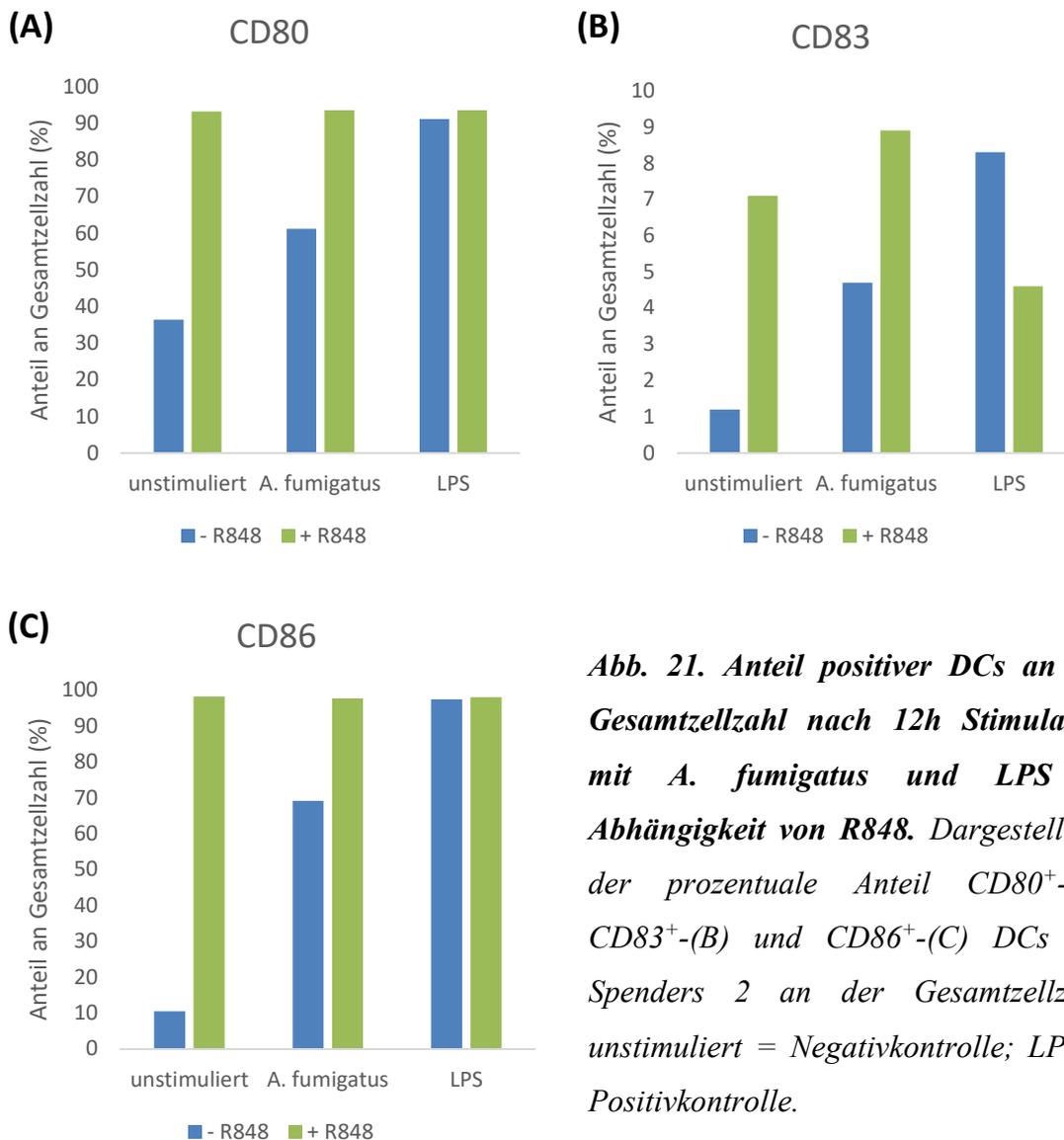


Abb. 21. Anteil positiver DCs an der Gesamtzellzahl nach 12h Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD80⁺-(A), CD83⁺-(B) und CD86⁺-(C) DCs des Spenders 2 an der Gesamtzellzahl. unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle.

Ergebnisse

Auf die Darstellung des Markers CD40 in Abbildung 21 wurde verzichtet, da der prozentuale Anteil ungeachtet der Stimulationen unverändert bei ca. 99,7% blieb.

Betrachtet man nun das Expressionsmuster und das Level der einzelnen Oberflächenmarker, indem man die MFI als Maß für die Expression der analysierten Oberflächenmarker stimulierter und unstimulierter Zellen vergleicht, ergibt sich das in Abbildung 22 dargestellte Bild. Dort wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Marker CD40, CD80 und CD86 der Zellen von Spender 1 und 2 in Abhängigkeit von R848 nach einer Stimulationsdauer von 12 Stunden aufgetragen. Spender 3 zeigte in der Expression der einzelnen Marker die gleichen Tendenzen. Auf Grund spenderabhängiger divergierender Werte in der Ausprägung des Markers CD83 bei gleichzeitiger Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* und R848, wird dieser gesondert dargestellt (Abb. 24) und besprochen.

Auffallend ist, dass sich die Level des Markers CD40, im Gegensatz zu seiner prozentualen Verteilung, die wie bereits beschrieben, durch die Stimulationen geringfügig unverändert bei ihrem Ausgangswert von 99,7% blieb, abhängig vom Agens auf der Oberfläche stimulierter DCs veränderten. Bereits die alleinige Stimulation mit Resiquimod führte bei naiven DCs zu einer Zunahme der Expression von CD40 (+1,9-fach (6 h) und + 2,8-fach (12 h)), CD80 (+1,8-fach (6 h) und +2,4-fach (12 h)), CD83 (+1,5-fach (6 h) und +4,6-fach (12 h)) und CD86 (+1,5-fach (6 h) und +5-fach (12 h)). Die maximal messbare Zunahme zeigte sich dabei nach 12 Stunden in der Expression der Marker CD83 und CD86. Die durch *A. fumigatus* induzierte Reifung naiver DCs konnte in diesem Versuch durch die Zunahme der Expression von CD40, CD80 und CD86 erfasst werden (Abb. 22). Nach 12-stündiger Inkubation mit *A. fumigatus* wurde eine 2-fache Zunahme der Expressionslevel von CD40 und CD80 gemessen, die Expression von CD86 stieg sogar um das 4-fache an. Der Reifemarker CD83 reagierte auf *Aspergillus fumigatus* mit einer spenderabhängigen Zunahme um das 2- bis 6-fache (Abb. 24).

Ergebnisse

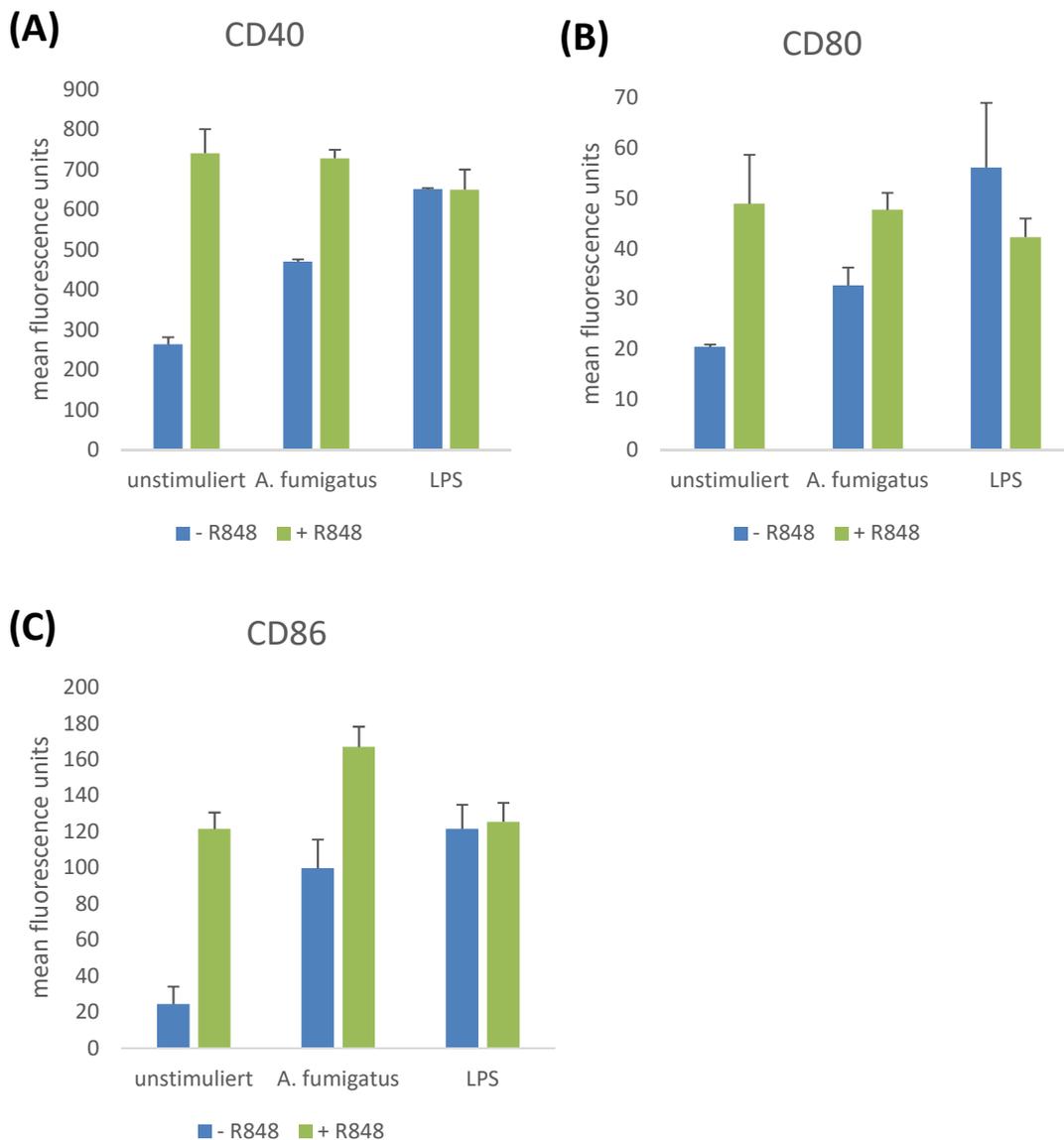


Abb. 22. Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Oberflächenmarker auf moDCs nach 12 h Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848. Dargestellt sind die Oberflächenmarker CD40 (A), CD80 (B), und CD86 (C); als Grundlage für die Berechnung diente die MFI der Spender 1 und 2; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle; $n = 2$; Mittelwerte \pm Standardabweichung

Die gleichzeitige Stimulation mit R848 beeinflusste, wie die Abbildung 23 verdeutlicht, die Expression der detektierten Oberflächenmarker. So reagierten pilzstimulierte DCs auf R848 mit einer Zunahme der CD40-Expression um 74% (6 h), die nach 12 Stunden um

Ergebnisse

54% erhöht war. Analog dazu wurde die Expression von CD40 bei der Positivkontrolle nach 6 Stunden durch R848 um 32% heraufreguliert und zeigte nach 12 Stunden keine Unterschiede mehr. Die Verteilungsdichte der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nahm auf pilzstimulierten Zellen in Anwesenheit von R848 ebenfalls zu und ergab nach 6 Stunden einen Anstieg von 41% (CD80) und 23% (CD86). Diese Zunahme blieb nach einer 12-stündigen Ko-Stimulation mit R848 bei CD80 (46%) gleich und zeigte bei CD86 mit 68% die stärkste Entwicklung. Diese Entwicklung war bei der Positivkontrolle nicht zu beobachten. So ergaben sich bei ihr in Anwesenheit von R848 in der Expression von CD80 bei beiden Zeitpunkten leicht reduzierte Werte, der Marker CD86 blieb von R848 unbeeinflusst.

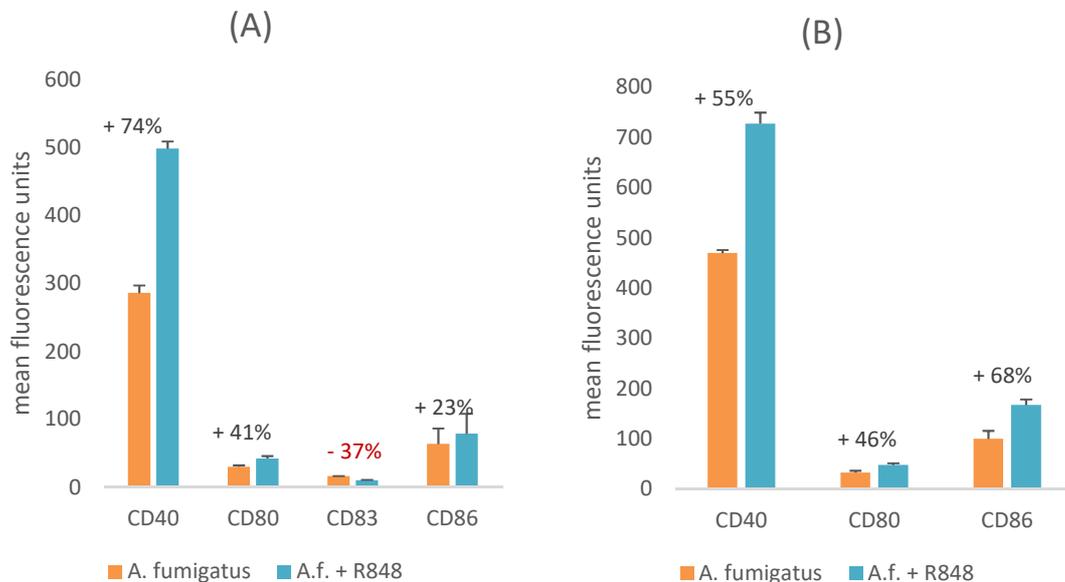


Abb. 23. Einfluss des Modulators R848 auf die Maturation *A. fumigatus* stimulierter DCs. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Spender 1 und 2 nach 6h (A) und 12h (B) Stimulation mit *A. fumigatus* \pm R848. $n = 2$; Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Unterschiede in der Expression der jeweiligen Oberflächenmarker sind in Prozent angegeben. Die Expression des Markers CD83 nach 12h wird in Abb. 24 gesondert dargestellt.

