

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

Die Rolle von GSK3 im Rahmen der angeborenen Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*



Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Daniela Elisabeth Wilhelm

aus Kist

Würzburg, September 2010

Referent: Prof. Dr. med. H. Einsele
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Morschhäuser
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :
17. April 2012

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aspergillus fumigatus und invasive Aspergillose	1
1.1.1	Biologie und Pathologie von Aspergillus fumigatus	1
1.1.2	Invasive Aspergillose	2
1.1.3	Rekombinante Aspergillus fumigatus-Antigene	7
1.2	Die Immunabwehr gegen Aspergillus fumigatus	8
1.2.1	Aufbau und Prinzipien des menschlichen Immunsystems	8
1.2.2	Angeborene und erworbene Immunantwort auf Aspergillus fumigatus	10
1.3	Dendritische Zellen	13
1.3.1	Entdeckung und Ursprung	13
1.3.2	Bedeutung der DCs für die Immunantwort	14
1.4	Signaling der angeborenen Immunabwehr	18
1.4.1	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	18
1.4.2	DC-Rezeptoren für Aspergillus fumigatus	19
1.4.3	GSK3, PI3K und ihre Bedeutung für DCs	25
1.5	Zielsetzung	27
2	Material	29
2.1	Geräte	29
2.2	Verbrauchsmaterial	31
2.3	Kits	32
2.4	Reagenzien	33
2.5	Zytokine	33
2.6	Primer	34
2.7	Sonden	35

3 Methoden	36
3.1 Zellbiologische Methoden	36
3.1.1 Gewinnung von CD14-positiven Monozyten	36
3.1.2 Generierung von iDCs aus CD14-positiven Monozyten	39
3.2 Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1 Isolierung von Total-RNA	40
3.2.2 cDNA-Synthese	41
3.2.3 Quantitative real time RT-PCR	43
3.3 Statistik	48
3.4 Versuchsaufbau	48
3.4.1 Stimulierung mit rekombinanten <i>Aspergillus fumiga-</i> <i>tus</i> - Antigenen	48
3.4.2 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid	49
3.4.3 Stimulierung mit verschiedenen <i>Aspergillus fumiga-</i> <i>tus</i> - Morphologien	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Stimulierung mit rekombinanten <i>Aspergillus fumigatus</i> - Antigenen	51
4.1.1 Expression von GSK3	51
4.1.2 Expression von IL-12p35, IL-6 und IL-1 β	55
4.2 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid	62
4.2.1 Expression von IL-12p35	63
4.2.2 Expression von IL-23	66
4.3 Stimulierung mit verschiedenen <i>Aspergillus fumigatus</i> - Mor- phologien	68
4.3.1 Expression von GSK3	69
5 Diskussion	72
5.1 Aktueller Stand der Forschung	72
5.2 Stimulierung mit rekombinanten <i>Aspergillus fumigatus</i> -An- tigenen	78
5.2.1 Expression von GSK3	78
5.2.2 Expression von IL-12p35, IL-6 und IL-1 β	81
5.3 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid	85
5.3.1 Expression von IL-12p35	86

5.3.2 Expression von IL-23	90
5.4 Stimulierung mit verschiedenen Aspergillus fumigatus-Mor- phologien	94
5.4.1 Expression von GSK3	94
5.5 Ausblick	96
6 Zusammenfassung	102
7 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	105
8 Literaturverzeichnis	109
9 Abbildungsverzeichnis	118
10 Tabellenverzeichnis	120

1 Einleitung

1.1 Aspergillus fumigatus und invasive Aspergillose

1.1.1 Biologie und Pathologie von Aspergillus fumigatus

Aspergillus fumigatus ^a ist ein zur Klasse der Ascomyzeten ^b gehörender, ubiquitär vorkommender Schimmelpilz. Seine natürliche ökologische Nische ist der Erdboden, wo er sich saprophytisch von totem organischen Material ernährt. Aspergillus fumigatus ist ein sehr thermophiler Organismus. Sein Wachstum wurde bei Temperaturen bis zu 55°C, sein Überleben sogar bei Temperaturen bis zu 70°C nachgewiesen^[53]. Darüber hinaus hat er keine speziellen Anforderungen an seine Nahrung, was unter anderem seine weltweite Verbreitung erklärt.

Der Schimmelpilz Aspergillus fumigatus pflanzt sich asexuell fort. In jedem seiner sporenbildenden Organe, den Phialiden, bildet er viele tausend grünliche Konidien^[53]. Diese Konidien werden durch starke Windstöße und andere Erschütterungen freigesetzt und verbleiben wegen ihres kleinen Durchmessers von 2-3 µm und ihrer stark hydrophoben Oberfläche für lange Zeit schwebend in der Luft^[79]. Unter geeigneten Umweltbedingungen keimen die Konidien zu Keimschläuchen aus, aus denen sich Hyphen entwickeln. Diese Hyphen verzweigen sich dann zu einem Pilzmyzel, welches wiederum Phialiden und Konidien ausbildet.

Täglich atmet jeder Mensch mehrere hundert Sporen des opportunistisch pathogenen Schimmelpilzes ein, deren Konzentration in der Innen- und Außenluft wegen der extrem hohen Sporulationskapazität des Pilzes bis zu 100 / m³ betragen kann. Die eingeatmeten Konidien gelangen aufgrund ihrer Größe leicht bis in die Alveolen der menschlichen Lunge.

^aAspergillus fumigatus = lat. rauchgrauer Gießkannenschimmel

^bAscomyzeten = Schlauchpilze

Bei immunkompetenten Menschen sind diese jedoch nicht pathogen, da sie sofort vom angeborenen Immunsystem bekämpft und beseitigt werden^[54].

Die Krankheiten, die von *Aspergillus fumigatus* ausgelöst werden, betreffen aufgrund des Aufnahmemechanismus der Sporen zumeist den Respirationstrakt, nicht-respiratorische Infektionen mit dem opportunistisch pathogenen Schimmelpilz sind äußerst selten. Man unterscheidet weiterhin Krankheiten, die mit einer Kolonisierung des Respirationstraktes durch *Aspergillus fumigatus* einhergehen von solchen ohne Kolonisierung des Respirationstraktes. Zu Letzteren zählen vor allem allergische Erkrankungen wie das allergische Asthma, die allergische Sinusitis und die allergische Alveolitis, auch bekannt unter dem Namen "Farmerlunge". Die weitaus gefährlicheren Krankheiten, die eine Kolonisierung des Respirationstraktes und teilweise das invasive Wachstum des Schimmelpilzes im Wirtsgewebe beinhalten, treten in Abhängigkeit vom Zustand des Immunsystems des Patienten auf. Hierzu gehören die Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), das Aspergillom und die meist tödlich verlaufende invasive Aspergillose^[53]. Bei der ABPA handelt es sich um ein bronchiales Asthma mit passageren Lungeninfiltraten, welches vor allem Patienten mit zystischer Fibrose oder allergischem Asthma befällt. Diese Krankheit kann durch die Fibrosierung der Lunge und die Ausbildung von Bronchiektasen zu einer starken respiratorischen Funktionseinschränkung führen. Als Aspergillom, auch "Pilzball" genannt, wird das Wachstum von *Aspergillus fumigatus* in präformierten Höhlen im Lungengewebe, welche z.B. nach Erkrankungen wie der Tuberkulose oder der Sarkoidose entstehen bezeichnet^[107].

Auf die vor allem bei immunsupprimierten Patienten auftretende invasive Aspergillose wird in Kapitel 1.1.2 im Detail eingegangen.

1.1.2 Invasive Aspergillose

Bis vor etwa zwanzig Jahren war *Aspergillus fumigatus* ein sehr seltener Erreger, der vor allem mit Krankheiten wie der allergischen Alveolitis oder dem Aspergillom in Verbindung gebracht wurde. Durch die

Einführung massiv immunsuppressiver Therapien in verschiedenen medizinischen Fachbereichen und die damit verbundene Zunahme von immunsupprimierten Patienten stieg die klinische Relevanz des opportunistisch pathogenen Pilzes jedoch in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts stark an. Bis heute ist *Aspergillus fumigatus* der häufigste sich über die Luft verbreitende Auslöser schwerer invasiver Schimmelpilz-Infektionen^[53]. Neben ihm können aber auch andere Mitglieder der Gattung *Aspergillus*, wie z.B. *Aspergillus flavus* und *Aspergillus terreus* die invasive Aspergillose verursachen^[64].

Voraussetzung für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose aus der Infektion mit Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* ist eine eingeschränkte Funktion des Immunsystems. Die invasive Aspergillose tritt deshalb beinahe ausschließlich bei immunsupprimierten Menschen und besonders häufig bei Patienten mit hämatologischen Malignomen auf. Die Inzidenz der invasiven Aspergillose in der Gruppe der Patienten, die an einer akuten Leukämie leiden beträgt 5-25 %, nach allogener Stammzelltransplantation 2,3-15 % und nach autologer Stammzelltransplantation 0,5-4 %^[53,107]. Nach zytotoxischer Behandlung im Rahmen der Transplantation eines soliden Organes, vor allem der Lunge, kommt die invasive Schimmelpilz-Infektion in 0,5-5 % der Fälle vor. Auch bei HIV-Infizierten (1-12 %) und bei Patienten mit Chronisch Granulomatöser Krankheit (CGD; 25-40 %) ist die invasive Aspergillose eine häufige infektiologische Komplikation^[53].

Klassische Risikofaktoren für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose sind die schwere, prolongierte Neutropenie, eine Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten (z.B. im Rahmen einer CGD), die Transplantation von Organen (vor allem die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen oder der Lunge), eine langdauernde Hochdosistherapie mit Kortikosteroiden, hämatoonkologische Erkrankungen, zytotoxische Therapien und AIDS im fortgeschrittenen Stadium^[107]. Erst kürzlich wurden zudem die Infektion mit dem Zytomegalie-Virus (CMV), die Lymphopenie, die Therapie mit dem Virostatikum Ganciclovir und bestimmte Polymorphismen im IL-10-Gen des Wirtes als weitere Risikofaktoren identifiziert^[43].

Die Pathophysiologie der invasiven Aspergillose beginnt mit der Inokulation der Aspergillus-Sporen durch die Atemluft, mit welcher die Konidien bis in die Alveolen der menschlichen Lunge gelangen. Hier kommt es zu einer Adhäsion der Konidien an die Basallamina des Lungengewebes. Um eine Infektion auslösen zu können benötigen die Pilzsporen nun bestimmte Verteidigungsmechanismen gegen die angeborene Immunabwehr des Wirtes, da diese die eingeatmeten Sporen sofort angreift^[78]. Die Konidien, die der Immunabwehr entgangen sind beginnen auszukeimen und invasiv in das Lungengewebe einzuwachsen. Auf diesem Weg können die Hyphen auch Anschluss an Blutgefäße finden, wodurch es zur hämatogenen Dissemination des Schimmelpilzes in verschiedene andere Organe des Körpers, besonders häufig in Hirn, Leber, Nieren und Milz kommt^[53].

Die Tatsache dass der Anteil an Aspergillus fumigatus-Konidien durchschnittlich lediglich 0,3 % aller Sporen in der Luft eines Krankenhauses ausmacht, aber 90 % aller invasiven Aspergillosen durch Aspergillus fumigatus ausgelöst werden führte zur Postulation spezieller Virulenzfaktoren dieses Pilzes^[78]. Die oben beschriebenen Pathomechanismen des Schimmelpilzes legten die Annahme von Virulenzfaktoren nahe, welche die Adhäsion der Konidien an das respiratorische Epithel, die Resistenz gegen die Immunabwehr des Wirtes sowie die Invasion des Myzels in das Lungengewebe fördern.

Konidien besitzen im Gegensatz zu Hyphen eine für sie typische Oberflächenstruktur, die sich aus einer Schicht hydrophober Proteine, der sogenannten Rodlet-Schicht und einer pigmentierten Außenschicht zusammensetzt. Diese Oberflächenstruktur schützt die Konidien vor der Phagozytose durch Wirtsabwehrzellen. Die Rodlet-Schicht vermittelt darüber hinaus die Bindung der Pilzsporen an die Kollagenfasern des Lungengewebes. Die Oberfläche der Konidien weist zusätzlich viele negativ geladene Kohlenhydrate auf, welche die Bindung an Laminin und Fibronectin in der Basallamina induzieren. Hyphen verfügen dagegen über eine große Anzahl von Enzymen, die ihnen bei der Überwindung struktureller Barrieren des Wirtes hilfreich sind, wie z.B. verschiedene Elastasen und Kollagenasen. Sowohl Konidien als auch Hyphen sezernieren Toxine (z.B. Gliotoxin) und Enzyme (z.B. Katalasen), die sie vor der

Immunabwehr des Wirtes schützen^[78].

Bei der Untersuchung der genannten putativen Virulenzfaktoren anhand von Aspergillus-Mutanten und Tiermodellen konnte jedoch kein Faktor für sich alleine genommen die Virulenz von Aspergillus fumigatus hinreichend erklären. Somit wird heute eine multifaktorielle Virulenz angenommen^[78]. Außerdem sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es eventuell überhaupt keinen Schlüsselfaktor für die Virulenz des Schimmelpilzes gibt, sondern dass die außerordentliche Pathogenität von Aspergillus fumigatus im immunsupprimierten Organismus vielmehr mit seinen biologischen Charakteristika wie den besonders kleinen Konidien, dem schnellen Wachstum bei 37°C und der alimentären Anspruchslosigkeit korreliert. Diese Theorie wird auch von der Tatsache unterstützt, dass jeder Aspergillus fumigatus-Stamm potentiell pathogen ist, wenn er auf den richtigen Wirt trifft^[54].

Die klinischen Zeichen einer invasiven pulmonalen Aspergillose sind meist sehr unspezifisch und leicht zu übersehen. Häufig geht sie mit reduziertem Allgemeinbefinden, Fieber, unproduktivem Husten, Thoraxschmerzen, Gewichtsverlust, Dyspnoe und eventuell Hämoptyse einher^[53]. Auch endarterielle Embolien als Ausdruck einer Angioinvasion durch den Schimmelpilz, oft in Form schmerzloser Hautpapeln kommen vor^[8]. Von der hämatogenen Dissemination des Pilzes, welche von der Lunge ihren Ausgang nimmt ist zumeist das Gehirn betroffen. Hier führen die Hyphen von Aspergillus fumigatus zu Infarkten, Blutungen, Meningitis oder zum Epiduralabszess^[107].

Die unspezifische Klinik der invasiven Aspergillose unterstreicht die Bedeutung verlässlicher apparativer Methoden zur Diagnostik der Erkrankung. Nur eine frühzeitige, zuverlässige Diagnose eröffnet den immunsupprimierten Patienten die Möglichkeit einer rechtzeitigen Behandlung und somit eine reelle Chance diese schwere Infektion zu überleben. Eine häufig im klinischen Alltag angewandte Kombination von verschiedenen Methoden zur Diagnostik beinhaltet die Computertomographie (CT), die Anzucht einer Aspergillus fumigatus-Kultur bzw. den mikroskopischen Nachweis des Pilzes aus unterschiedlichen biologischen Materialien sowie den Nachweis von Aspergillus-Antigenen im Serum des Patienten^[53].

Der Goldstandard bleibt aber weiterhin die histopathologische Diagnose anhand einer thorakoskopischen oder offenen Lungenbiopsie, was jedoch in vielen Fällen erst post mortem gelingt^[107]. Aktueller Gegenstand intensiver Forschungen ist der Nachweis von Aspergillus-DNA mittels PCR aus dem Serum oder der Bronchoalveolarlavage (BAL)-Flüssigkeit von Patienten. In der Literatur findet man hier sehr unterschiedliche Angaben zu Sensitivität und Spezifität der PCR, außerdem existieren bis zum heutigen Zeitpunkt keine einheitlichen Standards hinsichtlich der verwendeten Primer, Reagenzien und Protokolle^[8]. Der DNA-Nachweis wird somit momentan lediglich adjuvant verwendet und stellt noch keine Routine-Untersuchung in der Diagnostik der invasiven Aspergillose dar^[107].

Die medikamentöse Therapie der invasiven Aspergillose ist kompliziert, und die Mortalität bleibt trotz der vielen seit den 90er Jahren neu zu den Therapeutika hinzugekommenen Wirkstoffe sehr hoch. In der Hochrisikogruppe der Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation beträgt die Mortalitätsrate der invasiven Schimmelpilz-Infektion z.B. auch heute noch immer über 90 %. Zu den Antimykotika, die bei invasiver Aspergillose eingesetzt werden können gehören die Triazole, welche die Bildung der Ergosterole in der Zellmembran von Pilzen hemmen sowie die Polyene, welche durch Bindung an die Ergosterole zur Permeabilitätserhöhung der Membran führen. Eine Ausweichmöglichkeit bei Patienten, die auf diese Standard-Antimykotika nicht ansprechen oder diese aufgrund ihrer Nebenwirkungen nicht vertragen stellt die besonders nebenwirkungsarme Gruppe der Echinocandine dar. Sie hemmen die Synthese eines Zellwandbestandteiles der Pilze, des 1,3- β -D-Glucan^[107]. Eine weitere Therapiemöglichkeit, die nur für ein eingeschränktes Patientenkollektiv in Betracht kommt ist die chirurgische Intervention. Die Teilresektion der Lunge wird vor allem bei Patienten mit massiver Hämoptyse oder Befall der großen pulmonalen Gefäße durchgeführt^[53]. Die adjuvante Immunmodulation mit den Zytokinen G-CSF, GM-CSF und IFN- γ findet zur Zeit nur in Einzelfällen Anwendung, da noch keine ausreichenden Studiendaten vorliegen. In vitro- sowie Tierversuche zur unterstützenden Immunmodulation bei invasiver Aspergillose zeigten aber bereits vielversprechende Ergebnisse^[107].

Da die invasive Aspergillose bei immunsupprimierten Patienten eine schwer therapierbare Infektion mit hoher Mortalitätsrate darstellt, stellt sich die Frage nach sinnvollen Möglichkeiten zur Prävention dieser Erkrankung. Weil die weiter oben genannten Risikofaktoren kaum modifizierbar sind, gestaltet sich die Prophylaxe allerdings sehr schwierig. Ein Ansatz ist die Reduktion der Sporenkontamination im Krankenhauszimmer immunsupprimierter Patienten mittels High Efficiency Particulate Arresting (HEPA)-Filtern und Laminar Air Flow-Systemen^[42]. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass sich die immunsupprimierten Patienten nicht in der Nähe von Bau- oder Renovierungsarbeiten auf dem Krankenhausgelände aufhalten, da sich die Konidien-Konzentration in der Luft während dieser kurzfristig stark erhöht^[107]. Eine andere Möglichkeit der Prävention von invasiven Schimmelpilzkrankungen stellt die Chemoprophylaxe dar. Klinische Studien, welche die Effektivität der Chemoprophylaxe belegen laufen derzeit noch, allgemein ist sie jedoch wohl nur bei Hochrisikopatienten indiziert^[43]. Thema aktueller Forschungen ist die Impfung gegen die invasive Aspergillose. Hierbei wird versucht, eine schützende T_H1 -abhängige Resistenz gegen *Aspergillus fumigatus* auszulösen. Dieses Ziel kann sowohl direkt durch die Stimulierung eines Organismus mit verschiedenen Bestandteilen von *Aspergillus fumigatus* als auch mit Hilfe speziell stimulierter, ex vivo generierter und anschließend re-transfundierter dendritischer Zellen erreicht werden^[94].

1.1.3 Rekombinante *Aspergillus fumigatus*-Antigene

Zu den bisher bekannten antigenen Strukturen von *Aspergillus fumigatus* zählen sowohl eine Reihe von Proteinen und Glykoproteinen, teils mit enzymatischer Aktivität, als auch Kohlenhydrate^[50]. Die früher häufig für Forschung und Diagnostik verwendeten *Aspergillus*-Extrakte enthalten eine Vielzahl dieser Antigene in variabler Konzentration, abhängig von vielen verschiedenen Faktoren wie z.B. der Art des verwendeten Mediums oder der Extraktionsmethode^[53]. Dieses Fehlen standartisierter Pilz-Extrakte mit definierter Antigen-Zusammensetzung führte in den letzten Jahren zur Entwicklung von über 20 verschiedenen rekombinanten Anti-

genen^[50]. Hierbei handelt es sich um einzelne, hochreine Antigene, die mit Hilfe diverser molekular- und biotechnologischer Methoden geklont, charakterisiert und in geeigneten Genexpressionssystemen produziert wurden^[22]. Im Einzelnen wurden in der vorliegenden Dissertationsarbeit folgende Antigene verwendet:

- Aspf 1: Dieses Gen kodiert für das 18 kDa große Ribotoxin aus der Familie der Mitogilline, ein Enzym mit Ribonukleaseaktivität. Es ist in der Zellwand von *Aspergillus fumigatus* lokalisiert, wird aber auch sezerniert^[55]. Aspf 1 hemmt die Translation eukaryontischer Zellen durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung in einer hochkonservierten Region der 28S rRNA^[50].
- Aspf 6: Bei diesem Antigen handelt es sich um eine 26,5 kDa große Superoxiddismutase (SOD). Das manganabhängige Enzym dient der Detoxifizierung von Superoxid-Radikalen und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Pilzes gegen die von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunabwehr gebildeten reaktiven Sauerstoffmetabolite^[78].
- Aspf 16: Das Aspf 16-Antigen ist 43 kDa groß^[78]. Sequenzhomologien zu einer bakteriellen Glucanase weisen darauf hin, dass es sich bei diesem Antigen um eine in der Zellmembran oder der Zellwand von *Aspergillus fumigatus* verankerte Glucanase handeln könnte.

Die in Teilen dieser Promotionsarbeit zur Stimulation von unreifen dendritischen Zellen verwendeten rekombinanten Antigene entsprechen den in der Diplomarbeit von Carina Bäuerlein^[14] beschriebenen Antigenen. Nähere Informationen zu den Bezugsquellen und zur Herstellung siehe dort.

1.2 Die Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 Aufbau und Prinzipien des menschlichen Immunsystems

Das menschliche Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen, nicht antigenspezifischen und in einen erworbenen, adaptiven oder

auch antigenspezifischen Anteil. Das angeborene Immunsystem stellt den phylogenetisch älteren Teil dar. Erste Komponenten hiervon existieren in ähnlicher Form bei Pflanzen und Tieren gleichermaßen, was bedeutet dass bereits deren gemeinsame Vorfahren eine primitive Form der unspezifischen Immunabwehr besessen haben müssen. Die adaptive Immunabwehr existiert hingegen nur bei den Vertebraten und ist somit als entwicklungsgeschichtlich wesentlich jünger anzusehen^[48].

Die Hauptaufgaben des Immunsystems bestehen in der Erkennung und Bekämpfung von in den Organismus eingedrungenen Pathogenen. Zudem ist die Regulierung der Immunantwort von entscheidender Bedeutung, um eine Schädigung durch überschießende Abwehrmechanismen zu verhindern^[40].

Die unspezifische Immunabwehr kann zwischen nicht-infektiösem Selbst und infektiösem Fremd unterscheiden. Zur Erkennung körperfremder Strukturen besitzen ihre Zellen spezielle Rezeptoren, die sogenannten Pathogen Recognition Receptors (PRRs). Da die PRRs direkt im Genom kodiert sind, ist ihre Anzahl limitiert. Sie binden einige über die Zeit hochkonservierte molekulare Komponenten der Angreifer, die Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterien, das 1,3- β -D-Glucan von Pilzen und das Phosphoglycan von Parasiten. PAMPs stellen charakteristische Komponenten der Pathogene dar und kommen in den Zellen des Wirtes nicht vor^[41]. Das angeborene Immunsystem erfüllt zwei wichtige Aufgaben: Zum einen kann es als die erste Abwehr angesehen werden, die der Organismus einem Angreifer entgegensetzt. Seine Mechanismen greifen sofort, während das adaptive Immunsystem sehr langsam reagiert. Im Laufe der Zeit haben viele Pathogene jedoch Strategien entwickelt, um die angeborene Immunabwehr zu umgehen. Führen die Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr nicht zur Elimination des Pathogens, so ist ihre zweite Aufgabe die Alarmierung der antigenspezifischen Immunabwehr^[40].

Die Zellen des adaptiven Immunsystems besitzen Rezeptoren, die jeweils für ein einzelnes Antigen hoch spezifisch sind. Sie benötigen somit ein wesentlich größeres Repertoire an verschiedenen Rezeptoren zur

Pathogenerkennung als die Zellen des angeborenen Immunsystems. Diese Vielfalt an antigenspezifischen Rezeptoren wird durch somatische Rekombination erreicht. Gedächtnisbildung und Steigerung der Antigen-Affinität im Laufe der Immunabwehr sind Fähigkeiten, welche lediglich das adaptive Immunsystem aufweist^[40].

1.2.2 Angeborene und erworbene Immunantwort auf *Aspergillus fumigatus*

Zur erfolgreichen Verteidigung gegen *Aspergillus fumigatus* werden sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem benötigt^[79]. Das angeborene Immunsystem erfüllt hierbei zwei unterschiedliche Aufgaben: zum einen wirkt es direkt fungizid, zum anderen instruiert es die Zellen der adaptiven Immunabwehr durch die Aufnahme und Präsentation von Antigenen sowie durch die Sekretion verschiedener Zytokine. Die Zellen der spezifischen Immunabwehr können durch Zytokinsekretion wiederum die Aktivität der Phagozyten der angeborenen Immunabwehr steigern, so dass beide Arme des Immunsystems in einer wechselseitigen Beeinflussung eng zusammenarbeiten^[83].

Die Mechanismen des unspezifischen Immunsystems spielen beim immunkompetenten Wirt die Hauptrolle in der Abwehr des Schimmelpilzes. Bei immunsupprimierten Patienten sind diese dagegen auf unterschiedliche Art und Weise beeinträchtigt^[53]. In Situationen der eingeschränkten Immunkompetenz gewinnt die spezifische Immunabwehr, vor allem die T_H -Zell-vermittelte Immunität an Bedeutung^[79].

Die vom Menschen eingeatmeten *Aspergillus*-Sporen treffen zuerst auf die anatomischen Barrieren des Wirtes. Tight junctions und die mukoziliäre Clearance des Epithels im Bereich des Respirationstraktes stellen die erste Hürde für den Schimmelpilz dar. Häufig gelingt es den Konidien jedoch, diese Barrieren zu umgehen. Verschiedene von ihnen sezernierte Toxine wie das Gliotoxin hemmen z.B. die Motilität der Zilien, Proteasen zerstören das Epithel des Wirtes und erleichtern das Eindringen des Pilzes. Die im Surfactant der Lunge vorhandenen Proteine A und D vermitteln die Phagozytose der inhalierten Konidien durch Makrophagen

und neutrophile Granulozyten. Auch die Endothel- und Epithelzellen der Lunge selbst nehmen die Pilzsporen auf. Es ist allerdings noch unklar, ob dieser Vorgang beim Menschen tatsächlich zur Beseitigung von *Aspergillus* aus der Lunge beiträgt^[53].

Die Hauptrolle in der angeborenen Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus* spielen phagozytierende Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Die Alveolarmakrophagen befinden sich bereits direkt vor Ort im Lungengewebe, die neutrophilen Granulozyten werden erst durch die von den Makrophagen ausgeschütteten Zytokine aus dem zirkulierenden Blut rekrutiert^[53]. Die Makrophagen nehmen die Konidien des Schimmelpilzes in sogenannte Phagosomen auf. Etwa drei Stunden nach der Phagozytose findet der erste Schritt der Auskeimung des Pilzes, das Anschwellen der Sporen innerhalb des Phagosoms statt. Das Abtöten dieser geschwollenen Konidien beginnt erst 6-8 Stunden nach der Phagozytose und schreitet sehr langsam voran. Erst nach 24 Stunden ist ein Großteil von ihnen eliminiert^[54]. Alveolarmakrophagen töten die aufgenommenen Konidien mit Hilfe reaktiver Sauerstoffmetabolite, welche von einer NADPH-Oxidase produziert werden^[74]. Die Konidien, welchen es gelungen ist innerhalb der Makrophagen auszukeimen oder der Phagozytose zu entgehen, werden nun von den neutrophilen Granulozyten bekämpft. Über verschiedene Rezeptoren können die Granulozyten direkt mit den Hyphen interagieren^[53]. Da die Hyphen für eine phagozytotische Aufnahme jedoch zu groß sind, kommt es lediglich zu einer Adhäsion an den Pilz. Diese löst wiederum den sogenannten Respiratory Burst, die Sekretion der dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffmetabolite und die Degranulation der mit Enzymen gefüllten Granula der Granulozyten aus^[54]. Die genauen Mechanismen, die letztlich zur Beseitigung des Schimmelpilzes durch die neutrophilen Granulozyten führen sind unbekannt, es scheinen jedoch sowohl oxidative als auch nicht-oxidative Wege beteiligt zu sein. Die Elimination der Hyphen erfolgt sehr schnell, nach zwei Stunden ist bereits die Hälfte von ihnen abgetötet^[53].

Auch Thrombozyten sind an der angeborenen Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus* beteiligt. Sie heften sich an invasiv in die Blutgefäße einwachsende Hyphen. Durch diesen Kontakt werden die Blut-

plättchen aktiviert. Sie werden sowohl mit einer direkten Zerstörung der Zellwand des Schimmelpilzes als auch mit einer Unterstützung der fungiziden Funktionen der neutrophilen Granulozyten assoziiert^[53].

Als wichtigste humorale Komponente des unspezifischen Immunsystems unterstützt auch das Komplementsystem die Abwehr gegen *Aspergillus fumigatus*. Die Aktivierung des alternativen Weges führt hierbei zur Elimination des Schimmelpilzes, außerdem wird die Bindung von Makrophagen erleichtert^[53].

Reicht die angeborene Immunabwehr nicht zur Beseitigung des in den Wirt eingedrungenen opportunistisch pathogenen Schimmelpilzes aus, so gewinnt die adaptive Immunabwehr an Bedeutung. Über bisher weitestgehend unbekannte Mechanismen kommt es dabei im Laufe einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* zu einer T_h1 - oder zu einer T_h2 -dominierten Immunantwort^[54]. Die naiven T-Helfer-Lymphozyten werden durch die Interaktion mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen aktiviert und differenzieren sich anschließend zu T_h1 - oder zu T_h2 -Zellen. T_h1 -Lymphozyten lösen durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN- γ , IL-12 und TNF- α eine zelluläre Immunantwort aus^[53]. Sie aktivieren vermehrt Makrophagen, neutrophile Granulozyten, zytotoxische Lymphozyten und NK-Zellen. Diese T_h1 -Immunantwort wird mit einer erhöhten Resistenz gegen *Aspergillus fumigatus* in Verbindung gebracht. Die T_h2 -dominierte Immunantwort führt dagegen zu einer Progression der invasiven Aspergillose^[54]. Die zelluläre Immunantwort wird hierbei durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-10 gebremst, stattdessen kommt es zu einer humoralen Immunantwort mit erhöhter Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten^[53]. Neue Studien belegen den Einfluss einer weiteren Art von CD4-positiven T-Zellen, den T_h17 -Zellen, auf das Outcome einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus*. Diese T_h17 -Zellen werden mit einer persistierenden, überschießenden Inflammation bei fehlendem Aufbau von Immunität gegenüber dem pathogenen Pilz in Verbindung gebracht^[104].

1.3 Dendritische Zellen

1.3.1 Entdeckung und Ursprung

Dendritische Zellen (DCs) gehören der angeborenen Immunabwehr an und kommen überall im menschlichen Körper vor, sowohl in den meisten Oberflächenepithelien als auch in den meisten soliden Organen. Im peripheren Blut machen sie lediglich 1-2 % der gesamten zirkulierenden Leukozyten aus^[87]. Der ursprünglich rein deskriptive Name rührt von den vielen langen, baumartigen Ausläufern der Zellen her. Bereits 1868 entdeckte der Medizinstudent Paul Langerhans die ersten Vertreter der sehr heterogenen Gruppe der DCs durch eine Goldchloridfärbung im Epithel der menschlichen Haut, die nach ihm benannten Langerhans-Zellen, welche er allerdings zunächst als Nervenzellen verkannte^[45]. 1973 schließlich fand Ralph Steinman DCs in den peripheren lymphatischen Organen von Mäusen vor und gab ihnen ihren bis heute gültigen Namen^[91]. Im Laufe der Zeit wurden diesen Zellen ähnliche Leukozyten auch in den nicht-lymphatischen Organen von Mäusen und Menschen entdeckt. Zudem häuften sich die Hinweise darauf, dass die Funktion der DCs im Zusammenhang mit der Immunantwort steht^[36].

Progenitoren der DCs sind die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Aus diesen entwickeln sich unterschiedliche Präkursoren, die für kurze Zeit im Blut zirkulieren^[6]. Zu diesen DC-Präkursoren zählen zwei CD11c-positive, sogenannte myeloide und eine CD11c-negative, sogenannte lymphoide Form. Die Präkursoren differenzieren sich zu unreifen DCs und wandern in die verschiedenen Gewebe ein. Aus den myeloiden Vorstufen entwickeln sich die konventionellen DCs wie z.B. Langerhans-Zellen und interstitielle DCs, deren Hauptaufgabe in der Induktion und Regulation der T-Zellantwort besteht. Aus den lymphoiden Präkursoren entstehen dagegen plasmazytoide Zellen, die besonders viel Interferon produzieren können und eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf virale Infektionen spielen^[87].

