

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Einfluss von Hypoxie auf die Interaktion von moDCs und T-Zellen mit *Aspergillus fumigatus***

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marion Alice Wallstein

aus Dortmund

Würzburg, Juli 2020

**Referent:** Prof. Dr. Jürgen Löffler

**Koreferent:** Prof. Dr. Matthias Eyrich

**Dekan:** **Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:** 09.04.2021

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhalt

I. Einleitung .....	1
1. Die Bedeutung von Pilzen in der Medizin.....	1
2. <i>A. fumigatus</i> .....	1
2.1 Pathogenese von <i>A. fumigatus</i> .....	2
2.2 Klinische Manifestationen einer Infektion mit <i>A. fumigatus</i> .....	2
3. Allgemeine Abläufe in unserem Immunsystem bei einer Infektion mit <i>A. fumigatus</i> .....	3
3.1 Aufgaben der moDCs während einer Infektion mit <i>A. fumigatus</i> .....	5
3.2 Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 .....	6
3.3 Antwort der T-Lymphozyten während einer <i>A. fumigatus</i> -Infektion .....	7
3.4 Die Rolle unterschiedlicher Zytokine während einer <i>A. fumigatus</i> -Infektion.....	10
4. Der Einfluss von Hypoxie auf unser Immunsystem .....	13
5. Die Rolle von STAT3 .....	14
6. Zielsetzung der Arbeit.....	16
II. Material und Methoden .....	17
1. Kultivierung von <i>A. fumigatus</i> .....	17
1.1 <i>A. fumigatus</i> -Anzucht .....	17
1.2 <i>A. fumigatus</i> -Ernte.....	17
1.3 Keimschlauch-Anzucht .....	18
1.4 <i>A. fumigatus</i> -Keimschlauch-Inaktivierung.....	18
2. Zellkulturtechniken.....	20
2.1 PBMC-Isolation .....	20
2.2 PMBCs Konservierung .....	22
2.3 Isolation von CD14+ Monozyten von PMBCs .....	22
2.4 Ausplattieren der CD14+ Monozyten.....	24
2.5 Zugabe von frischem Medium und Chemokinen .....	25
2.6 Ernte der moDCs.....	26

2.7	Maturation der moDCs .....	27
2.8	Ernte der maturierten moDCs .....	28
2.9	Pan T-Zell-Isolation .....	29
2.10	Allogener T-Zell-Assay .....	31
2.11	Ernte des T-Zell-Assays .....	33
2.12	Autologer T-Zell-Assay .....	34
3.	Durchflusszytometrie .....	34
3.1	CD80, CD83 und CD86-Messung .....	34
4.	Zytokinmessung mittels ELISA .....	37
4.1	INF $\gamma$ -Messung mittels ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay) ...	37
4.2	Multiplex-Assay .....	40
4.3	Analyse von IL12/23(p40) und IL12(p70) .....	40
4.4	IFN $\gamma$ -Analyse anhand einer Zeitreihe .....	41
5.	Apoptosedektion mittel Annexin/PI-Analyse .....	41
5.1	Annexin/PI-Analyse .....	41
6.	Glucose/Laktat-Messung .....	42
7.	Immunoblotting .....	43
7.1	STAT3 – Immunoblotting .....	43
8.	Statistik .....	46
III.	Ergebnisse .....	47
1.	moDC-Reifung unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie .....	47
	.....	48
2.	moDCs in Kolultur mit allogenen, naiven T-Zellen .....	49
3.	Analyse der T-Zell-Aktivierung durch moDCs mittels INF $\gamma$ -Messung .....	51
4.	Apoptose-Detektion nach 24 h Maturierung .....	53
5.	Apoptose-Detektion nach 72 h in T-Zell-Kokultur .....	55
6.	Zeitreihenanalyse der INF- $\gamma$ -Ausschüttung im T-Zell Assay .....	58
7.	Analyse der INF $\gamma$ -Ausschüttung im autologen T-Zell-Assay .....	59

8. Zytokinanalyse nach 72 h in T-Zell Kokultur .....	60
9. Analyse des IL12/23(p40) -Zytokinlevels nach 72 h in T-Zell Kokulturs .....	64
10. Analyse des IL12p70-Zytokinlevels nach 72 h in T-Zell-Kokultur .....	65
11. Glykolytische Aktivität der moDCs nach 72 h in T-Zell-Kokultur.....	67
12. STAT-3-Immunoblot .....	69
IV. Diskussion.....	70
1. Der Effekt von Hypoxie auf moDCs .....	71
2. Hypoxie befähigt moDCs zu einer verstärkten T-Zellaktivierung.....	72
3. Apoptose und Zelltod als möglicher zusätzlicher T-Zellaktivator .....	74
4. IL12p70 als möglicher Verstärker der T-Zell-vermittelten Immunantwort auf <i>A. fumigatus</i> .....	76
5. Ein anaerober Stoffwechsel führt nicht zu einer verstärkten T-Zell Aktivierung... 80	
6. Maturierung unter Hypoxie führt nicht zu einer vermehrten STAT3-Aktivität.....	80
Zusammenfassung.....	83
Literaturverzeichnis .....	84
Abbildungsverzeichnis .....	93
Tabellenverzeichnis .....	94
Anhang.....	96
Lebenslauf.....	96
.....	96
Danksagung .....	98

## I. Einleitung

### 1. Die Bedeutung von Pilzen in der Medizin

Pilze sind ubiquitär in der Umwelt vorkommende Eukaryonten. In der Medizin gehören Pilzinfektion heutzutage zu denen an den schwierigsten behandelbaren Infektionen. Einige Pilze verursachen Infektionen bei gesunden Menschen. Aber die meisten Pilzinfektionen treten bei Immunsupprimierten auf. Hier spielt der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* eine entscheidende Rolle. [1]

### 2. *A. fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* gehört zu den Schimmelpilzarten. Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* kommen in mehr als 200 Arten ubiquitär vor. Ihr typisches mikromorphologisches Merkmal sind die in eine Vesicula endenden Konidienträger, an denen die konidogenen Zellen (Phialiden) ihre Konidien (Philaokonidien) ausbilden. [2] Abbildung 1 zeigt ein lichtmikroskopisches Bild des Pilzes.



**Abbildung 1: Lichtmikroskopie einer typischen *A. fumigatus* Spore [3]**

Die Konidien repräsentieren den asexuellen Lebenszyklus. Der Entwicklungszyklus beginnt mit dem Wachstum von Hyphen, welche sich entweder aus einer einzelnen Konidie oder aus einer Ascospore (= meiotisches Produkt der sexuellen Reproduktion) entwickeln. Die Wachstumsphase beinhaltet die Keimung (= Entwicklung von

Keimschläuchen) mit darauffolgender Entwicklung von einem Netzwerk, bestehend aus Hyphen, die zu einem Myzel zusammenwachsen. [2]

*A. fumigatus* wächst fakultativ aerob, was bedeutet, dass er auch unter starken hypoxischen Bedingungen (Sauerstoffkonzentration von < 0,1%) wachsen kann. [4] Die Zellen des Pilzes besitzen Zellwände, bestehend aus unterschiedlichen  $\beta$ -Polysacchariden, die in einem fibrillären Netz enthalten sind. Dieses Netz ist aus  $\beta$ -Glukan, Chitin und einem amorphen Zement aufgebaut, welcher Galaktomannan und  $\alpha$ -Glukan enthält. Galaktomannan und  $\alpha$ -Glukan befinden sich an der Außenseite der Zellwand und werden als sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) vom menschlichen Immunsystem erkannt. [5, 6] *Grahl et al. (2012)* konnten u.a. zeigen, dass Hypoxie zu Veränderung der *A. fumigatus* Zellwand führt. [7] *Shepardson et al* zeigten 2014, dass Hypoxie die Exposition von  $\beta$ -Glukanen erhöhte, was zu einer verstärkten Zellwand mit einem erhöhten Durchmesser führte, *in vitro* und *in vivo*. [8] Außerdem lösten unter Hypoxie gewachsene Hyphen eine verstärkte Dektin-1-Antwort aus. [9] Dektin-1 gehört zu den C-Typ Lektin Rezeptoren und erkennt *A. fumigatus*. [10]

### **2.1 Pathogenese von *A. fumigatus***

Bei intakter Oberfläche des Wirtgewebes bzw. normaler, unbeeinträchtigter Abwehrlage werden die Pilzsporen problemlos eliminiert. Ist aber die Haut geschädigt, können die Sporen persistieren, Pilzkolonien ausbilden und sich im Extremfall wie ein Rasen über die Wundfläche ausbreiten. Durch Inhalation gelangen die Pilze über den Respirationstrakt in den Organismus. Die inhalierten Konidien sind so klein (2-4  $\mu\text{m}$ ), dass sie ungehindert bis in die Alveolen vordringen können.

Bei abwehrgeschwächten Personen können die Pilze überleben und eine manifeste Infektion der Lunge mit möglicher Dissemination in andere Organe auslösen. Zu den prädisponierenden Faktoren gehören neben Lungengewebsschäden vor allem Störungen der zellulären und humoralen Infektabwehr, wobei die Zahl und Funktion der neutrophilen Granulozyten von entscheidender Bedeutung sind. [11]

### **2.2 Klinische Manifestationen einer Infektion mit *A. fumigatus***

Im klinischen Kontext werden drei Hauptformen unterschieden. Die invasive Aspergillose (IA), die chronische pulmonale Aspergillose und die allergische

bronchopulmonale Aspergillose. [12] Zudem wird zwischen kutanen Aspergillosen, dem Aspergillom und der allergischen Aspergillus-Sinusitis unterschieden. [13]

Bei der invasiven Aspergillose handelt es sich um eine gefürchtete Komplikation, insbesondere bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen. Da die Zahl der hämatologischen Stammzelltransplantationen seit einigen Jahren steigt und häufiger eine hochdosierte antineoplastische Chemotherapie durchgeführt wird, stellt sich im klinischen Alltag die Frage zur Notwendigkeit einer Prophylaxe oder Therapie von Aspergillus-Infektionen und anderen invasiven Mykosen immer dringlicher. Die Diagnose einer invasiven Aspergillose ist komplex und kann dazu führen, dass eine notwendige antimykotische Therapie verspätet begonnen wird. Ein verzögerter Therapiebeginn ist jedoch mit einer erhöhten Sterberate assoziiert. [14] Gerade deswegen ist es wichtig die molekularen Prozesse, die bei einer Infektion mit *A. fumigatus* stattfinden, besser zu verstehen, um neue Angriffspunkte für eine bessere Diagnostik und/oder Therapie zu finden. Obwohl man weiß, dass die invasive Aspergillose eine der häufigsten Pilzinfektionen bei Krebspatienten ist, kann man die genaue Inzidenz aufgrund der niedrigen Sensitivität der diagnostischen Nachweismethoden bis heute nur schätzen. [15]

### **3. Allgemeine Abläufe in unserem Immunsystem bei einer Infektion mit**

#### **A. *fumigatus***

Beim Eindringen von Konidien bis in die Alveolen, werden zunächst eingeatmete Konidien von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Anschließend werden weitere Monozyten und neutrophile Granulozyten durch Ausschüttung von Zytokinen zum Infektionsort rekrutiert. [16]

Pulmonale dendritische Zellen befinden sich überall in unserem Lungengewebe. Sie bilden die Verbindung zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort. [17] Dendritische Zellen erkennen *A. fumigatus* durch sog. Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *patterns-recognition receptors*, PRR). Es sind bereits mehrere unterschiedliche PRR bekannt, die eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Pilzen einnehmen. Zu



ihnen gehören Toll-ähnliche Rezeptoren (engl.: *Toll-like-Receptors*, TLR), Dektin-1, Surfactant Protein A und D, Mannose-bindendes Lektin und Pentraxin-3. [18]

Die oben beschriebenen PRR werden durch unterschiedliche PAMP stimuliert. Zu den PAMP gehören zum Beispiel  $\alpha$ -Glucan, Chitin oder  $\beta$ -Glucan, abhängig vom morphologischen Status des Pilzes. [19] Ein hochpotentes bakterielles PAMP ist zum Beispiel das Lipopolysaccharid (LPS), welches sich an der Außenseite der Zellmembran von gramnegativen Bakterien befindet. [5]

Durch das Vorhandensein dieser PAMP wird die Aktivierung sowohl von DCs als auch Makrophagen induziert. Diese Aktivierung führt zur Phagozytose und Prozessierung des Antigens, um sie naiven T-Zellen in den lymphatischen Geweben wie z.B. Lymphknoten und Milz über ko-stimulatorische Moleküle und MHC-II (engl.: major histocompatibility complex; MHC) präsentieren zu können. Parallel werden nach der Aktivierung der DCs zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine sezerniert. [19] Naive T-Zellen erkennen durch den T-Zell-Rezeptor Fragmente des Antigens, die an MHC-Moleküle auf der Oberfläche der DCs gebunden sind und somit präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, wobei MHC-Klasse-I intrazelluläre, im Zytosol verdaute Antigene präsentiert, die von zytotoxischen CD (engl.: cluster of differentiation) 8 positiven (+) T-Zellen erkannt werden. MHC-Klasse-II präsentiert CD4+ T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) durch Endozytose verdaute Antigen-Fragmente. In Abhängigkeit des umgebenden Zytokin-Milieus und zusätzlicher Ko-Stimulation durch die Moleküle CD80, CD86 und CD40 differenzieren naive CD4+ T-Zellen in verschiedene Th-Subtypen. [20] *Braedel et al.* konnten 2004 zeigen, dass die Aktivierung von dendritischen Zellen durch *A. fumigatus* aus dem Knochenmark von Mäusen sowohl von TLR2 als auch von TLR4 abhängig ist und zu einer unterschiedlichen IL(*Interleukin*)-6 und IL-12-Sekretion führt. [21]

Die Immunantwort gegen *A. fumigatus* ist demnach von einem Gleichgewicht zwischen der Zytokinantwort und der Anwesenheit verschiedener T-Zellpopulationen abhängig. Während des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen, wird auch die T-Zell-Antwort beeinflusst. Gerade an diesem Prozess der Antigen-abhängigen T-Zell-Reifung wird aktuell viel geforscht, um potenzielle Therapieansätze zu finden, die die Abwehr von

immunsupprimierten Patienten stärken können, oder um einen Impfstoff gegen *A. fumigatus* zu entwickeln. [18]

### **3.1 Aufgaben der moDCs während einer Infektion mit *A. fumigatus***

Bei den dendritischen Zellen werden unterschiedliche Subgruppen unterschieden. Die Unterteilung dieser Subgruppen richtet sich nach dem Zellursprung, der anatomischen Lokalisation und nach der immunologischen Funktion. Im menschlichen Blut werden zum Beispiel drei unterschiedlichen Formen von dendritischen Zellen unterschieden: CD1c+ myeloide DCs (mDCs), CD141+ mDCs und plasmazytoide DCs (pDCs).[22]

moDCs stammen, wie ihr Name schon verrät, von Monozyten ab. Die Generierung von moDCs aus Monozyten kann *in vitro* unter Zugabe der humanen Wachstumsfaktoren GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und IL-4 erfolgen. Dies konnte bereits 1994 von Sallusto *et al.* [23] gezeigt werden. Die Etablierung dieses Generierungsprotokolls erzielte über die letzten Jahre erhebliche Fortschritte in der Erforschung des Reifungsprozesses von dendritischen Zellen während einer *A. fumigatus* Infektion.

Man findet moDCs im Gewebe in einem stationären Zustand. Hauptsächlich werden sie durch eine Entzündungsreaktion generiert und zeigen dann eine hohe Plastizität und eine Vielzahl von Funktionen. Diese Funktionen werden durch ihre Umgebung stark beeinflusst. [22] Neben den Umgebungsfaktoren, wie zum Beispiel Hypoxie, kommt es auch auf das Wachstumsstadium des Pilzes an, der die DCs beeinflusst. So konnten *Bozza et al.* 2002 zum Beispiel zeigen, dass pulmonale dendritische Zellen *A. fumigatus*-Keimschläuche im Gegensatz zu Konidien in einer Art Reißverschluss-Phagozytose internalisieren. Durch die Internalisierung von Keimschläuchen kam es zu einer verstärkten IL-4 Ausschüttung der DCs. Nach der Reifung der DCs kam es zu einer erhöhten Anzahl IFN(Interferon) $\gamma$  produzierender T-Zellen, unabhängig davon, ob sie Konidien oder Keimschläuche internalisiert hatten. Es kam allerdings nur durch die Internalisierung von Keimschläuchen zu einer erhöhten Anzahl von Interleukin-4 produzierender T-Zellen. [24] Dendritische Zellen scheinen die einzigen Zellen aktuell zu

sein, die die unterschiedlichen Wachstumsstadien des Pilzes unterscheiden können und besitzen damit die Fähigkeit, die anschließende T-Zell-Antwort zu instruieren. [24]

### **3.2 Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86**

Durch das spezifische Erkennen von verwandten antigenen Peptiden, welche durch MHC-Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen präsentiert werden, wird der T-Zell-Rezeptor-Signalweg in Gang gesetzt. Jedoch sind es die kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren der T-Zellen, die die Funktion und das Schicksal der naiven T-Zellen lenken und bestimmen. Dementsprechend sind für eine volle T-Zell-Aktivierung sowohl der T-Zell-Rezeptor als auch kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD83 erforderlich. Diese Moleküle spielen also eine entscheidende Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung, T-Zell-Differenzierung, ihrer Funktion und ihres Überlebens. [25]

Das Glykoprotein CD83 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus einzelnen extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Domäne. Eine CD83 Expression wird nicht nur auf aktivierten DCs, sondern auch auf aktivierten B- und T-Lymphozyten beobachtet. [26] Aets-Toegaert *et al.* (2007) konnten zeigen, dass das Herunterregulieren der CD83 Expression auf menschlichen DCs mittels RNA-Interferenz (RNAi) zu einer geringeren allogenen T-Zell-Proliferation, reduzierten IFN $\gamma$ -Sekretion und einer verminderten Kapazität tumorantigen spezifische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu *primen* führte. [26]

Der CD80/CD86 - CD28/CTLA (cytotoxic T-lymphocyte-associated) -4-Aktivierungsweg ist der bis heute am ausführlichsten erforschte Signalweg der T-Zell Kostimulation. CD80 und CD86 gehören zur B7-Familie und zeigen sowohl eine Spezifität für CD28-, als auch für CTLA-4. CD28 und CTLA-4 befinden sich auf der Oberfläche von naiven T-Zellen und gehören beide der CD28-Familie an. CD28 wird konstant auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert, wohingegen die CTLA-4-Expression erst nach einer T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird. CD86 wird auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen konstant in niedrigen Konzentrationen exprimiert und nach einer Aktivierung durch PAMPs sehr schnell hochreguliert, wohingegen CD80 erst später nach einer Aktivierung auf der

Zelloberfläche von DCs exprimiert wird. Durch die Interaktion von CD80/CD86 mit CD28 kommt es schließlich zu einer verstärkten und anhaltenden T-Zell-Antwort, was zu einer Zytokinfreisetzung führt. Diese Zytokinfreisetzung ermöglicht schließlich die klonale T-Zellexpansion und T-Zell-Differenzierung. Die Interaktion von CD80/CD86 mit CTLA-4 führt dagegen zu einer Hemmung der T-Zell-Rezeptor- und CD28-abhängigen Signalkaskade. CTLA-4 hemmt die IL-2 Synthese und den Zellzyklus. [27]

### **3.3 Antwort der T-Lymphozyten während einer *A. fumigatus*-Infektion**

T-Lymphozyten spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Immunabwehr von opportunistischen Infektionen, wie zum Beispiel Pilzinfektionen. Deutlich wird dies zum Beispiel in der Tatsache, dass HIV-Patienten, welche aufgrund der viralen Erkrankung zu wenig CD4-T-Helferzellen besitzen, sehr viel anfälliger für Pilzinfektionen sind. [28]

Naive T-Zellen werden abhängig von unterschiedlichsten Faktoren zur Differenzierung in Th1, Th2, Th17 oder Tregs (*regulatorische T-Zellen*) angeregt.

Allgemein produzieren Th1 Zellen IFN $\gamma$ , IL-2 und Tumornekrose-Faktor- $\beta$ (TNF $\beta$ ), was die Aktivierung von Makrophagen beeinflusst und eine Rolle bei Hypersensitivitätsreaktionen spielt. [29] CD4<sup>+</sup> T-Zellen wandern während einer Pilzinfektion in die drainierenden Lymphknoten und verstärken die IFN $\gamma$ -Produktion, wohingegen andere Signale die Th1 Differenzierung in der Lunge selbst fördern. Bozza *et al.* konnten zeigen, dass die Übertragung von dendritischen Zellen, welche mit *A. fumigatus* Konidien stimuliert wurden, zu einer verstärkten Widerstandsfähigkeit gegen eine invasive Aspergillose bei immunsupprimierten Mäusen führte, welche eine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten, indem die DCs T-Lymphozyten zur IFN $\gamma$ -Produktion anregten. [30] Romani *et al.* konnten in ähnlicher Art und Weise zeigen, dass die Übertragung von *A. fumigatus* spezifischen Th1 Zellen auf neutropene Mäuse zu einer verbesserten Abwehr gegen eine invasive Aspergillose führte. [31] Die Th1 Zellaktivierung wird durch die Ausbildung von TLRs und CLR (C-type lectin receptors) auf DCs verbessert. Durch die IFN $\gamma$  Produktion und durch die Bereitstellung von Hilfe bei

der Produktion opsonierender Antikörpern sind Th1 Zellen optimale Zellen, um Fresszellen zu aktivieren und die Infektion zu eliminieren. [6]

Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, was das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen beeinflusst. [29] Der Ausgleich zwischen Th1 und Th2 Zellen spielt bei Pilzinfektionen eine besondere Rolle. So kommt es zum Beispiel bei der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) zu einer verstärkten Th2 Zellanwort, welche zu einer asthmaähnlichen pulmonalen Hypersensitivitätsreaktion führt. Es konnte an einem Mäusemodell gezeigt werden, dass die Verabreichung von IL-4 zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine invasive pulmonale Aspergillose führt. Dementsprechend scheint eine *A. fumigatus* induzierte Th2 Antwort zu einer ABPA-Infektion beizutragen und zu einem schlechteren Outcome bei einer Aspergillus Infektion zu führen. [28] Studien an Mäusen und menschlichen Zellen haben gezeigt, dass sowohl eine Th1/Th2-Fehlregulation als auch ein Umschalten auf eine Th2 Antwort mit einem schlechten Outcome, einer invasiven Aspergillose, in Verbindung gebracht werden kann. [24]

Tregs können die Entzündungsreaktion kontrollieren, indem sie potenziell zerstörerische Effekte von Neutrophilen unterdrücken. Dies geschieht durch die Ausschüttung von IL-10 und durch einen kontaktabhängigen CTLA4/IDO(*Indolamin-2,3-Dioxygenase*) -Mechanismus. [32] Tregs können dementsprechend die Th2 Antwort hemmen und vor einer allergischen Reaktion schützen. [25], [32], [33]

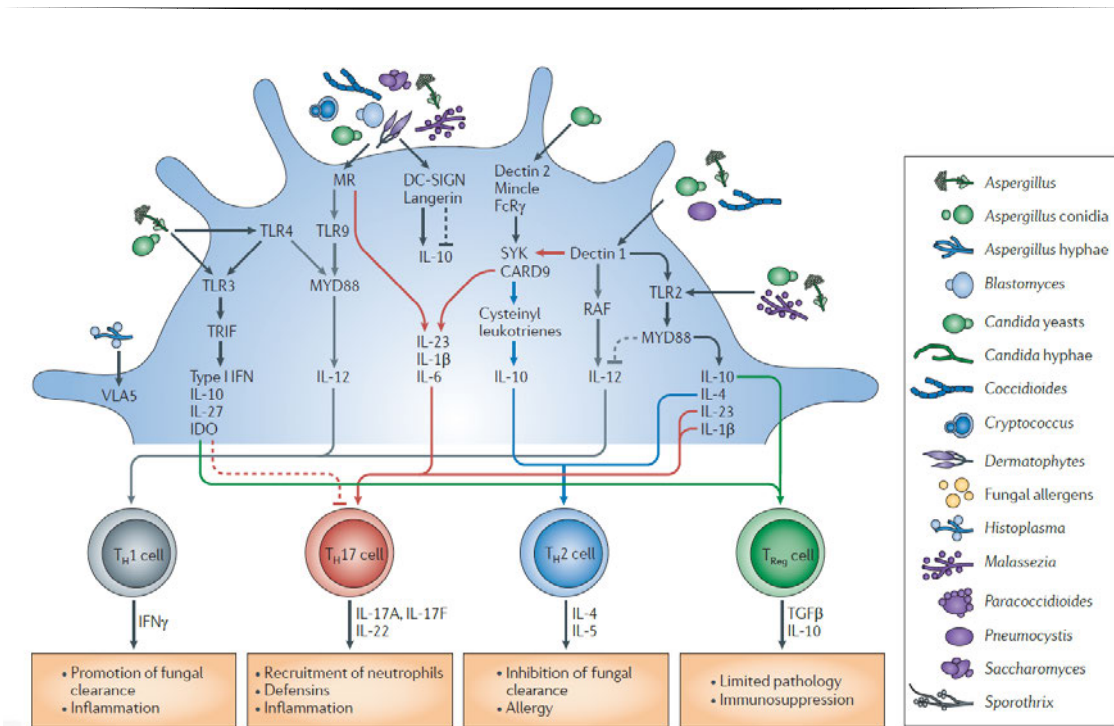
Bei Th17 Zellen handelt es sich um CD4+ T-Helferzellen, die selektiv IL-17 produzieren. Maßgeblich für ihre Entwicklung scheinen die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-23 zu sein. [34] Genetische Defizite haben darauf hingewiesen, dass der Dektin-1-CARD9(*caspase recruitment domain-containing protein 9*), STAT3(*signal transducer and activator of transcription 3*) und Th17 Weg eine Rolle bei der Abwehr von Pilzinfektion spielen. Die Th17 Zellaktivierung funktioniert bei Pilzinfektion hauptsächlich über den SYK(*spleen tyrosine kinase*)-CARD9, MYD88(*myeloid differentiation factor 88*) und Mannose-

Rezeptor Signalweg bei DCs und Makrophagen. [6] Dies wird in Abbildung 2 deutlich. Gleichwohl scheint *A. fumigatus* die IL-17 Produktion nicht besonders stark zu stimulieren und die Abwehr scheint wie bereits oben beschrieben eher auf einer starken Th1 Antwort zu basieren. [28]

$\gamma\delta$  T-Zellen, eine weitere T-Zell-Subgruppe, könnten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Pilzinfektionen einnehmen. Fenoglio *et al.* konnten zeigen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen die IFN $\gamma$  und IL-17 Produktion bei einer Infektion mit *C. albicans* induzieren können. Beides wichtige Zytokine, die bei der Immunabwehr eine Rolle spielen. [28], [35]

Th0-Zellen repräsentieren eine unterschiedlich differenzierte Gruppe von Effektorzellen, welche sowohl Th1 als auch Th2 Zytokine ausschütten können. [29] Abbildung 2 verdeutlicht, dass verschiedene Pilze andere Signalkaskaden in DCs aktivieren, was sich nachträglich auf die T-Zell-Subpopulationen auswirkt.