Die Expression des Reifemarkers CD83 auf pilzstimulierten DCs in Anwesenheit von R848 ergab je nach Spender unterschiedliche Ergebnisse. So zeigten Spender 1 und 2,

Ergebnisse

wie auch die Positivkontrolle nach 6 Stunden eine Resiquimod-abhängige Abnahme der CD83-Expression um 37%. Spender 3 dagegen reagierte auf eine Ko-Stimulation mit einer Zunahme des CD83-Levels um 25%. Nach einer 12-stündigen Stimulation ergab sich ein anderes Bild. In Abbildung 24 sind die Spender 1 (A) und Spender 2 (B) getrennt grafisch dargestellt. Nach einer 12-stündigen Stimulation reagiert Spender 1 auf *Aspergillus fumigatus* in Anwesenheit von R848 mit einer Zunahme der Expression von CD83 um 39%, hingegen Spender 2 mit einer Abnahme um 76%. Spender 3 verhielt sich bei diesem Messzeitpunkt wie Spender 1.

Eine R848-abhängige Reduktion des CD83-Levels zeigte sich auch bei der Positivkontrolle (Abb. 24).

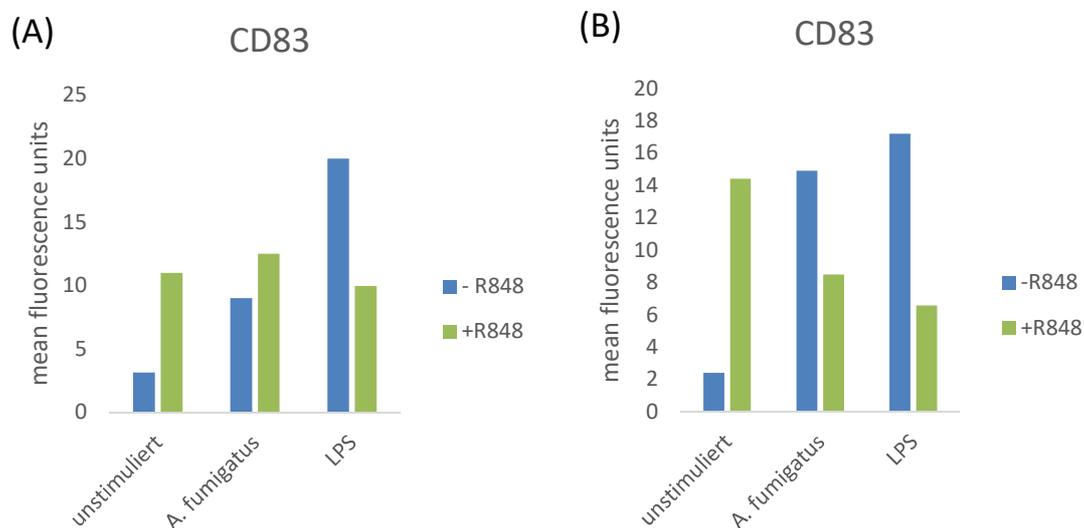


Abb. 24. Spenderabhängiges Verhalten des Reifemarkers CD83 unter Resiquimod. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Spender 1 (A) und 2 (B) nach 12h Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* und LPS in An- und Abwesenheit von R848; unstimuliert = Negativkontrolle; LPS = Positivkontrolle

4. Diskussion

Trotz der Weiterentwicklung diagnostischer und therapeutischer Methoden in der Behandlung von Pilzerkrankungen, ist der opportunistische Erreger *Aspergillus fumigatus* insbesondere für immungeschwächte Patienten weiterhin ein gefürchteter und gefährlicher Keim (Lin et al. 2001). Er führt auf Grund der mangelnden Immunabwehr und damit verbundenen insuffizienten Abtötung der eingeatmeten *Aspergillus*-Sporen zu dem Krankheitsbild der invasiven Aspergillose. Diese Erkrankung geht bei immunsupprimierten Patienten immer noch mit einer hohen Letalität einher, die bis zu 94% betragen kann (Denning und Stevens 1990).

In den letzten Jahren konnten diagnostische Verfahren verbessert und neue sensitive Techniken erprobt werden, um somit eine möglichst frühe Diagnosefindung zu ermöglichen, die für den frühen Therapiebeginn und die damit verbundene positive Prognose für den Patienten unerlässlich sind. Einige dieser Methoden, wie der DNA-Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion sind für die Diagnosestellung einer IA noch nicht ausreichend etabliert und standardisiert und werden nur von wenigen Speziallaboren durchgeführt (White et al. 2013). Daher empfiehlt es sich, bei Verdacht oder einem Hinweis auf eine invasive Aspergillose eine sofortige kalkulierte antimykotische Therapie zu beginnen, um die Überlebenschancen der Patienten zu verbessern (Caillot et al. 1997). Das leider nur moderate Ansprechverhalten aktuell eingesetzter Antimykotika verbunden mit zum Teil massiven therapielimitierenden Nebenwirkungen bildet keine günstige Grundlage für eine erfolgreiche Therapie und erfordert zwingend die Erforschung neuer effektiverer Medikamente (Segal et al. 2008).

Betrachtet man die Pathogenese einer invasiven Aspergillose, so spielt das angeborene Immunsystem, insbesondere die dendritischen Zellen eine zentrale Rolle in der Abwehr des Pilzes *Aspergillus fumigatus* und der gleichzeitigen Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Ramirez-Ortiz und Means 2012). Das Imidazoquinolin Resiquimod, in seiner Funktion als TLR7- und TLR8-Agonist, besitzt immunstimulatorische Eigenschaften, indem es beispielsweise die Maturation und Zytokinproduktion dendritischer Zellen anregt (Ahonen et al. 1999). Die Wirkweise des Immunmodulators Alum ist zwar noch nicht hinreichend geklärt, zeigt aber immunstimulatorisches Potential (Ghimire et al. 2012). Unter diesen Gesichtspunkten wurde in dieser Arbeit der mögliche

immunstimulatorische Effekt von Alum und Resiquimod auf dendritische Zellen in Gegenwart von *Aspergillus fumigatus* untersucht.

4.1. Regulation der Zytokinsekretion und Maturation pilzkonfrontierter dendritischer Zellen unter Behandlung mit R848

Die Zytokinsekretion pilzkonfrontierter moDCs unter Resiquimod-Behandlung wurde auf Proteinebene untersucht. Es wurden die Zeitpunkte für eine Stimulation mit R848 festgesetzt (3 und 6 Stunden) und eine Konzentration von 1 µg / ml gewählt, die sich in vorherigen Studien als effektive Stimulationsdosis erwies (Wagner et al. 1999).

Erwarteterweise zeigten sich bei der Sekretion der Zytokine und der Expression der Oberflächenmarker zum Teil starke spenderabhängige Schwankungen. Auf diese Gegebenheit wird unter 4.3. näher eingegangen.

In der Immunabwehr des Pilzes nehmen die dendritischen Zellen eine zentrale Stellung ein (Ramirez-Ortiz und Means 2012). Durch die Phagozytose des Erregers und die über PRRs induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie die Aktivierung des adaptiven Immunsystems sind sie maßgeblich an der Bekämpfung des Pilzes beteiligt (Ramirez-Ortiz und Means 2012). Die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine bei einer Konfrontation dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus* konnte in dieser Arbeit zweifelsfrei demonstriert werden. Es zeigten sich als Reaktion auf *Aspergillus fumigatus* erhöhte Level der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β und CCL20. Hingegen wurde das pilzspezifische Chemokin CXCL10 bei 6-stündigem *Aspergillus*-Kontakt sehr gering produziert. CXCL10 trägt maßgeblich zur Abwehr einer *Aspergillus*-Infektion bei. Das Ausmaß der Sekretion dieses Zytokins wird jedoch entscheidend von seinem Genotyp bestimmt. So exprimieren iDCs mit einem Wildtyp-Allel für CXCL10 bei einer *Aspergillus*-Infektion signifikant höhere Level dieses Chemokins im Vergleich zu iDCs, die bestimmte Haplotypen tragen (Mezger et al. 2008b).

Im Vergleich zu bakteriellem Lipopolysaccharid erwies sich *Aspergillus fumigatus* in der Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β und CCL20 als stärkerer Induktor. Im Gegensatz zu dem TLR2- und TLR4-Agonisten LPS, sind an der Erkennung des Pilzes *Aspergillus fumigatus* deutlich mehr PRRs beteiligt, unter anderem auch Dectin-1 (Mansour et al.

2012). Dies könnte die stärkere Zytokinausschüttung als Antwort auf *Aspergillus fumigatus* im Vergleich zu LPS erklären.

Wie Mezger und Kollegen zeigen konnten, werden IL-1 β und CCL20 wie auch andere Zytokine bei Kontakt mit *Aspergillus fumigatus* sezerniert, wobei CCL20 im Vergleich zu anderen Zytokinen am stärksten exprimiert wird (Mezger et al. 2008a).

Zahlreiche Studien, inklusiver dieser (Mezger et al. 2008a), belegt eine Relevanz dendritischer Zellen in der Immunabwehr aspergillärer Infektionen (Ramirez-Ortiz und Means 2012; Graziutti et al. 2001) und damit stellt der TLR7/TLR8-Agonist Resiquimod als Stimulant dendritischer Zellen einen möglichen Ansatz in der Immuntherapie invasiver Aspergillosen dar. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass R848 bei dendritischen Zellen die Ausschüttung zahlreicher Zytokine, wie TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL20 und CXCL10 induziert (Ahonen et al. 1999; Gorden et al. 2005; Peine et al. 2014a; Jensen und Gad 2010). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Daten dieser Studien, indem bereits eine 6-stündige Stimulation mit R848 bei naiven moDCs zu einer Sekretion von TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL20 und CXCL10 führte. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Studie von Jensen und Kollegen (Jensen und Gad 2010), wurde die stärkste Induktion durch R848 im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei TNF- α und IL-6 beobachtet. Resiquimod besitzt, wie bereits beschrieben und in dieser Arbeit demonstriert, auf Grund der Induktionsfähigkeit inflammatorischer Zytokine in dendritischen Zellen immunstimulatorische Eigenschaften (Ahonen et al. 1999; Gibson et al. 2002). Ein potentieller Einfluss von Resiquimod in der Therapie von *Aspergillus-fumigatus*-Infektionen ist bislang absent. Jedoch konnte bereits demonstriert werden, dass eine gleichzeitige Stimulation verschiedener Toll-like-Rezeptoren dendritischer Zellen, beispielsweise TLR3/TLR4 mit TLR7, 8 oder 9 die Ausschüttung von Zytokinen potenziert (Napolitani et al. 2005). In dieser vorliegenden Arbeit konnte durch Konzentrationsbestimmung aller sechs regulatorischer Proteine eine Resiquimod-abhängige Zytokinantwort pilzinfizierter DCs beschrieben werden (Abb. 15 - 20). So kam es in Anwesenheit von Resiquimod zu einer verstärkten Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL20 und CXCL10 in Reaktion auf *Aspergillus fumigatus*. Hierbei zeigten TNF- α , IL-6 und IL-1 β in ihrer Sekretion den stärksten positiven Einfluss von R848 mit einer 3- bis 10-fach gesteigerten Ausschüttung. Die

Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zeigte in Abhängigkeit von R848 nur eine moderate Erhöhung.

In der Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* sind bestimmte Zytokine von besonderer Bedeutung. Das Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen (v.a. TNF- α , IFN- γ , IL-1 und IL-6) und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-4 und IL-10) beeinflusst die Prognose einer invasiven Aspergillose maßgeblich (Cenci et al. 1997; Cenci et al. 1998; Stevens 2006). Eine T_H1-dominierende pro-inflammatorische Immunantwort stellt daher die Basis einer effektiven Antwort auf eine *Aspergillus fumigatus*- Infektion dar (Cenci et al. 1998). Diese Arbeit zeigt, dass R848 die Zytokine TNF- α und IL-6 in der Abwehr des Pilzes *Aspergillus fumigatus* am stärksten beeinflusst. Mehrad und Kollegen konnten in einem Mausmodell demonstrieren, dass inokulierte *Aspergillus*-Konidien einen Anstieg von TNF- α in der Lunge, verbunden mit einem Anstieg neutrophiler Granulozyten induzieren und eine Behandlung mit TNF- α -Blocker das Überleben der Mäuse drastisch reduziert (Mehrad et al. 1999). In ähnlicher Weise ist IL-6 an der Rekrutierung phagozytärer Zellen, v.a. neutrophiler Granulozyten maßgeblich beteiligt (Clahsen und Schaper 2008). Ein Mangel an IL-6 resultiert in einer insuffizienten Phagozytose von *Aspergillus*-Hyphen und einer erhöhten Mortalität (Cenci et al. 2001). Die von *Aspergillus fumigatus* vermittelte Stimulation des Dectin-1-Rezeptors auf mononukleären Zellen induziert über das NLRP3-Inflammasom die Sekretion von IL-1 β (Saïd-Sadier et al. 2010). IL-1 β ist, wie auch TNF- α und IL-6 (Clahsen und Schaper 2008; Vieira et al. 2009), für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen verantwortlich (Miller et al. 2007), die das Auskeimen und Wachstum des Pilzes durch effiziente Phagozytose kontrollieren und unterbinden. *Aspergillus fumigatus* ist jedoch in der Lage die Wirkung von IL-1 β zu hemmen, indem er über seinen Zellwandbestandteil Galaktosaminogalactan (GAG) in humanen PBMCs die Sekretion des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) induziert und wie an einem Mausmodell gezeigt, das Risiko für eine invasive Aspergillose erhöht (Gresnigt et al. 2014).