Die unreifen DCs können zusätzlich anhand ihrer anatomischen Lokalisation in Thymus, nicht-lymphatischen und lymphatischen Geweben unterschieden werden. Zu den DCs der nicht-lymphatischen Gewebe

gehören unter anderem die Langerhans-Zellen der Epidermis sowie die interstitiellen DCs im Bindegewebe solider Organe. Diese Zellen stellen die peripheren Wächter des Immunsystems dar, die nach Aufnahme eines Antigen in die T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe einwandern und dort T-Zellen aktivieren. In lymphatischen Geweben findet man Follikuläre DCs (FDCs) und Keimzentrums DCs (GCDCs) vor. FDCs selektieren und aktivieren Zentrozyten die einen B-Zellrezeptor besitzen, welcher eine hohe Affinität zu dem von ihnen präsentierten Antigen aufweist. GCDCs fungieren als APCs für T-Zellen. Die DCs des Thymus werden mit der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen in Verbindung gebracht^[87].

Da die Gewinnung von DCs aus Geweben oder Blut mit einem enormen zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden ist, werden die heute in der Forschung benötigten DCs in einigen gut etablierten in-vitro-Systemen hergestellt. Die am häufigsten zur Generierung unreifer DCs verwendete Methode ist die Stimulierung der im peripheren Blut häufig vorkommenden Monozyten mit IL-4 und GM-CSF. Des Weiteren können CD34-positive hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark verwendet werden. Sie differenzieren sich nach Behandlung mit GM-CSF und TNF- α ebenfalls zu unreifen DCs^[4]. Zur Induktion der Reifung aller künstlich hergestellten unreifen DCs werden bakterielle Produkte wie LPS oder verschiedene proinflammatorische Zytokine verwendet^[87].

1.3.2 Bedeutung der DCs für die Immunantwort

DCs gehören selbst dem angeborenen Immunsystem an und können über Zytokine verschiedene andere Zellen dieses Teils der Immunabwehr aktivieren. Zugleich sind sie aber auch die wichtigsten Initiatoren der adaptiven Immunantwort. Aus diesem Grund stellen sie auch das zentrale Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar^[93]. Ihr Einfluss auf die Differenzierung von naiven T-Zellen zu verschiedenen Effektorzellen ermöglicht es den DCs darüber hinaus, eine der jeweiligen Situation genau angepasste Immunantwort auszulösen.

Die Hauptaufgabe der DCs besteht in der Induktion, Steuerung und Regulation der T-Zellantwort auf ein in den Organismus eingedrungenes Pathogen. Dabei fungieren sie als Mittler zwischen den T-Zellen und dem Antigen, welches ohne DCs keine starke T-Zell-Immunität auslösen könnte^[89]. Sie erhöhen also die Immunogenität von Antigenen, weshalb sie auch als natürliches Adjuvans bezeichnet werden^[90].

Nachdem sich aus den DC-Progenitoren des Knochenmarks die im Blut zirkulierenden DC-Präkursoren entwickelt haben, wandern sie in verschiedene Gewebe ein und werden dort ortsständig. Diese gewebständigen unreifen DCs weisen eine besonders hohe endozytotische Aktivität auf^[6]. Über verschiedene Mechanismen phagozytieren sie Pathogene und körpereigene Antigene^[34]. An die Endozytose des Pathogens schließt sich dessen Prozessierung im Inneren der DCs an. Durch diesen Vorgang wird es in viele verschiedene Antigene zerlegt. Um eine T-Zellvermittelte Antwort auf den Angreifer auslösen zu können, müssen die DCs nun eine phänotypische und funktionelle Wandlung von unreifen, Antigen-aufnehmenden Zellen zu reifen, Antigen-präsentierenden Zellen vollziehen^[89]. Diese Reifung wird durch eine Vielzahl von Signalen ausgelöst, zu denen unter anderem inflammatorische Zytokine und Erregerbestandteile gehören. Die Reifungssignale führen zu einer erhöhten Expression von MHC-Antigen-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DCs, während sich ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme verringert^[89]. Zusätzlich wird der Chemokinrezeptor CCR7 auf der Oberfläche der reifen DCs vermehrt exprimiert. Er reagiert auf bestimmte Chemokine, die vor allem in lymphatischen Organen gebildet werden. Dadurch wird eine gerichtete Migration der DCs über afferente Lymphgefäße in die sekundären lymphatischen Organe ermöglicht^[15].

In den T-Zellzonen der regionalen Lymphknoten präsentieren die DCs die von ihnen aufgenommenen und prozessierten Antigene den im Blut zirkulierenden naiven T-Zellen. Dabei locken sie die T-Zellen durch die Sekretion von Chemokinen an und halten sie mit Hilfe interzellulärer Adhäsionsmoleküle fest^[89]. Nur naive T-Zellen, deren Rezeptor zum präsentierten Antigen passt, können anschließend mit den DCs interagieren^[87]. Für diese Interaktion sind mehrere Signale nötig, die durch Rezeptoren und Liganden auf den Oberflächen der naiven T-Zellen und

der DCs vermittelt werden. Das erste Signal entsteht aus der Erkennung des von den DCs präsentierten MHC-Peptid-Komplexes durch den antigenspezifischen T-Zellrezeptor. Das zweite Signal wird durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen des B7-Komplexes, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) der DCs mit dem CD28-Oberflächenmolekül der T-Zellen ausgelöst^[6]. Diese beiden Signale führen zu einer Aktivierung der T-Zellen, die daraufhin IL-2 sezernieren und sich autokrin zur klonalen Expansion und Differenzierung zu T-Effektorzellen stimulieren. Dieser Vorgang wird häufig auch als Priming der T-Zellen bezeichnet^[40]. Nach ihrer Differenzierung gelangen die verschiedenen T-Effektorzellen über die efferenten Lymphgefäße zurück in den Blutkreislauf und von dort in das geschädigte Gewebe^[89].

DCs können sowohl naive CD4- als auch naive CD8-positive T-Zellen aktivieren. CD4-positive T-Zellen erkennen dabei Pathogene, die ihnen über MHCII-Moleküle gezeigt werden. Die Differenzierung zu den unterschiedlichen CD4-positiven Effektorzellen benötigt noch ein zusätzliches, drittes Signal in Form von durch die DCs sezernierten Zytokinen. So führt die Stimulation der naiven CD4-T-Zellen mit IFN- γ und IL-12 zur Bildung von T_h1 -Zellen, die Stimulation mit IL-4 dagegen zur Bildung von T_h2 -Zellen. Durch die Sekretion von IL-6 und TGF- β entstehen T_h17 -Zellen, IL-10 induziert die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen). T_h1 -Zellen lösen eine Inflammation aus und aktivieren Makrophagen, außerdem stimulieren sie die Neubildung von Makrophagen-Vorläufern im Knochenmark. T_h2 -Zellen führen dagegen zu einer humoralen Immunantwort, indem sie die Bildung von Antikörpern durch B-Zellen stimulieren. T_h17 -Zellen induzieren die Produktion von bestimmten Chemokinen durch Stroma- und Epithelzellen, die zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und damit zur Inflammation beitragen. T_{reg} -Zellen kontrollieren die Aktivität der übrigen T-Effektorzellen direkt und indirekt durch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine^[40].

Naive CD8-positive T-Lymphozyten binden an Antigene, die ihnen von den DCs über MHCI-Moleküle präsentiert werden. Nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen töten sie Körperzellen, die ein zytosolisches Pathogen aufweisen, wie z.B. virusinfizierte Zellen^[40]. Normalerweise können nur endogene Proteine, die im Proteasom einer Zelle prozessiert

wurden auf MHCI-Molekülen präsentiert werden^[89]. DCs jedoch können über bestimmte Rezeptoren auch exogene Proteine, wie z.B. tote Zellen und Immunkomplexe aufnehmen und mit Hilfe von MHCI-Molekülen präsentieren. Dieser Vorgang wird Cross-presentation genannt^[89].

Eine weitere Aufgabe der DCs ist die sogenannte Tolerogenität, d.h. ihre Fähigkeit eine immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen auszulösen. Dies ist besonders wichtig wenn man bedenkt, dass DCs bei der Phagozytose von toten, virusinfizierten Körperzellen neben den pathogenen immer auch körpereigene Antigene aufnehmen und präsentieren. In diesem Fall muss die von ihnen ausgelöste Immunantwort auf die körperfremden Antigene beschränkt und eine für den Menschen schädliche Autoreaktivität der T-Zellen verhindert werden. Dies geschieht zum einen im Thymus, wo DCs durch die Deletion autoreaktiver T-Zellen für die sogenannte zentrale Toleranz sorgen. Da diese jedoch stets unvollständig ist, weil z.B. T-Zellen mit niedrig affinen Rezeptoren der negativen Selektion entgehen und einige Selbst-Antigene nicht in den Thymus gelangen, wird ein zweiter Mechanismus, die periphere Toleranz benötigt. Im sogenannten steady state, also in Abwesenheit einer Infektion oder Entzündung präsentieren unreife DCs konstitutiv körpereigene Antigene mit Hilfe von MHCI- und MHCII-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Da weitere Reifungsstimuli im steady state fehlen, kommt es dann entweder zur Deletion der korrespondierenden T-Zellen oder zur Induktion von T_{reg} -Zellen^[92].

Die einzigartigen Fähigkeiten der DCs in Bezug auf die Kontrolle der Immunantwort machen diese Zellen auch als Ziel von Immuntherapien interessant. Über mit speziellen Antigenen stimulierte DCs versucht man hierbei Einfluss auf das Immunsystem des Patienten zu nehmen. So könnte es mit der Hilfe dieser Zellen z.B. möglich sein, die Immunantwort auf eine Infektion oder einen malignen Tumor antigenspezifisch zu verstärken, während die Immunantwort bei Patienten mit Allergien oder Autoimmunerkrankungen antigenspezifisch gedämpft werden könnte. Um diese potentiellen Therapiemöglichkeiten nutzen zu können ist allerdings ein noch profunderes Verständnis der Immunogenität und Tolerogenität der DCs nötig^[90].

1.4 Signaling der angeborenen Immunabwehr

1.4.1 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 angesprochen sind die Zellen des unspezifischen Immunsystems zur Erkennung von in den Organismus eingedrungenen Pathogenen mit einer Reihe von Rezeptoren, den PRRs ausgestattet. Diese binden an repetitive molekulare Strukturen die nur auf Mikroorganismen, nicht jedoch auf den Zellen des Wirtes selbst vorkommen, die sogenannten PAMPs. Die PAMPs spielen eine entscheidende Rolle in der Physiologie des jeweiligen Pathogens und wurden somit über die Zeit konserviert. Da die PRRs im Genom der Immunzellen kodiert sind, existiert nur eine limitierte Anzahl dieser Rezeptoren. Jeder PRR hat jedoch eine breite Spezifität und kann eine Fülle verschiedener PAMPs mit ähnlichen strukturellen Motiven binden, so dass die Erkennung eines Großteiles der Bandbreite pathogener Mikroorganismen durch die Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr gewährleistet wird. Das unspezifische Immunsystem ist dadurch in der Lage, die Zeit bis zu einer eventuell nötigen Reaktion der adaptiven Immunabwehr zu überbrücken. Deren Rezeptoren sind hochspezifisch und existieren aufgrund ihrer Kodierung in verschiedenen Gensegmenten und ihrer Zusammensetzung durch somatische Rekombination in praktisch unbegrenzter Anzahl^[41].

PRRs aktivieren Mechanismen der angeborenen Immunabwehr, sind aber auch an der Auslösung der Antwort des adaptiven Immunsystems beteiligt. Dieses Prinzip wird auch "innate control of adaptive immunity" genannt und bedeutet die Herstellung einer Assoziation zwischen dem Antigen, das von den Lymphozyten der erworbenen Immunabwehr erkannt wird und dem PAMP, das von den PRRs erkannt wird. Die Zellen des spezifischen Immunsystems erhalten also eine Information über den Ursprung des Antigens durch das unspezifische Immunsystem^[66].

Nach der Erkennung einer Pathogen-assoziierten Struktur vermitteln die verschiedenen Arten von PRRs sofort unterschiedliche Reaktionen der Abwehrzelle. Sie können z.B. die Phagozytose des erkannten Mikroorganismus induzieren, zur Ausschüttung antimikrobieller Effektormoleküle führen, der Opsonisierung des Pathogens dienen und das Komplement-

und Gerinnungssystem aktivieren. An einige Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr schließt sich eine intrazelluläre Signalkaskade an, die letztlich der Auslösung einer für den eingedrungenen Erreger adäquaten Immunantwort dient. Diese Signalkaskaden bewirken meist eine Änderung im Genexpressionsprofil der Immunzelle. Dadurch kommt es zur Ausschüttung verschiedener immunmodulatorischer Zyto- und Chemokine sowie zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der Zellen und zu einer vermehrten Antigenpräsentation^[41]. Durch die sezernierten Botenstoffe können sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr aktiviert und gesteuert werden. Zu den PRRs mit intrazellulärer Signalkaskade, die für die Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* relevant sind zählen unter anderem auch die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sowie Dectin-1, die in Kapitel 1.4.2 näher beschrieben werden.

1.4.2 DC-Rezeptoren für *Aspergillus fumigatus*

An der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* und der anschließenden Steuerung des adaptiven Immunsystems durch DCs sind die Toll-like-Rezeptoren TLR 4 und TLR 2 sowie das nicht-klassische C-Typ Lektin Dectin-1 beteiligt^[11,69].

DCs dekodieren die mit *Aspergillus* assoziierte Information mit Hilfe dieser PRRs und übersetzen sie in verschiedene Zytokine, die Sprache der T-Zellen. Aus diesen sezernierten Zytokinen resultiert dann die Differenzierung naiver T-Zellen zu unterschiedlichen T-Effektorzellen und somit auch qualitativ verschiedene T_h -Zellantworten^[84]. Nicht jede Immunantwort, sondern nur die für das jeweilige Pathogen adäquate wirkt sich dabei für den Wirt protektiv aus und verhindert seine Schädigung durch die Inflammation. Bisher ist es in weiten Teilen noch unklar, welche Mechanismen zur Auslösung und Steuerung der geeigneten Immunantwort führen. Früher war man der Ansicht, dass die Stimulierung eines bestimmten TLR stets zur Auslösung derselben T_h -Zellantwort führt. Heute wird jedoch angenommen, dass die Entscheidung für eine bestimmte Immunantwort ein weitaus komplexerer Vorgang ist, der sowohl durch

die Untergruppe der aktivierten DCs, als auch durch die Art des Liganden und den Kontext der Erkennung beeinflusst wird^[1].

Toll-like Rezeptoren

Die TLRs stellen ein evolutionär sehr altes Erkennungs- und Signalingsystem dar, welches in ähnlicher Form von allen multizellulären Organismen genutzt wird. Der Mensch exprimiert zehn verschiedene TLRs, die sich hinsichtlich der von ihnen erkannten PAMPs, ihrer Lokalisation auf Zellniveau und ihres Expressionsmusters voneinander unterscheiden. TLR 1, TLR 2, TLR 4, TLR 5 und TLR 6 sind an die Oberfläche der Immunzellen gebunden, während TLR 3, TLR 7 und TLR 9 intrazellulär vorkommen und durch die Produktion von IFN- α und IFN- β zu einer antiviralen Immunantwort führen. TLR 4 bindet mit Hilfe von CD14 und dem Myeloid Differentiation Factor 2 (MD-2) an LPS. Hierfür muss das LPS zunächst von dem in der Leber produzierten Akute-Phase-Protein LPS-binding Protein (LBP) gebunden und anschließend an CD14 transferiert werden. Dann erst kann der CD14-LPS-Komplex an den TLR 4-MD-2-Komplex binden. TLR 2 bildet Heterodimere mit TLR 1 oder TLR 6 und erkennt sowohl die Lipoteichonsäure (LTA) grampositiver Bakterien als auch verschiedene Lipoproteine von gramnegativen Bakterien. TLR 5 ist auf die Erkennung des Flagellins aus den Flagellen begeißelter Bakterien spezialisiert. Bakterielle DNA wird anhand ihrer typischen unmethylierten CpG-Motive von TLR 9 erkannt. TLR 3 bindet an dsRNA, TLR 7 und TLR 8 an ssRNA^[40].

Alle TLRs sind nach demselben Prinzip aufgebaut: Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne, die mehrere Kopien eines Leucin-reichen Motives enthält und über eine einfach transmembranäre Domäne mit der intrazellulären Domäne verbunden ist. Dieser intrazelluläre Anteil, die Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem IL-1-Rezeptor auf. Nach der Bindung des jeweiligen Liganden ändert der TLR seine Konformation und initialisiert die angeschlossenen Signalkaskade. Diese beeinflusst die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, was schließlich zu einer Änderung im Genexpressionsprofil der Zelle führt^[40].

Im Detail läuft der klassische TLR-Signalweg wie folgt ab (siehe Abb. 1): Bindet ein passender Ligand an den TLR, so kommt es zu einer Verbindung seiner TIR-Domäne mit einem intrazellulären Adapter-Protein, welches ebenfalls eine TIR-Domäne besitzt. Von diesen Adapter-Proteinen sind bisher fünf verschiedene bekannt, welche jeweils mit bestimmten TLRs assoziiert sind. Das am besten untersuchte Adapter-Protein ist der Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88). Das aktivierte MyD88 bindet an eine IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und aktiviert sie. Diese Serin-Threonin-Kinase führt anschließend zur Aktivierung des Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF-6). TRAF-6 aktiviert die Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1 (TAK1), welche eine Mitogen-aktiviertes Protein (MAP) Kinase Kaskade induziert. Diese Kaskade hat zwei verschiedene targets: Zum einen wird die Inhibitor κ B-Kinase (IKK) aktiviert, die den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor κ B (NF κ B) von seinem Inhibitor κ B (I κ B) befreit und somit dessen Translokation in den Zellkern bewirkt. Zum anderen werden die MAP-Kinasen c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 phosphoryliert, welche zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Activating Protein 1 (AP-1) führen. Dieser klassische TLR-Signalweg wird von allen TLRs benutzt, daneben gibt es aber auch alternative Wege. Sie werden über andere Adapter-Proteine vermittelt, führen aber ebenfalls häufig zu einer Aktivierung von NF κ B. Sie können allerdings auch in einer Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren resultieren^[47].

Auch DCs besitzen TLRs zur Erkennung pathogener Strukturen. Die Zytokine, welche von ihnen nach der Aktivierung des TLR-Signalweges sezerniert werden sind an der Entscheidung über die Art der resultierenden T_h -Zellantwort beteiligt. Der reguläre TLR-Weg, der über das Adapter-Protein MyD88 vermittelt wird, löst unter anderem die Sekretion von IL-12 aus. IL-12 bewirkt eine proinflammatorische T_h1 -Antwort. Neben diesem regulären Weg sind an die TLRs viele Seitenwege angeschlossen, die das Outcome des TLR-Signalings und damit der T_h -Zell-Antwort verändern können. Einer dieser Mechanismen führt über die Phosphatidyl Inositol-3-Kinase (PI3K) (siehe Abb. 2)^[65]. Die Inhibierung von PI3K resultiert in einer vermehrten Sekretion von IL-12, somit scheinen die downstream targets von PI3K an der Regulierung der Pro-

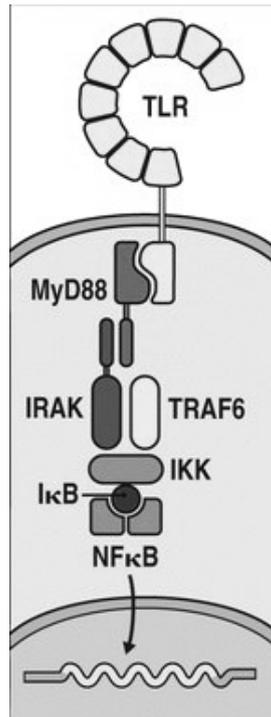


Abbildung 1

Konventioneller TLR-Signalweg (Abbildung modifiziert nach: C. Janeway (2008). Janeway's Immunobiology, Band 7. Garland Science)

duktion proinflammatorischer Zytokine beteiligt zu sein^[27]. Eines dieser downstream targets ist die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), welche möglicherweise die Entscheidung in Richtung T_h1 - oder T_h2 -Antwort beeinflussen kann. Es wurde postuliert, dass PI3K zur Aktivierung der Protein Kinase B (Akt-1) führt, welche wiederum die konstitutiv aktive GSK3 durch Phosphorylierung inaktiviert. Die Inhibierung von GSK3 führt zur vermehrten Produktion von IL-10 sowie zur verringerten Produktion von IL-12, wodurch eine T_h2 -Antwort ausgelöst wird. Die Inhibierung von PI3K oder Akt-1 hat den gegenteiligen Effekt mit vermehrter IL-12- und verminderter IL-10-Produktion, was zu einer T_h1 -Antwort führt. Diese Auswirkungen von GSK3 auf die Zytokinantwort sind durch ihren Einfluss auf den Transkriptionsfaktor cAMP Response Element-binding Protein (CREB) zu erklären. CREB wird normalerweise von GSK3 inhibiert. Wird GSK3 durch eine Phosphorylierung durch Akt-1 selbst inaktiviert, ist CREB aktiv und tritt mit NFκB um den Koaktivator CREB-binding Protein (CBP) in Wettstreit, welches beide für ihre Funktion benötigen. So lässt sich der Effekt des PI3K-abhängigen TLR-Signalings auf die Zytokinpro-

duktion durch die Steigerung der CREB-induzierten IL-10-Expression sowie die Inhibierung der NF κ B-induzierten IL-12-Expression erklären^[65]. Der Mechanismus, der die Intensität des Signalings nach Bindung eines Liganden an einen TLR über den MyD88- oder den PI3K-abhängigen Weg reguliert ist jedoch noch nicht bekannt. Vermutet wird, dass z.B. unterschiedliche Liganden zu einem präferentiellen Signaling über einen der beiden Wege führen könnten.

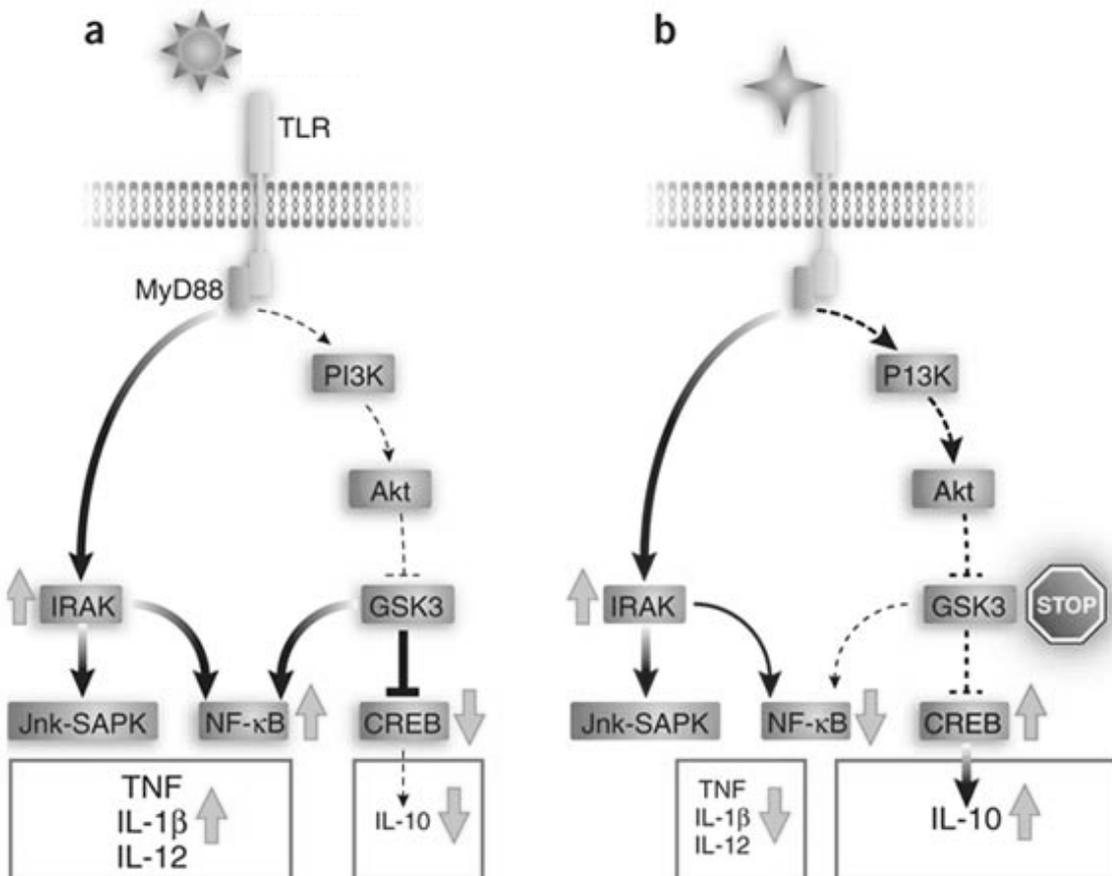


Abbildung 2

Alternativer, PI3K- / GSK3-abhängiger TLR-Signalweg a: proinflammatorisch; b: antiinflammatorisch (Abbildung modifiziert nach: J. R. Woodgett und P. S. Ohashi (2005). GSK3: an in-Toll-erant protein kinase? Nat Immunol, 6 (8): 751-752.)

Da der TLR-Signalweg ursprünglich als ein essentieller Mechanismus der antimykotischen Resistenz von *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde^[57], verwundert es nicht dass die Familie der TLRs auch bei humanen Immunzellen an der Erkennung pathogener Pilze wie *Aspergillus fumigatus* beteiligt ist. Außerdem existiert das Konzept, dass die Zellen

des angeborenen Immunsystems mit Hilfe der TLRs in der Lage sind, zwischen unterschiedlichen Pilz-Morphologien zu unterscheiden. Über die Spezifität der TLRs in Bezug auf die Erscheinungsformen von *Aspergillus fumigatus* findet man in der Literatur allerdings sehr unterschiedliche Angaben. Übereinstimmend angenommen wird lediglich, dass sowohl TLR 4 als auch TLR 2 eine Rolle bei der Erkennung der verschiedenen Morphologien des pathogenen Schimmelpilzes spielen^[58]. Mannan und Glucuronoxylomannan sind hierbei die Liganden für TLR 4, während TLR 2 an Phospholipomannan und Zymosan bindet^[97].

Dectin-1

Dectin-1 ist ein Mitglied der sogenannten nicht-klassischen C-Typ Lektine, einer Gruppe von Immunrezeptoren, welche in einer gemeinsamen genomischen Region, dem NK-Komplex kodiert sind. Für die Erkennung ihrer Liganden besitzen die nicht-klassischen C-Typ Lektine eine extrazelluläre Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (CRD). Dectin-1 gehört einer speziellen Untergruppe innerhalb der nicht-klassischen C-Typ Lektine an, welche ein intrazelluläres Signalmotiv besitzt. In seinem zytosomatischen Anteil befindet sich eine Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif (ITAM) - ähnliche Domäne, die bei Bindung eines Liganden phosphoryliert wird. Durch diesen Vorgang wird die Interaktion mit der Spleen Tyrosine Kinase (SYK) sowie die Bindung verschiedener Adapter-Moleküle ermöglicht. Daneben existieren aber auch verschiedene Hinweise für SYK-unabhängige Dectin-1-Signalwege^[12]. Dectin-1 ist das erste Beispiel für einen Nicht-TLR-PRR, der selbst intrazelluläre Signale übermitteln kann. Der Signalweg von Dectin-1 ist noch nicht im Detail erforscht, scheint aber die Moleküle Member 9 of Caspase Recruitment Domain Family (CARD-9), B-cell Lymphoma Factor 10 (Bcl-10) und Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Factor 1 (MALT-1) zu beinhalten^[56]. Beim Menschen existieren mehrere Spleißvarianten von Dectin-1, welche abhängig vom Gewebetyp in DCs, aber auch in Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen exprimiert werden^[12].

Dectin-1 bindet an die β -Glucane in der Zellwand verschiedener Pilze,

Pflanzen und Bakterien und spielt eine besonders wichtige Rolle in der antimykotischen Immunabwehr. Neben der Induktion von Genen für antimikrobielle Proteine und inflammatorische Zytokine kann Dectin-1 aber auch die Phagozytose seines Liganden vermitteln^[12]. Für die Sekretion einiger Zytokine wie IL-2 und IL-10 ist die Aktivierung von SYK alleine ausreichend^[82], die Sekretion anderer Zytokine wie IL-12 und TNF- α erfordert ein zusätzliches TLR-abhängiges Signaling^[13,29].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 ein wichtiger Rezeptor für *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuche auf humanen DCs ist und darüber hinaus an der Auslösung proinflammatorischer Immunantworten beteiligt ist^[69].

1.4.3 GSK3, PI3K und ihre Bedeutung für DCs

GSK3 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die an einer Vielzahl von Signal- und Stoffwechselwegen im menschlichen Körper beteiligt ist. Die erste Funktion, die diesem Enzym zugeschrieben wurde ist die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung der Glykogensynthase im Rahmen des Glykogenstoffwechsels^[102]. Mittlerweile wird angenommen, dass GSK3 über 40 verschiedene Substrate hat, von denen 18 Transkriptionsfaktoren sind. GSK3 beeinflusst die zelluläre Struktur und das zelluläre Wachstum sowie die Motilität und die Apoptose der Zelle. Seit kurzem ist darüber hinaus bekannt, dass die Funktion von GSK3 im Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen steht, welche ein integraler Bestandteil der Pathophysiologie vieler verschiedener Krankheiten sind. Die Dysregulierung von GSK3 spielt deshalb unter anderem bei vielen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Schizophrenie, bipolaren affektiven Erkrankungen, aber auch bei einigen nicht-neurologischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und der Entstehung maligner Tumoren eine wichtige Rolle^[46]. GSK3 existiert in den zwei Isoformen GSK3 α (51 kDa) und GSK3 β (47 kDa), welche in ihren Kinase-Domänen beinahe identische Sequenzen aufweisen. Über die unterschiedlichen Funktionen der beiden Isomere ist bisher nur wenig bekannt. Trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit scheinen die beiden Enzyme verschiedene Aufgaben zu erfüllen, was unter anderem an der Unfähigkeit von

GSK3 α ersichtlich ist, den bei Mäuseembryonen letalen Phänotyp von GSK3 β -Null-Mutanten auszugleichen^[23].

In vivo wird GSK3 über drei verschiedene Mechanismen reguliert. Ihre Aktivität wird dabei durch Phosphorylierung, durch Interaktion mit GSK3-bindenden Proteinen und durch die Regulierung ihrer Lokalisierung in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle kontrolliert. Die Phosphorylierung von GSK3 an ihrem N-terminalen Serin, z.B. durch Akt-1 vermindert, die Phosphorylierung eines bestimmten Tyrosin-Restes erhöht dabei die Aktivität des Enzymes. Darüber hinaus phosphoryliert GSK3 nur geprimte, also von anderen Enzymen vorphosphorylierte targets, weshalb hier von einer Phosphorylierungs-gebundenen Regulierung der GSK3 auf zwei verschiedenen Ebenen gesprochen werden kann^[46].

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit zur Inhibierung von GSK3 verwendete Lithiumchlorid (LiCl) hat zwei verschiedene Funktionsweisen. Zum einen erhöht es die Aktivität von PI3K und damit von Akt-1, was zur Phosphorylierung des N-terminalen Serinrestes von GSK3 führt^[21]. Zum anderen führt es direkt zu einer kompetitiven Hemmung von GSK3, weil es die für ihre Funktion wichtigen Mg²⁺-Ionen ersetzt^[86]. Kürzlich wurde in murinen Neuronen ein weiterer Mechanismus zur Erklärung des Effektes von LiCl auf GSK3 entdeckt. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte hierbei ein Einfluss auf der Transkriptionsebene festgestellt werden, welcher sich als verminderte GSK3-mRNA Produktion bei den mit LiCl behandelten Zellen manifestierte^[68].

Die der GSK3 im TLR-Signalweg vorgeschaltete PI3K (siehe Kapitel 1.4.2) gehört zu einer Familie von Lipidkinasen, welche die Addition eines Phosphatmoleküls an die 3'OH-Position eines Phosphatidylinositolringes katalysieren. Ebenso wie GSK3 ist auch PI3K an der Regulierung einer Vielzahl von fundamentalen Zellfunktionen wie dem Wachstum und dem Überleben, der malignen Transformation sowie Veränderungen im Zytoskelett der Zelle beteiligt. PI3K besteht aus zwei Untereinheiten, der regulatorischen p85- sowie der katalytischen p110-Untereinheit, welche jeweils in mindestens fünf verschiedene Isoformen existieren. Die Aktivierung von PI3K geschieht in zwei Schritten. Dabei kommt es zunächst

zur Assoziation der mit dem TLR interagierenden p85-Untereinheit mit der p110-Untereinheit. Hierauf folgt die Interaktion des entstandenen Heterodimers mit einem Aktivator-Protein, welche letztlich zur Aktivierung von PI3K führt. Die aktive PI3K ist nun in der Lage verschiedene targets, zu denen unter anderem die Serin-Threonin-Kinase Akt-1 gehört zu phosphorylieren^[49].