## I. Einleitung



**Abbildung 2: CD4+ T-Zell-Subpopulationen in einer Pilzinfektion.**

Die Abbildung zeigt wie dendritische Zellen über verschiedene Zytokine die Differenzierung von T-Helfer-Zellen stimulieren. Im Kasten rechts werden verschiedene Pilze aufgeführt, welche unterschiedlich mit der Plasmamembran der dendritischen Zellen reagieren. In den orangenen Textfeldern sind nochmals die Hauptfunktionen der T-Zellen aufgezeigt. (entnommen aus *Luigina Romani, Immunity to fungal infections*) [6]

### 3.4 Die Rolle unterschiedlicher Zytokine während einer *A. fumigatus*-Infektion

Verschiedene Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Infektion. Im Folgenden soll auf einige wenige näher eingegangen werden.

IL-12 ist in seiner Struktur einzigartig, da es sich hierbei um ein heterodimerische Zytokinfamilie handelt, zu der IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35 gehören. IL-12 und IL-23 sind überwiegend proinflammatorische/prostimulatorische Zytokine, die eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Th1 und Th17-Zellen spielen. [36]

IL-12-Zytokine bestehen aus einer  $\alpha$  (p19, p28 oder p35) und einer  $\alpha\beta$ -Kette (p40 oder Ebi3). Paart sich die p40-Kette mit p35, so wird das Zytokin IL-12 gebildet. Paart sich die p40-Kette mit p19, so wird das Zytokin IL-23 gebildet. Diese unterschiedlichen Zytokine agieren ebenfalls mit unterschiedlichen Rezeptoren. Der Signalweg, der dieser Zytokin-

Rezeptor-Interaktion folgt, wird über Mitglieder der JAK (*Janus Kinase*) -STAT-Familie vermittelt. So vermittelt zum Beispiel IL-12 eine Signalkaskade durch pSTAT4 und IL-23 durch pSTAT3.

IL-12 wird von DCs, Makrophagen und B-Zellen als Antwort auf mikrobielle Pathogene gebildet. Durch einen positiven *Feedback*-Mechanismus induziert IL-12 die IFN $\gamma$  Produktion durch T-Zellen. Diese IFN $\gamma$  Produktion fördert wiederum die IL-12 Produktion durch DCs und erleichtert somit die Th1 Differenzierung. [36]

IL-23 wird ebenfalls von aktivierten DCs und Makrophagen als Antwort auf mikrobielle Pathogene gebildet. Es spielt allerdings eher eine Schlüsselrolle bei der Th17 Entwicklung, indem es die IL-17 Expression und den Th17 Phänotyp stabilisiert. [36]

*A. fumigatus* Hyphen stimulieren die Produktion von IL-10 durch TLR2. IL-10 unterdrückt die antifungale Aktivität von Monozyten gegen *A. fumigatus* Hyphen und verstärkt parallel deren phagozytische Aktivität. [19] IL-10 wird unter anderem auch von Th2 Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen sezerniert. [37] Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass hohe Serumkonzentrationen von IL-10 mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine invasive Aspergillose einhergingen. [37]

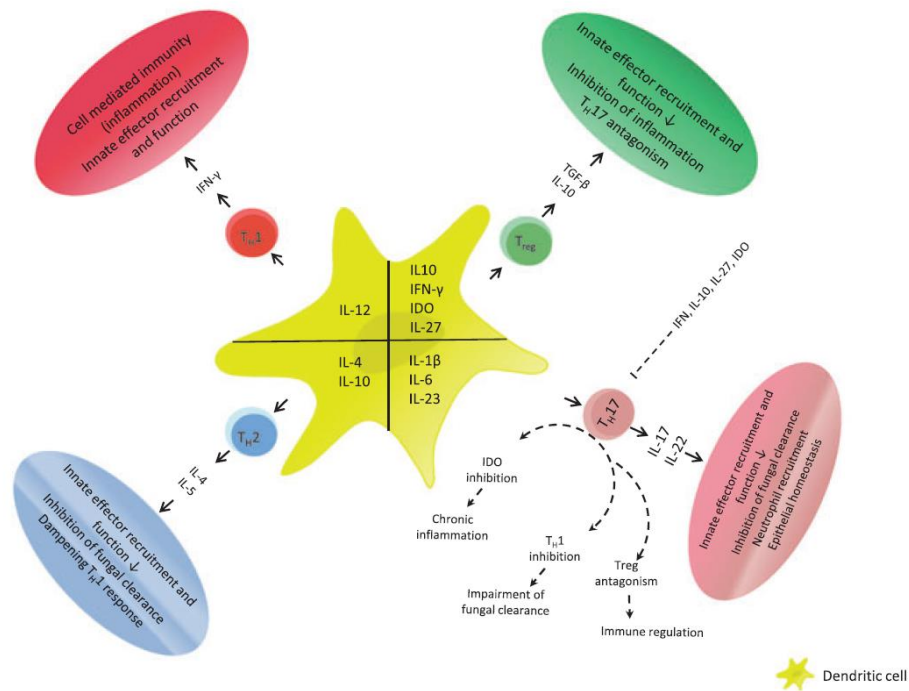
TNF $\alpha$  ist ein Zytokin, welches von Alveolarmakrophagen und von Epithelzellen sezerniert wird. Es spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. [37]

IFN $\gamma$  wird hauptsächlich von Th1 Zellen produziert und spielt dementsprechend eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen. Studien an Tieren mit rekombinanten IFN $\gamma$  oder Antikörpern gegen IFN $\gamma$  zeigten *in vivo*, dass IFN $\gamma$  ein ausschlaggebender Faktor für eine normale Immunabwehr gegen verschiedenste pulmonale Pathogene ist (*A. fumigatus* eingeschlossen). Shao *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Behandlung von Mäusen mit intranasalen Adm (*administrated of a recombinant adenovirus vector*) IFN $\gamma$  zu einer verstärkten Aspergillusabwehr führt. [38]



# I. Einleitung

Die folgende Abbildung 3 fasst die unterschiedlichen Effekte der verschiedensten Zytokine zusammen.



**Abbildung 3: Aspergillus abhängige Zytokine, die eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr einnehmen.**

Durch die Produktion unterschiedlichster Zytokine können unterschiedlichste T-Zellen als Effektorzellen der Immunabwehr fungieren. (entnommen aus Minireview: host defence in invasive aspergillosis) [19]

### 4. Der Einfluss von Hypoxie auf unser Immunsystem

Säugetiere haben Sensoren, um die Sauerstoffkonzentration im Gewebe zu messen und besitzen Mechanismen, um schnell auf einen Sauerstoffmangel zu reagieren, indem zum Beispiel die Atemfrequenz oder das Herz-Zeit-Volumen gesteigert wird. Wenn weiterhin eine inadäquate Sauerstoffkonzentration persistiert, greifen weitere Mechanismen, um Sauerstoff zu sparen oder den Organismus an eine niedrigere Sauerstoffkonzentration anzupassen. Einer dieser Mechanismen basiert auf sauerstoffsensitiven Prolylhydroxylasen (PHDs). Diese hydroxylieren Prolin an der  $\alpha$ -Einheit des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors (HIF). HIF besteht aus zwei Untereinheiten (HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ ). Von diesen Untereinheiten tritt HIF-1 $\alpha$  ubiquitär auf. HIF-1 $\beta$  dagegen ist auf bestimmte Gewebe beschränkt. [39]

Besonders HIF-1 $\alpha$  wird eine Schlüsselrolle bei der zellulären und systemischen Antwort bei hypoxischen Bedingungen zugeschrieben. [40] Man weiß, dass Hypoxie Einfluss auf eine Entzündungsreaktion hat und dass die Entzündung selbst zu hypoxischen Bedingungen führt. Unter normoxischen Bedingungen kann aktiviertes HIF die Entzündungsreaktion einleiten bevor es im Gewebe zu einer Hypoxie kommt. [7], [39] Fliesser *et al* (2016) zeigten, dass HIF-1 $\alpha$  unter beiden Bedingungen (Normoxie und Hypoxie) in menschlichen DCs durch Stimulation mit *A. fumigatus* stabilisiert wird. [41] Hsu *et al.* (2013) konnten zeigen, dass eine mikrovaskuläre Ischämie einen erhöhten Risikofaktor für eine *A. fumigatus* Ausbreitung darstellt. [4] Peyssonnaud *et al.* postulierten 2019, dass HIF-1 $\alpha$  einen Sepsismarker darstellen könnte und dass die Hemmung dieses Transkriptionsfaktors zu einer verringerten LPS-induzierten Mortalität führen könnte. [42]

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass Hypoxie zu einer verminderten Reifung von dendritischen Zellen führt. Zudem führt Hypoxie zu einer selektiven Zytokinfreisetzung. [9], [39] Fliesser *et al.* (2016) zeigten, dass Hypoxie zu einer verminderten Sekretion von IL-1 $\alpha$ , IL-12p70, IL-6 und IL-10 führt. [43] Mancino *et al.* (2008) zum Beispiel konnten zeigen, dass Hypoxie die Freisetzung von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in dendritischen Zellen fördert. [44] Dies sind zwei Zytokine, die durch die Aktivität von NF- $\kappa$ B kontrolliert werden. NF (*nucleus factor*) - $\kappa$ B repräsentiert eine Familie von

Transkriptionsfaktoren, welche eine große Anzahl von Genen regulieren, die bei der Immunabwehr und Entzündungsreaktion involviert sind. Zu dieser Familie gehören 5 Mitglieder: NF- $\kappa$ B1(auch p50 genannt), NF- $\kappa$ B2(auch p52 genannt), RelA (auch p65 genannt), RelB und c-Rel. NF- $\kappa$ B wird durch zwei Hauptsignalwege aktiviert; dem kanonischen oder nicht kanonischen Signalweg. Der kanonische Signalweg wird durch unterschiedlichste Stimuli aktiviert, wie zum Beispiel PRRs und T-Zell-Rezeptoren. Dagegen wird der nicht-kanonische Signalweg durch selektive Stimuli aktiviert, die Liganden der TNFR-Superfamilie aufweisen. Dazu gehört beispielsweise CD40. [45] Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie bilden also eine Brücke zwischen Entzündung und Hypoxie, indem sie mit dem PHD-HIF-Signalweg verlinkt sind. [39]

HIF-1 $\alpha$  scheint aber nicht nur Einfluss auf die Differenzierung und Reifung der DCs zu haben, sondern auch auf deren Migration. [46]

Hypoxie beeinflusst nicht nur unser Immunsystem und dessen Abläufe, sondern auch *A. fumigatus* selbst. Wie oben bereits beschrieben führt Hypoxie zu Zellwandveränderungen. [9] Zudem scheint Hypoxie selbst ein Teil der Pathogenese von einer invasiven Aspergillose zu sein. Grahl *et al.* (2011) konnten zeigen, dass während einer invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) es zu einem hypoxischem Milieu kommt und dass eine Alkoholdehydrogenase des Pilzes die Pathogenese in der Lunge beeinflusst. [47]

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einfluss von Hypoxie bzw. der Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf humane dendritische Zellen bisher wenig untersucht wurde. Genauso unklar ist, welche Rolle Hypoxie bei einer invasiven Aspergillose einnimmt und welchen Einfluss sie auf die erworbene Immunantwort hat.

### **5. Die Rolle von STAT3**

Der JAK/STAT (Signal transducer and activator of transcription protein)-Signalweg beeinflusst die Zelldifferenzierung und reguliert die Dauer und Intensität der Entzündungsreaktion. Es gibt 4 JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) und 7 STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6), die durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren genutzt werden. [48] Im Allgemeinen kommt es durch die Zytokinbindung durch seinen Rezeptor zur Aktivierung der JAKs. Dem folgt eine

Phosphorylierung des Zytokinrezeptors. Dieser Prozess wiederum erlaubt die Bindung von STATs. STATs werden an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zur Bildung von Dimeren, welche in den Zellkern verlagert werden und dort die Genexpression regulieren. [49]

Unter den STATs scheint STAT3 entscheidend zu sein, ob sich naive T-Zellen in Tregs oder Th17-Zellen differenzieren. STAT3 hat zudem einen wichtigen proinflammatorischen Effekt, da es beim Zellwachstum, beim Apoptose Prozess und bei der Transkription von Genen, die bei einer Entzündung aktiv sind, eine Rolle spielt. [48], [49]

Studien über den genetischen Hintergrund des autosomal dominant erworbenen Hyper-IgE-Syndroms haben gezeigt, dass bei dieser Erkrankung eine dominant negative Mutation im STAT3 Gen vorliegt. [49] Weitere Studien haben gezeigt, dass STAT3 Mutationen mit einer erhöhten Anfälligkeit für Pilzinfektionen einhergehen. [48], [49] STAT3 Defekte menschlicher neutrophiler Granulozyten hemmten das Wachstum von *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen und zeigten normale Chemotaxis. Ruxolitinib, ein JAK/STAT-Inhibitor, reduziert wiederum die Abwehr von neutrophilen Granulozyten gegen *A. fumigatus*. Nguyen-Jackson *et al.* konnten bereits 2010 zeigen, dass das Zytokin G-CSF zu einer vermehrten STAT3 Aktivierung in neutrophilen Granulozyten, welche aus unreifem Knochenmark isoliert wurden, führte. Diese erhöhte STAT3 Aktivität führte zu einer erhöhten CXCR2(*CX chemokine receptor 2*)-Expression und zu einer erhöhten neutrophilen Mobilisierung aus dem Knochenmark ins periphere Blut. [50] Eine weitere Studie konnte zeigen, dass naive T-Zellen von stammzelltransplantierten Spendern, die eine invasive Aspergillose entwickelt hatten, eine reduzierte IL-6-Antwort im Sinne einer reduzierten STAT3 Phosphorylierung zeigten. Weiter kam es bei Patienten, die an einer invasiven Aspergillose erkrankt waren, zu keiner IL-6 induzierten IL-17 Produktion. Dies unterstützt die Annahme, dass der IL-6/STAT3-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* spielt. [51]

Zudem scheint STAT3 ebenfalls mit dem HIF1 $\alpha$ -Signalweg in Verbindung zu stehen. Sowohl HIF1 $\alpha$  als auch STAT3 werden in unterschiedlichen Krebszellen vermehrt gebildet. Qing -Xu *et al.* (2005) konnten zeigen, dass eine STAT3-Hemmung die

Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) *in vitro* blockiert und *in vivo* das Tumorwachstum und die Angiogenese hemmt. [52] Ebenso konnten Pawlus *et al.* (2014) zeigen, dass eine Hemmung der STAT3-Aktivität zu einer signifikanten Reduktion von HIF-1 $\alpha$  führte. [53]

Zusammenfassend bleiben sowohl HIF-1 $\alpha$ -, als auch STAT3 mögliche Zielproteine, um medikamentös das Outcome einer invasiven Aspergillose bei immunsupprimierten Patienten zu verbessern. Dieser Ansatz benötigt weitere Beachtung und intensive Forschung.

### **6. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Hypoxie auf die Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem besser zu verstehen. Ebenso soll die Funktion verschiedener Botenstoffe in Signalkaskaden näher untersucht werden, um potenzielle neue Therapieansätze entwickeln zu können.

## II. Material und Methoden

### 1. Kultivierung von *A. fumigatus*

#### 1.1 *A. fumigatus*-Anzucht

Materialien:

<i>A. fumigatus</i>	Stamm ATCC 46645
Bierwürz-Agarplatten	Institut für medizinische Mikrobiologie der Uniklinik Würzburg
Kühlschrank 4°C	Liebherr GmbH
Brutschrank Heraeus® Function Line	Thermo Fisher Scientific
Pipette 100µl	Eppendorf
Pippettenspitze 100 µl	StarLab

Die moDCs wurden mit inaktivierten Keimschläuchen stimuliert. Um inaktivierte Keimschläuche zu erhalten, wurde zuerst der Schimmelpilz kultiviert. Dafür wurden 100 µl einer *A. fumigatus*-Konidien-Stamm-Lösung (ATCC 46645), welche bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurde, in die Mitte einer Bierwürzplatte pipettiert. Die Bierwürzplatten wurden vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Dann wurden die Konidien mit einem sterilen Tupfer im 8-Ösen-Ausstrich auf der Platte verteilt, damit der Pilz in einem dichten Rasen auf der Platte anwachsen konnte. Die Platte wurde mit Klebeband zugeklebt und dann im Brutschrank für 72 h bei 35 °C bebrütet.

#### 1.2 *A. fumigatus*-Ernte

Materialien:

Steriles Wasser	B. Braun
Cell Strainer (40 µm)	BD Biosciences
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
Vortex Genie 2®	Scientific Industries, Inc.

## II. Material und Methoden

Auf dem dicht mit *A. fumigatus* bewachsenen Agar wurden vorsichtig ein paar Tropfen steriles Wasser gegeben. Dann wurde der gesamte Agar sanft mit einem sterilen Tupfer vom Mycel des Schimmelpilzes befreit. Die dadurch entstandene Schimmelpilzlösung wurde mit einem Cell Strainer (40 µm) gegeben, um eine reine Konidien Aufschwemmung zu erhalten. Anschließend wurde die Konzentration der Aufschwemmung bestimmt, indem die Konidien in einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden. Anhand der eingesetzten Verdünnung konnte die Konidien Konzentration pro ml berechnet werden.

### 1.3 Keimschlauch-Anzucht

Materialien:

Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-one
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors HT
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon

In 50 ml Falcons mit 20 ml reinem RPMI 1640 ohne Zusätze wurden  $1,0 \times 10^8$  Konidien der *A. fumigatus*-Stocklösung pipettiert. Die Aufschwemmung wurde über Nacht (ÜN) bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Die Deckel der Falcons wurden um eine ¼-Drehung geöffnet, um aerobe Wachstumsbedingungen zu garantieren. Die Übernachtskultur (ÜNK) wurde anschließend bei 37°C weiter inkubiert, um aus den geschwollenen Konidien Keimschläuche zu züchten. Nach ca. 1 h wurden die Keimschläuche geerntet, wenn sich ca. 50% der Konidien zu Keimschläuchen entwickelt hatten.

### 1.4 *A. fumigatus*-Keimschlauch-Inaktivierung

Materialien:

Cell-Strainer 40 µm	BD Biosciences
Falcons 50 ml	Greiner Bio-one
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 S oder 3S-R	Thermo Fisher Scientific

## II. Material und Methoden

100% Ethanol	Sigma Aldrich
Safe-Lock Microzentrifuge Tube, 2,0 ml	Eppendorf
Steriles Wasser	B. Braun
Microcentrifuge 5415 R	Eppendorf
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Nadel 20 G	BD
96-Well-Plate	Greiner, bio-one
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
Pipette 100 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 100 µl	StarLab

Die Keimschlauchaufschwemmung wurde durch einen CellStrainer(40 µm) in ein frisches 50 ml Falcon gegeben. Danach wurde die Aufschwemmung bei 5000 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde in 2 ml 100%igem Ethanol resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Aufschwemmung in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 5000 x g und RT zentrifugiert. Nachfolgend wurde zweimal mit 2 ml sterilem Wasser und zweimal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Und schließlich wurde einmal mit 1 ml Medium (RPMI 1640 ohne Zusätze) gewaschen. Der Ansatz wurde mehrfach durch eine sterile Spritzenadel (20G) gezogen, um eine homogene Aufschwemmung zu erhalten. Anschließend wurden die Keimschläuche in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, um eine Lösung mit einer Endkonzentration von  $1,0 \times 10^8$  Keimschläuchen/ml herzustellen. Hierzu wurde zuvor eine 1:100-Verdünnung der Keimschlauchaufschwemmung hergestellt, von der 10 µl wiederum mit 10 µl Trypanblau 1:1 verdünnt wurden. Entsprechend der Auszählung wurde der restliche Ansatz in entsprechendem Volumen Medium (RPMI 1640) aufgenommen. Dazu wurde der Ansatz bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig vollständig mit einer Eppendorf-Pipette entfernt und die inaktivierten Keimschläuche wurden in frischem Medium (RPMI 1640)



aufgenommen, damit einer Endkonzentration von  $1,0 \times 10^8$  Keimschläuchen/ml entstand.

### 2. Zellkulturtechniken

#### 2.1 PBMC-Isolation

Materialien:

LRS Kammern	Institut für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg
Falcons 50 ml	Greiner Bio one
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml, 20 ml	Greiner Bio one
Sicherheitswerkband HERAsafe® KS 18	Thermo Fisher Scientific
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Pasteurpipetten	Hartenstein
Biocoll	Biochrom AG
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
Trypan Blue 0,4%	Sigma Aldrich
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon

Thrombozytenkonzentrate wurden am Institut für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg mittels des Aphareseverfahrens gewonnen. Hierbei wird das venöse Blut des Spenders kontinuierlich entnommen und einem Zellseparator zugeführt. Im Zellseparator werden die Thrombozyten des Spenders von den restlichen Bestandteilen des Blutes mittels Zentrifugation getrennt und in einem Sammelbeutel gesammelt. Die restlichen Blutbestandteile werden dem Spender wieder zurücktransfundiert. Durch dieses Verfahren bleiben immer auch Leukozyten in der Separator-kammer zurück. Dieses Abfallprodukt, die sogenannten LRS-Kammern, eignen sich zur Isolation von menschlichen Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC).

## II. Material und Methoden

---

Dazu wurde das Blut in ein 50 ml Falcon gegeben und mit 50 ml Puffer (HBSS + 1% FCS + 2mM EDTA, 22°C) aufgefüllt und invertiert. Dann wurde die Blutlösung vorsichtig und langsam mit einer serologischen Pipette auf 15 ml Biocoll Trennlösung geschichtet. Die Trennlösung enthält eine Polysucrose mit einem Molekulargewicht von 400 kDa, wodurch eine Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht wird. Dabei sammeln sich durch die Zentrifugation die Zellen mit der größten Dichte im Zellsediment und die Zellen mit der geringsten Dichte verbleiben im Überstand. Die PBMCs sammeln sich entsprechend ihrer Dichte zwischen der Trennlösung und dem Überstand. Nach 20 min Zentrifugation bei 800 x g und RT wurden die PBMCs mittels einer Pasteurpipette aus der Trennlösung aufgesaugt und in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Es folgten 2 Waschschrötte. Hierbei wurde das Falcon mit den PBMCs mit HBSS (+ 1%FCS + 2mM EDTA, 22°C) auf 50 ml aufgefüllt, invertiert und anschließend für 15 min bei 120 x g bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand erneut dekantiert, das Zellpellet vom Boden des Falcons gelöst und das Falcon wurde erneut mit HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA, 22°C) aufgefüllt und wie o.g. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand erneut dekantiert und das Pellet in 50 ml HBSS (+ 1% FCS + 2mM EDTA, 4°C) resuspendiert. Anschließend wurden die PBMCs mit einer Trypanblaufärbung auf Vitalität geprüft und gezählt. Die Substanz Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, abgestorbene und perforierte Zellen nehmen dagegen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Die für den Versuch benötigte Zellzahl wurde mit einer serologischen Pipette in ein frisches Falcon überführt und für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend konnte mit der Isolation von CD14+ Monozyten begonnen werden.

