

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Quantifizierung und funktionale Analysen von *Aspergillus*-spezifischen
Rezeptoren auf humanen dendritischen Zell-Subpopulationen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Maike Sina Hefter
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Korreferent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Invasive Mykosen	1
1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4
1.3	Das Immunsystem in Bezug auf <i>A. fumigatus</i>	6
1.3.1	Dendritische Zellen	7
1.3.2	C-Typ Lektine als Pilz-Erkennungsrezeptoren	9
1.4	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Zellkulturelle Methoden	15
2.1.1	Isolation von PBMCs	15
2.1.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	16
2.1.3	Isolation von CD 14-positiven Monozyten	17
2.1.4	Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	18
2.1.5	Isolation von myeloiden dendritischen Zellen	18
2.2	<i>Aspergillus fumigatus</i> -Kultur und Vorbereitung	20
2.3	Stimulation DCs mit verschiedenen <i>A. fumigatus</i> Morphologien	20
2.3.1	Stimulation moDC-CLECs	21
2.3.2	Stimulation mDC-CLECs	21
2.3.3	Blockierungs-Assay gegen CLEC7A auf moDCs und mDCs	22
2.4	Phagozytose-Blockierungs-Assay auf moDCs und mDCs	23
2.5	Durchflusszytometrie	24
2.5.1	Grundlagen	24
2.5.2	Vorbereitung der Proben	25
2.5.3	Messung der Proben	26
2.6	Molekularbiologische Arbeiten	27
2.6.1	RNA-Isolation	27
2.6.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	28
2.6.3	cDNA-Synthese / Reverse Transkription	28
2.6.4	Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	29
2.7	ELISA	32
2.7.1	Grundlagen	32

2.7.2	Durchführung nach BioLegend	32
2.8	Statistik	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Einfluss unterschiedlicher <i>A. fumigatus</i> Morphologien auf die Expression verschiedener C-Typ Lektine in moDCs	34
3.1.1	CLEC4A.....	35
3.1.2	CLEC6A.....	36
3.1.3	CLEC7A.....	37
3.1.4	CLEC12A.....	38
3.1.5	CLEC4E	39
3.2	Einfluss unterschiedlicher <i>A. fumigatus</i> Morphologien auf C-Typ Lektine auf RNA-Ebene in moDCs	40
3.2.1	<i>CLEC4A</i>	41
3.2.2	<i>CLEC6A</i>	42
3.2.3	<i>CLEC7A</i>	43
3.2.4	<i>CLEC12A</i>	44
3.3	Einfluss unterschiedlicher <i>A. fumigatus</i> Morphologien auf die Expression verschiedener C-Typ Lektine in mDCs	45
3.3.1	CLEC4A.....	46
3.3.2	CLEC6A.....	47
3.3.3	CLEC7A.....	47
3.3.4	CLEC12A.....	49
3.3.5	CLEC4E	50
3.4	Blockierungs-Assays gegen CLEC7A auf moDCs	51
3.4.1	Reifemarker.....	51
3.4.2	Zytokine	53
3.4.3	Phagozytose.....	55
3.5	Blockierungs-Assays gegen CLEC7A auf mDCs	56
3.5.1	Reifemarker.....	56
3.5.2	Zytokine	58
3.5.3	Phagozytose.....	59
4	Diskussion	61
4.1	Die Expression verschiedener C-Typ Lektine auf moDCs und mDCs.....	61

4.2	Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Maturierung	65
4.3	Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Zytokinfreisetzung	67
4.4	Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Phagozytose	70
5	Zusammenfassung	72
6	Abkürzungsverzeichnis	74
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	76
8	Literaturverzeichnis	80
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Invasive Mykosen

Nahezu jeder Mensch erkrankt im Laufe seines Lebens an einer Pilzinfektion. Diese meist oberflächlichen, Infektionen sind in der Regel unkompliziert zu behandeln und stellen keine vitale Gefährdung für den Betroffenen dar [1]. Oberflächliche Infektionen der Haut und Hautanhangsgebilde machen hiervon, mit fast 25 Prozent, den Großteil aus. Sie werden überwiegend von Dermatophyten verursacht [2].

Invasive Mykosen hingegen haben eine deutlich geringere Inzidenz, dafür aber eine besorgniserregend hohe Mortalität. Schätzungen zufolge sterben jährlich rund 1,5 Millionen Menschen weltweit an Infektionen mit *Cryptococcus*, *Candida*, *Pneumocystis* und *Aspergillus*, wobei die Invasive Aspergillose (IA) mit geschätzt über 200.000 lebensbedrohlichen Infektionen jährlich weltweit und einer Mortalitätsrate von 30 bis 95 Prozent auf Platz 4 der 10 bedeutendsten Invasiven Mykosen liegt [1]. Hierbei spielt besonders *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) eine bedeutende Rolle und ist in nahezu 90 Prozent die Ursache aller menschlichen Aspergillus-Infektionen [3, 4].

Als Haupteintrittspforte für *A. fumigatus* ist dabei hauptsächlich der Respirationstrakt betroffen, wenngleich auch andere Organsysteme, wie beispielsweise die Haut oder der Gastrointestinaltrakt befallen sein können [3]. Abhängig vom Ort der Infektion innerhalb des Respirationstraktes und dem Ausmaß der Invasion des Pilzes, Parameter welche stark vom Immunstatus der jeweiligen Person abhängig sind, variiert das Spektrum der Infektionen [3, 5]. Bei immunkompetenten Personen kann *A. fumigatus* allergische Erkrankungen wie Asthma oder allergische Sinusitiden auslösen [6]. Die Therapie besteht hier vorwiegend in einer Meidung des Pathogens, was in den meisten Fällen auch zu einer klinischen Symptomverbesserung führt [3]. Demgegenüber stehen Erkrankungen die mit einem Myzelwachstum einhergehen und üblicherweise eine therapeutische Intervention benötigen, wie die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), das Aspergillom oder die Invasive Aspergillose (IA) [3]. Bei der ABPA handelt es sich um eine Überempfindlichkeitsreaktion auf *A. fumigatus*, von der besonders Patienten mit beeinträchtigter Lungenfunktion, wie bei Asthma oder zystischer Fibrose, betroffen sind. Das Aspergillom entsteht in präformierten Höhlen, die durch Infektionskrankheiten wie Tuberkulose (Tbc) oder Sarkoidose entstanden

sind. Es ist die kolonialisierte Form der Aspergillose [5, 6]. Die Invasive Aspergillose ist wohlmöglich die verheerendste aller *A. fumigatus* assoziierten Infektionen, da sie schnell fortschreitet und nicht selten zum Tode führt [6].

Auch wenn die exakten Mortalitätsraten aufgrund der mangelnden epidemiologischen Erfassung unbekannt sind, stellen invasive Mykosen ein zunehmendes Problem der modernen Medizin dar [7]. Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung einer IA sind Neutropenie ($< 500/\text{mm}^3$ für > 10 Tage), Organtransplantationen, im Besonderen Lungentransplantationen, Hochdosis-Kortison-Therapie, maligne hämatologische Erkrankungen, Zytostatika-Therapien, sowie immun-kompromittierende Erkrankungen, wie beispielsweise AIDS (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome) oder Tuberkulose [8, 9]. Besonders Neutropenie gilt als eine der wichtigsten Risikofaktoren, wobei die Tiefe und die Dauer des Zelltiefs von großer Bedeutung sind [10]. Hier sind vor allem Patienten mit refraktärer Leukämie zu nennen, die mit multiplen Zytostatikatherapie-Zyklen behandelt werden [6]. Schätzungen zufolge tritt die IA in 10 bis 25 Prozent aller Leukämiepatienten auf und stellt mit einer Mortalitätsrate von 80 bis 90 Prozent, trotz Therapie, eine bedeutende Todesursache dar [3]. Eine weitere Risikogruppe sind Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) erhalten haben, wobei das Risiko für eine IA bei der allogenen HSZT mit 2,3 bis 15 Prozent größer ist als bei der autologen HSZT mit 0,5 bis 4 Prozent [9].

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz der IA stetig angestiegen, was vor allem mit der Entwicklung neuer Therapieregime in der modernen Medizin assoziiert ist [11]. Hinzu kommt, dass die IA häufig schwierig früh zu diagnostizieren ist und die therapeutischen Möglichkeiten wenig effektiv sind, was zu der hohen Mortalitätsrate führt [12]. In der Diagnostik der IA haben sich bei hämatologischen Patienten in den letzten Jahren besonders serologische und radiologische Methoden bewährt. Ein großer Fortschritt ist die frühzeitige Durchführung einer Computertomographie der Lunge und der Nasennebenhöhlen [13]. Hier zeigen sich als charakteristische Frühform der IA die typischen milchglasartigen Trübungen um einen nodulären Herd (Abb.1) [9].

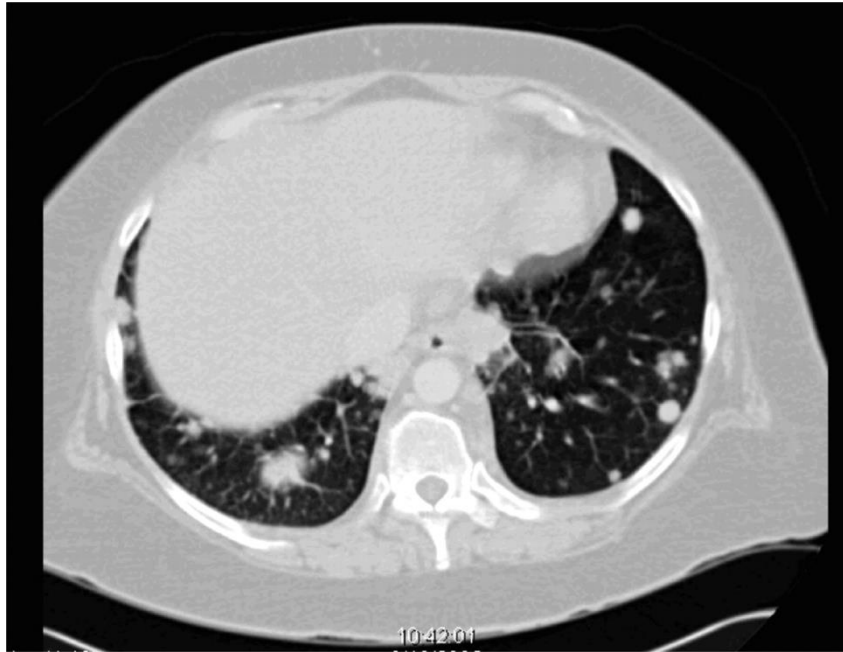


Abb. 1: Computertomographie der Lunge mit milchglasartigen Trübungen um noduläre Verdichtungen als charakteristische Frühform der Invasiven Aspergillose (IA) [9].

Daneben gibt es serologische Verfahren, wie den Galaktomannan-Antigen-Test. Maertens *et al.* zeigten, dass durch Antigen-Tests die Diagnose einer IA durchschnittlich 6 bis 13 Tage früher gestellt werden konnte [14]. Auch molekularbiologische Untersuchungen werden zunehmend eingesetzt [15, 16].

Die Therapie der Invasiven Aspergillose erfolgt leitliniengerecht mit Voriconazol, einem Triazol-Antimykotikum [6, 9]. Studien zeigten ein verbessertes Outcome im Vergleich zur Therapie mit Amphotericin B und ein günstigeres Nebenwirkungsprofil mit einer besseren Verträglichkeit [9]. Zu beachten ist allerdings das hohe Interaktionspotential der Azol-Antimykotika. Als Substrate und Inhibitoren des Cytochrom P-450 Isoenzym CYP3A4 beeinflussen sie die Metabolisierung von Zytostatika und Immunsuppressiva und können dadurch zu unerwünschten Nebenwirkungen führen [6]. Als ergänzende Therapie sollten, falls vertretbar, immunsuppressive Medikamente reduziert oder pausiert werden und die Gabe von Granulozyten-stimulierendem Faktor bei Neutropenie erwogen werden. Zur Prophylaxe der IA bei neutropenen Patienten stellt Posaconazol, neben der generell empfohlenen Expositionsprophylaxe, eine effektive Therapie dar [6].

1.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender opportunistischer Schimmelpilz, der den Ascomyceten (Schlauchpilze), Ordnung der Eurotiales zugeordnet wird. Sein Name leitet sich aufgrund der typischen rauchgrünen Farbe der Sporen von lat. *fumus* (der Rauch) ab. Diese Färbung wird durch das Pigment 1,8-Dihydroxynaphththalin-Melanin hervorgerufen. Die Zellwand von *A. fumigatus* ist nahezu ausschließlich aus Polysacchariden zusammengesetzt, wie β -1,3-Glukane, Galaktomannan und Galaktosaminogalaktan (GAG) [17]. Diese Zellwandkomponenten spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer Immunantwort [18].

Als Saprobiont lebt *A. fumigatus* von sich zersetzenden organischen Substanzen und ist in der Lage bei Temperaturen zwischen 12 und 56 °C zu wachsen. Man findet ihn häufig im Kompost, in Blumenerde oder auf verschimmeltem Brot.

Die Verbreitung von *A. fumigatus* erfolgt durch Sporen, sogenannte Konidien, die durch ihren geringen Durchmesser von nur 2 - 3 μm problemlos über die Atemwege in die Lungen gelangen können. Es befinden sich geschätzt ca. 1- 100 Konidien pro m^3 in der Luft, sodass jeder Mensch täglich mehrere Hundert Konidien einatmet [3, 19]. Bei gesunden Individuen bleibt dies in der Regel ohne Konsequenz, da der Großteil der Konidien durch die mukoziliäre Clearance beseitigt wird. Zusätzlich sind auch Epithelzellen in der Lage, Konidien aufzunehmen [3, 6]. Konidien, welche diese anatomische Barriere überwinden konnten, werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert und abgetötet. Diese primäre Verteidigungslinie gegen *A. fumigatus* ist außerdem an der Initiierung einer pro-inflammatorischen Immunantwort beteiligt, die zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in die Lunge führt. Gelingt es Konidien diesen Abwehrmechanismen zu entkommen, kann es zur Auskeimung kommen. In gesunden Individuen werden die Hyphen dann durch gewebständige Neutrophile abgetötet [5]. Eine Invasion von *A. fumigatus* resultiert primär aus einer Dysfunktion zwischen diesen primären Abwehrmechanismen und Eigenschaften des Opportunisten, die es ihm ermöglichen unter den gegebenen Umständen zu wachsen und invasiv zu werden [20]. Die folgende Abbildung (Abb. 2) zeigt den Infektionsweg von *A. fumigatus*.

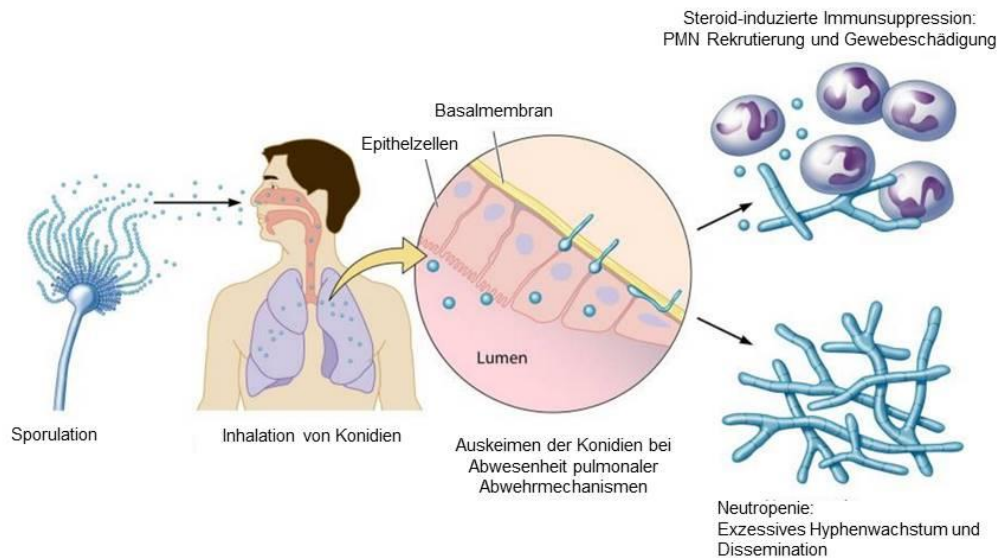


Abb. 2: Infektionsweg von *A. fumigatus*. Konidien werden eingeatmet und führen bei immunkompromittierten Patienten entweder zu einer Granulozyten-vermittelten Kontrolle des Pilzes (Steroid-induzierte Immunsuppression), die jedoch mit einer schweren Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung einhergeht oder bei Neutropenie zu einem exzessiven Hyphenwachstum und Dissemination (Neutropenie). PMN = Polymorphnukleärer neutrophiler Leukozyt [5].

Kommt es bei Beeinträchtigung des primären Abwehrsystems zur Auskeimung der Konidien und einem invasiven Wachstum von *A. fumigatus* in das Lungenparenchym spricht man von einer Invasiven Aspergillose [21]. Dabei spielt der Immunstatus des Patienten eine wichtige Rolle für den weiteren Verlauf. Neutropenie geht mit einem unkontrollierten Hyphenwachstum und einer von der Lunge ausgehenden hämatogenen Verbreitung einher. Bei Steroid-induzierter Immunsuppression kommt es dagegen vielmehr zu einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen in die Lungen und einer Kontrolle des Hyphenwachstums, was jedoch in einer überschießenden Entzündungsreaktion mit Gewebnekrosen resultiert und als führende Todesursache angesehen wird [5].

Neben *A. fumigatus* gibt es in der Gattung *Aspergillus* noch weitere für den Menschen potentiell pathogene Arten, wie *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. nidulans*, die jedoch deutlich seltener sind [3].

1.3 Das Immunsystem in Bezug auf *A. fumigatus*

Die Immunabwehr des Menschen lässt sich in zwei große Mechanismen einteilen: die angeborene oder unspezifische Immunabwehr und die adaptive oder spezifische Immunabwehr. Zum angeborenen Immunsystem werden Phagozyten wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (engl. dendritic cells; DCs) gezählt, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), das Komplementsystem und Interferone (IFN) [22]. Sie besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) zur Erkennung von Pathogenen und Induktion einer effektiven Immunantwort. Man unterscheidet vier Familien: Toll-like Rezeptoren (TLR), Nucleotide-oligomerisation domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR), retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like Rezeptoren (RLR) und C-Type Lectin-like Rezeptoren (CLR). Sie binden an hoch-konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [23]. Die adaptive Immunabwehr wird im Wesentlichen von T- und B-Lymphozyten gebildet [24].

Inhalierete *A. fumigatus* Konidien werden von Alveolarmakrophagen, Monozyten oder neutrophilen Granulozyten phagozytiert und durch oxidative Mechanismen abgetötet [25]. Epithelzellen der Lunge sind ebenfalls in der Lage Konidien zu internalisieren und die hydrophilen Surfactantproteine -A und -D führen zu einer gesteigerten Phagozytose und Eliminierung durch Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten [3]. Daneben werden NK-Zellen Chemokin-vermittelt in die Lunge rekrutiert und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen *A. fumigatus* [6]. Sie proliferieren und produzieren unter anderem Interferon-gamma (IFN- γ) wodurch weitere Immunzellen aktiviert werden [26].

Wenn es den Konidien allerdings gelingt dieser ersten Verteidigungslinie zu entkommen, ist der Pilz in der Lage auszukeimen und invasiv in das Lungenepithel zu wachsen. Dort wird *A. fumigatus* neben neutrophilen Granulozyten auch von dendritischen Zellen erkannt und phagozytiert [5]. Auf die Rolle der DCs soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.3.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen mit der Fähigkeit, unter anderem, B- und T-Lymphozyten Antigen-spezifisch zu stimulieren [27]. DCs gehören dem angeborenen Immunsystem an und spielen eine große Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems, weswegen sie auch als Wächter des Immunsystems bezeichnet werden [28]. Unreife DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gelangen über den Blutstrom in die verschiedensten Gewebe. Dort sind sie in der Lage Pathogene zu erkennen und zu phagozytieren. Hierbei spielt die Morphologie von *A. fumigatus* eine wichtige Rolle. Geschwollene Konidien und Hyphen werden effizienter phagozytiert, was auf das vermehrte Vorhandensein von β -1,3-Glukan auf der Pilzzellwand in diesen Stadien zurückzuführen ist [29]. Ruhende Konidien werden von einer Rodlet-Schicht, bestehend aus dem hydrophoben RodA-Protein, überzogen, was den Zugang zu den immunogenen Glukanen erschwert und sie dadurch vor Phagozytose schützt [30]. Nach Aufnahme des Pathogens maturieren die DCs, migrieren in nahegelegene Lymphknoten und sind dort in der Lage naive T-Lymphozyten Antigen-spezifisch zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen [22, 31].

Durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren, wie Interleukin (IL) -6 und dem Tumornekrosefaktor (TNF) $-\alpha$, die die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Entzündungszellen regulieren, tragen DCs ebenfalls zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei [32]. Die Maturierung der DCs wird von einem veränderten Phagozytose-Verhalten aber auch von Änderungen der Expression verschiedener Rezeptoren an der Zelloberfläche und Änderungen im Zytokin-Expressionsprofil begleitet [31]. Es kommt unter anderem zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83, CD86, sowie des Homing-Rezeptors CCR7 und von MHC Klasse II (engl. major histocompatibility complex; MHC) Molekülen, wie beispielsweise HLA-DR [22].

Man unterscheidet im Menschen verschiedene Subtypen von DCs, wobei allen gemeinsam ist das sie das MHC-Klasse II Molekül HLA-DR exprimieren. Je nach Antigen Ausstattung differenziert man unter anderem zwischen CD1c, CD11c und CD141 positiven myeloiden DCs (mDCs) und CD123, CD303 und CD304 plasmazytoiden DCs (pDCs) [33, 34]. Diese beiden Subtypen induzieren, abhängig von

verschiedenen Umweltfaktoren, unterschiedliche Immunantworten. Erst kürzlich wurde die Rolle von pDCs an der Immunantwort gegen *A. fumigatus* *in vitro* und *in vivo* genauer untersucht [35, 36].

Die Relevanz von mDCs für eine Immunantwort gegen *A. fumigatus* lässt hingegen noch viele Fragen offen. mDCs entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen und sind mit einer Vielzahl von Rezeptoren zur Antigen-Erkennung, -Aufnahme und -Präsentation, ausgestattet [37]. Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Fähigkeit zur Stimulation von naiven T-Zellen und Initiierung einer Th1-dominierenden Immunantwort, unter anderem durch die Freisetzung von IL-12 [25, 38]. Eine Th1-dominierende Immunantwort geht vor allem mit einer starken zellulären Aktivität und erhöhten Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-12 und IFN- γ einher [3]. Durch die Aktivierung von NK-Zellen zur Produktion von IFN- γ wird dies weiter unterstützt [26]. Diese Tatsache ist von großer Bedeutung bei der schützenden Immunantwort gegen *A. fumigatus*, da diese vor allem auf einer IFN- γ produzierenden Th1-Immunantwort beruht und mit einem besseren Outcome bei IA assoziiert ist [25, 39].