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 angedeutet wurde, kommt GSK3 sowie PI3K im Rahmen der Funktion von DCs eine bedeutende Rolle zu. Beide Enzyme sind entscheidend an der alternativen TLR-Signalkaskade in jenen Zellen beteiligt, welche die adaptive Immunantwort auslösen und steuern. GSK3 scheint hierbei an einer Schlüsselposition zu stehen, an der die Entscheidung für eine pro- oder antiinflammatorische Immunantwort fällt. Die Regulierung von GSK3 im TLR-Signalweg von DCs scheint also letztlich über das Outcome einer Infektion zu entscheiden.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die Interaktion zwischen humanen dendritischen Zellen und *Aspergillus fumigatus* genauer zu charakterisieren. Die Versuche dieser Arbeit richten sich dabei nach Erkenntnissen von Martin et al., welche wie in Kapitel 1.4.2 ausführlich beschrieben wurde einen alternativen, sich an den Toll-like Rezeptor anschließenden Signalweg erstbeschrieben haben^[65]. Die Autoren postulierten diesen Signalweg für den TLR 4 humaner Monozyten im Rahmen der Erkennung von LPS. Die Arbeit von Rodionova et al. lieferte erste Hinweise darauf, dass dieser PI3K-abhängige Signalweg auch in humanen DCs eine Rolle spielen könnte^[80]. In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte nachgewiesen werden, inwieweit dieser Signalweg auf die Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane DCs übertragbar ist, vor allem im Hinblick auf den regulierenden Einfluss von GSK3 auf die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine. Diese Zytokine führen zur Auslösung bestimmter T_h-Zellantworten, welche über das Outcome der invasiven Aspergillose entscheiden. Nur eine adäquate T_h-Zellantwort kann dabei das Überleben der Patienten günstig beeinflussen. Die Betei-

ligung von GSK3 wurde hierfür bei der Konfrontation der dendritischen Zellen mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Antigenen sowie verschiedenen Morphologien des Schimmelpilzes untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer GSK3-Hemmung auf die resultierende Zytokinantwort nach Stimulierung der Zellen mit *Aspergillus*-Keimschläuchen beobachtet.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ - Inkubator	Heraeus HERAcell 240i	Thermo Scientific / Kendro Laboratory Products
Gefrierschränke -20°C	Comfort / Premium No Frost	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus HERAfreeze	Thermo Scientific / Kendro Laboratory Products
Kühlblock	LightCycler Centrifuge Adapters	Roche
Kühlschrank +4°C	Premium	Liebherr
Magnet für Zellsortierung	QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec
Mikroskop	Type 120 Phase Contrast	Nikon Instruments Europe B.V.
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf
Mikrozentrifuge	Galaxy Mini	VWR international
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-improved	Marienfeld
PCR-Gerät	Mastercycler	Eppendorf
Photometer	Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Reference	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
real time PCR-Gerät	LightCycler 1.5	Roche
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS 9	Thermo Scientific / Kendro Laboratory Products
Ultrazentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S- R	Thermo Scientific / Kendro Laboratory Products
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.

Tabelle 1

Verwendete Geräte

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	CellStar PP-Test Tubes 15 ml / 50 ml	greiner bio-one
LightCycler Kapillaren	20 µl	Roche
Mikrotiterplatten (6-Well, 24-Well)	Multiwell 6 well / 24 well	Becton Dickinson
Pasteurpipetten	Einmal-Pasteurpipetten	Hartenstein
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Pipettenspitzen 10 µl / 100 µl / 1000 µl	nerbe plus
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	SafeSeal micro tubes 0,2 ml / 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar Stripette 5 ml / 10 ml / 25 ml	Corning
Trennsäulen für Zellsortierung	Separation Columns LS	Miltenyi Biotec
Zellkulturflaschen (200 ml)	CellStar Tissue Culture Flasks 200 ml	greiner bio-one
Zellschaber	Cell Scraper 23 cm	SPL life sciences

Tabelle 2

Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.3 Kits

Kit	Inhalt	Hersteller
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe PCR Kit	LightCycler FastStart Enzyme LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe MgCl ₂ Stock Solution, 25 mM H ₂ O, PCR-grade	Roche
QIAshredder	QIAshredder Spin Columns	Qiagen
QuantiFast Probe PCR Kit	QuantiFast Probe PCR Master Mix RNase-Free Water	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	gDNA Wipeout Buffer Quantiscript Reverse Transcriptase Quantiscript RT Buffer RT Primer Mix RNase-Free Water	Qiagen
RNeasy Mini Kit	RNeasy Mini Spin Columns Collection Tubes (1,5 ml, 2 ml) Buffer RLT Buffer RW1 Buffer RPE (concentrate) RNase-Free Water	Qiagen

Tabelle 3

Verwendete Kits

2.4 Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
β -Mercaptoethanol	β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
CD14-Antikörper	CD14-Microbeads human	Miltenyi Biotec
Dichtegradient für Zellsortierung	Biocoll Separating Solution (FICOLL)	Biochrom AG
Ethanol 100 %	Ethanol 100%	Roth
FCS	FCS	Sigma-Aldrich
HBSS	GIBCO HBSS	Invitrogen
LPS (ultrarein)	LPS (ultrarein)	Sigma-Aldrich
Refobacin	Refobacin 80 mg	Merck
Trypanblau	Trypan blue solution	Fluka Chemie
Zellkulturmedium	GIBCO RPMI 1640 Medium (+ GlutaMAX)	Invitrogen

Tabelle 4

Verwendete Reagenzien

2.5 Zytokine

Zytokin	Stammlösung	Hersteller
GM-CSF	250 μ g/ml Hanks	Berlex
IL-4	10 μ g/ml Hanks	R&D Systems

Tabelle 5

Verwendete Zytokine

2.6 Primer

Gen	Primer	Sequenz	Hersteller
GSK3 β	S	5' - GAAAGTTAGCAGAGACAAGGACG - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - CACCACTGGAGTAGAAGAAATAACG - 3'	
hALAS	S	5' - AATGAGTCGCCACCCACG - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - CAGCTCCCCTCTAAGTCCA - 3'	
IL-1 β	S	5' - CAGGGACAGGATATGGAGCAA - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - GCAGACTCAAATCCAGCTTGTTA - 3'	
IL-6	S	5' - CTTTTGGAGTTTGAGGTATACCTAG - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - CGCAGAATGAGATGAGTTGTC - 3'	
IL-12p35	S	5' - GAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGG - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - TCAAGGGAGGATTTTTGTGG - 3'	
IL-23	S	5' - ACTAGTGGGACACATGGATCTA - 3'	TIB MOLBIOL
	A	5' - TGAGTCCTTGGGGGTCAC - 3'	

Tabelle 6

Verwendete Primer

2.7 Sonden

Gen	Sonde	Sequenz	Hersteller
GSK3 β	FL	5' - AGTGTCTGTATAGCTGACTTCTTGTGGCC - 3'	TIB MOLBIOL
	LC	5' - GTCTGGACCCTGCCCAGGAGTT - 3'	
hALAS	FL	5' - CCTGCCCCAGCACCATGTTGTTTC - 3'	TIB MOLBIOL
	LC	5' - GTGTCCATAACTGCCCCACACACC - 3'	
IL-1 β	FL	5' - GCTTATCATCTTTCAACACGCAGGACA - 3'	TIB MOLBIOL
	LC	5' - GTACAGATTCTTTTCCTTGAGGCCCA - 3'	
IL-6	FL	5' - TAGATGCAATAACCACCCCTGACCCA - 3'	TIB MOLBIOL
	LC	5' - CCACAAATGCCAGCCTGCTGAC - 3'	
IL-12p35	FL	5' - AGGCAGATCTTTCTAGATCAAACATGCTG - 3'	TIB MOLBIOL
	LC	5' - CAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCC - 3'	
IL-23		5' - CCATCTCCACACTGGATATGGGGA - 3'	TIB MOLBIOL

Tabelle 7

Verwendete Sonden

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Gewinnung von CD14-positiven Monozyten

PBMC-Isolierung

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten unreifen dendritischen Zellen (iDCs) werden in vitro aus CD14-positiven Monozyten gesunder Spender generiert. Diese Monozyten werden aus sogenannten buffy coats gewonnen, welche bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und Plasmapräparaten aus Vollblutspenden durch Zentrifugation entstehen. Die hierfür benötigten buffy coats, welche ein Gemisch aus Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und toten Zellen enthalten werden vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg bereitgestellt.

Für die Gewinnung humaner mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)^c werden zunächst 50 ml des buffy coats in eine 200 ml-Zellkulturflasche überführt und mit einer Puffer-Lösung (HBSS) auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend werden vier 50 ml-Falconröhrchen mit je 20 ml eines aus Saccharose-Epichlorhydrin-Polymeren bestehenden Dichtegradienten (FICOLL) vorbereitet. Diese werden nun vorsichtig mit je 25 ml des verdünnten Patientenblutes überschichtet. Durch zwanzigminütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm und Raumtemperatur bildet sich die sogenannte Interphase, welche die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) enthält. Die restlichen Zellen, welche im Patientenblut vorhanden sind, setzen sich aufgrund ihrer größeren Dichte am

^cPBMCs: Monozyten und Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen)

Boden der Falconröhrchen ab. Die Interphase wird nun mit einer Pasteurpipette vorsichtig aufgenommen und in ein neues 50 ml-Falconröhrchen überführt. Dann wird wiederum mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 1300 rpm und 4°C für zehn Minuten bildet sich nun ein Zellpellet am Boden des Falconröhrchens. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und das Zellpellet wird in 50 ml HBSS gelöst. Während des sich anschließenden Zählvorganges werden die suspendierten PBMCs bei 4°C gelagert.

Zum Zählen der isolierten PBMCs wird ein Aliquot aus 90 μ l HBSS und 10 μ l der Zellsuspension hergestellt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. 10 μ l dieses Aliquots werden anschließend mit 10 μ l Trypanblau gefärbt, wodurch sich insgesamt eine Verdünnung von 1:20 ergibt. Die Trypanblaufärbung erlaubt eine zusätzliche Vitalitätsdiagnostik der auszählenden Zellen, da sich dieser Farbstoff aufgrund der veränderten Permeabilität der Plasmamembran nur in toten Zellen anreichert. 10 μ l der gefärbten Zellsuspension werden nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Anschließend wird der Mittelwert der in den vier je 1 mm² großen Eckquadraten der Neubauer-Zählkammer ausgezählten Zellen ermittelt. Die Gesamtzahl der isolierten PBMCs errechnet sich wie folgt:

$$a \times b \times c \times d \times e$$

mit:

- a Mittelwert der gezählten Zellen aus vier Eckquadraten
- b Verdünnungsfaktor (hier konstanter Faktor von 20)
- c Faktor zur Umrechnung der Schichthöhe von 0,1 mm auf 1 mm (konstanter Faktor von 10)
- d Faktor zur Umrechnung von 1 μ l in 1 ml (konstanter Faktor von 1000)
- e Faktor zur Ermittlung der Zellzahl im Ausgangsvolumen (hier konstanter Faktor von 50)

Magnetische CD14-Positivselektion

Im Gegensatz zu anderen PBMCs befindet sich auf der Oberfläche der zu isolierenden Monozyten der Oberflächenmarker CD14, welcher nun zur magnetischen Zellsortierung der Monozyten mit Hilfe eines monoklonalen CD14-MicroBeads-Antikörpers verwendet wird.

Die Zellsuspension wird erneut für zehn Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, wodurch sich wiederum ein Zellpellet bildet. Nach Dekantieren des Flüssigkeitsüberstandes werden die PBMCs mit HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) soweit verdünnt, dass sich $1,5 \times 10^8$ Zellen in 850 μ l Lösung befinden. Dieser Ansatz wird nun auf vier 20 ml-Falconröhrchen zu je 850 μ l aufgeteilt, und es werden je 150 μ l CD14-MicroBeads dazupipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation dieser Ansätze bei 8°C werden je 20 ml HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) hinzugefügt. Dieser Schritt sowie das sich anschließende zehnmündige Zentrifugieren bei 1300 rpm und 4°C dienen dem Auswaschen von ungebundenen Antikörpern. Der Flüssigkeitsüberstand wird dekantiert, das jeweils entstandene Zellpellet in je 1 ml HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) resuspendiert.

Die so gelösten Zellen werden auf jeweils eine zuvor in den MACS-Magneten eingebrachte MACS-Trennsäule pipettiert. Durch das Einbringen der ferromagnetischen Trennsäulen in den Magneten entsteht ein starkes magnetisches Feld, welches die mit den superparamagnetischen MicroBeads-Antikörpern markierten Zellen zurückhält. Nach dreimaligem Spülen der Trennsäulen mit jeweils 3 ml HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) befinden sich nun ausschließlich die CD14-positiven Monozyten in der Säulenmatrix, in welcher sie magnetisch durch die an den CD14-Antikörper gebundenen MicroBeads festgehalten werden.

Die Trennsäulen werden anschließend nacheinander aus dem Magneten herausgenommen und auf ein 15 ml-Falconröhrchen gesetzt. Mit Hilfe eines zur Trennsäule zugehörigen Stempels werden die CD14-positiven Zellen nach Zugabe von je 2 ml HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) aus der Trennsäule herausgedrückt. Die so gewonnenen Zellen werden mit HBSS (+ 1% FCS + 2 mM EDTA) auf 10 ml aufgefüllt und erneut wie oben beschrieben mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Während

des Zählvorganges werden die suspendierten Zellen wiederum bei 4°C gelagert.

3.1.2 Generierung von iDCs aus CD14-positiven Monozyten

Durch Stimulation der isolierten CD14-positiven Monozyten mit IL-4 und dem Wachstumsfaktor GM-CSF erfolgt deren Differenzierung zu iDCs. IL-4 hemmt bei dieser Vorgehensweise die Weiterentwicklung der Monozyten^[85].

Zur Kultivierung der ausgezählten und suspendierten Zellen werden diese für zehn Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, anschließend wird der Überstand dekantiert. Das entstandene Zellpellet wird im zuvor angesetzten Medium (siehe Tabelle 8) so gelöst, dass sich in 3 ml Medium je $2,5 \times 10^6$ Zellen befinden. Dann werden 6-Well-Platten mit jeweils 3 ml des zellhaltigen Mediums pro Well bestückt. Die so kultivierten Zellen werden für fünf bis sieben Tage im Brutschrank bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Reagenz	Menge / Konzentration
RPMI-Medium	90 % des Endvolumens
FCS	10 % des Endvolumens
GM-CSF	Endkonzentration von 100 ng/ml
IL-4	Endkonzentration von 20 ng/ml

Tabelle 8

Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Alle 48 Stunden wird ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Hierzu wird zunächst jedem Well 1 ml Medium entnommen. Die darin enthaltenen Zellen werden durch zehnmütige Zentrifugation bei 1300 rpm bei Raumtemperatur pelletiert, der Überstand wird dekantiert. Anschließend wird das Zellpellet im gleichen Volumen frischen Mediums, welches wie in Tabelle 8 beschrieben zusammengestellt wird gelöst und je 1 ml dieser Suspension in jedes Well zurückgegeben.

Nach fünf bis sieben Tagen können die iDCs geerntet werden. Die mittlerweile am Boden der Wells adhären Zellen werden mit Hilfe eines

Zellschabers und durch mehrmaliges Spülen mit HBSS von der Mikrotiterplatte abgelöst, anschließend bei 1300 rpm für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, in 20 ml HBSS resuspendiert und wie oben beschrieben mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Total-RNA

Für die Isolierung von Total-RNA^d aus den dendritischen Zellen werden das RNeasy Mini Kit sowie der QIAshredder von Qiagen verwendet.

Die zuvor dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechend stimulierten Zellen (siehe Kapitel 3.4) werden mit Hilfe einer Pipette vom Boden der 24-Well-Platten gelöst und in 1,5 ml-Tubes überführt. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 5400 rpm bildet sich ein Zellpellet aus, dessen Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und für eine eventuelle spätere Verarbeitung bei -80°C eingefroren wird. Das Pellet wird nun in je 350 µl des zuvor frisch mit 1% β-Mercaptoethanol angesetzten RLT-Puffers suspendiert, wodurch die Plasmamembranen der Zellen und ihrer Organellen zerstört und eventuell vorhandene RNasen inaktiviert werden. Diese Zellsuspension wird anschließend in die QIAshredder-Tubes überführt und für eine Minute bei 13200 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt dient der Homogenisierung des Lysates. Der durch das Abzentrifugieren entstandene Durchlauf wird nach Mischung mit 350 µl 70%igen Ethanols in die RNeasy-Spinsäule pipettiert. Das Hinzufügen des 70%igen Ethanols optimiert die Bindung der RNA an die Silica-Membran der RNeasy-Spinsäule. Diese Membran ist selektiv für RNA, deren Länge 200 Nukleotide überschreitet. Da die meisten rRNAs und tRNAs kürzer als 200 Nukleotide sind, erfolgt eine Anreicherung der längeren mRNA in der RNeasy-Spinsäule. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm liegt die Total-RNA an die Silica-Membran der Spinsäulen gebunden vor.

^dTotal-RNA: gesamte RNA einer Zelle (mRNA, tRNA, rRNA etc.)

Die Spinsäulen werden auf ein neues 1,5 ml-Tube gesetzt und zur Aufreinigung der RNA mit jeweils 700 μ l RW1-Puffer versehen, es schließt sich ein erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 10000 rpm an. Danach wird der Filter zweimal mit je 500 μ l RPE-Puffer gewaschen, im ersten Schritt wird wiederum für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert, im zweiten Schritt für zwei Minuten bei 13200 rpm. Der Durchfluss dieser drei Waschschrte wird jeweils verworfen. Um letzte Reste der verwendeten Puffer aus den Filtern zu eliminieren schließt sich nun noch eine einminütige trockene Zentrifugierung der auf ein neues 1,5 ml-Tube gesetzten Spinsäulen bei 13200 rpm an.

Die Säulen werden im Anschluss nochmals auf ein neues 1,5 ml-Tube umgesetzt, jeweils 35 μ l RNase-freies Wasser werden vorsichtig direkt auf die Filter pipettiert. Durch Zentrifugation von einer Minute Dauer bei 10000 rpm wird die Total-RNA mit Hilfe des RNase-freien Wassers aus dem Filter eluiert und liegt nun im Durchlauf vor.

Die so gewonnene Total-RNA wird sofort auf Eis gelagert. Nach photometrischer Vermessung der RNA-Konzentration (siehe Kapitel 3.2.2) wird das Material bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 cDNA-Synthese

Photometrische Vermessung der RNA-Konzentration

Die Ermittlung der Konzentration der Total-RNA erfolgt über die Bestimmung ihrer optischen Dichte (OD). Das Prinzip der OD-Messung beruht darauf, dass RNA ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 260 nm zeigt.

Zur photometrischen Vermessung wird das NanoDrop Spectrophotometer mit dem Programm ND 1000 V3 1.0 verwendet, welches die gemessenen Absorptionen automatisch in RNA-Konzentrationen umrechnet. Der BLANK-Wert des Gerätes wird im Vorfeld mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Anschließend werden je 2 μ l der Proben je zweimal vermessen, die weiterhin verwendete RNA-Konzentration ergibt sich aus dem Mittelwert.

Um eine möglichst geringe Proteinkontamination der Proben zu gewährleisten sollte die Ratio der gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,75 und 2,01 liegen^[25].

cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Der folgende Schritt dient der Generierung der für die real time RT-PCR benötigten doppelsträngigen cDNA aus der in der Total-RNA enthaltenen mRNA. Hierfür wird das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet.

Zunächst wird in die benötigte Anzahl auf Eis stehender 0,2 ml-Tubes je 2 µl gDNA Wipeoutbuffer vorgelegt. Anschließend wird die erforderliche Menge der zu transkribierenden RNA und RNase-freies Wasser hinzupipettiert, so dass sich insgesamt ein Volumen von 14 µl pro Ansatz ergibt. Die Proben werden nun kurz zentrifugiert, um eventuell vorhandene Luftblasen aus der Flüssigkeit zu entfernen. Dann werden die Proben im Mastercycler für fünf Minuten bei 42°C inkubiert, wodurch die enthaltene genomische DNA eliminiert wird.

Währenddessen wird in einem ebenfalls auf Eis stehenden 1,5 ml-Tube der Mastermix für die reverse Transkription entsprechend Tabelle 9 zusammengestellt. Dieser Mastermix wird gut gevortext und kurz zentrifugiert, anschließend wird er auf Eis gelagert.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer (5x)	4 µl
RT Primer Mix	1 µl

Tabelle 9

Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription

Nun werden die Proben aus dem Mastercycler herausgenommen und wiederum auf Eis gestellt. Dann werden je 6 µl des Mastermixes hinzupipettiert und mehrfach aspiriert, so dass sich ein Endvolumen von

20 μ l ergibt. Es schließt sich eine weitere Inkubation im Mastercycler an, zunächst für 25 Minuten bei 42°C, dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, dann für drei Minuten bei 95°C um das Enzym zu deaktivieren. Zum Schluss werden die Proben noch für fünf Minuten bei 4°C gekühlt.

Der verwendete Primer Mix enthält eine Mischung aus Random-Primern und Oligo-dT-Primern, welche selektiv an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Dadurch synthetisiert die reverse Transkriptase zunächst ein RNA/DNA-Hybridmolekül, dessen RNA-Anteil anschließend durch die RNase H-Aktivität der reversen Transkriptase degradiert wird. Zum Schutz der nicht-hybridisierten RNA ist in Quantiscript Reverse Transcriptase zusätzlich ein RNase-Inhibitor enthalten. In einem zweiten Schritt wird schließlich der komplementäre DNA-Strang synthetisiert.

Die so generierte cDNA wird aus dem Mastercycler herausgenommen und bis auf Weiteres bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Quantitative real time RT-PCR

Die quantitativen Genexpressionsanalysen werden mit Hilfe der real time RT-PCR durchgeführt, welche die in-vitro-Amplifikation von DNA mittels PCR^[70] mit einer Quantifizierung der PCR-Produkte durch Fluoreszenzmessung kombiniert. Diese Methode erlaubt die hochspezifische Quantifizierung sehr kleiner DNA-Mengen und beinhaltet sowohl die Amplifikation als auch die Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte in einem geschlossenen System, wodurch die Kontamination der Proben minimiert wird^[62]. Verwendet werden das LightCycler FastStart DNA Master HybProbe PCR Kit von Roche sowie das QuantiFast Probe PCR Kit von Qiagen entsprechend der in den Vorarbeiten von Katrin Spinnler^[88] und Carina Bäuerlein^[14] eingesetzten Materialien. Die verwendeten Primer und Sonden sind für das jeweilige Gen spezifisch und werden von TIB MOLBIOL bezogen.

Die Sonden für hALAS, GSK3, IL-12p35, IL-6 und IL-1 β sind Hybridisierungssonden, die nach dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Prinzip (FRET-Prinzip) arbeiten. Donor und Akzeptor sind Oligonukleotide,

deren Sequenz zum jeweils gesuchten Gen komplementär ist. Der Donor ist an seinem 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert, der bei Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 470 nm selbst grünes Licht der Wellenlänge 540 nm emittiert. Befindet sich der Akzeptor, welcher an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff LC Red 640 trägt, in räumlicher Nähe zum Donor, so wird der Farbstoff des Akzeptors durch das abgestrahlte Licht des Donor-Farbstoffes angeregt und emittiert nun selbst rotes Licht von 640 nm Wellenlänge. Die Fluoreszenz des Akzeptors kann nur detektiert werden, solange beide Sonden an das template gebunden sind. Die Intensität des emittierten roten Lichtes entspricht dabei der Menge an PCR-Produkt^[61].

Die Taq-Man-Sonde für IL-23 ist eine Hydrolysierungssonde und arbeitet ebenfalls nach dem FRET-Prinzip. Hierbei wird nur ein zum PCR-Produkt komplementäres Oligonukleotid verwendet, welches an seinem 5'-Ende den Reporter-Farbstoff, am 3'-Ende den Quencher-Farbstoff trägt. Der Reporter-Farbstoff Fluorescein wird mit blauem Licht angeregt, und strahlt nun selbst grünes Licht ab. Dieses Fluoreszenzsignal wird jedoch sofort vom Quencher-Farbstoff Black Berry Quencher (BBQ) ausgelöscht. Erst wenn der Reporter-Farbstoff in der Elongationsphase durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgespalten wird und sich nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher-Farbstoff befindet, kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden^[32]. Auch bei dieser Methode entspricht die Intensität der gemessenen Fluoreszenz der Menge an PCR-Produkt^[61].

Als Template für die real time RT-PCR dient die zuvor synthetisierte cDNA. Die Menge des gebildeten PCR-Produktes wird nach jedem Zyklus durch Fluoreszenzmessung mit Hilfe der Photodioden des Light-Cycler Fluorimeters bestimmt^[100].

Zu Beginn wird in einem auf Eis stehenden 1,5 ml-Tube der PCR-Mastermix entsprechend der Tabellen 10, 11 und 12 zusammensetzt.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RNase-freies Wasser	6 µl
QuantiFast Probe PCR Master Mix	10 µl
Sense-Primer	0,5 µl
Antisense-Primer	0,5 µl
FL-Sonde	0,5 µl
LC-Sonde	0,5 µl

Tabelle 10

Qiagen-Mastermix für Hybridisierungssonden (hALAS, GSK3, IL-12p35, IL-6, IL-1 β)

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RNase-freies Wasser	11,6 µl
MgCl ₂	2,4 µl
Taq Polymerase	2 µl
Sense-Primer	0,5 µl
Antisense-Primer	0,5 µl
FL-Sonde	0,5 µl
LC-Sonde	0,5 µl

Tabelle 11

Roche-Mastermix für Hybridisierungssonden (hALAS, GSK3, IL-12p35, IL-6, IL-1 β)

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RNase-freies Wasser	8,6 µl
MgCl ₂	2,4 µl
Taq Polymerase	2 µl
Sense-Primer	1,5 µl
Antisense-Primer	1,5 µl
Taq-Man-Sonde	2 µl

Tabelle 12

Roche-Mastermix für Hydrolysierungssonde (IL-23)

Anschließend wird die erforderliche Anzahl an LightCycler Kapillaren vorsichtig in den Kühlblock gesteckt. Je 18 µl des zuvor gut gevortexten

Mastermixes werden in jede Kapillare pipettiert. Nun werden 2 µl der jeweiligen cDNA zu jedem Reaktionsansatz hinzugegeben, wobei mehrfach aspiriert wird. Es schließt sich ein 15-sekündiges Zentrifugieren bei 2000 rpm an, wodurch die Flüssigkeit in den unteren Teil der Kapillaren gelangt und eventuell vorhandene Luftblasen eliminiert werden. Dann werden die Kapillaren vorsichtig aus dem Kühlblock herausgenommen und in das Probenkarussell umgesteckt. Dieses wird in den LightCycler eingesetzt, das jeweilige Amplifikationsprogramm wird gestartet (siehe Tabellen 13, 14 und 15).

	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	3 min (Qiagen) / 10 min (Roche)
Amplifikation	45	95°C	15 sek
		55°C	15 sek
		72°C	15 sek
Kühlen	1	40°C	30 sek

Tabelle 13

Amplifikationsprogramm für hALAS und GSK3

	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	3min (Qiagen) / 10 min (Roche)
Amplifikation	45	95°C	9 sek
		54°C	15 sek
		72°C	20 sek
Kühlen	1	40°C	5 sek

Tabelle 14

Amplifikationsprogramm für IL-12p35, IL-6 und IL-1β

	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	10 min
Amplifikation	50	95°C	5 sek
		60°C	30 sek
Kühlen	1	40°C	30 sek

Tabelle 15

Amplifikationsprogramm für IL-23

In der frühen Phase der Amplifikation übertreffen die detektierten Hintergrundsignale durch ungebundene Sonden die spezifischen Signale der an das amplifizierte Gen gebundenen Sonden. Beim Übergang in die exponentielle log-Phase jedoch heben sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes signifikant vom Hintergrundsignal ab^[101], was von der LightCycler Software als Crossing-Point (CP) erkannt wird. Der CP wird umso schneller erreicht, je mehr Nukleinsäure vom LightCycler detektiert wird. Die Expression des jeweiligen Gens wird mit Hilfe eines internen Standards, des sogenannten Housekeeping-Gens normalisiert, um Abweichungen z.B. in der Effizienz der reversen Transkription auszugleichen. Das Housekeeping-Gen sollte idealerweise in den verschiedenen Geweben eines Organismus und unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden^[33]. Der in dieser Arbeit verwendete interne Standard ist das für die Häm-Biosynthese benötigte Enzym humane δ -Aminolävulinatsynthase (hALAS), deren CP ebenfalls bestimmt wird. Die normalisierte Expression errechnet sich unter Annahme einer maximalen Amplifikationseffizienz mit der folgenden Formel^[44]:

$$\text{Normalisierte Expression} = 2^{\text{CP hALAS} - \text{CP Target}}$$

Die normalisierte Expression der unstimulierten Kontrolle wird gleich 100%, die normalisierte Expression der stimulierten Zellen wird hierzu ins Verhältnis gesetzt. Dadurch ergibt sich die relative Expression des jeweiligen Gens^[33].

$$\text{Relative Expression} = \frac{\text{Normalisierte Expression stimulierte Zellen}}{\text{Normalisierte Expression Kontrolle}}$$

3.3 Statistik

Alle Versuche in der vorliegenden Promotionsarbeit wurden mindestens als $n = 2$ produziert. Für die Versuche mit verschiedenen Aspergillus-Antigenen wurden die Zellen von vier verschiedenen Spendern mit Aspf 1, von je drei verschiedenen Spendern mit Aspf 16 und Aspf 6, jeweils im einfachen Ansatz stimuliert. Die Versuche mit dem GSK3-Inhibitor Lithiumchlorid (LiCl) wurden an den Zellen von drei verschiedenen Spendern, jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt. Für die Versuche mit unterschiedlichen Aspergillus-Morphologien wurden die Zellen von drei verschiedenen Spendern jeweils im zweifachen Ansatz stimuliert.

Von allen gemessenen Werten wurde das arithmetische Mittel (\bar{x}) anhand folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Die Standardabweichung (s) der Messwerte wurde wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Stimulierung mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus* - Antigenen

Nähere Informationen zu dem im Folgenden erklärten Versuchsaufbau sind der Diplomarbeit von Carina Bäuerlein^[14] zu entnehmen.

Für die Stimulierung der wie oben beschrieben generierten iDCs mit den rekombinanten Antigenen Aspf 1, Aspf 6 und Aspf 16 wurden jeweils 10^6 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen lagen hierbei in je einem Milliliter RPMI mit 10 % FCS gelöst vor. Die unstimulierten Zellen stellten die Negativkontrolle dar, während die Stimulierung der Zellen mit LPS in der Konzentration $10 \mu\text{g/ml}$ als Positivkontrolle diente.

Die zu untersuchenden rekombinanten Antigene wurden in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ appliziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre. Anschließend wurden die DCs zu drei verschiedenen Zeitpunkten, nach 6, 24 und 48 Stunden geerntet und ihre RNA gewonnen. Diese diente als Ausgangsmaterial für die anschließende cDNA-Synthese und für die Bestimmung der relativen Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-12p35, IL-6 und IL-1 β sowie der GSK3 mittels quantitativer real time RT-PCR.

Für die Untersuchung der GSK3-Expression wurden vier verschiedene Spender im einfachen Ansatz mit Aspf 1, je drei verschiedene Spender im einfachen Ansatz mit Aspf 6 und Aspf 16 stimuliert. Die 48-Stundenwerte der GSK3-Expression nach Behandlung mit Aspf 6 und Aspf 16 liegen von zwei der stimulierten Spender vor. Die Expression von IL-12p35, IL-6 und IL-1 β wurde orientierend mit Hilfe der Zellen eines Spenders nach Stimulation mit Aspf 1 und Aspf 16 bestimmt.

3.4.2 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid

Nähere Informationen zu den im Folgenden beschriebenen Versuchen sind in der Diplomarbeit von Katrin Spinnler^[88] zu finden.

Je 10⁶ der aus Monozyten generierten iDCs wurden in einem Milliliter RPMI mit 10 % FCS gelöst und in einer 24-Well-Platte ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen mit LiCl in einer Endkonzentration von 10 mM versehen und für zwei Stunden bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die nicht mit dem GSK3-Inhibitor behandelten iDCs dienten als Kontrolle für die Auswirkung der Inhibition auf die Zytokinexpression der Zellen. Die Stimulierung der iDCs erfolgte anschließend mit je 10⁶ Keimschläuchen von *Aspergillus fumigatus*, so dass sich ein DC : Keimschlauch-Verhältnis von 1 : 1 ergab. Als Positivkontrolle dienten mit LPS in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ stimulierte Zellen, während unstimulierte Zellen die Negativkontrolle darstellten. Alle Zellen wurden nochmals bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die DCs geerntet, ihre RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der relativen Genexpression

der Zytokine IL-12p35 und IL-23 erfolgte mittels quantitativer real time RT-PCR.

Der hier beschriebene Versuchsaufbau wurde an den Zellen von drei verschiedenen Spendern, jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt.