## II. Material und Methoden

### 2.2 PMBCs Konservierung

Materialien:

FCS	Sigma-Aldrich
DMSO	Roth
Falcons 50 ml	
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
Kryo-Röhrchen 1,2 ml	Thermo Fisher
Mister Frosty	Taylor-Wharton
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein

Zunächst wurden die isolierten PMBCs in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die benötigte Anzahl Zellen wurden anschließend in ein frisches 50 ml Falcon mittels einer serologischen Pipette überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden in der erforderlichen Menge Freeze-Medium aufgenommen. Das Freeze Medium bestand aus reinem FCS und 8% DMSO. Pro Kryoröhrchen wurden  $5,0 \times 10^7$  Zellen eingefroren. Die befüllten Kryoröhrchen wurden mittels Mister Frosty bei -80°C eingefroren.

### 2.3 Isolation von CD14+ Monozyten von PMBCs

Materialien:

Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
Filtrationssäule MACS LS Column	Miltenyi Biotec
CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec

## II. Material und Methoden

Kühlschrank 4°	Liebherr
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
MACS Seperator	Miltenyi Biotec
Stempel	Miltenyi Biotec
Trypan Blue 0,4%	Sigma Aldrich
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific

Für die Isolation von CD14+ Monozyten wurde das Verfahren der magnetischen Zellseparation angewandt. Hierbei fand eine positive Selektion statt.

Für eine LS-Säule wurden  $2,5 \times 10^8$  PBMCs verwendet. Das PBMC-Pellet wurde mit  $340 \mu\text{l}$  Puffer/ $1,0 \times 10^8$  PBMCs und  $60 \mu\text{l}$  CD14 Microbeads/  $1,0 \times 10^8$  PBMCs bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz gewaschen, indem das 50 ml Falcon mit HBSS (+ 1% FCS + 2nM EDTA) aufgefüllt, invertiert und bei  $300 \times g$  und bei  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert wurde. Während der Zentrifugation wurde die Säule vorbereitet: Die LS-Säule wurde in ein magnetisches Feld eingespannt (MACS Separator) und mit 3 ml Puffer äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit  $800 \mu\text{l}$  Puffer pro  $1,0 \times 10^8$  PBMCs resuspendiert. Im direkten Anschluss wurde die komplette Zellsuspension auf die Säule gegeben. Danach wurde dreimal mit 3 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein frisches 15 ml Falcon aufgesetzt. Durch Zugabe von 5 ml Puffer auf die Säule wurden die CD14-markierten Monozyten aus der Säule gewaschen. Dazu wurde der Puffer mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Die trübe Zellsuspension mit CD14+ Monozyten wurde mit einer Trypanblaufärbung auf Vitalität überprüft und gezählt.

### 2.4 Ausplattieren der CD14+ Monozyten

Materialien:

Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Wasserbad Memmert WB7	Memmert
GM-CSF (250µg/ml)	Baywe HealthCare Pharmaceuticals
IL-4 (10µg/ml)	Miltenyi Biotec
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Refobacin 120 µg/ml	Merck
6 Well-Zellkulturplatten	Corning Inc. Liefe Sciences
Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio one
CELLSTAR® Zellkulturflaschen 75 cm <sup>3</sup>	Greiner Bio one
Sicherheitswerkband HERAsafe® KS 18	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific

Das 15 ml Falcon wurde bei 300 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 37°C warmem Medium (RPMI 1640 + 10% FBS + Refobacin 120µg/ml) resuspendiert und auf eine Endkonzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 0,4 µl/ml GM-CSF (250 µg/ml) und 1 µl/ml IL4 (10 µg/ml) zu den Zellen hinzugegeben. Zuletzt wurden jeweils 3 ml pro Well der Zellsuspension mit einer serologischen Pipette auf 6-Well-Platten verteilt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch die Zugabe von Chemokinen wird eine Differenzierung der Monozyten zu monozyten-abhängigen dendritischen Zellen gewährleistet.

## II. Material und Methoden

### 2.5 Zugabe von frischem Medium und Chemokinen

Materialien:

RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
GM-CSF (250µg/ml)	Baywe HealthCare Pharmaceuticals
IL-4 (10µg/ml)	Miltenyi Biotec
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad Memmert WB7	Memmert
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio one
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
Inkubator HERAcCell 240	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific

Am zweiten und am vierten Tag nach dem Ausplattieren wurde den Zellen frisches Medium und frisches IL4 und GM-CSF zugeführt. Dabei wurde pro Well 1 ml Medium mit der serologischen Pipette entfernt und in ein 50 ml Falcon gegeben. Das Falcon wurde für 10 min bei RT bei 300 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden die Platten wieder in den Inkubator gestellt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in frischem, vorgewärmtem Medium (37°C) resuspendiert. Anschließend wurden 3 µl/ml IL4 (30 µg/ml) und 1,2 µl/ml GM-CSF (750µg/ml) zur Zellsuspension hinzugegeben und invertiert. Nach dem Invertieren wurde 1 ml der Zellsuspension pro Well mit einer serologischen Pipette zurücktransferiert und die Zellen weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.6 Ernte der moDCs

Materialien:

Zellschaber	SPL Life Sciences
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio one
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Refobacin 120 µg/ml	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Trypan Blue 0,4%	Sigma Aldrich
GM-CSF (250µg/ml)	Baywe HealthCare Pharmaceuticals
IL-4 (10µg/ml)	Miltenyi Biotec
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific

Nach 5 Tagen Inkubation konnten die moDCs geerntet werden. Dabei wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und mit einer serologischen Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Jedes Well wurde mit 1 ml HBSS (4°C, ohne Zusätze) gespült. Die Spülsuspension wurde ebenfalls in einem 50 ml Falcon gesammelt. Danach wurden die Falcons bei 300 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 5 ml vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + Refobacin+ 10%FBS, 37°C) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypanblaufärbung auf Vitalität geprüft und gezählt. Die Zellen wurden auf eine Endkonzentration von  $1,0 \times 10^6$ /ml eingestellt. Pro  $1,0 \times 10^6$  moDCs wurde 1 µl IL-4 und 0,4 µl GM-CSF beigefügt. Anschließend wurden die moDCs stimuliert.

### 2.7 Maturation der moDCs

Materialien:

6 Well-Zellkulturplatten	Corning Inc. Liefe Sciences
CO2-Inkubator C60	Labotec
Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
CD14+ moDCs	
LPS	Invivogen
Inaktivierte Keimschläuche <i>A. fumigatus</i>	
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific

Pro Vertiefung wurden  $1,0 \times 10^6$  moDCs/ml in jeweils zwei 6-Well-Platten ausplattiert, wobei eine Platte später unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, 37°C; Labotect C60) und eine Platte unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, 37°C; HERAcell 240) inkubiert wurde. Pro Platte wurden einem Teil moDCs keine Stimuli zugesetzt, ein Teil moDCs wurde mit 1 µg/ml LPS und ein Teil wurde mit inaktivierten *A. fumigatus* Keimschläuchen (ATCC 46645; MOI = 1) stimuliert. Durch die Stimulation mit LPS bilden die Zellen den TLR2 und TLR4 Rezeptor aus. Durch die Stimulation mit inaktivierten *A. fumigatus* Keimschläuchen soll die Bildung von Dectin-1 angeregt werden. Die Stimulation erfolgte für 24 h.



## II. Material und Methoden

### 2.8 Ernte der maturierten moDCs

Materialien:

Zellschaber	SPL Life Sciences
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon
Trypan Blue 0,4%	Sigma Aldrich
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Safe-Lock Microzentrifuge Tube, 1,5 ml	Eppendorf
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Refobacin 120 µg/ml	Merck
Fetales Rinderserum (engl.: bovine serum; fbs)	Sigma-Aldrich
Pipette 1000µl	Eppendorf
Pippettenspitze 1000 µl	StarLab
Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific

Die maturierten moDCs wurden nach 24h auf Eis geerntet. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Danach wurde die Zellaufschwemmung in ein 50 ml Falcon überführt. Es wurden folgende Zellsuspensionen erhalten, die jeweils unterschiedliche Bedingungen repräsentierten:

Falcon 1 = Normoxie – unstimuliert

Falcon 2 = Normoxie – mit LPS stimuliert

Falcon 3 = Normoxie – mit *A. fumigatus* inaktivierten Keimschläuchen stimuliert

Falcon 4 = Hypoxie – unstimuliert

## II. Material und Methoden

Falcon 5 = Hypoxie – mit LPS stimuliert

Falcon 6 = Hypoxie – mit *A. fumigatus* inaktivierten Keimschläuchen stimuliert

Die Falcons wurden bei 300 x g, 5 min bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Das Zellpellet wurde mit 1 ml HBSS (+ EDTA + FCS) gelöst. Die Zellen wurden gezählt und anschließend erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min bei RT), der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden in Medium (RPMI 1640 + 10%FCS + Refobacin) resuspendiert und auf eine Endkonzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C gehalten.

### 2.9 Pan T-Zell-Isolation

Materialien:

Filtrationssäule MACS LS Column	Miltenyi Biotec
MACS Separator	Miltenyi Biotec
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
Eingefrorene PBMCs	
Wasserbad Memmert WB7	Memmert
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Refobacin 120 µg/ml	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Mikroskop Eclipse 50i oder TS100	Nikon
Trypan Blue 0,4%	Sigma Aldrich
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio one
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio one
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich

## II. Material und Methoden

Pan T- Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec
Kühlschrank 4°C	Liebherr

Die T-Zell-Isolation erfolgte ebenfalls mit einer magnetischen Zellseparation. Hierbei erfolgte eine negative Selektion.

Die T-Zellen wurden aus zuvor bei -80°C eingefrorenen PBMCs isoliert. Die PBMCs wurden schonend im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + 10% FCS + Refobacin) aufgenommen. Danach erfolgte eine Trypanblaufärbung, um die Zellen zu zählen und auf Vitalität zu prüfen. Die benötigte Zellzahl wurde in ein weiteres Falcon pipettiert und bei 300 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und pro  $1,0 \times 10^7$  Zellen wurden 40 µl HBSS (+ EDTA + FCS) und 10 µl Pan TCell Biotin-Antibody Cocktail (Miltenyi Biotec) hinzugegeben, resuspendiert und für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 30 µl Puffer (HBSS + FBS + EDTA) pro  $1,0 \times 10^7$  Zellen und 20 µl Pan TCell MicroBeads Cocktail (Miltenyi Biotec) hinzugegeben, resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Säule vorbereitet. Eine LS-Säule wurde in einen Magnetständer eingespannt und mit 3 ml Puffer (HBSS + FBS + EDTA) äquilibriert. Für das Eluat wurde ein frisches Falcon unter die Säule gestellt.

Nach der Inkubation bei 4°C wurden noch 500 µl Puffer (HBSS + FBS + EDTA) zu den Zellen gegeben und der gesamte Zellansatz direkt auf die Säule pipettiert. Das Falcon wurde mit 500 µl Puffer (HBSS + FBS + EDTA) gewaschen und ebenfalls auf die Säule gegeben. Nachdem die gesamte Zellaufschwemmung die Säule passiert hatte, folgte ein Waschschrift mit 3 ml Puffer (HBSS + FBS + EDTA). Da die Zellen nicht mit *Microbeads* beladen wurden, verbleiben sie nicht in der Säule, sondern werden als Eluat direkt aus der Säule gespült.

Das T-Zell-Eluat im Falcon wurde anschließend bei 300 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet wurde in 3 ml vorgewärmten Medium (37°C) aufgenommen. Es folgte eine Trypanblaufärbung zur Zellzählung und Vitalitätsprüfung. Die T-Zellsuspension wurde auf eine Endkonzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml

## II. Material und Methoden

---

eingestellt. Die T-Zellen wurden zum allogenen T-Zell-Assay mit unterschiedlichen moDCs verwendet.

### 2.10 Allogener T-Zell-Assay

Materialien:

24-Well Zellkulturplatten	Corning Inc. Lieve Sciences
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies
Refobacin 120 µg/ml	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
Pipette 1000µl	Eppendorf
Pipettenspitze 1000 µl	StarLab
Pipette 100µl	Eppendorf
Pippettenspitze 100 µl	StarLab
Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific

Die maturierten moDCs und die T-Zellen wurden im Verhältnis von 1:10 [1 Teil moDCs ( $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ ) + 9 Teile T-Zellen ( $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ )] zusammengegeben. Es folgt eine schematische Übersicht:

**Tabelle 1: Pipettierschema allogener T-Zell-Assay**

Well/Reaktionsgefäß	Bezeichnung	T-cells [ $\mu$ l]	Medium [ $\mu$ l]	moDCs [ $\mu$ l]
1	Med Ctrl	∅	500	∅
2	T-cell Ctrl	450	50	∅
3	NCtrl1 + T	450	∅	50
4	NCtrl 2 + T	450	∅	50
5	HCtrl 1 + T	450	∅	50
6	HCtrl 2 + T	450	∅	50
7	NLPS 1 + T	450	∅	50
8	NLPS 2 + T	450	∅	50
9	HLPS 1 + T	450	∅	50
10	HLPS 2 + T	450	∅	50
11	NAF 1+ T	450	∅	50
12	NAF 2+ T	450	∅	50
13	HAF 1+ T	450	∅	50
14	HAF 2 + T	450	∅	50
15	NCtrl1	∅	450	50
16	NCtrl2	∅	450	50
17	HCtrl1	∅	450	50
18	HCtrl2	∅	450	50
19	NLPS1	∅	450	50
20	NLPS2	∅	450	50
21	HLPS1	∅	450	50
22	HLPS2	∅	450	50
23	NAF1	∅	450	50
24	NAF2	∅	450	50
25	HAF1	∅	450	50
26	HAF2	∅	450	50

## II. Material und Methoden

Zuerst wurde das Medium (RPMI 1640 + 10% FBS + Refobacin) in 24-Well-Platten vorgelegt, dann wurden die T-Zellen hinzugegeben. Zuletzt wurden die unterschiedlichen moDCs zum Ansatz pipettiert. Der Versuchsansatz wurde kurz durch leichtes Schwenken der Platten gemischt und für 72h bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Je nach vorhandener Zellmenge, welche von Spender zu Spender variierte, wurden biologische Replikate angesetzt.

### 2.11 Ernte des T-Zell-Assays

Materialien:

Pipette 1000µl	Eppendorf
Pipettenspitze 1000 µl	StarLab
Safe-Lock Microzentrifuge Tube, 1,5 ml	Eppendorf
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
BD FACSCalibur	BD Biosciences
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipette 100µl	Eppendorf
Pipettenspitze 100 µl	StarLab
Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
FACS Tubes	BD Biosciences
Anti-CD80-APC	BD Biosciences
Anti-Ig1-APC	BD Biosciences
Anti-CD83-PE	BD Biosciences
Anti-IgG1-PE	BD Biosciences
Anti-CD86-FITC	BD Biosciences
Anti-IgG1-FITC	BD Biosciences
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Solution	BD Biosciences

## II. Material und Methoden

FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Light-Safe micro centrifuge tubes 0,5 ml	Sigma Aldrich
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Kühlschrank 4°	Liebherr

Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen auf Eis geerntet. Dabei wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze vom Plattenboden gelöst und die Aufschwemmung in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde jedes Well mit 500 µl Puffer (HBSS + FBS + EDTA) gespült. Die Eppendorf-Gefäße wurden bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert und bei -20°C eingefroren. Aus diesen Überständen wurden später die Zytokin-Analysen durchgeführt.

Die Zellpellets wurden mit 200 µl Puffer (HBSS + FBS + EDTA) resuspendiert und die Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD83 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 2.12 Autologer T-Zell-Assay

Der oben beschriebene T-Zell-Assay wurde zusätzlich bei 3 verschiedenen Spendern in einem autologen Setting durchgeführt. Hierzu wurden vom gleichen Spender, von dem die moDCs generiert wurden, am Tag der CD14+-Monozyten-Ausplattierung PBMCs bei -80°C eingefroren. Aus diesen PMBCs wurden dann im Verlauf des Experiments die T Zellen mit dem Pan T-Zell Isolation Kit isoliert. Der weitere Versuchsablauf ist deckungsgleich zum allogenen T-Zell-Assay.

## 3. Durchflusszytometrie

### 3.1 CD80, CD83 und CD86-Messung

Materialien:

BD FACSCalibur	BD Biosciences
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipette 100µl	Eppendorf
Pipettenspitze 100 µl	StarLab
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich

## II. Material und Methoden

Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich
FACS Tubes	BD Biosciences
Anti-CD80-APC	BD Biosciences
Anti-Ig1-APC	BD Biosciences
Anti-CD83-PE	BD Biosciences
Anti-IgG1-PE	BD Biosciences
Anti-CD86-FITC	BD Biosciences
Anti-IgG1-FITC	BD Biosciences
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Solution	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Lichtgeschützte Reaktionsgefäße 1,5 ml	Hartenstein
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Kühlschrank 4C°	Liebherr
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific

Bei der Durchflusszytometrie passieren Zellen durch den Prozess der hydrodynamischen Fokussierung in Form eines laminaren Partikelstroms einzeln einen Laserstrahl und erzeugen ihrerseits eine Streuung des Laserlichts. Durch Detektion des Vorwärts (forward scatter (FSC)) - und Seitwärtsstreulichts (side scatter (SSC)) können verschiedene Zellpopulationen erfasst werden. Der FSC Detektor befindet sich in der Achse der Laserquelle und erkennt vorwärts gestreutes Licht, das der Größe der Zelle entspricht. Die Vorwärtsstreuung entsteht durch die Oberfläche der Zelle. Der SSC Detektor steht in einem 90° Winkel zum Laserstrahl. Seitliche Streuung des Lichts wird durch lamellare Strukturen in der Zelle verursacht und ist proportional zu deren Körnung/Granularität der Zelle. Der Laserstrahl erregt zudem fluoreszente Moleküle, die daraufhin Licht eines charakteristischen Spektrums emittieren. Die Detektion



## II. Material und Methoden

unterschiedlicher Fluoreszenzsignale ermöglicht zusätzlich eine Analyse der Oberflächeneigenschaften der Zellen.

Für die Messung der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 wurden die moDCs bei 500 x g und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und die Zellpellets anschließend in 200 µl Puffer (HBSS + 10% FBS + EDTA) resuspendiert. Es wurden 12 FACS-Röhrchen vorbereitet (vgl. Tabelle 2).

Für  $2,5 \times 10^5$  Zellen wurden 4 µl Anti-CD80-APC bzw. 4 µl Anti-IgG1, 6 µl Anti-CD83-PE bzw. 6 µl Anti-IgG1 und 6 µl Anti-CD86-FITC bzw. 6 µl Anti-IgG1 verwendet. Die jeweils drei Antikörper wurden in einem opaken Eppendorf-Gefäß zusammengeführt und gevortext. Anschließend wurde die Antikörper-Mischung zu den moDCs pipettiert und der gesamte Ansatz wurde für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Die Isotyp Färbungen(=Anti-IgG1) dienten als Negativ-Kontrollen, welche das Ausmaß an Hintergrundsignal des Primärantikörpers aufzeigen.

**Tabelle 2: Pipettierschema für die Durchflusszytometrie**

FACS-Röhrchen Nr.:		Volumen	Volumen Antikörper-Mischung
1a	moDCs – Normoxie unstimuliert	100 µl	12µl
1b	moDCs – Normoxie unstimuliert	100 µl	12µl
2a	moDCs – Hypoxie unstimuliert	100 µl	12µl
2b	moDCs – Hypoxie unstimuliert	100 µl	12µl
3a	moDCs – Normoxie mit LPS stimuliert	100 µl	12µl
3b	moDCs – Normoxie mit LPS stimuliert	100 µl	12µl
4a	moDCs – Hypoxie mit LPS stimuliert	100 µl	12µl
4b	moDCs – Hypoxie mit LPS stimuliert	100 µl	12µl
5a	moDCs – Normoxie mit <i>A.fumigatus</i> stimuliert	100 µl	12µl
5b	moDCs – Normoxie mit <i>A.fumigatus</i> stimuliert	100 µl	12µl
6a	moDCs – Hypoxie mit <i>A. fumigatus</i> stimuliert	100 µl	12µl
6b	moDCs – Hypoxie mit <i>A. fumigatus</i> stimuliert	100 µl	12µl

## II. Material und Methoden

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit 4 ml Puffer (HBSS + 10% FBS + EDTA) gewaschen und anschließend für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Analyse erfolgte mit dem FACS-Calibur BD. Die FACS-Daten wurden mit FlowJo (BD) ausgewertet.

### 4. Zytokinmessung mittels ELISA

#### 4.1 INF $\gamma$ -Messung mittels ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)

Materialien:

ELISA Reader GENios FL	Tecan
ELISA Washer hydroFlex	Tecan
ELISA Max™ Set	Biolegend
Multipette	Eppendorf
Combitips	Eppendorf
Coating Buffer	Selbst hergestellt
Wash Buffer	Selbst hergestellt
Ampuwa®Spüllösung	FreseniusKabi
Assay Diluent	Selbst hergestellt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumcarbonat	Carl Roth
PBS (10x)	
Tween 20	Sigma Aldrich
PBS (1x)	
BSA	Carl Roth
TMB Substrat	Biolegend
Safe Lock Microtubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
96- Well-Platte	Greiner Bio-one
1000 $\mu$ l XL Filterspitze	StarLab
Präzisionswaage GF-200	A & D Instruments
Folie zur Abdeckung der Titerplatte	R & D Systems

## II. Material und Methoden

Kühlschrank 4°	Liebherr
MS1 Minishaker	IKA
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Pipette 100µl	Eppendorf
Pipettenspitze 100 µl	StarLab
Gefrierschrank -80°C	

Die Aktivierung der T-Zellen wird durch die Produktion von Interferon  $\gamma$  repräsentiert. Die Konzentration von IFN $\gamma$  wurde mittels eines ELISA Max<sup>TM</sup> Sets von BioLegend gemessen.

24 h vorher wurde die Titerplatte beschichtet. Hierzu wurde der Anti-IFN $\gamma$ -Capture-Antikörper 1:200 mit dem Coating-Buffer verdünnt. Zur Herstellung von 100 ml Coating Buffer wurden 100 mM Natriumhydrogencarbonat und 34 mM Natriumcarbonat in ml sterilem Wasser gelöst. Jeweils 100 µl Verdünnung wurden mit einer Multipette pro Well pipettiert. Die Titerplatte wurde mit Folie überklebt, damit der Puffer nicht verdunstet und über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert, um das Binden des Antikörpers an die Titerplatte zu gewährleisten.

Nach der Inkubationszeit wurden die überschüssigen Capture-Antikörper durch viermaliges Waschen (hydroFlex) mit Waschpuffer (1fach PBS + 0,05% Tween 20) entfernt. Nach dem Waschen wurde mit einer Multipette 200 µl Assay Diluent (1% BSA in 1fach PBS) pro Well pipettiert und die Platte wurde für 1 Stunde unter Schütteln (300 rpm) bei RT inkubiert, um Störreaktionen zu reduzieren.

Der lyophilisierte Protein-Standard wurde in 200 µl Assay Diluent gelöst. Anschließend wurden 20 µl Aliquots hergestellt und bei -80°C aufbewahrt. Zum Erhalt einer Standard-Kurve wurde der Protein-Standard in Assay Diluent diluiert. Man erhielt eine Konzentrationsreihe von 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 und 7,8 pg/ml. Die Proben wurden in RPMI 1640(+10% FCS) verdünnt.

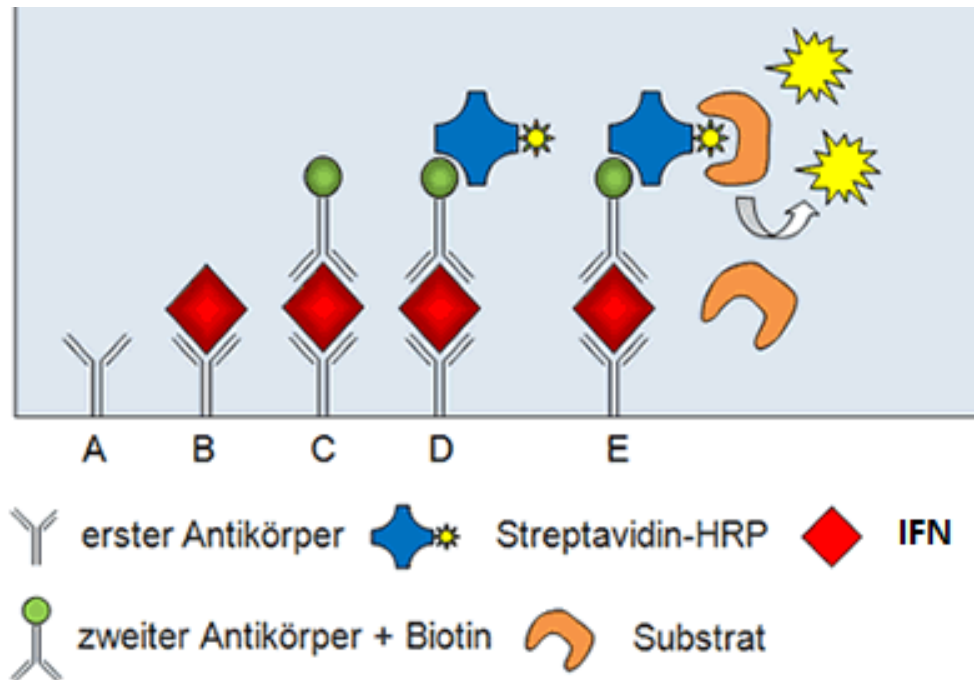
Anschließend wurden 100 µl pro Standard oder Probe in Duplikaten aufgetragen. Die Titerplatte wurde für 2 h unter Schütteln (300 rpm) bei RT inkubiert. Nach 2 h Inkubationszeit erfolgte erneut ein viermaliges Waschen der Platte mit Waschpuffer.

