

Interaktionen des humanpathogenen Pilzes
Aspergillus fumigatus
mit dem angeborenen Immunsystem und Thrombozyten



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kristin Bernadette Czakai

aus Lohr am Main

Würzburg, 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fakultät für Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Institut für Molekulare Infektionsimmunologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Interaktionen des humanpathogenen Pilzes *Aspergillus fumigatus* mit dem angeborenen Immunsystem und Thrombozyten**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 2015

Kristin Czakai

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	1
1.1.	Summary.....	3
2.	Einleitung.....	5
2.1.	<i>Candida albicans</i>	5
2.2.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6
2.3.	Die angeborene Immunantwort gegen <i>A. fumigatus</i>	8
2.4.	Rolle der Thrombozyten in der Immunantwort gegen <i>A. fumigatus</i>	13
2.5.	miRNAs.....	15
2.6.	Transkriptionsfaktoren.....	17
2.7.	Modellierung eines Aktivierungsnetzwerkes von DCs.....	18
2.8.	Ziele der Arbeit.....	19
3.	Methoden.....	20
3.1.	Verwendete Medien.....	20
3.2.	Verwendete Puffer.....	20
3.3.	Generierung von <i>A. fumigatus</i> Konidien und Keimschläuchen.....	22
3.4.	Generierung von <i>C. albicans</i> Keimschläuchen.....	22
3.5.	Primärzellen und Zelllinien.....	23
3.6.	Ko-Kulturen mit <i>A. fumigatus</i> und <i>C. albicans</i>	25
3.7.	<i>Dye Exclusion Assay</i> und Bestimmung der Zellzahl.....	26
3.8.	Messung des Oxidativen Bursts.....	26
3.9.	XTT.....	27
3.10.	Phagozytose.....	28
3.11.	Durchflusszytometrie.....	29
3.12.	Elektrophoresen und Immunoblotting.....	30
3.13.	ELISA.....	32
3.14.	Genexpressionanalysen.....	32
3.15.	Genomweite Microarrays.....	40

3.16.	Signalwege.....	42
3.17.	miRNA Deep Sequencing.....	42
3.18.	Modelling.....	45
3.19.	Heatmaps.....	46
3.20.	Venn Diagramme	46
3.21.	Graphische Darstellung und Statistik.....	46
3.22.	Förderung.....	46
3.23.	Ethik	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Charakterisierung der Oberflächenexpression von CD1a und CD14 auf Monozyten.....	47
4.2.	Charakterisierung der Oberflächenexpression von CD1a und CD14 auf DCs.....	48
4.3.	miRNA-Regulation mit Analyse des Transkriptoms von <i>A. fumigatus</i> und <i>C. albicans</i> -stimulierten DCs	48
4.4.	Untersuchung der Reifung von DCs	73
4.5.	Untersuchung des Zytokinprofils der mit <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> und LPS stimulierten DCs	75
4.6.	Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Immunantwort von DCs.....	81
4.7.	Untersuchung des Einflusses von PRP auf das Transkriptom von <i>A. fumigatus</i> -stimulierten DCs	84
4.8.	Makrophagen	93
4.9.	Neutrophile Granulozyten	93
4.10.	Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Immunantwort von DCs und Makrophagen	98
4.11.	Erstellung eines Boolesches Modells	115
5.	Diskussion.....	119
5.1.	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> und LPS induzieren eine spezifische miRNA-Antwort.....	119
5.2.	KLF4 stellt einen wichtige Komponente in der IL-6-Immunantwort dar	125
5.3.	Plättchen beeinflussen die Immunfunktionen von DCs und Makrophagen.....	128
6.	Anhang.....	148

6.1.	Chemikalien.....	148
6.2.	Geräte	149
6.3.	Abkürzungen	150
6.4.	Kongressbeiträge	155
6.5.	Veröffentlichungen	155
6.6.	Danksagung	156