3.4.3 Stimulierung mit verschiedenen *Aspergillus fumigatus* - Morphologien

Für die Stimulierung mit den verschiedenen Schimmelpilz-Morphologien wurden zunächst je 10^6 der wie oben beschrieben generierten iDCs in einem Milliliter RPMI mit 10 % FCS gelöst und in einer 24-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden je 10^6 Konidien, Keimschläuche oder Hyphen von *Aspergillus fumigatus* zu diesen Zellen dazugegeben, was einem DC : *Aspergillus*-Verhältnis von 1 : 1 entspricht. Als Positivkontrolle dienten DCs, die mit 1 μ g LPS pro ml stimuliert wurden, die Negativkontrolle stellten wiederum unstimulierte Zellen dar. Nach 3- bzw. 6-stündiger Inkubation bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde die relative Expression von GSK3 mittels quantitativer real time RT-PCR bestimmt.

Dieser Versuchsaufbau wurde mit den Zellen von drei verschiedenen Spendern, jeweils im doppelten Ansatz durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Stimulierung mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus* - Antigenen

4.1.1 Expression von GSK3

Der erste Versuch diente der Erforschung einer Beteiligung der GSK3 am Signaling von iDCs nach Erkennung einzelner *Aspergillus fumigatus*-Antigene. Hierfür wurden die Zellen mit den rekombinanten Antigenen Aspf 1, Aspf 6 und Aspf 16 stimuliert. Die GSK3-Expression der unstimulierten Negativkontrollen zu den drei verschiedenen Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden wurde dabei auf 100 % festgelegt. Die Expression der stimulierten Zellen wurde hierzu ins Verhältnis gesetzt und mit der jeweiligen Positivkontrolle, den mit LPS behandelten iDCs verglichen. LPS ist als starker proinflammatorischer Reiz für die Zellen des menschlichen Immunsystems bekannt, bei dessen Erkennung unter anderem GSK3 beteiligt ist.

Die mit LPS im Einfach-Ansatz stimulierten DCs von fünf verschiedenen Spendern zeigen im Durchschnitt eine verringerte GSK3-Expression (siehe Abb. 3). An den beiden Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden liegt sie mit 15 % (± 6 %) und 29 % (± 14 %) deutlich unter 50 %, nach 6 Stunden liegt die GSK3-Expression der DCs durchschnittlich bei 73 % (± 64 %). Zusammengefasst zeigt sich also, dass die Expression von GSK3 in humanen DCs auf den proinflammatorischen Reiz LPS hin verringert wird.

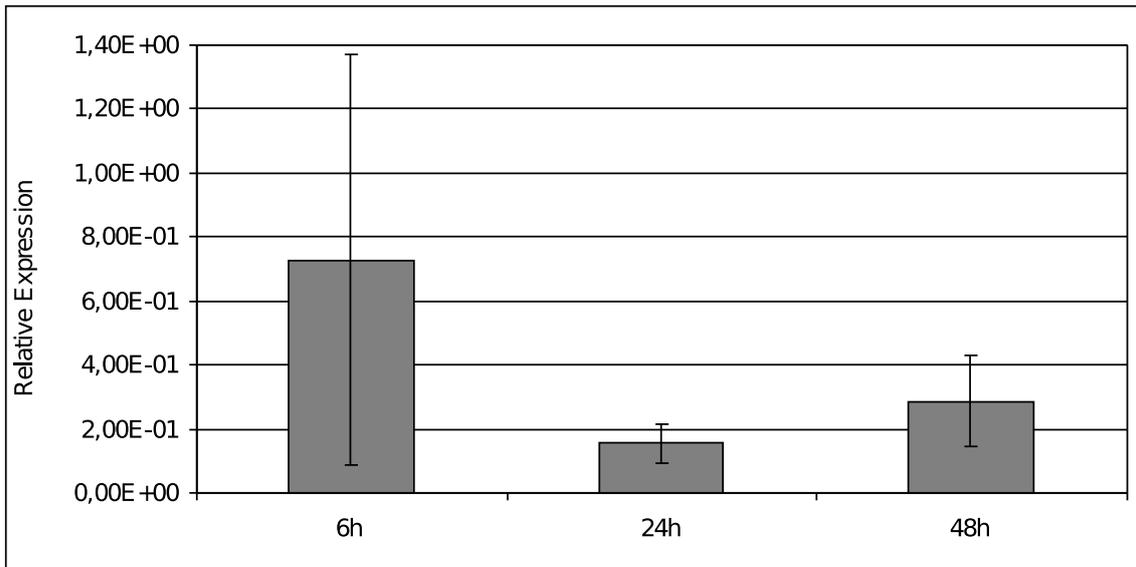


Abbildung 3

Durchschnittliche GSK3-Expression 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS

Die an einem Spender beispielhaft veranschaulichte Stimulation der Zellen mit Aspf 6 erzielt keine deutliche Veränderung der GSK3-Expression (siehe Abb. 4). Sie schwankt zu allen Zeitpunkten um den Wert der unstimulierten Zellen und verhält sich nicht parallel zu der Expression der jeweiligen Positivkontrolle. Nach 6 Stunden beträgt die GSK3-Expression des gezeigten Spenders 103 % im Vergleich zu 66 % der LPS-Kontrolle, nach 24 Stunden 83 % im Vergleich zu 11 % der LPS-Kontrolle. Nach 48 Stunden beträgt die Expression 101 % im Vergleich zu 44 % der Positivkontrolle. Die anderen Spender verhalten sich im Durchschnitt parallel zu diesen Ergebnissen, ihre GSK3-Expression zeigt ebenfalls kaum eine Reaktion auf die Stimulierung mit Aspf 6. Die Expressionswerte nach 48 Stunden wurden insgesamt bei zwei verschiedenen Spendern, die zu den übrigen Zeitpunkten bei drei verschiedenen Spendern, jeweils im einfachen Ansatz bestimmt.

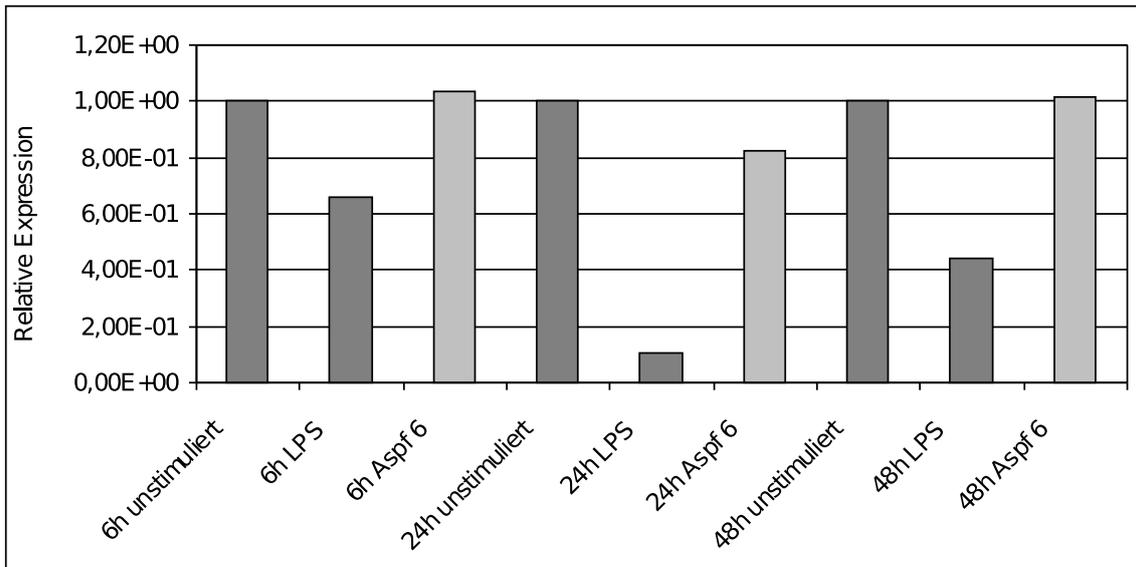


Abbildung 4

Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 6

Auch die Stimulierung der iDCs mit Aspf 16 zeigt kaum eine Auswirkung auf ihre Expression der GSK3. Durchschnittlich schwankt sie ebenso wie bei den mit Aspf 6 stimulierten Zellen nur wenig um 100 % und verhält sich nicht parallel zur GSK3-Expression der mit LPS stimulierten Zellen. Der für die Stimulierung mit Aspf 16 beispielhaft gezeigte Spender weist nach 6 Stunden eine GSK3-Expression von 106 % im Vergleich zu 21 % der LPS-Kontrolle und nach 24 Stunden 97 % im Vergleich zu 17 % der LPS-Kontrolle auf (siehe Abb. 5). Die Expressionswerte nach 48 Stunden wurden hier ebenfalls von zwei Spendern, zu den übrigen Zeitpunkten von drei Spendern bestimmt. Der abgebildete Spender zeigt nach 48 Stunden eine verringerte GSK3-Expression von 33 %, die aber im Vergleich zur LPS-Kontrolle mit 10% noch immer etwas weniger deutlich ausfällt. Der zweite, hier nicht gezeigte Spender weist nach Stimulierung mit Aspf 16 keine verminderte GSK3-Expression nach 48 Stunden auf. Von allen Spender wurde ein einfacher Ansatz untersucht.

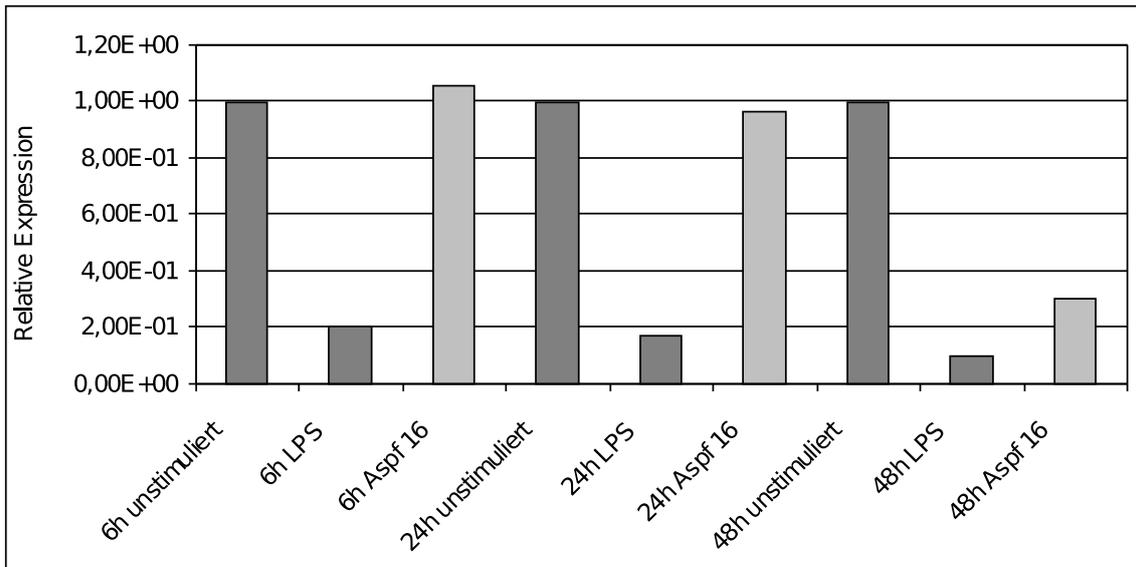


Abbildung 5

Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 16

Im Gegensatz zur Stimulierung der iDCs mit Aspf 6 und Aspf 16 zeigen die mit Aspf 1 behandelten Zellen eine deutliche, zur Positivkontrolle kongruente Reaktion in ihrer GSK3-Expression. Der hier beispielhaft gezeigte Spender weist zu allen drei Zeitpunkten eine Herunterregulierung von GSK3 auf (siehe Abb. 6). Zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden liegt die Expression mit 50 % und 46 % deutlich unter der Expression der unstimulierten Zellen und verhält sich parallel zu den LPS-Kontrollen mit jeweils 23 %. Abgesehen von einem Spender, der häufig entgegengesetzt der anderen reagierte verhalten sich die GSK3-Expressionen der übrigen drei Spender durchschnittlich gleichsinnig zu diesen Ergebnissen. Nach 6 Stunden beträgt die GSK3-Expression des abgebildeten Spenders 76 %. Sie verhält sich hier entgegen ihrer Positivkontrolle, die abweichend vom Durchschnitt zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Expression von 165 % aufweist. Durchschnittlich zeigen jedoch auch die übrigen drei Spender nach 6 Stunden eine verminderte GSK3-Expression, parallel zu ihrer jeweiligen LPS-Kontrolle. Von allen vier Spendern wurde je ein Ansatz hergestellt.

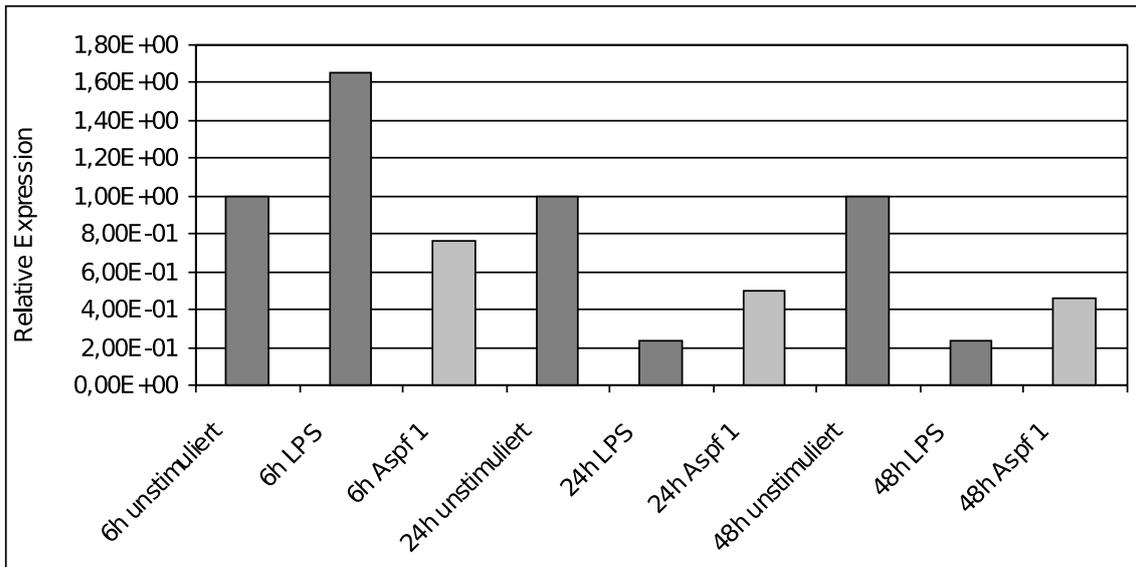


Abbildung 6

Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 1

4.1.2 Expression von IL-12p35, IL-6 und IL-1 β

Der nächste Schritt sollte dazu dienen die Annahme zu verifizieren, dass die im vorangegangenen Versuch beobachtete Reduktion der GSK3-Expression menschlicher iDCs nach Stimulierung mit LPS und Aspf 1 im Zusammenhang mit einer proinflammatorischen Reaktion der Zellen steht. Hierfür wurde bei einem Spender im einfachen Ansatz die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12p35, IL-6 und IL-1 β vergleichend nach Stimulation mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16 untersucht. Laut unseren Beobachtungen ist Aspf 16 eines derjenigen Aspergillus fumigatus-Antigene, welche keinen Einfluss auf die GSK3-Expression der DCs zeigen (siehe Kapitel 4.1.1). Somit sollte dieses Antigen im Gegensatz zu LPS und Aspf 1 auch keine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine hervorrufen. Die untersuchten Zytokine IL-12p35, IL-6 und IL-1 β werden vermehrt von DCs ausgeschüttet, die mit einem Pathogen in Kontakt getreten sind und stehen im Zusammenhang mit der Auslösung proinflammatorischer Immunantworten. Da nur ein Spender untersucht wurde, können hier lediglich Trends in der Zytokinexpression festgestellt werden. Um quantitative Aussagen treffen zu können wä-

re eine Wiederholung der Versuche mit einer größeren Spenderanzahl erforderlich.

Wie oben beschrieben wurde auch hier die Zytokinexpression der unstimulierten Negativkontrolle auf 100 % festgelegt, die Expression der mit LPS stimulierten Positivkontrolle und der mit den *Aspergillus fumigatus*-Antigenen stimulierten DCs wurde hierzu ins Verhältnis gesetzt. Die Zytokin-Expression wurde wiederum zu den Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden bestimmt.

Nach 6 Stunden zeigen die DCs eine stark erhöhte IL-12p35-Expression auf den proinflammatorischen Reiz LPS hin (siehe Abb. 7). Die mit Aspf 1 stimulierten Zellen reagieren ebenso mit einer gesteigerten Expression von IL-12p35, während die mit Aspf 16 behandelten DCs im Vergleich hierzu nur wenig im Sinne der Positivkontrolle reagieren. Eine 24 Stunden dauernde Exposition mit LPS ergab leider entgegen der Erwartungen eine verminderte IL-12p35-Expression (siehe Abb. 8). Auch die Expression der mit Aspf 16 behandelten Zellen verändert sich in diese Richtung, während Aspf 1 eine verhältnismäßig hohe IL-12p35-Expression hervorruft. Nach 48 Stunden ist die Expression der LPS-Kontrolle erneut erhöht, die mit Aspf 1 behandelten Zellen reagieren parallel hierzu (siehe Abb. 9). Auch die Stimulierung mit Aspf 16 erbringt nach 48 Stunden eine leicht erhöhte IL-12p35-Expression, die im Vergleich zu den mit Aspf 1 stimulierten Zellen allerdings deutlich geringer ausfällt.

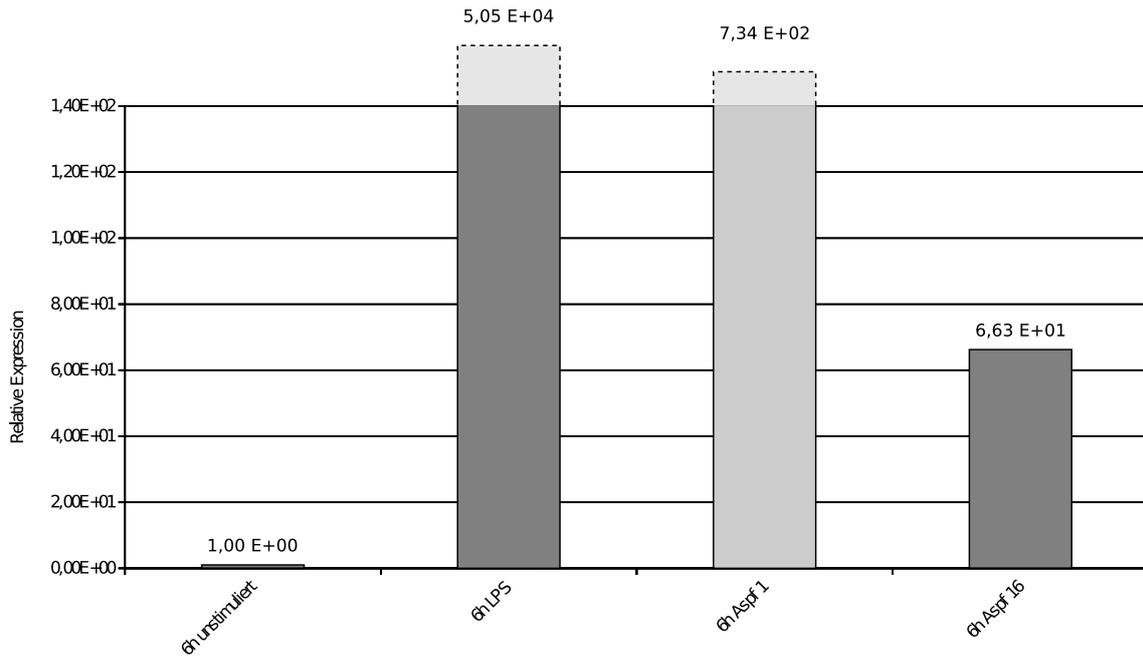


Abbildung 7

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

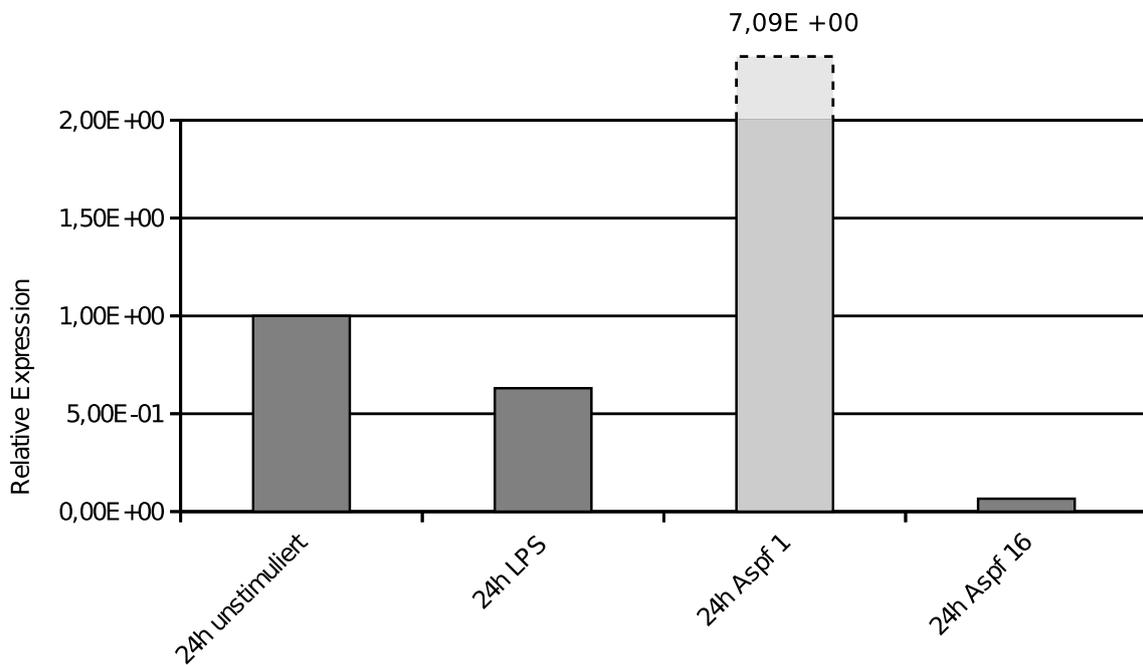


Abbildung 8

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

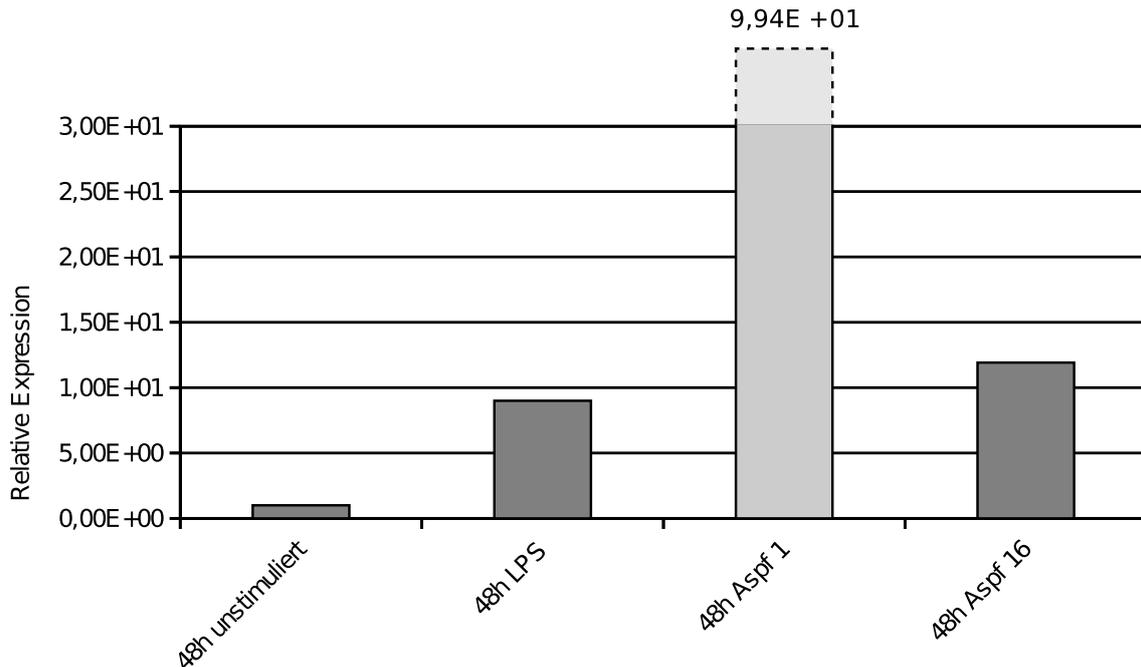


Abbildung 9

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

Wie erwartet zeigt sich nach Stimulierung der Zellen mit LPS ein starker Anstieg der IL-6-Expression zu allen drei Zeitpunkten (siehe Abb. 10, 11, und 12). Die mit Aspf 1 behandelten Zellen zeigen parallel hierzu ebenfalls eine gesteigerte Expression von IL-6, welche besonders nach 24 und 48 Stunden deutlich wird. Im Vergleich weisen die mit Aspf 16 stimulierten Zellen kaum eine Änderung ihrer IL-6-Expression im Sinne ihrer LPS-Kontrolle auf, nach 6 Stunden entwickelt sie sich sogar dieser entgegengesetzt. Nach 24 und 48 Stunden ist die proinflammatorische Reaktion der DCs auf Aspf 1 besonders deutlich zu sehen, während durch Aspf 16 nur eine äußerst geringe Steigerung der IL-6-Expression ausgelöst wird.

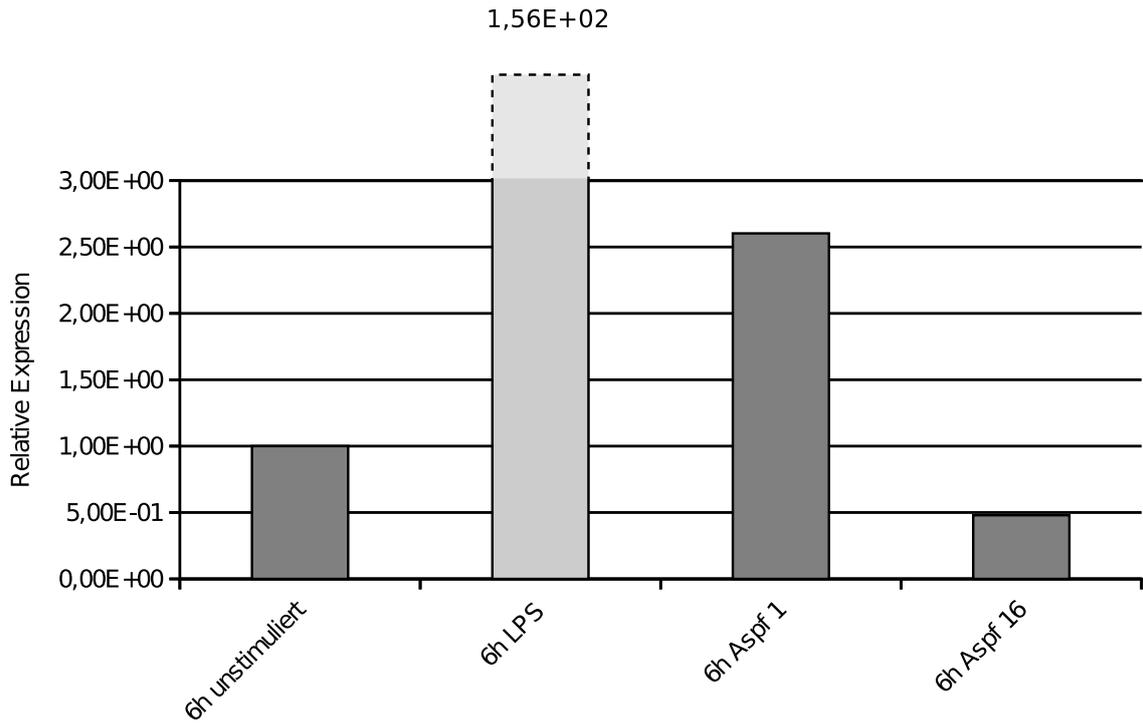


Abbildung 10

Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

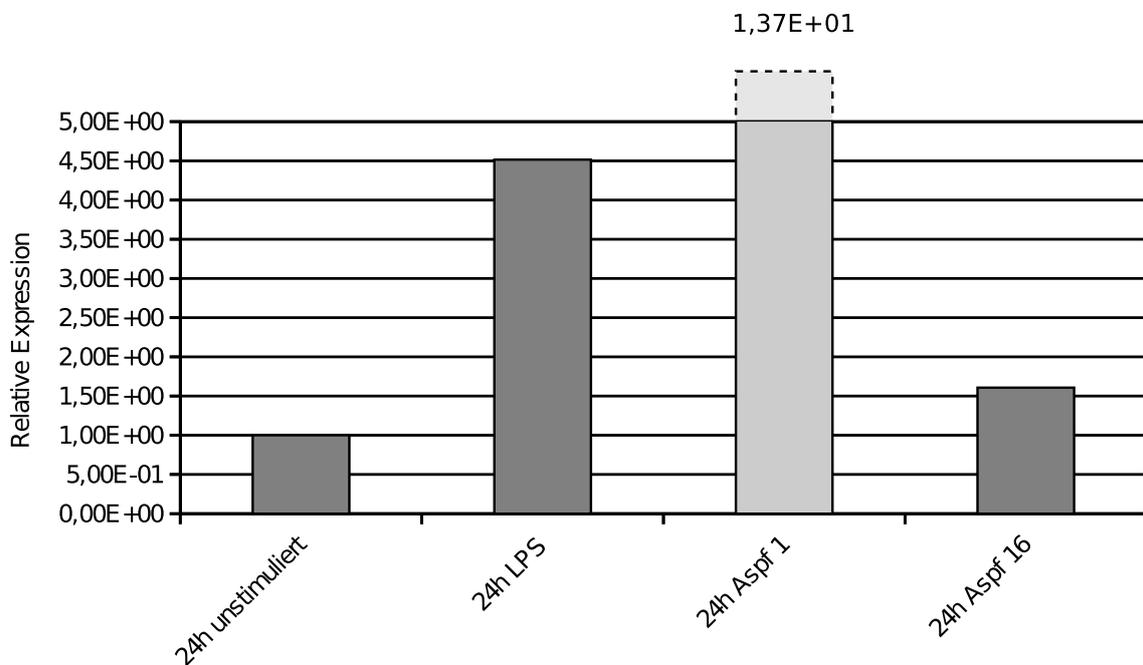


Abbildung 11

Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

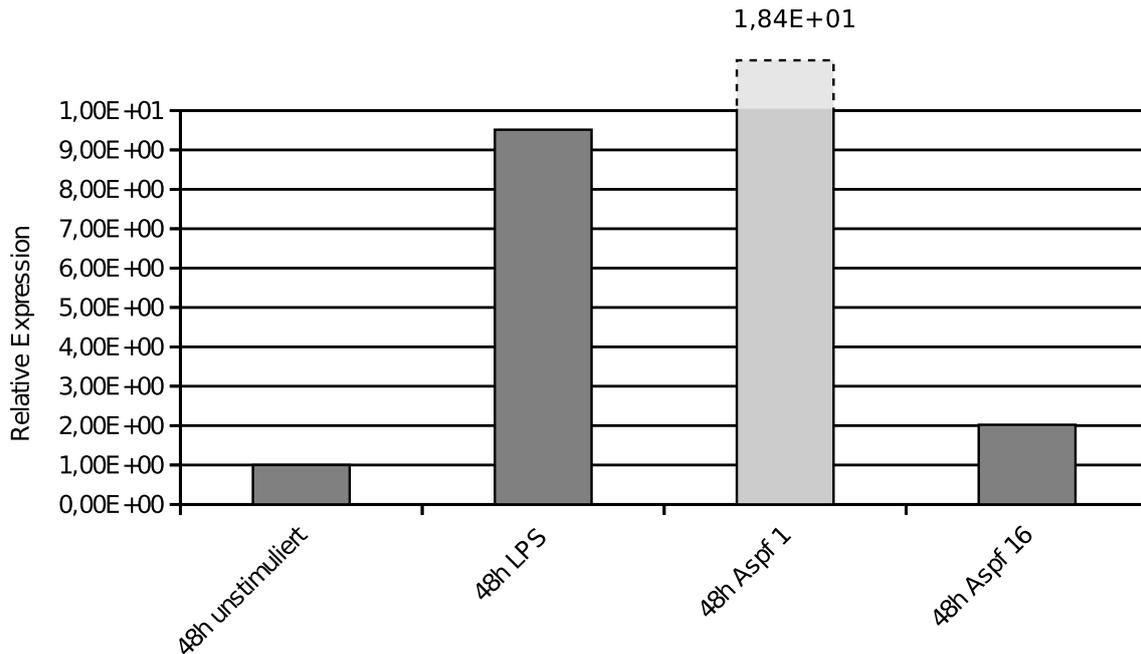


Abbildung 12

Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

Auch die IL-1 β -Expression der mit LPS versehenen DCs zeigt zu allen Zeitpunkten eine deutliche Erhöhung (siehe Abb. 13, 14, und 15). Die Stimulierung der Zellen mit Aspf 1 ergibt eine Hochregulierung von IL-1 β parallel zur jeweiligen Positivkontrolle nach 6, 24 und 48 Stunden. Verglichen mit diesen Werten verändert sich die Expression der mit Aspf 16 stimulierten Zellen nicht wesentlich im Sinne der LPS-Kontrolle und schwankt um die Werte der unstimulierten Zellen. Nach 6 Stunden wird die IL-1 β -Expression der mit Aspf 16 behandelten DCs sogar reduziert, sie verhält sich also gegensinnig der Positivkontrolle.