## II. Material und Methoden

---

Der *Detection*-Antikörper, welche an das IFN $\gamma$  bindet, wurde 1:200 mit Assay Diluent verdünnt. Dieser Antikörper erhöht zum einen die Spezifität und zum anderen wird eine Signalverstärkung hervorgerufen. Pro Well wurden 100  $\mu$ l der Verdünnung mit der Multipette auf die Platte gegeben. Die Platte wurde erneut für 1 h unter Schütteln (300 rpm) bei RT inkubiert.

Nach viermaligem Waschen der Platte wurde Avidin-HRP 1:1000 mit Assay Diluent verdünnt und 100  $\mu$ l von der Verdünnung pro Well mit der Multipette pipettiert. Die Titerplatte wurde 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen. Zur Herstellung der TMB Substrat-Lösung wurden Substrat A 1:1 mit Substrat B gemischt. Es wurden 100  $\mu$ l pro Well von dieser Lösung auf die Titerplatte gegeben und im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Stopp-Lösung wurde 1 M Schwefelsäure verwendet. Die Reaktion wurde abgebrochen, als die Standardproben ihre maximale Reaktion zeigten. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100  $\mu$ l der Schwefelsäure pro Well mit der Multipette pipettiert. Unmittelbar danach wurde die Absorption bei  $\lambda = 450$  nm mit Subtraktionskorrektur bei  $\lambda = 570$  nm am GENios (Fa. Tecan; Software XFluor4) gemessen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der Standardkurve bestimmt und mittels Microsoft Excel 2013 anhand einer Regressionsgerade berechnet. Abbildung 4 soll das Prinzip nochmals veranschaulichen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des IFN-Nachweises mittels ELISA:**

IFN $\gamma$  bindet an den ersten und zweiten Antikörper. Durch Zugabe von Streptavidin-HRP und Substrat findet eine enzymatische Reaktion statt, die das Substrat in einen blauen Farbstoff umwandelt. Durch Zugabe der Stopplösung ändert sich der Farbstoff von blau zu gelb. (Entnommen von *dermatest.de* [11])

#### 4.2 Multiplex-Assay

Um die Zytokinproduktion durch die moDCs nach 72 h in T-Zell Kokultur zu messen, wurden die Kokultur-Überstände von 3 unterschiedlichen Spendern mittels einem BioPlex Pro<sup>®</sup> System analysiert. Die Messung erfolgte durch Frau Dr. Kerstin Hünninger in Zusammenarbeit mit dem Hans-Knöll-Institut, Jena.

#### 4.3 Analyse von IL12/23(p40) und IL12(p70)

Materialien:

IL12/23(p40) ELISA Max <sup>™</sup> Standard	Biologend
IL12(p70) ELISA Max <sup>™</sup> Standard	Biologend

Die Konzentrationen von IL12/23(p40) und IL12(p70) wurden mittels eines ELISA Max<sup>™</sup> Standard Sets von Biologend gemessen. Gearbeitet wurde nach dem mitgelieferten

Protokoll. Detaillierte Auflistung der Materialien und Durchführung sind oben beschrieben unter 4.1.

### 4.4 IFN $\gamma$ -Analyse anhand einer Zeitreihe

Um die IFN $\gamma$ -Ausschüttung der T-Zellen über den Zeitraum von 72 h zu betrachten, wurden pro Spender jeweils drei Zellkulturplatten (24 Well) angelegt und unterschiedlich lange inkubiert. Eine Platte wurde nach 24 h, eine Platte nach 48 h und die dritte Platte wurde, wie oben bereits beschrieben, nach 72 h geerntet. Die Überstände wurden bei -20°C eingefroren. Die IFN $\gamma$ -Konzentrationsmessung aus diesen Überständen erfolgte durch das ELISA Max™ Standard Set der Firma Biolegend.

## 5. Apoptosedektion mittel Annexin/PI-Analyse

### 5.1 Annexin/PI-Analyse

Materialien:

APC Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Solution	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Light-Safe micro centrifuge tubes 0,5 ml	Sigma Aldrich
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Sicherheitswerkband HERAsafe®KS 18	Thermo Fisher Scientific
BD FACSCalibur	BD Biosciences
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipette 10 $\mu$ l/200 $\mu$ l	Eppendorf
Pippettenspitze 10 $\mu$ l/200 $\mu$ l	StarLab
FACS Tubes	BD Biosciences

Um die Viabilität der Zellen zu überprüfen und zu vergleichen, wurden die moDCs sowohl nach der 24h-Inkubation unter Normoxie bzw. Hypoxie und nach den 72h in Kokultur mit T-Zellen mit Annexin V-APC und Propidium Iodid (PI) gefärbt. Das Prinzip

dieser Färbung beruht auf der Veränderung der Plasmamembran apoptotischer Zellen. Gehen Zellen in Apoptose über, verlagern sie das Phospholipid Phosphatidylserin von der Innenseite ihrer Zellmembran auf die Außenseite. Annexin V kann dann an dieses Phospholipid binden. Annexin V kann allerdings nicht ins Zellinnere eindringen. Um zu unterscheiden, ob sich die Zellen in Apoptose befinden oder bereits nekrotisch sind, führt man gleichzeitig eine Färbung mit PI durch. Dieser Farbstoff kann Membranen von toten oder defekten Zellen überwinden und sie im Innern anfärben. Dementsprechend sind viable Zellen weder Annexin V noch PI positiv. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Fluoreszenz gemessen und mit dem Programm FlowJo ausgewertet.

### 6. Glucose/Laktat-Messung

Materialien:

Serum-Monovette, 2,7 ml, Glukosebestimmung	Sarstedt
Pipette 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen blau 1000 µl	StarLab
Cobas C701	Roche

Aus den Überständen des allogenen T-Zell-Assays und von einem Spender des autologen T-Zell-Assays erfolgte eine Glucose und Laktat-Bestimmung. Dafür wurden jeweils 500µl jeder Probe in eine Serum-Monovette® Glucose und Laktat von Sarstedt überführt. Diese Serum Monovette ist mit Fluoridsalzen benetzt, die den Glucosespiegel in der Probe stabilisieren. Die Messung erfolgte photometrisch durch eine Blutgasanalyse (Cobas C701) im Zentrallabor den Uniklinikum Würzburg.

**7. Immunoblotting**

**7.1 STAT3 – Immunoblotting**

Materialien:

Safe-Lock Microzentrifuge Tube, 2,0 ml	Eppendorf
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipette 10 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl	Sarstedt
- 20°C Isotherm System	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Kühlschrank 4C°	Liebherr
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR
Spannungsgerät PowerPac Basic	BioRad
Gelkammer	BioRad
Taschenkamm	BioRad
Sonifizierer UP50H	Hielscher Ultrasonics
ThermoCycler	Applied Biosystems
50 ml Falcons	Greiner bio-one
Küchentücher	ZEWA
Blue Flash M	SERVA Elctrophoresis
Blotting Paper	Schleicher-Schell
Röntgenfilme	Fujifilm, Hartenstein
PE-Puffer	
SDS	Carl Roth
Steriles Wasser	B. Braun
PAA 3%	Sigmaaldrich
APS 10%	Sigmaaldrich
TEMED	Sigmaaldrich
TAE	Invitrogen
Tris/Glycine/SDS-Puffer	BioRad



## II. Material und Methoden

Marker Page Ruler™	ThermoFisher
10 xSemi-dry Transfer Puffer	Merck
Magermilchpulver	Carl Roth
TBS	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich
Anti-STAT3-Antikörper	Sigma Aldrich
Anti-pSTAT3-Antikörper	Sigma Aldrich
Anti-Rabbit-Antikörper	Sigma Aldrich
β-Actin-Antikörper	Sigma Aldrich
Natriumacid	Sigma Aldrich
Röntgenfilmentwickler CP1000	Agfa
ECL	BioRad
Ponceau S	Sigma Aldrich

Die Generierung und Maturierung der moDCs erfolgte wie oben beschrieben. Nach der 24h-Maturierung wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in einem 2 ml Eppendorf Gefäß gesammelt. Dann erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 500 x g bei RT. Der Überstand wurde abpipettiert und die Eppendorf Gefäße mit den Zellpellets wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Probenaufbereitung wurden die Eppendorf Gefäße in einem -20°C Iso-Therm System gestellt. Pro Probe wurden 40 µl Probenextraktions-Puffer

auf das Zellpellet gegeben, gevortext und anzentrifugiert. Anschließend erfolgte für 20 s eine Sonifikation der Proben, um die Zellen und DNA-Moleküle mit hochfrequenten Ultraschallwellen aufzubrechen.

In einem Streifen Eppendorf PCR Tubes wurden pro Eppendorf Gefäß 10 µl SDS-Puffer vorgelegt. Zu dem SDS-Puffer wurden jeweils 30 µl Probe gegeben. Der Streifen wurde geschüttelt und die Proteine auf dem Thermo-Cycler(9800 Fast ThermalCycler, Applied Biosystems) denaturiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Das Trenn – und Sammelgel wurde in einer Gelkassette (BioRad Mini Protean System) mit einer Dicken von 0,75 mm gegossen. Vorher wurden die Gele in einem 50 ml Falcon

## II. Material und Methoden

---

vorbereitet. Das 12 % Trenngel bestand aus 3,5 ml destilliertem Wasser, 2,5 ml 4-fach Resolving Gel Buffer und 4 ml PAA (3%). Das 4,5%ige Sammelgel bestand aus 3 ml destilliertem Wasser, 1,25 ml 4-fach-Stacking Gel Buffer und 0,75 ml PAA (3%). 100 µl APS (10%) und 10 µl TMED wurden zum Trenngel kurz vor dem Gießen hinzugegeben. Für das Sammelgel wurden 50 µl APS (10%) und 5 µl TMED verwendet.

Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert. Über das Trenngel wurde destilliertes Wasser geschichtet, um Austrocknung zu vermeiden. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Wasser abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Danach wurde der Taschenkamm eingesetzt. Nach der Aushärtung des Trenngels, wurden die Gele, einschließlich der Glasplatten, in feuchtes Küchenpapier eingeschlagen und in einer Plastiktüte bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zum Beladen des Gels wurde der Taschenkamm vorsichtig entfernt und das Gel wurde in die vorher mit 1x Tris/Glycine/SDS-Puffer vorbereitete Laufkammer eingespannt. Anschließend wurden die Geltaschen mit 10 µl Probe und 4 µl Marker (Page Ruler™) beladen. Danach wurden die Elektroden angeschlossen. Die ersten 10 min der Elektrophorese wurden mit 80 Volt, danach mit 160 Volt durchgeführt.

Nach dem Durchlauf des Gels wurden die aufgetrennten Proteine geblottet (Blue Flash-M, SERVA Electrophoresis). Vor dem Blotten wurde das Blotting-Papier in Semi-dry-Puffer (10fach Semi-dry-transfer-Buffer, 20% Methanol) eingelegt. Pro Gel wurde mit 75 mA für 90 min geblottet.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 60 min mit Milchpuffer (5 g Milchpulver + 100 ml TTBS) geblockt. TTBS wurde aus 10fach TBS, 900 ml destilliertem Wasser und 1 ml Tween 20 hergestellt.

Anschließend wurde der Primärantikörper (Anti-Mouse, 1:1000) auf die Membran gegeben, nachdem Milchpuffer entfernt wurde und die Membran für 5 min mit TTBS (1fach TBS + 1 ml Tween 20) gewaschen wurde. Der Puffer wurde entfernt und die Antikörper-Verdünnung (Rabbit-Anti-STAT3, 1:1000 oder Rabbit-Anti-pSTAT3, 1:1000, jeweils in TTBS + BSA-Puffer und Natriumazid gelöst) auf die Membran gegeben. Die Membran wurde ÜN bei 4 °C auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dreimal für 5 min mit TTBS auf dem Schüttler gewaschen und die Sekundäantikörper-Verdünnung (Anti-Rabbit, 1:5000) auf die Membran gegeben.

Die Membran wurde 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TTBS und ein einmaliges Waschen für 5 min auf dem Schüttler mit TBS. Danach wurde die Membran mit einem lumineszierenden Reagenz für 5 min inkubiert. Zur Detektion des spezifischen Proteins wurde das Reagenz entfernt und die Membran mittels ECL-Lösung und Röntgenfilmen in der Dunkelkammer entwickelt.

Zur Sichtbarmachung des Gesamt-Proteins auf der Membran wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt. Die Ponceau-Färbung wurde wie folgt durchgeführt. Die Membran wurde mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Ponceau Lösung unter leichten Schwenkbewegungen bedeckt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde dreimal mit VE-Wasser gewaschen.

### **8. Statistik**

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden durch mindestens 3 unabhängige Versuche erzielt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-test (Microsoft Excel).

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 5. Die Signifikanzniveaus sind mit \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  gekennzeichnet.

### III. Ergebnisse

#### 1. moDC-Reifung unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie

Sowohl durch die Stimulation mit LPS als auch die Stimulation mit aktivierten Keimschläuchen findet eine vermehrte moDC-spezifische Expression der drei Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 im Vergleich zu unstimulierten Zellen statt (Abbildung 5).

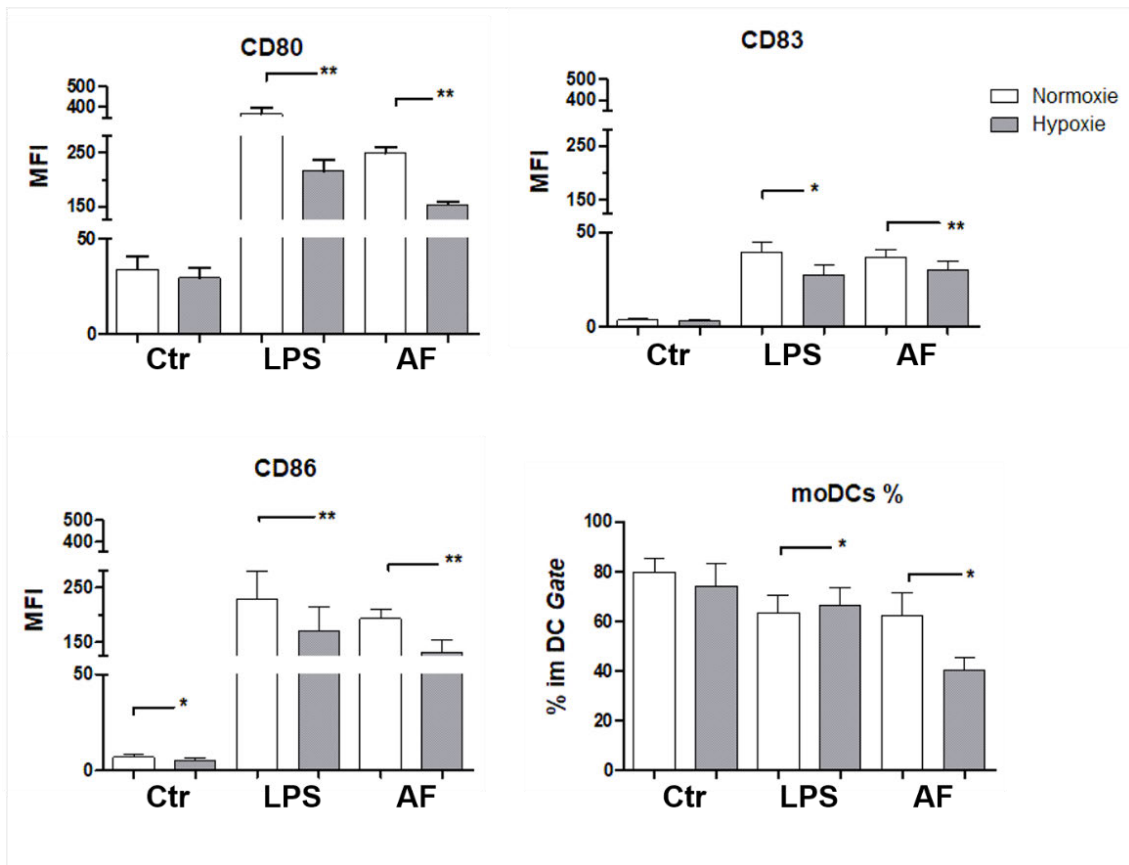
Zudem kann man feststellen, dass unter Hypoxie stimulierte moDCs eine signifikant niedrigere Expression aller drei Oberflächenmarker ausbilden verglichen mit normoxisch inkubierten moDCs (Abbildung 5 graue Balken). Bei unstimulierten moDCs ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD80 und CD83 zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Analyse des Oberflächenmarkers CD86 eine signifikant niedrigere Expression auf der Zellmembran der moDCs gemessen, die unter Hypoxie gereift waren, im Vergleich zu den unter Normoxie inkubierten moDCs (Abbildung 5 links unten).

Die Auswertung der absoluten Anzahl an moDCs im untersuchten *Gate* zeigte bei den unstimulierten moDCs keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 5 rechts unten).

Der im DC-*Gate* detektierte Anteil an hypoxisch und mit LPS stimulierten moDCs war signifikant höher als der Anteil an normoxisch und mit LPS stimulierten Zellen.

Bei den moDCs, die mit inaktivierten Keimschläuchen stimuliert wurden, zeigte sich ein signifikant gegenteiliger Effekt (Abbildung 5 rechts unten).

### III. Ergebnisse



**Abbildung 5: Expression der Oberflächenmarker CD 80, CD83 und CD86 nach 24 h Stimulation unter Normoxie oder Hypoxie.**

Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD 86 von unstimulierten moDCs (Ctrl) oder stimulierten Zellen mittels LPS (1  $\mu$ /ml) oder inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (AF, MOI = 1) für 24 h. Die Stimulation fand entweder unter Normoxie (weiß) oder unter Hypoxie (grau) statt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler vom geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI). Signifikanz \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (t-test).

#### **2. moDCs in Kokultur mit allogenen, naiven T-Zellen**

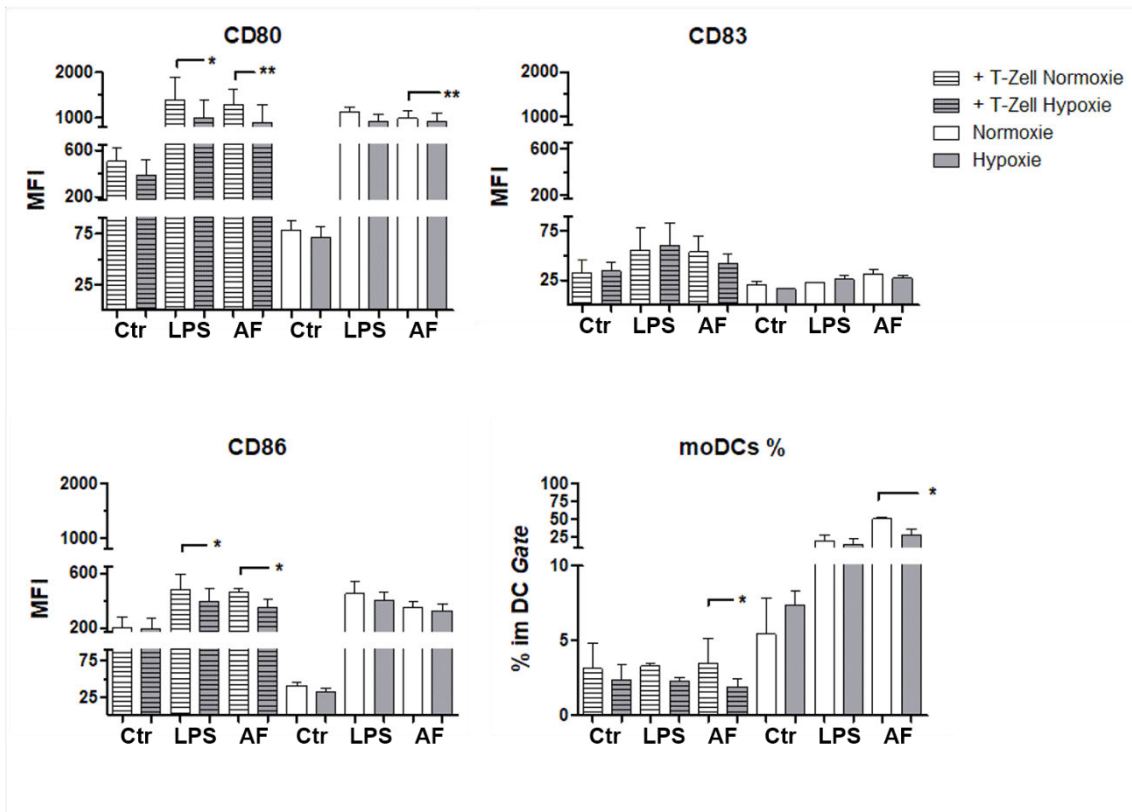
Es wurden erneut die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 durchflusszytometrisch gemessen, um den Reifegrad der moDCs zu beurteilen. Parallel wurden moDCs ohne T-Zell-Kokultur mitgeführt.

Es hat sich gezeigt, dass bei Kokultur-Proben prozentual nur wenig moDCs im *Gate* detektiert wurden (vgl. Abbildung 6 unten rechts; alle unter 5%). Bei Betrachtung des Histogramms in Abbildung 6 fällt auf, dass der Anteil der moDCs in T-Zell Kokultur unter Hypoxie immer geringer ist, als der Anteil, der unter Normoxie und in T-Zell Kokultur gereift ist. Dieser Unterschied war bei den moDCs, die mit inaktivierten Keimschläuchen stimuliert wurden, signifikant (vgl. Abbildung 6 rechts unten).

Die Analyse der Oberflächenmarker CD80 und CD86 zeigte eine signifikant niedrigere Expression bei den unter Hypoxie gereiften moDCs, welche mit T-Zellen kokultiviert wurden. Die Kontrollen zeigten ein ähnliches Ergebnis, allerdings ohne Signifikanz (vgl. Abbildung 6 links).

Die Messung des Oberflächenmarkers CD83 zeigte im Allgemeinen keine signifikanten und nur geringfügige Veränderungen (vgl. Abbildung 6 rechts oben). Unter hypoxischen Bedingungen (grau) und mit LPS Stimulation ist die CD83 Expression mit einer MFI von 65 höher als bei Inkubation in Anwesenheit von Keimschläuchen (AF) mit einer MFI von 50. Im direkten Vergleich von T-Zell kokultivierten moDCs zu moDCs Monokulturen (unabhängig von Stimulation oder Sauerstoffgehalt) (vgl. Abbildung 6 „+T-Zell“, gestreift versus ohne Muster) wird ersichtlich, dass in T-Zell Kokultur eine höhere CD83-Expression aufweist.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 6: Analyse der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 nach 72 h in T-Zell-Kokultur.**

Die unstimulierten moDCs (Ctrl) und die unter unterschiedlichen Bedingungen (Normoxie und Hypoxie) stimulierten moDCs wurden nach 24 h Stimulation mit LPS (1µg/ml) oder inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (AF, MOI = 1) für 72 h mit allogenen naiven T-Zellen kokultiviert („+ T-Zell“ gestreift). Es wurden moDCs Monokulturen mitgeführt (ohne Muster). Nach 72 h in Kokultur wurden die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler vom geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, ungepaarter t-test

#### **3. Analyse der T-Zell-Aktivierung durch moDCs mittels INF $\gamma$ -Messung**

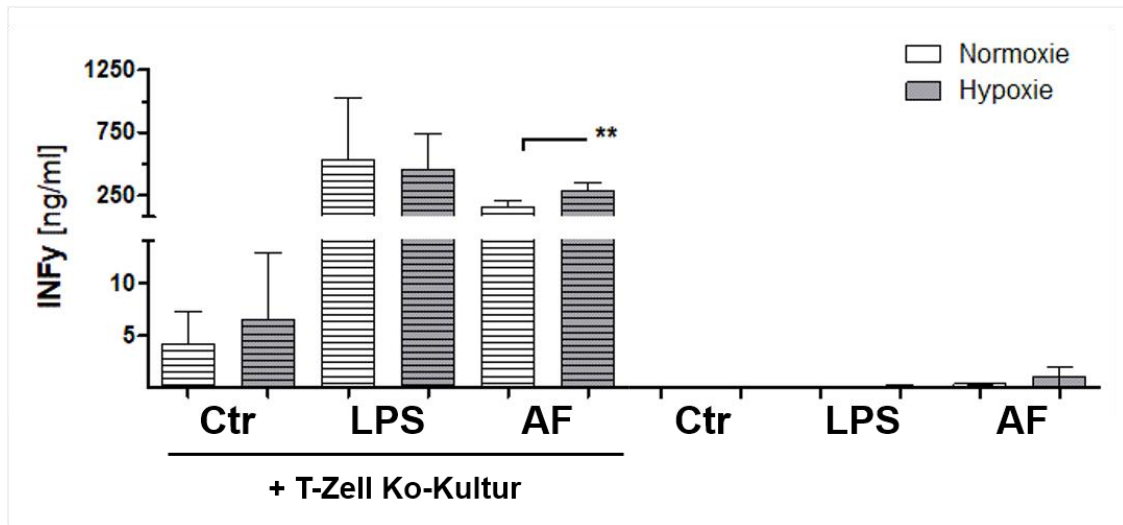
Die unstimulierten moDCs produzierten kaum oder kein INF $\gamma$  (Abbildung 7 rechts, ohne Muster). Es wird ersichtlich, dass in Anwesenheit von T-Zellen eine erhöhte Konzentration an INF $\gamma$  vorhanden ist.