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch DCs erfolgt neben löslichen Faktoren wie IFN- γ auch kontaktabhängig. Bei der DC/T-Zell-Interaktion spielen eine Vielzahl von Molekülen eine Rolle. Der erste Schritt besteht in der Erkennung MHC-Molekül-gebundener Antigene mittels spezifischer T-Zell-Rezeptoren. Im zweiten Schritt werden ko-stimulatorische Moleküle benötigt um die T-Zell-Aktivierung aufrecht zu halten. Hierbei spielt CD86 auf DCs eine wichtige Rolle. Umgekehrt können T-Zellen DCs mittels CD40-Liganden (CD40-L) aktivieren. Die ausgelöste Signalkaskade resultiert in einer vermehrten Expression von CD80 und CD86 und Freisetzung der Zytokine IL-1, IL-12, TNF und weiterer Chemokine [22].

Für Forschungszwecke werden häufig, aufgrund ihres zahlenmäßig häufigeren Vorkommens, *in vitro* generierte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (moDCs) verwendet, um die Funktion von DCs zu untersuchen [40, 41]. Sie repräsentieren einen Subtyp von DCs, der sowohl Makrophagen- als auch Monozyten-ähnliche Charakteristiken aufweist [40]. Die verschiedenen Subtypen sind mit unterschiedlichen Rezeptoren ausgestattet, die zum einen in der Lage sind Pathogene zu erkennen und auch eine Immunantwort hervorzurufen [42]. Neben verschiedenen Toll-like

Rezeptoren, zu nennen sind hier vor allem die an der Erkennung von Pilzen beteiligten TLR 1, 2, 4, 6, 7 und 9 [43], sind DCs ebenfalls mit unterschiedlichen Rezeptoren aus der Familie der C-Typ Lektin (CLEC) Rezeptoren ausgestattet [27]. Im Unterschied zu TLR spielen CLR nicht nur eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen, sondern auch bei der Aufnahme von Auto-Antigen und im Zusammenspiel verschiedener Entzündungszellen [32].

1.3.2 C-Typ Lektine als Pilz-Erkennungsrezeptoren

C-Typ Lektin Rezeptoren sind Teil einer großen Familie von transmembranösen und löslichen Proteinen, die im Wesentlichen durch ihre charakteristische C-Typ Lektin Domäne definiert werden. Sie erkennen Kohlenhydrat-Strukturen, wie zum Beispiel β -Glukan und Mannan, welche die Hauptbestandteile der Zellwand von *A. fumigatus* ausmachen [17, 43]. Diese Erkennungsdomänen werden auch als carbohydrate recognition domain (engl; CRD) bezeichnet. Die Bindung von C-Typ Lektin Rezeptoren an CRDs erfolgt Kalzium-abhängig [44]. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Antigene zu internalisieren, sodass diese in lysosomalen Kompartimenten degradiert werden und durch DCs präsentiert werden können [45]. Man unterscheidet zwei verschiedene Typen von transmembranösen CLR, zum einen Typ-I-Transmembranproteine, mit extrazellulärem NH₂-Terminus und multiplen CRDs, sowie Typ-II-Transmembranproteine, mit intrazellulärem N-Terminus und lediglich einer CRD. Die meisten CLR auf DCs sind Typ-II-Transmembranproteine [32, 45].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene CLR hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Rolle an der Erkennung von *A. fumigatus* untersucht. Sie werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

CLEC4A (engl. dendritic cell immunoreceptor; DCIR) ist ein transmembranöses Typ-II-Glykoprotein. Es besitzt ein intrazelluläres inhibitorisches Immun-Tyrosin-basiertes Schaltermotiv (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM) und wird von Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und B-Lymphozyten exprimiert [46]. Die durch die ITIM-Domäne vermittelte Signaltransduktion, weist auf eine mögliche Beteiligung von CLEC4A an der Herabregulation der zellulären Aktivität hin [47]. Auch wenn bislang

noch kein Ligand identifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von DCIR eine Clathrin-vermittelte Endozytose triggert. Die Rezeptor-Internalisation führte zu einer signifikant verminderten TLR8-vermittelten IL-12 und TNF- α Produktion [48].

CLEC6A ist ebenfalls ein transmembranöses Typ II Glykoprotein [49]. Es wird unter anderem von Monozyten, B-Lymphozyten und mononukleären Zellen [49] sowie von pDCs exprimiert und ist ein spezifischer Rezeptor für α -Mannan [35]. Es ist an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt und seine Aktivierung führt unter anderem zu einer erhöhten TNF- α Freisetzung und einer gesteigerten Immunaktivität gegen den Pilz [35]. Die Aktivierung von CLEC6A und die darauffolgende intrazelluläre Signalkaskade wird über die γ -Kette des Fc-Rezeptors, welche quasi als Adapter-Protein fungiert und eine Immuntyrosin-Aktivierungs-Domäne (engl. immunoreceptor tyrosin-based activation motif, ITAM) trägt, vermittelt [50].

CLEC7A (Dectin-1) ist ein spezifischer Rezeptor für β -1,3 und β -1,6 verknüpfte Glukane, welche vermehrt in der Zellwand von Pilzen vorkommen [51, 52]. Es gilt als zentraler Rezeptor auf moDCs für die Erkennung und Phagozytose von *A. fumigatus* [53]. CLEC7A wird von einer Vielzahl von Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Subtypen von T-Zellen und moDCs exprimiert [54] und besitzt eine ITAM-Domäne am intrazellulären NH₂-Terminus [51]. ITAM vermittelt wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Phagozytose des Liganden sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) triggert. Zudem kommt es dabei zu einem Zusammenspiel mit TLR2 (engl. cross-talk) und der Induktion einer Th1-vermittelten IL-12 Produktion [55]. Die Aktivierung von CLEC7A induziert neben der Phagozytose und der Produktion von ROS ebenfalls eine Maturierung der DCs, sowie Veränderungen im Zytokin- und Chemokin- Expressionsmuster, wie zum Beispiel die Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und IL-10 [23, 56]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Signaltransduktion nach Ligandenbindung über verschiedene Adaptorproteine, u.a. Syk, Card9 und PKC δ 9 vermittelt wird [56, 57].

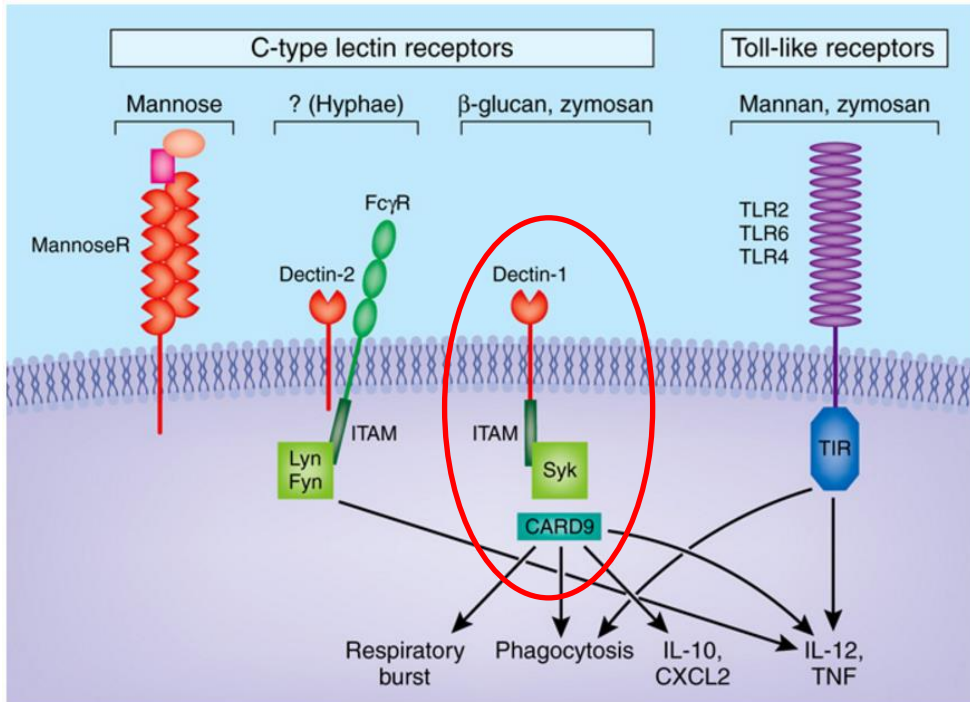


Abb. 3: CLEC7A-vermittelte Effekte nach Ligandenbindung. CLEC7A bindet β -Glukane und induziert Syk und Card9 vermittelt unterschiedliche zelluläre Immunantworten (entnommen aus Dostert und Tschopp, 2007) [57].

CLEC12A (engl. myeloid inhibitory C-Type-like lectine, MICL; DCAL-2) ist, neben CLEC4A, ein weiterer inhibitorischer transmembranöser Typ II C-Typ Lektin Rezeptor mit ITIM-Domäne [58]. Er kommt auf myeloiden Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Maturierung und Zytokinproduktion [32, 59]. Nach Ligandenbindung wird er internalisiert und induziert eine leicht erhöhte Produktion der Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- α , sowie eine Hochregulation von CCR7, dem Homing Rezeptor auf DCs. Weiterhin interagiert er synergistisch, ähnlich wie CLEC7A, mit den Toll-like Rezeptoren TLR2 und 4 [32]. Der Rezeptor wird im Falle einer Infektion oder bei TLR-Stimulation herab reguliert. Ein spezifischer Ligand für CLEC12A wurde bislang noch nicht identifiziert [23].

CLEC4E (engl. macrophage-inducible C-type lectin; Mincle) ist ein transmembranöser Typ II C-Typ Lektin Rezeptor und wird unter anderem von aktivierten Makrophagen,

Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert [44]. Ursprünglich wurde er als Transkriptionsziel von NF-IL6 (engl. nuclear factor, NF) in aktivierten Makrophagen identifiziert [60]. Es wurde gezeigt, dass CLEC4E über eine ITAM-Domäne mit der γ -Kette des Fc-Rezeptors verbunden ist und durch diverse Stimuli aktiviert und induziert wird [61]. Die Aktivierung von CLEC4E führt über die ITAM-Domäne und eine nachfolgende Signalkaskade zur Induktion zahlreicher inflammatorischer Zytokine, unter anderem TNF- α und IL-6 [60]. Als intrazelluläres Adaptorprotein dient unter anderem Syk, welches über Card9, Bcl10 und Malt1 zu Transkriptionsänderungen führt [62]. Das wiederum führt zur Freisetzung von Zytokinen, die die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in verschiedene T-Helfer-Zell-Subtypen, nämlich Th1- und Th17-Helferzellen, induzieren [63]. Als CLEC4E-Liganden sind bislang SAP130 (engl. SIN3A-associated protein), welches von nekrotischen Zellen freigesetzt wird, TDM (Trehalose-6'-Dimykolat), auch bekannt als Cord-Faktor von pathogenen Mycobakterien und der pathogene Pilz *Malassezia* identifiziert worden [60].

1.4 Ziele der Arbeit

Invasive Mykosen, im Besonderen Invasive Aspergillosen, stellen ein zunehmendes Problem unserer modernen Medizin dar. Erkenntnisse über die Interaktionen von *A. fumigatus* mit Immunzellen sind für das Verständnis der IA von enormer Bedeutung. Hierbei spielen vor allem dendritische Zellen eine wichtige Rolle, da sie als professionelle Antigen-präsentierende Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem sind. *In vitro* wird zu diesem Zweck häufig mit generierten moDCs gearbeitet. Zur Interaktion von *in vivo* vorkommenden mDCs mit *A. fumigatus* gibt es hingegen bislang wenige Daten.

An der Erkennung von *A. fumigatus* und Auslösung einer Immunantwort sind verschiedene Rezeptoren beteiligt. Neben Toll-like Rezeptoren spielen besonders C-Typ Lektin Rezeptoren eine bedeutende Rolle. Besonders die Rolle von CLEC7A an der Erkennung und Initiierung einer Immunantwort nach Kontakt mit *A. fumigatus* auf moDCs ist bislang gut untersucht. Daneben gibt es noch eine Vielzahl weiterer CLECs, die als potentielle Rezeptoren in Frage kommen. Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien ist es von besonderer Bedeutung ein besseres Verständnis von möglichen Rezeptoren zu erlangen, über die *A. fumigatus* erkannt wird und anschließend das adaptive Immunsystem aktiviert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Interaktion dendritischer Zellen mittels verschiedener CLECs mit *A. fumigatus* zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst die Expression von CLEC4A, CLEC6A, CLEC7A, CLEC12A und CLEC4E auf moDCs sowie auf mDCs analysiert. Die Analysen umfassen Daten zur Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometer, sowie auf molekularbiologischer Ebene hinsichtlich der mRNA-Expression nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, geschwollenen Konidien und Keimschläuchen.

Weiterhin wurde die Rolle von CLEC7A auf moDCs und mDCs genauer untersucht und die Auswirkungen einer Rezeptor-Blockade auf das Maturierungsverhalten der Zellen, ihr Zytokin-Profil, bezüglich der Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und das Phagozytose-Verhalten der beiden Subpopulationen beobachtet.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Rolle von CLEC7A auf mDCs gelegt, da hierzu bislang erst wenige Daten vorliegen.

Die Relevanz dieser Arbeit ist besonders im Hinblick auf zukünftige Therapiestrategien zu sehen. Ziel war es die Interaktion von *A. fumigatus* mit C-Typ Lektin Rezeptoren zu analysieren und Kenntnisse über ihre Rolle an der Pathogenese von invasiven Pilzinfektionen zu erlangen. Ein besseres Verständnis über die Pathogenese ist die Grundlage für eine mögliche pharmakologische Beeinflussung und Entwicklung neuer Therapieoptionen, wie die Entwicklung einer anti-fungalen DC-Immuntherapie.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturelle Methoden

2.1.1 Isolation von PBMCs

Die Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) erfolgte aus Leukozytenkonzentraten gesunder Thrombozytenspender aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg.

Die Isolation wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen. Hierbei kommt es mithilfe des Ficoll-Gradienten, einem Kohlenhydratpolymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml, zur Auftrennung der verschiedenen zellulären Blutbestandteile. Die PBMCs, zu denen Lymphozyten (B-, T- und NK-Zellen), Monozyten und dendritische Zellen zählen, sammeln sich hierbei in der Interphase und können isoliert werden.

Das Leukozytenkonzentrat wurde in einem 50 ml Falcon Röhrchen mit Puffer (HBSS, 5 mM EDTA, Sigma Aldrich) auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt. In zwei weiteren 50 ml Falcon-Röhrchen wurden jeweils 15 ml FICOLL[®] (Bicoll) vorgelegt und sorgfältig mit jeweils 25 ml verdünntem Leukozytenkonzentrat überschichtet. Hierbei sollte man eine Phasenvermischung vermeiden. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt mit 800×g für 20 Minuten (min) ohne Bremse und bei Raumtemperatur (RT) kam es zur Ansammlung der PBMCs in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll. Zellen mit höherer Dichte, wie Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen, sammelten sich im Sediment am Boden des Falcon-Röhrchens. Die Interphasen wurden sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in einem neuen 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt, mit Puffer auf 50ml verdünnt und pelletiert (150×g, 15 min, RT). Dieser Schritt diente der Entfernung von Thrombozyten, welche aufgrund ihrer geringeren Dichte im Überstand verbleiben und durch vorsichtiges Dekantieren verworfen werden. Es folgte ein erneuter Waschschrift. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 50 ml Puffer resuspendiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Bei der Neubauer Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, der aus einer größeren, dickeren Grundplatte und einem dünneren Deckglas besteht. Strichmarkierungen, die sogenannten Zählnetze, auf der Grundplattenoberfläche markieren einen Raum, dessen Volumen durch die Markierungen und die Kammerhöhe, der Abstand zwischen Grundplatte und Deckglas, bestimmt ist. Die Zählnetze haben eine Größe von 3 x 3 mm, wovon sich jedes aus neun 1 x 1 mm Großquadraten zusammensetzt. Die Eckquadrate sind nochmals in 16 kleinere Quadrate von 0,25 x 0,25 mm Länge unterteilt. Die Kammerhöhe beträgt 0,1 mm. Daraus berechnet sich ein Volumen von 0,1 Mikrolitern (μl) für ein Großquadrat. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer lässt sich somit mikroskopisch die Zellkonzentration von Zellsuspensionen bestimmen und das erforderliche Volumen für eine bestimmte Zellkonzentration berechnen.

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde der Azofarbstoff Trypanblau (Fluka) verwendet. Trypanblau färbt als nicht membrangängiger Farbstoff nur tote Zellen und lässt somit vitale Zellen ungefärbt.

Es wurden 10 μl der PBMC-Zellsuspension entnommen und mit 90 μl HBSS-Puffer verdünnt (1:10 Verdünnung). Anschließend erfolgte nochmals eine 1:2 Verdünnung mit Trypanblau. Aus dieser Verdünnung wurden 10 μl entnommen, in die Neubauer Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte, dem Kammerfaktor und dem Volumen des Aliquots errechnet sich somit folgende Gesamtzellzahl in 50 ml:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) \times 10 \times 2 \times 50 \text{ ml}$$

Das erforderliche Volumen für eine bestimmte Zellzahl ließ sich nun per Dreisatz berechnen:

$$\text{Erforderliches Volumen} = \text{Gesamtvolumen} / \text{Gesamtzellzahl} \times \text{gewünschte Zellzahl}$$

2.1.3 Isolation von CD 14-positiven Monozyten

Im Anschluss an die Isolation der PBMCs erfolgte die Separation von Monozyten mittels magnetischer Positiv-Selektion. Monozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche den Marker CD14 und können dadurch mithilfe von anti-CD14-Antikörper, welche an magnetische MicroBeads (Miltenyi Biotec) gekoppelt sind, markiert und anschließend über ein Trennsäulensystem im magnetischen Feld (engl. magnetic activated cell sorting; MACS-System) separiert werden. Alle nicht markierten Zellen laufen durch die Säulen hindurch und werden somit aussortiert, die markierten Zellen bleiben haften und können anschließend eluiert und gesammelt werden.

Zunächst wurde die Zellsuspension mit den isolierten PBMCs zentrifugiert (300×g, 10 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 340 µl Puffer pro 1×10^8 PBMCs resuspendiert. Nun wurden jeweils 60 µl anti-CD14-MicroBeads pro 1×10^8 PBMCs hinzugegeben und die Suspension für 15 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit Puffer, um überschüssige MicroBeads zu entfernen und ein weiterer Zentrifugationsschritt (300×g, 10 min, 4°C).

Während dieses Zentrifugationsschritts wurden die LS-Trennsäulen vorbereitet, indem sie in den Magnethalter eingesetzt und mit jeweils 3 ml Puffer äquilibriert wurden. Das Zellpellet wurde, nachdem der Überstand dekantiert wurde, in 500 µl Puffer pro 1×10^8 Zellen aufgenommen und auf die Magnetsäulen verteilt. Für ein bestmögliches Ergebnis wurden nicht mehr als 3×10^8 PBMCs pro Säule verwendet. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 3 ml Puffer. Anschließend wurden die Säulen vorsichtig aus dem Magnethalter genommen, auf ein 15 ml Falcon-Röhrchen gesetzt und jede Säule mit 5 ml Puffer und dem Säulenstempel eluiert. Dabei wurden die in ihr befindlichen Monozyten aus der Säule gedrückt. Es folgte eine erneute Zellzählung (Abschnitt 2.1.2) wobei dieses Mal nur eine 1:5 Verdünnung mit Puffer und anschließend 1:2 mit Trypanblau erfolgte. Die Gesamtzellzahl errechnete sich somit wie folgt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl} \times 10^4 \times 5 \times 2 \times 5 \text{ ml}$$

Die Ausbeute betrug etwa 20% der eingesetzten PBMCs.

2.1.4 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Es besteht die Möglichkeit *in vitro* die Differenzierung von CD14 positiven und CD1a negativen Monozyten zu CD14 negativen und CD1a positiven dendritischen Zellen durch Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu induzieren [41]. Unter mehrtägiger Einwirkung der Zytokine GM-CSF (engl. granulocyte macrophage-colony stimulating factor) und IL-4 können somit aus humanen Monozyten *in vitro* Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (moDCs) generiert werden [40].

Hierfür wurden die gewonnenen Monozyten in RPMI Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 10 ng/ml Interleukin 4 (R&D Systems), 100 ng/ml GM-CSF (Bayer)) aufgenommen (1×10^6 Monozyten in 1 ml Medium). Anschließend wurden jeweils 3 ml dieser Zellsuspension pro well einer 6-well-Platte verteilt und die Platten für 5 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. An Tag 2 und an Tag 4 erfolgte jeweils eine Teilerneuerung des Mediums und Substitution der Zytokine. Hierfür wurde pro well 1 ml entnommen, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (300×g, 10min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Medium mit 10% FCS und der Menge an Zytokinen vom Tag der Aussaat aufgenommen und anschließend 1 ml in jedes well zurückgegeben.

An Tag 5 wurden die zu moDCs ausdifferenzierten Zellen schließlich geerntet. Dazu wurden die Zellen mittels Zellschaber sorgfältig vom Boden und den Rändern mobilisiert und anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine erneute Zellzählung (Abschnitt 2.1.2) mit einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau. Währenddessen wurden die Zellen pelletiert (300×g, 10 min, RT). Im Anschluss daran konnte das Pellet in ein geeignetes Mediumvolumen für die folgenden Experimente aufgenommen werden.