Die während einer *Aspergillus*-Infektion von dendritischen Zellen sezernierten Chemokine CXCL10 und CCL20, die in dieser Arbeit ebenfalls in Anwesenheit von Resiquimod verstärkt produziert wurden, wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Effektor-T_H1-Zellen und erhöhen die Attraktivität dieses

Diskussion

Infektionsherdes (Gafa et al. 2007). Des Weiteren beeinflusst CXCL10 die endotheliale T-Zell-Adhäsion und T-Zell-Chemotaxis (Gafa et al. 2007).

Die Rolle des Zytokins IL-10 bei einer *Aspergillus*-Infektion ist noch nicht hinreichend geklärt. Unter Einfluss von Resiquimod zeigten naive und pilzstimulierte DCs aller drei Spender höhere IL-10-Konzentrationen, die jedoch im Vergleich zur Beeinflussung anderer Zytokine nur relativ moderat erhöht waren. Dies ist jedoch für die Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* sinnvoll, da eine IL-10 getriggerte T_H2-Antwort die Prognose einer IA verschlechtert (Stevens 2006). Eine Vergleichsstudie aus dem Jahr 2001 ließ einen Zusammenhang zwischen einem hohen IL-10 Level und einem schlechten Outcome immunsuppressiver Patienten mit einer invasiven Aspergillose annehmen (Roilides et al. 2001). Umso erstaunlicher war das Ergebnis einer klinischen Studie aus dem Jahr 2009, die zeigt, dass initial hohe IL-10-Spiegel mit einer geringeren Mortalität verbunden sind (Chai et al. 2010). Man vermutet, dass eine andauernde und übermäßige inflammatorische Reaktion auf *Aspergillus fumigatus* die Progression einer IA fördert und IL-10 in diesem Zusammenhang protektiv wirkt (Zelante et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde des Weiteren die Wirkung von Resiquimod auf die Reifung pilzinfizierter dendritischer Zellen untersucht. Es wurden iDCs mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen in An- und Abwesenheit von Resiquimod (1 µg / ml) stimuliert und die Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Der Oberflächenmarker CD40 wird, wenn auch nur in sehr geringen Mengen, auch auf unreifen DCs, konstitutiv exprimiert (Banchereau et al. 1994). Dies zeigte sich auch in dieser Arbeit. So wurde das kostimulatorische Molekül CD40 auf ca. 99% aller Zellen, auch auf unstimulierten, unreifen DCs exprimiert, zeigte aber Veränderungen in der Moleküldichte, bzw. im Expressionslevel von CD40 als Antwort auf die verschiedenen Stimuli.

Die Wirkung von *Aspergillus fumigatus* auf unreife DCs wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Es zeigte sich, dass *A. fumigatus* die Aktivierung und Maturation unreifer humaner moDCs induziert und dass dieser Prozess durch eine Änderung des Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen gekennzeichnet ist (Braedel et al. 2004). Diese Daten ließen sich in dieser Arbeit reproduzieren (Abb. 21-24). So konnte die durch *Aspergillus fumigatus* induzierte

Diskussion

Aktivierung und Reifung unreifer DCs durch die Zunahme des Anteils an CD80⁺, CD83⁺ und CD86⁺ -DCs, sowie einer Expressionserhöhung von CD40, CD80, CD83 und CD86 belegt werden.

Wie Ahonen und Kollegen bereits nachweisen konnten, induziert R848 über TLR7 und 8 ebenfalls die Aktivierung und Maturation unreifer DCs, messbar an der Änderung des Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen (Ahonen et al. 1999). Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sind mit den Daten dieser Studie konform. So führte eine 12-stündige Stimulation unreifer DCs mit R848 zu einem Anstieg der Expressionslevel von CD40, CD80, CD83 und CD86, sowie des prozentualen Anteils CD80⁺, CD83⁺ und CD86⁺ -DCs. Der Reifungsmarker für DCs, CD83 und das kostimulatorische Molekül CD86 zeigten dabei die maximal messbare Zunahme.

Auch bei einer *Aspergillus*-Infektion scheint R848 dendritische Zellen in der Aktivierung und Reifung günstig zu beeinflussen. So reagierten in dieser Arbeit DCs in Anwesenheit von R848 auf *Aspergillus fumigatus* mit einer verstärkten Expression von CD40, CD80 und CD86, die im Vergleich dazu ohne R848-Einfluss bedeutend geringer ausgeprägt war. In Bezug auf eine potentielle R848-abhängige Veränderung in der Expression des Reifemarkers CD83 auf pilzstimulierten DCs kann in dieser Arbeit auf Grund der numerischen Stichprobengröße statistisch keine einwandfrei Aussage getroffen werden. So kam es bei zwei Spendern nach 12 Stunden zu einer Resiquimod-vermittelten Zunahme der Expressionsdichte des Markers CD83 auf pilzstimulierten DCs, dementsgegen reagierte der dritte Spender mit einer Abnahme der CD83-Expression. Der Anteil CD83⁺-DCs nahm bei einer simultanen Stimulation mit *A. fumigatus*. und R848 leicht zu. Diese divergierenden Ergebnisse in Bezug auf die Expression von CD83 bei simultaner Stimulation mit *Aspergillus*, bzw. LPS und R848 wurde bereits von Pufnock und Kollegen beschrieben (Pufnock et al. 2011). Sie konnten zeigen, dass eine gleichzeitige Stimulation unreifer DCs mit LPS und R848 eine inhomogene Population reifer DCs hervorruft, die sich in dem Expressionsmuster ihrer Oberflächenmarker unterscheiden und CD83⁺ oder CD83^{neg} sein können (Pufnock et al. 2011). Des Weiteren konnte eine Ko-Stimulation von LPS und R848 die Expression von CD80, CD83 und CD86 nicht steigern, wobei der Anteil CD83⁻-DCs bei einer gleichzeitigen Stimulation mit LPS und R848 zunahm (Pufnock et al. 2011). Der Rückgang CD83⁺-Zellen konnte auch in dieser Arbeit bei der mit Resiquimod-behandelten Positivkontrolle festgestellt

Diskussion

werden. Die legt die Vermutung nahe, dass eine simultane Stimulation unreifer DCs mit *Aspergillus* und R848 eine mögliche Auswirkung auf die CD83-Expression dendritischer Zellen haben kann. Hier wäre es sicherlich sinnvoll, diese Versuchsreihe mit einer größeren Spenderpopulation zu wiederholen.

Die Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen ist essentiell für eine effektive Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus*. Während ihres Reifungsprozesses, induziert durch Antigenkontakt, verändert sich das Expressionsmuster zahlreicher Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen und sie verlieren ihre phagozytotische Aktivität (Cella et al. 1997; Banchereau et al. 2000; Garrett et al. 2000). Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86 ist Voraussetzung für eine effektive Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Fehlen solche kostimulatorischen Moleküle, so werden T-Zellen nur unvollständig aktiviert. Das Oberflächenmolekül CD83, auch als Reifemarker dendritischer Zellen bekannt (Zhou und Tedder 1995), fungiert zudem als ein solches kostimulatorisches Molekül. Eine induzierte Hemmung der CD83-Expression auf dendritischen Zellen resultiert in einer verminderten T-Zell-Aktivierung (Aerts-Toegaert et al. 2007).

Generell lassen sich die in dieser Arbeit gewonnenen Daten auf Grund der spenderabhängigen Schwankungen und der geringen Stichprobengröße lediglich als Trends erkennen. Daher werden keine signifikanten Ergebnisse repräsentiert. Jedoch stellen sie einen guten Ausgangspunkt für zukünftige Arbeiten dar. Durch den Einsatz einer größeren Spenderpopulation könnten auftretende Streuungen der Ergebnisse mit nicht-parametrischen Verfahren statistisch ausgewertet und unter Verwendung eines eventuell korrigiertem Signifikanzniveaus beurteilt werden. Des Weiteren wäre es denkbar, weitere Stimulationszeitpunkte einzusetzen, um einen zeitlichen Verlauf zu beurteilen. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, Resiquimod in weiteren Konzentrationen zu testen, um dosisabhängige Reaktionen zu dokumentieren. Im Hinblick auf das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung wären die hier durchgeführten Versuche zu wiederholen.

Dennoch lassen die hier gewonnenen Ergebnisse einen möglichen additiven Effekt von Resiquimod auf dendritische Zellen im Rahmen einer *Aspergillus*-Infektion zu. Es wäre denkbar, dass Resiquimod in der Immuntherapie invasiver Aspergillosen einen möglichen Nutzen bringt. Da eine Therapie dieser nach wie vor mit einer hohen

Diskussion

Sterberate behafteten Infektion trotz Einsatz neuer Antimykotika weiterhin schwierig ist, versucht man seit einigen Jahren mittels immuntherapeutischer Verfahren die Prognose, vor allem von Hochrisikopatienten, zu verbessern (Carvalho et al. 2012). Diese Patienten, vornehmlich stammzelltransplantierte Patienten, verfügen über ein supprimiertes oder noch nicht regeneriertes Immunsystem. Es wurde bereits versucht über die Gabe von Granulozyten-Transfusionen und dem Wachstumsfaktor G-CSF die Prognose neutropenischer Patienten unter einer antifungalen Therapie zu verbessern, jedoch konnte in einer randomisierten Studie der erhoffte Nutzen dieser additiven Behandlung nicht verifiziert werden (Seidel et al. 2008). Weitere Therapieansätze, wie die Gabe von IFN- γ in Verbindung mit Antimykotika, zeigen Erfolg und geben Hoffnung auf angemessene Behandlungsverfahren (Yamashita et al. 2013), jedoch fehlen weitere umfangreiche kontrollierte klinische Studien, die den Einsatz als Immuntherapeutika in der Routinebehandlung prüfen (Carvalho et al. 2012).

Ein möglicher Nutzen als Immunmodulator in der Behandlung invasiver Aspergillosen ist für Resiquimod bisher noch nicht untersucht worden. Erste Erfolge in der Verwendung als orales Therapeutikum zur Behandlung chronischer Hepatitis-C-Infektionen konnten in einer Phase IIa-Studie erzielt werden, die eine Reduktion der Viruslast unter Resiquimod-Behandlung aufwies (Pockros et al. 2007). Die durch Resiquimod zum Teil massiv induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, führte neben den angestrebten Effekten jedoch auch zu massiven, therapielimitierenden Nebenwirkungen, so dass diese Studie abgebrochen werden musste. Eine aktuelle Studie, welche im Januar 2014 veröffentlicht wurde, untersuchte die Wirksamkeit von R848 als systemisches Therapeutikum der viszeralen Leishmaniose in einem Mausmodell (Peine et al. 2014b). Peine und Kollegen konnten zeigen, dass mit *Leishmania donovani* infizierte Mäuse, die liposomales Resiquimod injiziert bekamen, eine deutlich geringere Erregeranzahl, sowie eine gesteigerte T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion aufwiesen (Peine et al. 2014b). Auf Basis dieser Ergebnisse wäre es denkbar, in folgenden Forschungsprojekten Resiquimod als Immuntherapeutikum in der Behandlung der invasiven Aspergillose zu testen.

Zudem bietet sich R848 auf Grund seiner stimulatorischen Fähigkeiten als Adjuvans in einer DC-basierten Immuntherapie an. Der Einsatz dendritischer Zellen in der Immuntherapie, beispielsweise in der Behandlung maligner Erkrankungen, ist derzeit

Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte (Anguille et al. 2014). Im Gegensatz zu anderen Immuntherapeutika, sind dendritische Zellen in ihrer Anwendung und ihrer geringen Toxizität als sicher zu bewerten (H Yi und Appel 2013). Angesichts ihrer besonderen Stellung und Funktion im Rahmen einer Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus*, stellen dendritische Zellen einen möglichen Ansatzpunkt in der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien bei der Behandlung invasiver Aspergillosen dar. Durch die synergistische Aktivierung dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus* und Resiquimod könnte eine verstärkte T-Zell-Aktivierung und – Proliferation erreicht werden. Gerade stammzelltransplantierte Patienten besitzen in der ersten Zeit nach der Transplantation ein supprimiertes und nicht voll funktionsfähiges Immunsystem und sind daher nicht in der Lage, eine über DC-vermittelte effektive T-Zell-Antwort zu initiieren. Unter Betrachtung dieser Gegebenheit wäre es eine Überlegung, Aspergillose-erkrankten Patienten neben einer konventionellen antimykotischen Therapie ex vivo generierte DCs in Verbindung mit Resiquimod zu re-transfundieren, um eine verstärkte Immunantwort gegen den Pilz zu erreichen.

Demgegenüber wäre es für Risikopatienten von größerer Bedeutung, durch prophylaktische Maßnahmen die Entstehung einer invasiven Aspergillose zu verhindern. In den letzten Jahren wurde das Augenmerk vermehrt auf die Entwicklung von Impfstoffen gegen *A. fumigatus* gelegt (Liu et al. 2011a; Stevens et al. 2011). Da eine Aktiv-Impfung auf Grund des supprimierten Immunsystems der Patienten keine Option darstellt, wäre es möglich, dendritische Zellen ex vivo zu generieren, mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenen und R848 zu stimulieren und diese gepulsten DCs dem Patienten zu re-transfundieren. R848 könnte in diesem Fall als Adjuvans die gewünschte protektive Immunantwort potenzieren. So konnte in vivo bereits demonstriert werden, dass mit *Candida-albicans*-beladene DCs in stammzelltransplantierten Mäusen eine protektive T_H1-Antwort bewirken (Bacci et al. 2002). Jedoch gibt es derzeit nur wenige Studien, die den Einsatz dendritischer Zellen als Antigeneträger gegen *Aspergillus fumigatus* untersucht haben (Perruccio et al. 2004).