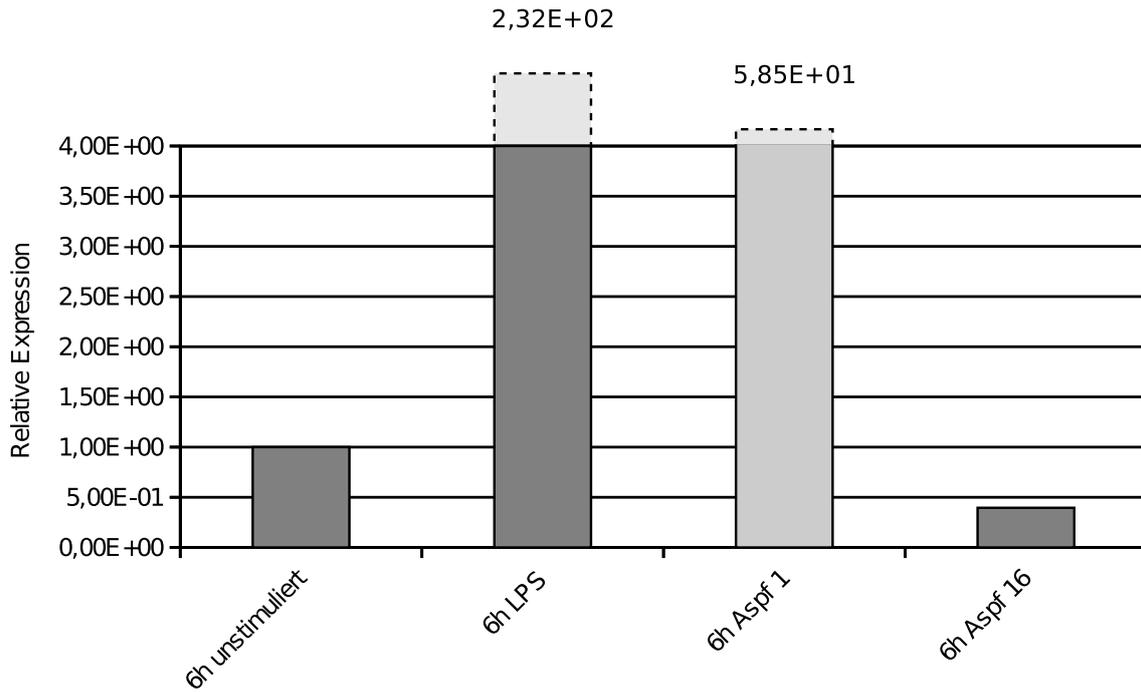


Abbildung 13

Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

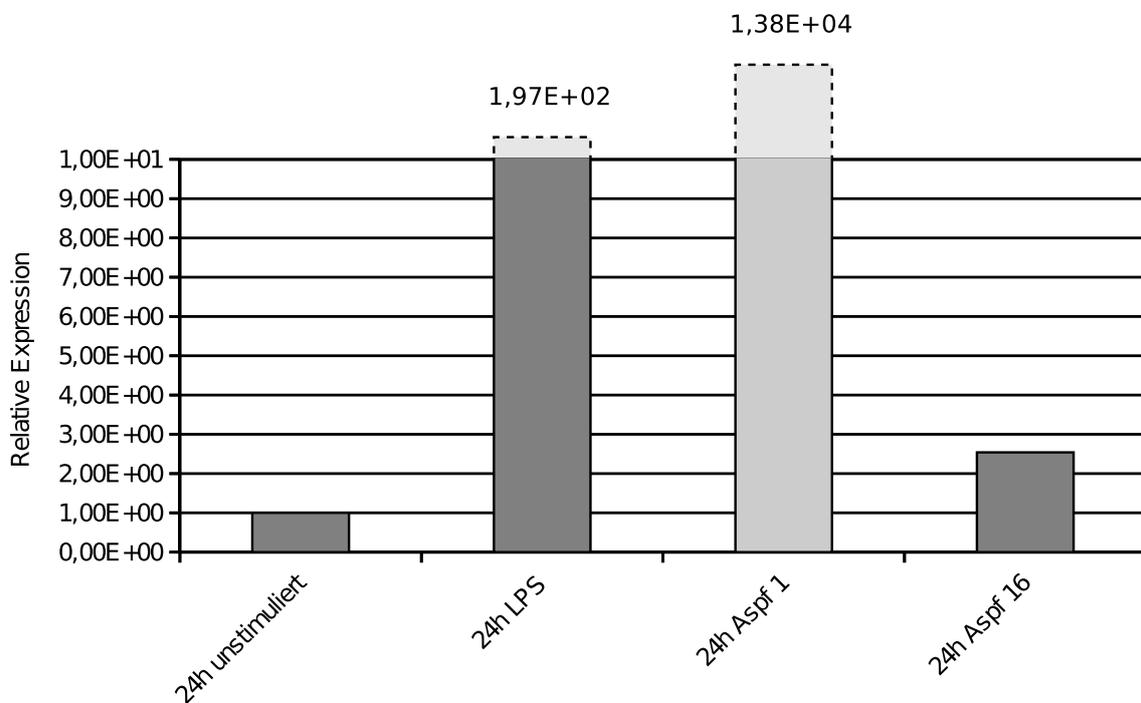


Abbildung 14

Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

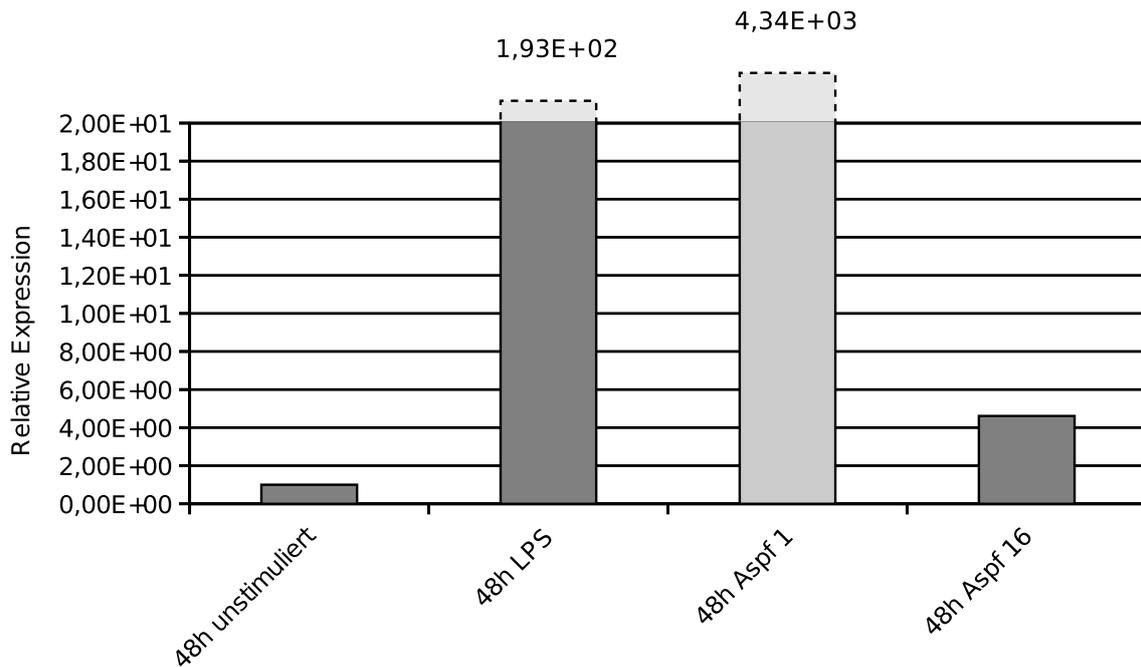


Abbildung 15

Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16

Zusammengefasst zeigt sich an dem abgebildeten Spender die vermehrte proinflammatorische Reaktion der Zellen auf LPS und Aspf 1 verglichen mit Aspf 16. Zu allen drei Zeitpunkten erreicht die Stimulierung mit Aspf 1 eine wesentlich stärker erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine, als sie bei der Stimulierung der DCs mit Aspf 16 beobachtet werden kann.

4.2 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid

Im folgenden Versuch wurden Veränderungen im Zytokinexpressionsprofil von mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen stimulierten iDCs nach Inhibierung im downstream-signaling des TLR untersucht. Hierfür wurde GSK3 mit Hilfe von Lithiumchlorid (LiCl) gehemmt, um einen Kausalzusammenhang zwischen der GSK3-Aktivität und der Zytokinexpression der Zellen herstellen zu können. LiCl führt über eine Aktivitätserhöhung der PI3K zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung von GSK3. Außerdem wird GSK3 durch LiCl kompetitiv gehemmt, da LiCl die

für ihre Aktivität benötigten Mg^{2+} Ionen verdrängt. Zur Kontrolle der Auswirkung dieser GSK3-Hemmung auf die Expression verschiedener Zytokine dienten jeweils iDCs, die nicht mit LiCl inhibiert wurden. Die Positivkontrolle stellten bei diesem Versuch iDCs, die mit dem stark proinflammatorisch wirkenden LPS behandelt wurden dar, als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet.

Die Expression von IL-12p35 und IL-23 wurde bei drei verschiedenen Spendern jeweils im dreifachen Ansatz untersucht. Dabei wurde wiederum die Expression der unstimulierten, nicht mit LiCl behandelten Zellen auf 100 % festgelegt, die der stimulierten und inhibierten Zellen wurde hierzu ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde jeweils die relative Expression der inhibierten Zellen mit der der nicht-inhibierten Zellen verglichen.

4.2.1 Expression von IL-12p35

Das proinflammatorische Zytokin IL-12p35 ist nach LPS- bzw. *Aspergillus fumigatus*-Stimulierung wie erwartet im Vergleich zu den unstimulierten Zellen um ein vielfaches hochreguliert, was auch in dem hier exemplarisch gezeigten Ansatz beobachtet werden kann (siehe Abb. 16, 17 und 18). Die der Stimulation vorangehende Inhibierung von GSK3 führt bei allen Spendern zu einer deutlich verminderten Expression von IL-12p35. Dieser Effekt ist sowohl nach Stimulierung der Zellen mit LPS als auch nach Stimulierung mit Keimschläuchen feststellbar. Der Spender im Beispiel weist nach LPS-Stimulierung eine durch LiCl hervorgerufene Reduktion der IL-12p35-Expression von 99,9 % auf (siehe Abb. 17). Alle Spender zeigen in allen Ansätzen ihrer mit LiCl behandelten Positivkontrolle eine um mehr als 98 % verminderte Expression von IL-12p35, im Durchschnitt ergibt sich eine 99,8 %-ige Reduzierung ($\pm 0,4$ %). Der Effekt, den die GSK3-Hemmung auf die mit den *Aspergillus*-Keimschläuchen stimulierten Zellen zeigt, ist mit der bei der LPS-Kontrolle beobachteten Reaktion vergleichbar. Im abgebildeten Beispiel wurde mit LiCl eine um 84,2 % reduzierte Zytokinexpression erreicht, im Durchschnitt beträgt die Verminderung 86,1 % (± 6 %) (siehe Abb. 18). Die unstimulierten

Zellen zeigen ebenfalls eine zu den stimulierten DCs parallele Veränderung der IL12p35-Expression nach LiCl-Behandlung. Sie ist im Beispiel um 50 %, im Durchschnitt aller Spender um 44,8 % ($\pm 67,5$ %) reduziert (siehe Abb. 16).

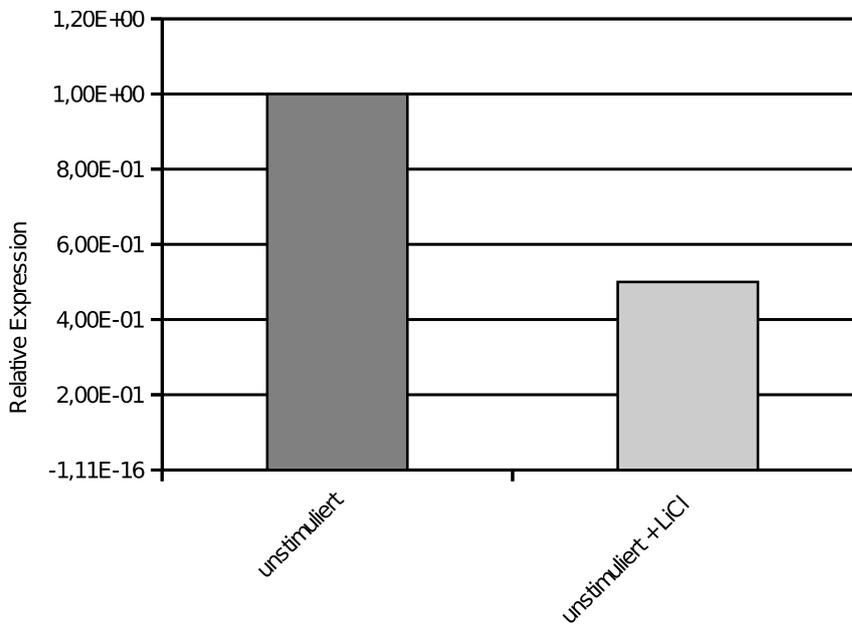


Abbildung 16

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung bei unstimulierten Zellen

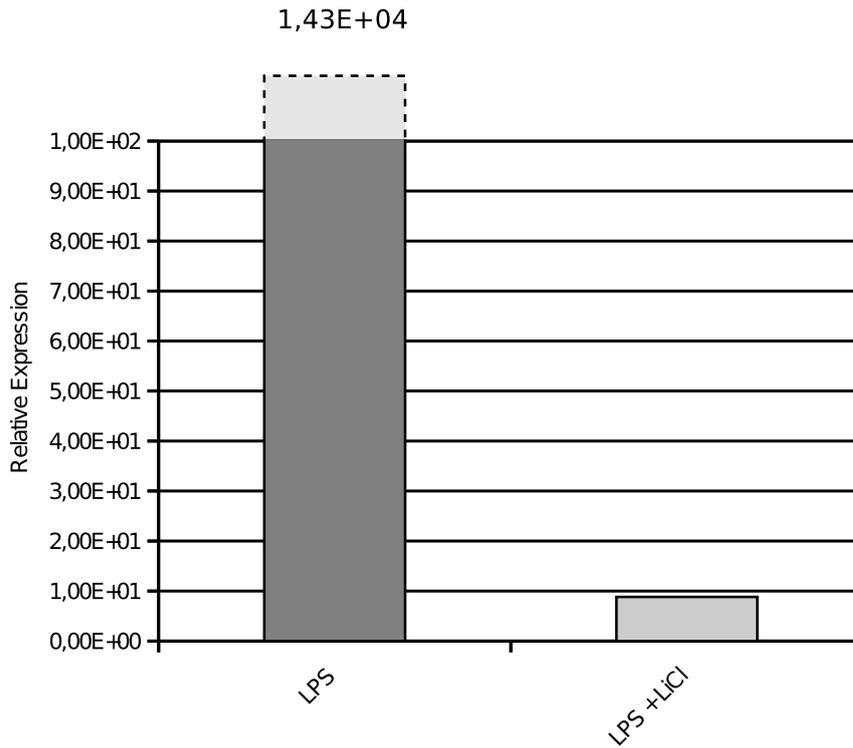


Abbildung 17

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit LPS

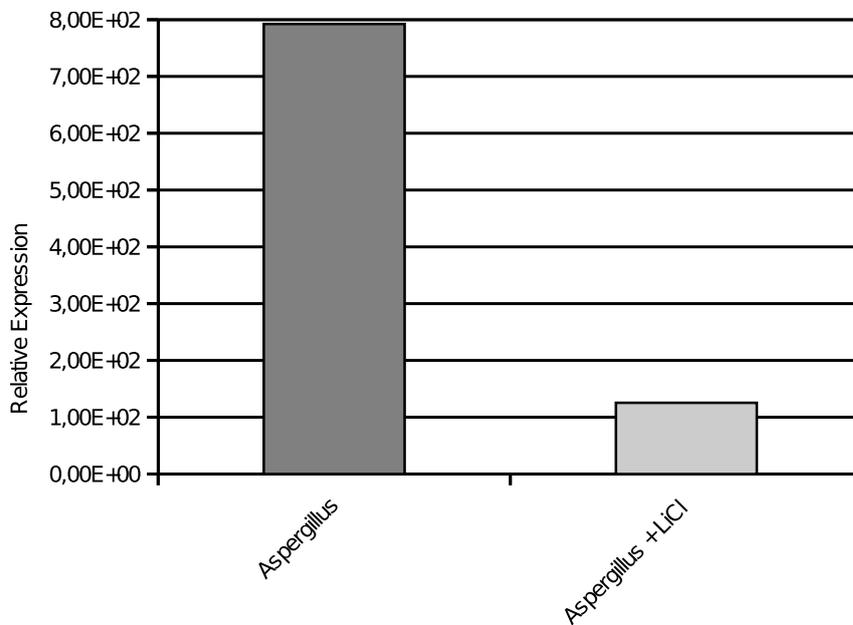


Abbildung 18

Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit Aspergillus

4.2.2 Expression von IL-23

Ebenso wie die IL-12p35-Expression nimmt auch die IL-23-Expression nach Stimulierung der DCs mit LPS und Aspergillus-Keimschläuchen um ein vielfaches zu, was auch im beispielhaft gezeigten Ansatz deutlich wird (siehe Abb. 19, 20 und 21). Die Inhibierung von GSK3 mit LiCl zeigt auf die IL-23-Expression deutliche Auswirkungen. Im Beispiel wird nach LiCl-Behandlung bei den Zellen der Positivkontrolle eine 88,9 %-ige Reduktion der Expression erreicht, im Durchschnitt aller Spender werden 79,5 % ($\pm 10,3$ %) erreicht (siehe Abb. 20). Die mit Aspergillus fumigatus stimulierten DCs des gezeigten Spenders reagieren auf LiCl im Sinne ihrer LPS-Kontrolle mit einer um 51,4 % verminderten IL-23-Expression (siehe Abb. 21). Durchschnittlich zeigen alle Spender nach GSK3-Inhibierung und Keimschlauch-Stimulierung eine Reduktion der IL-23-Expression von 49,5 % ($\pm 39,3$ %). Im Beispiel weisen auch die unstimulierten Zellen eine verminderte Zytokinexpression nach LiCl-Behandlung auf. Die Reduktion der IL-23-Expression beträgt hier 40,5 %, im Durchschnitt aller Spender konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden (siehe Abb. 19). Die unstimulierten Zellen reagierten mit einer um 18,5 %-igen (± 105 %) Erhöhung ihrer Zytokinexpression durchschnittlich entgegen der Positivkontrolle.

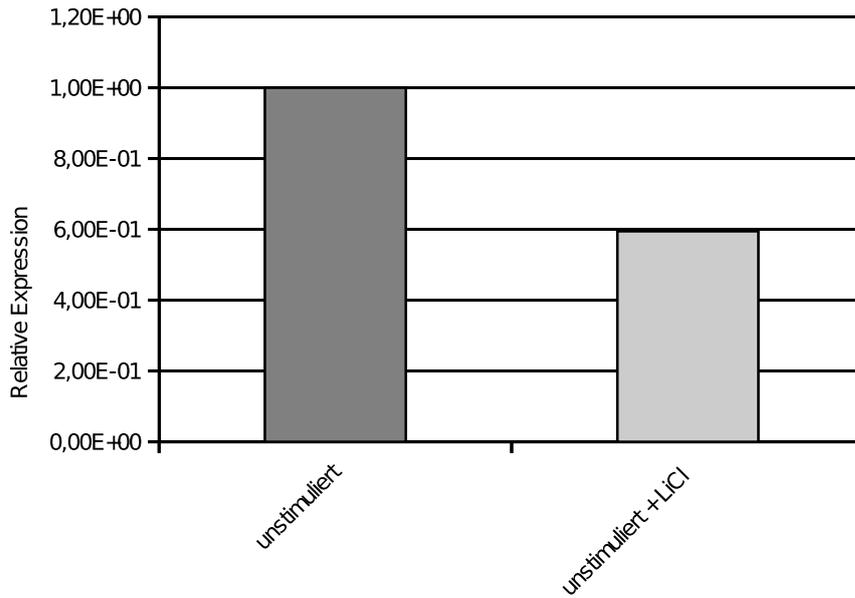


Abbildung 19

Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung bei unstimulierten Zellen

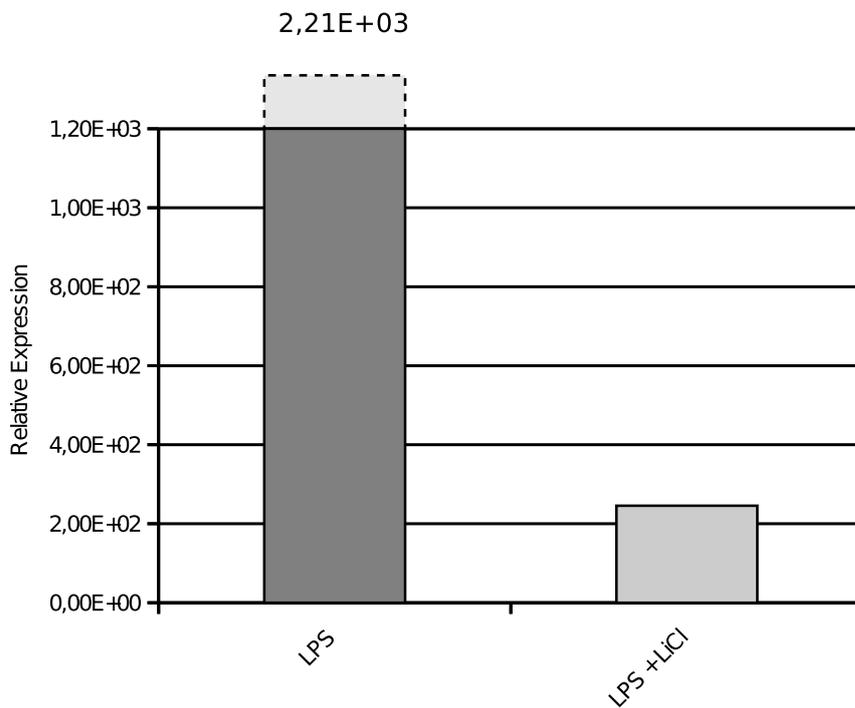


Abbildung 20

Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit LPS

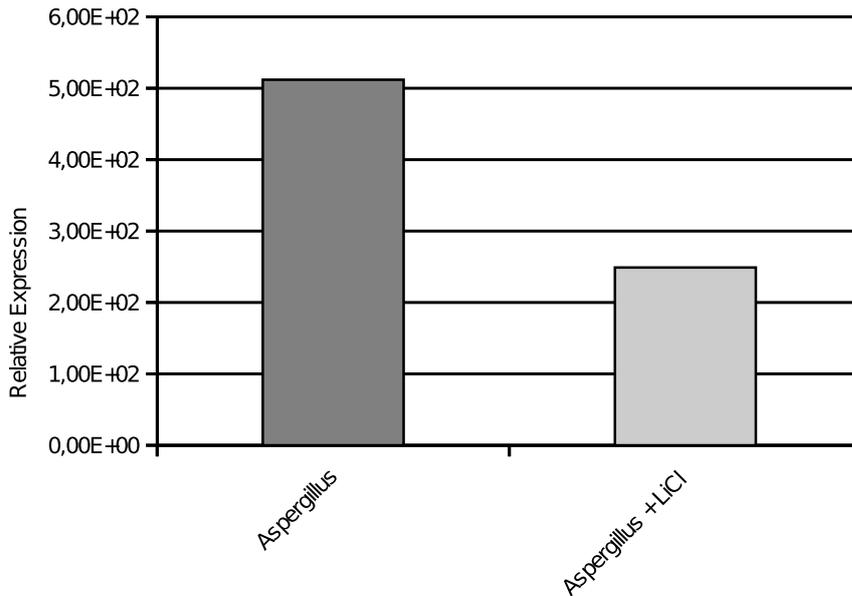


Abbildung 21

Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit *Aspergillus*

4.3 Stimulierung mit verschiedenen *Aspergillus fumigatus* - Morphologien

Die quantitativ unterschiedliche Beteiligung von GSK3 bei der Erkennung verschiedener *Aspergillus*-Morphologien durch humane iDCs wurde an den Zellen von drei verschiedenen Spendern, jeweils im doppelten Ansatz untersucht. Hierzu wurden die aus Monozyten generierten iDCs mit Konidien, Keimschläuchen und Hyphen von *Aspergillus fumigatus* stimuliert. Als Positivkontrolle dienten wiederum mit LPS behandelte DCs, die Negativkontrolle stellten unstimulierte Zellen dar. Die relative Expression der GSK3 wurde anschließend zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, nach 3 und nach 6 Stunden bestimmt. Dabei wurde die Expression der unstimulierten Zellen zu beiden Zeitpunkten auf 100 % festgelegt, die GSK3-Expression der stimulierten Zellen wurde hierzu jeweils ins Verhältnis gesetzt.

4.3.1 Expression von GSK3

Nach 3 Stunden lässt sich in dem hier exemplarisch gezeigten Ansatz sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei den mit *Aspergillus* stimulierten DCs eine deutlich reduzierte GSK3-Expression feststellen (siehe Abb. 22). Wie bereits in Kapitel 4.1.1 zu beobachten war, reagieren die Zellen auf den starken proinflammatorischen Reiz des LPS mit einer ausgeprägten Verminderung ihrer GSK3-Expression. Im Beispiel beträgt sie 66,9 % (siehe Abb. 22), im Durchschnitt aller Spender fällt sie mit 15 % ($\pm 31,6$ %) weniger deutlich aus. Bei dem gezeigten Spender rufen die *Aspergillus*-Hyphen unter den verschiedenen Pilz-Morphologien die stärkste Reaktion der GSK3-Expression im Sinne der Positivkontrolle hervor, sie ist hier um 69 % verringert (siehe Abb. 22). Auch bei den übrigen Spendern fällt die Reduktion der GSK3-Expression nach der Stimulierung mit den Hyphen am deutlichsten aus, sie beträgt durchschnittlich 52 % ($\pm 11,6$ %). Die zweitstärkste Verminderung der GSK3-Expression wird sowohl im Beispiel als auch durchschnittlich durch die Stimulierung mit den *Aspergillus*-Keimschläuchen erzielt. Im gezeigten Ansatz ist nach 3-stündiger Inkubation der Zellen mit den Keimschläuchen eine 61,9 %-ige Reduktion (siehe Abb. 22), im Durchschnitt aller Spender eine 47 %-ige ($\pm 14,8$ %) Reduktion festzustellen. Die geringsten Auswirkungen auf die Expression der GSK3 zeigen die Sporen von *Aspergillus fumigatus*. Sie führen beim gezeigten Ansatz zu einer Verminderung der Expression um 55,4 % (siehe Abb. 22), durchschnittlich beträgt die Reduktion der GSK3-Expression 32 % ($\pm 21,3$ %).

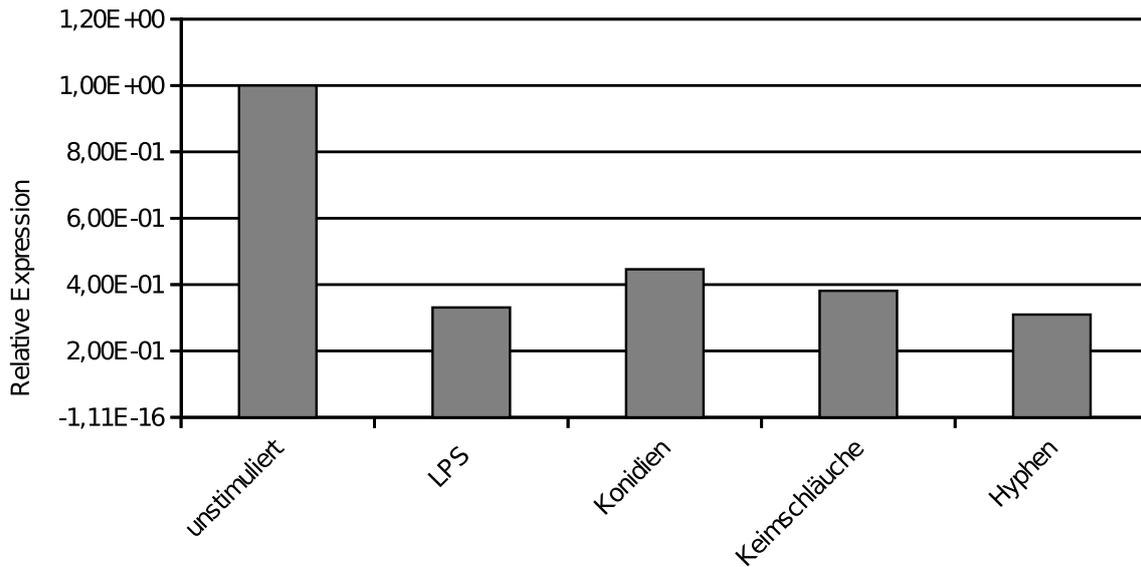


Abbildung 22

Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 3 Stunden nach Stimulierung mit Aspergillus-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen

Nach 6-stündiger Stimulierung der Zellen fällt die Reaktion der GSK3-Expression sowohl beim gezeigten Ansatz als auch im Durchschnitt aller Spender weniger deutlich aus (siehe Abb. 23). Die Expression der Positivkontrolle ist im Beispiel um 56 % verringert (siehe Abb. 23). Zu diesem Zeitpunkt rufen außerdem die Keimschläuche mit einer 37 %igen Reduktion eine deutlichere Reaktion der GSK3-Expression im Sinne der Positivkontrolle hervor als die Hyphen mit 26,5 % (siehe Abb. 23). Wie bereits nach 3 Stunden zu beobachten war, weisen auch hier die mit Aspergillus-Konidien stimulierten Zellen des gezeigten Spenders die am wenigsten ausgeprägte Verminderung der GSK3-Expression auf. Sie beträgt hier lediglich 13,9 % (siehe Abb. 23). Im Durchschnitt der Spender zeigt die Positivkontrolle nach 6 Stunden eine 27 %-ige ($\pm 29,6$ %) Verringerung ihrer GSK3-Expression gegenüber den unstimulierten Zellen. Die Expressionen der mit den Aspergillus-Morphologien stimulierten Zellen unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich kaum voneinander. Die Konidien rufen eine Reduktion der GSK3-Expression um 27,6 % ($\pm 18,1$ %), die Keimschläuche um 26,4 % ($\pm 19,8$ %) hervor. Etwas schwächer reagieren die DCs auf die Hyphen von *Aspergillus fumigatus*, die im Durchschnitt aller Spender lediglich eine 22,7 %-ige ($\pm 15,6$ %) Verringerung der GSK3-Expression auslösen.

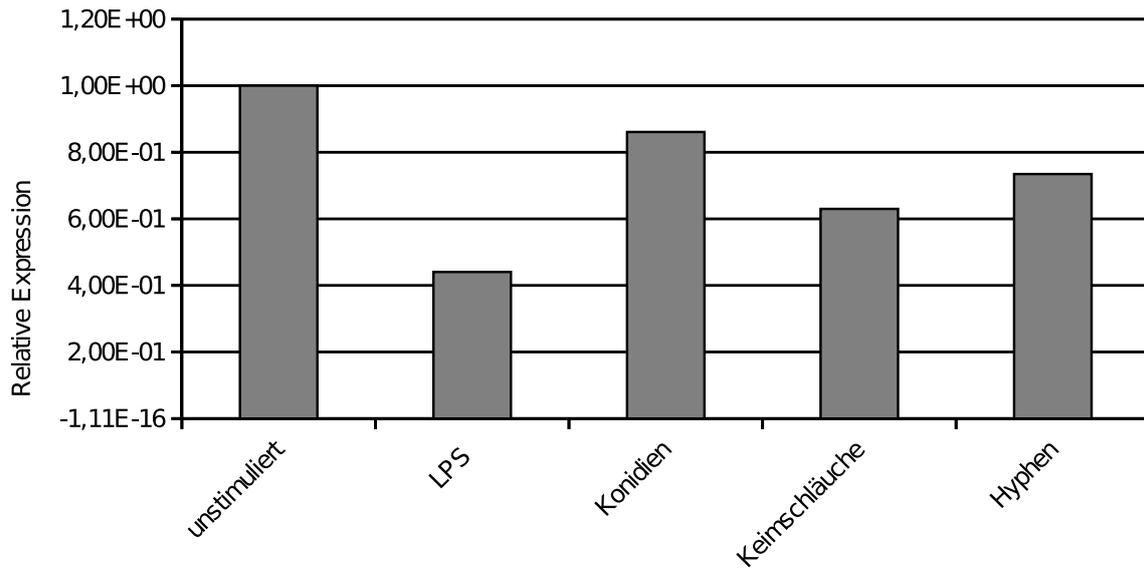


Abbildung 23

Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit Aspergillus-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen

5 Diskussion

5.1 Aktueller Stand der Forschung

Die meist durch *Aspergillus fumigatus* ausgelöste invasive Aspergillose ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, welche hauptsächlich immunsupprimierte Menschen befällt. Nach der Inhalation der Konidien des opportunistisch pathogenen Schimmelpilzes kommt es hierbei zum invasiven Wachstum im Lungengewebe des Wirtes, an welches sich die hämatogene Disseminierung von *Aspergillus fumigatus* in andere Organe anschließt. Ein Grund für die extrem hohe Mortalität dieser Infektionskrankheit von z.B. über 90 %^[107] in der Hochrisikogruppe der Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation ist die aufgrund der unspezifischen klinischen Anzeichen schwierige und häufig zu spät gestellte Diagnose^[53].