2.1.5 Isolation von myeloiden dendritischen Zellen

Die Isolation von myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) erfolgte direkt aus PBMCs mittels magnetischer Positiv-Selektion. Myeloide dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den Marker CD1c (= BDCA1) mit dessen Hilfe man, wie unter 2.1.3 beschrieben, eine magnetische Selektionierung vornehmen kann [34]. Zur

Isolation von CD1c⁺ mDCs wurde das CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben verwendet. CD1c wird allerdings auch von ruhenden B-Lymphozyten exprimiert, weshalb es nötig ist im ersten Schritt eine Depletion der ebenfalls CD19 exprimierenden B-Zellen vorzunehmen. Diese erfolgte durch Zugabe von jeweils 200 µl Puffer, 100 µl FcR Blocking Reagent, 100 µl anti-CD19 MicroBeads und 100 µl biotinylierten CD1c Antikörpern pro 1×10⁸ PBMCs. Nach 15 min Inkubationszeit bei 4°C erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml Puffer gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (300×g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 500 µl Puffer aufgenommen, auf die mit 3 ml äquilibrierten LS-Magnetsäulen verteilt und dreimal mit je 3 ml Puffer gespült. Das Ergebnis war, dass die magnetisch markierten CD19-positiven B-Zellen in den Säulen zurückgehalten wurden und alle CD19-negativen PBMCs, zu denen mDCs zählen, hindurch liefen und in einem 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt werden konnten. Die Zellen des Durchflusses wurden pelletiert (300×g, 10 min, 4°C) und in 400 µl Puffer aufgenommen. Im Anschluss daran erfolgte die Positiv-Selektion der mDCs. Hierfür wurden die bereits mit anti-CD1c-Biotin gebundenen mDCs durch Zugabe von 100 µl anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert. Nach 10 min bei 4°C folgte ein erneuter Waschschrift mit 10 ml und das Pellet wurde in 500 µl resuspendiert. Es folgte die Separation über eine mit 1 ml Puffer äquilibrierte MS-Säule. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 µl Puffer wurden die in der Säule zurückgehaltenen Zellen mit 500 µl Puffer auf eine vorbereitete zweite MS-Säule eluiert. Diese wurde wieder dreimal gewaschen. Abschließend konnten die CD1c positiven mDCs nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mithilfe des Säulenstempels und 1 ml Puffer in ein 15 ml Falcon eluiert werden. Für eine höhere Zellreinheit waren unbedingt zwei MS-Säulen notwendig. Es folgte eine Zellzählung (Abschnitt 2.1.2) mit einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau. Währenddessen wurden die Zellen pelletiert (300×g, 10 min, RT). Im Anschluss daran konnte das Pellet in einem geeigneten Mediumvolumen für die folgenden Experimente aufgenommen werden. Die Ausbeute lag etwa bei 0,4% der eingesetzten PBMCs.

2.2 *Aspergillus fumigatus*-Kultur und Vorbereitung

Zur Herstellung von *Aspergillus fumigatus* Konidien (engl. conidia; con) wurden 100 µl einer bei 4°C aufbewahrten Konidien suspension des Ausgangsstammes (Stamm: ATCC 46645) [64] auf einer Bierwürzplatte ausgestrichen. Diese wurde anschließend sorgfältig verklebt und kopfüber für mindestens 3 Tage bei 37°C kultiviert bis die Platte dicht bewachsen war. Sobald dies der Fall war wurden 10 ml steriler HBSS-Puffer (Sigma Aldrich) auf die Platte gegeben und die hydrophoben Konidien vorsichtig mit einem sterilen Wattestäbchen abgelöst um sie im Anschluss, zur Separation, durch ein Zellsieb (Stemcell) mit 40 µm Porengröße, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen zu überführen und unter dem Lichtmikroskop zu zählen. Für die Zählung wurde eine 1:100 Verdünnung mit Puffer hergestellt und fünf Kleinquadrate ausgezählt (Abschnitt 2.1.2). Die Suspension ruhender Konidien wurde bei 4°C aufbewahrt und regelmäßig erneuert. Zur Herstellung von geschwollenen Konidien (engl. swollen conidia, sc) wurden Konidien in RPMI-Medium aufgenommen, über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und nach mikroskopischer Kontrolle gegebenenfalls noch für weitere 1-2 h bei 37°C im Schüttelinkubator gelagert. Bei der Herstellung der Keimschläuche (engl. germ tubes; gt) wurde ähnlich verfahren, wobei im Wesentlichen die Lagerung bei 37°C verlängert wurde. Währenddessen erfolgten regelmäßige mikroskopische Kontrollen um die Auskeimung zu überprüfen. Sobald über 80% der eingesetzten Konidien ihre Größe zu über 10µm großen Keimschläuchen verdreifacht hatten, wurden die Keimschläuche für Stimulationsversuche verwendet.

2.3 Stimulation DCs mit verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien

Im Folgenden werden die verschiedenen Konfrontationsexperimente erläutert. Hierfür wurden zwei Subpopulationen dendritischer Zellen (DCs), nämlich *in vitro* generierte von moDCs und *ex vivo* mDCs, mit verschiedenen Morphologien von *A. fumigatus* stimuliert. Daraus sollten Erkenntnisse über die Rolle verschiedener C-Typ Lektin Rezeptoren (CLECs) an der Erkennung von *A. fumigatus* gewonnen werden. Außerdem soll durch eine Antikörper vermittelte Rezeptor-Blockade von CLEC7A die Rolle

dieses Rezeptors genauer untersucht werden. Für jedes Experiment wurden mindestens drei verschiedene Immunzell-Spender untersucht, um eine statistische Aussage treffen zu können.

2.3.1 Stimulation moDC-CLECs

Um die Expression und mögliche Regulation der untersuchten CLECs auf moDCs nach Stimulation mit verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien zu untersuchen, wurden die *in vitro* generierten moDCs unterschiedlich lange mit einer äquivalenten Menge *A. fumigatus* Konidien, geschwollenen Konidien, oder Keimschläuchen stimuliert.

Hierfür wurden die generierten moDCs in die Vertiefungen einer 48-well-Platte verteilt. Pro Ansatz lag die Zellzahl bei 1×10^6 moDCs in 500 μ l RPMI-Medium und 10 % FCS. Dazu wurde jeweils eine äquivalente Menge der verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien gegeben, nämlich Konidien, geschwollenen Konidien oder Keimschläuche, welche ebenfalls in 500 μ l RPMI-Medium aufgenommen wurden, sodass ein Endvolumen von 1 ml entstand. Die erreichte MOI (engl. multiplicity of infection), die das Verhältnis von infektiösen Partikeln zu ihren Zielzellen beschreibt, betrug demnach 1. Die verschiedenen Ansätze wurden anschließend je nach Experiment unterschiedlich lange bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abschnitt 2.5).

2.3.2 Stimulation mDC-CLECs

Die Stimulation von mDCs verlief ähnlich wie unter 2.3.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass hier geringere Zellzahlen pro Ansatz eingesetzt wurden. Hier lag die Zellzahl pro Ansatz bei jeweils 5×10^5 mDCs in 250 μ l RPMI-Medium und 10% FCS. Dazu wurde ebenfalls die äquivalente Menge an unterschiedlichen *A. fumigatus* Morphologien (MOI=1) gegeben welche ebenfalls in 250 μ l RPMI-Medium aufgenommen wurden, sodass ein Endvolumen von 500 μ l entstand. Die Ansätze wurden anschließend unterschiedlich lange bei 37°C im Brutschrank inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht (Abschnitt 2.5).

2.3.3 Blockierungs-Assay gegen CLEC7A auf moDCs und mDCs

Bei der Durchführung der Blockierungs-Assays auf moDCs wurden pro Ansatz 2×10^5 moDCs in 200 μ l RPMI-Medium und 10% FCS in die Vertiefungen einer 96-well-Platte verteilt. Es folgte die Zugabe von 50 μ l FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) und eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Anschließend wurden 3 μ g/ml des CLEC7A blockierenden Antikörpers (R&D Systems, Klon #259931) (Abb.4) hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

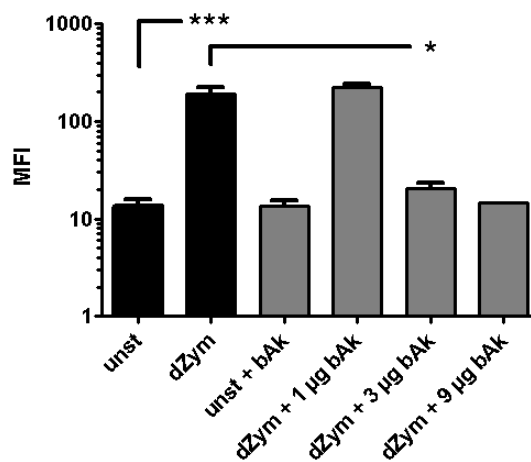


Abb. 4: Konzentrationsreihe zur Ermittlung der nötigen Zielkonzentration des CLEC7A blockierenden Antikörpers (R&D Systems, Klon #259931) für moDCs am Beispiel des Reifemarkers CD86. Dargestellt sind die Konzentrationen $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$), $c = 3 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$) und $c = 9 \mu\text{g/ml}$ ($n = 1$). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Danach erfolgte die Stimulation mit 100 μ g/ml depletiertem Zymosan (dZym; InvivoGen) oder ruhenden *A. fumigatus* Konidien (MOI = 1). Ein Ansatz blieb als Negativkontrolle unstimuliert. Nach 18 h wurden die Zellen geerntet, die Überstände abgenommen und bei -20°C eingefroren und die moDCs hinsichtlich ihrer Expression der Reifemarker CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC und HLA-DR durchflusszytometrisch untersucht (Abschnitt 2.5). Anhand der eingefrorenen

Überstände wurde die Menge an produziertem TNF- α , IL-8 und IL-1 β mittels ELISA quantifiziert (Abschnitt 2.7).

Zur Durchführung der Blockierungs-Assays auf mDCs wurden pro Ansatz 5×10^5 mDCs in 200 μ l RPMI-Medium und 10 % FCS in die Vertiefungen einer 96-well-Platte verteilt. Es folgte ebenfalls die Zugabe von 50 μ l FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) und eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 μ g/ml CLEC7A blockierenden Antikörpers (R&D Systems, Klon #259931) und eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Für mDCs wurde noch ein zweiter CLEC7A blockierender Antikörper (InvivoGen, Klon #22H8) in der Zielkonzentration 10 μ g/ml getestet. Hier betrug die Inkubationszeit 1 h. Danach erfolgte die Stimulation mit 100 μ g/ml depletiertem Zymosan (dZym; InvivoGen) oder ruhenden *A. fumigatus* Konidien (MOI = 1). Ein Ansatz blieb als Negativkontrolle unstimuliert. Nach 18 h wurden die Zellen geerntet, die Überstände abgenommen und eingefroren und die mDCs hinsichtlich ihrer Expression der Reifemarker CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC und HLA-DR durchflusszytometrisch untersucht (Abschnitt 2.5). Anhand der eingefrorenen Überstände wurde die Menge an produziertem TNF- α , IL-8, IL-1 β und IL-10 mittels ELISA quantifiziert (Abschnitt 2.7).

Tab. 1: Liste der verwendeten blockierenden Antikörper

Anti-Human CLEC7A	IgG2B - Klon # 259931	R&D Systems
Anti-hDectin-1	IgG1 - Klon # 22H8	InvivoGen

2.4 Phagozytose-Blockierungs-Assay auf moDCs und mDCs

CLEC7A ist als Phagozytose-Rezeptor unter anderem auf Monozyten und dendritischen Zellen bekannt [53]. Um die Rolle von CLEC7A auf moDCs und mDCs und die Auswirkungen einer Rezeptor-Blockade auf das Phagozytose-Verhalten der Zellen zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Phagozytose-Assays durchgeführt. Das Phagozytose-Verhalten der beiden Subpopulationen wurde durch Verwendung eines GFP- (grün fluoreszierendes Protein) exprimierenden *A. fumigatus* Stammes untersucht [65].

Hierfür wurden jeweils 1×10^5 moDCs/ mDCs in 50 μ l RPMI-Medium und 10% FCS auf FACS-Röhrchen verteilt. Ein Ansatz blieb unstimuliert, jeweils zwei stimulierte Ansätze wurden bei 4°C und 37°C gelagert, wovon jeweils ein Ansatz blockiert wurde. Die Blockierung von CLEC7A erfolgte, nach vorheriger Zugabe von 12,5 μ l FcR Blocking Reagent, durch Zugabe von 3 μ g/ml CLEC7A blockierenden Antikörpers (R&D Systems, Klon #259931). Für mDCs wurde noch ein zweiter CLEC7A blockierender Antikörper (InvivoGen, Klon #22H8) in der Zielkonzentration 10 μ g/ml getestet. Die Phagozytose-Kapazität wurde festgelegt durch eine 1 stündige Inkubation der Zellen entweder bei 4°C oder bei 37°C. Die bei 4°C inkubierten Zellen dienten als Referenzwert. Danach wurden moDCs für 3 h mit 1×10^5 GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (MOI = 1), bzw. mDCs mit 1×10^6 GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (MOI = 10) bei den jeweiligen Temperaturbedingungen stimuliert.

Durch Zugabe von 1 ml kaltem Puffer wurde die Reaktion gestoppt, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (300 \times g, 10 min, 4°C). Abschließend wurde die GFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Einzelzellen. Hierbei werden unterschiedliche Parameter wie Zellgröße, Struktur und Fluoreszenzemission ermittelt.

Bei der FACS-Analyse (engl. fluorescence activated cell sorting), einer bestimmten Form der Durchflusszytometrie, werden Zellen, die mittels fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern markiert wurden, durch einen Detektor gemessen. Dabei werden die Zellen mit konstantem Fluss und hohem Druck durch einen Messbereich befördert, wo sie auf einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm treffen. Je nach Eigenschaft senden sie nun spezifische Fluoreszenz- und Streulichtsignale aus,

welche von speziellen Photodioden registriert werden. Folgenden Parameter werden im Einzelnen bestimmt:

- Fluoreszenzsignal, je nach gebundenem und mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Antikörper
- Seitwärtsstreulicht, „side scatter“ (SSC), als Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und somit abhängig von der Granularität einer Zelle
- Vorwärtsstreulicht, „forward scatter“ (FSC), als Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und somit abhängig vom Zellvolumen

Zusammenfassend können durch die FACS-Analyse morphologische Eigenschaften und zelluläre Oberflächenmarker beurteilt werden.

2.5.2 Vorbereitung der Proben

Die zu analysierenden Zellen wurden in ein rundes 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, in Puffer gelöst und anschließend mind. 1×10^5 Zellen auf die vorbereiteten 5 ml FACS-Röhrchen verteilt. Dazu wurde unter lichtgeschützten Verhältnissen der jeweilige Antikörper (Tab.2) in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung, sowie die dazugehörigen Isotyp-Kontrollen pipettiert, gefolgt von einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C, unter lichtgeschützten Verhältnissen.

Die Isotyp-Kontrollen dienen dazu eine Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Antikörper-Bindung zu beurteilen. Es handelt es sich dabei um einen Antikörper mit demselben Farbstoff und derselben Klasse, jedoch ohne spezifische Bindekapazität. Die Fluoreszenz der Isotyp-Kontrollen diente der Festlegung der Hintergrundfluoreszenz, welche über die Spannungsmodulation der Detektoren unter eine Fluoreszenzintensität (MFI, engl. mean fluorescence intensity) von 10 eingestellt wurde.

Im Anschluss daran erfolgte ein Waschschriff mit 3 ml kaltem Puffer, um überschüssige Antikörper zu entfernen und ein Zentrifugationsschritt (300×g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden abgenommen und die Proben bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Tab. 2: Liste der verwendeten Fluoreszenz-Antikörper und die dazugehörigen Isotyp-Kontrollen für die durchflusszytometrischen Analysen.

Oberflächenmarker	Isotyp	Firma
CD1c	IgG2a – APC	Miltenyi Biotec
CD14	IgG2a – FITC	BD
CD1a	IgG1 – APC	Miltenyi Biotec
CLEC 4a	IgG1 – PE	R&D Systems
CLEC 6a	IgG1 – PE	R&D Systems
CLEC 7a	IgG2b – PE	R&D Systems
CLEC 12a	IgG2b – PE	R&D Systems
CLEC 4e	IgG – FITC	Biorbyt
CD80	IgG1 – APC	Miltenyi Biotec
CD83	IgG1 – PE	BD
CD86	IgG1 – FITC	BD
CD40	IgG2a – FITC	BD
HLA-ABC	IgG2b – PE	BD
HLA-DR	IgG2b – PE	BD
CCR7	IgG1 – APC	Miltenyi Biotec

2.5.3 Messung der Proben

Die Proben wurden mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer der Firma Becton-Dickinson (BD) gemessen. Zur graphischen Darstellung wurde die an das FACS Calibur angeschlossene CellQuest Pro (BD) Software verwendet.

Die Auswertung der Daten wurde mit der Software FlowJo (Tree Star) durchgeführt.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

Die mit den verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien stimulierten moDCs wurden mittels Genexpressionsanalyse hinsichtlich der Induktion verschiedener C-Typ Lektin Rezeptoren auf mRNA-Ebene untersucht. Die stimulierten Zellen wurden hierfür in 50 µl RNaProtect (Quiagen) resuspendiert und konnten dadurch, mit besonderem Schutz der mRNA-Integrität für mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

2.6.1 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus moDCs erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen). Zunächst wurde das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer gelöst. Dazu wurden 350 µl 70 % Ethanol (EtOH) gegeben und das entstandene Lysat nach sorgfältiger Resuspension auf eine Quiagen Mini-Säule überführt. Die Trennsäulen enthalten eine Silicagel-Matrix, mit deren Hilfe die in den Zellen vorhandene RNA gebunden und anschließend eluiert werden kann. Die Säulen wurden auf ein 1,5 ml Sammel-Röhrchen aufgesetzt und zentrifugiert (8000×g, 30 s). Nun haftete die RNA an der Säulenmatrix. Es folgte ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer und eine Zentrifugation (8000×g, 30 s). Um zu verhindern, dass es zur unspezifischen Bindung der Primer an DNA-Fragmente kommt, erfolgte anschließend eine Spaltung von DNA-Resten mittels Desoxyribonucleasen. Je Probe wurden 10 µl DNase I mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und auf jede Säule gegeben. Während einer 15 min Inkubation bei RT erfolgte nun die Spaltung der DNA-Reste. Anschließend wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Zur Aufreinigung der RNA folgten zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 µl RPE-Puffer, einmal für 15 Sek. bei mindestens 10000×g und abschließend für 2 min bei mindestens 10000×g. Im letzten Schritt wurde die RNA nun aus den Säulen eluiert. Hierfür wurden die Säulen auf frische 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und die RNA durch Zugabe von jeweils 30 µl RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation für 1 min bei mindestens 8000×g in das neue Reaktionsgefäß eluiert. Es folgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (Abschnitt 2.7.2) und die Umschreibung in cDNA (Abschnitt 2.7.3).

2.6.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte mithilfe des Spektrometers NanoDrop ND-1000 (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von RNA entspricht. Hierfür wurden jeweils 1-2 µl der RNA-Lösung auf die zuvor gereinigte Messfläche gegeben und die Absorption bei 260 nm gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass als Referenzwert RNase-freies Wasser verwendet wurde, das Lösungsmittel in dem die RNA gelöst wurde.

2.6.3 cDNA-Synthese / Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA wurde das cDNA First Strand Synthesis Kit (Thermo Scientific) verwendet. Das Kit enthält das Enzym Reverse Transkriptase, welches, unter Verwendung von Desoxynukleotiden, in der Lage ist RNA in cDNA umzuschreiben.

Im ersten Schritt wurden 100 – 500 ng RNA in 10 µl RNase freiem Wasser verdünnt und folgende Substanzen zugesetzt:

Tab. 3: Reaktionsreagenzien zur cDNA Synthese

Reaktionsreagenz	Volumen [µl]
Oligo dT Primer	1
5 × Reaktions-Puffer	4
10 nM dNTP Mix	2
RiboLock-RNase Inhibitor	1
M-MiLV-Reverse Transkriptase	2
RNA 100 – 500 ng	10
Endvolumen	20

Nach vorsichtigem Mischen der Reagenzien und anschließender Zentrifugation wurden die in Achterstreifen befindlichen Ansätze im Thermocycler (Mastercycler EP S, Eppendorf) unter den folgenden Bedingungen inkubiert:

Step 1: 5 min bei 25°C

Step 2: 60 min bei 37°C

Step 3: 5 min bei 70°C

Step 4: ∞ bei 4°C

Die gewonnenen cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.4 Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Realtime Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist ein verbreitetes Verfahren zur quantitativen Genexpressionsanalyse. Durch den Einsatz von spezifischen Primern für das zu untersuchende Gen und dem Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (BioRad), lassen sich PCR Produkte bereits während der Amplifikation mithilfe spezieller PCR-Geräte detektieren. Primer sind 10-20 Nukleotid kurze, einzelsträngige DNA-Stücke. Sie lagern sich sequenz-spezifisch in vorwärts (engl. forward) und reverser Richtung an die cDNA an und dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt der Amplifikation. SYBR Green bindet doppelsträngige DNA und es entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex. Dieser Komplex absorbiert blaues Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm. Je mehr doppelsträngige cDNA also vorhanden ist, desto größer ist die Fluoreszenzintensität. Alle qRT-PCRs wurden mit dem iTAQ™ Universal SYBR^R Green Supermix (BioRad) durchgeführt. Die Expression der untersuchten Gene wurde mit der Expression eines Referenzgens, auch Housekeeping Gen genannt, verglichen. Dies ermöglicht die relative Quantifizierung der Genexpression. Als Referenzgen wurde das Gen h-Alas (humane δ-Aminolävulinatsynthase), welches für ein mitochondriales Enzym codiert, verwendet. Housekeeping Gene zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Expression, unabhängig von äußeren Stimuli, konstant bleibt. Nach der Amplifikation erfolgt eine

Schmelzkurvenanalyse als schrittweise Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 90°C, wobei DNA Stücke derselben Länge und Sequenz einen Signalausschlag bei derselben Denaturierungstemperatur liefern. So wird überprüft, ob wirklich nur ein spezifisches DNA-Stück amplifiziert wurde. Für den Fall, dass die vervielfachte DNA verschiedene Sequenzen enthielt, so würde die Schmelzkurvenanalyse mehrere Signalausschläge anzeigen.

Zur Vorbereitung wurde die cDNA im Verhältnis 1:4 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und der jeweilige Mastermix für das Housekeeping Gen h-*Alas* und die untersuchten Gene CLEC 4A, 6A, 7A, 12A vorbereitet:

Tab. 4: Reaktionsreagenzien für die qPCR.

Reagenz	Volumen [μ l]
RNase-freies Wasser	4
10 μ M forward Primer	1
10 μ M reverse Primer	1
iTaq Mastermix BioRad	10
cDNA Verdünnung	4
Endvolumen	20

Tab. 5: Für die qPCR verwendete Primer.

Gen	ID	Firma
CLEC 4A	qHsaCIP0027397	BioRad
CLEC 6A	qHsaCED0048536	BioRad
CLEC 12A	qHsaCID0036803	BioRad

Tab. 6: Selbst designte Primer mit NK-Nummer, Sequenz und Programm. *fw* = forward, *rv* = reverse.

Gen	ID	Richtung	Primersequenz	Software
hALAS	NM_000688.5	fw rv	GGCAGCACAGATGAATCAGA CCTCCATCGGTTTTCACT	Primer3
CLEC7A	NM_197947.2	fw rv	CTGGTGATAGCTGTGGTCCTG AAGAACCCTGTGGTTTTGACA	Primer-Blast

Danach wurden die qPCR Ansätze in eine 96-well-PCR-Platte transferiert. Diese wurde kurz zentrifugiert, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Vertiefung sammelte. Die PCR-Zyklen mit folgender Schmelzkurvenanalyse wurden mithilfe des PCR-Gerätes StepOne Plus (Applied Biosystems) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 7: qPCR Zyklen mit Schmelzkurvenanalyse.