T-Zellen, die durch mit LPS stimulierten moDCs unter Normoxie aktiviert wurden, produzierten mehr INF $\gamma$  aus als T-Zellen, welche durch mit LPS stimulierten moDCs unter Hypoxie aktiviert wurden (vgl. Abbildung 7 LPS weiß gestreift vs. LPS grau gestreift). Der Unterschied zeigte keine Signifikanz.

Die Messergebnisse der Kokultur-Überstände mit Keimschläuchen stimulierten moDCs zeigten einen gegenteiligen und signifikanten Effekt (vgl. Abbildung 7 AF weiß gestreift vs. AF grau gestreift).

Als Kontrolle, dass die INF $\gamma$ -Ausschüttung fast ausschließlich von den T-Zellen herrührte, wurde die INF $\gamma$ -Konzentration in den Überständen der moDCs bestimmt, die nicht mit T-Zellen in Berührung gekommen waren. Hier zeigte sich bei den unstimulierten moDCs keine INF $\gamma$ -Ausschüttung und bei den stimulierten moDCs eine Autoproduktion von maximal 1,7 ng/ml.





**Abbildung 7: Stärke der T-Zell-Aktivierung durch unterschiedlich stimulierte moDCs**  
moDCs, die unter hypoxischen Bedingungen mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* stimuliert wurden (AF grau gestreift), zeigen eine verstärkte Aktivierung von allogenen naiven T-Zellen.

Mittels ELISA wurde die INFγ-Konzentration aus den Überständen der T-Zell Kokulturen gemessen. Rechts sind als Kontrollen zur INFγ Autoproduktion die Überstände aus moDC Monokulturen aufgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Signifikanz: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Ungepaarter T-Test)

#### 4. Apoptose-Detektion nach 24 h Maturierung

Die Apoptose von dendritischen Zellen wird durch extrinsische und T-Zell-vermittelte Signale reguliert. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Apoptose der dendritischen Zellen immunsuppressiv wirkt und die T-Zell-Generierung fördert. Lebende dendritische Zellen nehmen apoptotische Zellen in sich auf und transportieren deren Antigene zur Präsentation an ihre Oberfläche. [54] Es ist möglich, dass Apoptose eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung in dieser Studie spielt.

Die Analyse des prozentualen Anteils der moDCs im *Gate* zeigte, dass sich bei den unter Hypoxie gereiften moDCs weniger Zellen im *Gate* befanden als bei den moDCs, die unter Normoxie gereift waren (vgl. Abbildung 8, rechts unten). Bei den moDCs, die mit inaktivierten Keimschläuchen stimuliert wurden, war dieser Unterschied signifikant (vgl. AF weiß vs. AF grau).

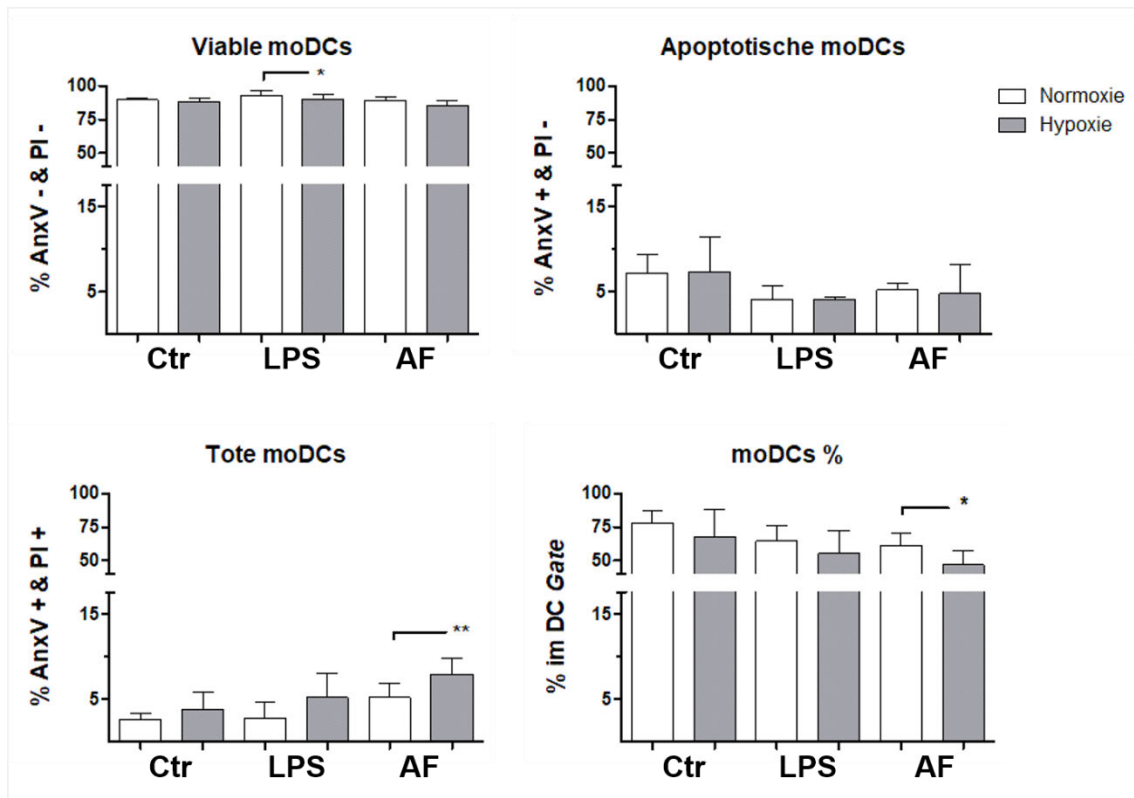
Bei der Analyse der lebenden Zellen fanden sich unter den Hypoxie Gruppen weniger lebende Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Zellpopulation, die unter Normoxie stimuliert wurden (vgl. Abbildung 8 links oben); wobei dieser Trend bei LPS stimulierten Zellen signifikant war.

Bei der Messung der apoptotischen Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 8 oben rechts).

Die Analyse der toten Zellen zeigte, dass bei hypoxischer Inkubation mehr Zellen sterben als bei normoxischen Bedingungen (vgl. Abbildung 8 unten links). Dieser Unterschied ist signifikant bei den mit Keimschläuchen inkubierten moDCs (AF weiß vs. AF grau).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter Hypoxie ein vermehrter Teil der Zellen nicht überlebt. Kommt zu Hypoxie noch ein starker Stimulus hinzu (wie durch die inaktivierten Keimschläuche von *A. fumigatus*) verringert sich die Viabilität der moDCs.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 8: Detektion apoptotischer und lebender moDCs mittels AnnexinV/PI-Färbung nach 24 h Maturierung.**

Oben links: AnxV & PI negative Zellen = viable Zellen. Oben rechts: AnxV positive & PI negative Zellen = apoptotische Zellen. Unten links: AnxV & PI positive Zellen = tote Zellen. Unten rechts wird der prozentuale Anteil der untersuchten moDCs im Gate dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler vom geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität. Signifikanz: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, ungepaarter t-test.

#### 5. Apoptose-Detektion nach 72 h in T-Zell-Kokultur

Nach 72-stündiger Kokultivierung von moDCs mit allogenen naiven T-Zellen, wurden die Zellen geerntet. Es erfolgte analog der 24 h Maturierung eine Detektion der apoptotischen, toten und lebenden Zellen mittels durchflusszytometrischer AnxV/PI-Analyse.

Die Auswertung des prozentualen Anteils von moDCs im *Gate* zeigt zunächst, dass sich bei der T-Zellkokultur weniger moDCs im *Gate* befanden, als ohne Zugabe von T-Zellen (Abbildung 9 unten rechts). Die geringere moDC Anzahl ist dadurch zu begründen, dass T-Zellen zur Kokultur in 9-facher Konzentration eingesetzt wurden und die durchflusszytometrische Messung beim Erreichen einer bestimmten Zellzahl abgeschlossen wurde.

Bei den mitgeführten unstimulierten moDC Monokulturen wurden unter Hypoxie signifikant mehr Zellen im *Gate* detektiert als im Vergleich zu den unter Normoxie gehaltenen moDCs (vgl. Abbildung 9 Ctr grau vs. Ctr weiß). Zudem überlebten signifikant mehr Zellen dieser Gruppe (vgl. Abbildung 9 oben links Ctr grau vs. Ctr. Weiß). Von den mit LPS und *A. fumigatus* (AF) unter Hypoxie (grau) stimulierten moDCs (Abbildung 9 unten rechts) wurden signifikant weniger moDCs im *Gate* gezählt im Vergleich zu den Zellen die unter Normoxie (weiß) gereift waren.

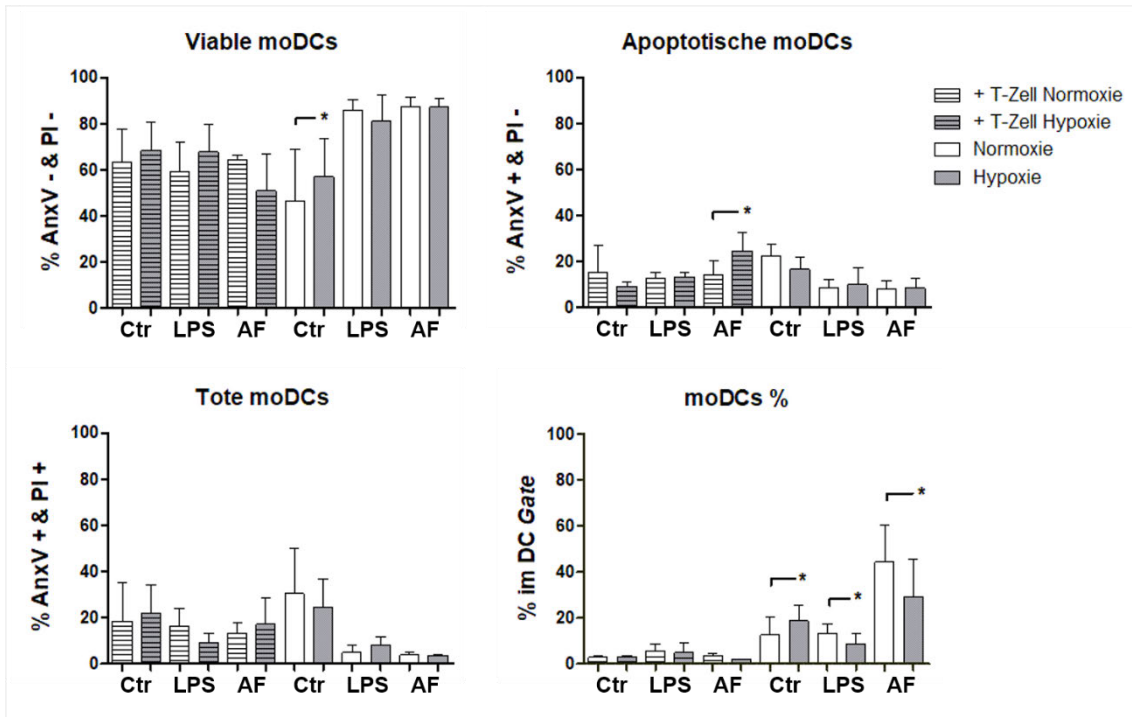
Die Auswertung der lebenden Zellen, also der AnxV und PI negativen Zellen (Abbildung 9 oben links), zeigte keinen eindeutigen Trend. Im Allgemeinen kann man erkennen, dass unter Stimulation (mit LPS oder Keimschläuchen) und in Kokultur gehaltene moDCs weniger gut überleben als die entsprechenden Proben in Monokultur (gestreift vs. Ohne Muster). Ein entsprechender Trend für Normoxie oder Hypoxie ist nicht festzustellen. In den Kontrollgruppen (Ctr gestreift und Ctr ohne Muster; jeweils weiß vs. grau) schienen unter hypoxischen Bedingungen mehr Zellen zu überleben als unter Normoxie. Das gleiche gilt für kokultivierte und mit LPS stimulierte Zellen, ist jedoch umgekehrt bei der entsprechenden Monokultur Probe (vgl. LPS gestreift vs. LPS ohne Muster). Die mit Keimschläuchen stimulierten und in Kokultur inkubierten moDCs zeigten unter

normoxischen Umständen eine höhere Viabilität als unter Hypoxie (vgl. AF gestreift weiß vs. AF gestreift grau). In den entsprechenden Monokulturen (ohne Muster) ist der Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie marginal und nicht erkennbar unterschiedlich.

Die Auswertung der apoptotischen, also der AnxV positiven und PI negativen Zellen, zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen hypoxisch und normoxisch inkubierten moDCs, welche mit inaktivierten Keimschläuchen maturiert wurden und sich in T-Zell Kokultur befanden. Unter den anderen Zellpopulationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Ein bestimmter Trend, dass die Reifung unter Hypoxie eine vermehrte Apoptose induziert, konnte ebenfalls bei den anderen Zellgruppen nicht festgestellt werden (Abbildung 9 oben links).

Bei der Auswertung der toten Zellen, also der AnxV und PI positiven Zellen, zeigte sich bei keiner Vergleichsgruppe ein signifikanter Unterschied.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 9: Detektion der toten, apoptotischen und lebenden moDCs mittels AnxV/PI-Färbung nach 72 h in T-Zell-Kokultur.**

Oben links: AnxV & PI negative Zellen = viable Zellen. Oben rechts: AnxV positive & PI negative Zellen = apoptotische Zellen. Unten links: AnxV & PI positive Zellen = tote Zellen. Unten rechts ist der prozentuale Anteil der untersuchten moDCs im *Gate* dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler vom geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität. Signifikanz: \*p < 0,05 (ungepaarter T-Test)

#### **6. Zeitreihenanalyse der INF- $\gamma$ -Ausschüttung im T-Zell Assay**

Der T-Zell Assay wurde mit moDCs vier unterschiedlicher Spender durchgeführt. Hier wurden die Zellen nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h geerntet und die INF $\gamma$ -Konzentration in den Überständen bestimmt. Ziel dieses Assays war die Ermittlung, zu welchem Zeitpunkt es zu der bereits beobachteten verstärkten INF $\gamma$  Produktion kommt, wie sie in Abbildung 7 bereits dargestellt wurde.

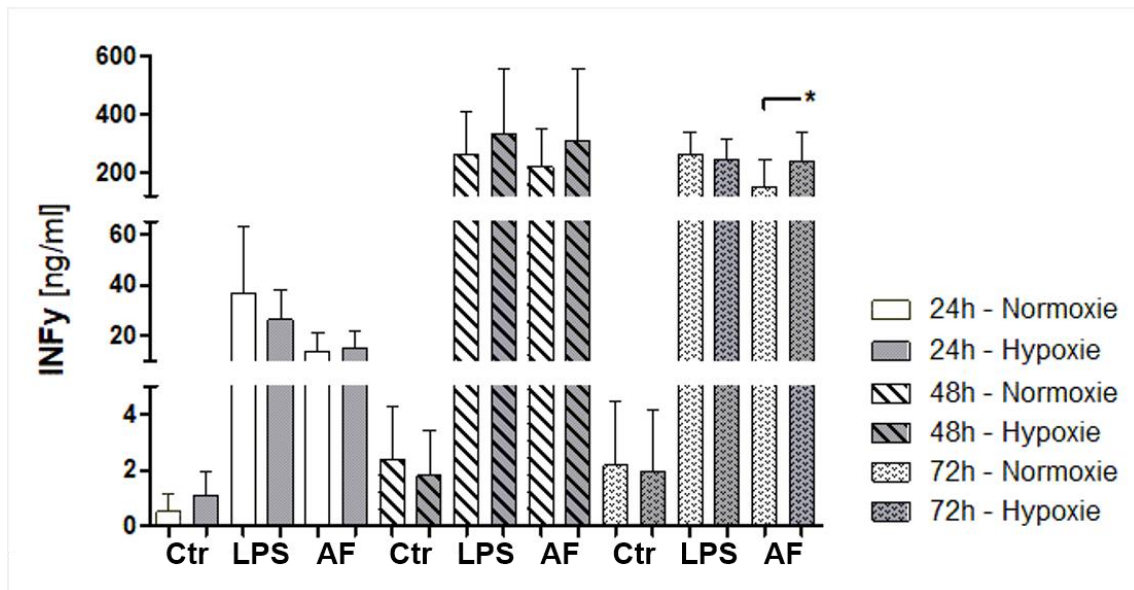
Es konnte festgestellt werden, dass nach 24 h moDCs und T-Zell-Kokultur noch kaum INF $\gamma$  produziert wurde (vgl. Abbildung 10).

Abbildung 10 zeigt die INF $\gamma$  Messung aller Proben in T-Zell Kokultur an unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten (ohne Muster = 24 h, schraffiert = 48h und gepunktet = 72 h). Zunächst kann man erkennen, dass in allen Kontrollen (Ctr = unstimuliert) kaum INF $\gamma$  produziert wurde (bis höchstens 5 ng/ml). Nach 24 h ist die INF $\gamma$  Konzentration nicht sehr stark ausgeprägt, weder bei den mit LPS oder Keimschlauch stimulierten moDCs noch unter Normoxie oder Hypoxie (bis zu höchsten 60 ng/ml). Nach 48 h stiegen die INF $\gamma$  Konzentrationen stark an.

Zwischen den Vergleichsgruppen zeigten sich keine Signifikanzen, jedoch wurde mehr INF $\gamma$  unter hypoxischen als unter normoxischen Bedingungen produziert; dies trifft zu für Proben mit LPS als auch mit Keimschläuchen stimulierten moDCs.

Nach 72 h zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie nach 48 h. Es wurde jeweils eine etwas geringere Menge INF $\gamma$  gemessen. Erwähnenswert sind hier die geringeren Standardabweichungen im Vergleich zu den Proben nach 48 h. Zwischen den Zellen, die mit inaktivierten Keimschläuchen stimuliert wurden (AF gepunktet weiß vs. grau), konnte erneut der signifikante Unterschied nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 7 AF gestreift weiß vs. grau).

Zusammenfassend kann bereits nach 48 h eine erhöhte Menge INF $\gamma$  gemessen werden. Jedoch ist ein signifikanter Unterschied der INF $\gamma$ -Produktion der allogenen naiven T-Zellen erst nach 72 h festzustellen. Zudem zeigt sich diese Signifikanz nur beim Vergleich der Kokultur in Normoxie und Hypoxie mit Keimschlauch-stimulierten moDCs (vgl. AF gepunktet weiß vs. grau).



**Abbildung 10: INF $\gamma$ -Konzentration nach 24 h, 48 h und 72 h. T-Zell kokultivierte moDCs wurden mit LPS oder Keimschläuchen (AF) zuvor stimuliert und unter Normoxie (weiß) oder Hypoxie (grau) inkubiert.**

Ctr = unstimuliert. Dargestellt sind die INF $\gamma$  Konzentrationen (gemessen mittels ELISA) zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten: 24 h = ohne Muster; 48 h = schraffiert; 72 h = gepunktet. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Signifikanz: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (ungepaarter t-Test)

### 7. Analyse der INF $\gamma$ -Ausschüttung im autologen T-Zell-Assay

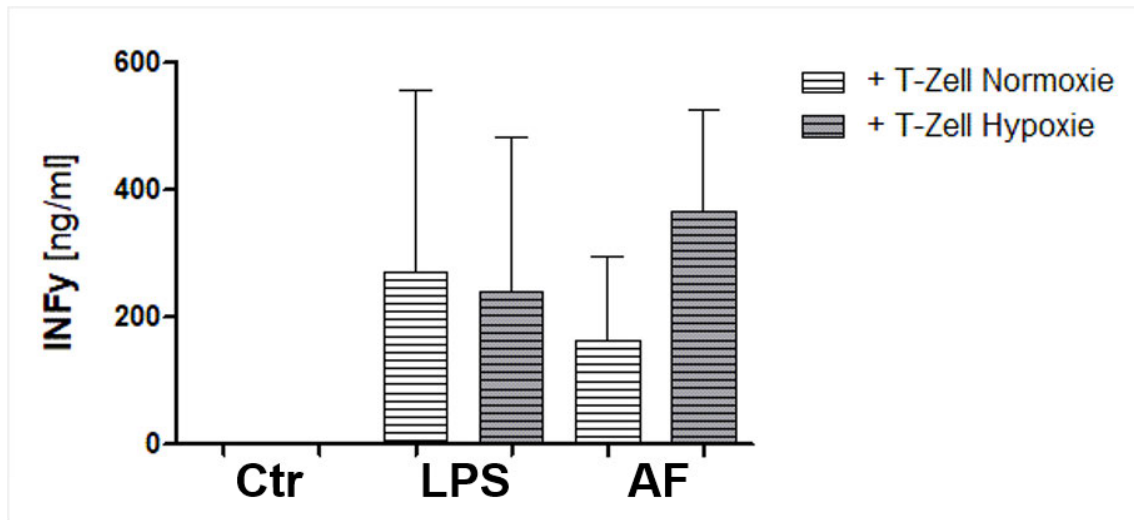
Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der beobachtete Effekt (vgl. Abbildung 10) noch messbar ist, wenn autologe T-Zellen zur Kokultur verwendet werden. Demnach wurden vom gleichen Spender, von dem die moDCs generiert wurden, PBMCs gewonnen und naive T-Zellen isoliert (siehe Methodenteil 2. Zellkulturtechniken). Die INF $\gamma$  Konzentrationen wurde erneut nach 72 h in Kokultur gemessen.

Abbildung 11 zeigt erneut eine vermehrte INF $\gamma$  Konzentration in der Kokultur, in der moDCs unter Hypoxie mit dem Pilz *A. fumigatus* stimuliert wurden, im Vergleich zu der unter Normoxie inkubierten Probe (vgl. Abbildung 11 AF gestreift weiß vs. grau). Es ist keine Signifikanz festzustellen. In der Vergleichsgruppe, die mit LPS stimuliert wurde, zeigt sich eine niedrigere Ausschüttung von INF $\gamma$ , wenn die Zellen unter Hypoxie gehalten wurden als unter Normoxie (vgl. Abbildung 11 LPS gestreift weiß vs. grau). Die



unstimulierten moDCs haben zu keiner INF $\gamma$  Produktion der T-Zellen geführt (vgl. Abbildung 11 Ctr).

Im Vergleich zum allogenen T-Zell-Assay (Abbildung 7) können die gleichen Tendenzen hier im autologen T-Zell-Assay festgestellt werden, jedoch ohne Signifikanz.



**Abbildung 11: INF $\gamma$ -Konzentration im autologen T-Zell-Assay nach 72 h.**

moDCs, welche unter hypoxischen Bedingungen mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* stimuliert wurden, zeigen eine verstärkte Aktivierung von autologen naiven T-Zellen. Weiße Balken demonstrieren normoxisch inkubierte moDCs, graue hypoxisch inkubierte moDCs. Als Kontrollen wurden unstimulierte (Ctr) moDCs mitgeführt. Stimuliert und zur Reifung gebracht wurden die moDCs entweder mit LPS oder mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (AF). Dargestellt sind die Daten von 3 unterschiedlichen Experimenten mit Standardfehler, (ungepaarter T-Test).

### 8. Zytokinanalyse nach 72 h in T-Zell Kokultur

Dendritische Zellen und T-Zellen kommunizieren nicht nur über ihre Oberflächenmarker, sondern auch über kleinste Proteine miteinander, die zum Beispiel das Zellwachstum oder die Zelldifferenzierung vorantreiben. Diese Botenstoffe, sogenannte Zytokine, wurden mittels eines Multiplex-ELISAs analysiert. Die Daten repräsentieren die Zytokin Konzentrationen der Überständen nach 72 h in T-Zell Kokultur.

Untersucht wurden die Zytokine IL12p70, IL-6, IL-10, IL-23, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-15, MIP-3 $\alpha$ , GM-CSF, IP-10, IL-4, IL-21 und RANTES. Allgemein kann man feststellen, dass bei Betrachtung der einzelnen Zytokin Konzentrationen zwischen den Spendern selbst eine starke Heterogenität vorlag. Daher wurden die Zytokin Konzentrationen einzelner Spender auf einen Trend in ihrer Konzentration untersucht. Ein Trend liegt in dieser

Definition dann vor, wenn von allen 3 Experimenten die Zytokin Konzentrationen in den Überständen der moDC-Kokulturen, die mit inaktivierten Keimschläuchen bzw. LPS unter Hypoxie stimuliert wurden (Abbildung 12 schwarze Kreise), höher oder niedriger war, als in der Normoxie-Vergleichsgruppe (Abbildung 12 weiße Kreise).

Bei den Zytokinen IL12p70, IL-6, IL-10 und IL-23 fand man eine verstärkte Sekretion in der Hypoxie-*A. fumigatus*-Gruppe im Vergleich zur Normoxie-Gruppe (Abbildung 12 grüne Überschriften). Was die dazugehörigen LPS Vergleichsgruppen betrifft, so konnte in den oben beschriebenen Zytokin Konzentrationen kein Trend beobachtet werden. Es zeigte jeweils nur 2 von 3 Spender die gleiche Tendenz zu einer verminderten (IL12p70, IL-6 und IL-10) bzw. zu einer vermehrten Sekretion (IL-23).