Bei gesunden Menschen werden eingeatmete *Aspergillus*-Sporen sofort durch die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten eliminiert. Immunsupprimierte Menschen leiden dagegen an einer quantitativen oder qualitativen Verminderung dieser Abwehrzellen. In einem solchen Fall gewinnt die erworbene Immunabwehr stark an Bedeutung.

Dendritische Zellen gehören selbst dem angeborenen Immunsystem an, besitzen aber einzigartige Fähigkeiten zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems und zur Steuerung dieses Teiles der Immunabwehr. Sie sind die potentesten Initiatoren der T_h -Zellantwort und entscheiden durch die von ihnen sezernierten immunmodulatorischen Zytokine auch über die Art dieser T_h -Zellantwort^[90]. Da vielfältige Hinweise darauf existieren, dass sich lediglich eine T_h1 -dominierte Immunantwort protektiv auf den Wirt auswirkt, kommt den DCs letztlich die Entscheidung

über das Outcome einer invasiven Infektion mit *Aspergillus fumigatus* beim immunsupprimierten Patienten zu^[54].

An der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch DCs sowie an der Auslösung der auf diese Erkennung folgenden Immunantwort sind unter anderem die Toll-like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4^[11] sowie der non Toll-like Rezeptor Dectin-1 beteiligt^[69]. Die Aktivierung dieser PRRs führt zur Initialisierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und somit auch die Produktion unterschiedlicher immunmodulatorischer Zytokine beeinflussen^[2,12]. Die genauen Mechanismen dieser Signalkaskaden sind für die Erkennung von *Aspergillus fumigatus* jedoch in weiten Teilen noch unbekannt.

Anders stellt sich die Situation für die Erkennung des bakteriellen Antigens LPS durch den TLR 4 der DCs dar. Hier konnten mehrere Arbeiten mit verschiedenen Immunzellen dazu beitragen, den an den TLR 4 angeschlossenen Signalweg genauer zu beschreiben. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen außerdem, dass wie bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben nicht nur der klassische MyD88-abhängige TLR-Signalweg an der Erkennung von LPS beteiligt ist, sondern dass PI3K als ein alternatives Signalmolekül bei diesem Vorgang angesehen werden kann^[2]. Die Tatsache, dass PI3K einen negativen regulatorischen Einfluss auf die durch den TLR-Signalweg ausgelöste Zytokinproduktion hat, wiesen Fukao et al. erstmals nach. Sie konnten zeigen, dass die Inhibierung von PI3K in murinen DCs vor der Stimulierung der Zellen mit verschiedenen PAMPs, unter anderem LPS, zu einer vermehrten Produktion von IL12p70, IL12p40 und IL12p35 führt. Die Autoren beobachteten außerdem, dass die Regulierung der Zytokinproduktion hierbei auf mRNA-Ebene stattfinden muss^[27]. Guha et al. stellten ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss von PI3K auf die Produktion des proinflammatorischen TNF- α bei mit LPS stimulierten humanen Monozyten fest und deuteten an, dass eine Erklärung für diesen Effekt teilweise in der Inhibierung von GSK3 durch PI3K zu suchen sei^[35]. Welches downstream target der PI3K die Expression der pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokine reguliert konnten auf diesen Ergebnissen aufbauend schließlich Martin et al. in humanen Monozyten zeigen. Sie identifizierten GSK3 als das Substrat der PI3K, welches die Ausschüttung von Zytokinen reguliert, die an der Auslösung

verschiedener T_h -Zellantworten beteiligt sind. Dieser Studie, welche die Abhängigkeit der immunmodulatorischen Zytokine IL12p40, IL-10, IL-1 β , TNF- α und IL-6 von der Aktivität der PI3K sowie der GSK3 bei mit LPS stimulierten humanen Monozyten nachwies kommt für die vorliegende Promotionsarbeit eine besondere Bedeutung zu. Darüber hinaus identifizierten Martin et al. CREB als den von GSK3 aktivierten Transkriptionsfaktor, welcher die Effekte des alternativen TLR-Signalweges auf die Zytokinproduktion vermittelt^[65]. Anhand der Ergebnisse dieser Studie war es möglich, eine grobe Skizze dieses alternativen, PI3K-abhängigen TLR-Signalweges anzufertigen (siehe Abbildung 2) und ihn dem klassischen TLR-Signalweg gegenüberzustellen^[103]. Martin et al. betonten außerdem, dass GSK3 eine besondere Rolle für die resultierende Immunantwort zukommt, da die Aktivität dieser Proteinkinase durch die Regulierung der Sekretion bestimmter Zytokine letztlich über die Art der ausgelösten T_h -Antwort entscheidet. Erste Hinweise auf die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse lieferte ein Maus-Modell, welches mit einer im Normalfall letalen Endotoxin-Dosis konfrontiert wurde. Hierbei zeigten Martin et al., dass die Inhibierung von GSK3 mit LiCl einen Großteil der Mäuse vor dem tödlichen toxischen Schock durch überschießende Inflammation retten konnte^[65]. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Versuchen von Fukao et al., die eine erhöhte Resistenz sowie eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine von PI3K-knockout Mäusen für die Infektion mit *Leishmania major* zeigten, während sich die Kontrollgruppe durch eine vorwiegende T_h2 -Immunantwort als suszeptibel für diese Infektion erwies^[27]. Außerdem äußerten Martin et al. die Vermutung, dass der von ihnen postulierte Mechanismus auch für die Toll-like Rezeptoren TLR 2, TLR 5 und TLR 9 zu gelten scheint^[65]. Diese Ergebnisse passen auch zu früheren Studien, welche die Beteiligung von PI3K im downstream-signaling von TLR 2, TLR 4 und TLR 9 aufzeigten^[26,77]. Rodionova et al. wiesen die Beteiligung von GSK3 sowie PI3K bei der Erkennung von LPS und *E. coli* schließlich auch bei humanen iDCs nach. Auch hier beeinflussten beide Signalmoleküle die Produktion der immunmodulatorischen Zytokine, wobei ebenso wie in der Arbeit von Martin et al. die aktive GSK3 die Auslösung einer proinflammatorischen, die aktive PI3K dagegen die Auslösung einer antiinflammatorischen Immunantwort zu begünstigen scheint^[80]. Der regulatorische Einfluss

von PI3K sowie von GSK3 auf die Zytokinsekretion dendritischer Zellen wurde anschließend noch von mehreren Gruppen in unterschiedlichen Versuchsaufbauten nachgewiesen. Hoarau et al. zeigten z.B., dass die Sekretion von IL-12p70 bei humanen iDCs nach Inhibierung von GSK3 und anschließender Stimulierung mit LPS vermindert ist, während die Sekretion von IL-10 ansteigt. Genau den gegenteiligen Effekt erbrachte die Hemmung von PI3K^[39]. Ein geringeres Ausmaß an Veränderung im Zytokinprofil wurde von Ohtani et al. festgestellt, welche murine DCs nach Inhibierung von GSK3 und PI3K mit LPS konfrontierten. Die Hemmung von GSK3 zeigte in diesem Fall keinen Einfluss auf die Produktion von IL-12p70, während die Produktion von IL-10 erhöht war. Die Inaktivierung von PI3K zeigte zwar Veränderungen im Sekretionsprofil beider Zytokine, doch diese fielen nicht signifikant aus. Die Produktion von IL-12p70 war in diesem Versuch etwas erhöht, während die von IL-10 etwas erniedrigt war^[72]. Alle eben zitierten Studien bestätigen die Ergebnisse der Versuche von Martin et al. zum TLR 4-Signalweg, wenn auch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Es existieren jedoch in anderen Arbeiten auch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von GSK3 und PI3K auf die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine. Eine Studie von Ono et al. stellte z.B. keinen Zusammenhang zwischen der Aktivität von GSK3 und der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β durch murine DCs nach Stimulierung mit LPS fest. Jedoch konnte auch hier die Regulierung der Sekretion des antiinflammatorischen Zytokines IL-10 durch GSK3 nachgewiesen werden^[73]. Die Gründe für derartige Widersprüche könnten teilweise bereits in der Auswahl von Zellen unterschiedlicher Herkunft oder der Fokussierung auf unterschiedliche immunmodulatorische Zytokine zu suchen sein.

Pathogene Pilze werden ebenso wie andere pathogene Organismen von den Zellen des angeborenen Immunsystems durch die Interaktion ihrer PRRs mit den PAMPs der Pathogene erkannt. Darüber hinaus existiert das Konzept, dass die Zellen der angeborenen Immunabwehr mit Hilfe ihrer PRRs die verschiedenen Morphologien unterscheiden können, die während des Lebenszyklus der Pilze auftreten. Dies wurde unter anderem für murine DCs nachgewiesen, welche auf die Konfrontation mit

Hefen bzw. Hyphen von *Candida albicans* mit der Auslösung verschiedener T_h -Zellantworten reagierten^[24]. Ein Rezeptor, der diese Unterscheidung vermitteln könnte ist Dectin-1, welcher murine Makrophagen dazu befähigt, die Hefen des Pilzes, nicht aber seine filamentäre Form zu erkennen^[30]. Ebenso wie es für *Candida albicans* nachgewiesen wurde, scheinen auch die unterschiedlichen Morphotypen von *Aspergillus fumigatus* durch verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt zu werden^[31]. Dadurch sind die Zellen der unspezifischen Immunabwehr, wie zum Beispiel DCs in der Lage, zwischen den Erscheinungsformen des pathogenen Schimmelpilzes zu unterscheiden und die für das jeweilige Stadium der Infektion adäquate Immunantwort auszulösen. Welche Rezeptoren hierbei für die Erkennung der einzelnen *Aspergillus*-Morphologien verantwortlich sind, wird in der aktuellen Literatur, abhängig vom untersuchten Zelltyp allerdings sehr kontrovers diskutiert. So sollen murine Makrophagen Konidien und Hyphen des Schimmelpilzes über TLR 2 erkennen^[63,71], während TLR 4 nur an Konidien binden kann^[71]. Diese Annahme wird gefestigt durch Experimente mit TLR 4-knockout Mäusen, welche eine erhöhte Sensibilität für *Aspergillus*-Konidien aufwiesen^[9]. Andere Autoren räumen TLR 4 dagegen nur eine Bedeutung bei der Erkennung angeschwollener Sporen ein^[63]. Es existieren aber auch Arbeiten, die sowohl TLR 2 als auch TLR 4 für die Erkennung von Konidien und Hyphen durch Maus-Makrophagen verantwortlich machen^[67]. Kaum eindeutiger gestaltet sich die Situation bei der Forschung an humanen Zellen. Hier erkennen transfizierte embryonale Nierenzellen Sporen und Hyphen von *Aspergillus* durch TLR 2^[63]. Arbeiten mit humanen Kornealepithelzellen konnten zeigen, dass diese Konidien durch TLR 2 und TLR 4 erkennen^[106]. TLR 4 scheint hingegen bei humanen Monozyten lediglich die Hyphen des Schimmelpilzes binden zu können^[99]. Diese Annahme wird ergänzt durch Hinweise auf der Genexpressionsebene humaner Monozyten, dass TLR 4 nicht an der Erkennung von Konidien beteiligt ist^[81]. Die Keimschläuche von *Aspergillus fumigatus* werden nicht durch Rezeptoren aus der Toll like-Familie, sondern durch das nicht-klassische C-Typ Lektin Dectin-1 erkannt^[69]. Obwohl also letztlich keine Klarheit darüber herrscht, welcher Rezeptor für die Erkennung welcher Erscheinungsform des Schimmelpilzes verantwortlich ist, so kann zusammengefasst allgemein davon ausgegangen

werden, dass TLR 2, TLR 4 und Dectin-1 an der Unterscheidung beteiligt sind.

Neben den Mechanismen der angeborenen Immunabwehr spielt wie bereits erwähnt auch die T-Zellimmunität eine wichtige Rolle für die Kontrolle einer invasiven Infektion mit *Aspergillus fumigatus*. Bisher wurden hierbei eine T_h1 -Antwort sowie die in ihrem Rahmen von DCs sezernierten T_h1 -Zytokine wie IL-18, IL-12 und TNF- α mit einer protektiven Immunität gegenüber dem fakultativ pathogenen Schimmelpilz assoziiert, während einer T_h2 -Immunantwort und den zugehörigen Zytokinen wie IL-4 und IL-10 die Progression der Infektion zugeschrieben wurde^[54]. Erst kürzlich wurde dieses binäre T_h1 -/ T_h2 -Modell zur Erklärung der Pathophysiologie der invasiven Infektion mit *Aspergillus fumigatus* um eine weitere mögliche T_h -Zellantwort erweitert, welche durch die neu entdeckten T_h17 -Zellen vermittelt wird. Zelante et al. wiesen im murinen Modell nach, dass eine T_h17 -dominierte Immunantwort zur Persistenz der invasiven Pilzinfektion durch überschießende Inflammation bei fehlendem Aufbau einer Immunität gegenüber *Aspergillus fumigatus* führt. Hierbei stellten sie fest, dass die Sekretion von IL-23 durch DCs die Funktion der T_h17 -Zellen zu unterstützen und darüber hinaus die Sekretion des für die Auslösung der T_h1 -Immunantwort entscheidenden IL-12p70 herunterzuregulieren scheint^[105]. Auch Gafa et al. konnten zeigen, dass humane DCs auf die Stimulierung mit *Aspergillus*-Konidien mit einer vermehrten Expression von IL-23 reagieren^[28].

Vor dem Hintergrund dieser Studien und vor allem im Hinblick auf die Arbeit von Martin et al. sollten die Versuche der vorliegenden Arbeit unter anderem nachweisen, in wieweit GSK3 an der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch DCs beteiligt ist, und ob Anhaltspunkte dafür existieren, dass ihr in dieser Situation ebenfalls eine zentrale regulierende Rolle für die Auslösung verschiedener T_h -Zellantworten zukommt. Hierbei wurde die Rolle von GSK3 sowohl bei der Konfrontation der DCs mit einzelnen *Aspergillus fumigatus*-Antigenen, als auch bei der Konfrontation mit verschiedenen Morphologien des fakultativ pathogenen Schimmelpilzes untersucht. Um einen direkten Nachweis für die Abhängigkeit der Sekretion immunmodulatorischer Zytokine von der Aktivität der GSK3 im Rahmen der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* zu erbringen, wurde

diese Proteinkinase in einem Teil der vorliegenden Arbeit außerdem analog zu den Versuchen von Martin et al. und Rodionova et al. vor der Stimulierung mit Hilfe von LiCl inhibiert. Die von uns untersuchten Zytokine entsprechen hierbei den in den eben zitierten Arbeiten im Fokus stehenden Zytokinen. Aufgrund der neuen Erkenntnisse zur T_h -Zellantwort war es ein weiteres Anliegen dieser Promotionsarbeit, die Beteiligung des die T_h17 -Antwort unterstützenden IL-23 bei einer Infektion mit *Aspergillus* zu untersuchen sowie einen eventuell vorhandenen Zusammenhang der Sekretion dieses Zytokines mit der Aktivität der GSK3 aufzudecken.

5.2 Stimulierung mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Antigenen

5.2.1 Expression von GSK3

Martin et al. konnten mit ihrer Arbeit die Beteiligung von GSK3 bei der Erkennung von LPS durch den TLR 4 humaner Monozyten aufzeigen. Darüber hinaus postulierten sie die entscheidende Funktion von GSK3 bei der Regulierung der pro- bzw. antiinflammatorischen Immunantwort^[65]. Rodionova et al. wiesen diese Rolle der GSK3 für die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine schließlich auch bei mit LPS stimulierten humanen iDCs nach^[80]. Da pathogene Pilze wie *Aspergillus fumigatus* von den Zellen des angeborenen Immunsystems ebenfalls durch unterschiedliche PRRs, unter anderem durch die TLRs erkannt werden, liegt die Vermutung einer ähnlichen Beteiligung von GSK3 bei diesem Vorgang nahe. In aktueller Literatur zur Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch verschiedene PRRs sind, abhängig vom jeweiligen Zelltyp und Pilzbestandteil, sehr unterschiedliche Angaben zu finden. Einigkeit herrscht lediglich dahingehend, dass an diesem Vorgang sowohl TLR 2 als auch TLR 4 und Dectin-1 beteiligt sind^[11,69]. Welche Rezeptoren für die Erkennung von einzelnen rekombinanten *Aspergillus*-Antigenen zuständig sind, ist dagegen bisher völlig ungeklärt. Da einige der rekombinanten Antigene über T-Zellepitope verfügen, ist es möglich dass sie ebenfalls

durch die PRRs der DCs erkannt werden, welche besonders starke T-Zellreaktionen auslösen können^[51]. Diese Zusammenhänge warfen die Frage nach der Möglichkeit einer Beteiligung von GSK3 bei der Erkennung von einzelnen *Aspergillus fumigatus*-Antigenen in analoger Weise zu der Rolle dieser Kinase bei der Erkennung von LPS auf.

Um diese Beteiligung von GSK3 bei der Erkennung von verschiedenen *Aspergillus fumigatus*-Antigenen durch humane iDCs zu untersuchen, wurden die Spenderzellen mit den rekombinanten Antigenen Aspf 1, Aspf 6 und Aspf 16 stimuliert. Es zeigte sich vor allem nach 24- und nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit dem stark proinflammatorisch wirkenden, als Positivkontrolle verwendeten LPS eine Reduktion der GSK3-Expression von jeweils deutlich über 50 %. Gleichsinnige Ergebnisse erzielte die Stimulierung der DCs mit Aspf 1, auch hier war die GSK3-Expression vor allem nach 24 und nach 48 Stunden deutlich verringert. Auf die Stimulierung mit Aspf 6 und Aspf 16 hin zeigte sich im Gegensatz hierzu keine korrespondierende Reaktion der GSK3-Expression der Zellen (siehe Kapitel 4.1.1).

Der stark proinflammatorische Reiz des LPS zeigte also auf der Genexpressionsebene einen Einfluss auf GSK3 und führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression dieser Serin-Threonin-Kinase. Außerdem hat es den Anschein, dass bestimmte Antigene wie Aspf 1 GSK3 ebenfalls auf der Genexpressionsebene beeinflussen können, was genau jenem Effekt entspricht, der bei der Stimulierung der Zellen mit LPS beobachtbar ist. In den Vorarbeiten von Carina Bäuerlein^[14] war Aspf 1 im Vergleich mit anderen rekombinanten Antigenen bereits als dasjenige aufgefallen, welches die stärkste proinflammatorische Reaktion in humanen iDCs auslösen kann. Möglicherweise besteht hier also ein Zusammenhang zwischen der verminderten Expression von GSK3 und der inflammatorischen Reaktion dendritischer Zellen.

Ob die Beteiligung von GSK3 bei der Erkennung von *Aspergillus*-Antigenen jener entspricht, welche Martin et al. für die Erkennung von LPS beschrieben haben, ist anhand dieses Versuches allerdings nicht ausreichend feststellbar. Eine Tatsache, die eher gegen eine vergleichbare Rolle von GSK3 bei der Erkennung der Pilz-Antigene wie bei der Erkennung von

LPS spricht, ist die von Martin et al. beschriebene, durch die Inhibierung von GSK3 hervorgerufene antiinflammatorische Reaktion der Zellen. In diesem Sinne muss GSK3 aktiv sein, um eine proinflammatorische Reaktion auslösen zu können^[65]. Diese Annahme wurde auch von Rodionova et al. für humane DCs bestätigt, hier war die Sekretion proinflammatorischer Zytokine auf die Stimulierung mit E. coli hin bei aktiver GSK3 erhöht, während antiinflammatorische Zytokine deutlich weniger sezerniert wurden^[80]. Unsere Ergebnisse zeigten im Gegensatz hierzu eine verminderte GSK3-Expression sowohl auf LPS als auch auf Aspf 1 hin, wobei zumindest LPS normalerweise eine starke proinflammatorische Reaktion auslöst. Sollte also ein Zusammenhang zwischen GSK3 und der Erkennung von Aspergillus-Antigenen bestehen, so entspricht dieser wahrscheinlich nicht genau dem von Martin et al. beschriebenen, da in unseren Versuchen ein proinflammatorischer Reiz mit einer verminderten GSK3-Expression und mit einer mutmaßlich ebenfalls verminderten GSK3-Aktivität korreliert. Denkbar wäre z.B., dass der an der Antigen-Erkennung beteiligte Rezeptor nicht der Familie der TLRs angehört oder dass die sich an den Rezeptor anschließende Signalkaskade ein anderes downstream-signaling aufweist, an welchem GSK3 zwar beteiligt ist, aber eine andere Stellung einnimmt. Es stellt sich hier darüber hinaus die Frage nach der Vergleichbarkeit der von Martin et al. untersuchten Hemmung der GSK3-Aktivität und der in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene festgestellten Veränderung der GSK3-Expression. Eine verminderte GSK3-Expression muss nicht zwangsweise mit einer verminderten GSK3-Aktivität einhergehen, was in umgekehrter Weise ebenso gilt. Nur wenn posttranskriptionelle und posttranslationelle Modifizierungen außer Acht gelassen werden, kann beides gleichgesetzt werden. Um dahingehend einen sicheren Zusammenhang herstellen zu können, könnte die zusätzliche Überprüfung der GSK3-Aktivität bzw. -Inaktivität in unseren Zellen, z.B. anhand eines Nachweises der Phosphorylierung des Enzyms nützlich sein.

Eine andere Möglichkeit die in Betracht gezogen werden sollte, ist dass der im Rahmen dieser Promotionsarbeit beobachtete Zusammenhang zwischen der Stimulierung von DCs mit LPS und Aspf 1 und ihrer reduzierten GSK3-Expression nicht zwangsweise auf das PRR-Signaling

zurückzuführen ist, da GSK3 auch an einer ganzen Reihe anderer Vorgänge in der Zelle beteiligt ist^[23]. Rodionova et al. stimulierten humane iDCs mit *E. coli* und stellten dabei fest, dass GSK3 für eine erfolgreiche Reifung der iDCs zu antigenpräsentierenden Zellen inhibiert werden muss. Diese physiologische Inhibierung wird ebenfalls durch Akt-1 vermittelt. Laut diesen Studien ist GSK3 in iDCs konstitutiv aktiv und verhindert deren spontane Reifung^[80]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Reduktion der GSK3-Expression könnte also auch im Rahmen dieses durch ein Pathogen ausgelösten Reifungsprozesses der DCs gedeutet werden. Hierbei ergibt sich allerdings erneut das bereits zuvor angesprochene Problem, in wieweit die Höhe der in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene bestimmten GSK3-Expression mit der von Rodionova et al. auf Proteinebene bestimmten GSK3-Aktivität korreliert. Die Bedeutung von GSK3 für die erfolgreiche Reifung von Knochenmarkszellen zu reifen DCs, vor allem hinsichtlich ihrer Fähigkeit eine T_h1 - bzw. T_h2 -Antwort auszulösen, wurde auch von Ono et al. beschrieben^[73]. Hoarau et al. wiesen ebenfalls nach, dass GSK3 negativ, PI3K dagegen positiv in die Reifung humaner iDCs involviert ist^[39].

Die Ergebnisse des eben beschriebenen Versuches lassen die Vermutung zu, dass ein Zusammenhang zwischen der Stimulierung humaner iDCs mit LPS und einzelnen *Aspergillus fumigatus*-Antigenen und der Expression von GSK3 besteht. Besonders AspF 1 weist einen deutlichen, zu LPS parallelen Einfluss auf die GSK3-Expression der mit ihm stimulierten Zellen auf. Inwiefern die beobachtete Reduktion der GSK3-Expression mit dem TLR-Signaling und der ausgelösten Immunantwort zusammenhängt, kann anhand dieser Daten allerdings nicht beantwortet werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt orientierend die Expression einiger proinflammatorischer Zytokine nach Stimulierung mit den rekombinanten Antigenen bestimmt, um festzustellen ob diese sich analog zur GSK3-Expression verändert.

5.2.2 Expression von IL-12p35, IL-6 und IL-1 β

Um die Vermutung zu verifizieren, dass die zuvor beobachtete Veränderung der GSK3-Expression humaner iDCs nach Stimulierung mit LPS und

Aspf 1 mit der konsekutiven Auslösung einer inflammatorischen Immunantwort zusammenhängt, wurde orientierend die Expression einiger proinflammatorischer Zytokine nach Stimulierung der Zellen mit LPS sowie mit den rekombinanten Antigenen Aspf 1 und Aspf 16 bestimmt. Aspf 1 hatte im vorangegangenen Versuch ebenso wie LPS einen starken Einfluss auf die GSK3-Expression der DCs gezeigt, während Aspf 16 eines jener Antigene zu sein scheint, welche keinen Einfluss auf die Expression dieses Enzymes haben (siehe Kapitel 4.1.1). Es zeigte sich erwartungsgemäß eine entsprechend der LPS-Kontrolle erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12p35, IL-6 und IL-1 β bei den mit Aspf 1 stimulierten Zellen, während die Behandlung der DCs mit Aspf 16 nur wenige bis keine Schwankungen in der jeweiligen Zytokinexpression auslöste (siehe Kapitel 4.1.2).

Die untersuchten Zytokine IL-12p35, IL-6 und IL-1 β stehen alle im Zusammenhang mit der Auslösung proinflammatorischer Immunantworten. Während das von DCs sezernierte IL-12p35 als der die Bioaktivität bestimmende Teil von IL-12p70 eine T_h1-Antwort auslösen kann, ist IL-6 zusammen mit TGF- β für die Differenzierung naiver T_h-Zellen zu T_h17-Zellen zuständig. Diese Entwicklung wird unter anderem durch die Sekretion von IL-1 β durch die DCs unterstützt. In Abwesenheit von IL-6 entstehen dagegen unter dem Einfluss von TGF- β T_{reg}-Zellen^[98]. IL-6 wird im Rahmen der invasiven Aspergillose im allgemeinen eine protektive Rolle zugeschrieben, es wird bereits kurze Zeit nach intranasaler Inokulation von Aspergillus-Sporen gebildet^[18]. Cenci et al. zeigten im murinen Model, dass IL-6-defiziente Tiere zwar neutrophile Granulozyten in ihre Lungen rekrutieren konnten, diese aber die eingeatmeten Konidien nicht beseitigen konnten. IL-6 wird deswegen auch mit der Aktivierung der fungiziden Aktivität von Phagozyten in Verbindung gebracht^[17].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigen die bereits von Carina Bäuerlein^[14] gezeigte Reaktion von DCs auf verschiedene rekombinante Aspergillus-Antigene. In ihrer Arbeit stellte sie fest, dass humane iDCs vor allem auf Aspf 1 mit einer vermehrten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- α sowie mit einer verringerten Expression des als antiinflammatorisch geltenden IL-10

reagieren. Die anderen in diesem Rahmen getesteten rekombinanten Antigene (unter anderem Aspf 6 und Aspf 16) riefen dagegen nur eine schwache Reaktion der Zytokinexpression der Zellen hervor. Es lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass die GSK3-Expression sich in unseren Versuchen bei der Stimulierung mit LPS und Aspf 1 parallel zu der Expression proinflammatorischer T_h1 - und T_h17 -Zytokine verändert. Aspf 16 hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression der GSK3 und der Zytokine. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die durch Aspf 1 ausgelöste Verminderung der GSK3-Expression möglicherweise in Zusammenhang mit der parallel beobachtbaren proinflammatorischen Reaktion der Zellen steht. Welcher Art genau dieser Zusammenhang ist, kann aus den vorliegenden Ergebnissen allerdings noch nicht sicher geschlossen werden. Für die Beantwortung dieser Frage sind weitere Experimente nötig, die den Kausalzusammenhang zwischen GSK3 und den proinflammatorischen Zytokinen überprüfen. Hierfür würde sich z.B. die der Stimulierung mit den rekombinanten Antigenen vorangehende Blockierung der Aktivität oder der Expression der GSK3 eignen. Eine auf diese Inhibierung folgende Veränderung im Zytokinexpressionsprofil der Zellen wäre ein weiterer Hinweis auf eine immunregulatorische Rolle von GSK3 bei der Erkennung einzelner *Aspergillus fumigatus*-Antigene durch humane DCs.

Unabhängig vom Zusammenhang der GSK3 mit der Sekretion der immunmodulatorischen Zytokine durch DCs unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Carina Bäuerlein^[14] die These, dass humane iDCs grundsätzlich mit einzelnen rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Antigenen stimulierbar sind. Die Stimulierbarkeit humaner DCs mittels Antigen-Gemischen des Schimmelpilzes ist bereits mehrfach dokumentiert worden^[11]. Kurup et al. stellten 1996 im murinen Modell fest, dass auch einzelne Peptide des rekombinanten Antigens Aspf 1 in der Lage sind unterschiedliche T_h -Zellantworten auszulösen, was eine Beteiligung von DCs bei diesem Vorgang wahrscheinlich macht^[51]. 2001 gelang es Banerjee et al., PBMCs von ABPA-Patienten mit dem rekombinanten Antigen Aspf 16 zu stimulieren, sie zeigten eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen^[7]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Rathore

et al., die eine proliferative Reaktion der PBMCs von ABPA-Patienten nach Stimulierung mit Asp f 2 feststellten^[76]. Neuere Arbeiten zeigen schließlich, dass humane DCs mit Allergenen von *Aspergillus* stimulierbar sind und anschließend T_h -Zellantworten auslösen können^[52]. Unsere Daten bestätigen diese Beobachtungen, wir stellten eine Stimulierbarkeit humaner iDCs mit Asp f 1 im Sinne einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine fest.

Die Stimulierbarkeit von humanen DCs mit einzelnen rekombinanten Antigenen von *Aspergillus fumigatus* eröffnet unter anderem neue Möglichkeiten für die DC-basierte Immuntherapie. Hierbei soll versucht werden, die T_h -Zellantwort der Patienten mit Hilfe der *in vitro*-Stimulierung und anschließenden Retransfusion von DCs in eine bestimmte Richtung zu dirigieren. Diese Zellen sind, wie bereits in Kapitel 1.3.2 ausgeführt wurde, entscheidend an der Auslösung der verschiedenen T_h -Zellantworten auf ein in den Körper eingedrungenes Pathogen beteiligt. Für den Fall der invasiven Aspergillose wurde bereits mehrfach im murinen Modell nachgewiesen, dass sich lediglich eine T_h1 -Antwort protektiv für den Wirt auswirkt, während eine T_h2 -Antwort zur Progression der Erkrankung führt^[18-20]. Die Gültigkeit dieses Modells wird auch für den Menschen angenommen, da gesunde Probanden auf die Konfrontation mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenen mit einer T_h1 -Antwort reagieren. Darüber hinaus zeigen Patienten, die an invasiver Aspergillose leiden ein wesentlich besseres Outcome wenn sich ihre Immunantwort mehr in die Richtung einer T_h1 -Antwort als in die einer T_h2 -Antwort bewegt^[38]. Die Immunisierung von Patienten mit DCs, die mit proinflammatorisch wirkenden Antigenen stimuliert wurden stellt somit einen vielversprechenden Ansatz in der Prävention dieser hauptsächlich für Immunsupprimierte gefährlichen Erkrankung dar. Zunächst wurden Versuche unternommen, eine Immunisierung mittels Pilzantigenen ohne den Umweg über die vorangehende *in vitro* DC-Stimulierung zu erreichen. Hierzu wurde z.B. von Cenci et al. im murinen Modell die intranasale Applikation eines *Aspergillus* Antigen-Gemisches mit der Applikation von Asp f 2 verglichen. In diesem Versuch gelang die Immunisierung der Mäuse nur mit dem Antigen-Gemisch, während Asp f 2 eine T_h2 -Antwort auslöste^[16]. Die erfolgreiche Auslösung einer T_h1 -Antwort durch ein Gemisch von Antigenen legt die Vermutung

nahe, dass einzelne Aspergillus-Antigene existieren, die sich für die Immunisierung eignen. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich vor allem Aspf 1 durch die potentielle Auslösung einer T_h1 -Antwort für die DC-basierte Immuntherapie der invasiven Aspergillose eignen würde. Da Aspf 1 wegen der ebenfalls beobachteten vermehrten Sekretion von IL-6 und IL- 1β allerdings auch in der Lage zu sein scheint, neben einer protektiven T_h1 -Zellantwort die für überschießende Inflammation bei fehlender Beseitigung des Aggressors verantwortliche T_h17 -Zellantwort auszulösen, ist hier zunächst noch Vorsicht geboten. Auf die genaue Wirkung von Aspf 1 hinsichtlich der resultierenden T_h -Zellantwort in vivo können anhand unserer in vitro-Versuche nur ungenügende Rückschlüsse gezogen werden. Bozza et al. testeten im Mausmodell bereits die Eignung der rekombinanten Antigene Aspf 2, Aspf 3, Aspf 12 und Aspf 16 für eine Immunisierung gegen die invasive Aspergillose. Hierbei stellte sich heraus, dass keines der Antigene die Tiere vor einer Infektion mit dem Schimmelpilz schützen konnte. Diese Daten bestätigen unsere Vermutung, dass sich Aspf 16 aufgrund der fehlenden Auslösung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine weniger für eine präventive Impfung eignen würde. Aspf 16 in Kombination mit TLR 9-stimulierenden unmethylierten CpG Oligonukleotiden löste dagegen die gewünschte T_h1 -Reaktion aus und konnte die Überlebensrate deutlich erhöhen^[10].