Zyklus	Dauer [s]	Temperatur [°C]
Initiation	30	95
40 Zyklen	3	95
	30	60
Schmelzkurve	15	95
	60	60
	+ 0,5°C / Messung	
	15	95

Für die Auswertungen der qPCR Daten wurde zuerst die PCR-Effizienz mithilfe der Programms LinRegPCR (Acronis) bestimmt. Die Analyse der relativen Expression erfolgte mittels $\Delta\Delta C_T$ - Methode. Dafür wurden die gemittelten Cycle Threshold (C_T)- bzw. Crossing Point (Cp)- Werte verwendet. Der Crossing Point bezeichnet den Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom Hintergrund hervortritt und macht es damit möglich vergleichende quantitative Aussagen über die initiale Menge an DNA machen. Je niedriger der Cp-Wert umso mehr Nucleinsäure liegt in einer Probe vor.

Die relative Expression (R) wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet:

$$R = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta C_{P_{\text{Ziel}}}} \text{ (Kontrolle - Behandlung)}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta C_{P_{\text{Referenz}}}} \text{ (Kontrolle - Behandlung)}}$$

Alle qPCR Daten wurden nach diesem Verfahren ausgewertet.

2.7 ELISA

2.7.1 Grundlagen

Beim ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) handelt es sich um ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Zytokinen. Das Prinzip beruht auf einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion. Hierfür wird ein für das zu untersuchende Zytokin spezifischer Capture-Antikörper an die Oberfläche einer 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. An diesen Antikörper kann das zu detektierende Antigen binden, sodass ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Dazu wird ein zweiter, ebenfalls spezifisch für das zu untersuchende Zytokin, Detektions-Antikörper gegeben und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Somit ist das Antigen von beiden Antikörpern umgeben, weshalb man diese Form des ELISA auch Sandwich-ELISA nennt. Zusätzlich ist der Detektions-Antikörper an Biotin gebunden, welches von dem Streptavidin gekoppeltem Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase; HRP) gebunden wird. Durch die Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) kommt es zur Türkisfärbung. Die Farbintensität ist proportional zur vorhandenen Zytokinkonzentration und kann mittels Absorptionsmessung am ELISA-Reader bestimmt werden.

2.7.2 Durchführung nach BioLegend

Zum Nachweis der Zytokine TNF- α , IL-8, IL1- β und IL-10 wurden die jeweiligen ELISA MAXTM Standard Sets der Firma BioLegend verwendet. Die Zytokine wurden aus den Überständen der Blockierungs-Assays (Abschnitt 2.3.3) bestimmt. Zuerst wurde der Capture-Antikörper 1:200 in Coating Puffer (8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃ in 1 Liter destilliertem Wasser lösen und pH 9,5 einstellen) verdünnt und jeweils 100 μ l in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte der erste Waschschrift mit je 200 μ l Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS; Phosphat-gepufferte-Saline, 8 g NaCl, 1,16 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl in 1 L destilliertem Wasser lösen und pH auf 7,4 einstellen) mithilfe eines ELISA-Waschgerätes (hydroFlex ELISA-washer,

Tecan). Dadurch wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Um unspezifische Bindungen des Analyts an die Plattenoberfläche zu verhindern, folgte eine Blockierung für 1 h bei RT mit jeweils 200 µl des Assay Diluent (1% BSA (Sigma Aldrich) in PBS). In dieser Zeit wurden die Proben und Standards vorbereitet. Als Standard dienten jeweils im Kit enthaltene Referenzproteine, die entsprechend den Herstellerangaben als Konzentrationsreihen verdünnt wurden. Nach einem erneuten Waschschrift, erfolgte die Zugabe der Proben und Standards, jeweils 100 µl, und eine 2 stündige Inkubationszeit bei RT auf dem Schüttelinkubator. Der Detektions-Antikörper wurde 1:200 in Assay Diluent verdünnt und jeweils 100 µl pro Vertiefung verteilt. Es folgten eine Inkubationszeit für 1 h bei RT auf dem Schüttelinkubator und ein Waschschrift. Danach wurden pro Vertiefung 100 µl TMB Substrat zugegeben und abhängig von der Farbentwicklung für 15 – 30 min bei RT ohne Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopp-Reagenz (2N H₂SO₄, Sigma Aldrich) pro Vertiefung wurde die Reaktion gestoppt und es kam zu einem Farbumschlag nach gelb. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm in einem Tecan ELISA-Reader (GENios FL, Tecan) gemessen und mithilfe des Standards die Konzentrationen der einzelnen Zytokine in Microsoft Excel errechnet.

2.8 Statistik

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, durch mindestens drei unabhängige Versuche erzielt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Excel, Microsoft). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 5.

Die Signifikanzniveaus sind wie folgt gekennzeichnet: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss unterschiedlicher *A. fumigatus* Morphologien auf die Expression verschiedener C-Typ Lektine in moDCs

Um den Einfluss verschiedener *A. fumigatus* Morphologien auf die Expression und Regulation verschiedener C-Typ Lektine (CLECs) zu untersuchen wurden *in vitro* generierte moDCs unterschiedlich lange mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Kondien (engl. swollen conidia; sc) oder Keimschläuchen (engl. germ tubes; gt) inkubiert (MOI = 1). Pro Ansatz lag die Zellzahl bei 1×10^6 moDCs. Als Negativkontrolle wurde je ein unstimulierter Ansatz mitgeführt. Danach wurden die Zellen mit den jeweiligen FACS-Antikörpern gefärbt und die CLECs mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Darstellungen der Ergebnisse beziehen sich durchgehend auf die gemittelten Werte von mindestens drei Spendern (n = 3), wenn nicht anders angegeben.

3.1.1 CLEC4A

Im Vergleich zur unspezifisch gefärbten Isotypkontrolle, ließ sich eine deutliche Expression von CLEC4A auf unstimulierten moDCs detektieren. Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien zeigte sich nach 3 und 6 h eine leicht erhöhte Expression. Nach 12 h war die Expression von CLEC4A eher vermindert, verglichen mit den unstimulierten Zellen. Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien kam es zu einer signifikanten Reduktion der Rezeptor-Expression im Zeitverlauf. Auch nach Stimulation mit Keimschläuchen konnte eine verminderte Expression beobachtet werden, welche aber nicht signifikant war. Zusammenfassend war eine signifikant verringerte Expression von CLEC4A nach Stimulation mit geschwollenen Konidien zu sehen (Abb. 5).

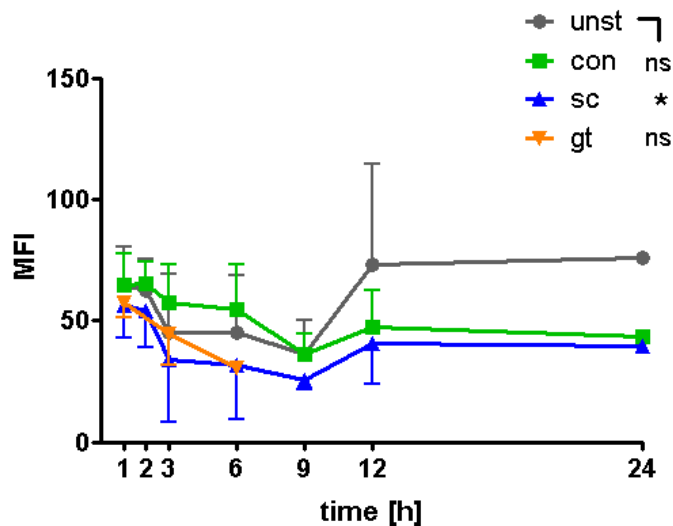


Abb. 5: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12 und 24 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$.

3.1.2 CLEC6A

Das Signal des für CLEC6A spezifischen Antikörpers war nicht stärker, als das, der unspezifischen Isotypkontrolle. Auch nach Inkubation der moDCs mit den verschiedenen Pilzmorphologien über mehrere Stunden, veränderte sich die Signalintensität und damit die Expression von CLEC6A nicht.

Die Messung eines beispielhaften Senders ist in Abbildung 6 zu sehen und die Mittelwerte von 3 Spendern in Abbildung 7.

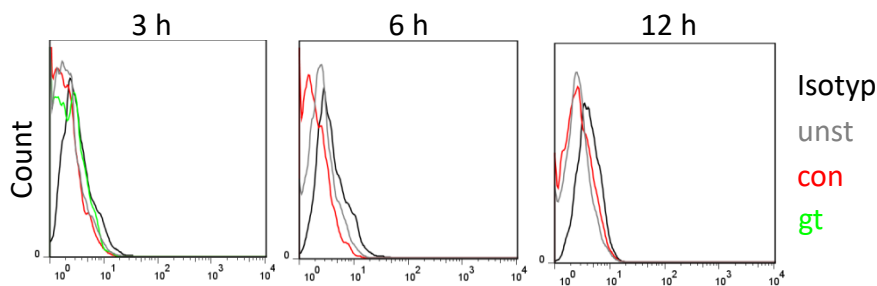


Abb. 6: Darstellung der Expression von CLEC6A mittels eines exemplarischen Spenders. Es konnte keine Expression von CLEC6A im Zeitverlauf beobachtet werden.

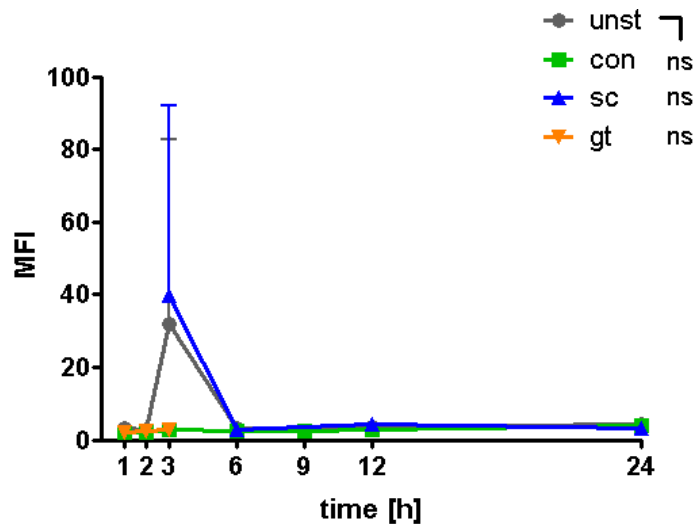


Abb. 7: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC6A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12 und 24 h. Als Negativkontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant.

3.1.3 CLEC7A

Die Expression von CLEC7A auf unstimulierten moDCs ließ sich im Vergleich zur Isotypkontrolle deutlich detektieren (Abb. 8). Eine Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien induzierte eine hoch signifikant verringerte Expression des Rezeptors im Zeitverlauf. Ebenso verhielt es sich nach Stimulation mit geschwollenen Konidien und Keimschläuchen. Die Reduktion der Expression von CLEC7A ist besonders in den früheren Zeitpunkten nach Stimulation mit geschwollenen Konidien und Keimschläuchen deutlicher als nach Stimulation mit Konidien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Pilz Morphologien eine signifikant verringerte Expression von CLEC7A induzierten.

Die Messung eines beispielhaften Spenders ist in Abbildung 9 zu sehen.

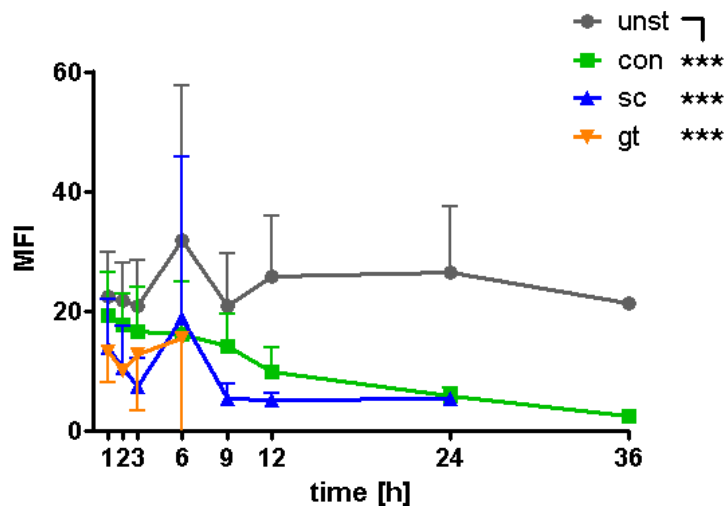


Abb. 8: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC7A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 8$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. *** $p < 0,001$.

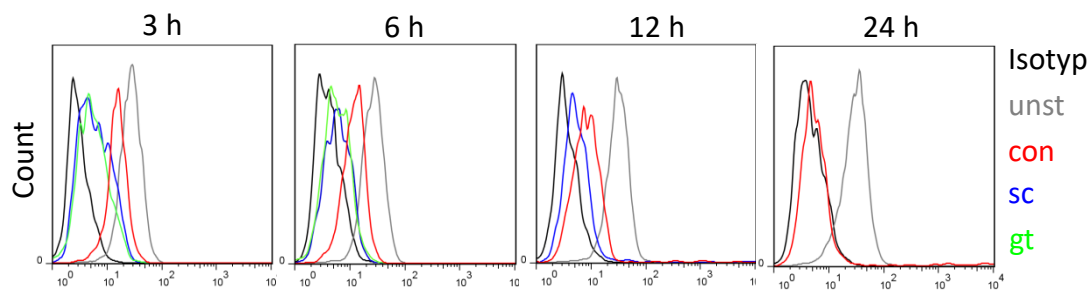


Abb. 9: Darstellung der Expression von CLEC7A auf moDCs mittels eines exemplarischen Spenders. Es lässt sich deutlich die Expression und das Verschwinden von CLEC7A von der Zelloberfläche nach Stimulation mit *A.fumigatus* beobachten.

3.1.4 CLEC12A

Es zeigte sich eine relativ geringe Expression von CLEC12A auf unstimulierten moDCs (Abb. 10). Nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien ließ sich eine signifikant reduzierte Rezeptor-Expression beobachten. Noch signifikanter wurde die Reduktion nach Konfrontation mit geschwollenen Konidien. Auch durch die Stimulation mit Keimschläuchen kam es im Zeitverlauf zu einer signifikant reduzierten Expression von CLEC12A. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei untersuchten Pilz Morphologien eine signifikant verringerte Expression des Rezeptors induzierten.

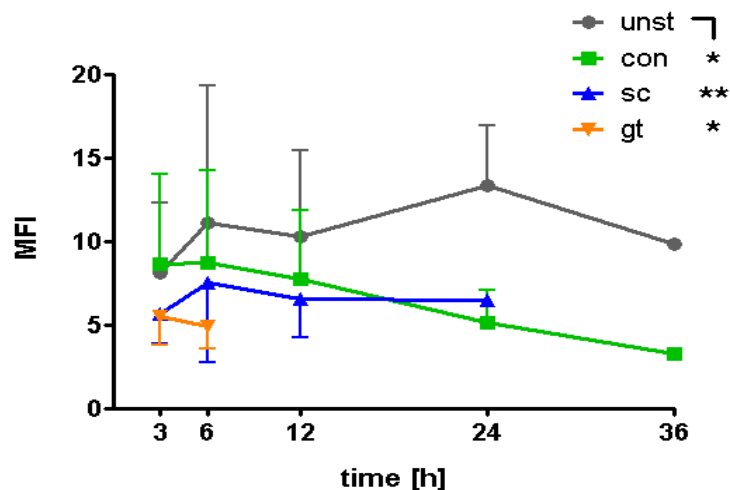


Abb. 10: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC12A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 3, 6, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.5 CLEC4E

CLEC4E wurde hinsichtlich seiner Regulation auf moDCs untersucht. Eine Isotyp-Kontrolle war nicht verfügbar. Nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien zeigte sich in den früheren Zeitpunkten, 3 und 6 h, kaum eine Veränderung der Rezeptor-Expression. Nach 12 h war eine dezent erhöhte Expression, verglichen mit dem unstimulierten Ansatz, zu sehen. Dieser Unterschied war allerdings in den späteren Zeitpunkten, 24 und 36 h, nicht mehr zu beobachten. Nach Konfrontation mit geschwollenen Konidien zeigte sich in allen Zeitpunkten eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante, Expression von CLEC4E. Auch nach Stimulation mit Keimschläuchen zeigte sich eine leicht erhöhte Expression von CLEC4E (Abb. 11).

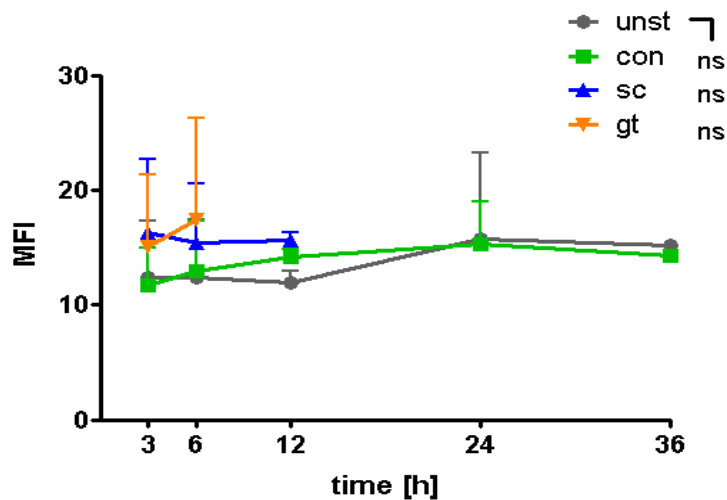


Abb. 11: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4E auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 3, 6, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant.

3.2 Einfluss unterschiedlicher *A. fumigatus* Morphologien auf C-Typ Lektine auf RNA-Ebene in moDCs

Im Folgenden werden die Ergebnisse der RNA-Expression der ausgewählten C-Typ Lektine (CLECs) in moDCs nach Stimulation mit Konidien (con) und geschwollenen Konidien (engl. swollen conidia; sc) vorgestellt.

Die *in vitro* generierten moDCs wurden hierfür für jeweils 3, 6 und 12 h mit einer äquivalenten Menge *A. fumigatus* Konidien bzw. geschwollenen Konidien bei 37 °C inkubiert (MOI = 1). Pro Ansatz lag die Zellzahl bei 1×10^6 moDCs. Als Negativkontrolle wurde je ein unstimulierter Ansatz mitgeführt. Anschließend erfolgte die Isolation der mRNA und Durchführung einer qPCR (Abschnitt 2.6).

Die Darstellungen der Ergebnisse beziehen sich durchgehend auf die gemittelten Werte von je drei Spendern (n = 3). Alle Werte wurden mit dem Referenzgen hALAS normalisiert.

3.2.1 *CLEC4A*

Die relative mRNA-Expression von *CLEC4A* wurde durch eine Stimulation mit beiden Pilz Morphologien, Konidien und geschwollenen Konidien, signifikant reduziert. Nach Stimulation mit Konidien ließ sich nach 3 h eine deutliche, wenn auch nicht signifikant reduzierte mRNA-Expression erkennen. Nach 6 bzw. 12 h war die Reduktion hoch signifikant. Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien war bereits nach 3h eine hoch signifikant reduzierte mRNA-Expression zu beobachten, ebenso nach 6 und 12 h. Für beide Morphologien gilt, dass die Reduktion der relativen mRNA-Expression nach 12 h am größten war (Abb. 12).

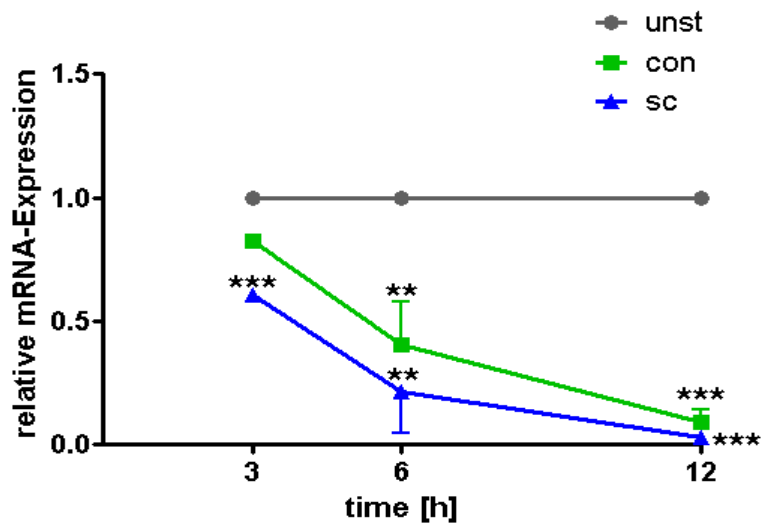


Abb. 12: Relative mRNA-Expression von *CLEC4A* in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten moDCs (unst). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$.

3.2.2 CLEC6A

Die Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien und geschwollenen Konidien induzierte im Zeitverlauf eine signifikant reduzierte relative mRNA-Expression von *CLEC6A*. Nach Stimulation mit Konidien ließ sich nach 6 und 12 h eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression beobachten. Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien kam es erst nach 12 h zu einer höchst signifikant reduzierten relativen mRNA-Expression (Abb. 13).

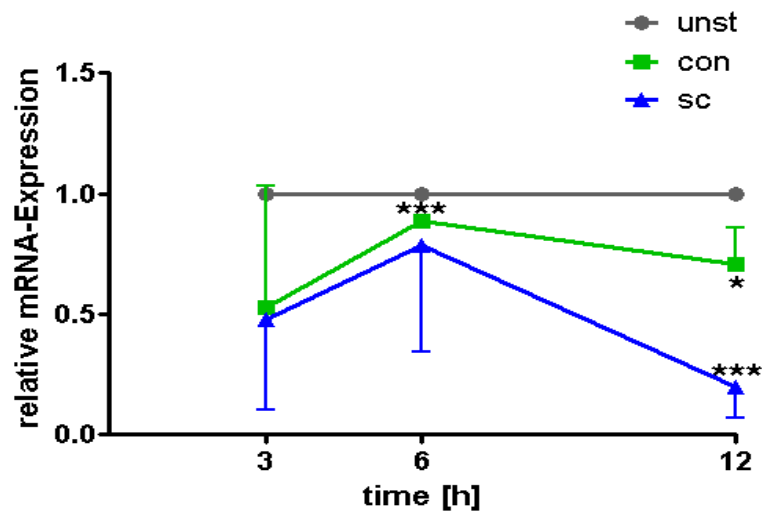


Abb. 13: Relative mRNA-Expression von *CLEC6A* in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 3$.

3.2.3 CLEC7A

Die relative mRNA-Expression von *CLEC7A* wurde durch eine Stimulation mit beiden Pilz Morphologien, Konidien und geschwollenen Konidien, im Zeitverlauf signifikant reduziert. Nach 3 h Stimulation mit Konidien war noch kein Unterschied zur mitgeführten unstimulierten Probe zu beobachten. Nach 6 h war eine signifikante Reduktion zu erkennen, was sich im Zeitverlauf noch weiter fortsetzte. Nach 12 stündiger Stimulation war die relative mRNA-Expression fast um die Hälfte und hoch signifikant vermindert.