4.2. Einfluss von Alum auf die Zytokinproduktion pilzkonfrontierter dendritischer Zellen

Die Zytokinsekretion pilzkonfrontierter moDCs unter Alum-Behandlung wurde auf Proteinebene untersucht. Als Stimulationsdauer wurde 6 Stunden gewählt.

Die Wirkweise des als Adjuvans in zahlreichen Impfstoffen eingesetzten Alum ist noch nicht hinreichend geklärt, jedoch zeigt es unterschiedliche stimulatorische Eigenschaften auf das Immunsystem. Unter anderem induziert es bei dendritischen Zellen über die Stimulation des Inflammasoms die Ausschüttung von IL-1 β und IL-18 (Sharp et al. 2009). Die Wirkweise aluminiumhaltiger Adjuvantien auf dendritische Zellen im Rahmen einer *Aspergillus*-Infektion wurde bisher nicht untersucht. Da aluminiumhaltige Verbindungen immunstimulatorische Eigenschaften besitzen, ist es denkbar, dass diese in der Immuntherapie invasiver Aspergillosen eine mögliche Option wären. Wie auch bei der Messreihe mit Resiquimod, ergaben sich spenderabhängige Schwankungen. Jedoch zeigten bei der Bestimmung der Zytokine alle drei Spender tendenziell das gleiche Verhalten.

In dieser Arbeit konnte kein messbarer Einfluss von Alum auf die Zytokinproduktion naiver DCs nachgewiesen werden. So kam es nach einer 6-stündigen Stimulation mit Alum zu einer schwachen Sekretion von TNF- α , IL-6 und CXCL10 und keiner messbaren Ausschüttung von IL-10, IL-1 β und CCL20.

Auch im Hinblick auf eine *Aspergillus*-Infektion führte Alum zu keiner verstärkten Immunantwort. So konnten in Anwesenheit von Alum keine verstärkten Level der Zytokinexpression von TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL20 oder CXCL10 gemessen werden.

Diese Versuchsreihe wurde jedoch nur mit Alum zu einem Zeitpunkt und einer Konzentrationsstufe mit einer Stichprobengröße von drei Spendern durchgeführt. Es bietet sich daher an, diese Messreihe mit einer größeren Stichprobengröße in Abhängigkeit verschiedener Stimulationszeiten und eingesetzter Alumkonzentrationen zu wiederholen.

Da Aluminiumverbindungen seit Jahrzehnten als Adjuvantien in Impfstoffen etabliert sind (Hogenesch 2012) und auch in der spezifischen Immuntherapie als Adjuvans zur Behandlung von Allergien Anwendung finden (Heydenreich et al. 2014), wäre ein

Einsatz als Adjuvans in einem Impfstoff zur Prävention invasiver Aspergillosen denkbar. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen invasive Aspergillosen wird derzeit von zahlreichen Arbeitsgruppen erforscht (Diaz-Arevalo et al. 2011; Liu et al. 2012). Eine Studie aus Kalifornien ergab, dass *Saccharomyces*-Spezies, die als Impfstoff verabreicht wurden, das Auftreten invasiver Aspergillosen bei Mäusen reduzieren und das dabei getestete Adjuvans Alum im Vergleich zu anderen Adjuvantien einen signifikanten Vorteil zeigte, indem es durch die Potenzierung der Immunantwort in Verbindung mit dem Impfstoff das Überleben der Mäuse maßgeblich verlängerte (Liu et al. 2011a).

4.3. Spenderabhängige Abweichungen in den durchgeführten Experimenten

Bei den Stimulationen dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus*, sowie Resiquimod und Alum ergaben sich in den Ergebnissen teilweise große Schwankungen. Zwar verhielten sich die Zellen aller drei Spender meist tendenziell gleich, indem sie auf die Stimulationen mit einer vermehrten oder verminderten Ausschüttung von Zytokinen, bzw. Expression von Oberflächenmarkern reagierten, aber das Ausmaß der Reaktion variierte jedoch sehr stark spenderabhängig.

Zahlreiche Faktoren können das Immunsystem und damit Immunzellen, in diesem Fall dendritische Zellen, beeinflussen. Dazu zählen die Einnahme bestimmter Medikamente, das Alter und Geschlecht der Spender, sowie ihre Lebensumstände. Polymorphismen der Toll-like-Rezeptoren wirken ebenso auf die Steuerung einer Immunantwort ein (Medvedev 2013). Zudem wird die Expression der Toll-like-Rezeptoren auf Leukozyten durch den Kontakt mit Zytokinen und Pathogenen beeinflusst (Zarembek und Godowski 2002). Dies bedeutet, dass das momentane TLR-Expressionsmuster auf den dendritischen Zellen keinen dauerhaften Zustand repräsentiert, sondern sich beständig als Reaktion auf PAMPs verändert. Diese interindividuelle Heterogenität beeinflusst TLR-basierte Analysen ebenfalls.

Da in dieser Arbeit Zellen anonymer Spender verwendet wurden, können über eventuelle Störfaktoren keine Aussage gemacht werden.

Generell zeigten sich trotz spenderabhängiger Schwankungen in dem Ausmaß der Zytokinsekretion und Expression der Oberflächenmarker tendenziell vergleichbare Ergebnisse. Jedoch divergierten sie in der Bestimmung des Expressionslevels des

Diskussion

Markers CD83. Wie unter 3.3. beschrieben, wurde unter Resiquimod-Behandlung sowohl eine Zunahme, als auch Abnahme des Levels von CD83 auf pilzstimulierten DCs gemessen, abhängig von den eingesetzten Spenderzellen.

Um in Zukunft potentielle endogene und exogene Störfaktoren zu minimieren, wäre es eventuell ratsam, bei der Auswahl der Spender auf die Anonymität zu verzichten, um somit Angaben über mögliche störende Einflüsse zu erhalten. Zudem wäre es möglich, folgende oder wiederholungsbedürftige Experimente mit den Zellen des gleichen Spenders durchzuführen.

5. Zusammenfassung

Invasive Aspergillosen zählen auch heute noch zu den potentiell lebensbedrohlichen Infektionen, die gemeinsam mit anderen invasiven Pilzinfektionen für die hohe Mortalität bei immunsupprimierten Patienten verantwortlich sind (Lin et al. 2001). Die Entwicklung und Erforschung spezifischer diagnostischer Methoden und antimykotischer Medikamente konnten die Behandlungschancen einer IA zwar verbessern, bringen aber weiterhin keine befriedigenden Erfolge. So ist es dringend erforderlich, alternative Therapieoptionen zu erforschen und zu entwickeln. Da sich seit einigen Jahren das Augenmerk vermehrt in Richtung Immuntherapie konzentriert und diese Therapieform auch bei der Behandlung invasiver Aspergillosen Anwendung findet, wurden in diesem Zusammenhang die Immunmodulatoren Resiquimod und Alum auf ihre Wirkung auf dendritische Zellen bei einer *Aspergillus*-Infektion analysiert. Dendritische Zellen besitzen in der Immunabwehr gegen *Aspergillus* eine Schlüsselrolle, indem sie als Bindeglied zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem fungieren und somit essentiell für eine effektive T-Zell gesteuerte Immunantwort sind. Der mögliche Einfluss der beiden Modulatoren auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine dendritischer Zellen wurde auf Protein-Ebene untersucht und die Modifikation der Expression bestimmter Oberflächenmarker als Reaktion auf Resiquimod analysiert. Es zeigte sich, dass das Adjuvans Alum dendritische Zellen in ihrer Immunantwort gegen *Aspergillus* nicht beeinflusst und zu keiner gesteigerten Sekretion inflammatorischer Zytokine führt. Aus diesem Grund wurde auf die Bestimmung des Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen in Abhängigkeit von Alum verzichtet. Hingegen konnte Resiquimod einen positiven Trend in der verstärkten Zytokinsekretion aufweisen. So ließ sich in Anwesenheit von Resiquimod eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* erkennen. Dieser additive Effekt von R848 zeigte sich auch bei der Expression kostimulatorischer Moleküle dendritischer Zellen. Es zeigte sich eine gesteigerte Reifung pilzstimulierter dendritischer Zellen in Anwesenheit von Resiquimod durch Zunahme der Level von CD40, CD80 und CD86. In der Expression des Markers CD83 konnte keine einheitliche Aussage getroffen werden, da es spenderabhängig sowohl zu einer Zu-, als auch Abnahme der Fluoreszenzintensität von CD83 als Reaktion auf eine Ko-Stimulation mit *Aspergillus*

Zusammenfassung

und R848 kam. Es war festzustellen, dass die Zellen auf die eingesetzten Stimulantien stark spenderabhängig reagieren.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnte sich ein möglicher Nutzen des Immunmodulators Resiquimod für die Therapie invasiver Aspergillosen ergeben. Gerade immunsupprimierte Patienten mit einer invasiven Aspergillose könnten von einer DC-basierten Immuntherapie in Verbindung mit Resiquimod profitieren.

Dies gilt es jedoch nur, wenn es durch weitere Analysen und Versuchsreihen bestätigt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

A Gaspari, Anthony; Tying, Stephen K.; Rosen, Theodore (2009): Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy. In: *J Drugs Dermatol* 8 (5), S. 467–474.

Adams, Sylvia (2009): Toll-like receptor agonists in cancer therapy. In: *Immunotherapy* 1 (6), S. 949–964.

Aderem, A.; Ulevitch, R. J. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. In: *Nature* 406 (6797), S. 782–787.

Aerts-Toegaert, Cindy; Heirman, Carlo; Tuyaeerts, Sandra; Corthals, Jurgen; Aerts, Joeri L.; Bonehill, Aude et al. (2007): CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. In: *Eur J Immunol* 37 (3), S. 686–695.

Ahonen, C. L.; Gibson, S. J.; Smith, R. M.; Pederson, L. K.; Lindh, J. M.; Tomai, M. A.; Vasilakos, J. P. (1999): Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. In: *Cell Immunol* 197 (1), S. 62–72.

Aimanianda, Vishukumar; Bayry, Jagadeesh; Bozza, Silvia; Kniemeyer, Olaf; Perruccio, Katia; Elluru, Sri Ramulu et al. (2009a): Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. In: *Nature* 460 (7259), S. 1117–1121.

Aimanianda, Vishukumar; Haensler, Jean; Lacroix-Desmazes, Sébastien; Kaveri, Srini V.; Bayry, Jagadeesh (2009b): Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (6), S. 287–295.

Aksoy, Mark O.; Yang, Yi; Ji, Rong; Reddy, P. J.; Shahabuddin, Syed; Litvin, Judith et al. (2006): CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290 (5), S. L909–18.

Allen, Samantha J.; Crown, Susan E.; Handel, Tracy M. (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25, S. 787–820.

Allo, M. D.; Miller, J.; Townsend, T.; Tan, C. (1987): Primary cutaneous aspergillosis associated with Hickman intravenous catheters. In: *N Engl J Med* 317 (18), S. 1105–1108.

Ancuta, Petronela; Rao, Ravi; Moses, Ashlee; Mehle, Andrew; Shaw, Sunil K.; Luscinskas, F. William; Gabuzda, Dana (2003): Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. In: *J Exp Med* 197 (12), S. 1701–1707.

Anguille, Sébastien; Smits, Evelien L.; Lion, Eva; van Tendeloo, Viggo F; Berneman, Zwi N. (2014): Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. In: *The Lancet Oncology* 15 (7), S. e257.

Assier, Eric; Marin-Esteban, Viviana; Haziot, Alain; Maggi, Enrico; Charron, Dominique; Mooney, Nuala (2007): TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. In: *J Leukoc Biol* 81 (1), S. 221–228.

- AWMF: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. ; www.awmf.org
- Baba, M.; Imai, T.; Nishimura, M.; Kakizaki, M.; Takagi, S.; Hieshima, K. et al. (1997): Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. In: *J Biol Chem* 272 (23), S. 14893–14898.
- Bacci, Angela; Montagnoli, Claudia; Perruccio, Katia; Bozza, Silvia; Gaziano, Roberta; Pitzurra, Lucia et al. (2002): Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. In: *J Immunol* 168 (6), S. 2904–2913.
- Balloy, Viviane; Huerre, Michel; Latge, Jean-Paul; Chignard, Michel (2005): Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. In: *Infect Immun* 73 (1), S. 494–503.
- Banchereau, J.; Bazan, F.; Blanchard, D.; Briere, F.; Galizzi, J. P.; van Kooten, C. et al. (1994): The CD40 antigen and its ligand. In: *Annu Rev Immunol* 12, S. 881–922.
- Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J. et al. (2000): Immunobiology of dendritic cells. In: *Annu Rev Immunol* 18, S. 767–811.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252.
- Barton, Richard C. (2013): Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. In: *Scientifica (Cairo)* 2013, S. 459405.
- BD Biosciences: Optics-FACS Calibur.
- Beisswenger, C.; Hess, C.; Bals, R. (2012): *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-beta signalling in respiratory epithelial cells. In: *Eur Respir J* 39 (2), S. 411–418.
- Bellocchio, S.; Moretti, S.; Perruccio, K.; Fallarino, F.; Bozza, S.; Montagnoli, C. et al. (2004): TLRs Govern Neutrophil Activity in Aspergillosis. In: *The Journal of Immunology* 173 (12), S. 7406–7415.
- Bernstein, D. I.; Harrison, C. J. (1989): Effects of the immunomodulating agent R837 on acute and latent herpes simplex virus type 2 infections. In: *Antimicrob Agents Chemother* 33 (9), S. 1511–1515.
- Bishop, G. A.; Hsing, Y.; Hostager, B. S.; Jalukar, S. V.; Ramirez, L. M.; Tomai, M. A. (2000): Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. In: *J Immunol* 165 (10), S. 5552–5557.
- Bochud, Pierre-Yves; Chien, Jason W.; Marr, Kieren A.; Leisenring, Wendy M.; Upton, Arlo; Janer, Marta et al. (2008): Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. In: *N Engl J Med* 359 (17), S. 1766–1777.
- Boes, B.; Bashir, R.; Boes, C.; Hahn, F.; McConnell, J. R.; McComb, R. (1994): Central nervous system aspergillosis. Analysis of 26 patients. In: *J Neuroimaging* 4 (3), S. 123–129.