Ein wichtiger Schwerpunkt der zukünftigen Forschung wird somit die Suche nach einem Antigen bzw. einem Konjugat sein, welches durch die Stimulation dendritischer Zellen die erwünschte Immunreaktion im Patienten auslösen kann. Obwohl man hierbei lange Zeit von einem binären T_h1/T_h2 -Modell ausgegangen ist, laut dem sich lediglich eine T_h1 -Antwort zugunsten des Patienten auswirkt, sollten auch neue Erkenntnisse im Modell der Pathophysiologie der invasiven Aspergillose, wie z.B. die Rolle der T_h17 -Zellen berücksichtigt werden.

5.3 Inhibierung von GSK3 mit Lithiumchlorid

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die Rolle der GSK3 bei der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane DCs erfasst wer-

den und unter anderem ein Kausalzusammenhang zwischen der GSK3-Aktivität und der Expression bestimmter immunmodulatorischer Zytokine überprüft werden. Hierfür wurden die Zellen in einem Teil der Versuche mit dem GSK3-Inhibitor LiCl behandelt und anschließend mit Aspergillus-Keimschläuchen stimuliert. Dann wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12p35 und IL-23 mittels real time RT-PCR bestimmt und mit der Expression unstimulierter und mit LPS stimulierter Zellen verglichen.

Die GSK3-Hemmung durch das hier verwendete LiCl beinhaltet zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen erhöht es die Aktivität von PI3K, was die Phosphorylierung des N-terminalen Serinrestes von GSK3 und damit die Inaktivität des Enzyms nach sich zieht^[21]. Zum anderen führt LiCl direkt zu einer kompetitiven Hemmung von GSK3, weil es die für ihre Funktion wichtigen Mg^{2+} Ionen ersetzt^[86]. Neuere Arbeiten zur Wirkung von LiCl zeigen außerdem seinen Einfluss auf der Genexpressionsebene: in den Neuronen von Ratten, die mit LiCl behandelt wurden, konnte eine verringerte Menge an GSK3-mRNA festgestellt werden^[68].

5.3.1 Expression von IL-12p35

Das auch als natural killer cell stimulatory factor 1 (NKSF 1) bekannte IL-12p35 ist ein Bestandteil des aus zwei Untereinheiten zusammengesetzten Heterodimers IL-12p70. Dessen beide Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40 sind in der biologisch aktiven Form des proinflammatorischen Zytokins über eine Disulfidbrücke verbunden. IL-12p70 wird von aktivierten APCs sezerniert und spielt eine wichtige Rolle für die Auslösung protektiver T_h1 -Antworten im Rahmen invasiver Pilzinfektionen^[3]. Die p35-Untereinheit wird im Vergleich zur p40-Untereinheit quantitativ deutlich weniger exprimiert und limitiert somit die Produktion von IL-12p70^[37]. Darüber hinaus kann die p40-Untereinheit Homodimere bilden, welche als IL-12-Rezeptorantagonisten wirken^[60]. IL-10, dessen Produktion von IL-12 induziert wird reguliert die IL-12-Expression^[5]. IL-12p70 ist das entscheidende Zytokin, das die Differenzierung naiver T_h -Zellen zu T_h1 -Zellen induziert.

IL-12p35 war bei den in dieser Arbeit mit dem GSK3-Inhibitor LiCl behandelten DCs sowohl nach der Stimulierung mit LPS als auch nach der Stimulierung mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen im Vergleich zu den nicht-inhibierten Zellen sehr deutlich herunterreguliert (siehe Kapitel 4.2.1). Auf die Stimulierung mit LPS reagierten die inhibierten DCs durchschnittlich mit einer 99,8 %-igen ($\pm 0,4$ %) Verringerung ihrer IL-12p35-Expression, *Aspergillus* rief durchschnittlich eine etwas weniger stark ausgeprägte Reduktion von 86,1 % (± 6 %) hervor. Diese Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluss der GSK3 auf die Expression des immunmodulatorischen Zytokines IL-12p35 im Rahmen der Erkennung von *Aspergillus fumigatus*. Die von uns beobachtete regulierende Rolle der GSK3 für die IL-12p35-Expression humaner DCs nach Stimulierung mit dem fakultativ pathogenen Schimmelpilz verhält sich parallel zu den Ergebnissen für die Stimulierung mit LPS, fällt allerdings etwas geringer aus.

Bereits vor Martin et al. zeigten andere Autoren den Einfluss von LiCl auf die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine durch die Zellen des angeborenen Immunsystems. Rapaport et al. behandelten z.B. humane Monozyten für fünf Tage in Anwesenheit eines Mitogens mit dem GSK3-Inhibitor und stellten hierbei eine Verlagerung der Zytokinproduktion der Zellen von den T_h1 -Zytokinen IL-2 und IFN- γ hin zu den T_h2 -Zytokinen IL-10 und IL-4 fest^[75]. Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Martin et al. bestätigt, welche bei humanen Monozyten durch die Inhibierung von GSK3 und die anschließende Stimulierung der Zellen mit LPS eine Reduktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem von IL-12p40, sowie eine erhöhte Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 feststellten^[65]. Interessanterweise fiel die von den Autoren berichtete Verringerung der IL-12p40-Produktion nicht mit dem Inhibitor LiCl, sondern mit spezifischer GSK3-siRNA am deutlichsten aus. Auch hier wurden allerdings nur Reduktionen von etwa 60 % erreicht, was quantitativ nicht an unsere Ergebnisse für die IL-12p35-Expression nach LPS-Stimulierung heranreicht. Gleichzeitig stellt sich natürlich auch die Frage nach der Zulässigkeit dieses Vergleiches zwischen dem von Martin et al. untersuchten IL-12p40 und dem von uns untersuchten IL-12p35, da IL-12p40 von den Zellen des Immunsystems

im Gegensatz zu IL-12p35 im Überschuss produziert wird und damit eventuell auch anderen Regulationsmechanismen unterliegt. Unsere Ergebnisse zeigen sowohl für LPS als auch für Aspergillus eine deutliche, GSK3-abhängige Regulation von IL-12p35 auf mRNA-Ebene, welche im Vergleich mit anderen Studien wohl nicht vollständig auf die Situation für IL-12p40 übertragen werden kann.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der IL-12p35- und IL-12p40-Expression bietet die Arbeit von Rodionova et al., die in humanen DCs ebenfalls die Aktivität von GSK3 inhibierten, unter anderem mit LiCl^[80]. Die anschließende Stimulierung der Zellen mit *E. coli* führte zur Blockierung der IL-12p70-Produktion, während die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12p40, IL-6 und TNF- α lediglich verringert war. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen ergibt sich ein Hinweis darauf, dass die Sekretion von IL-12p35 in stärkerem Maße von GSK3 abhängt als die Sekretion von IL-12p40. Diese Annahme wurde bereits von Rodionova et al. geäußert, die GSK3-abhängige und -unabhängige Mechanismen bei der Regulierung der IL-12p40-Sekretion vermuteten^[80]. Auch die Ergebnisse der Diplomarbeit von Katrin Spinner^[88] passen in dieses Bild. Neben einer verminderten TNF- α -Expression sowie einer erhöhten IL-10-Expression stellte sie bei der Inhibierung humaner DCs mittels LiCl und der anschließenden Stimulierung der Zellen mit Aspergillus-Keimschläuchen und LPS einen Rückgang der IL-12p40-Expression von 71 % bzw. 74 % fest. Die von ihr beobachtete Reduzierung der IL-12p40-Expression fällt somit sowohl bei den mit LPS als auch bei den mit Aspergillus stimulierten DCs nach GSK3-Hemmung geringer aus als die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Reduzierung der IL-12p35-Expression. Diese Feststellung lenkt die Vermutung ebenfalls auf eine unterschiedlich stark ausgeprägte GSK3-Regulierung der Expression der beiden IL-12-Untereinheiten im Rahmen des durch Aspergillus ausgelösten Signalings. Es sollte dennoch angemerkt werden, dass IL-12p40 kaum Auskunft über die Menge des tatsächlich vorhandenen, biologisch aktiven IL-12p70 gibt. IL-12p40 kann wie bereits erwähnt Homodimere bilden und somit sogar als Antagonist am IL-12-Rezeptor wirken. IL-12p35 scheint deshalb ein zuverlässigerer Indikator der IL-12p70-Aktivität und somit wesentlich relevanter bei der

Untersuchung der konsekutiv ausgelösten T_h1 -Antwort zu sein.

Es stellt sich weiterhin die Frage, in wiefern das von Martin et al. postulierte Model des TLR-Signalings bei Monozyten nach LPS-Stimulierung für den Signalweg von DCs nach Stimulierung mit *Aspergillus fumigatus* anwendbar ist. In beiden Situationen scheint GSK3 der Aktivierung proinflammatorischer sowie der Inaktivierung antiinflammatorischer Immunantworten zu dienen, was auch die Daten aus der Diplomarbeit von Katrin Spinnler^[88] sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen. Ob jedoch der Signalweg, der die Erkennung von LPS vermittelt jenem entspricht, der die Erkennung von *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen vermittelt, ist bisher unklar. Um eine Aussage hierüber treffen zu können müssen weitere Versuche unternommen werden, um das genaue downstream-signaling der PRRs humaner DCs nach Konfrontation mit *Aspergillus fumigatus* charakterisieren. Kürzlich veröffentlichte Daten von Mezger et al. geben bereits erste Hinweise darauf, dass bei der von uns studierten Erkennung von *Aspergillus*-Keimschläuchen durch humane DCs ein anderer Zusammenhang von GSK3 mit der Auslösung verschiedener T_h -Zellantworten bestehen könnte als der von Martin et al. postulierte TLR-Signalweg. Sie zeigten, dass hauptsächlich der non-TLR PRR Dectin-1 an der Erkennung von Keimschläuchen und der Auslösung proinflammatorischer Immunantworten beteiligt ist^[69]. Der sich an diesen Rezeptor anschließende Signalweg ist noch nicht im Detail erforscht, bisher sind nur wenige seiner Komponenten bekannt^[12]. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse ist es möglich, dass GSK3 am Dectin-1-Signalweg humaner iDCs und an der konsekutiven Auslösung proinflammatorischer Immunantworten nach Stimulierung mit *Aspergillus fumigatus* beteiligt ist. Eine weitere mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse wäre die zusätzliche Involvierung eines anderen, eventuell eines TLR-Rezeptors bei der Erkennung von *Aspergillus*, dessen Signalweg GSK3 beinhaltet.

Weitere Überlegungen erstrecken sich auf die Übertragbarkeit der in vitro-Daten zur Wirkung von LiCl auf in vivo-Situationen. Ein Beispiel für die Anwendbarkeit der GSK3-Hemmung findet sich z.B. bei Ohtani et al., die im murinen Model die durch LiCl ausgelöste Unterdrückung der T_h1 -Antwort auf ein Pathogen nachwiesen. Das von ihnen verwendete

Stimulans ist *Leishmania major*, weshalb aufgrund dieser Ergebnisse keine sicheren Rückschlüsse auf die allgemeine in vivo-Reaktion bei anderen Pathogenen gezogen werden können^[72]. Martin et al. zeigten die Wirksamkeit eines anderen GSK3-Inhibitors in einem Mausmodell, das die Gabe einer letalen Dosis LPS beinhaltet^[65]. Hier konnten abhängig vom Zeitpunkt der GSK3-Hemmung 50-70 % der Tiere vor dem Tod durch eine Endotoxin-Sepsis gerettet werden. Diese Ergebnisse deuten eine mögliche Anwendung der GSK3-Inhibierung im Bereich schwerer Infektionen an. Das beschriebene Vorgehen könnte dazu beitragen, Patienten vor einer Schädigung durch überschießende Immunreaktionen zu schützen, wie sie z.B. im Rahmen einer Sepsis zu beobachten sind. In diesem Zusammenhang könnte sich vor allem die Tatsache als nützlich erweisen, dass GSK3 nicht nur die Expression proinflammatorischer, sondern auch die Expression antiinflammatorischer Zytokine reguliert. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen den Einsatz von GSK3-Inhibitoren auch für den Fall schwerer invasiver *Aspergillus fumigatus*-Infektionen mit überschießender Inflammation denkbar erscheinen.

5.3.2 Expression von IL-23

IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin, welches ebenso wie das in Kapitel 5.3.1 besprochene IL-12p70 über eine p40-Untereinheit verfügt. Der zweite Bestandteil dieses immunmodulatorischen Zytokines ist eine IL-23p19-Kette. Obwohl IL-23 nicht direkt an der Differenzierung naiver T_H -Zellen zu T_H17 -Zellen beteiligt ist, spielt es eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion^[95]. Darüber hinaus unterstützt IL-23 die IFN- γ -Sekretion durch naive T-Zellen und stimuliert die Proliferation von T-Gedächtniszellen^[96]. Im Rahmen invasiver Pilzinfektionen werden IL-23 und die T_H17 -Zellen seit kurzem mit einer persistierenden Inflammation bei fehlendem Aufbau einer Immunität gegenüber dem Erreger in Verbindung gebracht^[105].

2001 stellten Re et al. bei der Stimulierung humaner DCs mit einem TLR 2-Agonisten fest, dass die Zellen diesen Reiz mit der vermehrten

Produktion von IL-12p40 und IL-23p19 beantworten, welche sich zu IL-23 zusammensetzen können. Wie in Kapitel 5.3.1 bereits erwähnt, ist IL-12p40 auch in der Lage Homodimere zu bilden, welche antagonistisch zu IL-12p70 wirken und somit die Voraussetzungen für die Entwicklung einer T_h2 -Antwort schaffen. Diese Zytokinantwort stellten die Autoren der Reaktion der DCs auf einen TLR 4-Agonisten gegenüber, welcher die Produktion von IL-12p70 und somit eine potentielle T_h1 -Antwort hervorrief^[77]. Dass IL-23 auch an der Immunantwort auf humanpathogene Pilze beteiligt ist, konnten Gafa et al. zeigen. Sie stimulierten humane DCs mit Konidien von *Aspergillus fumigatus* und wiesen hierbei unter anderem eine zeitabhängige Sekretion der Zytokine IL-12p70 und IL-23 nach. Während die Expression von IL-12p70 innerhalb von 6 bis 20 Stunden nach der Konidien-Exposition anstieg und nach 48 Stunden bereits wieder abfiel, begannen die Zellen erst nach circa 20 Stunden mit der Expression von IL-23. Im Gegensatz zu den mit LPS behandelten Kontroll-DCs wurde bei den mit Pilzsporen stimulierten Zellen auch nach 48 Stunden noch eine steigende IL-23-Expression beobachtet, so dass die Wirkung von IL-23 vor allem in den späten Stadien invasiver Pilzinfektionen zum tragen zu kommen scheint^[28]. Zelante et al. definierten schließlich die Wirkung von IL-23 und den IL-17-sezernierenden T_h17 -Zellen bei invasiven Pilzinfektionen. Sie stellten fest, dass beide Zytokine negative Regulatoren der protektiven T_h1 -Antwort sind und für die überschießende Inflammation verantwortlich sind, die zuvor mit einer unkontrollierten T_h1 -Antwort erklärt wurde. IL-23 führte im murinen Modell zu unkontrolliertem Pilzwachstum und schwerer Gewebsschädigung durch das Immunsystem. Des weiteren konnten die Autoren zeigen, dass die Produktion von IL-23 und IL-12 reziprok auf Ebene der DCs reguliert wird^[105]. Diese Erkenntnisse ergänzen das bisher angenommene Modell der Pathogenese schwerer invasiver Pilzinfektionen, welches sich hauptsächlich auf die Balance zwischen T_h1 - und T_h2 -Antwort stützte. Entgegen der oben erwähnten Daten von Re et al. demonstrierten Zelante et al. darüber hinaus anhand muriner DCs, dass die IL-23-Sekretion nach Stimulierung mit Hefen oder Konidien von *Candida* MyD88-abhängig sowohl durch TLR 4 als auch durch TLR 2 reguliert wird^[105].

In unseren Ergebnissen war durch die Stimulierung humaner iDCs mit

LPS eine um ein Vielfaches erhöhte IL-23-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu beobachten (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Ergebnisse stehen entgegen der Arbeit von Re et al., die nach Stimulierung der Zellen mit dem TLR 4-Agonisten LPS keine IL-23-Sekretion feststellen konnten^[77]. Im Gegensatz hierzu wiesen Zelante et al. die Beteiligung von TLR 4 bei der IL-23-Produktion nach, allerdings mit einem anderen Stimulans^[105]. Auch unsere Ergebnisse zeigen parallel zur Arbeit von Zelante et al., dass die Stimulierung des TLR 4 von DCs mittels LPS zu einer vermehrten Sekretion von IL-23 führt. Nach LiCl-Behandlung der iDCs und anschließender LPS-Stimulierung konnten wir durchschnittlich eine 79,5 %-ige ($\pm 10,3$ %) Reduzierung der IL-23-Expression der Zellen erzielen (siehe Kapitel 4.2.2). Die Expression dieses Zytokines könnte in DCs somit durch den GSK3-abhängigen TLR 4-Signalweg reguliert werden, den Martin et al. bereits für die Expression einiger anderer immunmodulatorischer Zytokine postulierten^[65]. Die Beteiligung von GSK3 bei der Regulierung der IL-23-Expression humaner iDCs nach Stimulierung mit LPS wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit zum ersten Mal dokumentiert.

Auch die Stimulierung der Zellen mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen bewirkte in unseren Versuchen eine Zunahme der IL-23-Expression im Vergleich mit den unstimulierten Zellen (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Feststellung ist kongruent zu den Ergebnissen von Gafa et al., die eine gesteigerte Produktion von IL-23 nach Stimulierung humaner DCs mit den Konidien des Schimmelpilzes zeigten^[28]. In unserer Arbeit war die Expression von IL-23 nach Stimulierung mit *Aspergillus* bei den mit LiCl inhibierten Zellen vermindert (siehe Kapitel 4.2.2). Ebenso wie bereits in Kapitel 5.3.1 für IL-12p35 gezeigt wurde, fiel diese Reduzierung der Expression mit durchschnittlich 49,5 % ($\pm 39,3$ %) geringer aus als jene bei den mit LPS stimulierten Zellen beobachtete. Es kann dennoch eine Beteiligung von GSK3 bei der Regulierung der IL-23-Expression in humanen DCs nach Erkennung von *Aspergillus fumigatus* angenommen werden. Dass diese Beteiligung allerdings nicht unbedingt im Rahmen des von Martin et al. entdeckten TLR-Signalweges zu sehen ist^[65], legen wie bereits zuvor erwähnt die Ergebnisse von Mezger et al. nahe, die eine wichtige Rolle von Dectin-1 bei der Erkennung von *Aspergil-*

lus fumigatus-Keimschläuchen durch humane DCs nachwiesen^[69]. Der Signalweg, welcher sich an Dectin-1 anschließt ist noch nicht im Detail erforscht, es ergibt sich aber anhand unserer Daten der Verdacht, dass GSK3 am Dectin-1-Signalweg humaner iDCs beteiligt sein könnte. Eine weitere mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse ist die Beteiligung eines zusätzlichen Rezeptors an der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane iDCs, dessen Signalweg GSK3 beinhaltet. Des Weiteren scheint die IL-23- ebenso wie IL-12p35-Expression der DCs nach Konfrontation mit *Aspergillus fumigatus* auch über GSK3-unabhängige Mechanismen reguliert zu werden.

Zelante et al. nahmen die durch IL-23 vermittelte überschießende Inflammation bei fehlender Resistenz gegen *Aspergillus* zum Anlass, die therapeutische Wirkung der IL-23- bzw. IL-17-Hemmung im murinen Model der invasiven Aspergillose zu untersuchen. Sie stellten hierbei ein verringertes Pilzwachstum in verschiedenen Geweben der behandelten Tiere fest. Beide Vorgehensweisen reduzierten darüber hinaus die klinischen Entzündungszeichen. Diese Entwicklung brachten die Autoren mit der bei diesen Mäusen nachgewiesenen erhöhten Frequenz von T_h1 -Zellen und der erniedrigten Frequenz von T_h17 -Zellen in Verbindung^[105]. Die von uns festgestellte Abhängigkeit der IL-23-Expression humaner DCs von der Aktivität der GSK3 eröffnet neue, auf den Feststellungen von Zelante et al. basierende Ansatzmöglichkeiten zur Therapie der invasiven Aspergillose. Die pharmakologische Intervention mit LiCl könnte hierbei aufgrund der verringerten IL-23-Produktion die Immunantwort weg von der ungünstigen T_h17 -Zell-dominierten Variante zur günstigeren T_h1 -Zellantwort lenken. Probleme könnte in diesem Fall die in Kapitel 5.3.1 besprochene Abhängigkeit des zur Auslösung einer protektiven T_h1 -Immunantwort benötigten IL-12p35 von der GSK3-Aktivität in humanen DCs bereiten. Da darüber hinaus die Expression von IL-12p35 in stärkerem Maße als jene von IL-23 durch GSK3 bestimmt zu werden scheint, sind zunächst weitere Versuche nötig, um die genaue Wirkung von LiCl auf das Expressionsprofil immunmodulatorischer Zytokine nach *Aspergillus*-Stimulierung besser einschätzen zu können.

5.4 Stimulierung mit verschiedenen *Aspergillus fumigatus*-Morphologien

Pathogene Pilze wie *Aspergillus fumigatus* werden von den Zellen des angeborenen Immunsystems über unterschiedliche PRRs erkannt. Es existiert außerdem die Vorstellung, dass diese Zellen die verschiedenen Pilzmorphologien anhand der Erkennung durch bestimmte Rezeptoren beziehungsweise die Kombination bestimmter Rezeptoren voneinander unterscheiden können, um anschließend individuell auf den Aggressor zu reagieren. In aktueller Literatur zur Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch bestimmte PRRs sind hierzu, abhängig vom jeweiligen Zelltyp und Pilzbestandteil, allerdings sehr unterschiedliche Angaben zu finden. Einigkeit herrscht hier lediglich dahingehend, dass bei diesem Vorgang für den Fall der humanen iDCs die Toll-like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 sowie der non-TLR Dectin-1 beteiligt sind^[11,69]. Diese Erkenntnisse gaben zusammen mit der Arbeit von Martin et al. über die entscheidende Rolle der GSK3 beim downstream-signaling bestimmter TLRs Anlass zu der Vermutung eines quantitativen Unterschiedes in der GSK3-Beteiligung bei der Konfrontation humaner DCs mit verschiedenen Erscheinungsformen des Schimmelpilzes. Um diese These zu verifizieren wurden die Zellen mit Konidien, Keimschläuchen und Hyphen von *Aspergillus* stimuliert und ihre GSK3-Expression wurde anschließend nach 3 und nach 6 Stunden mit jener von unstimulierten und mit LPS stimulierten DCs verglichen.

5.4.1 Expression von GSK3

Wie bereits bei der Stimulierung von DCs mit LPS im Rahmen anderer Versuche zu beobachten war (siehe Kapitel 4.1.1), so war auch hier die GSK3-Expression der Positivkontrolle im Vergleich mit den unstimulierten Zellen im Durchschnitt zu beiden Zeitpunkten vermindert (siehe Kapitel 4.3.1). Auch auf die Stimulierung mit den verschiedenen *Aspergillus*-Morphologien reagierten die DCs durchschnittlich im Sinne der Positivkontrolle mit einer Verringerung der GSK3-Expression. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen mit den Pilzformen ließ sich sogar ein

leichter Trend in der GSK3-Expression ablesen. Die stärkste Reduktion erzielten die Hyphen und die Keimschläuche, während die Pilzsporen eine weniger ausgeprägte Verringerung der GSK3-Expression hervorriefen. Nach sechs Stunden flachten sich diese Unterschiede allerdings deutlich ab, außerdem fiel die Reduktion der GSK3-Expression allgemein geringer aus.

Der nach drei Stunden beobachtete stärkere Einfluss der Hyphen im Vergleich zu den Konidien auf die Expression von GSK3 könnte anhand der Annahme erklärt werden, dass Hyphen von den Zellen des menschlichen Immunsystems laut einigen Autoren sowohl von TLR 2 als auch von TLR 4 erkannt werden, während die Erkennung der Sporen nur durch TLR 2 vermittelt wird^[63,99]. Laut Martin et al. ist GSK3 am Signalweg von beiden TLRs beteiligt^[65]. Bei unseren mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen stimulierten Zellen könnte somit eine Addition des Effektes beider Signalwege zu beobachten sein, während die mit Sporen stimulierten DCs nur die GSK3-Beteiligung eines Signalweges widerspiegeln. Da dieser Effekt jedoch bereits nach sechs Stunden aufgehoben zu sein scheint, ist die Gültigkeit einer solchen Erklärung durchaus anzuzweifeln. Bei einer zusammenfassenden Betrachtung aller Ergebnisse ergeben sich nicht genügend Anhaltspunkte für eine unterschiedlich stark ausgeprägte Beteiligung von GSK3 an der Erkennung verschiedener *Aspergillus fumigatus*-Morphologien.

Allgemein ist festzustellen, dass die GSK3-Expression bereits kurze Zeit nach Kontakt der DCs mit dem Pathogen deutlich herunterreguliert wird, wohingegen nach sechs Stunden eine weniger starke Reduktion der Expression zu verzeichnen ist. Dies passt zu der Annahme von Fukao et al, dass der PI3K-vermittelte TLR-Signalweg vor allem in der frühen Phase des Pathogenkontaktes aktiviert wird, um das Ausmaß der Aktivierung des Immunsystems anzupassen^[26]. GSK3 könnte als ein downstream-target von PI3K diesen Vorgang widerspiegeln.

Die Beobachtung einer Reaktion der GSK3-Expression bei den mit Keimschläuchen stimulierten Zellen lässt von den eben angesprochenen Aspekten abgesehen den Verdacht aufkommen, dass GSK3 auch in den Signalweg involviert sein könnte, der sich an Dectin-1 anschließt.

Dectin-1 ist derjenige Rezeptor, welcher in humanen DCs hauptsächlich verantwortlich für proinflammatorische Zytokinantworten auf *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuche zu sein scheint^[69]. Bereits die Ergebnisse der Inhibierung der iDCs mit LiCl vor der Stimulierung mit Keimschläuchen in Kapitel 4.2 der vorliegenden Arbeit legte die Vermutung nahe, dass GSK3 im Dectin-1-Signalweg eine Rolle spielen könnte. Diese Vermutung wird durch die eben beschriebene Reduktion der GSK3-Expression bei den mit Keimschläuchen stimulierten Zellen untermauert. Eine weitere Möglichkeit, welche die von uns festgestellte Beteiligung von GSK3 an der Erkennung von *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen erklären könnte, ist die Involvierung eines weiteren Rezeptors neben Dectin-1, z.B. eines TLRs an diesem Vorgang.

Abschließend bleibt anzumerken, dass Vorgänge auf Expressionsebene nicht zwangsweise die Verhältnisse auf der Proteinebene repräsentieren. Die fehlenden Nachweise der vorliegenden Arbeit, die eine unterschiedlich stark ausgeprägte GSK3-Beteiligung bei der Erkennung verschiedener *Aspergillus*-Formen durch humane DCs belegen könnten, sind vielleicht anhand der Unterschiede in der Produktion dieses Enzymes zu erbringen. Ein weiteres Ziel könnte deshalb die vergleichende Messung der GSK3-Produktion auf Proteinebene nach Konfrontation mit Konidien, Keimschläuchen und Hyphen von *Aspergillus fumigatus* sein.

5.5 Ausblick

Die invasive Aspergillose ist eine meist tödlich endende invasive Infektion mit Pilzen der Gattung *Aspergillus*, welche hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten auftritt. Während die inhalierten Sporen des Schimmelpilzes bei immungesunden Menschen sofort durch die Zellen der angeborenen Immunabwehr eliminiert werden, kommt der erworbenen Immunabwehr bei Risikopatienten eine vermehrte Bedeutung zu^[53]. DCs, welche selbst der angeborenen Immunabwehr zuzurechnen sind, besitzen einzigartige Fähigkeiten zur Auslösung und Steuerung der in diesem Rahmen besonders wichtigen T_h -Zellantwort^[93].

Prinzipiell sind heute bereits die beteiligten Rezeptoren bekannt, welche eine Rolle bei der Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* spielen. Ebenso kann die durch den opportunistisch pathogenen Pilz nach Aktivierung dieser Rezeptoren ausgelöste Immunantwort sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet und charakterisiert werden^[83]. Dazwischen befindet sich jedoch eine Art "schwarzes Loch", das heißt die Signalwege, welche diese beobachtbaren Immunantworten mit den Rezeptoren verbinden, sind bisher weitestgehend unerforscht.

Dass die Behandlung der invasiven Aspergillose trotz der vorhandenen Vielfalt an diagnostischen Möglichkeiten und antimykotischen Medikamenten sehr schwierig und wenig erfolgversprechend ist, liegt unter anderem an der bei den symptomarmen immunsupprimierten Patienten häufig zu spät gestellten Diagnose der Erkrankung. Zudem fehlt es an grundlegendem pathophysiologischem Verständnis dieser invasiven Infektion, um gezielt in den Krankheitsverlauf eingreifen zu können. Vor diesem Hintergrund eröffnet die Erforschung der an der Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* beteiligten Rezeptoren und Signalwege neue therapeutische Optionen, welche eines Tages die gezielte Manipulation der Immunantwort hin zu einer protektiven Reaktion des Organismus gegen den opportunistisch pathogenen Schimmelpilz ermöglichen könnten.

Einige der an die PRRs der angeborenen Immunabwehr angeschlossenen Signalwege, welche die Auslösung einer Immunantwort hervorrufen sind für bestimmte Pathogene wie z.B. das bakterielle LPS in den letzten Jahren intensiv erforscht und bereits detailliert skizziert worden. Für den TLR 4 entdeckten Martin et al. neben dem klassischen Signalweg^[2] hierbei einen zusätzlichen, GSK3-abhängigen Signalweg bei der Erkennung von LPS durch humane Monozyten, dessen Gültigkeit sie auch für eine Reihe anderer TLRs postulierten^[65]. Hierbei kommt der GSK3 wie bereits in den Kapiteln 1.4.2 und 1.4.3 ausgeführt wurde eine entscheidende Rolle für die Regulierung der resultierenden pro- bzw. antiinflammatorischen Immunantwort zu^[103].

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, zusammen mit anderen Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe die Über-

tragbarkeit des von Martin et al. beschriebenen TLR-Signalweges auf die Situation der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane iDCs zu verifizieren. Außerdem sollte überprüft werden, ob GSK3 in diesem Fall ebenso wie bei der von Martin et al. untersuchten Erkennung von LPS durch den TLR 4 die letztliche Entscheidung über die resultierende Immunantwort zukommt. Für die Versuche wurden humane iDCs aus Monozyten generiert und anschließend mit Konidien, Keimschläuchen, Hyphen oder rekombinanten Antigenen von *Aspergillus fumigatus* stimuliert sowie teilweise mit dem GSK3-Inhibitor LiCl behandelt. Als Positivkontrolle dienten jeweils mit LPS stimulierte DCs. Mittels quantitativer real time RT-PCR wurde im Anschluss hieran die Expression von GSK3 und bestimmten proinflammatorischen Zytokinen bestimmt.