Die Stimulation mit geschwollenen Konidien ließ nach 3 h, ähnlich der Stimulation mit Konidien, kaum ein Unterschied zum unstimulierten Ansatz erkennen. Hier kam es ebenfalls nach 6 h zu einer signifikanten Reduktion der Expression um fast die Hälfte. Die 12 stündige Stimulation induzierte eine höchst signifikante Reduktion um mehr als die Hälfte (Abb. 14).

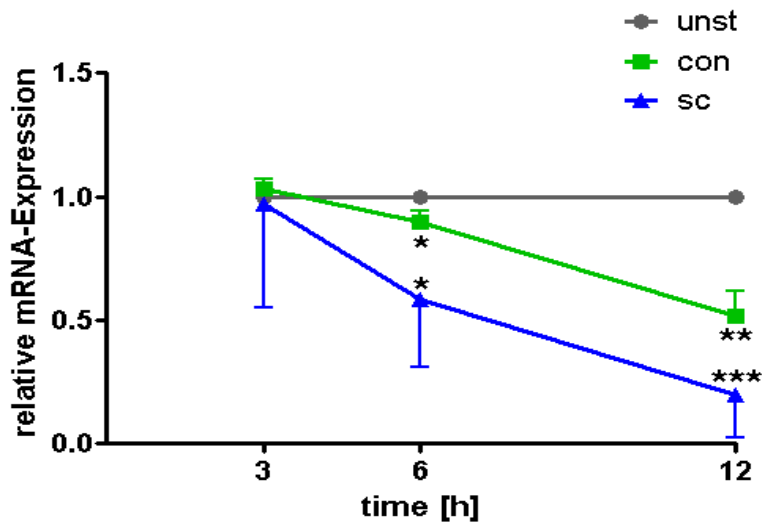


Abb. 14: Relative mRNA-Expression von *CLEC7A* in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$.

3.2.4 CLEC12A

Nach Stimulation mit Konidien zeigte sich nach 3 h eine dezente Reduktion der relativen mRNA-Expression im Vergleich zu unstimulierten moDCs. Nach 6 h war eine signifikante Reduktion um fast die Hälfte zu erkennen, was sich im Zeitverlauf nach 12 h weiter fortsetzte.

Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien zeigte sich bereits nach 3 h eine starke und signifikant reduzierte relative mRNA-Expression. Nach 6 stündiger Stimulation war die Expression weiterhin signifikant verringert, ebenso nach 12 h. Verglichen miteinander, zeigte sich nach 3 h Stimulation ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden *A. fumigatus* Morphologien, welcher sich jedoch nach 6 und 12 h nicht mehr beobachten ließ (Abb. 15).

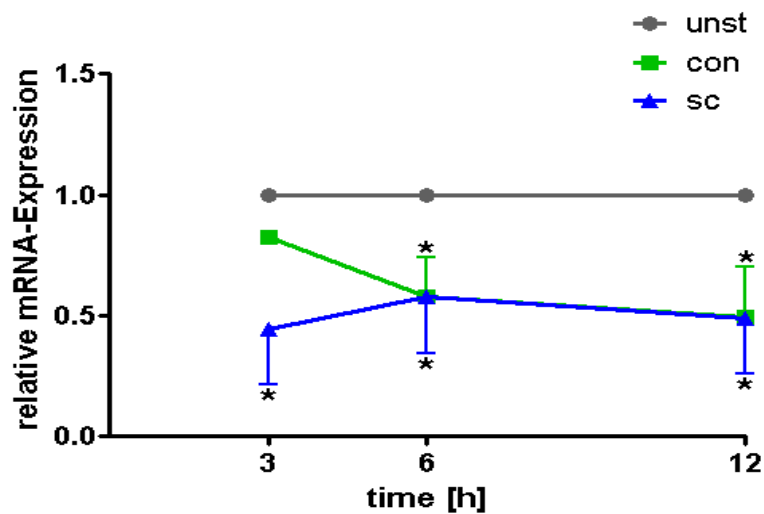


Abb. 15: Relative mRNA-Expression von CLEC12A in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs. * $p < 0,05$; $n = 3$.

3.3 Einfluss unterschiedlicher *A. fumigatus* Morphologien auf die Expression verschiedener C-Typ Lektine in mDCs

Um den Einfluss verschiedener *A. fumigatus* Morphologien auf die Expression und Regulation verschiedener C-Typ Lektine (CLECs) auf myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) zu untersuchen, wurden diese *in vitro* unterschiedlich lange mit verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien, nämlich Konidien (con), geschwollenen Kondien (engl. swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (engl. germ tubes; gt) inkubiert (MOI = 1). Pro Ansatz lag die Zellzahl bei 5×10^5 mDCs. Als Negativkontrolle wurde je ein unstimulierter Ansatz mitgeführt. Danach wurden die Zellen mit den jeweiligen FACS-Antikörpern gefärbt und die CLECs mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Darstellungen der Ergebnisse beziehen sich durchgehend auf die gemittelten Werte von je mindestens drei Spendern (n = 3).

3.3.1 CLEC4A

Eine Expression von CLEC4A auf unstimulierten mDCs war im Vergleich zur Isotypkontrolle deutlich zu erkennen. Nach Stimulation mit Konidien war nach 1 h kein Unterschied zum unstimulierten Ansatz zu erkennen. Nach 3 h zeigte sich eine geringe Reduktion der Expression, was sich im weiteren Zeitverlauf fortsetzte. Die stärkste Reduktion war nach 6 h zu sehen.

Die Stimulation mit geschwollenen Konidien induzierte im Zeitverlauf eine signifikante Reduktion der Rezeptor-Expression. Insgesamt war die Reduktion nach 6 h am größten. Ähnlich hierzu wurde die Expression von CLEC4A durch die Stimulation mit Keimschläuchen signifikant reduziert (Abb. 16).

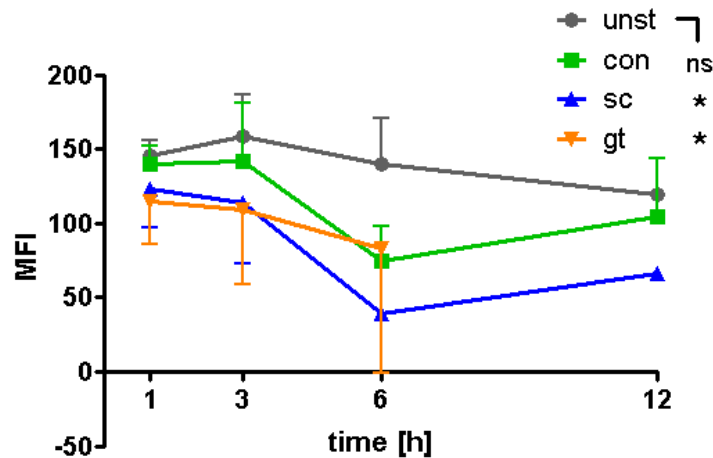


Abb. 16: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$.

3.3.2 CLEC6A

Eine Expression von CLEC6A auf der Zelloberfläche von mDCs war durchflusszytometrisch nicht nachweisbar (Abb. 17).

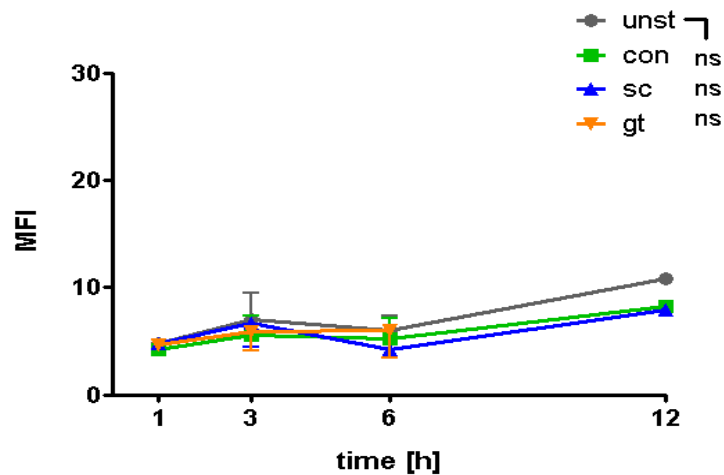


Abb. 17: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC6A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 4$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant.

3.3.3 CLEC7A

Eine Expression von CLEC7A auf unstimulierten mDCs war deutlich erkennbar. Die Stimulation mit Konidien induzierte im untersuchten Zeitverlauf eine hoch signifikant verringerte Rezeptor-Expression.

Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien konnte ebenfalls eine höchst signifikante Reduktion der Expression beobachtet werden, ebenso nach der Stimulation mit

Keimschläuchen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von CLEC7A auf der Zelloberfläche von mDCs durch die Stimulation mit allen untersuchten Pilz Morphologien signifikant verringert wurde (Abb. 18).

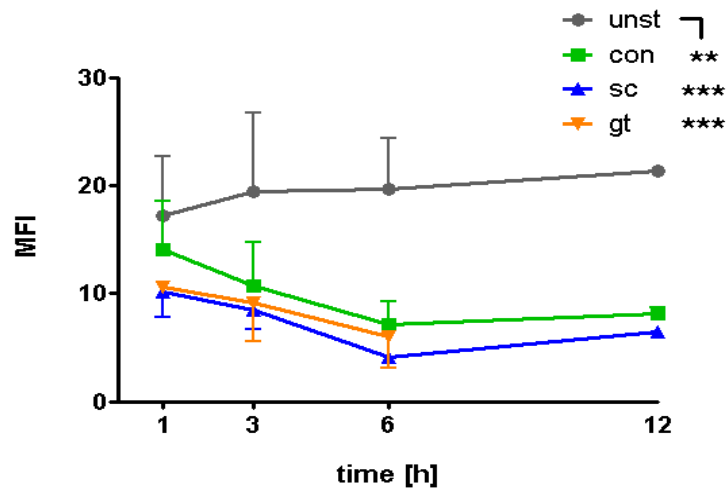


Abb. 18: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC7A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.4 CLEC12A

Es ließ sich eine hohe Expression von CLEC12A auf unstimulierten mDCs erkennen. Nach Stimulation mit Konidien ließ sich nach 1 h kein Unterschied in der Rezeptor-Expression zum unstimulierten Ansatz feststellen. Im weiteren Zeitverlauf kam es nach 6 h zu einer hoch signifikanten Reduktion der Expression um mehr als die Hälfte, was sich im weiteren Zeitverlauf fortsetzte.

Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien kam es bereits nach 1 h zu einer signifikant reduzierten Rezeptor-Expression. Dieser Trend setzte sich im Zeitverlauf weiter fort. Ähnlich verhielt es sich nach der Stimulation mit Keimschläuchen. Hier kam es ebenfalls bereits nach 1 h zu einer signifikant verringerten Expression des Rezeptors, ebenso im weiteren Zeitverlauf (Abb. 19).

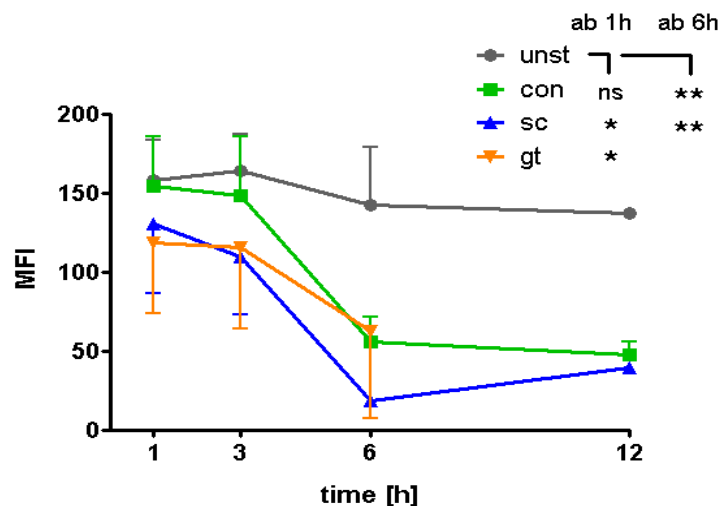


Abb. 19: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC12A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant.

3.3.5 CLEC4E

CLEC4E wurde hinsichtlich seiner Regulation auf mDCs untersucht. Eine Isotyp-Kontrolle war nicht verfügbar. Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien zeigte sich nach 1 h keine Veränderung der Rezeptor-Expression. Nach 3 h war eine geringe Herabregulation des Rezeptors, verglichen mit dem unstimulierten Ansatz, zu sehen. Dieser Unterschied war zum späteren Zeitpunkt, nach 6 Stunden noch etwas deutlicher zu beobachten. Nach Stimulation mit geschwollenen Konidien zeigte sich im Zeitverlauf eine signifikant verringerte Rezeptor-Expression. Die Stimulation mit Keimschläuchen induzierte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Expression von CLEC4E (Abb. 20).

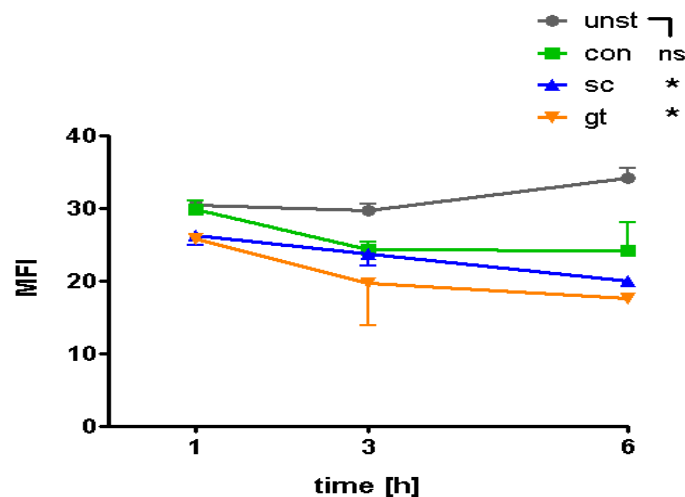


Abb. 20: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4E auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3 und 6 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant.

3.4 Blockierungs-Assays gegen CLEC7A auf moDCs

3.4.1 Reifemarker

Die Stimulation der moDCs erfolgte für 18 h mit *A. fumigatus* Konidien (con) oder depletiertem Zymosan (dZym) nach vorheriger CLEC7A-Blockade. Die Analyse wurde mit 3 verschiedenen Spendern durchgeführt um eine signifikante Aussage über das Maturierungsverhalten der Zellen treffen zu können. Als Negativ- bzw. Positiv-Kontrollen dienten jeweils ein unstimulierter Ansatz bzw. stimulierte Ansätze mit Konidien oder depletiertem Zymosan.

Unstimulierte moDCs zeigten generell eine relativ niedrige Expression aller Maturierungsmarker. Nach Stimulation mit Konidien und stärker noch mit depletiertem Zymosan kam es zu einer deutlichen Reifung der Zellen. Die Expression von CD83, CD86 und HLA-DR war signifikant erhöht.

Die Blockade von CLEC7A durch Zugabe des blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml) vor der Stimulation, erfolgte nach Durchführung einer Konzentrationsreihe zur Ermittlung der nötigen Zielkonzentration des Antikörpers (Abb. 4) und verhinderte die Maturierung effektiv. Die Expression der Reifemarker glich der Expression der unstimulierten Ansätze. Unspezifische Stimulationseffekte allein durch Zugabe des blockierenden Antikörpers waren nicht zu beobachten.

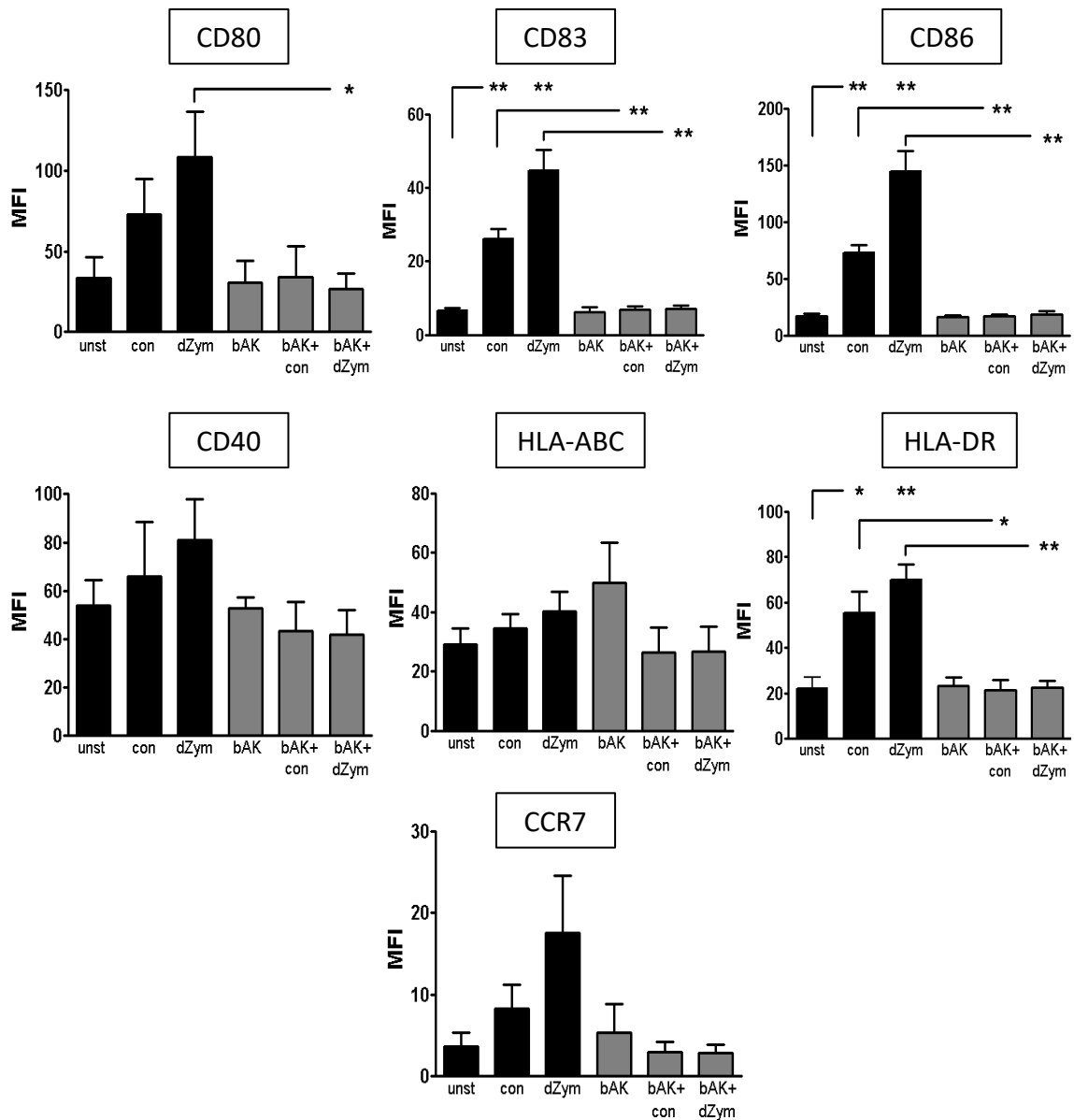


Abb. 21: *moDCs* maturierten nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletierem Zymosan (dZym). Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 3 µg/ml blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931) wurde die Maturierung effektiv inhibiert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Reifemarker mittels Durchflusszytometer (Mittlere Fluoreszenzintensität; MFI). Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.4.2 Zytokine

Zur Analyse der Zytokinsekretion wurden die Überstände nach 18 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) oder depletiertem Zymosan (dZym) mittels ELISA analysiert. Es wurden 3 verschiedenen Spendern untersucht um eine signifikante Aussage über die Zytokinsekretion treffen zu können. Beide Stimuli veranlassten moDCs zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL) -8, IL-1 β und Tumornekrosefaktor (TNF) - α . Besonders hoch war die Freisetzung von IL-8. Durch die Zugabe des blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931, c = 3 μ g/ml) vor der Stimulation konnte die Freisetzung aller drei untersuchten Zytokine signifikant verringert werden. Sie glich der Freisetzung der unstimulierten Ansätze. Eine erhöhte Zytokinfreisetzung allein durch die Zugabe des blockierenden Antikörpers konnte nicht beobachtet werden.

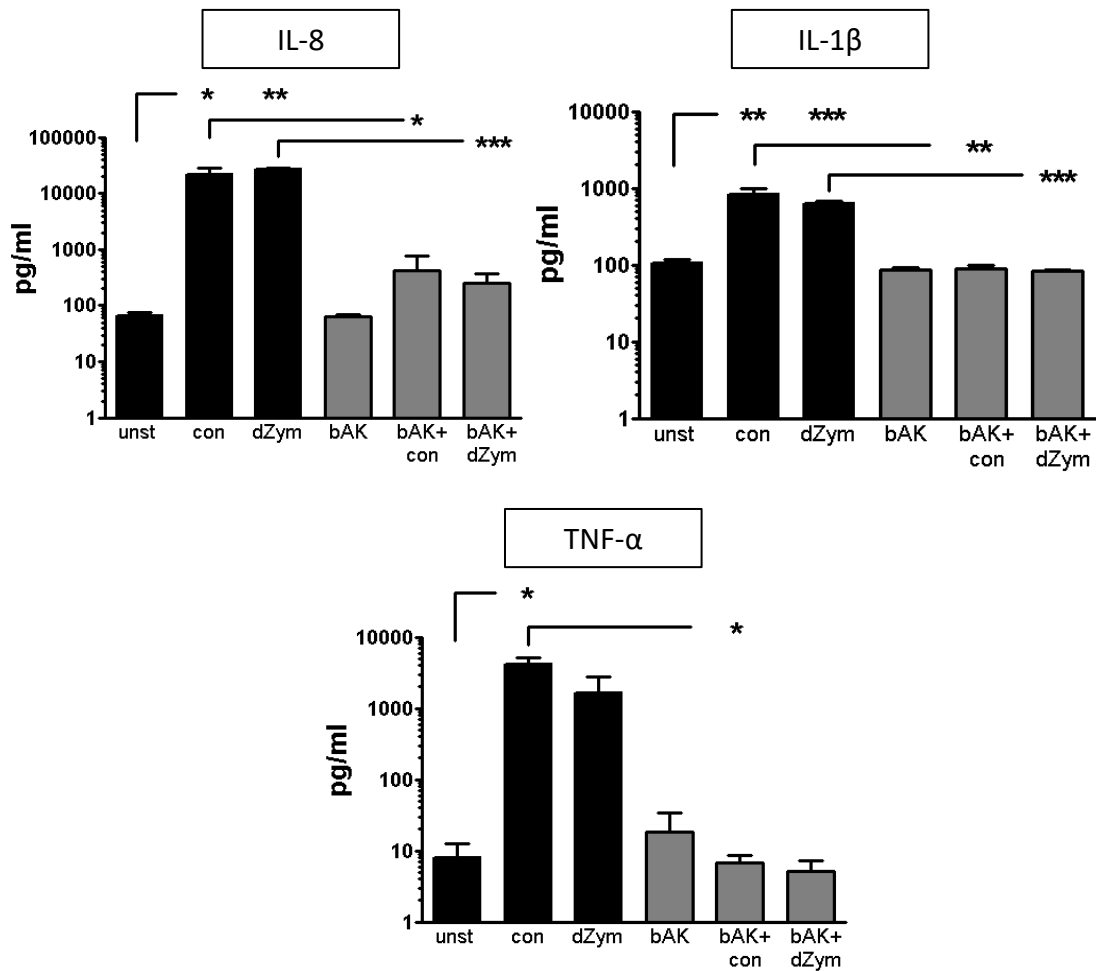


Abb. 22: Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletiertem Zymosan (dZym) sekretierten moDCs signifikant mehr pro-inflammatorische Zytokine IL-8, IL-1 β und TNF- α . Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 3 μ g/ml blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931) wurde die Zytokinsekretion deutlich vermindert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Überstände mittels ELISA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.4.3 Phagozytose

Zur Analyse des Phagozytose-Verhaltens von moDCs und die Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade wurden die Zellen für 3 h mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (con) stimuliert und anschließend mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse wurde für die Stimulation mit Konidien mit 3 Spendern durchgeführt. Für die Stimulation mit Keimschläuchen (gt) ist ein beispielhafter Spender gezeigt. Nach 3 h hatten im Durchschnitt 20 Prozent der moDCs Konidien phagozytiert. Durch Zugabe des CLEC7A blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931, $c = 3 \mu\text{g/ml}$) wurde die Phagozytose signifikant inhibiert. Hiernach lag der Anteil an moDCs, welche Konidien phagozytierten nur noch bei knapp 3 Prozent. Keimschläuche wurden deutlich weniger phagozytiert, hier ließ sich kaum ein Unterschied zum unstimulierten Ansatz erkennen.