- Braedel, Sibylla; Radsak, Markus; Einsele, Hermann; Latge, Jean-Paul; Michan, Andreas; Loeffler, Juergen et al. (2004): *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. In: *Br J Haematol* 125 (3), S. 392–399.
- Brakhage, Axel (1999): *Aspergillus fumigatus*. Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Basel: Karger (Contributions to microbiology, 2).
- Bromley, I. M.; Donaldson, K. (1996): Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. In: *Thorax* 51 (12), S. 1203–1209.
- Brown, G. D.; Gordon, S. (2001): Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. In: *Nature* 413 (6851), S. 36–37.
- Brown, J.; Wang, H.; Hajishengallis, G. N.; Martin, M. (2011): TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. In: *J. Dent. Res.* 90 (4), S. 417–427.
- Caillot, D.; Casasnovas, O.; Bernard, A.; Couaillier, J. F.; Durand, C.; Cuisenier, B. et al. (1997): Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. In: *J Clin Oncol* 15 (1), S. 139–147.
- Caillot, D.; Couaillier, J. F.; Bernard, A.; Casasnovas, O.; Denning, D. W.; Mannone, L. et al. (2001a): Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19 (1), S. 253–259.
- Caillot, D.; Couaillier, J. F.; Bernard, A.; Casasnovas, O.; Denning, D. W.; Mannone, L. et al. (2001b): Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. In: *J Clin Oncol* 19 (1), S. 253–259.
- Carrion, Steven de Jesus; Leal, Sixto M Jr; Ghannoum, Mahmoud A.; Aimanianda, Vishukumar; Latge, Jean-Paul; Pearlman, Eric (2013): The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. In: *J Immunol* 191 (5), S. 2581–2588.
- Carty, Michael; Goodbody, Rory; Schröder, Martina; Stack, Julianne; Moynagh, Paul N.; Bowie, Andrew G. (2006): The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. In: *Nat. Immunol.* 7 (10), S. 1074–1081.
- Carvalho, A.; Cunha, C.; Bistoni, F.; Romani, L. (2012): Immunotherapy of aspergillosis. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (2), S. 120–125.
- Cella, M.; Engering, A.; Pinet, V.; Pieters, J.; Lanzavecchia, A. (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. In: *Nature* 388 (6644), S. 782–787.
- Cella, M.; Jarrossay, D.; Facchetti, F.; Alebardi, O.; Nakajima, H.; Lanzavecchia, A.; Colonna, M. (1999): Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. In: *Nat Med* 5 (8), S. 919–923.

- Cenci, E.; Mencacci, A.; Casagrande, A.; Mosci, P.; Bistoni, F.; Romani, L. (2001): Impaired antifungal effector activity but not inflammatory cell recruitment in interleukin-6-deficient mice with invasive pulmonary aspergillosis. In: *J Infect Dis* 184 (5), S. 610–617.
- Cenci, E.; Mencacci, A.; Fe d'Ostiani, C.; Del Sero, G.; Mosci, P.; Montagnoli, C. et al. (1998): Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. In: *J Infect Dis* 178 (6), S. 1750–1760.
- Cenci, E.; Perito, S.; Enssle, K. H.; Mosci, P.; Latge, J. P.; Romani, L.; Bistoni, F. (1997): Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. In: *Infection and immunity* 65 (2), S. 564–570.
- Chai, Louis A.; Netea, Mihai G.; Teerenstra, Steven; Earnest, Arul; Vonk, Alieke G.; Schlamm, Haran T. et al. (2010): Early proinflammatory cytokines and C-reactive protein trends as predictors of outcome in invasive Aspergillosis. In: *J Infect Dis* 202 (9), S. 1454–1462.
- Chamilos, Georgios; Luna, Mario; Lewis, Russell E.; Bodey, Gerald P.; Chemaly, Roy; Tarrand, Jeffrey J. et al. (2006a): Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). In: *Haematologica* 91 (7), S. 986–989.
- Chamilos, Georgios; Luna, Mario; Lewis, Russell E.; Bodey, Gerald P.; Chemaly, Roy; Tarrand, Jeffrey J. et al. (2006b): Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). In: *Haematologica* 91 (7), S. 986–989.
- Chaplin, David D. (2006): 1. Overview of the human immune response. In: *J Allergy Clin Immunol* 117 (2 Suppl Mini-Primer), S. S430-5.
- Chapuis, F.; Rosenzweig, M.; Yagello, M.; Ekman, M.; Biberfeld, P.; Gluckman, J. C. (1997): Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. In: *Eur J Immunol* 27 (2), S. 431–441.
- Chaudhary, P. M.; Ferguson, C.; Nguyen, V.; Nguyen, O.; Massa, H. F.; Eby, M. et al. (1998): Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. In: *Blood* 91 (11), S. 4020–4027.
- Clahsen, Thomas; Schaper, Fred (2008): Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. In: *Journal of leukocyte biology* 84 (6), S. 1521–1529.
- Clemons, Karl V.; Danielson, Michael E.; Michel, Kyle S.; Liu, Min; Ottoson, Nadine C.; Leonardo, Steven M. et al. (2014): Whole glucan particles as a vaccine against murine aspergillosis. In: *Journal of medical microbiology* 63 (Pt 12), S. 1750–1759.
- Cooper, Megan A.; Elliott, Julie M.; Keyel, Peter A.; Yang, Liping; Carrero, Javier A.; Yokoyama, Wayne M. (2009): Cytokine-induced memory-like natural killer cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (6), S. 1915–1919.

- Cortez, Karoll J.; Lyman, Caron A.; Kottlilil, Shyam; Kim, Hee Sup; Roilides, Emmanuel; Yang, Jun et al. (2006): Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. In: *Infect Immun* 74 (4), S. 2353–2365.
- D'Andrea, A.; Aste-Amezaga, M.; Valiante, N. M.; Ma, X.; Kubin, M.; Trinchieri, G. (1993): Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. In: *J Exp Med* 178 (3), S. 1041–1048.
- Denning, D. W.; Stevens, D. A. (1990): Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases. In: *Rev Infect Dis* 12 (6), S. 1147–1201.
- Denning, David W. (1998): Invasive Aspergillosis. In: *CLIN INFECT DIS* 26 (4), S. 781–803.
- DGHO (2014): Invasive Pilzinfektionen-Therapie — Onkopedia. Hg. v. DGHO.; www.dgho-onkopedia.de
- DGHO (2014): Diagnostik invasiver Pilzinfektionen. Hg. v. DGHO- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie. www.onkopedia.de
- Diamond, R. D.; Huber, E.; Haudenschild, C. C. (1983): Mechanisms of destruction of *Aspergillus fumigatus* hyphae mediated by human monocytes. In: *J Infect Dis* 147 (3), S. 474–483.
- Diaz-Arevalo, Diana; Bagramyan, Karine; Hong, Teresa B.; Ito, James I.; Kalkum, Markus (2011): CD4+ T cells mediate the protective effect of the recombinant Asp f3-based anti-aspergillosis vaccine. In: *Infection and immunity* 79 (6), S. 2257–2266.
- Dinarello, C. A. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. In: *Blood* 87 (6), S. 2095–2147.
- Dinarello, C. A. (1998): Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. In: *Int Rev Immunol* 16 (5-6), S. 457–499.
- Drickamer, K. (1999): C-type lectin-like domains. In: *Curr Opin Struct Biol* 9 (5), S. 585–590.
- Eiff, M. von; Roos, N.; Schulten, R.; Hesse, M.; Zuhlsdorf, M.; van de Loo, J (1995): Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. In: *Respiration* 62 (6), S. 341–347.
- Fearon, D. T.; Locksley, R. M. (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. In: *Science* 272 (5258), S. 50–53.
- Fernandez, Elias J.; Lolis, Elias (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, S. 469–499.
- Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T. R.; Howard, M.; O'Garra, A. (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. In: *J Immunol* 147 (11), S. 3815–3822.
- Fogg, Darin K.; Sibon, Claire; Miled, Chaouki; Jung, Steffen; Aucouturier, Pierre; Littman, Dan R. et al. (2006): A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. In: *Science* 311 (5757), S. 83–87.

- Friedman, Alan D. (2002): Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. In: *Oncogene* 21 (21), S. 3377–3390.
- Funk, Emily; Kottlilil, Shyam; Gilliam, Bruce; Talwani, Rohit (2014): Tickling the TLR7 to cure viral hepatitis. In: *J Transl Med* 12, S. 129.
- Gafa, Valerie; Remoli, Maria Elena; Giacomini, Elena; Gagliardi, Maria Cristina; Lande, Roberto; Severa, Martina et al. (2007): In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. In: *Microbes Infect* 9 (8), S. 971–980.
- Gantner, Benjamin N.; Simmons, Randi M.; Canavera, Scott J.; Akira, Shizuo; Underhill, David M. (2003): Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. In: *J. Exp. Med.* 197 (9), S. 1107–1117.
- Gardiner, Donald M.; Howlett, Barbara J. (2005): Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. In: *FEMS Microbiol Lett* 248 (2), S. 241–248.
- Garrett, W. S.; Chen, L. M.; Kroschewski, R.; Ebersold, M.; Turley, S.; Trombetta, S. et al. (2000): Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. In: *Cell* 102 (3), S. 325–334.
- Geijtenbeek, T. B.; Torensma, R.; van Vliet, S J; van Duijnhoven, G C; Adema, G. J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G. (2000): Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. In: *Cell* 100 (5), S. 575–585.
- Gewurz, H.; Mold, C.; Siegel, J.; Fiedel, B. (1982): C-reactive protein and the acute phase response. In: *Adv Intern Med* 27, S. 345–372.
- Ghimire, Tirth R.; Benson, Robert A.; Garside, Paul; Brewer, James M. (2012): Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. In: *Immunol. Lett.* 147 (1-2), S. 55–62.
- Gibson, Sheila J.; Lindh, Jana M.; Riter, Tony R.; Gleason, Raymond M.; Rogers, Lisa M.; Fuller, Ashley E. et al. (2002): Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. In: *Cellular Immunology* 218 (1-2), S. 74–86.
- Glenny, A. T.; Pope, C. G.; Waddington, Hilda; Wallace, U. (1926): Immunological notes. XVII-XXIV. In: *J. Pathol.* 29 (1), S. 31–40.
- Gorden, Keith B.; Gorski, Kevin S.; Gibson, Sheila J.; Kedl, Ross M.; Kieper, William C.; Qiu, Xiaohong et al. (2005): Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. In: *J Immunol* 174 (3), S. 1259–1268.
- Grazziutti, M.; Przepiorka, D.; Rex, J. H.; Braunschweig, I.; Vadhan-Raj, S.; Savary, C. A. (2001): Dendritic cell-mediated stimulation of the in vitro lymphocyte response to *Aspergillus*. In: *Bone Marrow Transplant* 27 (6), S. 647–652.
- Gresnigt, Mark S.; Bozza, Silvia; Becker, Katharina L.; Joosten, Leo A B; Abdollahi-Roodsaz, Shahla; van der Berg, Wim B et al. (2014): A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. In: *PLoS Pathog* 10 (3), S. e1003936.

Gringhuis, Sonja I.; den Dunnen, Jeroen; Litjens, Manja; van der Vlist, Michiel; Wevers, Brigitte; Bruijns, Sven C M; Geijtenbeek, Teunis B H (2009): Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. In: *Nat Immunol* 10 (2), S. 203–213.

Gringhuis, Sonja I.; Wevers, Brigitte A.; Kaptein, Tanja M.; van Capel, Toni M M; Theelen, Bart; Boekhout, Teun et al. (2011): Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. In: *PLoS Pathog* 7 (1), S. e1001259.

Guo, Ya-Ling; Chen, Yi-Qiang; Wang, Ke; Qin, Shou-Ming; Wu, Cong; Kong, Jin-Liang (2010): Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. In: *Chest* 138 (4), S. 817–824.

Gupta (1998): Aluminum compounds as vaccine adjuvants. In: *Adv Drug Deliv Rev* 32 (3), S. 155–172.

H Yi, D.; Appel, S. (2013): Current status and future perspectives of dendritic cell-based cancer immunotherapy. In: *Scand. J. Immunol.* 78 (2), S. 167–171.

Hahn, Helmut \neg . (Hg.) (2009): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit ... 157 Tabellen. 6., komplett überarb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

Hardison, Sarah E.; Brown, Gordon D. (2012): C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. In: *Nat. Immunol.* 13 (9), S. 817–822.

HCDM (2014): Human Cell Human Cell Differentiation Molecules.

Hemmi, Hiroaki; Kaisho, Tsuneyasu; Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Sanjo, Hideki; Hoshino, Katsuaki et al. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. In: *Nat Immunol* 3 (2), S. 196–200.

Hengge, U. R.; Cusini, M. (2003): Topical immunomodulators for the treatment of external genital warts, cutaneous warts and molluscum contagiosum. In: *Br J Dermatol* 149 Suppl 66, S. 15–19.

Herbrecht, Raoul; Denning, David W.; Patterson, Thomas F.; Bennett, John E.; Greene, Reginald E.; Oestmann, Jorg-W et al. (2002): Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. In: *N Engl J Med* 347 (6), S. 408–415.

Hernanz-Falcon, P.; Arce, I.; Roda-Navarro, P.; Fernandez-Ruiz, E. (2001): Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. In: *Immunogenetics* 53 (4), S. 288–295.

Herold, Gerd (2013): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.

Hettinger, Jan; Richards, David M.; Hansson, Jenny; Barra, Melanie M.; Joschko, Ann-Cathrin; Krijgsveld, Jeroen; Feuerer, Markus (2013): Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. In: *Nat. Immunol.* 14 (8), S. 821–830.