Bei den Zytokinen IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-15 und MIP-3 $\alpha$  konnte kein Trend festgestellt werden (Abbildung 12 schwarze Überschriften) und bei den Zytokinen GM-CSF, IP-10, IL-4, IL-21 und RANTES fand man eine verminderte Sekretion in der Hypoxie-*A. fumigatus*-Gruppe im Vergleich zur Normoxie-Gruppe (Abbildung 12 rote Überschriften).

Was die Stimulation mit LPS betrifft, so zeigen die Zytokine IL-18, IP-10 und RANTES eine erhöhte Konzentration im Vergleich zur Stimulation mit Normoxie und die Zytokine GM-CSF und IL-21 eine verminderte Konzentration.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten die IL12 Zytokinfamilie genauer betrachtet werden.

### III. Ergebnisse

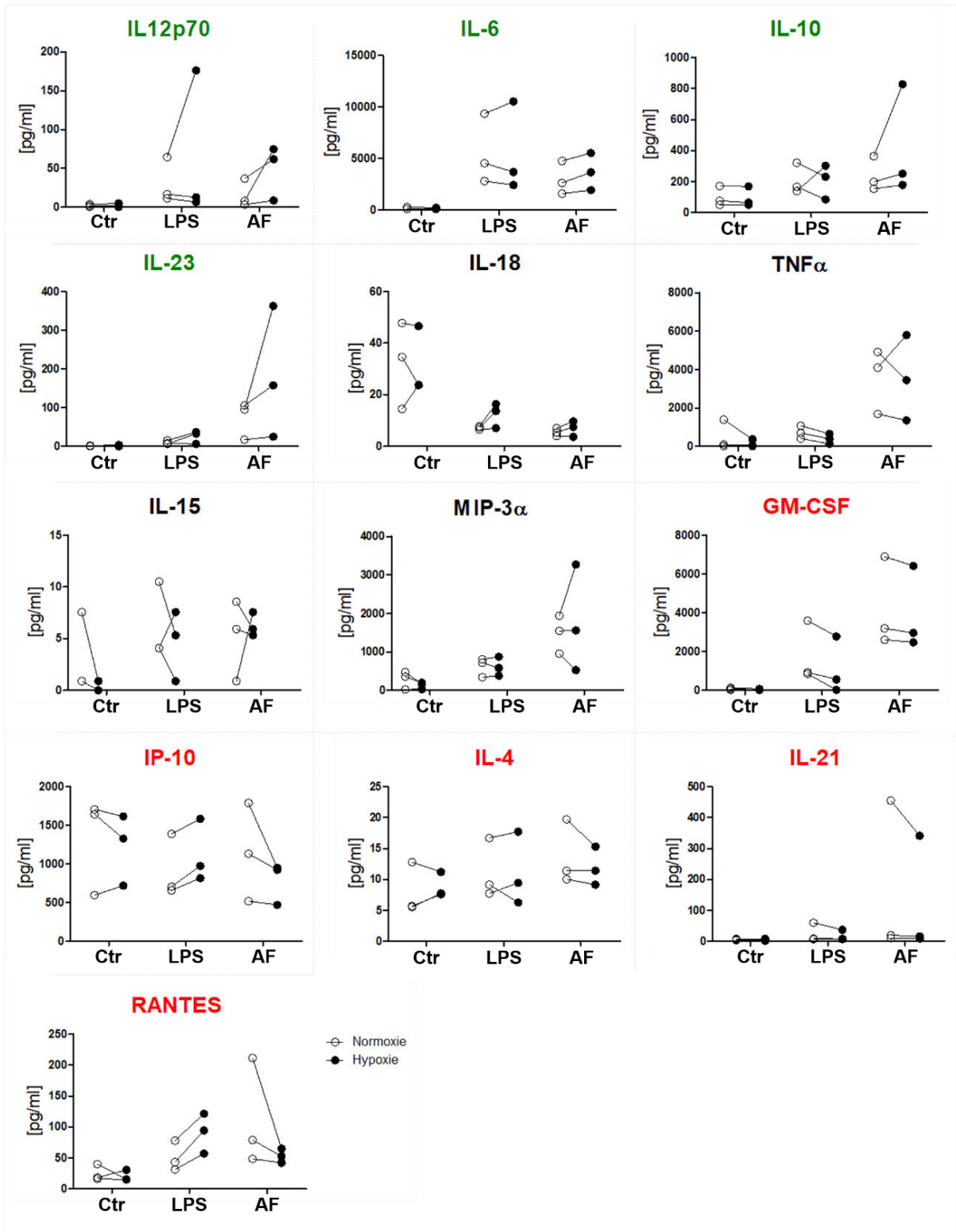


Abbildung 12: Zytokin Konzentrationen in den Überständen des 72h-T-Zell-Kokultur-Assays.

### III. Ergebnisse

---

Die Zytokinkonzentrationen wurden mittels eines Multiplex-ELISAs gemessen. Die weißen Kreise zeigen die Stimulationen der moDCs unter Normoxie, die schwarzen Kreise die Stimulationen unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) an. Ein Trend in der Zytokinproduktion liegt dieser Definition dann vor, wenn von allen 3 Experimenten die Zytokin Konzentration in den Überständen der moDC-Kokulturen, die im inaktivierten Keimschläuchen (AF) unter Hypoxie (schwarze Kreise) stimuliert wurden, höher oder niedriger war als in der Normoxie-Vergleichsgruppe (weiße Kreise). Eine grüne Überschrift bedeutet einen positiven Trend, eine schwarze bedeutet gar keinen Trend und eine rote Überschrift stellt einen negativen Trend dar. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

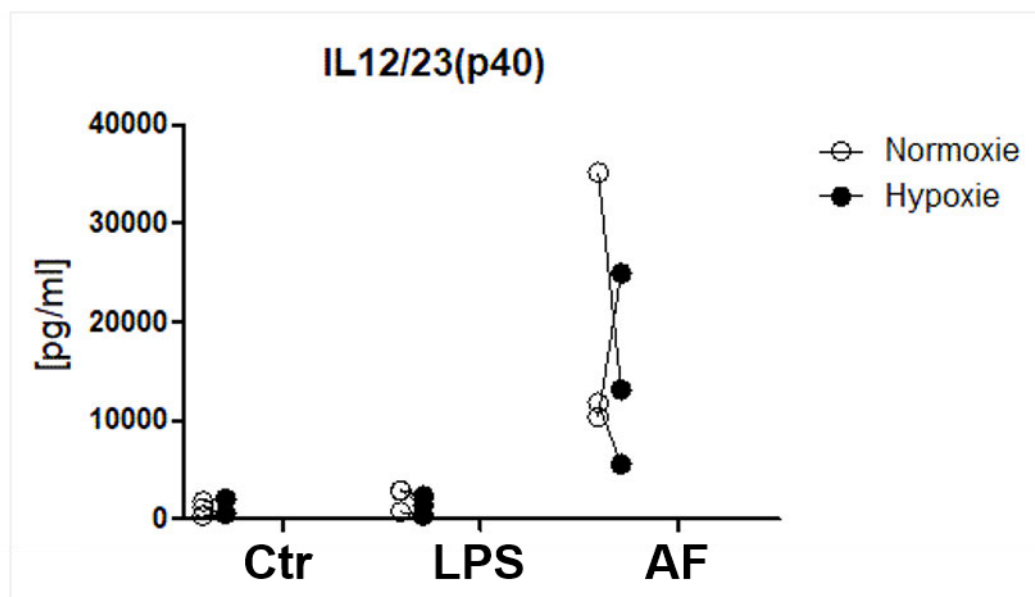
### 9. Analyse des IL12/23(p40) -Zytokinlevels nach 72 h in T-Zell Kokulturs

Die Messung der Konzentration von IL12/23(p40) erfolgte mittels ELISA. Die Konzentrationsmessung erfolgte aus den Überständen der moDC Proben nach 72 h in Kokultur mit allogenen naiven T-Zellen.

In den Überständen (Abbildung 13) der unstimulierten moDCs und der mit LPS stimulierten moDCs konnte nur eine minimale Konzentration von IL12/23(p40) gemessen werden und es bestand kein wesentlicher Unterschied zwischen den normoxisch oder hypoxisch inkubierten Zellen.

Die mit *A. fumigatus* stimulierten moDC-Proben, waren sehr heterogen. Zwei dieser Proben zeigten unter Hypoxie eine geringere Konzentration des Zytokins, die dritte Probe eine höhere Konzentration. Ein Trend war nach unserer Definition dementsprechend nicht nach zu weisen.

Die Kontrollpopulation ohne Zugabe von T-Zellen zeigten keine messbaren Werte von IL12/23(p40). Die Daten wurden daher nicht aufgeführt.



**Abbildung 13: Messung von IL12/23(p40) in den Überständen nach 72 h in Kokultur mit allogenen, naiven T-Zellen.**

Die Zytokinkonzentrationen wurden mittels ELISA gemessen. Die weißen Kreise zeigen die Stimulationen der moDCs unter Normoxie, die schwarzen Kreise die Stimulationen unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) an. AF = Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI = 1), LPS = Stimulation mit LPS (1 µg/ml) und Ctr = unstimulierte moDCs. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

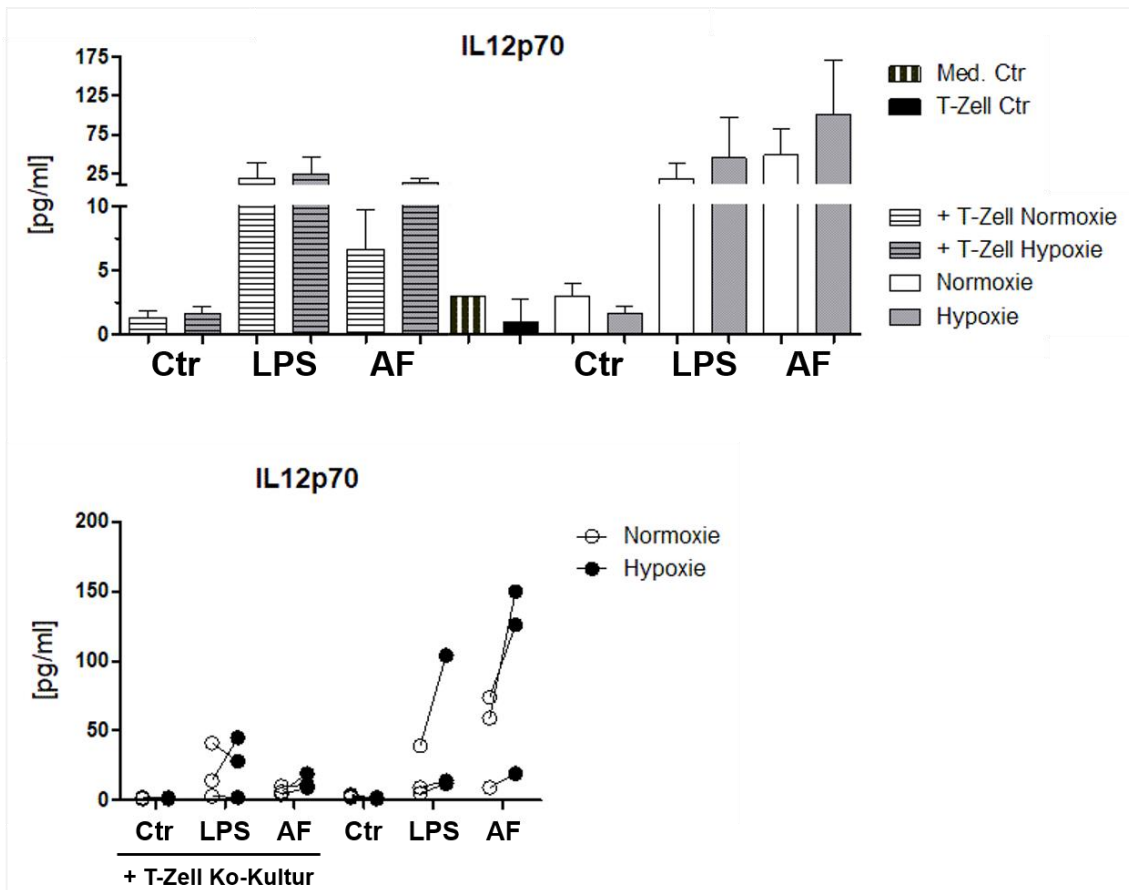
#### **10. Analyse des IL12p70-Zytokinlevels nach 72 h in T-Zell-Kokultur**

Die Messung der Konzentration von IL12p70 erfolgte mittels ELISA. Die Konzentrationsmessung erfolgte aus den Überständen der moDC Proben nach 72 h in Kokultur mit allogenen naiven T-Zellen (Abbildung 14).

Zunächst konnte festgestellt werden, dass in der Medium-Kontrolle (Med. Ctr) eine geringere Menge Zytokin detektiert wurde. Vergleicht man die unstimulierten Proben (Ctr) und auch die T-Zell-Kontrolle (schwarzer Balken) mit der Med. Ctr so sind hier keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Diese geringen Mengen IL12p70 können demnach vernachlässigt werden.

In den Überständen der T-Zell Kokulturen konnte sowohl bei den mit LPS stimulierten moDCs, als auch bei den mit *A. fumigatus* stimulierten moDCs eine nicht signifikante, jedoch stärkere Sekretion unter Hypoxie als unter Normoxie gemessen werden (vgl. Abbildung 14 weiß gestreift vs. grau gestreift). Es konnte bei dieser Probengruppe zudem kein Trend beobachtet werden (Abbildung 14 unten AF und LPS gestreift). Zudem kann man beobachten, dass die moDC Monokulturen eine höhere IL12p70 Sekretion zeigen als die moDCs in T-Zell Kokultur. Es zeigt sich bei beiden Monokulturen (LPS und AF-Monokultur) ein nach unserer Definition Trend zu einer verstärkten Sekretion von IL12p70 unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie. Eine Signifikanz zwischen den entsprechenden Normoxie und Hypoxiegruppen zeigte sich nicht (vgl. Abbildung 14 oben weiß ohne Muster vs. grau ohne Muster).

### III. Ergebnisse



**Abbildung 14: Messung von IL12p70 in den Überständen nach 72 h in Kokultur mit allogenen, naiven T-Zellen.**

Die IL12p70-Konzentration wurde mittels ELISA gemessen.

**Abbildung 14 oben** zeigt die gemessenen Konzentrationen in den Überständen der moDCs, die sich in Kokultur mit T-Zellen befanden. Weiß = Normoxie (21% O<sub>2</sub>), grau = Hypoxie (1% O<sub>2</sub>), gestreift = T-Zell-Kokultur, ohne Muster moDCs Monokultur, Ctr = unstimulierte moDCs, AF = moDCs stimuliert mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus*, LPS = stimuliert mit LPS (1 µg/ml). Med. Ctr = Medium Kontrolle, schwarzer Balken = T-Zell Kontrolle.

**Abbildung 14 unten** zeigt die Ergebnisse der beiden vorherigen Abbildungen zusammengefasst zur Beurteilung eines Trends. Die weißen Kreise zeigen die Stimulationen der moDCs unter Normoxie, die schwarzen Kreise unter Hypoxie. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

#### **11. Glykolytische Aktivität der moDCs nach 72 h in T-Zell-Kokultur**

Hypoxie führt bewiesenermaßen über HIF1 $\alpha$  zu einem verstärkten Glucoseverbrauch der moDCs und zu einer vermehrten Ansammlung von Laktat [41]. Es ist denkbar, dass eine verstärkte glykolytische Aktivität auch unter normalen Sauerstoffbedingungen stattfand und die T-Zellen verstärkt durch die unter Hypoxie gereiften dendritischen Zellen aktiviert wurden.

Untersucht wurde die glykolytische Aktivität, indem in den Überständen der T-Zell-Kokultur sowohl die Konzentration von Glukose als auch die von Laktat gemessen wurde (Abbildung 15).

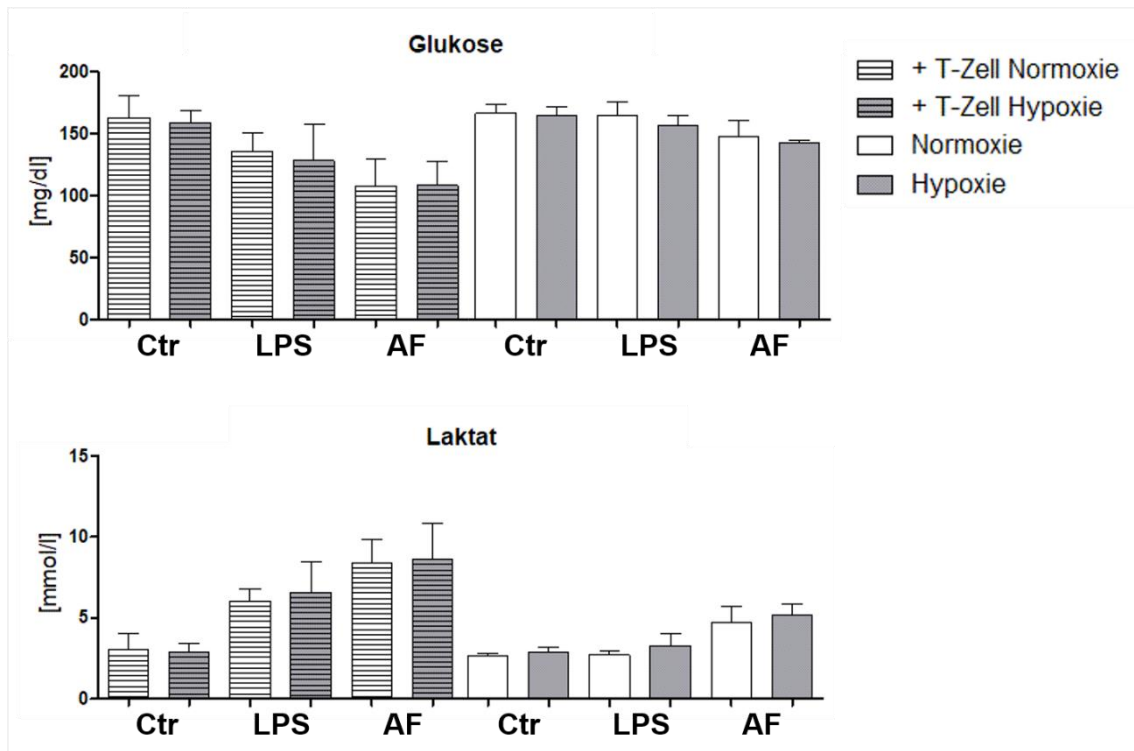
Es konnte in keiner Vergleichsprobe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allgemein konnte festgestellt werden, dass die moDCs, welche mit *A. fumigatus* stimuliert wurden den stärksten Verbrauch von Glukose und die stärkste Ansammlung von Laktat zeigten. Die Reifung unter Hypoxie oder Normoxie zeigte in den entsprechenden Proben keine großen Unterschiede.

Die Monokulturen (vgl. weiß ohne Muster vs. grau ohne Muster) zeigten ebenfalls eine verminderte Konzentration von Glukose, wenn die moDCs mit *A. fumigatus* stimuliert wurden, als wenn sie mit LPS stimuliert wurden. Konkordant zeigte sich eine verstärkte Konzentration von Laktat (vgl. Abbildung 15 unten vs. oben).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Stimulation mit *A. fumigatus* die glykolytische Aktivität am stärksten vorantreibt im Vergleich zur LPS-Stimulation, aber auch die T-Zell Kokultur an sich ohne Stimulus führt zum Verbrauch von Glukose und vermehrten Produktion von Laktat. Die Hypoxie dagegen führt zu keinem verstärkten Verbrauch und keiner verstärkten Messung von Laktat im Vergleich zur Normoxie.



### III. Ergebnisse

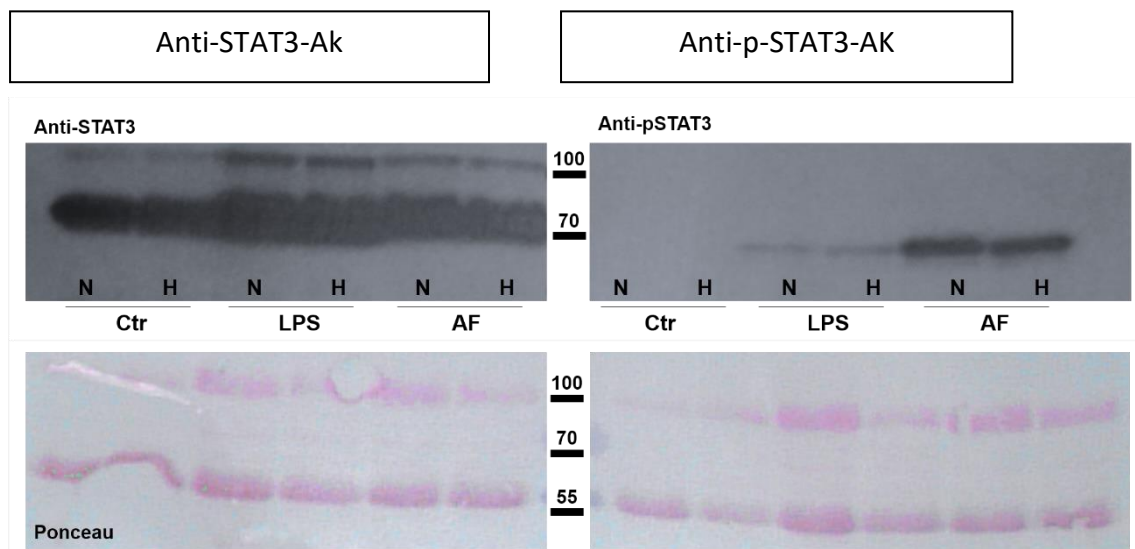


**Abbildung 15: Messung von Glukose und Laktat in den Überständen nach 72 h**

Oben: Glukosekonzentrationen der Überstände der unterschiedlich kultivierten moDCs. Unten: Laktatkonzentrationen in den Überständen der unterschiedlich kultivierten moDCs. Weiß = Normoxie (21%O<sub>2</sub>), grau = Hypoxie (1% O<sub>2</sub>), gestreift = T-Zell-Kokultur, ohne Muster moDCs Monokultur, Ctr. = unstimulierte moDCs, AF = moDCs stimuliert mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus*, LPS = stimuliert mit LPS (1µg/ml). Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler

## 12. STAT-3-Immunoblot

Die Gesamtzellextrakte der unter Normoxie und Hypoxie stimulierten moDCs wurden mittels Westernblot mit einem Anti-STAT3 und ANTI-p-STAT3-Antikörper analysiert. STAT3 wird durch eine Phosphorylierung der Aminosäure Tyr705 aktiviert. Der linke Teil der Abbildung 16 zeigt in jeder Probe eine STAT3-Bande. Der rechte Teil der Abbildung 16 zeigt einen exemplarischen Immunoblot des aktivierten STAT3 (pSTAT3). Dabei konnte bei unstimulierten moDCs kein aktiviertes STAT3 nachgewiesen werden. Bei denen mit LPS stimulierten moDCs konnte eine schwache Bande beobachtet werden und bei den mit *A. fumigatus* stimulierten moDCs zeigte sich eine deutliche Bande des pSTAT3. Die Banden der jeweiligen Proben unter Normoxie oder Hypoxie unterscheiden sich hingegen nicht.



**Abbildung 16: Expression von STAT3 und p-STAT3**

moDC Monokulturen wurden entweder für 24 h unter Normoxie (21%O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) inkubiert und mit LPS (1µg/ml) oder inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI = 1) stimuliert. Es ist ein exemplarischer Westernblot abgebildet.

### IV. Diskussion

Die invasive Aspergillose ist eine gefürchtete Infektion bei immunsupprimierten Patienten. Gerade bei Patienten, die aufgrund einer hämatologischen Grunderkrankung eine Stammzelltransplantation benötigen, ist die invasive Aspergillose häufig ein Todesurteil. [14] Es bestehen unterschiedliche Ansätze dieser Infektion zu begegnen. Zunächst einmal unterscheidet man die Prophylaxe und die Prävention. Präventiv sollten Patienten, die eine Stammzelltransplantation erhalten, zum Beispiel keinen Pfeffer oder andere Gewürze zu sich nehmen, da sie mit *A. fumigatus* kolonisiert sind. Zudem dürfen sie keinen Kontakt zu Zimmerpflanzen haben, da die Blumenerde ebenfalls kolonisiert ist. [55] Die Raumluft der Patientenzimmer wird mit einem speziellen Filtersystem (sog. HEPA-Filter) gereinigt. [56] Demgegenüber steht die prophylaktische empirische Therapie bei Hochrisikopatienten. Diese prophylaktische medikamentöse Therapie sollte nur bei hoher Wahrscheinlichkeit einer Infektion durchgeführt werden. [57]

Damit kommen wir zu einer weiteren Möglichkeit der Infektion entgegen zu treten: der Nachweis einer Aspergillose. Dieser erfolgt aktuell durch unterschiedliche Verfahren und durch die Beurteilung des Gesundheitszustandes. Dazu gehören unspezifische klinische Symptome bei neutropenen Patienten wie Fieber, der Nachweis von *Aspergillus* in einer bronchoalveolären Lavage, der Nachweis von *Aspergillus* in einer Blutkultur, ein positiver Galaktomannan-Test, eine positive PCR, Nachweis von *Aspergillus* spezifischen Antigenen und radiologische Untersuchungsverfahren wie eine Computertopografie. [14] Die rechtzeitige Erkennung von Risikofaktoren und die Entwicklung einer risikoadaptierten diagnostischen und therapeutischen Strategie sind entscheidend für die adäquate Therapieentscheidung und für die weitere Prognose. [58] Ein weiterer Ansatzpunkt eine schwerwiegende Infektion mit *Aspergillus* zu vermeiden ist die Entwicklung einer Impfung. Gegenwärtig wird hier besonders an den dendritischen Zellen aktiv geforscht. [30], [56] Sie bilden das Verbindungsstück zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. [59] *In vitro* stimulierte DCs könnten die Fähigkeit besitzen eine optimale antifungale Th1 Antwort hervorzurufen, was einem immunsupprimierten Patienten helfen könnte, eine Infektion mit *A. fumigatus*

effektiver und rechtzeitig zu bekämpfen. Sie könnten als natürliche Adjuvantien dienen. [30] Um diese Idee in naher Zukunft in die Tat umsetzen zu können, müssen allerdings, die Prozesse, die zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort stattfinden, besser verstanden werden.