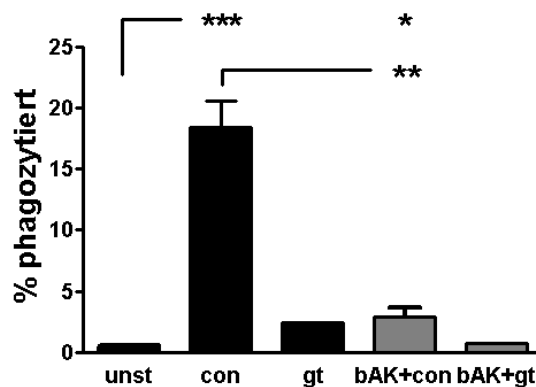


Abb. 23: Phagozytose-Aktivität von moDCs nach Stimulation mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (con) und Keimschläuchen (gt; germ tubes) sowie nach Zugabe von $3 \mu\text{g/ml}$ des CLEC7A blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.5 Blockierungs-Assays gegen CLEC7A auf mDCs

3.5.1 Reifemarker

Die Stimulation der mDCs erfolgte für 18 h mit *A. fumigatus* Konidien (con) oder depletiertem Zymosan (dZym) nach vorheriger CLEC7A-Blockade. Zur Blockade wurden zwei verschiedene Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml) verwendet, da bei der Verwendung des grauen Antikörpers unspezifische Stimulationseffekte beobachtet wurden. Zur Ermittlung der nötigen Zielkonzentration für den Klon #259931 wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt (Abb. 4) bzw. für den Klon #22H8 die Herstellerangaben befolgt. Die Analyse wurde für beide blockierenden Antikörper jeweils mit mindestens 3 verschiedenen Spendern durchgeführt um eine signifikante Aussage über das Maturierungsverhalten der Zellen treffen zu können. Als Negativ- bzw. Positiv-Kontrollen dienten jeweils unstimulierte Ansätze bzw. stimulierte Ansätze mit Konidien oder depletiertem Zymosan. Unstimulierte mDCs zeigten generelle Unterschiede zu moDCs im Expressionsprofil der Reifemarker. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD40 waren geringer exprimiert, ebenso wie CCR7, wohingegen die kostimulatorischen Moleküle CD83, CD86 und HLA-ABC, MHC-Molekül Klasse I und HLA-DR, MHC-Molekül Klasse II deutlich höher exprimiert waren als auf unstimulierten moDCs. Nach Stimulation mit Konidien und depletiertem Zymosan kam es zu einer deutlichen Reifung der Zellen. Die Expression von CD80, CD83, CD86, CD40 und CCR7 war signifikant erhöht. Durch die Blockade von CLEC7A durch Zugabe des grauen blockierenden Antikörpers vor der Stimulation, wurde die Expression von CD80, CD86 und HLA-DR signifikant verringert. Allerdings konnte hier eine Stimulation nur durch Zugabe des Antikörpers beobachtet werden, was zu einer signifikant erhöhten Expression von CD83 und CCR7 führte. Durch die Blockierung mittels des weißen Antikörpers wurde ebenfalls die Expression von CD80, CD40, sowie von HLA-DR und CCR7 signifikant verringert. Hier war keine Stimulation durch den Antikörper zu sehen.

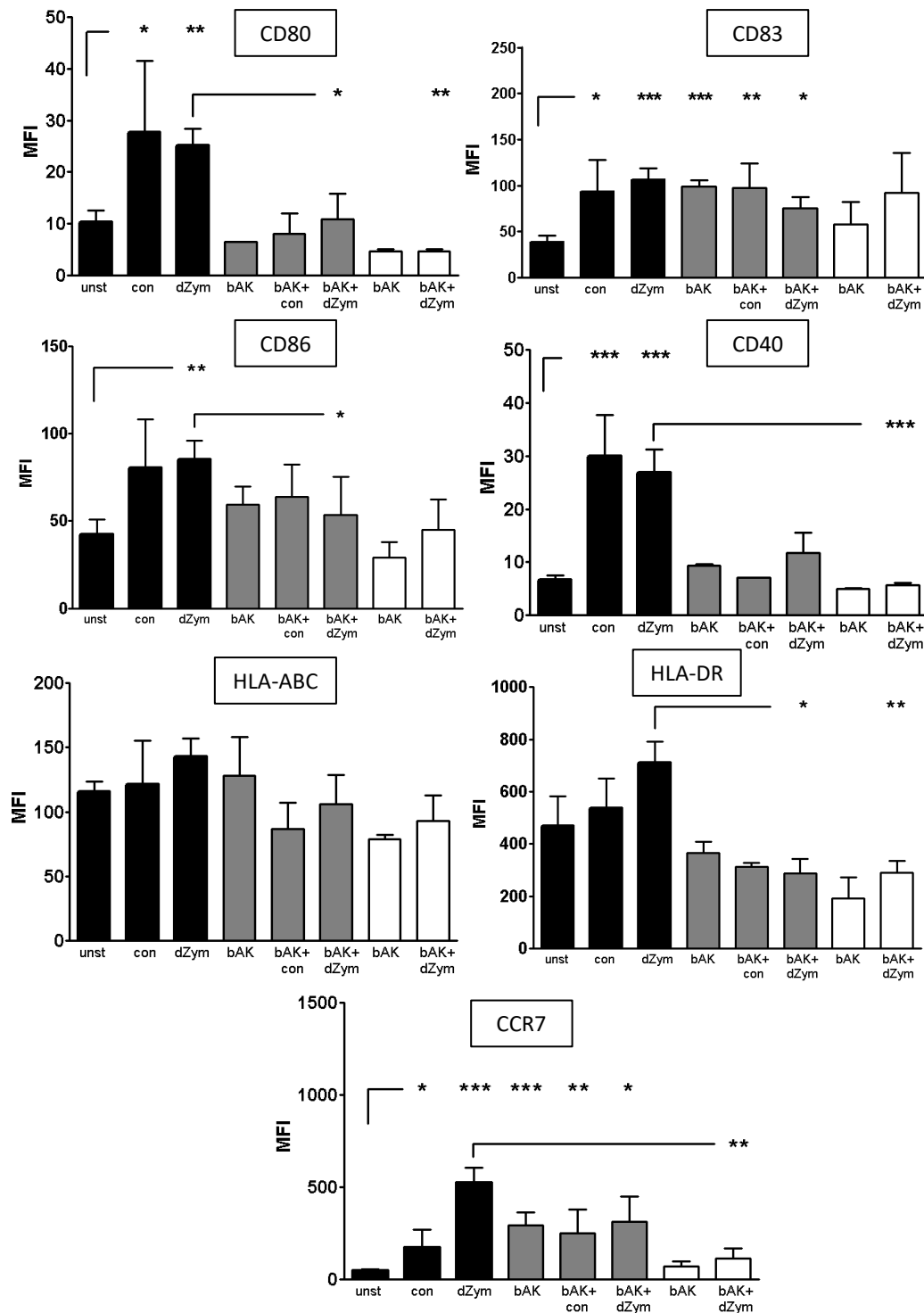


Abb. 24: mDCs maturierten nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletierem Zymosan (dZym). Durch die Blockierung von CLEC7A mittels blockierender Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, $c = 3 \mu\text{g/ml}$ / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, $c = 10 \mu\text{g/ml}$) wird die Maturierung einiger Reifemarker effektiv inhibiert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Reifemarker mittels Durchflusszytometer (Mittlere Fluoreszenzintensität; MFI). Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.5.2 Zytokine

Zur Analyse der Zytokinsekretion wurden die Überstände nach 18 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) oder depletiertem Zymosan (dZym) mittels ELISA untersucht. Die Analyse wurde für beide blockierende Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml) mit mindestens 3 verschiedenen Spendern durchgeführt um eine signifikante Aussage über die Zytokinsekretion treffen zu können. Beide Stimuli veranlassten mDCs zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-1 β , TNF- α und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Besonders hoch war, wie auch bei moDCs beobachtet, die Freisetzung von IL-8. Durch die Zugabe des ‚grauen‘ blockierenden Antikörpers vor Stimulation konnte die Freisetzung von TNF- α und IL-10 deutlich und von IL-8 und IL-1 β signifikant verringert werden. Eine signifikant erhöhte Zytokinfreisetzung allein durch die Zugabe des blockierenden Antikörpers konnte nicht beobachtet werden. Durch die Zugabe des ‚weißen‘ blockierenden Antikörpers konnte die Freisetzung von TNF- α , IL-8, IL-1 β und IL-10 ebenfalls signifikant verringert werden. Eine erhöhte Freisetzung nur durch den Antikörper konnte auch hier nicht beobachtet werden.

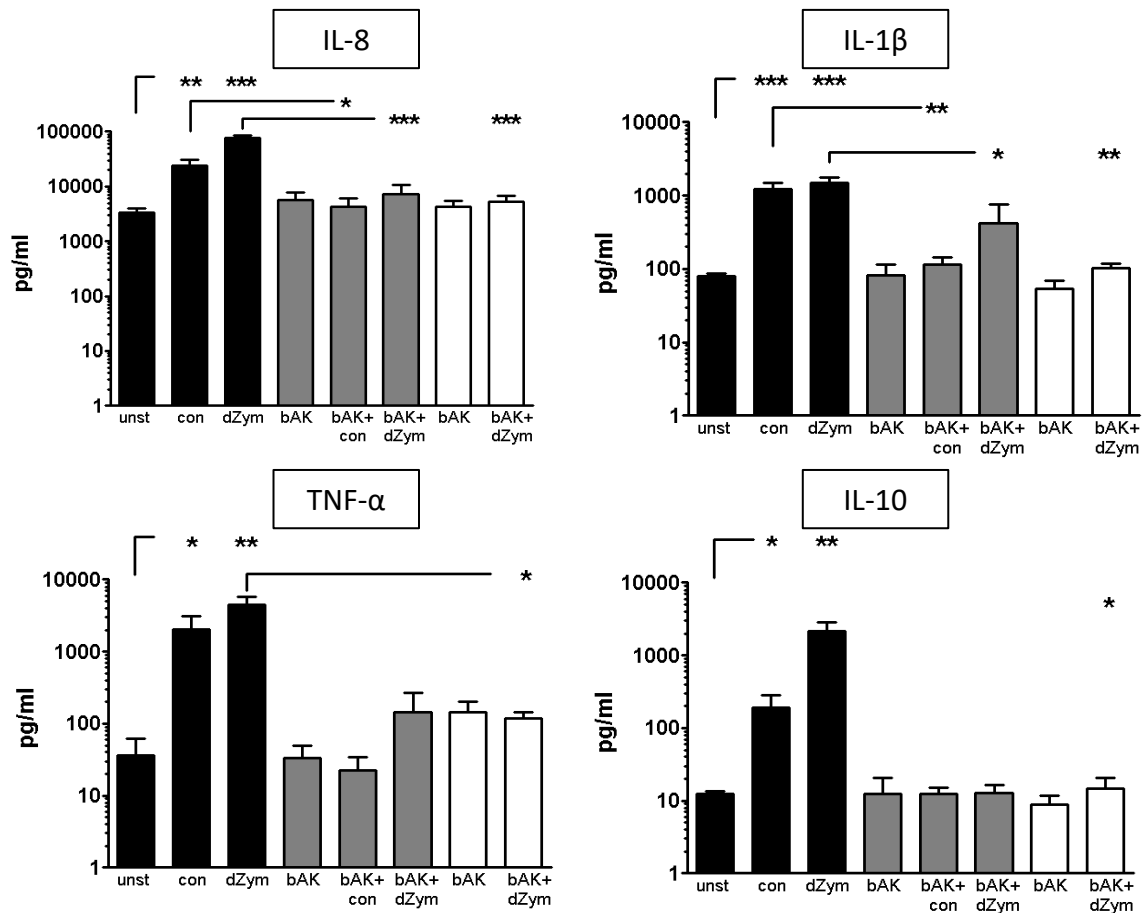


Abb. 25: Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletierem Zymosan (dZym) sekretierten mDCs signifikant mehr pro- und anti-inflammatorische Zytokine. Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 2 verschiedener blockierender Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml) war die Zytokinsekretion deutlich vermindert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Überstände mittels ELISA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.5.3 Phagozytose

Zur Analyse des Phagozytose-Verhaltens von mDCs und die Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade wurden die Zellen für 3 h mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (con) stimuliert und anschließend mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse wurde mit je 3 Spendern durchgeführt um eine signifikante Aussage über das Phagozytose-Verhalten treffen zu können. Im Vergleich zu moDCs phagozytierten mDCs trotz höherer MOI deutlich weniger. Nach 3 h hatten im Durchschnitt 5 Prozent

der mDCs Konidien phagozytiert. Durch Zugabe des ‚grauen‘ CLEC7A blockierenden Antikörpers (bAK, R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml) war die Phagozytose dezent verringert. Hiernach lag der Anteil an mDCs, welche Konidien phagozytierten bei knapp 3 Prozent. Durch Zugabe des ‚weißen‘ blockierenden Antikörpers (bAK, weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml) wurde die Phagozytose-Rate sogar auf fast 9 Prozent gesteigert im Vergleich zum unblockierten Ansatz.

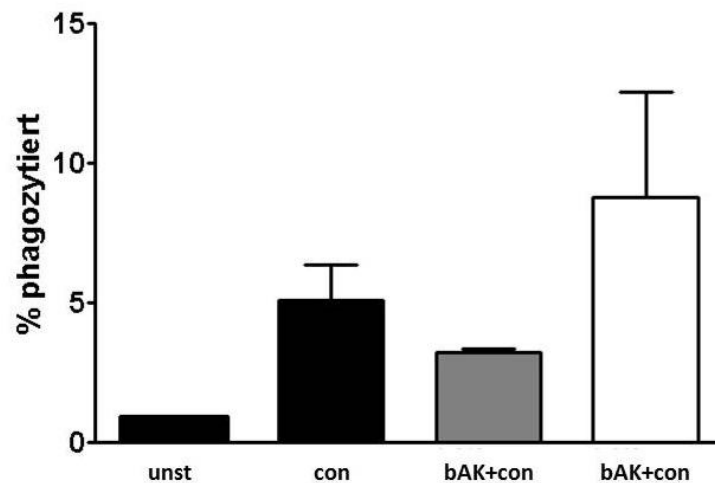


Abb. 26: Phagozytose-Aktivität von mDCs nach Stimulation mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (con) sowie nach Zugabe zweier verschiedener CLEC7A blockierenden Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n = 3, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4 Diskussion

4.1 Die Expression verschiedener C-Typ Lektine auf moDCs und mDCs

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegen Schimmelpilze wie *A. fumigatus* [25]. Nachdem DCs das Antigen erkannt haben, erfolgt die Aufnahme und Migration in nächstgelegene Lymphknoten, um dort T-Lymphozyten Antigen-spezifisch zu stimulieren [27]. Hierbei kommt verschiedenen C-Typ Lektinen eine bedeutende Rolle zu [27, 32]. Für wissenschaftliche Zwecke werden häufig unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (moDCs) verwendet, um *in vitro* Experimente durchzuführen, da sie in größerer Zahl verfügbar sind. Sie werden *in vitro* aus Monozyten, durch die Zugabe von Interleukin-4 und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulations Faktor, über mehrere Tage generiert [40]. Somit handelt es sich bei moDCs um artifizielle Zellen, deren Eigenschaften nicht vollständig auf die *in vivo* vorkommenden myeloiden DCs übertragbar sind, auch wenn sie viele Gemeinsamkeiten aufweisen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher die beiden Zell-Subpopulationen zu vergleichen. Plasmazytoide DCs wurden nicht untersucht, da sie die größten Unterschiede in ihrem Verhalten gegenüber *A. fumigatus* zeigen [65]. CLEC7A ist bislang der prominenteste Vertreter der C-Typ Lektin Rezeptoren (CLECs) im Hinblick auf die Erkennung und Initiierung einer Immunantwort nach Kontakt mit *A. fumigatus* [52]. Daneben gibt es allerdings eine Reihe weiterer CLECs die ebenfalls als Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) fungieren und möglicherweise eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *A. fumigatus* spielen. Hierfür wurden ausgewählte Vertreter dieser Rezeptorfamilie hinsichtlich ihrer Expression und Quantifizierung auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometer und hinsichtlich der Regulation der Transkription mittels rt-PCR, nach Interaktion mit unterschiedlichen *A. fumigatus* Morphologien, untersucht. Dabei wurde mit aktivem Pilz gearbeitet. Aufgrund der steigenden Mortalität wurden daher auch nicht für alle Morphologien alle Zeitpunkte untersucht. Dieser Tatsache könnte man beispielsweise durch Verwendung von inaktiviertem Pilz begegnen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Interaktion zwischen den untersuchten CLECs und ihren in Frage kommenden Liganden durch die Pilzinaktivierung gestört wird, weswegen die Entscheidung gegen eine Inaktivierung getroffen wurde.

CLEC4A ist als inhibitorischer Rezeptor auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, moDCs, mDCs und pDCs bekannt [66]. Bates *et al.* zeigten eine deutliche Expression von CLEC4A auf unreifen moDCs und eine deutliche Herabregulation des Rezeptors im Rahmen einer Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) oder einem CD40-Liganden, sowohl auf der Zelloberfläche, als auch auf mRNA-Ebene [46]. Darüber hinaus wurde CLEC4A auch auf anderen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, einschließlich mDCs, detektiert [48]. Diese Beobachtungen konnten nach Stimulation von moDCs und auch mDCs mit verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien bestätigt werden. Beide Zell-Subpopulationen exprimierten CLEC4A und die Stimulation führte zu einer Herabregulation des Rezeptors. Meyer-Wentrup *et al.* konnten zeigen, dass die Herabregulation von CLEC4A auf moDCs durch Calthrin-vermittelte Internalisation geschieht und zu einer Rezeptor-Translokation in lysosomale Kompartimente führt. Außerdem konnte gezeigt werden dass die Stimulation von CLEC4A über einen Cross-talk mit dem Toll-like Rezeptor TLR8 zu einer signifikant verringerten Freisetzung der Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) α und Interleukin (IL) α 12 führte, wohingegen die Stimulation keinen Effekt auf die TLR8-vermittelte Hochregulation von CD80 und CD86 hatte [48]. Die Frage nach dem Liganden bleibt noch zu klären, genauso wie die Aufklärung des exakten Mechanismus, an welcher Stelle CLEC4A mit der TLR8 Signalkaskade interferiert und welche Funktion der Rezeptor *in vivo* hat. Es gibt Hinweise in CLEC4A-knock-out-Mäusen, dass ein Verlust von CLEC4A mit einer erhöhten Rate an Enthesiopathien, Sialadenitiden und erhöhten Auto-Antikörper-Spiegeln assoziiert ist, was ein Hinweis für eine immunmodulatorische Rolle des Rezeptors sein kann [48, 66].

CLEC6A ist als spezifischer Rezeptor für α -Mannan, einem Zellwandbestandteil von *A. fumigatus*, an dessen Erkennung beteiligt [17, 35]. Loures *et al.* zeigten, dass humane pDCs *A. fumigatus* Hyphen *via* CLEC6A erkennen und diese Interaktion unter anderem eine Freisetzung der Zytokine TNF- α und Interferon- α zur Folge hat [35]. Ursprünglich wurde CLEC6A als Langerhans-Zell spezifischer C-Typ Lektin Rezeptor identifiziert, der über die γ -Kette des Fc-Rezeptors die intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt [67]. In Langerhans-Zellen lässt sich eine starke Expression auf mRNA-Ebene beobachten, wohingegen die Expression in unreifen moDCs deutlich schwächer ist [68].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durchflusszytometrisch auf beiden dendritischen Zell-Subpopulationen keine Expression von CLEC6A auf der Zelloberfläche festgestellt werden. Möglicherweise gelingt der Nachweis mithilfe anderer Methoden [49]. Molekularbiologisch gelang der Nachweis in moDCs, allerdings kam es hier im Unterschied zu Beobachtungen von Kanazawa *et al.* zu einer Herabregulation der Expression nach Stimulation mit *A. fumigatus* [68].

CLEC7A ist als einer der prominentesten Vertreter der C-Typ Lektin Rezeptoren an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt. Er bindet an β -Glukane, einem der Hauptbestandteile der Pilzzellwand [51, 52] und führt über Rezeptor-Internalisation zu einer Maturierung der Immunzellen und zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine [40, 53]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CLEC7A sowohl auf der Zelloberfläche *in vitro* generierter moDCs, als auch auf *in vivo* vorkommenden mDCs exprimiert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach Stimulation mit den unterschiedlichen *A. fumigatus* Morphologien von der Zelloberfläche beider dendritischer Zell-Subpopulationen verschwindet, was vereinbar mit seiner Funktion als Phagozytose-Rezeptor ist [53]. Die Herabregulation von CLEC7A nach Konfrontation mit dem Pilz deutet darauf hin, dass der Rezeptor sowohl auf moDCs, als auch auf mDCs eine Rolle bei der Erkennung von *A. fumigatus* spielt.