Heydenreich, B.; Bellinghausen, I.; Lund, L.; Henmar, H.; Lund, G.; Adler Wurtzen, P.; Saloga, J. (2014): Adjuvant effects of aluminium hydroxide-adsorbed allergens and allergoids - differences in vivo and in vitro. In: *Clinical and experimental immunology* 176 (3), S. 310–319.

- Hieshima, K.; Imai, T.; Opdenakker, G.; van Damme, J.; Kusuda, J.; Tei, H. et al. (1997): Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. In: *J Biol Chem* 272 (9), S. 5846–5853.
- Hirano, T. (1998): Interleukin 6 and its receptor: ten years later. In: *Int Rev Immunol* 16 (3-4), S. 249–284.
- HKI Jena: HKI Jena, SPP 1160. Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
- Hoelzer, Dieter (2013): Targeted therapy with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. In: *Curr Opin Oncol* 25 (6), S. 701–706.
- Hoffmann, Jules; Akira, Shizuo (2013): Innate immunity. In: *Curr Opin Immunol* 25 (1), S. 1–3.
- Hogenesch, Harm (2012): Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 406.
- Hohl, Tobias M.; Rivera, Amariliz; Lipuma, Lauren; Gallegos, Alena; Shi, Chao; Mack, Mathias; Pamer, Eric G. (2009): Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. In: *Cell Host Microbe* 6 (5), S. 470–481.
- Hornung, Veit; Bauernfeind, Franz; Halle, Annett; Samstad, Eivind O.; Kono, Hajime; Rock, Kenneth L. et al. (2008): Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. In: *Nat. Immunol.* 9 (8), S. 847–856.
- Hsu, Li-Yang; Ding, Ying; Phua, Jason; Koh, Liang-Piu; Chan, Douglas S.; Khoo, Kay-Leong; Tambyah, Paul A. (2010): Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. In: *BMC Infect. Dis.* 10, S. 44.
- Hutchison, Sharon; Benson, Robert A.; Gibson, Vivienne B.; Pollock, Abigail H.; Garside, Paul; Brewer, James M. (2012): Antigen depot is not required for alum adjuvant activity. In: *FASEB J.* 26 (3), S. 1272–1279.
- Jack, R. S.; Fan, X.; Bernheiden, M.; Rune, G.; Ehlers, M.; Weber, A. et al. (1997): Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. In: *Nature* 389 (6652), S. 742–745.
- Jahn, B.; Boukhallouk, F.; Lotz, J.; Langfelder, K.; Wanner, G.; Brakhage, A. A. (2000): Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus conidia*. In: *Infect Immun* 68 (6), S. 3736–3739.
- Jahn, B.; Koch, A.; Schmidt, A.; Wanner, G.; Gehringer, H.; Bhakdi, S.; Brakhage, A. A. (1997): Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. In: *Infect Immun* 65 (12), S. 5110–5117.
- Janeway, C. A. (1989): Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 (0), S. 1–13.

- Janeway, Charles A.; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20, S. 197–216.
- Janeway, Charles A Jr (2013): Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold spring harb symp quant biol.* 1989. 54: 1-13. In: *J Immunol* 191 (9), S. 4475–4487.
- Jantunen, E.; Volin, L.; Salonen, O.; Piilonen, A.; Parkkali, T.; Anttila, V-J et al. (2003): Central nervous system aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. In: *Bone Marrow Transplant* 31 (3), S. 191–196.
- Jensen, Simon S.; Gad, Monika (2010): Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. In: *J Inflamm (Lond)* 7, S. 37.
- Jiang, Zhengfan; Georgel, Philippe; Du, Xin; Shamel, Louis; Sovath, Sosathya; Mudd, Suzanne et al. (2005): CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. In: *Nat Immunol* 6 (6), S. 565–570.
- Jung, Steffen; Unutmaz, Derya; Wong, Phillip; Sano, Gen-Ichiro; De los Santos, Kenia; Sparwasser, Tim et al. (2002): In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. In: *Immunity* 17 (2), S. 211–220.
- Jurk, Marion; Heil, Florian; Vollmer, Jorg; Schetter, Christian; Krieg, Arthur M.; Wagner, Hermann et al. (2002): Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. In: *Nat Immunol* 3 (6), S. 499.
- Kadowaki, N.; Ho, S.; Antonenko, S.; de Waal Malefyt, R.; Kastelein, R. A.; Bazan, F.; Liu, Y.-J. (2001): Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. In: *Journal of Experimental Medicine* 194 (6), S. 863–870.
- Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Hoshino, K.; Akira, S. (2001): Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. In: *J Immunol* 166 (9), S. 5688–5694.
- Kamradt, T.; Ferrari-Kühne, K. (2011): Das adaptive Immunsystem. In: *Dtsch med Wochenschr* 136 (33), S. 1678–1683.
- Karve, Sudeep J.; Feldman, Steven R.; Yentzer, Brad A.; Pearce, Daniel J.; Balkrishnan, Rajesh (2008): Imiquimod: a review of basal cell carcinoma treatments. In: *J Drugs Dermatol* 7 (11), S. 1044–1051.
- Kawai, T.; Takeuchi, O.; Fujita, T.; Inoue, J.; Muhlrad, P. F.; Sato, S. et al. (2001): Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (10), S. 5887–5894.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2007): TLR signaling. In: *Semin Immunol* 19 (1), S. 24–32.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nat. Immunol.* 11 (5), S. 373–384.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2011): Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. In: *Immunity* 34 (5), S. 637–650.

- Kawel, Nadine; Schorer, Georg M.; Desbiolles, Lotus; Seifert, Burkhardt; Marincek, Borut; Boehm, Thomas (2011): Discrimination between invasive pulmonary aspergillosis and pulmonary lymphoma using CT. In: *Eur J Radiol* 77 (3), S. 417–425.
- Kemper, C. A.; Hostetler, J. S.; Follansbee, S. E.; Ruane, P.; Covington, D.; Leong, S. S. et al. (1993): Ulcerative and plaque-like tracheobronchitis due to infection with *Aspergillus* in patients with AIDS. In: *Clin Infect Dis* 17 (3), S. 344–352.
- Kesh, Sandra; Mensah, Nana Yaa; Peterlongo, Paolo; Jaffe, Dana; Hsu, Katharine; VAN DEN Brink, Marcel et al. (2005): TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1062, S. 95–103.
- Khot, Prasanna D.; Ko, Daisy L.; Hackman, Robert C.; Fredricks, David N. (2008): Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. In: *BMC Infect. Dis.* 8, S. 73..
- Kishimoto, T.; Akira, S.; Narazaki, M.; Taga, T. (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. In: *Blood* 86 (4), S. 1243–1254.
- Kohler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497.
- Kolattukudy, P. E.; Lee, J. D.; Rogers, L. M.; Zimmerman, P.; Ceselski, S.; Fox, B. et al. (1993): Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. In: *Infect Immun* 61 (6), S. 2357–2368.
- Kousha, M.; Tadi, R.; Soubani, A. O. (2011): Pulmonary aspergillosis: a clinical review. In: *Eur Respir Rev* 20 (121), S. 156–174..
- Kradin, Richard L.; Mark, Eugene J. (2008): The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. In: *Arch Pathol Lab Med* 132 (4), S. 606–614.
- Krewski, Daniel; Yokel, Robert A.; Nieboer, Evert; Borchelt, David; Cohen, Joshua; Harry, Jean et al. (2007): Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. In: *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10 Suppl 1, S. 1–269.
- Kwon-Chung, Kyung J.; Sugui, Janyce A. (2009): What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? In: *Med. Mycol.* 47 Suppl 1, S. S97-103.
- Kwon-Chung, Kyung J.; Sugui, Janyce A. (2013): *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? In: *PLoS Pathog.* 9 (12), S. e1003743.
- Lamoth, Frederic; Cruciani, Mario; Mengoli, Carlo; Castagnola, Elio; Lortholary, Olivier; Richardson, Malcolm; Marchetti, Oscar (2012): beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). In: *Clin Infect Dis* 54 (5), S. 633–643.
- Lass-Flörl, C.; Dierich, M. P. (2004): Epidemiologie und Expositionsprophylaxe nosokomialer *Aspergillus*-Infektionen bei hämatoonkologischen Patienten. In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47 (4), S. 379–383.

- Latge, J. P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. In: *Clin Microbiol Rev* 12 (2), S. 310–350.
- Le Borgne, Marie; Etchart, Nathalie; Goubier, Anne; Lira, Sergio A.; Sirard, Jean Claude; van Rooijen, Nico et al. (2006): Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. In: *Immunity* 24 (2), S. 191–201.
- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J.; Hoffmann, J. (1996): The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. In: *Cell* 86 (6), S. 973–983.
- Leon, Beatriz; Lopez-Bravo, Maria; Ardavin, Carlos (2007): Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. In: *Immunity* 26 (4), S. 519–531.
- Lin, S. J.; Schranz, J.; Teutsch, S. M. (2001): Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (3), S. 358–366.
- Liu, Min; Capilla, Javier; Johansen, Maria E.; Alvarado, Danielle; Martinez, Marife; Chen, Vicky et al. (2011a): *Saccharomyces* as a vaccine against systemic aspergillosis: 'the friend of man' a friend again? In: *J. Med. Microbiol.* 60 (Pt 10), S. 1423–1432.
- Liu, Min; Machová, Eva; Neščáková, Zuzana; Medovarská, Izabela; Clemons, Karl V.; Martinez, Marife et al. (2012): Vaccination with mannan protects mice against systemic aspergillosis. In: *Medical mycology* 50 (8), S. 818–828.
- Liu, Mingli; Guo, Shanchun; Hibbert, Jacqueline M.; Jain, Vidhan; Singh, Neeru; Wilson, Nana O.; Stiles, Jonathan K. (2011b): CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (3), S. 121–130.
- Loeffler, Juergen; Haddad, Ziad; Bonin, Michael; Romeike, Nele; Mezger, Markus; Schumacher, Ulrike et al. (2009): Interaction analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. In: *J Med Microbiol* 58 (Pt 1), S. 49–58.
- Loetscher, M.; Gerber, B.; Loetscher, P.; Jones, S. A.; Piali, L.; Clark-Lewis, I. et al. (1996): Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. In: *J Exp Med* 184 (3), S. 963–969.
- Löffler, Georg (2007): *Biochemie und Pathobiochemie. Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. 8., vollst. neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Loppnow, H. (2001): Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. In: *Der Internist* 42 (1), S. 13–27.
- Luong, Me-Linh; Husain, Shahid; Rotstein, Coleman (2013): Pharmacoeconomic assessment of therapy for invasive aspergillosis. In: *Mycoses* 56 (3), S. 338–349.
- Luster, A. D.; Ravetch, J. V. (1987): Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). In: *J Exp Med* 166 (4), S. 1084–1097.
- Mannel, D. N.; Echtenacher, B. (2000): TNF in the inflammatory response. In: *Chem Immunol* 74, S. 141–161.

- Mannel, D. N.; Moore, R. N.; Mergenhagen, S. E. (1980): Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). In: *Infect Immun* 30 (2), S. 523–530.
- Mansell, Ashley; Smith, Rosealee; Doyle, Sarah L.; Gray, Pearl; Fenner, Jennifer E.; Crack, Peter J. et al. (2006): Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. In: *Nat. Immunol.* 7 (2), S. 148–155.
- Mansour, Michael K.; Tam, Jenny M.; Vyas, Jatin M. (2012): The cell biology of the innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1273, S. 78–84.
- Markaryan, A.; Morozova, I.; Yu, H.; Kolattukudy, P. E. (1994): Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. In: *Infect Immun* 62 (6), S. 2149–2157.
- Marrack, Philippa; McKee, Amy S.; Munks, Michael W. (2009): Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. In: *Nat Rev Immunol* 9 (4), S. 287–293.
- McKee, Amy S.; Burchill, Matthew A.; Munks, Michael W.; Jin, Lei; Kappler, John W.; Friedman, Rachel S. et al. (2013): Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (12), S. E1122–31.
- Medvedev, Andrei E. (2013): Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. In: *J. Interferon Cytokine Res.* 33 (9), S. 467–484.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C A Jr (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. In: *Nature* 388 (6640), S. 394–397.
- Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. In: *Current Opinion in Immunology* 9 (1), S. 4–9.
- Mehrad, B.; Strieter, R. M.; Standiford, T. J. (1999): Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. In: *J Immunol* 162 (3), S. 1633–1640.
- Meier, A.; Kirschning, C. J.; Nikolaus, T.; Wagner, H.; Heesemann, J.; Ebel, F. (2003): Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. In: *Cell Microbiol* 5 (8), S. 561–570.
- Mezger, Markus; Kneitz, Susanne; Wozniok, Iwona; Kurzai, Oliver; Einsele, Hermann; Loeffler, Juergen (2008a): Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. In: *J. Infect. Dis.* 197 (6), S. 924–931.
- Mezger, Markus; Steffens, Michael; Beyer, Melanie; Manger, Carolin; Eberle, Johannes; Toliat, Mohammad-Reza et al. (2008b): Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. In: *Blood* 111 (2), S. 534–536.