Hypoxie kann zum einen Auslöser einer Entzündung sein, zum anderen werden entzündete Gewebe oft hypoxisch. Aufgrund des steilen Sauerstoffgradienten zwischen dem anaeroben Darmlumen und der metabolisch aktiven Lamina-Propria-Schleimhaut sind Darmepithelzellen physiologisch hypoxisch. [60] Es konnte gezeigt werden, dass in bakteriell infizierten Zellen die Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs sowie zelluläre Hypoxie und verminderte ATP-Spiegel mit HIF-Stabilisierung und Freisetzung angiogener Faktoren korrelieren. [61] Bei Mäusen ohne HIF-1 ist die bakterizide Aktivität in myeloiden Zellen vermindert, und die systemische Ausbreitung der Infektion kann nicht eingedämmt werden. [62]

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint der Einfluss von Hypoxie auf DCs in Interaktion mit *A. fumigatus* wenig erforscht zu sein. *Grahl et al* präsentierten 2011 die ersten *in vivo* Beobachtungen, dass hypoxische Mikrobedingungen während einer pulmonalen invasiven Aspergillose auftreten. Hier wurde eine Hypoxie mit  $O_2 \leq 1,5\%$  gemessen. [47] Also scheint Hypoxie auch ein relevanter Mikroumweltfaktor während einer IPA zu sein, welcher die Immunantwort auf *A. fumigatus* beeinflussen kann. [63] Dieser Einfluss sollte im Rahmen dieser Dissertation näher untersucht werden.

### **1. Der Effekt von Hypoxie auf moDCs**

moDCs wurden für 24 h mit LPS oder inaktivierten Keimschläuchen entweder unter Hypoxie oder unter Normoxie maturiert. Dies führte zur vermehrten Ausbildung von CD80, CD86 und CD83. LPS wurde als starker TLR2/TLR4-Ligand mitgeführt. [5] CD83 wurde als Reifemarker bestimmt und CD80 und CD86 als wichtige kostimulatorische Moleküle, um T-Zellen zu aktivieren. [21], [64] Abbildung 5 demonstriert, dass die Stimulation unter hypoxischen Bedingungen zu einer signifikant verminderten Ausbildung aller 3 Marker führt. Bei den unstimulierten moDCs zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei CD80 und CD83. Hypoxie allein scheint also keinen Effekt auf die Ausbildung dieser Oberflächenmarker zu haben. Bei CD86 ist dies anders. Hier zeigte

sich auch ein signifikanter Unterschied bei den unstimulierten DCs. Ebenfalls wird an den Kontrollen deutlich, dass die drei Oberflächenmarker auch ohne Stimulation zu einem geringen Teil auf der Oberfläche der unstimulierten DCs exprimiert werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass obwohl die Viabilität der DCs durch Hypoxie nicht verändert wird, es aber signifikant deren Phänotyp und Funktionalität verändert. Die Ergebnisse demonstrieren einen hemmenden Effekt auf die Maturierung der moDCs. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch *Bosetto et al.*, welche den Einfluss von Hypoxie auf DCs, die mit Leishmanien infiziert wurden, untersuchten. [65] Hier wurde Hypoxie allerdings mit einer Sauerstoffkonzentration von 5% erzeugt, was die Ergebnisse nicht vollständig vergleichbar macht. Zudem wurde hier auch eine reduzierte Ausbildung von CD80 bei unstimulierten DCs, welche unter Hypoxie inkubiert wurden, festgestellt. *Macino et al (2008)* beobachteten ebenfalls eine niedrigere Expression von CD80, CD86 und CD83 unter Hypoxie, entweder mit oder ohne LPS-Stimulation. Wohingegen *Goth et al (2013)* lediglich eine niedrigere Expression von CD80 und CD86 auf DCs in einem Mausmodell postulierten. [66], [67]

### **2. Hypoxie befähigt moDCs zu einer verstärkten T-Zellaktivierung**

Wie bereits erwähnt spielt die Kostimulation über CD80/86 eine entscheidende Rolle bei der vollständigen Aktivierung von T-Zellen. [25] Da diese Marker durch Hypoxie vermindert auf der Oberfläche der DCs exprimiert wurden, sollte man annehmen, dass diese Zellen auch weniger stark T-Zellen aktivieren können. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass bei DCs, welche unter Hypoxie mit *A. fumigatus* stimuliert wurden, genau das Gegenteil der Fall ist (vergleiche Abbildung 7).

Die maturierten moDCs wurden für 72 h mit allogenen naiven T-Zellen unter Normoxie in Kokultur gebracht. Das Protokoll wurde ähnlichen Studien, welche die T-Zell stimulierende Funktion von DCs untersuchten, entnommen. [66] Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. zeigt, dass auch nach 72 h in Kokultur mit T-Zellen weiterhin eine verminderte Expression aller drei Oberflächenmarker auf DCs nachzuweisen ist, welche unter Hypoxie maturiert wurden. Dementsprechend kam es zu keinerlei Nachreifung, welche die verstärkte IFN $\gamma$  Produktion von T-Zellen (siehe Abbildung 7) erklären könnte. Lediglich bei den moDCs, die unter Hypoxie mit LPS

stimuliert wurden, kam es zu einer leichten Nachreifung ohne messbaren signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 6 zweiter Graph). Die Ergebnisse von *Fliesser et al (2016)* konnten somit bestätigt werden. [68] Anschließend wurde IFN $\gamma$  mittels ELISA in den Überständen der Kokulturen gemessen. Abbildung 7 zeigt, dass eine signifikant höhere Konzentration von IFN $\gamma$  von den T-Zellen produziert wurde, welche unter Hypoxie mit *A. fumigatus* stimuliert wurden. *Jantsch et al (2008)* postulierten ebenfalls die höchste Lymphozytenstimulationskapazität von DCs, welche mit LPS unter Hypoxie stimuliert wurden. [66] Diese Tatsache konnte in unseren Versuch nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich der Effekt lediglich mit DCs, die mit *A. fumigatus* Keimschläuchen stimuliert wurden. In der Studie von *Jantsch et al* wurde allerdings kein IFN $\gamma$ , sondern die Lymphozytenproliferation gemessen.

Eine geringfügige IFN $\gamma$ -Produktion konnte auch bei unstimulierten moDCs, welche mit T-Zellen in Kokultur gebracht wurden, gemessen werden. Die T-Zellen werden also auch durch unstimulierte moDCs geringfügig aktiviert (vergleiche Abbildung 7 Ctr).

Wie bereits vorher schon beschrieben, handelt es sich bei HIF1 $\alpha$  um einen Transkriptionsfaktor, dem bei der zellulären Anpassung an niedrige Sauerstoffkonzentrationen eine Schlüsselrolle zukommt. [60], [69] *Fliesser et al (2015)* zeigten aber, dass die Hemmung des HIF1 $\alpha$ , die Kapazität T-Zellen zu aktivieren, nicht beeinflusste. [68] Dagegen zeigten *Wobben et al (2013)*, dass die T-Zellaktivierung erniedrigt werden kann, wenn DCs in ihrer HIF1 $\alpha$ -Produktion gehemmt werden. [70] Hier wurde allerdings von niedrigeren Konzentrationen von Granzym B mRNA auf eine erniedrigte T-Zellaktivierung geschlossen. Es bleibt also weiterhin unklar, welcher Mechanismus die unter Hypoxie maturierten moDCs dazu befähigte, T-Zellen verstärkt zu aktivieren.

Folgend wurde untersucht, wie lange es dauert, bis es zu der oben beschriebenen verstärkten Aktivierung des T-Zellen kommt. Deshalb wurde der T-Zell-Assay nach 24, 48h und 72 h abgebrochen und die IFN $\gamma$ -Konzentrationen in den Überständen gemessen. Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, war nach 48 h eine Maximalkonzentration von IFN $\gamma$  vorhanden. Nach 72 h ist die gemessene

IFN $\gamma$  Konzentration etwas geringer, was auf eine gewisse Instabilität des Zytokins hinweist. Die gleiche Beobachtung konnten auch *Schäfer et al* (2007) und *Lipiäinen et al* (2015) feststellen. [71], [72] Interessanterweise zeigt sich nach 48 h auch eine verstärkte T-Zellaktivierung bei moDCs, welche unter Hypoxie mit LPS stimuliert wurden, was aber nach 72h nicht mehr nachweisbar war. Die Messungen nach 48 h Stunden zeigten allerdings keine Signifikanz und einen hohen Standardfehler, was durch spenderabhängige Schwankungen begründet sein kann.

Schon lange ist die Rolle der T-Zellen bei der Transplantatabstoßungsreaktion bekannt. Fremdantigene werden von dendritischen Zellen erkannt, prozessiert und den T-Zellen präsentiert. [73] Um zu beweisen, dass die verstärkte T-Zellaktivierung in der Maturierung unter Hypoxie begründet ist und nicht durch Fremdantigene auf den moDCs hervorgerufen wird, führten wir den T-Zell-Assay erneut durch. Dieses Mal isolierten wir aber auch die naiven T-Zellen des Spenders und führten diese später seinen gereiften moDCs zu. Auch im autologen T-Zellassay zeigte sich die Fähigkeit der moDCs, welche unter Hypoxie mit *A. fumigatus* stimuliert wurden, die T-Zellen verstärkt zu aktivieren. Allerdings war dieses Mal der gemessene Effekt nicht signifikant, was ebenfalls durch spenderabhängige Schwankungen hervorgerufen werden kann (vergleiche Abbildung 11).

Es ist also anzunehmen, dass ein geringer Teil der verstärkten T-Zellaktivierung als Reaktion auf fremde MHC-Moleküle der moDCs zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass unter Maturierung unter Hypoxie die moDCs dazu befähigt eine verstärkte Immunantwort zu bewirken, bleibt aber bestehen.

### **3. Apoptose und Zelltod als möglicher zusätzlicher T-Zellaktivator**

Im Immunsystem ist Apoptose für die Lymphozytenentwicklung und Homöostase erforderlich. Die Dysregulation der Apoptose führt zu einer Vielzahl von Immunstörungen, einschließlich Immunschwäche und Autoimmunität. [74] Die Apoptose bei dendritischen Zellen ist ebenfalls ein Ereignis, was das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunität über mehrere Wege reguliert. Auch Defekte bei der DC Apoptose können Autoimmunität auslösen. [54] Dies sind nur zwei Beispiele, welche

demonstrieren, dass der Prozess der Apoptose als möglichen T-Zellaktivator nicht außer Acht gelassen werden sollte.

Beim Ablauf der Apoptose unterscheidet man zwei Wege, den intrinsischen und den extrinsischen Weg. [75] Beide Wege sind aktiv an der Regulierung von T-Zell-Antworten und Homöostase beteiligt. Mehrere antiapoptotische Moleküle wurden als Effektormoleküle identifiziert, welche zur Produktion von IL7 und kostimulatorischen Molekülen auf reifen T-Zellen führen. Naive T-Zellen benötigen aktive Signale, um zu überleben und sich einer homöostatisch angetriebenen Proliferation zu unterziehen. Zu den Hauptsignalen gehören TLR/MHCs und IL-7. Danach sind Moleküle des intrinsischen apoptotischen Signals die Haupteffektoren, die das naive Überleben von T-Zellen regulieren. [74]

Wie Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. zeigt, waren moDCs, welche mit *A. fumigatus* unter Hypoxie maturiert wurden, nicht vermehrt apoptotisch. Allerdings fanden sich vermehrt tote Zellen im *Gate*. Hypoxie mit gleichzeitiger Exposition eines starken Stimulus, scheinen also die moDCs schlechter zu tolerieren. Es könnte also sein, dass nicht der programmierte Zelltod, sondern Zelltrümmer an sich oder durch zerstörte Zellen freigesetzte Moleküle, die verstärkte T-Zellaktivierung hervorgerufen haben. Autophagie ist nachweislich am adaptiven, als auch am angeborenen Immunsystem beteiligt und kann direkt die T-Zell-Antwort beeinflussen. [76] Es könnte sein, dass durch das Prozessierung der toten Zellen durch die lebenden moDCs, es zu einer verstärkten T-Zell-Antwort kommt. [77] *Brenner et al* postulierten 2009, dass Hypoxie zu einer Apoptoseinduktion führt [78], wohingegen *Walmsley et al (2005)* ein verbessertes Überleben von Neutrophilen unter Hypoxie zeigten. In dieser Studie wurden die Zellen allerdings lediglich einer leichten Hypoxie von 16% O<sub>2</sub> ausgesetzt, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären dürfte. [79]

Nach 72h in T-Zell Kokultur konnte durchaus bei den moDCs, welche unter Hypoxie mit *A. fumigatus* maturiert worden waren, vermehrt Apoptose nachgewiesen werden. Die Annahme, dass die Apoptose bei der vermehrten T-Zellaktivierung eine Rolle spielt, kann also bestätigt werden. Allerdings würde man erwarten, dass sich dann auch der



gegenteilige Effekt bei den moDCs zeigen müsste, welche mit LPS unter Hypoxie maturiert wurden, da hier keine verstärkte IFN $\gamma$  Konzentration messbar war im Vergleich zur Normoxie (vergleiche Abbildung 7).

Wenn man sich die mitgeführten unstimulierten Kontrollen anschaut, so können die Ergebnisse von *Walmsley et al (2005)* bestätigt werden, denn hier zeigten sich vermehrt viable Zellen, wenn sie 24h einer Hypoxie ausgesetzt waren (siehe Abbildung 9 oben links). Dies konnte durch *Fliesser et al* nicht gezeigt werden. In dem Modell wurden Zellen, in denen das HIF1 $\alpha$ -Protein gehemmt wurde, mit Zellen, wo es nicht gehemmt wurde verglichen. Wenn das HIF1 $\alpha$ -Protein gehemmt war, zeigte sich in allen Bedingungen eine erniedrigte Viabilität. Im Umkehrschluss könnte man eine verstärkte Viabilität annehmen, wenn HIF1 $\alpha$  normal von moDCs produziert werden kann. Vergleicht man die Ergebnisse (weiße Balken) der unstimulierten ungehemmten siRNA-Proben, so lässt sich aber kein großer Unterschied in der Viabilität erkennen. [68] Dies könnte mit der durchgeführten Elektroporation in Zusammenhang stehen.

#### **4. IL12p70 als möglicher Verstärker der T-Zell-vermittelten Immunantwort auf *A. fumigatus***

Zytokine dienen der Kommunikation und Koordination innerhalb des Immunsystems. Zum Beispiel entscheidet die Konzentration von IL12 und IL4 darüber, ob sich naive T-Zellen in Th1 oder Th2 Zellen entwickeln. [59], [79] Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Resistenz gegen eine invasive Lungenaspergillose mit der Produktion von TNF, IL12 und IFN verbunden ist. [80] Um ein Schlüssel-Zytokin zu finden, welches eine besondere Rolle bei der Aktivierung von naiven T Zellen durch moDCs, welche unter Hypoxie gereift sind, spielt, führten wir zunächst einen Multiplex-ELISA aus den Überständen des T-Zell-Assays von 3 unabhängigen Spendern durch. Welche Zytokinkonzentrationen gemessen wurden zeigt Abbildung 12. Hier zeigte sich, dass die Reifung unter Hypoxie bei allen 3 Spendern zu einer verstärkten Produktion von IL12p70, IL-6, IL-10 und IL-23 durch die moDCs, welche mit *A. fumigatus* stimuliert wurden, führte (Abbildung 12 grüne Überschrift), wenn sie in Kokultur mit naiven T-Zellen gebracht wurden. Was die Stimulation mit LPS betraf, zeigte sich bei den Proben

kein eindeutiger Trend zu einer verstärkten oder verminderten Produktion. Die Schwankungen der gemessenen Konzentrationen sind vermutlich spenderbedingt. Zudem kann ein gewisser Konzentrationsverlust durch eine Zytokininstabilität vermutet werden.

Bei den Zytokinen GM-CSF, IP-10, IL-4, IL-21 und RANTES zeigte sich, dass eine Maturierung mit *A. fumigatus* unter Hypoxie zu einer jeweils verminderten Konzentration führte (Abbildung 12 rote Überschrift). Da jedoch die moDCs durch Zuführen von GM-CSF und IL-4 aus CD14+ Monozyten generiert wurden, ist die Messung nicht allein auf eine Produktion der moDCs zurückzuführen.

Interessanterweise führt die Maturierung von moDCs mit LPS unter Hypoxie zu einer verstärkten Produktion von IP-10 und RANTES. *Fischer et al* stellten fest, dass erhöhte Konzentrationen von RANTES eine Amplifikationskaskade auslöst und zur Synthese mehrerer weiterer proinflammatorische Chemokine und Zytokine führt. [81] *Fischer et al* demonstrierten in ihrem Mausmodell, dass Chemokine als Aktivatoren für unreife DCs dienen können. RANTES scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* zu spielen. In einer prospektiven Kohortenstudie fanden *Ellis et al* heraus, dass Patienten, die an einer schweren Sepsis verstarben, sehr niedrige und unkorrigierbare RANTES-Konzentrationen aufwiesen im Vergleich zu Patienten, die nach einer schweren Erkrankung gesund wurden und deren RANTES-Konzentrationen sich erholten. Dies scheint auch für Patienten zu gelten, welche an einer invasiven Pilzkrankung starben. Patienten, die sich von einer IPA erholten, konnten auch verstärkt RANTES neu produzieren. [81], [82] Dass Hypoxie zu einer verminderten Produktion von RANTES durch die moDCs führte, könnte also mit einer schlechteren Immunabwehr gegen *A. fumigatus* in Verbindung stehen.

IP-10, oder auch CXCL-10 genannt, bindet am CXCR3-Rezeptor und induziert Chemotaxis, Apoptose, Zellwachstum und Angiogenese. Veränderungen in der IP-10 Expression werden in Verbindung mit infektiösen Erkrankungen, Immundysfunktion und Tumorentwicklung gebracht. [83] IP-10 aktiviert den CXCR3-Rezeptor, welcher sich unter anderem auf aktivierten T- und B-Lymphozyten befindet. [83] Da es in unserer Studie zu einer verstärkten T-Zell-Aktivierung kam, obwohl die IP-10 Produktion in

moDCs, welche mit *A. fumigatus* maturiert wurden, durch Hypoxie vermindert wird, ist eine unerwartete Erkenntnis. In einer klinischen Studie, wo das Zytokinprofil in bronchoalveolären Lavages von lungentransplantierten Patienten untersucht wurde, zeigte sich eine verstärkte Konzentration von IP-10 bei Patienten, bei denen eine invasive pulmonale Aspergillose erwartet wurde. Hier wird IP-10 als möglicher Marker für ein frühes Stadium der Aspergillose im Vergleich zu Patienten, die nur kolonisiert waren, vorgestellt. [84] Von welchen Zellen die vermehrte Zytokin Produktion kam, wird in dieser Studie allerdings nicht klar. Eine zytologische Analyse wurde aus den Lavages leider nicht gemacht. Auch bei unserer Multiplex-Analyse war es uns nicht möglich ein Zytokinprofil aus den mitgeführten T-Zell-Kontrollen zu erstellen. Deswegen können die Konzentrationsmessungen auch durch eine Zytokinproduktion durch die T-Zellen selbst bedingt sein.

IL12 ist an der Differenzierung naiver T-Zellen in Th1 Zellen beteiligt und ist eines der potentesten Zytokine. [36] Dass eine Infektion mit *A. fumigatus* zu einer verstärkten Expression von IL12p70 in dendritischen Zellen führt, ist bekannt. [85] *Fliesser et al* zeigten 2016 eine verminderte Produktion durch Hypoxie nach 12 h Maturierung. [43] Über die Zytokinausschüttung von unter Hypoxie gereiften moDCs in T-Zell-Kokultur ist bisher wenig bekannt. Aufgrund unserer Multiplex-Analyse entschieden wir uns die Zytokine IL23 und IL12p70 genauer zu untersuchen.

Abbildung 13 zeigt die Konzentrationsmessungen in den Überständen nach 72h in T-Zell Kokultur. Es wurde deutlich, dass die Maturierung der moDCs mit LPS sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer verminderten Bildung von IL23 führte. Die Konzentrationen, im Vergleich zu den *A.fumigatus* Stimulationen, waren sehr gering. *Lombardi et al. (2009)* fanden eine verstärkte IL23-Produktion durch moDCs, welche mit LPS stimuliert wurden. Auch diese fanden eine starke Spenderabhängigkeit und unterschieden in *low und high responder*. Hier wurde die verstärkte Produktion allerdings durch Stimulation mit LPS und R848 hervorgerufen. Die Stimulation nur mit LPS zeigte ebenfalls eine geringe Produktion von IL23, was bedeutet, dass unsere Stimulation wahrscheinlich nicht ausreichend genug war, um die Ergebnisse von *Lomabardi et al* zu bestätigen. [86] Unsere Konzentrationsmessung von IL23 durch mit

*A. fumigatus* stimulierten moDCs zeigte ebenfalls eine starke Spendervariabilität. Zwei Spender zeigten eine geringe Produktion von IL23, ein Spender eine verstärkte Produktion, was die Ergebnisse von *Lobardi et al* nur bestätigen kann. *Gafa et al* kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Stimulation von moDCs mit LPS zu keiner verstärkten IL23-Sekretion führt, die Stimulation mit *A. fumigatus* allerdings schon. [85] IL23 könnte also eine wichtige Rolle zur Etablierung von T-Zellen bei Immungesunden spielen.

Die Messungen von IL12p70 erwiesen sich als stabiler. Hier zeigte sich bei allen drei Spendern eine vermehrte Konzentration durch moDCs, welcher zunächst unter Hypoxie mit *A. fumigatus* stimuliert wurden. Auch die moDCs, welche mit LPS unter Hypoxie stimuliert wurden, zeigten sowohl in T-Zell Kokultur als auch ohne T-Zellen eine vermehrte Produktion von IL12p70. Der Konzentrationsunterschied war allerdings hierbei sehr gering und nicht so deutlich, wie bei denen mit *A. fumigatus* stimulierten moDCs. Folglich scheint die vermehrte Sekretion von IL12p70 durch die moDCs die naiven T-Zellen verstärkt zu aktivieren. Schlussfolgernd befähigt die Maturierung unter Hypoxie die moDCs vermehrt IL12p70 produzieren zu können. Bereits 2010 diskutierten *Curtsinger et al.* (2010) ein drittes Signal, welches erforderlich ist, um T-Zellen aktivieren zu können und sprachen IL12 eine Schlüsselrolle zu. [87] Zum gleichen Ergebnis kamen *Schmidt et al.* (1999) und *Trinchieri* (2012). [87], [88] Dass IL12p70 und IL23 auch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Pilzinfektion spielt, wird von *Thompson et al* (2018) unterstützt. [89] Dass Hypoxie in dendritischen Zellen zu unterschiedlichen Zytokinprofilen und unterschiedlicher Reifung führt wird weiterhin untersucht. Hier zeigen sich nicht immer einheitliche Ergebnisse. [90] Ob Hypoxie über IL12p70 die adaptive Immunantwort verstärken kann, ist bisher nicht postuliert; die Schlüsselrolle von IL12p70 wurde aber bereits erkannt. Dies wird unter anderen in der Studie von *Carreno et al* (2013) deutlich, worin gezeigt wurde, dass eine Impfung mit dendritischen Zellen, welche IL12p70 produzieren konnten, mit einer längeren Tumorprogression einherging als eine Impfung mit dendritischen Zellen, die kein IL12p70 produzieren konnten. [91]

### **5. Ein anaerober Stoffwechsel führt nicht zu einer verstärkten T-Zell Aktivierung**

Die Aktivierung von dendritischen Zellen durch proinflammatorische Reize bewirkt eine Förderung der Glykolyse. Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  eine wichtige Rolle. Der Entzug von Zitat aus dem Zitratzyklus hat sich entscheidend für die Lipidbiosynthese bei DCs herausgestellt. Succinat aktiviert HIF1 $\alpha$  und fördert die proinflammatorische Genexpression. [66], [91] Wir wollten untersuchen, ob die Glykolyse auch in T-Zell Kokultur vermehrt aktiv ist und womöglich einen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung hat. Abbildung 15 macht deutlich, dass die Maturierung unter Hypoxie im T-Zell Assay nicht zu einer verstärkten Bildung von Laktat führte. Vielmehr zeigte sich, dass die glykolytische Aktivität der moDCs Stimulus abhängig ist. Die Stimulation von moDCs mit *A. fumigatus* führte zu einer stärkeren glykolytischen Aktivität als die Stimulation mit LPS. Dies konnte von *Fliesser et al* ebenfalls bestätigt werden. [68] Diese zeigten eine verstärkten DC Metabolismus unter Hypoxie. Auch *Srivastava et al* postulierten 2019 eine verstärkte glykolytische Aktivität von moDCs, welche mit *A. fumigatus* infiziert wurden. [92] Dies konnten wir bestätigen. Der T-Zell-Assay wurde aber unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Unsere Ergebnisse zeigen demnach, dass moDCs sehr anpassungsfähig sind und dass sie schnell auf Veränderungen der Umgebung reagieren können.