In moDCs wurde zusätzlich die Expression von CLEC7A auf mRNA-Ebene untersucht und eine Herabregulation beobachtet. Diese Beobachtung könnte man auf die Tatsache zurückführen, dass eine Stimulation von moDCs mit *A. fumigatus* nicht nur die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, sondern unter anderem auch des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin (IL) -10 triggert [65]. CLEC7A-vermittelt kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von IL-10 [69]. Interleukin-10 besetzt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle und Regulation von Entzündungsreaktionen. Ein Verlust des Interleukins hat überschießende Entzündungsreaktionen zur Folge, was einerseits bei der Eliminierung des Pathogens helfen kann, andererseits aber auch mit einem beträchtlichen Gewebeschaden einhergehen kann [70]. Eine solche regulatorische Eigenschaft des Zytokins wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Herabregulation der mRNA-Expression aller untersuchten CLECs.

CLEC12A wurde von Marshall *et al.* als inhibitorischer C-Typ-Lektin Rezeptor, welcher vorwiegend auf Granulozyten und Monozyten exprimiert ist, entdeckt [59].

Kurz darauf zeigten Chen *et al.*, dass CLEC12A auf der Zelloberfläche von CD14⁺ Monozyten, CD1a⁺ DCs und unreifen DCs exprimiert ist und nach Liganden-Bindung internalisiert wird, ähnlich wie CLEC7A [32]. Die Expression des Rezeptors konnte im Rahmen dieser Arbeit für moDCs mittels FACS-Analyse und rtPCR bestätigt werden. Es konnte weiterhin eine starke Expression, bis zu zehnfach höher als auf moDCs, auf mDCs gezeigt werden, ein weiterer Hinweis auf Unterschiede der Subpopulationen. Auf beiden dendritischen Zell-Subpopulationen kam es nach Stimulation mit dem Pilz *A. fumigatus* zu einem Verschwinden des Rezeptors von der Zelloberfläche, was mit der von Chen *et al.* beschriebenen Internalisation nach Liganden-Bindung vereinbar ist [32]. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls in weiteren Studien gemacht [58]. Andere Untersuchungen konnten für pDCs zeigen, dass Gene, die für CLEC12A codieren, nach Stimulation mit *A. fumigatus* herabreguliert werden [35]. Unsere Ergebnisse zeigen für moDCs ebenfalls eine Herabregulation auf mRNA-Ebene. Weitere Studien zeigten, dass CLEC12A mit TLR-vermittelten Signalkaskaden und der CD40-vermittelten Zellaktivierung interagiert, was vermuten lässt, dass CLEC12A eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellaktivität dendritischer Zellen und Regulation der Immunantwort spielt [32].

Bislang ist **CLEC4E** als Rezeptor zur Erkennung des Cord-Faktors, Trehalose-6,6-Dimycolat, ein Glykolipid der äußeren Zellwandschicht pathogener Mykobakterien [44], sowie an der Erkennung von Glykolipiden in der Zellwand von *Malassezia furfur*, einem opportunistischen Dermatophyten, und von *Candida albicans* bekannt [71, 72]. Außerdem gilt er als Rezeptor für SAP130, welches von nekrotischen Zellen freigesetzt wird und CLEC4E-vermittelt eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat, was einen Hinweis auf seine Rolle *in vivo* als Sensor für geschädigte Zellen sein könnte [60, 61]. Die genaue Rolle von CLEC4E an der Erkennung von *A. fumigatus* bleibt noch zu klären, genauso wie der Ligand. Unsere Ergebnisse geben einen Hinweis auf die Regulation des Rezeptors nach Stimulation mit *A. fumigatus*. Hierbei unterscheiden sich die untersuchten dendritischen Zell-Subpopulationen voneinander. Während es bei moDCs eher zu einer erhöhten Rezeptor-Expression im Zeitverlauf nach Stimulation mit geschwollenen Konidien und Keimschläuchen kam, war die Expression auf mDCs signifikant verringert. Zukünftige Untersuchungen können hier weitere Erkenntnisse hervorbringen.

Zusammenfassend liegen bislang die meisten Daten zu CLEC7A und seiner Rolle in der Immunantwort gegenüber verschiedenen Pathogenen vor. Dennoch könnten zukünftig weitere Untersuchungen der verschiedenen Rezeptoren tiefere Einblicke in die Interaktion zwischen Immunzellen und *A. fumigatus* geben.

4.2 Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Maturierung

Wie bereits beschrieben ist CLEC7A ein essentieller Rezeptor auf dendritischen Zellen für die Erkennung von *A. fumigatus* und Initiierung einer Immunantwort [51, 52]. Dendritische Zellen nehmen hierbei eine wichtige Rolle ein, indem sie in der Lage sind beide Arme des Immunsystems, das angeborene und das erworbene Immunsystem, zu aktivieren [22, 25]. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen nehmen sie das Antigen auf, dabei maturieren die DCs und migrieren in nächstgelegene lymphatische Organe um dort naive T-Lymphozyten Antigen-spezifisch zu stimulieren [26, 27]. Die Maturierung wird unter anderem von einer Expressionsänderung verschiedener ko-stimulatorischer Moleküle begleitet. Dabei kommt es zu einer Hochregulation von Oberflächenmolekülen zur T-Zell Ko-Stimulation wie CD80, CD83, CD86, von Oberflächenmolekülen zur Antigenpräsentation wie HLA-ABC, HLA-DR und des Homing-Rezeptors für die Migration zu Lymphknoten CCR7 [27, 31]. Ein erster Schritt in der DC/T-Zell Interaktion besteht in der Erkennung dendritischer MHC-Moleküle durch Antigen-spezifische T-Zellen. Der entscheidende Schritt um die T-Zell-Aktivierung aufrecht zu erhalten ist schließlich die Interaktion zwischen den exprimierten ko-stimulatorischen Molekülen und den entsprechenden T-Zell-Liganden. Hier ist besonders CD86 zu nennen, als eines der wichtigsten Moleküle [22]. Dendritische Zellen können wiederum via CD40 von T-Zellen aktiviert werden, was zu einer Hochregulation von CD80 und CD86 und zu einer gesteigerten Zytokinfreisetzung führt [22].

Darüber hinaus aktivieren DCs auch Bestandteile des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen. Diese proliferieren daraufhin, produzieren Interferon- γ und erlangen zytolytische Eigenschaften [26].

Kenntnisse über die Rolle von DCs an der Immunantwort gegen *A. fumigatus* wurden größtenteils aus Experimenten mit *in vitro* generierten moDCs gewonnen. Es ist jedoch

zu beachten, dass moDCs nicht zwangsläufig dasselbe biologische Verhalten zeigen oder dieselben Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) besitzen, verglichen mit *in vivo* vorkommenden mDCs. Lothar *et al.* zeigten beispielsweise dass mDCs deutlich weniger Konidien phagozytieren als moDCs und eine deutliche erhöhte Expression von Klasse I und Klasse II MHC Molekülen zeigen [65]. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

Vorherige Arbeiten zeigten bereits, dass moDCs bei Kontakt mit *A. fumigatus* mit einer Hochregulation ihrer Maturierungsmarker reagieren. Nach Stimulation von moDCs mit inaktivierten Hyphen, konnten Braedel *et al.* eine Expressionserhöhung von CD80, CD83, CD86, CD40 und HLA-DR beobachten [73]. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in anderen Studien gemacht [65]. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch mDCs bei Kontakt mit *A. fumigatus* maturieren und es zur Hochregulation der oben beschriebenen Maturierungsmarker, sowie von TLR2, TLR4 und CLEC7A kommt [65]. pDCs zeigten dieses Verhalten nicht, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die unterschiedlichen Subtypen dendritischer Zellen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Im Unterschied dazu, beobachteten Joo *et al.* eine Aktivierung von pDCs mit konsekutiver Hochregulation von CD80, CD83, CD86, CD40 und HLA-DR nach Stimulation von CLEC7A. Die Stimulation erfolgte allerdings mittels synthetisch hergestellten CLEC7A Liganden, wie R848 oder CpG-B [74]. Dabei ist zu bedenken, dass die Zusammensetzung der Pilzzellwand, abhängig von der Morphologie, variiert [17]. Weiterhin zeigten Joo *et al.* eine gegensätzliche Rolle von CLEC7A auf pDCs und mDCs. Während die Aktivierung von pDCs zu einer bei Pilzinfektionen eher ungünstigen Th2-dominierenden Immunantwort führte, kam es nach Aktivierung von CLEC7A auf mDCs vielmehr zu einer verminderten Th2-Immunantwort [74]. Andere Arbeiten konnten zeigen dass *A. fumigatus* Hyphen von pDCs vor allem über CLEC6A erkannt werden [35]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Stimulation von CLEC7A zu einer Aktivierung von moDCs und mDCs und konsekutiv zu einer Hochregulation der beschriebenen Maturierungsmarker führt und in wie weit sich die verschiedenen Morphologien von *A. fumigatus* dabei unterscheiden, wie bereits in vorherigen Studien für moDCs gezeigt [75]. Weiterhin wurden die Auswirkungen einer Blockade von CLEC7A auf beiden Subpopulationen untersucht. Dabei konnte für mDCs erstmalig gezeigt werden, dass die

Maturierung durch eine Rezeptorblockade und eine darauffolgende Stimulation mittels *A. fumigatus* oder depletiertem Zymosan signifikant reduziert war [76].

4.3 Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Zytokinfreisetzung

Diese Arbeit bestätigt, dass moDCs mit unterschiedlichen Morphotypen von *A. fumigatus* mittels CLEC7A interagieren und zeigt weiterhin, dass dies auch für *in vivo* vorkommende mDCs gilt [76]. Bei Stimulation von mDCs mit Konidien, geschwollenen Konidien oder Keimschläuchen lässt sich eine Herabregulation von CLEC7A auf der Zelloberfläche beobachten. Dies weist darauf hin, dass mDCs unterschiedliche *A. fumigatus* Morphotypen mittels des Rezeptors erkennen.

Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich eine Blockade von CLEC7A auf die beiden dendritischen Zell-Subpopulationen auswirkt.

Die Rezeptorblockade führte bei moDCs und mDCs zu einer verminderten Maturierung, wie unter 4.2 beschrieben. Zudem kam es zu einer signifikant verringerten Zytokinfreisetzung. Mezger *et al.* identifizierten CLEC7A bereits als wichtigen Rezeptor auf moDCs und zeigten seine Beteiligung in der Induktion einer pro-inflammatorischen Zytokinfreisetzung. Ein Knock-out von CLEC7A mittels RNAi führte zu einer signifikant reduzierten Zytokinfreisetzung [40]. Auskeimende Konidien aktivieren mindestens zwei zelluläre Signalwege. Während β -1,3-Glukan über CLEC7A eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, führt die Auskeimung von Konidien auch noch zur TLR2- und TLR4-vermittelten Aktivierung von DCs [73, 77]. Die äußere Zellwand von Pilzen besteht aus N- und O-glykosidisch gebundener Mannose die TLR4 aktiviert, wohingegen β -1,3-Glukan in inneren Zellwandschichten CLEC7A aktiviert [78, 79]. Um TLR-vermittelten Effekte auszuschließen wurden die DCs in Positivkontrollen nach CLEC7A Blockade mit depletiertem Zymosan stimuliert. Zymosan wird aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt und besteht vorwiegend aus β -1,3-Glukan. Durch weitere Verarbeitungen entsteht depletiertes Zymosan, ein spezifischer CLEC7A-Ligand ohne die Fähigkeit an Toll-like Rezeptoren zu binden [55].

Die Stimulation naiver T-Zellen und NK-Zellen durch aktivierte dendritische Zellen erfolgt zum einen direkt über Zell-Zell-Kontakte, als auch Zytokin-vermittelt [26].

Hierbei kommt es zur Freisetzung großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α oder IL-1 β , aber auch von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise IL-10 [80]. Lothar *et al.* zeigten, dass eine Stimulation von moDCs und mDCs mit *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen zu einer erhöhten Freisetzung von IL-8, IL-1 β , TNF- α und IL-10 führt [65]. Das konnte im Rahmen dieser Arbeit für beide dendritischen Zell-Subpopulationen ebenfalls gezeigt werden.

Die Sekretion von Interleukin (IL) -1 β , einem pro-inflammatorischen Zytokin, geschieht CLEC7A-vermittelt. Über die Aktivierung der intrazellulären Signalwege mittels der Adaptorproteine Syk und Card9 kommt es zur Freisetzung von IL-1 β [81]. Interleukin-1 β ist bekannt für seine Schlüsselrolle in der Differenzierung von T-Helfer-Zellen [63]. Es fördert die Proliferation von IL-17 produzierenden T-Helfer-Zellen (Th17-Helferzellen), welche neben der Th1-Helferzellen-vermittelten Immunantwort eine essentielle und schützende Rolle bei Pilzinfektionen spielen [82]. Eine beeinträchtigte Produktion von Interleukin-17 erhöht die Suszeptibilität für beispielsweise durch *A. fumigatus* hervorgerufene Pneumonien. Neben Interleukin-1 β spielt dabei Interleukin-23, welches überwiegend CLEC7A vermittelt von dendritischen Zellen sekretiert wird, eine wichtige Rolle [83].

Interleukin (IL) -10 ist als anti-inflammatorisches Zytokin bekannt und wird neben dendritischen Zellen von einer Vielzahl von Immunzellen produziert. Es trägt wesentlich dazu bei während einer Infektion überschießende, Organismus schädigende Reaktionen zu kontrollieren und zu verhindern [69]. Auch wenn es paradox erscheint, dass nach Konfrontation mit *A. fumigatus* die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht wird, konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass dies mit einem Vorteil für den Organismus einhergeht [84]. Während es zu Beginn einer Pilzinfektion eher zu einer Beeinträchtigung von Phagozytose, Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Zell-vermittelter Immunität kommt, können sich hohe IL-10-Konzentrationen im Verlauf der Infektion durchaus günstig auswirken [85]. Außerdem kann es potentiell zur Entwicklung von regulatorischen T-Zellen beitragen und dadurch schädliche Immunreaktionen verhindern und langfristig die Immunität fördern [54].

Der Tumornekrosefaktor (TNF) - α wird als pro-inflammatorisches Zytokin unter anderem von dendritischen Zellen produziert und nach Ligandenbindung an CLEC7A

freigesetzt. Es führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen [54]. Die Feststellung, dass es unter einer Therapie mit TNF- α -Blockern zu Pilzpneumonien kommen kann, unterstreicht die grundlegende Bedeutung des pro-inflammatorischen Zytokins in der Infekt-Kontrolle [85]. Schon frühere Arbeiten konnten protektive Effekte von TNF- α gegen die Invasive Aspergillose im Tierexperiment zeigen [86]. Weitere Beobachtungen weisen ebenfalls auf die bedeutende Rolle von TNF- α für die Immunabwehr hin. Neben Interleukin-1 erfolgt die Sekretion von TNF- α bereits in sehr frühen Stadien einer Infektion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Mausmodell der Widerstand gegen Pilzinfektionen durch Vorbehandlung mit TNF- α gesteigert werden kann [87].

Interleukin (IL) -8 wird von verschiedenen Immunzellen während einer Infektion freigesetzt und aktiviert besonders neutrophile Granulozyten. Es induziert unter anderem eine Chemotaxis und führt zur Akkumulation von Neutrophilen am Ort der Entzündung [88]. Die Expression von IL-8 wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Während Lipopolysaccharide, IL-1 β und TNF- α zu einer verstärkten IL-8-Produktion führen, hemmt IL-10 dessen Synthese [89]. Richardsson *et al.* haben Auswirkungen von IL-8 auf das Phagozytose-Verhalten von *A. fumigatus* Konidien neutrophiler Granulozyten untersucht. Sie beobachteten eine gesteigerte Phagozytose-Rate sowie einen signifikanten Anstieg der Absolutzahl phagozytierter Konidien nach Inkubation der Immunzellen mit IL-8 [90].

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Rolle von CLEC7A an der Initiierung einer sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinantwort nach Kontakt mit *A. fumigatus*. Eine Rezeptorblockade von CLEC7A führte sowohl bei moDCs und mDCs zu einer signifikant verringerten Zytokinfreisetzung. Diese Beobachtungen entsprechen früheren Studien mit moDCs [40] und weisen auf die immunmodulatorische Rolle von CLEC7A in beiden dendritischen Zell-Subpopulationen hin.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die bislang relativ gut untersuchte Rolle von CLEC7A in moDCs bestätigt werden und eine Beteiligung des Rezeptors an der Erkennung von *A. fumigatus* und Initiierung einer Immunantwort gezeigt werden. Die Rolle der darüber hinaus untersuchten C-Typ Lektin Rezeptoren bleibt vorerst ungeklärt und könnte ein interessanter Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CLEC7A von mDCs exprimiert wird, an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt ist und zur immunmodulatorischen Rolle der Immunzellen beiträgt.

Die Relevanz dieser Erkenntnis liegt darin, dass mDCs, im Gegensatz zu moDCs, primäre, *in vivo* vorkommende Antigen-präsentierende Zellen sind und sie direkt mit T-Zellen interagieren und diese Antigen-spezifisch stimulieren können, um eine wirksame Immunantwort auszulösen. Weiterhin dirigieren mDCs das angeborene Immunsystem durch die Freisetzung von diversen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-8, IL-10 und TNF α . Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind von Bedeutung für weitere Untersuchungen, mit dem Vorhaben dendritische Zellen für die Entwicklung einer Immuntherapie zur Behandlung der Invasiven Aspergillose zu Hilfe zu nehmen. Aufgrund ihrer Fähigkeiten T-Zell Funktionen zu regulieren und zu verstärken, sind sowohl Toll-Like-Rezeptor-Agonisten, wie auch β -Glukane, interessante Adjuvantien für eine Impfung auf Basis dendritischer Zellen [91].

Es bedarf weiterer Untersuchungen, insbesondere funktionaler Analysen von intrazellulären Signalwegen um ein besseres Verständnis der Pathogenese von *A. fumigatus* Infektionen zu erlangen. Die Übertragung in ein Tiermodell und die gezielte Ausschaltung von C-Typ Lektin Rezeptor Genen könnte ein Ausblick auf zukünftige Forschungsprojekte sein.

4.4 Auswirkungen einer CLEC7A-Blockade auf die Phagozytose

Die Phagozytose ist ein wichtiger Mechanismus des angeborenen Immunsystems. Sie erleichtert die Beseitigung und Abtötung des Pathogens und kurbelt das adaptive Immunsystem an [92]. CLEC7A ist als Phagozytose-Rezeptor auf diversen Immunzellen bekannt. Ausgelöst durch die Bindung des Liganden β -Glukan an den Rezeptor kommt es hierbei zu einer Reorganisation der Membranproteine und zur Formation sogenannter ‚phagozytärer Synapsen‘ [53]. In dendritischen Zellen wird die Phagozytose über die intrazelluläre Immuntirosin-Aktivierungs-Domäne von CLEC7A und das Adaptorprotein Syk induziert [93].

Lothar *et al.* konnten bereits zeigen, dass zwischen den Subtypen dendritischer Zellen durchaus Unterschiede im Phagozytose-Verhalten bestehen. Myeloide dendritische

Zellen (mDCs) phagozytierten deutlich weniger GFP-exprimierende *A. fumigatus* Konidien als Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (moDCs) [65]. Das konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden. Während nach 3 Stunden circa 20 Prozent der moDCs Konidien phagozytiert hatten, waren es bei mDCs nur circa 5 Prozent. Die starke künstliche Stimulation der moDCs während ihrer Generierung *in vitro* liefert hierfür einen möglichen Erklärungsansatz.

Durch Zugabe des blockierenden Antikörpers vor Stimulation mit GFP-exprimierenden Konidien wurde die Phagozytose in moDCs signifikant inhibiert. In mDCs ließ sich lediglich ein geringer Effekt beobachten, der als nicht aussagekräftig betrachtet werden kann. Dennoch unterstreichen diese Beobachtungen erneut die Tatsache, dass die beiden Subtypen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können und durchaus Unterschiede bestehen. Weiterhin bestätigen sie die Rolle von CLEC7A als Phagozytose-Rezeptor auf dendritischen Zellen.

5 Zusammenfassung

Pilzinfektionen zählen zu den häufigsten Infektionen beim Menschen. Sie verlaufen in den meisten Fällen unkompliziert und stellen keine vitale Bedrohung für den Betroffenen dar. Invasive Mykosen hingegen verlaufen oft tödlich und sind eine große Herausforderung für die moderne Medizin, da eine frühe Diagnose schwierig ist und die therapeutischen Möglichkeiten limitiert sind.

Die Invasive Aspergillose (IA) zählt mit geschätzt über 200.000 Infektionen pro Jahr weltweit zu einer der häufigsten Invasiven Mykosen. Die bekanntesten Risikofaktoren für die Entstehung einer IA sind die Neutropenie, Organtransplantationen, hämatopoetische Stammzelltransplantationen und Erkrankungen, die mit einer Kompromittierung des Immunsystems einhergehen. Erreger der Invasiven Aspergillose ist in nahezu 90 Prozent *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz. Seine Verbreitung erfolgt aerogen durch Sporen, sogenannte Konidien, die aufgrund ihres geringen Durchmessers problemlos über die Atemwege in die Lunge gelangen können.

Dendritische Zellen spielen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegen *A. fumigatus*. Sie sind ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und sind mit einer Vielzahl von Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) zur Pathogen-Erkennung ausgestattet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion ausgewählter C-Typ Lektin (CLEC) Rezeptoren auf Subtypen dendritischer Zellen (DCs) mit verschiedenen *A. fumigatus* Morphologien untersucht. Es wurde mit *in vitro* generierten Monozyten-abgeleiteten (moDCs) und *in vivo* vorkommenden myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) gearbeitet und die Expression von CLEC4A, CLEC6A, CLEC7A, CLEC12A und CLEC4E und eine mögliche Regulation der Rezeptoren nach Stimulation mit Konidien, geschwollenen Konidien oder Keimschläuchen untersucht. Hierbei wurde bei beiden Subtypen eine Herabregulation von CLEC4A, CLEC7A und CLEC12A beobachtet. Dies ist vereinbar mit der Tatsache, dass C-Typ Lektin Rezeptoren nicht nur eine Rolle bei der Pathogen-Erkennung spielen, sondern auch als Phagozytose-Rezeptoren fungieren. Auf molekularbiologischer Ebene wurde in Analysen von moDCs ebenfalls

eine Reduktion der relativen mRNA-Expression von *CLEC4A*, *CLEC6A*, *CLEC7A* und *CLEC12A* beobachtet.

Weiterhin wurden die Auswirkungen einer Rezeptorblockade von *CLEC7A* mittels blockierender Antikörper auf das Maturierungsverhalten und Zytokinprofil beider Subtypen analysiert. Hier konnte durch die Zugabe eines *CLEC7A* blockierenden Antikörpers vor Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien oder depletiertem Zymosan die Maturierung effektiv inhibiert werden. Die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-8 und -1 β , als auch des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 war durch die Rezeptorblockade ebenfalls signifikant vermindert.