Die Versuche mit verschiedenen rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Antigenen zeigten vor allem für Asp f 1 eine deutliche, zu den mit LPS stimulierten Zellen parallele Reaktion der GSK3-Expression humaner iDCs (siehe Kapitel 4.1.1). Die beobachtete Reduktion der GSK3-Expression ging sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei den mit Asp f 1 behandelten Zellen mit einer vermehrten Expression einer Reihe proinflammatorischer Zytokine einher (siehe Kapitel 4.1.2). Aufgrund dieser Daten ist es möglich, von einer wahrscheinlichen Beteiligung der GSK3 im Rahmen der Erkennung einzelner *Aspergillus fumigatus*-Antigene und der resultierenden Immunantwort auszugehen. Da jedoch kein direkter Kausalzusammenhang zwischen der GSK3- und der Zytokinexpression hergestellt wurde kann nicht sicher beantwortet werden, ob diese Beteiligung genau der von Martin et al. beschriebenen Rolle der GSK3 im Rahmen des durch LPS ausgelösten TLR-Signalings entspricht^[65]. Diese Kausalität konnte im nächsten Versuch für den Fall der Stimulierung mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen durch vorangehende Inhibierung der GSK3 mittels LiCl nachgewiesen werden. Ebenso wie die mit LPS stimulierten DCs zeigten auch die mit dem Schimmelpilz stimulierten Zellen einen deutlichen, durch LiCl hervorgerufenen Rückgang ihrer Expression einiger proinflammatorischer Zytokine (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Diese Ergebnisse untermauern den regulatorischen Einfluss von GSK3 auf die Expression immunmodulatorischer Zytokine bei der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* und verhalten sich kongruent zu den Ergebnissen

einer Reihe von Arbeiten mit dem bakteriellen Antigen LPS^[39,65,80]. Der letzte Teil der Experimente sollte ausgehend von der Vorstellung, dass verschiedene *Aspergillus*-Morphologien von unterschiedlichen PRRs erkannt werden quantitative Unterschiede in der GSK3-Beteiligung bei mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen stimulierten DCs nachweisen. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten zwar die Involvierung von GSK3 bei der Erkennung aller Morphologien zeigen, die festgestellten Unterschiede in der GSK3-Expression der DCs reichen jedoch nicht aus, um die Annahme einer unterschiedlich starken Bedeutung der GSK3 für die Immunantwort auf eine der Erscheinungsformen des fakultativ pathogenen Schimmelpilzes zu bestätigen (siehe Kapitel 4.3.1).

Die Daten der vorliegenden Promotionsarbeit lassen somit den Schluss zu, dass GSK3 an der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* beteiligt ist, und zumindest für den Fall der Keimschläuche durch ihren Einfluss auf die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine auch eine immunregulatorische Rolle spielt, wie sie von Martin et al. beschrieben wurde. Die Frage jedoch, ob sich der komplette TLR-Signalweg auf die Situation der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane iDCs übertragen lässt, kann noch nicht sicher beantwortet werden. Hierfür sind weitere Experimente nötig, welche die Beteiligung anderer Komponenten des GSK3-abhängigen TLR-Signalweges überprüfen.

Eine dieser Komponenten, welche laut Martin et al. am TLR-downstream-signaling oberhalb von GSK3 beteiligt ist, ist die PI3K^[65]. Sie besteht aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Unter-einheit. Das Enzym wird durch die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes aktiviert und besitzt selbst sowohl eine Lipid-Kinase- als auch eine Protein-Kinase-Aktivität. PI3K spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Zell-Signalwegen, die unter anderem mit dem Zellwachstum und der Apoptose zusammenhängen^[49]. Außerdem ist PI3K ein bedeutendes Enzym für die Auslösung einer adäquaten Immunantwort auf ein in den Organismus eingedrungenes Pathogen. Fukao et al. wiesen die negativ regulierende Rolle von PI3K auf die proinflammatorische Zytokinantwort von DCs im murinen Model nach^[27]. Sie postulierten darüber hinaus, dass PI3K vor allem beim ersten Kontakt der Zellen des angeborenen

Immunsystems mit einem Pathogen aktiviert wird. In diesem Fall soll PI3K das durch ein PAMP ausgelöste TLR-Signaling negativ regulieren und somit eine angemessene Aktivierung der Zellen garantieren^[26]. Die Beteiligung von PI3K bei der Regulierung der Sekretion immunmodulatorischer Zytokine wurde daraufhin von mehreren Autoren bei Monozyten und humanen DCs nachgewiesen, Martin et al. skizzierten sogar seine genaue Einbindung in den TLR-Signalweg^[65,80]. Hoarau et al. stellten schließlich fest, dass PI3K auch bei der Erkennung von Pilzbestandteilen durch DCs die Zytokinproduktion reguliert^[39]. Da eine Beteiligung von PI3K an der Regulierung der Zytokinantwort von DCs bisher jedoch nur für Zymosan und verschiedene bakterielle Pathogene nachgewiesen wurde, wäre die Charakterisierung seiner Rolle im Rahmen der Immunantwort auf *Aspergillus fumigatus* ein weiteres Ziel, das die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen könnte.

Ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Forschungsprojekte ist die Endstrecke des TLR-Signalweges, also die Vermittlung seiner immunologischen Wirksamkeit durch verschiedene Transkriptionsfaktoren. Bereits länger bekannt ist hierbei die Beteiligung von NF κ B an der Regulierung der Zytokinproduktion durch den klassischen TLR-Signalweg^[2]. Einige Arbeiten zur Erkennung von LPS, z.B. durch den TLR 4 humaner Endothelzellen stellten auch einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von PI3K und der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B her^[59], welcher schließlich von Martin et al. genauer beschrieben wurde. Diese Arbeitsgruppe konnte wie bereits in Kapitel 1.4.2 erläutert wurde in ihrer Arbeit zeigen, dass der Transkriptionsfaktor CREB bei der Erkennung von LPS durch den TLR 4 humaner Monozyten für die Effekte des alternativen, GSK3-abhängigen Signalweges verantwortlich ist. Sie postulierten, dass CREB bei inaktiver GSK3 selbst aktiv ist, und mit dem ebenfalls beteiligten NF κ B um ein Koaktivator-Protein konkurriert, welches beide Transkriptionsfaktoren für ihre Funktion benötigen. CREB führt hierbei zur vermehrten Transkription antiinflammatorischer Zytokine. Ist GSK3 jedoch aktiv, wird CREB inhibiert, was zu einer gesteigerten Aktivität von NF κ B und einer daraus resultierenden proinflammatorischen Zytokinantwort führt. Laut Martin et al. reguliert also GSK3 die Produktion immunmodulatorischer Zytokine durch die Beeinflussung der relativen

Menge an aktivem CREB bzw. NF κ B^[65]. Die genaue Einbindung von NF κ B, welches eigentlich die Effekte des klassischen TLR-Signalweges vermittelt, in den alternativen, GSK3-abhängigen TLR-Signalweg ist für die Erkennung mykotischer PAMPs noch nicht erforscht und stellt somit ein potentielles Ziel weiterer Experimente dar.

Die Erforschung der PRR-Signalwege, welche an der Erkennung und Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* beteiligt sind, ist für ein profundes Verständnis der Pathophysiologie der durch diesen opportunistisch pathogenen Schimmelpilz ausgelösten Krankheiten unumgänglich. Besonders für Krankheiten wie die invasive Aspergillose, die auch heute noch mit einer sehr hohen Mortalität einhergehen, eröffnen die Ergebnisse aktueller Forschungen neue Therapieansätze. Ein Beispiel für den gezielten therapeutischen Eingriff in die beteiligten Signalkaskaden stellt hierbei das Endotoxin-Schockmodell von Martin et al. dar. In diesem Modell wurden Mäuse durch die Verabreichung eines GSK3-Inhibitors vor dem sicheren Tod durch überschießende Inflammation nach Konfrontation mit einer normalerweise letalen Menge an bakteriellem LPS bewahrt^[65]. Die Übertragbarkeit dieser Daten auf die klinische Anwendung bleibt zwar fraglich, da GSK3 neben der TLR-Signalkaskade auch an einer beträchtlichen Menge anderer Signal- und Stoffwechselwege des menschlichen Körpers beteiligt ist. Dennoch konnte dieses Modell zeigen, wie das detaillierte Wissen um die an der Immunabwehr eines Pathogens beteiligten Signalwege das gezielte Eingreifen in den Krankheitsverlauf ermöglicht. Die gezielte Intervention in die pathophysiologischen Vorgänge bei der Infektion mit *Aspergillus fumigatus* ist deshalb auch das letzte Ziel der Forschungen an den für die Immunabwehr dieses fakultativ pathogenen Schimmelpilzes relevanten Signalwegen.

6 Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, dessen Sporen vom Menschen täglich zu hunderten mit der Atemluft aufgenommen werden. Aufgrund ihrer geringen Größe gelangen die Konidien leicht bis in die Alveolen der Lunge, wo sie normalerweise sofort von den verschiedenen Komponenten des angeborenen Immunsystems beseitigt werden. Immunsupprimierte Menschen leiden an einer qualitativen oder quantitativen Einschränkung dieses Teiles der Immunabwehr, weshalb die Inokulation der Sporen des fakultativ pathogenen Schimmelpilzes bei ihnen zur Auslösung der lebensgefährlichen invasiven Aspergillose führen kann. Die Mortalitätsrate dieser rasch progredienten Erkrankung beträgt in der Hochrisikogruppe der Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation über 90 %. In diesem immunsupprimierten Patientenkollektiv gewinnt die erworbene Immunabwehr, besonders die T_h -Zellantwort stark an Bedeutung.

Dendritische Zellen sind selbst dem angeborenen Immunsystem zuzurechnen, besitzen daneben aber einzigartige Fähigkeiten zur Aktivierung und Steuerung der erworbenen Immunabwehr. Sie nehmen in den Körper eingedrungene Pathogene auf, präsentieren sie naiven T-Zellen und regulieren durch die Sekretion verschiedener immunmodulatorischer Zytokine die konsekutiv ausgelöste T_h -Zellantwort. Lediglich die T_h1 -dominierte Immunantwort wird hierbei mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der invasiven Aspergillose in Verbindung gebracht. Die Zytokinsekretion der DCs wird durch intrazelluläre Signalkaskaden reguliert, welche sich an einige ihrer PRRs anschließen. Für die Immunantwort auf *Aspergillus fumigatus* sind in diesem Zusammenhang die Toll like-Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 sowie das nicht-klassische Lektin Dectin-1 von Bedeutung. Zwischen diesen Rezeptoren und der beobachtbaren Immunantwort befindet sich jedoch eine Art schwarzes Loch, das heißt die genauen Signalwege welche beide miteinander verbinden sind größ-

tenteils noch unbekannt. Für einige andere Antigene, wie z.B. das bakterielle LPS ist die sich an den TLR anschließende klassische Signalkaskade bereits im Detail erforscht. Kürzlich wurde zudem für LPS ein alternativer, PI3K-abhängiger Signalweg entdeckt, bei welchem die Aktivität der Serin-Threonin-Kinase GSK3 über die Expression der immunmodulatorischen Zytokine und somit letztlich über die Art der resultierenden Immunantwort entscheidet.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, die Übertragbarkeit dieses alternativen TLR-Signalweges und insbesondere der immunregulatorischen Rolle der GSK3 auf die Erkennung von *Aspergillus fumigatus* durch humane iDCs zu prüfen. Hierfür wurden aus humanen Monozyten generierte iDCs mit rekombinanten Antigenen und verschiedenen Morphologien von *Aspergillus fumigatus* stimuliert und teilweise mit dem GSK3-Inhibitor LiCl gehemmt. Anschließend wurde die Expression bestimmter immunmodulatorischer Zytokine und der GSK3 mittels quantitativer real time RT-PCR bestimmt. Hierbei konnte für eines der getesteten Antigene, Asp1, ein deutlicher Einfluss auf die GSK3-Expression der Zellen festgestellt werden. Ein paralleler Anstieg der Expression proinflammatorischer Zytokine erhärtete die Annahme einer immunregulierenden Rolle von GSK3 bei der Erkennung bestimmter *Aspergillus fumigatus*-Antigene, es wurde jedoch kein direkter Kausalzusammenhang nachgewiesen. Einen deutlicheren Zusammenhang zwischen der Aktivität der GSK3 und der Expression proinflammatorischer Zytokine im Sinne des alternativen TLR-Signalweges erbrachte die Inhibierung der Serin-Threonin-Kinase mittels LiCl. Die mit *Aspergillus fumigatus* stimulierten DCs reagierten hierauf im Vergleich zu den nicht-inhibierten Zellen mit einer Reduktion der IL-12p35-Expression um 86,1 % sowie mit einer Reduktion der IL-23-Expression um 49,5 %. Der letzte Teil der Experimente sollte ausgehend von der Vorstellung, dass verschiedene *Aspergillus*-Morphologien von unterschiedlichen PRRs erkannt werden quantitative Unterschiede in der GSK3-Beteiligung bei mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen stimulierten DCs nachweisen. Obwohl alle Morphologien des Schimmelpilzes einen Einfluss auf die GSK3-Expression der Zellen zeigten, konnten hierbei keine einheitlichen quantitativen Unterschiede festgestellt werden.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit die Beteiligung der GSK3 bei der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* sowie einzelnen seiner Antigene durch humane iDCs gezeigt werden. Außerdem konnten Hinweise auf eine immunregulierende Rolle der GSK3 bei der Abwehr des fakultativ pathogenen Schimmelpilzes erbracht werden, wobei die Übertragbarkeit des kompletten alternativen TLR-Signalweges auf diese Situation noch unklar ist.

Ein Ziel zukünftiger Forschungen könnte deshalb die Rolle weiterer Komponenten der alternativen Signalkaskade, wie z.B. der PI3K und der beteiligten Transkriptionsfaktoren sein. Die genaue Kenntnis der an der Immunabwehr von *Aspergillus fumigatus* beteiligten Signalwege auf molekularer Ebene eröffnet Möglichkeiten der gezielten Intervention in die pathophysiologischen Vorgänge der durch diesen Schimmelpilz ausgelösten Krankheiten. Die Wirksamkeit einer solchen Manipulation konnte bereits im murinen Modell durch die Inhibierung von GSK3 vor der Gabe einer normalerweise letalen Dosis LPS nachgewiesen werden.

7 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABPA	Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome, Erworbenes Immundefizienz Syndrom
Akt-1	Protein Kinase B
AP-1	Activating Protein 1
Aspf	Aspergillus fumigatus-Antigen
BAL	Bronchoalveolarlavage
Bcl-10	B-cell Lymphoma Factor 10
bzw.	beziehungsweise
CARD-9	Member 9 of Caspase Recruitment Domain Family
CBP	CREB-binding Protein
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CGD	Chronic Granulomatous Disease, Chronische Granulomatöse Krankheit
CMV	Zytomegalie-Virus
CpG	Cytosin-poly-Guanosin
CRD	Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne
CREB	cAMP Response Element-binding Protein
CRP	C-reaktives Protein

CSF	Colony Stimulating Factor
CT	Computertomographie
°C	Grad Celsius
DC	Dendritic Cell, Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
etc.	et cetera, und so weiter
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FDC	Folikuläre DC
GCDC	Keimzentrums DC
GM	Galaktomannan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen CSF
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
hALAS	humane δ -Aminolävulinatsynthase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPA	High Efficiency Particulate Arresting
HRCT	High Resolution CT, Hochauflösende CT
iDC	immature Dendritic Cell, unreife Dendritische Zelle
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor κ B-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
ITAM	Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif

I κ B	Inhibitor κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
LBP	LPS-binding Protein
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic Acid, Lipoteichonsäure
m ³	Kubikmeter
MALT-1	Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Factor 1
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MBL	Mannose Binding Lectin
MD-2	Myeloid Differentiation Factor 2
MDA-5	Melanoma Differentiation-associated Gene 5
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	millimolar
MMR	Makrophagen Mannose Rezeptor
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

NF κ B	Nuclear Factor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleäre Zelle aus dem peripheren Blut
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RIG-I	Retinoic Acid-inducible Gene I
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg
SOD	Superoxiddismutase
ss	single stranded, einzelsträngig
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TAK1	Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1
T _h	T-Helferzellen
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Necrosis Factor, Tumornekrose Faktor
TRAF-6	Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

- [1] S. Agrawal, A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. V. Dyke und B. Pulendran (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 171 (10): 4984–4989.
- [2] S. Akira und K. Takeda (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4 (7): 499–511.
- [3] C. Antachopoulos und E. Roilides (2005). Cytokines and fungal infections. *Br J Haematol*, 129 (5): 583–596.
- [4] C. Ardavín, G. M. del Hoyo, P. Martín, F. Anjuère, C. F. Arias, A. R. Marín, S. Ruiz, V. Parrillas und H. Hernández (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*, 22 (12): 691–700.
- [5] M. Aste-Amezaga, X. Ma, A. Sartori und G. Trinchieri (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol*, 160 (12): 5936–5944.
- [6] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran und K. Palucka (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18: 767–811.
- [7] B. Banerjee, V. P. Kurup, P. A. Greenberger, B. D. Johnson und J. N. Fink (2001). Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin Exp Allergy*, 31 (5): 761–770.
- [8] P. D. Barnes und K. A. Marr (2007). Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*, 139 (4): 519–531.
- [9] S. Bellocchio, C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S. S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S. M. Levitz und L. Romani (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol*, 172 (5): 3059–3069.

- [10] S. Bozza, R. Gaziano, G. B. Lipford, C. Montagnoli, A. Bacci, P. D. Francesco, V. P. Kurup, H. Wagner und L. Romani (2002). Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect*, 4 (13): 1281–1290.
- [11] S. Braedel, M. Radsak, H. Einsele, J.-P. Latgé, A. Michan, J. Loeffler, Z. Haddad, U. Grigoleit, H. Schild und H. Hebart (2004). *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*, 125 (3): 392–399.
- [12] G. D. Brown (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6 (1): 33–43.
- [13] G. D. Brown, J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. J. Marshall und S. Gordon (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197 (9): 1119–1124.
- [14] C. Bäuerlein (2007). Analyse der Interaktion rekombinanter Proteine und Peptide von *Aspergillus fumigatus* mit humanen Antigen-präsentierenden Zellen. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.
- [15] C. Caux, B. Vanbervliet, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, C. Vaure, K. Chemin, M.-C. Dieu-Nosjean, und A. Vicari (2002). Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation*, 73 (1 Suppl): S7–11.
- [16] E. Cenci, A. Mencacci, A. Bacci, F. Bistoni, V. P. Kurup und L. Romani (2000). T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol*, 165 (1): 381–388.
- [17] E. Cenci, A. Mencacci, A. Casagrande, P. Mosci, F. Bistoni und L. Romani (2001). Impaired antifungal effector activity but not inflammatory cell recruitment in interleukin-6-deficient mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*, 184 (5): 610–617.
- [18] E. Cenci, A. Mencacci, C. F. d’Ostiani, G. D. Sero, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci und L. Romani (1998). Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*, 178 (6): 1750–1760.
- [19] E. Cenci, A. Mencacci, G. D. Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, C. F. d’Ostiani, P. Mosci, M. Bachmann, F. Bistoni, M. Kopf und L. Romani (1999). Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis*, 180 (6): 1957–1968.
- [20] E. Cenci, S. Perito, K. H. Enssle, P. Mosci, J. P. Latgé, L. Romani und F. Bistoni (1997). Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun*, 65 (2): 564–570.

- [21] E. Chalecka-Franaszek und D. M. Chuang (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (15): 8745–8750.
- [22] R. Cramer (1998). Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*, 115 (2): 99–114.
- [23] B. W. Doble und J. R. Woodgett (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 116 (Pt 7): 1175–1186.
- [24] C. F. d'Ostiani, G. D. Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli und L. Romani (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 191 (10): 1661–1674.
- [25] S. Fleige, V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm und M. W. Pfaffl (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 28 (19): 1601–1613.
- [26] T. Fukao und S. Koyasu (2003). PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol*, 24 (7): 358–363.
- [27] T. Fukao, M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, T. Kadowaki, T. Takeuchi und S. Koyasu (2002). PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol*, 3 (9): 875–881.
- [28] V. Gafa, R. Lande, M. C. Gagliardi, M. Severa, E. Giacomini, M. E. Remoli, R. Nisini, C. Ramoni, P. D. Francesco, D. Aldebert, R. Grillot und E. M. Coccia (2006). 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. *Infect Immun*, 74 (3): 1480–1489.
- [29] B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira und D. M. Underhill (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 197 (9): 1107–1117.
- [30] B. N. Gantner, R. M. Simmons und D. M. Underhill (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*, 24 (6): 1277–1286.
- [31] G. M. Gersuk, D. M. Underhill, L. Zhu und K. A. Marr (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176 (6): 3717–3724.
- [32] U. E. Gibson, C. A. Heid und P. M. Williams (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6 (10): 995–1001.

- [33] A. Giulietti, L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon und C. Mathieu (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25 (4): 386–401.
- [34] P. Guermonprez, J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry und S. Amigorena (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 20: 621–667.
- [35] M. Guha und N. Mackman (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*, 277 (35): 32.124–32.132.
- [36] D. N. Hart (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90 (9): 3245–3287.
- [37] M. P. Hayes, J. Wang und M. A. Norcross (1995). Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*, 86 (2): 646–650.
- [38] H. Hebart, C. Bollinger, P. Fisch, J. Sarfati, C. Meisner, M. Baur, J. Loeffler, M. Monod, J.-P. Latgé und H. Einsele (2002). Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*, 100 (13): 4521–4528.
- [39] C. Hoarau, L. Martin, D. Faugaret, C. Baron, A. Dauba, C. Aubert-Jacquin, F. Velge-Roussel und Y. Lebranchu (2008). Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE*, 3 (7): e2753.
- [40] C. Janeway (2008). *Janeway's Immunobiology*, Band 7. Garland Science.
- [41] C. A. Janeway und R. Medzhitov (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20: 197–216.
- [42] E. Jantunen, V.-J. Anttila und T. Ruutu (2002). *Aspergillus* infections in allogeneic stem cell transplant recipients: have we made any progress? *Bone Marrow Transplant*, 30 (12): 925–929.
- [43] E. Jantunen, A. Nihtinen und V.-J. Anttila (2008). Changing landscape of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 10 (3): 156–161.
- [44] M. R. Johnson, K. Wang, J. B. Smith, M. J. Heslin und R. B. Diasio (2000). Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 278 (2): 175–184.
- [45] S. Jolles (2002). Paul Langerhans. *J Clin Pathol*, 55 (4): 243.

- [46] R. S. Jope und G. V. W. Johnson (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*, 29 (2): 95–102.
- [47] T. Kawai und S. Akira (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13 (5): 816–825.
- [48] D. A. Kimbrell und B. Beutler (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*, 2 (4): 256–267.
- [49] M. A. Krasilnikov (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)*, 65 (1): 59–67.
- [50] V. P. Kurup (2005). Aspergillus antigens: which are important? *Med Mycol*, 43 Suppl 1: S189–S196.
- [51] V. P. Kurup, V. Hari, J. Guo, P. S. Murali, A. Resnick, M. Krishnan und J. N. Fink (1996). Aspergillus fumigatus peptides differentially express Th1 and Th2 cytokines. *Peptides*, 17 (2): 183–190.
- [52] S.-E. Lamhamedi-Cherradi, R. E. Martin, T. Ito, F. Kheradmand, D. B. Corry, Y.-J. Liu und M. Moyle (2008). Fungal proteases induce Th2 polarization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. *J Immunol*, 180 (9): 6000–6009.
- [53] J. P. Latgé (1999). Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12 (2): 310–350.
- [54] J. P. Latgé (2001). The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends Microbiol*, 9 (8): 382–389.
- [55] J. P. Latgé, M. Moutaouakil, J. P. Debeaupuis, J. P. Bouchara, K. Haynes und M. C. Prévost (1991). The 18-kilodalton antigen secreted by Aspergillus fumigatus. *Infect Immun*, 59 (8): 2586–2594.
- [56] S. LeibundGut-Landmann, O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland und C. R. e Sousa (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 8 (6): 630–638.
- [57] B. Lemaitre, J. M. Reichhart und J. A. Hoffmann (1997). Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (26): 14.614–14.619.
- [58] S. M. Levitz (2004). Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect*, 6 (15): 1351–1355.
- [59] X. Li, J. C. Tupper, D. D. Bannerman, R. K. Winn, C. J. Rhodes und J. M. Harlan (2003). Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infect Immun*, 71 (8): 4414–4420.

- [60] P. Ling, M. K. Gately, U. Gubler, A. S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, Y. C. Pan und J. Hakimi (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol*, 154 (1): 116–127.
- [61] J. Loeffler, N. Henke, H. Hebart, D. Schmidt, L. Hagemeyer, U. Schumacher und H. Einsele (2000). Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*, 38 (2): 586–590.
- [62] J. Loeffler, P. Swatich, D. Akhawi-Araghi, H. Hebart und H. Einsele (2003). Automated RNA extraction by MagNA Pure followed by rapid quantification of cytokine and chemokine gene expression with use of fluorescence resonance energy transfer. *Clin Chem*, 49 (6 Pt 1): 955–958.
- [63] S. S. Mambula, K. Sau, P. Henneke, D. T. Golenbock und S. M. Levitz (2002). Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*, 277 (42): 39.320–39.326.
- [64] K. A. Marr (2008). Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Mycol*, 46 (4): 293–302.
- [65] M. Martin, K. Rehani, R. S. Jope und S. M. Michalek (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*, 6 (8): 777–784.
- [66] R. Medzhitov (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449 (7164): 819–826.
- [67] A. Meier, C. J. Kirschning, T. Nikolaus, H. Wagner, J. Heesemann und F. Ebel (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*, 5 (8): 561–570.
- [68] C. Mendes, F. Mury, E. de Sá Moreira, F. Alberto, O. Forlenza, E. Dias-Neto und W. Gattaz (2008). Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- [69] M. Mezger, S. Kneitz, I. Wozniok, O. Kurzai, H. Einsele und J. Loeffler (2008). Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis*, 197 (6): 924–931.
- [70] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263–273.
- [71] M. G. Netea, A. Warris, J. W. M. V. der Meer, M. J. Fenton, T. J. G. Verver-Janssen, L. E. H. Jacobs, T. Andresen, P. E. Verweij und B. J. Kullberg (2003). *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*, 188 (2): 320–326.

- [72] M. Ohtani, S. Nagai, S. Kondo, S. Mizuno, K. Nakamura, M. Tanabe, T. Takeuchi, S. Matsuda und S. Koyasu (2008). Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood*, 112 (3): 635–643.
- [73] T. Ono, Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, K. Nonomura und K. Onoé (2007). Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. *Immunology*, 122 (2): 189–198.
- [74] B. Philippe, O. Ibrahim-Granet, M. C. Prévost, M. A. Gougerot-Pocidallo, M. S. Perez, A. V. der Meeren und J. P. Latgé (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*, 71 (6): 3034–3042.
- [75] M. H. Rapaport und H. K. Manji (2001). The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biol Psychiatry*, 50 (3): 217–224.
- [76] V. B. Rathore, B. Johnson, J. N. Fink, K. J. Kelly, P. A. Greenberger und V. P. Kurup (2001). T cell proliferation and cytokine secretion to T cell epitopes of Asp f 2 in ABPA patients. *Clin Immunol*, 100 (2): 228–235.
- [77] F. Re und J. L. Strominger (2001). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*, 276 (40): 37.692–37.699.
- [78] A. Rementeria, N. López-Molina, A. Ludwig, A. B. Vivanco, J. Bikandi, J. Pontón und J. Garaizar (2005). Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*, 22 (1): 1–23.
- [79] A. Rivera, T. Hohl und E. G. Pamer (2006). Immune responses to *Aspergillus fumigatus* infections. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12 (1 Suppl 1): 47–49.
- [80] E. Rodionova, M. Conzelmann, E. Maraskovsky, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, A. D. Ho, M. Zöller, P. Dreger und T. Luft (2007). GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood*, 109 (4): 1584–1592.
- [81] E. K. Rodland, M. Mattingsdal, O. K. Olstad, R. Ovstebø, P. Kierulf, F. Muller und S. S. Frøland (2008). Expression of genes in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 46 (4): 327–336.
- [82] N. C. Rogers, E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown und C. R. e Sousa (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 22 (4): 507–517.
- [83] L. Romani (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4 (1): 1–23.

- [84] L. Romani, F. Bistoni und P. Puccetti (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol*, 10 (11): 508–514.
- [85] N. Romani, S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman und G. Schuler (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180 (1): 83–93.
- [86] W. J. Ryves und A. J. Harwood (2001). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*, 280 (3): 720–725.
- [87] K. Sato und S. Fujita (2007). Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, 56 (3): 183–191.
- [88] K. Spinnler (2007). Analyse der Interaktion dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus* nach Inhibition von GSK3. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.
- [89] R. M. Steinman (2001). Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med*, 68 (3): 160–166.
- [90] R. M. Steinman (2007). Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1: S53–S60.
- [91] R. M. Steinman und Z. A. Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137 (5): 1142–1162.
- [92] R. M. Steinman, D. Hawiger und M. C. Nussenzweig (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21: 685–711.
- [93] R. M. Steinman und H. Hemmi (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311: 17–58.
- [94] D. A. Stevens (2004). Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. *Clin Infect Dis*, 38 (8): 1131–1136.
- [95] B. Stockinger und M. Veldhoen (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*, 19 (3): 281–286.
- [96] G. Trinchieri, S. Pflanz und R. A. Kastelein (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19 (5): 641–644.
- [97] S. Uematsu und S. Akira (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*, 84 (9): 712–725.

- [98] M. Veldhoen, R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley und B. Stockinger (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24 (2): 179–189.
- [99] J. E. Wang, A. Warris, E. A. Ellingsen, P. F. Jørgensen, T. H. Flo, T. Espevik, R. Solberg, P. E. Verweij und A. O. Aasen (2001). Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun*, 69 (4): 2402–2406.
- [100] C. T. Wittwer, K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry und U. J. Balis (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22 (1): 176–181.
- [101] M. L. Wong und J. F. Medrano (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75–85.
- [102] J. R. Woodgett und P. Cohen (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta*, 788 (3): 339–347.
- [103] J. R. Woodgett und P. S. Ohashi (2005). GSK3: an in-Toll-erant protein kinase? *Nat Immunol*, 6 (8): 751–752.
- [104] T. Zelante, S. Bozza, A. D. Luca, C. D'angelo, P. Bonifazi, S. Moretti, G. Giovannini, F. Bistoni und L. Romani (2008). Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. *Med Mycol*, S. 1–8.
- [105] T. Zelante, A. D. Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein, M. Kopf und L. Romani (2007). IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*, 37 (10): 2695–2706.
- [106] J. Zhao und X. yi Wu (2008). Triggering of toll-like receptors 2 and 4 by *Aspergillus fumigatus* conidia in immortalized human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Chin Med J (Engl)*, 121 (5): 450–454.
- [107] O. S. Zmeili und A. O. Soubani (2007). Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*, 100 (6): 317–334.

9 Abbildungsverzeichnis

1	Konventioneller TLR-Signalweg (Abbildung modifiziert nach: C. Janeway (2008). Janeway's Immunobiology, Band 7. Garland Science)	22
2	Alternativer, PI3K- / GSK3-abhängiger TLR-Signalweg a: proinflammatorisch; b: antiinflammatorisch (Abbildung modifiziert nach: J. R. Woodgett und P. S. Ohashi (2005). GSK3: an in-Toll-erant protein kinase? Nat Immunol, 6 (8): 751-752.) .	23
3	Durchschnittliche GSK3-Expression 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS	52
4	Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 6	53
5	Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 16	54
6	Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6, 24 und 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS und Aspf 1	55
7	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	57
8	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	57
9	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	58
10	Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	59
11	Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	59
12	Beispielhafte IL-6-Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	60
13	Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	61

14	Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 24 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	61
15	Beispielhafte IL-1 β -Expression eines Spenders 48 Stunden nach Stimulierung mit LPS, Aspf 1 und Aspf 16	62
16	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung bei unstimulierten Zellen	64
17	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit LPS	65
18	Beispielhafte IL-12p35-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit Aspergillus	65
19	Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung bei unstimulierten Zellen	67
20	Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit LPS	67
21	Beispielhafte IL-23-Expression eines Spenders mit und ohne LiCl-Behandlung nach Stimulierung mit Aspergillus	68
22	Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 3 Stunden nach Stimulierung mit Aspergillus-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen	70
23	Beispielhafte GSK3-Expression eines Spenders 6 Stunden nach Stimulierung mit Aspergillus-Konidien, -Keimschläuchen und -Hyphen	71

10 Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Geräte	30
2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	31
3	Verwendete Kits	32
4	Verwendete Reagenzien	33
5	Verwendete Zytokine	33
6	Verwendete Primer	34
7	Verwendete Sonden	35
8	Zusammensetzung des Zellkulturmediums	39
9	Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription	42
10	Qiagen-Mastermix für Hybridisierungssonden (hALAS, GSK3, IL-12p35, IL-6, IL-1 β)	45
11	Roche-Mastermix für Hybridisierungssonden (hALAS, GSK3, IL-12p35, IL-6, IL-1 β)	45
12	Roche-Mastermix für Hydrolysierungssonde (IL-23)	45
13	Amplifikationsprogramm für hALAS und GSK3	46
14	Amplifikationsprogramm für IL-12p35, IL-6 und IL-1 β	46
15	Amplifikationsprogramm für IL-23	47

Danksagung

Vielen Dank an:

PD Dr. Jürgen Löffler für die Überlassung meines Promotionsthemas und die Betreuung meiner Arbeit.

Professor Dr. Hermann Einsele und Professor Dr. Jörg Morschhäuser für die Übernahme der Gutachten.

Carina Bäuerlein und Katrin Spinnler, auf deren Diplomarbeiten Teile der vorliegenden Arbeit aufbauen (Carina Bäuerlein: „Analyse der Interaktion rekombinanter Proteine und Peptide von *Aspergillus fumigatus* mit humanen Antigen-präsentierenden Zellen“; Katrin Spinnler: „Analyse der Interaktion dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus* nach Inhibition von GSK3“)

Melanie Beyer für die geduldige Einweisung im Labor.

Alle MTAs, Biologie-Doktoranden, -Diplomanden und Medizin-Doktoranden für ihr offenes Ohr bei allen Fragen, ihre Hilfsbereitschaft und das nette Klima im Labor.

Thomas Wecker für seine Hilfe und Unterstützung.

Meine Familie und Freunde.