### **6. Maturierung unter Hypoxie führt nicht zu einer vermehrten STAT3-Aktivität**

*Mirjam Fliesser* konnte 2015 im Rahmen ihrer Dissertation STAT3 als wichtigen Transkriptionsfaktor bei der Aktivierung von DCs unter Hypoxie mit *A. fumigatus* identifizieren. [68] Aufgrund dieser Daten entschieden wir uns zu untersuchen, ob aktives STAT3 durch moDCs, welche unter Hypoxie mit *A. fumigatus* stimuliert wurden, vermehrt messbar ist. Abbildung 16 zeigt einen exemplarischen Westernblot. In unserer Studie zeigte sich kein vermehrtes p-STAT3 durch Maturierung unter Hypoxie. Allerdings konnte gezeigt werden, dass moDCs vermehrt p-STAT3 bilden, wenn sie mit *A. fumigatus* stimuliert werden, als mit LPS. Zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen *Wei Gao et al* (2015), die eine erhöhte p-STAT3 Konzentration in Fibroblasten fanden, welche aus der Synovialflüssigkeit von Pateinten stammte, die an einer rheumatoiden Arthritis litten.

[93] Die diskrepanten Ergebnisse liegen wahrscheinlich an den unterschiedlichen Zellarten (Fibroblasten vs. moDCs), welche unter Hypoxie untersucht wurden.

Dass STAT3-Defizienz ein Risikofaktor ist, eine invasive Aspergillose zu entwickeln, publizierten *Donald C. Vinh et al* 2010. Diese zeigten an Patienten, welche am autosomal dominanten STAT3-defizienten Hyper-IgE-Syndrom (AD-HIES) litten, dass ein STAT3-Mangel zu einer verspäteten Abwehr gegen Pilzinfektionen führt. Diese verspätete Abwehr hatte aber nichts mit der Funktion von PBMCs zu tun. Vielmehr wurde dies in der Funktion von STAT3 bei der epithelialen Integrität und in seiner Rolle, Epithelzellen zu ermöglichen auf von Th17 stammende Zytokine mit einem Hochregulieren von antimikrobiellen Peptiden zu reagieren, begründet. [93], [94] In dieser Studie wurden PBMCs von AD-HIES Patienten isoliert und mit *A. fumigatus* infiziert. Es wurde lediglich die Hemmung des Pilzwachstums untersucht, welche sich zwischen gesunden Spendern und kranken Spendern (STAT3-Mangel) nicht unterschied. Wir konnten zeigen, dass STAT3 in moDCs eine wichtigere Rolle bei der Infektion mit *A. fumigatus* im Vergleich zu einer bakteriellen Infektion (LPS-Stimulation) spielt.

*Wang et al* zeigten 2010, dass die erhöhte Aktivität von STAT3 in Tumorzellen zu einer Hemmung von dendritischen Zellen in ihrer Reifung und zur IL-12 Produktion führen. Daraus schlossen sie, dass eine Hemmung der STAT3 Signalkaskade nicht nur zu einer direkten Tumorunterdrückung führen könnte, sondern auch die angeborene Antitumorimmunität aktivieren könnte. [52], [95] Da in unserer Studie die Maturierung mit *A. fumigatus* unter Hypoxie moDCs am stärksten dazu befähigte T-Zellen zu aktivieren, und auch hier STAT3 stark messbar war, könnte man eher auf eine verminderte Aktivität schließen, wenn man den STAT3 Signalweg in dendritischen Zellen hemmen würde. *Lingna Xu et al (2018)* fanden bei immunsupprimierten Mäusen, welche an einer IPA erkrankt waren, eine erniedrigte Aktivität von STAT3. Hier wurde STAT3 auf dem Level von mRNA gemessen. [96] Nach dessen und unseren Ergebnissen würde man ebenfalls vermuten, dass eine erniedrigte STAT3 Aktivität mit einem schlechteren *Outcome* einer IPA vergesellschaftet ist. *Camargo et al* publizierten 2015, dass Patienten, welche an einer IA litten, eine erniedrigte STAT3-Phosphorylierung in naiven T-Zellen und Monozyten zeigten und unterstützten damit die Annahme, dass der

IL-6/STAT3 Signalweg eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus* spielen muss. [51]

Zusammenfassend kann man festhalten, dass STAT3 bei der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* eine wichtige Rolle zu spielen scheint. STAT3 scheint aber keine Rolle bei der vermehrten T-Zell Aktivität zu spielen, welche durch moDCs hervorgerufen wird, die unter Hypoxie mit *A. fumigatus* maturieren.

## Zusammenfassung

Das bessere Verstehen der Pathogenese des Pilzes, des Immunsystems und der Abläufe, welche im menschlichen Körper bei einer invasiven Aspergillose von statten gehen, kann neue Therapieansätze erbringen.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Infektion von dendritischen Zellen mit *A. fumigatus* unter Hypoxie, die dendritischen Zellen anschließend unter Normoxie dazu befähigt, eine verstärkte adaptive Immunantwort hervorzurufen. Hypoxie könnte somit als zusätzlicher Faktor verwendet werden, um dendritischen Zellen als effektive Adjuvantien in einer Impfung gegen *A. fumigatus* zu verwenden.

Ursächlich für diese verstärkte Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren, scheint zum einen die Apoptose und zum anderen eine verstärkte Produktion von IL12p70 zu sein.

Umso besser wir die molekularen Abläufe einer invasiven Aspergillose verstehen, umso mehr steigt die Wahrscheinlichkeit, dieser - besonders bei Immunsupprimierten - gefürchteten Infektion entgegen zu treten.



## Literaturverzeichnis

- [1] J. R. Köhler, A. Casadevall, and J. Perfect, "The spectrum of fungi that infects humans," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–22, 2015.
- [2] J. Varga, G. Szigeti, N. Baranyi, S. Kocsubé, C. M. O’Gorman, and P. S. Dyer, "Aspergillus: Sex and Recombination," *Mycopathologia*, vol. 178, no. 5–6, pp. 349–362, 2014.
- [3] J. P. Latgé, "Aspergillus fumigatus and Aspergillosis," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 310–350, 1999.
- [4] J. L. Hsu *et al.*, "Aspergillus fumigatus Invasion Increases with Progressive Airway Ischemia," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e77136, 2013.
- [5] T. H. Mogensen, "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 240–273, 2009.
- [6] L. Romani, "Immunity to fungal infections," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 4, pp. 275–288, 2011.
- [7] N. Grahl, K. M. Shepardson, D. Chung, and R. A. Cramer, "Hypoxia and fungal pathogenesis: To air or not to air?," *Eukaryot. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 560–570, 2012.
- [8] K. M. Shepardson, "Hypoxia enhances innate immune activation to Aspergillus fumigatus through cell wall modulation," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [9] V. Nizet and R. S. Johnson, "Interdependence of hypoxic and innate immune responses," vol. 154, no. 11, pp. 2262–2265, 2014.
- [10] M. Mezger *et al.*, "Proinflammatory Response of Immature Human Dendritic Cells is Mediated by Dectin-1 after Exposure to Aspergillus fumigatus Germ Tubes," *J. Infect. Dis.*, vol. 197, no. 6, pp. 924–931, 2008.
- [11] <https://www.dermatest.de/messmethoden/enzyme-linked-immunoabsorbent-assay-elisa>
- [12] T. F. Patterson *et al.*, "Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 63, no. 4, pp. e1–e60, 2016.
- [13] P. D. Barnes and K. A. Marr, "Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and

- Treatment," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 20, no. 3, pp. 545–561, 2006.
- [14] K. Al-SHAIR et al, "Invasive Aspergillus-Infektionen", Zeitschrift für Chemotherapie, vol. 1, pp. 1–10, 2014.
- [15] J. Latgé, "Aspergillus fumigatus and Aspergillosis Aspergillus fumigatus and Aspergillosis," vol. 12, no. 2, pp. 310–350, 1999.
- [16] T. R. T. Dagenais and N. P. Keller, "Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in invasive aspergillosis," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 3, pp. 447–465, 2009.
- [17] Z. G. Ramirez-Ortiz and T. K. Means, "The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (A," pp. 635–646, 2012.
- [18] Jose F. Camargo and Shahid Husain, "Immune Correlates of Protection in Human Invasive Aspergillosis", *Clinical Infectious Diseases*, vol. 59, no. 4, pp. 569-577, 2014.
- [19] C. Lass-Flörl, E. Roilides, J. Löffler, D. Wilflingseder, and L. Romani, "Minireview: Host defence in invasive aspergillosis," *Mycoses*, vol. 56, no. 4, pp. 403–413, 2013.
- [20] J. K. H. Tan and H. C. O. Neill, "Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity.", *Journal of Leucocyte Biology*, vol. 78, p 320-324, 2005
- [21] S. Braedel *et al.*, "Aspergillus fumigatus antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4," *Br. J. Haematol.*, vol. 125, no. 3, pp. 392–399, 2004.
- [22] A. Schlitzer, N. McGovern, and F. Ginhoux, "Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 9–22, 2015.
- [23] B. F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "From the "Basel Institute for Immunology, CH-4005, Basel, Switzerland; and the \*Department of Immunology, Istituto Superiore di SanitY, 1-00161, Rome, Italy," *J. Exp. Med.*, vol. 179, no. April, 1994.
- [24] S. Bozza *et al.*, "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.*, vol. 168, no. 3, pp. 1362–1371, 2014.
- [25] L. Chen and D. B. Flies, "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 227–242, 2013.

- [26] C. Aerts-Toegaert *et al.*, "CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 3, pp. 686–695, 2007.
- [27] A. H. Sharpe and G. J. Freeman, "The B7-CD28 superfamily," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 2, pp. 116–126, 2002.
- [28] F. L. Van De Veerdonk and M. G. Netea, "T-cell subsets and antifungal host defenses," *Curr. Fungal Infect. Rep.*, vol. 4, no. 4, pp. 238–243, 2010.
- [29] S. Romagnani, M. H. Kaplan, and M. J. Grusby, "Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection," *Trends Microbiol.*, vol. 4, no. 12, pp. 470–473, 1996.
- [30] S. Bozza *et al.*, "A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation," *Blood*, vol. 102, no. 10, pp. 3807–3814, 2003.
- [31] E. Cenci *et al.*, "T Cell Vaccination in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 1, pp. 381–388, 2000.
- [32] C. Montagnoli *et al.*, "Immunity and Tolerance to Aspergillus Involve Functionally Distinct Regulatory T Cells and Tryptophan Catabolism," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 3, pp. 1712–1723, 2006.
- [33] T. Zelante *et al.*, "Th17 cells in the setting of Aspergillus infection and pathology," *Med. Mycol.*, vol. 47, no. SUPPL. 1, pp. 162–169, 2009.
- [34] S. Romagnani, "Human Th17 cells," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 1–8, 2008.
- [35] D. Fenoglio *et al.*, "V $\delta$ 1 T lymphocytes producing IFN- $\gamma$  and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*," *Blood*, vol. 113, no. 26, pp. 6611–6618, 2009.
- [36] A. Manuscript, "IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers," vol. 13, no. 8, pp. 722–728, 2014.
- [37] V. Balloy and M. Chignard, "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*," *Microbes Infect.*, vol. 11, no. 12, pp. 919–927, 2009.
- [38] C. Shao *et al.*, "Transient overexpression of  $\gamma$  interferon promotes *Aspergillus* clearance in invasive pulmonary aspergillosis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 142, no. 2, pp. 233–241, 2005.

- [39] H. K. Eltzschig and P. Carmeliet, "Hypoxia and Inflammation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 7, pp. 656–665, 2011.
- [40] R. Spirig *et al.*, "Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 $\alpha$  and dendritic cell maturation under normoxic conditions," *PLoS One*, vol. 5, no. 6, pp. 1–12, 2010.
- [41] M. Fliesser *et al.*, "Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  modulates metabolic activity and cytokine release in anti- *Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 8, pp. 865–873, 2015.
- [42] C. Peyssonnaud *et al.*, "Cutting Edge: Essential Role of Hypoxia Inducible Factor-1  $\alpha$  in Development of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis," 2019.
- [43] M. Fliesser *et al.*, "Hypoxia attenuates anti-*Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells," *Mycoses*, vol. 59, no. 8, pp. 503–508, 2016.
- [44] A. Mancino *et al.*, "Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions," *Blood*, vol. 112, no. 9, pp. 3723–3734, 2008.
- [45] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S. Sun, "NF-  $\kappa$  B signaling in inflammation," no. April, 2017.
- [46] T. Köhler *et al.*, "Influence of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  on dendritic cell differentiation and migration," pp. 1226–1236, 2012.
- [47] N. Grahl *et al.*, "In vivo Hypoxia and a Fungal Alcohol Dehydrogenase Influence the Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis," vol. 7, no. 7, 2011.
- [48] A. V Villarino, Y. Kanno, and J. J. O. Shea, "Mechanism of JAK/STAT signaling in immunity disease," vol. 194, no. 1, pp. 21–27, 2016.
- [49] J. J. O'Shea, S. M. Holland, and L. M. Staudt, "JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 2, pp. 161–170, 2013.
- [50] H. Nguyen-Jackson *et al.*, "STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction," *Blood*, vol. 115, no. 16, pp. 3354–3363, 2010.

- [51] J. F. Camargo, A. Bhimji, D. Kumar, and R. Kaul, "Impaired T Cell Responsiveness to Interleukin-6 in Hematological Patients with Invasive Aspergillosis," pp. 1–12, 2015.
- [52] G. L. Semenza *et al.*, "Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways," *Oncogene*, vol. 24, no. 36, pp. 5552–5560, 2005.
- [53] M. R. Pawlus *et al.*, "STAT3 and HIF1 $\alpha$  cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells," *Oncogene*, vol. 33, no. 13, pp. 1670–1679, 2014.
- [54] R. Kushwah and J. Hu, "Dendritic Cell Apoptosis: Regulation of Tolerance versus Immunity," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 2, pp. 795–802, 2010.
- [55] D. W. Denning, "Invasive Aspergillosis," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, pp. 781–805, 1998.
- [56] K. Göttmann and H. Holz, "Isolierungsmaßnahmen bei Patienten | Autoren," no. October 2014, 2017.
- [57] B. Bewig *et al.*, "Leitlinie zur antimykotischen Prophylaxe und Therapie invasiver Pilzinfektionen ( Erwachsene )," no. November, 2005.
- [58] J. J. Vehreschild, "Invasive Infektionen mit Aspergillus spp . und Pilzen der Ordnung Mucorales : Herausforderungen und Therapieoptionen."
- [59] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "The instructive role of dendritic cells on T-cell responses," *Arthritis Res.*, vol. 4, pp. S127–S132, 2002.
- [60] J. Karhausen *et al.*, "Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis," *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 8, pp. 1098–1106, 2004.
- [61] V. A. J. Kempf *et al.*, "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: Evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections," *Circulation*, vol. 111, no. 8, pp. 1054–1062, 2005.
- [62] C. Peyssonnaud *et al.*, "HIF-1  $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes Find the latest version : HIF-1  $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 7, pp. 1806–1815, 2005.
- [63] C. T. Taylor and S. P. Colgan, "Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 12, pp. 774–

- 785, 2017.
- [64] L. S. Van Rijt *et al.*, "Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 114, no. 1, pp. 166–173, 2004.
- [65] M. C. Bosseto, P. V. B. Palma, D. T. Covas, and S. Giorgio, "Hypoxia modulates phenotype, inflammatory response, and leishmanial infection of human dendritic cells," *Apmis*, vol. 118, no. 2, pp. 108–114, 2010.
- [66] J. Jantsch *et al.*, "Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 7, pp. 4697–4705, 2008.
- [67] A. C. G. Grodzki, C. Giulivi, and P. J. Lein, "Oxygen Tension Modulates Differentiation and Primary Macrophage Functions in the Human Monocytic THP-1 Cell Line," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [68] M. Fließer, "Hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  modulate the immune response of human dendritic cells against *Aspergillus fumigatus*," *Opus.Bibliothek.Uni-Wuerzburg.De*, 2015.
- [69] T. A. Trendeleva, D. A. Aliverdieva, and R. A. Zvyagilskaya, "Mechanisms of sensing and adaptive responses to low oxygen conditions in mammals and yeasts," *Biochem.*, vol. 79, no. 8, pp. 750–760, 2014.
- [70] R. Wobben, Y. Hüsecken, C. Lodewick, K. Gibbert, J. Fandrey, and S. Winning, "Role of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  for interferon synthesis in mouse dendritic cells," *Biol. Chem.*, vol. 394, no. 4, pp. 495–505, 2013.
- [71] H. Schäfer, G. Kliem, B. Kropp, and R. Burger, "Monoclonal antibodies to guinea pig interferon-gamma: Tools for cytokine detection and neutralization," *J. Immunol. Methods*, vol. 328, no. 1–2, pp. 106–117, 2007.
- [72] T. Lipiäinen *et al.*, "Formulation and stability of cytokine therapeutics," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 307–326, 2015.
- [73] C. A. Farrar, J. W. Kupiec-Weglinski, and S. H. Sacks, "The innate immune system and transplantation," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 10, pp. 1–16, 2013.

- [74] N. Zhang, H. Hartig, I. Dzhagalov, D. Draper, and Y. W. He, "The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes," *Cell Res.*, vol. 15, no. 10, pp. 749–769, 2005.
- [75] M. S. D'Arcy, "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy," *Cell Biol. Int.*, vol. 43, no. 6, pp. 582–592, 2019.
- [76] B. Levine and V. Deretic, "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. october, 2007.
- [77] V. Menéndez-Benito, "Autophagy in MHC Class II Presentation : Sampling from Within," *Immunity*, January, pp. 1–3, 2007.
- [78] D. Brenner and T. W. Mak, "Mitochondrial cell death effectors," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 871–877, 2009.
- [79] S. R. Walmsley *et al.*, "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$  – dependent NF-  $\kappa$  B activity," vol. 201, no. 1, pp. 105–115, 2005.
- [80] H. Hebart *et al.*, "Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies," vol. 100, no. 13, pp. 4521–4528, 2002.
- [81] F. R. Fischer, Y. Luo, M. Luo, L. Santambrogio, and M. E. Dorf, "RANTES-Induced Chemokine Cascade in Dendritic Cells," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1637–1643, 2001.
- [82] M. Ellis, "Febrile neutropenia: Evolving strategies," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1138, pp. 329–350, 2008.
- [83] Mingli Liu *et al.*, "CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [84] S. Herrera *et al.*, "Cytokine profile in lung transplant recipients with *Aspergillus* spp colonization," *Transpl. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 3, pp. 1–8, 2019.
- [85] V. Gafa *et al.*, "Human Dendritic Cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 Receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response", *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 3, pp. 1480–1489, 2006.
- [86] V. Lombardi *et al.*, " Human Dendritic Cells Stimulated via TLR7 and/or TLR8

- Induce the Sequential Production of IL-10, IFN- $\gamma$ , and IL-17A by Naive CD4 + T Cells," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 6, pp. 3372–3379, 2009.
- [87] Julie M. Curtsinger and Matthew F. Mescher, "Inflammatory cytokines as a third signal for t cell activation," *Immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 1–7, 2010.
- [88] C. S. Schmidt and M. F. Mescher, "Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo.," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 5, pp. 2561–7, 1999.
- [89] A. Thompson and S. J. Orr, "Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections," *Cytokine*, vol. 111, no. April, pp. 398–407, 2018.
- [90] S. Winning and J. Fandrey, "Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage between Innate and Adaptive Immunity," *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, 2016.
- [91] B. M. Carreno *et al.*, "IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 8, pp. 3383–3394, 2013.
- [92] M. Srivastava, E. Bencurova, S. K. Gupta, E. Weiss, J. Löffler, and T. Dandekar, "Aspergillus fumigatus challenged by human dendritic cells: Metabolic and regulatory pathway responses testify a tight battle," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 9, no. MAY, pp. 1–17, 2019.
- [93] W. Gao *et al.*, "Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 74, no. 6, pp. 1275–1283, 2015.
- [94] Tobias M. Hohl, "Immune response to invasive aspergillosis: new understanding and therapeutic opportunities," *Curr Opin Infect. Dis.*, vol. 30, no. 4, pp. 364–371, 2018.
- [95] D. C. Vinh, J. A. Sugui, D. Ph, A. P. Hsu, A. F. Freeman, and S. M. Holland, "Invasive fungal disease in autosomal-dominant hyper IgE syndrome," vol. 125, no. 6, pp. 1389–1390, 2011.
- [96] D. Zhang *et al.*, "The changes of expressive levels of IL-17A, STAT3, and ROR $\gamma$ t in different invasive pulmonary aspergillosis mice," *Infect. Drug Resist.*, vol. Volume 11, pp. 1321–1328, 2018.





## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtmikroskopie einer typischen <i>A. fumigatus</i> Spore [3].....	1
Abbildung 2: CD4+ T-Zell-Subpopulationen in einer Pilzinfektion.....	10
Abbildung 3: Aspergillus abhängige Zytokine, die eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr einnehmen.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des IFN-Nachweises mittels ELISA:.....	40
Abbildung 5: Expression der Oberflächenmarker CD 80, CD83 und CD86 nach 24 h Stimulation unter Normoxie oder Hypoxie. ....	48
Abbildung 6: Analyse der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 nach 72 h in T-Zell-Kokultur. ....	50
Abbildung 7: Stärke der T-Zell-Aktivierung durch unterschiedlich stimulierte moDCs .	52
Abbildung 8: Detektion apoptotischer und lebender moDCs mittels AnnexinV/PI-Färbung nach 24 h Maturierung.....	54
Abbildung 9: Detektion der toten, apoptotischen und lebenden moDCs mittels AnxV/PI-Färbung nach 72 h in T-Zell-Kokultur. ....	57
Abbildung 10: INF $\gamma$ -Konzentration nach 24 h, 48 h und 72 h. T-Zell kokultivierte moDCs wurden mit LPS oder Keimschläuchen (AF) zuvor stimuliert und unter Normoxie (weiß) oder Hypoxie (grau) inkubiert. ....	59
Abbildung 11: INF $\gamma$ -Konzentration im autologen T-Zell-Assay nach 72 h.....	60
Abbildung 12: Zytokin Konzentrationen in den Überständen des 72h-T-Zell-Kokultur-Assays. ....	62
Abbildung 13: Messung von IL12/23(p40) in den Überständen nach 72 h in Kokultur mit allogenen, naiven T-Zellen.....	64
Abbildung 14: Messung von IL12p70 in den Überständen nach 72 h in Kokultur mit allogenen, naiven T-Zellen.....	66
Abbildung 15: Messung von Glukose und Laktat in den Überständen nach 72 h .....	68
Abbildung 16: Expression von STAT3 und p-STAT3.....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema allogenes T-Zell-Assay.....	32
Tabelle 2: Pipettierschema für die Durchflusszytometrie.....	36

## Abkürzungsverzeichnis

Name	Erklärung
LPS	Lipopolysaccharid
TRLs	Toll-like Receptors
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
IL	Interleukin
CD	Cluster of differentiation
CM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
moDCs	Monocyte derived dendritic cells
MHC	major histocompatibility class
IFN	Interferon
Tregs	Regulatorische T-Zellen
CLRs	C-Type Lektin Rezeptoren
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated
PHDs	Polyhydroxylasen
HIF	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
NFκB	Nucleus factor κB
TNF	Tumornekrose Faktor
STAT	Signal transducer and activator of transcription protein
JAK	Janus kinase

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Name</b>	<b>Erklärung</b>
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
ÜNK	Übernachtkultur
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
FCS	Fetales Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ctr	Kontrolle
N	Normoxie
H	Hypoxie
AF	<i>A. fumigatus</i>
PI	Propidium Iodid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

Anhang

**Lebenslauf**



### **Danksagung**

Während des Entstehungsprozesses dieser Dissertation haben mich so einige besondere Menschen begleitet. Ein paar von Ihnen möchte ich hiermit aber noch einmal im besonderen Maße Dank sagen.

Zuallererst möchte ich Dr. Jürgen Löffler danken ohne den diese Dissertation gar nicht erst möglich gewesen wäre. Danke, dass du mir eine Chance gegeben hast.

Dann möchte ich Dr. Mirjam Fliesser danken, die mich als Betreuerin sowohl mental, also auch praktisch, tatkräftig unterstützt hat. Liebe Mirjam, danke, dass du neben deiner vielen Arbeit auch noch Zeit für mich gefunden hast.

Herzlichst Dank sagen möchte ich auch meiner Freundin Annegret Elting, welche mich gerade in der Schreibphase dieser Arbeit im besonderen Maße unterstützt hat. Danke für deine motivierenden Wort, fürs Korrekturlesen, die vielen nützlichen Tipps und deine aufgeopferte Zeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne die mein Studium und auch diese Arbeit nie möglich gewesen wäre. Danke, dass ihr mich immer in all meinen Vorhaben unterstützt und immer für mich da seid.