Diese Erkenntnisse stützen die bislang relativ gut untersuchte Rolle von *CLEC7A* auf Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen als spezifischen Rezeptor für *A. fumigatus*. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *CLEC7A* ebenfalls auf mDCs an der Erkennung von *A. fumigatus* und Initiierung einer Immunantwort beteiligt ist. Diese Tatsache ist von Bedeutung, da die beiden Subtypen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können und die Relevanz von *in vivo* vorkommen myeloiden dendritischen Zellen an einer Immunantwort gegen *A. fumigatus* bislang noch viele Fragen offen lässt.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, insbesondere funktionaler Analysen von intrazellulären Signalwegen um ein besseres Verständnis zu erlangen. Die Übertragung in ein Tiermodell und die gezielte Ausschaltung von C-Typ Lektin Rezeptor Genen könnte ein Ausblick auf zukünftige Forschungsprojekte sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
Bcl10	B-Zell CLL 10 Protein
Card9	engl. caspase recruitment domain family member 9
CLEC	C-Typ Lectin
CLR	C-Type Lectin-like Rezeptor
CRD	engl. carbohydrate recognition domain
DC	engl. dendritic cell
DCIR	engl. dendritic cell immunoreceptor
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FSC	engl. forward-scatter
GAG	Galaktosaminogalaktan
GM-CSF	engl. granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HRP	engl. horseradish peroxidase
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IA	Invasive Aspergillose
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	engl. immunoreceptor tyrosin-based activation motif
ITIM	engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
MACS	engl. magnetic activated cell sorting
Malt1	engl. mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MFI	engl. mean fluorescence intensity
MHC	engl. major histocompatibility complex
MICL	engl. myeloid inhibitory C-Type-like lectine

Mincle	engl. macrophage-inducible C-type lectin
MOI	engl. multiplicity of infection
NF	engl. nuclear factor
NOD	engl. nucleotide-oligomerisation domain
PAMP	engl. pathogen-associated molecular patterns
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
PKC δ 9	Protein Kinase δ 9
PMN	Polymorphnukleärer neutrophiler Leukozyt
PRR	engl. pattern recognition receptor
RIG	engl. retinoic acid-inducible gene-1
ROS	engl. reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SAP130	engl. SIN3A-associated protein
SSC	engl. side-scatter
Syk	engl. spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TDM	Trehalose-6'-Dimykolat
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Computertomographie der Lunge mit milchglasartigen Trübungen um noduläre Verdichtungen als charakteristische Frühform der Invasiven Aspergillose (IA) [9]..... 3
- Abb. 2:** Infektionsweg von *A. fumigatus*. Konidien werden eingeatmet und führen bei immunkompromittierten Patienten entweder zu einer Granulozytenvermittelten Kontrolle des Pilzes (Steroid-induzierte Immunsuppression), die jedoch mit einer schweren Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung einhergeht oder bei Neutropenie zu einem exzessiven Hyphenwachstum und Dissemination (Neutropenie). PMN = Polymorphnukleärer neutrophiler Leukozyt [5]..... 5
- Abb. 3:** CLEC7A-vermittelte Effekte nach Ligandenbindung. CLEC7A bindet β -Glukane und induziert Syc und Card9 vermittelt unterschiedliche zelluläre Immunantworten (entnommen aus Dostert und Tschopp, 2007) [57]..... 11
- Abb. 4:** Konzentrationsreihe zur Ermittlung der nötigen Zielkonzentration des CLEC7A blockierenden Antikörpers (R&D Systems, Klon #259931) für moDCs am Beispiel des Reifemarkers CD86. Dargestellt sind die Konzentrationen $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$), $c = 3 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$) und $c = 9 \mu\text{g/ml}$ ($n = 1$). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ 22
- Abb. 5:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12 und 24 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$ 35
- Abb. 6:** Darstellung der Expression von CLEC6A mittels eines exemplarischen Spenders. Es konnte keine Expression von CLEC6A im Zeitverlauf beobachtet werden. 36
- Abb. 7:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC6A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12 und 24 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ns = nicht signifikant..... 36
- Abb. 8:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC7A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 8$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. *** $p < 0,001$ 37
- Abb. 9:** Darstellung der Expression von CLEC7A auf moDCs mittels eines exemplarischen Spenders. Es lässt sich deutlich die Expression und das

- Verschwinden von CLEC7A von der Zelloberfläche nach Stimulation mit *A.fumigatus* beobachten..... 38
- Abb. 10:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC12A auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 3, 6, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. n = 3. Mittelwerte ± Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ 38
- Abb. 11:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4E auf moDCs nach Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 3, 6, 12, 24 und 36 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. n = 3. Mittelwerte ± Standardabweichung. ns = nicht signifikant. 39
- Abb. 12:** Relative mRNA-Expression von CLEC4A in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten moDCs (unst). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n = 3. 41
- Abb. 13:** Relative mRNA-Expression von CLEC6A in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs.* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n = 3. 42
- Abb. 14:** Relative mRNA-Expression von CLEC7A in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n = 3. 43
- Abb. 15:** Relative mRNA-Expression von CLEC12A in moDCs nach 3, 6 und 12 h Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs. * $p < 0,05$; n = 3..... 44
- Abb. 16:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. n = 5. Mittelwerte ± Standardabweichung. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$ 46
- Abb. 17:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC6A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. n = 4. Mittelwerte ± Standardabweichung. ns = nicht signifikant. 47
- Abb. 18:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC7A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-

- Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 48
- Abb. 19:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC12A auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3, 6 und 12 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 5$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant. 49
- Abb. 20:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CLEC4E auf mDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), geschwollenen Konidien (swollen conidia; sc) und Keimschläuchen (germ tubes; gt) für 1, 3 und 6 h. Als Negativ-Kontrolle diente ein unstimulierter (unst) Ansatz. $n = 3$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. 50
- Abb. 21:** moDCs maturierten nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletiertem Zymosan (dZym). Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 3 $\mu\text{g/ml}$ blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931) wurde die Maturierung effektiv inhibiert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Reifemarker mittels Durchflusszytometer (Mittlere Fluoreszenzintensität; MFI). Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung..... 52
- Abb. 22:** Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletiertem Zymosan (dZym) sekretierten moDCs signifikant mehr pro-inflammatorische Zytokine IL-8, IL-1 β und TNF- α . Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 3 $\mu\text{g/ml}$ blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931) wurde die Zytokinsekretion deutlich vermindert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Überstände mittels ELISA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung. 54
- Abb. 23:** Phagozytose-Aktivität von moDCs nach Stimulation mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (con) und Keimschläuchen (gt; germ tubes) sowie nach Zugabe von 3 $\mu\text{g/ml}$ des CLEC7A blockierenden Antikörpers (bAK) (R&D Systems, Klon #259931). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung..... 55
- Abb. 24:** mDCs maturierten nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und depletiertem Zymosan (dZym). Durch die Blockierung von CLEC7A mittels blockierender Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, $c = 3 \mu\text{g/ml}$ / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, $c = 10 \mu\text{g/ml}$) wird die Maturierung einiger Reifemarker effektiv inhibiert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Reifemarker mittels Durchflusszytometer (Mittlere Fluoreszenzintensität; MFI). Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung. 57

Abb. 25: Nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> Konidien (con) und depletiertem Zymosan (dZym) sekretierten mDCs signifikant mehr pro- und anti-inflammatorische Zytokine. Durch die Blockierung von CLEC7A mittels 2 verschiedener blockierender Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml) war die Zytokinsekretion deutlich vermindert. Die Stimulation erfolgte für 18 h und die Analyse der Überstände mittels ELISA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein unstimulierter Ansatz (unst) mitgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	59
Abb. 26: Phagozytose-Aktivität von mDCs nach Stimulation mit GFP-exprimierenden <i>A. fumigatus</i> Konidien (con) sowie nach Zugabe zweier verschiedener CLEC7A blockierender Antikörper (bAK) (grau = R&D Systems, Klon #259931, c = 3 µg/ml / weiß = InvivoGen, Klon #22H8, c = 10 µg/ml). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung.	60
Tab. 1: Liste der verwendeten blockierenden Antikörper	23
Tab. 2: Liste der verwendeten Fluoreszenz-Antikörper und die dazugehörigen Isotyp-Kontrollen für die durchflusszytometrischen Analysen.	26
Tab. 3: Reaktionsreagenzien zur cDNA Synthese	28
Tab. 4: Reaktionsreagenzien für die qPCR.....	30
Tab. 5: Für die qPCR verwendete Primer.	30
Tab. 6: Selbst designte Primer mit NK-Nummer, Sequenz und Programm. fw = forward, rv = reverse.	30
Tab. 7: qPCR Zyklen mit Schmelzkurvenanalyse.....	31

8 Literaturverzeichnis

1. **Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G. und White, T.C.** Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 2012. 4(165): 165rv113.
2. **Havlickova, B., Czaika, V.A. und Friedrich, M.** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 2008. 51 Suppl 4: 2-15.
3. **Latge, J.P.** Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 1999. 12(2): 310-350.
4. **Bodey, G.P. und Vartivarian, S.** Aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1989. 8(5): 413-437.
5. **Dagenais, T.R. und Keller, N.P.** Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 2009. 22(3): 447-465.
6. **Segal, B.H.** Aspergillosis. *N Engl J Med*, 2009. 360(18): 1870-1884.
7. **Brown, G.D., Denning, D.W. und Levitz, S.M.** Tackling human fungal infections. *Science*, 2012. 336(6082): 647.
8. **Garcia-Vidal, C., Royo-Cebrecos, C., Peghin, M., Moreno, A., Ruiz-Camps, I., Cervera, C., Belmonte, J., Gudiol, C., Labori, M., Rosello, E., de la Bellacasa, J.P., Ayats, J. und Carratala, J.** Environmental variables associated with an increased risk of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, 2014. 20(11): O939-945.
9. **Zmeili, O.S. und Soubani, A.O.** Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*, 2007. 100(6): 317-334.
10. **Gerson, S.L., Talbot, G.H., Hurwitz, S., Strom, B.L., Lusk, E.J. und Cassileth, P.A.** Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*, 1984. 100(3): 345-351.
11. **Balloy, V., Huerre, M., Latge, J.P. und Chignard, M.** Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*, 2005. 73(1): 494-503.
12. **Lin, S.J., Schranz, J. und Teutsch, S.M.** Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*, 2001. 32(3): 358-366.
13. **Denning, D.W.** Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*, 2000. 355(9202): 423-424.

14. **Maertens, J., Verhaegen, J., Demuynek, H., Brock, P., Verhoef, G., Vandenberghe, P., Van Eldere, J., Verbist, L. und Boogaerts, M.** Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(10): 3223-3228.
15. **Einsele, H. und Loeffler, J.** Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect*, 2008. 14 Suppl 4: 37-45.
16. **White, P.L., Barnes, R.A., Springer, J., Klingspor, L., Cuenca-Estrella, M., Morton, C.O., Lagrou, K., Bretagne, S., Melchers, W.J., Mengoli, C., Donnelly, J.P., Heinz, W.J., Loeffler, J. und Eapcri.** Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol*, 2015. 53(9): 2832-2837.
17. **Latge, J.P. und Beauvais, A.** Functional duality of the cell wall. *Curr Opin Microbiol*, 2014. 20: 111-117.
18. **Carrion Sde, J., Leal, S.M., Jr., Ghannoum, M.A., Amanianda, V., Latge, J.P. und Pearlman, E.** The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. *J Immunol*, 2013. 191(5): 2581-2588.
19. **Latge, J.P.** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*, 2001. 9(8): 382-389.
20. **Schaffner, A., Douglas, H. und Braude, A.** Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*, 1982. 69(3): 617-631.
21. **Tomee, J.F. und van der Werf, T.S.** Pulmonary aspergillosis. *Neth J Med*, 2001. 59(5): 244-258.
22. **Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. und Palucka, K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: 767-811.
23. **Plato, A., Willment, J.A. und Brown, G.D.** C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol*, 2013. 32(2): 134-156.
24. **Shoham, S. und Levitz, S.M.** The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*, 2005. 129(5): 569-582.
25. **Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P. und Romani, L.** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus*

- fumigatus from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol*, 2002. 168(3): 1362-1371.
26. **Reschner, A., Hubert, P., Delvenne, P., Boniver, J. und Jacobs, N.** Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol*, 2008. 152(2): 219-226.
 27. **Banchereau, J. und Steinman, R.M.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392(6673): 245-252.
 28. **Chai, L.Y., Vonk, A.G., Kullberg, B.J. und Netea, M.G.** Immune response to *Aspergillus fumigatus* in compromised hosts: from bedside to bench. *Future Microbiol*, 2011. 6(1): 73-83.
 29. **Brakhage, A.A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P.F. und Behnsen, J.** Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol*, 2010. 13(4): 409-415.
 30. **Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A.A., Kaveri, S.V., Romani, L. und Latge, J.P.** Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 2009. 460(7259): 1117-1121.
 31. **Burns, S. und Thrasher, A.J.** Dendritic cells: the bare bones of immunity. *Curr Biol*, 2004. 14(22): R965-967.
 32. **Chen, C.H., Floyd, H., Olson, N.E., Magaletti, D., Li, C., Draves, K. und Clark, E.A.** Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*, 2006. 107(4): 1459-1467.
 33. **Collin, M., McGovern, N. und Haniffa, M.** Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013. 140(1): 22-30.
 34. **Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W. und Schmitz, J.** BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2000. 165(11): 6037-6046.
 35. **Loures, F.V., Rohm, M., Lee, C.K., Santos, E., Wang, J.P., Specht, C.A., Calich, V.L., Urban, C.F. und Levitz, S.M.** Recognition of *Aspergillus fumigatus* Hyphae by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Mediated by Dectin-2 and Results in Formation of Extracellular Traps. *PLoS Pathog*, 2015. 11(2): e1004643.
 36. **Ramirez-Ortiz, Z.G., Lee, C.K., Wang, J.P., Boon, L., Specht, C.A. und Levitz, S.M.** A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Cell Host Microbe*, 2011. 9(5): 415-424.

37. **van der Aar, A.M., Sylva-Steenland, R.M., Bos, J.D., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C. und Teunissen, M.B.** Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol*, 2007. 178(4): 1986-1990.
38. **Kadowaki, N.** Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int*, 2007. 56(3): 193-199.
39. **Chai, L.Y., van de Veerdonk, F., Marijnissen, R.J., Cheng, S.C., Khoo, A.L., Hectors, M., Lagrou, K., Vonk, A.G., Maertens, J., Joosten, L.A., Kullberg, B.J. und Netea, M.G.** Anti-Aspergillus human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology*, 2010. 130(1): 46-54.
40. **Mezger, M., Kneitz, S., Wozniok, I., Kurzai, O., Einsele, H. und Loeffler, J.** Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis*, 2008. 197(6): 924-931.
41. **Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. und Schuler, G.** Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, 1996. 196(2): 137-151.
42. **Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F. und Liu, Y.J.** Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, 2001. 194(6): 863-869.
43. **Hardison, S.E. und Brown, G.D.** C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*, 2012. 13(9): 817-822.
44. **Furukawa, A., Kamishikiryo, J., Mori, D., Toyonaga, K., Okabe, Y., Toji, A., Kanda, R., Miyake, Y., Ose, T., Yamasaki, S. und Maenaka, K.** Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(43): 17438-17443.
45. **Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A. und van Kooyk, Y.** Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: 33-54.
46. **Bates, E.E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J.J., Zurawski, S.M., Patel, S., Abrams, J.S., Lebecque, S., Garrone, P. und Saeland, S.** APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol*, 1999. 163(4): 1973-1983.
47. **Richard, M., Thibault, N., Veilleux, P., Breton, R. und Beaulieu, A.D.** The ITIM-bearing CLECSF6 (DCIR) is down-modulated in neutrophils by

- neutrophil activating agents. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 310(3): 767-773.
48. **Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M.W., de Vries, I.J., Figdor, C.G. und Adema, G.J.** DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol*, 2009. 85(3): 518-525.
 49. **Kanazawa, N., Tashiro, K. und Miyachi, Y.** Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology*, 2004. 209(1-2): 179-190.
 50. **Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D., Jr. und Ariizumi, K.** Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*, 2006. 281(50): 38854-38866.
 51. **Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S. und Gordon, S.** Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 2003. 197(9): 1119-1124.
 52. **Brown, G.D. und Gordon, S.** Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 2001. 413(6851): 36-37.
 53. **Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S., Magee, A.S., Danielson, M.E., Weiss, A., Vasilakos, J.P. und Underhill, D.M.** Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*, 2011. 472(7344): 471-475.
 54. **Brown, G.D.** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(1): 33-43.
 55. **Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S. und Underhill, D.M.** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 2003. 197(9): 1107-1117.
 56. **Rizzetto, L., De Filippo, C., Rivero, D., Riccadonna, S., Beltrame, L. und Cavalieri, D.** Systems biology of host-mycobiota interactions: dissecting Dectin-1 and Dectin-2 signalling in immune cells with DC-ATLAS. *Immunobiology*, 2013. 218(11): 1428-1437.
 57. **Dostert, C. und Tschopp, J.** DETeCTING fungal pathogens. *Nat Immunol*, 2007. 8(1): 17-18.
 58. **Marshall, A.S., Willment, J.A., Pyz, E., Dennehy, K.M., Reid, D.M., Dri, P., Gordon, S., Wong, S.Y. und Brown, G.D.** Human M1CL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. *Eur J Immunol*, 2006. 36(8): 2159-2169.

59. **Marshall, A.S., Willment, J.A., Lin, H.H., Williams, D.L., Gordon, S. und Brown, G.D.** Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): 14792-14802.
60. **Miyake, Y., Ishikawa, E., Ishikawa, T. und Yamasaki, S.** Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle. *Self Nonself*, 2010. 1(4): 310-313.
61. **Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K. und Saito, T.** Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol*, 2008. 9(10): 1179-1188.
62. **Richardson, M.B. und Williams, S.J.** MCL and Mincle: C-Type Lectin Receptors That Sense Damaged Self and Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Front Immunol*, 2014. 5: 288.
63. **Geijtenbeek, T.B. und Gringhuis, S.I.** Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(7): 465-479.
64. **Hearn, V.M. und Mackenzie, D.W.** Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen*, 1980. 23(10): 549-562.
65. **Lothar, J., Breitschopf, T., Krappmann, S., Morton, C.O., Bouzani, M., Kurzai, O., Gunzer, M., Hasenberg, M., Einsele, H. und Loeffler, J.** Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 2014. 304(8): 1160-1168.
66. **Redelinghuys, P. und Brown, G.D.** Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells. *Immunol Lett*, 2011. 136(1): 1-12.
67. **Saijo, S. und Iwakura, Y.** Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*, 2011. 23(8): 467-472.
68. **Kanazawa, N., Tashiro, K., Inaba, K., Lutz, M.B. und Miyachi, Y.** Molecular cloning of human dectin-2. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(6): 1522-1524.
69. **Saraiva, M. und O'Garra, A.** The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(3): 170-181.
70. **Elcombe, S.E., Naqvi, S., Van Den Bosch, M.W., MacKenzie, K.F., Cianfanelli, F., Brown, G.D. und Arthur, J.S.** Dectin-1 regulates IL-10 production via a MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory macrophage markers. *PLoS One*, 2013. 8(3): e60086.
71. **Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tatenno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S. und Saito, T.** C-type lectin Mincle is an activating receptor for

- pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(6): 1897-1902.
72. **Wells, C.A., Salvage-Jones, J.A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R.Z., Beckhouse, A.G., Lo, Y.L., Manzanero, S., Cobbold, C., Schroder, K., Ma, B., Orr, S., Stewart, L., Lebus, D., Sobieszczuk, P., Hume, D.A., Stow, J., Blanchard, H. und Ashman, R.B.** The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol*, 2008. 180(11): 7404-7413.
 73. **Braedel, S., Radsak, M., Einsele, H., Latge, J.P., Michan, A., Loeffler, J., Haddad, Z., Grigoleit, U., Schild, H. und Hebart, H.** *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*, 2004. 125(3): 392-399.
 74. **Joo, H., Upchurch, K., Zhang, W., Ni, L., Li, D., Xue, Y., Li, X.H., Hori, T., Zurawski, S., Liu, Y.J., Zurawski, G. und Oh, S.** Opposing Roles of Dectin-1 Expressed on Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells in Th2 Polarization. *J Immunol*, 2015. 195(4): 1723-1731.
 75. **Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y. und Gordon, S.** Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*, 2002. 196(3): 407-412.
 76. **Hefter, M., Lothar, J., Weiss, E., Schmitt, A.L., Fliesser, M., Einsele, H. und Loeffler, J.** Human primary myeloid dendritic cells interact with the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* via the C-type lectin receptor Dectin-1. *Med Mycol*, 2017. 55(5): 573-578.
 77. **Hohl, T.M.** Stage-specific innate immune recognition of *Aspergillus fumigatus* and modulation by echinocandin drugs. *Med Mycol*, 2009. 47 Suppl 1: S192-198.
 78. **Hohl, T.M., Van Epps, H.L., Rivera, A., Morgan, L.A., Chen, P.L., Feldmesser, M. und Pamer, E.G.** *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*, 2005. 1(3): e30.
 79. **Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W., Brown, A.J. und Kullberg, B.J.** Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*, 2006. 116(6): 1642-1650.
 80. **Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F. und Berneman, Z.N.** Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(6): 1365-1374.

81. **Romani, L.** Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(4): 275-288.
82. **Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C. und Geijtenbeek, T.B.** Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*, 2009. 10(2): 203-213.
83. **Chamilos, G., Ganguly, D., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Goldman, W.E., Gilliet, M. und Kontoyiannis, D.P.** Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS One*, 2010. 5(9): e12955.
84. **Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D. und Reis e Sousa, C.** Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 2005. 22(4): 507-517.
85. **Romani, L.** Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(1): 1-23.
86. **Nagai, H., Guo, J., Choi, H. und Kurup, V.** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis*, 1995. 172(6): 1554-1560.
87. **Roilides, E., Dimitriadou-Georgiadou, A., Sein, T., Kadiltsoglou, I. und Walsh, T.J.** Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 1998. 66(12): 5999-6003.
88. **Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I.** Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 1992. 307(1): 97-101.
89. **Pease, J.E. und Sabroe, I.** The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am J Respir Med*, 2002. 1(1): 19-25.
90. **Richardson, M.D. und Patel, M.** Stimulation of neutrophil phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by interleukin-8 and N-formylmethionyl-leucylphenylalanine. *J Med Vet Mycol*, 1995. 33(2): 99-104.
91. **Anguille, S., Smits, E.L., Lion, E., van Tendeloo, V.F. und Berneman, Z.N.** Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol*, 2014. 15(7): e257-267.
92. **Herre, J., Marshall, A.S., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S. und Brown, G.D.** Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, 2004. 104(13): 4038-4045.

93. **Kerrigan, A.M. und Brown, G.D.** Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev*, 2010. 234(1): 335-352.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewissenhafte und ausführliche Betreuung während der Anfertigung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Jasmin Lothar für die intensive Betreuung und freundliche Zusammenarbeit, sowie allen Mitarbeiterinnen im Labor, im Besonderen Frau Anna-Lena Schmitt und Frau Esther Weiß.

Von Herzen danke ich meiner Familie für die Ermöglichung des Studiums und die immer währende Unterstützung.