- Michallet, Mauricette; Sobh, Mohamad; Morisset, Stéphane; Kraghel, Samira; Nicolini, Franck-Emmanuel; Thomas, Xavier et al. (2011): Risk factors for invasive aspergillosis in acute myeloid leukemia patients prophylactically treated with posaconazole. In: *Med. Mycol.* 49 (7), S. 681–687.
- Miller, L. S.; Pietras, E. M.; Uricchio, L. H.; Hirano, K.; Rao, S.; Lin, H. et al. (2007): Inflammasome-Mediated Production of IL-1 Is Required for Neutrophil Recruitment against *Staphylococcus aureus* In Vivo. In: *The Journal of Immunology* 179 (10), S. 6933–6942.
- Miyazaki, T.; Kohno, S.; Mitsutake, K.; Maesaki, S.; Tanaka, K.; Ishikawa, N.; Hara, K. (1995): Plasma (1--3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (12), S. 3115–3118.
- Morgan, J.; Wannemuehler, K. A.; Marr, K. A.; Hadley, S.; Kontoyiannis, D. P.; Walsh, T. J. et al. (2005): Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. In: *Med Mycol* 43 Suppl 1, S. S49-58.
- Mousset, Sabine; Buchheidt, Dieter; Heinz, Werner; Ruhnke, Markus; Cornely, Oliver A.; Egerer, Gerlinde et al. (2014): Treatment of invasive fungal infections in cancer patients—updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). In: *Ann. Hematol.* 93 (1), S. 13–32.
- Mullbacher, A.; Eichner, R. D. (1984): Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (12), S. 3835–3837.
- Mutschler, Ernst (2008): Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 9., vollst. neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Naffaa, Mohammad; Makhoul, Badira F.; Tobia, Amjad; Kaplan, Marielle; Aronson, Doron; Saliba, Walid; Azzam, Zaher S. (2013): Interleukin-6 at discharge predicts all-cause mortality in patients with sepsis. In: *Am J Emerg Med* 31 (9), S. 1361–1364.
- Naik, Shalin H.; Metcalf, Donald; van Nieuwenhuijze, Annemarie; Wicks, Ian; Wu, Li; O'Keefe, Meredith; Shortman, Ken (2006): Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. In: *Nat Immunol* 7 (6), S. 663–671.
- Naik, Shalin H.; Sathe, Priyanka; Park, Hae-Young; Metcalf, Donald; Proietto, Anna I.; Dakic, Aleksander et al. (2007): Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. In: *Nat. Immunol.* 8 (11), S. 1217–1226.
- Napolitani, Giorgio; Rinaldi, Andrea; Bertoni, Francesco; Sallusto, Federica; Lanzavecchia, Antonio (2005): Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. In: *Nat Immunol* 6 (8), S. 769–776.

- Nascimento, Adriana M.; Goldman, Gustavo H.; Park, Steven; Marras, Salvatore A E; Delmas, Guillaume; Oza, Uma et al. (2003): Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. In: *Antimicrob Agents Chemother* 47 (5), S. 1719–1726.
- Neveu, Wendy A.; Bernardo, Edgar; Allard, Jenna L.; Nagaleekar, Viswas; Wargo, Matthew J.; Davis, Roger J. et al. (2011): Fungal allergen β -glucans trigger p38 mitogen-activated protein kinase-mediated IL-6 translation in lung epithelial cells. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (6), S. 1133–1141.
- Nguyen, M. Hong; Leather, Helen; Clancy, Cornelius J.; Cline, Christina; Jantz, Michael A.; Kulkarni, Varsha et al. (2011): Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17 (7), S. 1043–1050.
- Nichols, W. Garrett; Corey, Lawrence; Gooley, Ted; Davis, Chris; Boeckh, Michael (2002): High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. In: *J. Infect. Dis.* 185 (3), S. 273–282.
- Onai, Nobuyuki; Manz, Markus G.; Schmid, Michael A. (2010): Isolation of common dendritic cell progenitors (CDP) from mouse bone marrow. In: *Methods Mol. Biol.* 595, S. 195–203.
- O'Neill, Luke A J; Fitzgerald, Katherine A.; Bowie, Andrew G. (2003): The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. In: *Trends Immunol* 24 (6), S. 286–290.
- Ostensen, M. E.; Thiele, D. L.; Lipsky, P. E. (1987): Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. In: *J Immunol* 138 (12), S. 4185–4191.
- Pagano, Livio; Caira, Morena; Candoni, Anna; Offidani, Massimo; Fianchi, Luana; Martino, Bruno et al. (2006): The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. In: *Haematologica* 91 (8), S. 1068–1075.
- Paris, Sophie; Wysong, Deborah; Debeaupuis, Jean-Paul; Shibuya, Kazutoshi; Philippe, Bruno; Diamond, Richard D.; Latge, Jean-Paul (2003): Catalases of *Aspergillus fumigatus*. In: *Infect Immun* 71 (6), S. 3551–3562.
- Pasare, Chandrashekar; Medzhitov, Ruslan (2004): Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. In: *Immunity* 21 (5), S. 733–741.
- Passlick, B.; Flieger, D.; Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989): Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. In: *Blood* 74 (7), S. 2527–2534.
- Paul, Sanjoy; Diekema, Daniel; Moye-Rowley, W. Scott (2013): Contributions of *Aspergillus fumigatus* ATP-binding cassette transporter proteins to drug resistance and virulence. In: *Eukaryotic Cell* 12 (12), S. 1619–1628.

- Pauw, Ben de; Walsh, Thomas J.; Donnelly, J. Peter; Stevens, David A.; Edwards, John E.; Calandra, Thierry et al. (2008): 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. In: *Clin. Infect. Dis.* 46 (12), S. 1813–1821.
- PEI (2014): PEI, Paul-Ehrlich-Institut: Sicherheitsinformationen 2014 - Sicherheitsbewertung von Aluminium in Therapieallergenen. www.pei.de/DE/arzneimittelsicherheit-vigilanz/archiv-sicherheitsinformationen/2014/
- Peine, Kevin J.; Gupta, Gaurav; Brackman, Deanna J.; Papenfuss, Tracey L.; Ainslie, Kristy M.; Satoskar, Abhay R.; Bachelder, Eric M. (2014a): Liposomal resiquimod for the treatment of *Leishmania donovani* infection. In: *J Antimicrob Chemother* 69 (1), S. 168–175.
- Peine, Kevin J.; Gupta, Gaurav; Brackman, Deanna J.; Papenfuss, Tracey L.; Ainslie, Kristy M.; Satoskar, Abhay R.; Bachelder, Eric M. (2014b): Liposomal resiquimod for the treatment of *Leishmania donovani* infection. In: *J Antimicrob Chemother* 69 (1), S. 168–175.
- Peng, Guangyong; Guo, Zhong; Kiniwa, Yukiko; Voo, Kui Shin; Peng, Weiyi; Fu, Tihui et al. (2005): Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. In: *Science* 309 (5739), S. 1380–1384.
- Perruccio, Katia; Bozza, Silvia; Montagnoli, Claudia; Bellocchio, Silvia; Aversa, Franco; Martelli, Massimo et al. (2004): Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. In: *Blood Cells Mol Dis* 33 (3), S. 248–255.
- Perussia, B.; Fanning, V.; Trinchieri, G. (1985): A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. In: *Nat Immun Cell Growth Regul* 4 (3), S. 120–137.
- Plato, Anthony; Willment, Janet A.; Brown, Gordon D. (2013): C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. In: *Int. Rev. Immunol.* 32 (2), S. 134–156.
- Pockros, Paul J.; Guyader, Dominique; Patton, Heather; Tong, Myron J.; Wright, Terry; McHutchison, John G.; Meng, Tze-Chiang (2007): Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. In: *J Hepatol* 47 (2), S. 174–182.
- Pufnock, Jeffrey S.; Cigal, Melinda; Rolczynski, Lisa S.; Andersen-Nissen, Erica; Wolf, Mathias; McElrath, M. Juliana; Greenberg, Philip D. (2011): Priming CD8⁺ T cells with dendritic cells matured using TLR4 and TLR7/8 ligands together enhances generation of CD8⁺ T cells retaining CD28. In: *Blood* 117 (24), S. 6542–6551.
- Quintin, Jessica; Cheng, Shih-Chin; van der Meer, Jos Wm; Netea, Mihai G. (2014): Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. In: *Curr Opin Immunol* 29C, S. 1–7.

- Ramirez-Ortiz, Zaida G.; Lee, Chrono K.; Wang, Jennifer P.; Boon, Louis; Specht, Charles A.; Levitz, Stuart M. (2011): A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. In: *Cell Host Microbe* 9 (5), S. 415–424.
- Ramirez-Ortiz, Zaida G.; Means, Terry K. (2012): The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). In: *Virulence* 3 (7), S. 635–646.
- Ramirez-Ortiz, Zaida G.; Specht, Charles A.; Wang, Jennifer P.; Lee, Chrono K.; Bartholomeu, Daniella C.; Gazzinelli, Ricardo T.; Levitz, Stuart M. (2008): Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. In: *Infect. Immun.* 76 (5), S. 2123–2129.
- Renz-Polster, Herbert (Hg.) (2008): Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt, greifbar, verständlich ; [Online-Zugang + interaktive Extras]. 4., vollst. überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer (StudentConsult).
- Rivera, Amariliz; Ro, Grace; Van Epps, Heather L; Simpson, Tyler; Leiner, Ingrid; Sant'Angelo, Derek B.; Pamer, Eric G. (2006): Innate immune activation and CD4+ T cell priming during respiratory fungal infection. In: *Immunity* 25 (4), S. 665–675.
- Robert Koch-Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 27/2013. <http://edoc.rki.de>
- Rødland, Ernst Kristian; Ueland, Thor; Pedersen, Turid M.; Halvorsen, Bente; Muller, Fredrik; Aukrust, Pål; Frøland, Stig S. (2010): Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. In: *Infect. Immun.* 78 (3), S. 1269–1275.
- Roilides, E.; Sein, T.; Roden, M.; Schaufele, R. L.; Walsh, T. J. (2001): Elevated serum concentrations of interleukin-10 in nonneutropenic patients with invasive aspergillosis. In: *J Infect Dis* 183 (3), S. 518–520.
- Rolston, K. (2001): Overview of systemic fungal infections. In: *Oncology (Williston Park)* 15 (11 Suppl 9), S. 11–14.
- Romani, N.; Reider, D.; Heuer, M.; Ebner, S.; Kampgen, E.; Eibl, B. et al. (1996): Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. In: *Journal of immunological methods* 196 (2), S. 137–151.
- Rubino, Ivana; Coste, Alix; Le Roy, Didier; Roger, Thierry; Jatou, Katia; Boeckh, Michael et al. (2012): Species-specific recognition of *Aspergillus fumigatus* by Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 6. In: *J. Infect. Dis.* 205 (6), S. 944–954.
- Saïd-Sadier, Najwane; Padilla, Eduardo; Langsley, Gordon; Ojcius, David M. (2010): *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. In: *PLoS ONE* 5 (4), S. e10008.
- Sainz, Juan; Lupiáñez, Carmen Belén; Segura-Catena, Juana; Vazquez, Lourdes; Ríos, Rafael; Oyonarte, Salvador et al. (2012): Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. In: *PLoS ONE* 7 (2), S. e32273..

- Sallusto, F. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. In: *Journal of Experimental Medicine* 179 (4), S. 1109–1118..
- Satpathy, Ansuman T.; Wu, Xiaodi; Albring, Jörn C.; Murphy, Kenneth M. (2012): Re(de)fining the dendritic cell lineage. In: *Nat. Immunol.* 13 (12), S. 1145–1154.
- Schreibelt, Gerty; Tel, Jurjen; Slieden, Kwinten H. E. W. J.; Benitez-Ribas, Daniel; Figdor, Carl G.; Adema, Gosse J.; Vries, I. Jolanda M. (2010): Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. In: *Cancer Immunol Immunother* 59 (10), S. 1573–1582.
- Schulze, H. J.; Cribier, B.; Requena, L.; Reifemberger, J.; Ferrandiz, C.; Garcia Diez, A. et al. (2005): Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. In: *Br J Dermatol* 152 (5), S. 939–947..
- Schwalbe, R. A.; Dahlback, B.; Coe, J. E.; Nelsestuen, G. L. (1992): Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. In: *Biochemistry* 31 (20), S. 4907–4915.
- Segal, Brahm H.; Herbrecht, Raoul; Stevens, David A.; Ostrosky-Zeichner, Luis; Sobel, Jack; Viscoli, Claudio et al. (2008): Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (5), S. 674–683.
- Seidel, M. G.; Peters, C.; Wacker, A.; Northoff, H.; Moog, R.; Boehme, A. et al. (2008): Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. In: *Bone Marrow Transplant.* 42 (10), S. 679–684.
- Seo, K. W.; Kim, D. H.; Sohn, S. K.; Lee, N. Y.; Chang, H. H.; Kim, S. W. et al. (2005): Protective role of interleukin-10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. In: *Bone Marrow Transplant.* 36 (12), S. 1089–1095.
- Serbina, Natalya V.; Cherny, Mathew; Shi, Chao; Bleau, Sharon A.; Collins, Nancy H.; Young, James W.; Pamer, Eric G. (2009): Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. In: *J. Immunol.* 183 (4), S. 2678–2687.
- Serrano-Gomez, Diego; Dominguez-Soto, Angeles; Ancochea, Julio; Jimenez-Heffernan, Jose A.; Leal, Juan Antonio; Corbi, Angel L. (2004): Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. In: *J Immunol* 173 (9), S. 5635–5643.
- Sharp, Fiona A.; Ruane, Darren; Claass, Benjamin; Creagh, Emma; Harris, James; Malyala, Padma et al. (2009): Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (3), S. 870–875.

- Shimazu, Rintaro; Akashi, Sachiko; Ogata, Hirotaka; Nagai, Yoshinori; Fukudome, Kenji; Miyake, Kensuke; Kimoto, Masao (1999): MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. In: *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11), S. 1777–1782.
- Soubani, A. O. (2002): The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis*. In: *Chest* 121 (6), S. 1988–1999.
- Stanzani, Marta; Orciuolo, Enrico; Lewis, Russell; Kontoyiannis, Dimitrios P.; Martins, Sergio L R; St John, Lisa S; Komanduri, Krishna V. (2005): *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. In: *Blood* 105 (6), S. 2258–2265.
- Steinbach, William J. (2013): Are we there yet? Recent progress in the molecular diagnosis and novel antifungal targeting of *Aspergillus fumigatus* and invasive aspergillosis. In: *PLoS Pathog.* 9 (10), S. e1003642.
- Steinman, Ralph M.; Cohn, Zanvil A. (1973): identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *J Exp Med* 137 (5), S. 1142–1162.
- Stevens, David A. (2006): Th1/Th2 in aspergillosis. In: *Med Mycol* 44 (s1), S. 229–235.
- Stevens, David A.; Clemons, Karl V.; Liu, Min (2011): Developing a vaccine against aspergillosis. In: *Medical mycology* 49 Suppl 1, S. S170-6.
- Stynen, D.; Sarfati, J.; Goris, A.; Prevost, M. C.; Lesourd, M.; Kamphuis, H. et al. (1992): Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. In: *Infection and immunity* 60 (6), S. 2237–2245.
- Sulahian, Annie; Touratier, Sophie; Ribaud, Patricia (2003): False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. In: *N Engl J Med* 349 (24), S. 2366–2367.
- Suresh, Rahul; Mosser, David M. (2013): Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. In: *Adv Physiol Educ* 37 (4), S. 284–291.
- Szeimies, Rolf-Markus; Gerritsen, Marie-Jeanne P.; Gupta, Girish; Ortonne, Jean Paul; Serresi, Stefano; Bichel, Jens et al. (2004): Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from a phase III, randomized, double-blind, vehicle-controlled, clinical trial with histology. In: *J Am Acad Dermatol* 51 (4), S. 547–555.
- Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2005): Toll-like receptors in innate immunity. In: *Int Immunol* 17 (1), S. 1–14.
- Takeuchi, O.; Kawai, T.; Muhlradt, P. F.; Morr, M.; Radolf, J. D.; Zychlinsky, A. et al. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. In: *Int Immunol* 13 (7), S. 933–940.
- Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A. et al. (1999): TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. In: *Gene* 231 (1-2), S. 59–65.

- Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Horiuchi, Takao; Hoshino, Katsuaki; Takeda, Kiyoshi; Dong, Zhongyun et al. (2002): Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. In: *J Immunol* 169 (1), S. 10–14.
- Tarrand, Jeffrey J.; Lichterfeld, Mathias; Warraich, Irfan; Luna, Mario; Han, Xiang Y.; May, Gregory S.; Kontoyiannis, Dimitrios P. (2003): Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. In: *Am J Clin Pathol* 119 (6), S. 854–858.
- Tewari, A.; Buhles, W C Jr; Starnes, H F Jr (1990): Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. In: *Lancet* 336 (8717), S. 712–714.
- Thau, N.; Monod, M.; Crestani, B.; Rolland, C.; Tronchin, G.; Latge, J. P.; Paris, S. (1994): rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. In: *Infect Immun* 62 (10), S. 4380–4388.
- Thomsen, Lindy L.; Topley, Peter; Daly, Maria G.; Brett, Sara J.; Tite, John P. (2004): Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. In: *Vaccine* 22 (13-14), S. 1799–1809.
- Tobin, M. B.; Peery, R. B.; Skatrud, P. L. (1997): Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. In: *Gene* 200 (1-2), S. 11–23.
- Tomai, M. A.; Gibson, S. J.; Imbertson, L. M.; Miller, R. L.; Myhre, P. E.; Reiter, M. J. et al. (1995): Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. In: *Antiviral Res* 28 (3), S. 253–264.
- Tomai, M. A.; Imbertson, L. M.; Stanczak, T. L.; Tygrett, L. T.; Waldschmidt, T. J. (2000): The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. In: *Cell Immunol* 203 (1), S. 55–65.
- Tsai, H. F.; Wheeler, M. H.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. (1999): A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. In: *J Bacteriol* 181 (20), S. 6469–6477.
- Tunnicliffe, Georgia; Schomberg, Lucy; Walsh, Simon; Tinwell, Brendan; Harrison, Tom; Chua, Felix (2013): Airway and parenchymal manifestations of pulmonary aspergillosis. In: *Respir Med* 107 (8), S. 1113–1123.
- Underhill, David M.; Rossmagle, Eddie; Lowell, Clifford A.; Simmons, Randi M. (2005): Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. In: *Blood* 106 (7), S. 2543–2550.
- Universitätsklinikum Heidelberg: Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin III, Kardiologie, Angiologie, Pneumologie.
- van Deuren, M.; Dofferhoff, A. S.; van der Meer, J W (1992): Cytokines and the response to infection. In: *J Pathol* 168 (4), S. 349–356.
- van Furth, R.; Cohn, Z. A.; Hirsch, J. G.; Humphrey, J. H.; Spector, W. G.; Langevoort, H. L. (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. In: *Bull World Health Organ* 46 (6), S. 845–852.

- Vasilakos, J. P.; Smith, R. M.; Gibson, S. J.; Lindh, J. M.; Pederson, L. K.; Reiter, M. J. et al. (2000): Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. In: *Cell Immunol* 204 (1), S. 64–74.
- Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. In: *Annu. Rev. Immunol.* 10, S. 411–452.
- Vermeulen, Edith; Lagrou, Katrien; Verweij, Paul E. (2013): Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. In: *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26 (6), S. 493–500.
- Verweij, Paul E.; Howard, Susan J.; Melchers, Willem J G; Denning, David W. (2009): Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. In: *Drug Resist Updat* 12 (6), S. 141–147.
- Vieira, S. M.; Lemos, H. P.; Grespan, R.; Napimoga, M. H.; Dal-Secco, D.; Freitas, A. et al. (2009): A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. In: *British journal of pharmacology* 158 (3), S. 779–789.
- Wagner, T. L.; Ahonen, C. L.; Couture, A. M.; Gibson, S. J.; Miller, R. L.; Smith, R. M. et al. (1999): Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. In: *Cell Immunol* 191 (1), S. 10–19.
- Wald, Anna; Leisenring, Wendy; van Burik, Jo-Anne; Bowden, Raleigh A. (1997): Epidemiology of *Aspergillus* Infections in a Large Cohort of Patients Undergoing Bone Marrow Transplantation. In: *J Infect Dis* 175 (6), S. 1459–1466.
- Walsh, T. J.; Hier, D. B.; Caplan, L. R. (1985): Aspergillosis of the central nervous system: clinicopathological analysis of 17 patients. In: *Ann Neurol* 18 (5), S. 574–582.
- Walsh, Thomas J.; Anaissie, Elias J.; Denning, David W.; Herbrecht, Raoul; Kontoyiannis, Dimitrios P.; Marr, Kieren A. et al. (2008): Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. In: *Clin. Infect. Dis.* 46 (3), S. 327–360.
- Wang, Xuefeng; Dong, Liyang; Ni, Hongchang; Zhou, Sha; Xu, Zhipeng; Hoellwarth, Jason Shih et al. (2013): Combined TLR7/8 and TLR9 ligands potentiate the activity of a *Schistosoma japonicum* DNA vaccine. In: *PLoS Negl Trop Dis* 7 (4), S. e2164.
- Waring, P.; Eichner, R. D.; Mullbacher, A.; Sjaarda, A. (1988): Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. In: *J Biol Chem* 263 (34), S. 18493–18499.
- Werner, Jessica L.; Metz, Allison E.; Horn, Dawn; Schoeb, Trenton R.; Hewitt, Matthew M.; Schwiebert, Lisa M. et al. (2009): Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. In: *J. Immunol.* 182 (8), S. 4938–4946.
- White, P. Lewis; Parr, Christian; Thornton, Christopher; Barnes, Rosemary A. (2013): Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. In: *J. Clin. Microbiol.* 51 (5), S. 1510–1516.

- Woiciechowsky, C.; Schoning, B.; Lanksch, W. R.; Volk, H. D.; Docke, W. D. (1999): Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 77 (11), S. 769–780.
- Yamashita, Kouhei; Miyoshi, Takashi; Arai, Yasuyuki; Mizugishi, Kiyomi; Takaori-Kondo, Akifumi; Ueyama, Takehiko (2013): Enhanced generation of reactive oxygen species by interferon-gamma may have contributed to successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease. In: *Int J Hematol* 97 (4), S. 505–510.
- Zarembek, K. A.; Godowski, P. J. (2002): Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. In: *The Journal of Immunology* 168 (2), S. 554–561.
- Zelante, Teresa; Bozza, Silvia; Luca, Antonella de; D'Angelo, Carmen; Bonifazi, Pierluigi; Moretti, Silvia et al. (2009): Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. In: *Med. Mycol.* 47 Suppl 1, S. S162-9.
- Zelensky, Alex N.; Gready, Jill E. (2005): The C-type lectin-like domain superfamily. In: *FEBS J* 272 (24), S. 6179–6217.
- Zhang, Ming; Sun, Wen-Kui; Wu, Ting; Chen, Fei; Xu, Xiao-Yong; Su, Xin; Shi, Yi (2014): Efficacy of combination therapy of triazole and echinocandin in treatment of invasive aspergillosis: a systematic review of animal and human studies. In: *J Thorac Dis* 6 (2), S. 99–108.
- Zhou, L. J.; Tedder, T. F. (1995): Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. In: *J Immunol* 154 (8), S. 3821–3835.
- Zola, Heddy (2007): Leukocyte and stromal cell molecules. The CD markers. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.; <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0740/2006036649-d.html>.
- Zola, Heddy; Swart, Bernadette; Nicholson, Ian; Aasted, Bent; Bensussan, Armand; Boumsell, Laurence et al. (2005): CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. In: *Blood* 106 (9), S. 3123–3126.

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

- Abb. 1 Signalkaskaden der Toll-like-Rezeptoren
- Abb. 2 Signalwege ausgewählter transmembranärer CLRs
- Abb. 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Pilzes *Aspergillus fumigatus*
- Abb. 4 Invasive pulmonale Aspergillose mit Halo-Zeichen im CT-Thorax
- Abb. 5 Zählgitter einer Neubauer-Kammer
- Abb. 6 Stimulationsschema
- Abb. 7 Pipettierschema der Standard-Verdünnungsreihe des TNF- α -ELISA
- Abb. 8 Aufbau des BD FACSCalibur™
- Abb. 9 TNF- α -Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 10 IL-6- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 11 IL-10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 12 IL-1 β - Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 13 CXCL10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 14 CCL10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von Alum
- Abb. 15 TNF- α -Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 16 IL-6- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 17 IL-10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 18 IL-1 β - Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 19 CXCL10- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 20 CCL20- Sekretion humaner moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 21 Anteil positiver DCs an der Gesamtzellzahl nach 12h Stimulation mit *A. fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 22 Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Oberflächenmarker auf moDCs nach 12 h Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* und LPS in Abhängigkeit von R848
- Abb. 23 Einfluss des Modulators R848 auf die Maturation *A. fumigatus* konfrontierter DCs
- Abb. 24 Spenderabhängiges Verhalten des Reifemarkers CD83 unter Resiquimod

Tabellen

- Tab. 1 Beispiele für Mustererkennungsrezeptoren dendritischer Zellen
- Tab. 2 Humane Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden
- Tab. 3 Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE)
- Tab. 4 Anteil der positiven DCs in Prozent in Bezug auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen nach 6h und 12h Stimulation

Abkürzungen

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A.f.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Alum	Kaliumaluminiumsulfat (<i>Potassium aluminium sulfate</i>)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BDG	beta-(1,3)-d-glucan
cDC	klassische dendritische Zelle (<i>conventional dendritic cell</i>)
CD	Differenzierungsfaktor (<i>cluster of differentiation</i>)
CDP	<i>common dendritic cell precursor</i>
CLR	C-Typ-Lektin Rezeptoren
CRD	Kohlenhydrat-erkennende Domäne (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
CT	Computertomographie
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DC-SIGN	<i>Dendritic cell specific intracellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin</i>
Dectin-1	<i>dendritic-cell-associated C-type lectin-1</i>
ds	doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay
FACS	fluoreszenzassoziierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
GAG	Glukosaminoglykan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage activating factor</i>)
h	Stunde (<i>hora</i>)
HBSS	Hanks-Hepes-Puffer
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation)

Abkürzungen

	<i>(Hematopoietic stem cell transplantation)</i>
IA	invasive Aspergillose
iDC	unreife dendritische Zelle (<i>immature dendritic cell</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>IκB-kinase-complex</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IRAK	<i>IL1-receptor associated kinase</i>
IRF-3	<i>interferon regulatory factor-3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
m	milli (x 10 ⁻³)
M	molar
min	Minute
mm	Millimeter
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
mDC	myeloide dendritische Zelle (<i>myeloid dendritic cell</i>)
MACS	magnetische Zellseparation (<i>magnetic cell sorting</i>)
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MDP	Monozyten-Makrophagen-Dendriten-Precursor
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
moDC	aus Monozyten generierte dendritische Zelle (<i>monocyte-derived dendritic cell</i>)
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
n	Anzahl der Einzelbeobachtungen
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>

Abkürzungen

NK	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like-Rezeptor
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
PAMP	pathogen-assoziierte, molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm (x 10 ⁻¹²)
PRR	mustererkennender Rezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
R848	Resiquimod
RLR	RIG-I-like Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RodA	<i>Rodlet Protein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SARM1	<i>sterile-α- and armadillo-motif-containing protein 1</i>
sec	Sekunde (<i>second</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single-nucleotide-polymorphism</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single - stranded</i>)
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>sideward scatter</i>)
Tab.	Tabelle
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
T _H 1, T _H 2, T _H 17	T-Helfer-Zelle Typ 1, -Typ 2, -Typ 17
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	<i>MYD88-adaptor-like protein = MAL</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>

Abkürzungen

TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
u.a.	unter anderem
unst.	unstimuliert

Danksagung

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Zum einen gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele, der es mir ermöglicht hat, an seiner Klinik zu promovieren.

Zum anderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit überlassen und mich in allen Fragen und Problemen geduldig unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Tanja Breitschopf und Anna-Lena-Schmitt, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mir bei jeglichen Problemen geholfen haben, sowie dem gesamten Laborteam. Zudem möchte ich noch das besonders gute Arbeitsklima in dieser Abteilung hervorheben. Ich habe mich dort sehr wohlgefühlt.

Ferner möchte ich ein großes Dankeschön an Timo aussprechen, der mich in fachlichen Fragen unterstützt und motiviert hat. Danke!

Zuletzt möchte ich mich bei allen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet und bestärkt haben.