1. Zusammenfassung

Pilze sind in unserer Umwelt allgegenwärtig und besiedeln im Fall von *Candida albicans* (*C. albicans*) sogar bei über 50% der Menschen die Schleimhäute, während Sporen von *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) täglich über die Atmung in die Lunge des Menschen gelangen. Dennoch sind Erkrankungen, die durch diese zwei Pilze ausgelöst werden, bei gesunden Menschen selten. Ist jedoch das Immunsystem beeinträchtigt, können diese Pilze zu systemischen und damit lebensbedrohlichen Erkrankungen wie der invasiven Aspergillose und der systemischen Candidiasis führen. Für eine Verbesserung der Behandlung solcher Infektionen ist das genaue Verständnis der Immunabwehrmechanismen entscheidend. Da *A. fumigatus* über die Lunge in den Körper gelangt, wurden in dieser Arbeit die häufigsten Immunzellen der Lunge, die Makrophagen, und deren Immunantwort auf *A. fumigatus* untersucht. Parallel hierzu wurden dendritische Zellen (DCs) verwendet, die als Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem wirken. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf *A. fumigatus* induzierte Genexpressionsänderungen und deren Regulationsmechanismen gelegt. Dabei wurden kurze, regulatorische RNAs, die sogenannten miRNAs, untersucht, die eine wichtige Rolle in der post-transkriptionalen Genregulation spielen. Bislang ist nur wenig über die miRNA-abhängigen Genregulationen in DCs, die auf eine Infektion mit *A. fumigatus* oder *C. albicans* reagieren, bekannt. Um alle durch *A. fumigatus* und *C. albicans* regulierten miRNAs zu identifizieren, wurden DCs mit *A. fumigatus* und *C. albicans* ko-kultiviert und anschließend eine Komplettssequenzierung der kurzen RNAs durchgeführt. Die Pilz-spezifische Induktion der miRNA-Regulation wurde zudem mit der miRNA-Regulation durch den bakteriellen Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid verglichen. Durch die Stimulation mit Keimschläuchen von *A. fumigatus* wurden die miRNAs miR-132-3p/5p, miR-155-5p, miR-129-2-3p, miR-129-5p, miR-212-3p/5p und miR-9-5p in DCs induziert. Diese wurden ebenfalls durch *C. albicans* induziert, zudem noch die miRNAs miR-147a und miR-147b. Spezifisch für *A. fumigatus* war die Regulation der miR-129-2-3p. Neben dem miRNA-Profilung wurde auch das mRNA-Transkriptom über Microarrays analysiert und dadurch 18 potentielle Zielgene der Pilz-induzierten miRNAs identifiziert.

Neben den Elementen der Translationsregulation wurden auch die Transkriptionsfaktoren untersucht. Als einziger unter den 60 regulierten Transkriptionsfaktoren zeigte KLF4 eine veränderte Expressionsrichtung in DCs, die mit Pilzen oder LPS behandelt waren. Während die Stimulation mit LPS die Expression von KLF4 induzierte, wurde es durch die Pilze *A. fumigatus* und *C. albicans* reprimiert. In einer Untersuchung der unterschiedlichen

A. fumigatus-Rezeptoren, wurde deren Einfluss auf die KLF4-Regulation gezeigt. Während TLR4-Liganden KLF4 induzierten, führten Liganden, die an die Rezeptoren TLR2/TLR1 und Dectin-1 binden, zu einer Reduktion von KLF4. Nach einem erfolgreich etablierten *KLF4-knock-down* mittels RNA-Interferenz wurden KLF4-Zielgene untersucht. Während kein bzw. nur ein geringer Effekt auf die Genexpression von CCL2, RANTES, CXCL10 und TNF beobachtet wurde, sorgte der *KLF4 knock-down* für eine hoch signifikante Reduktion der *IL6*-Genexpression in LPS-stimulierten DCs.

Um die KLF4-Regulation weiter zu untersuchen, wurde zudem eine weitere Zellpopulation des angeborenen Immunsystems, die Makrophagen, verwendet. Auch hier wurde die Immunantwort gegen *A. fumigatus* analysiert. Zudem wurde die Rolle der Thrombozyten als Immunmediatoren betrachtet. Zuerst wurde ein Zytokinprofil des plättchenreichen Plasmas (PRP), das mit *A. fumigatus* stimuliert wurde, erstellt. In diesem konnte nur RANTES in hoher Konzentration nachgewiesen werden. Daraufhin wurde der Einfluss von PRP auf die Reifung von DCs, die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und DCs sowie der Einfluss von DCs und Makrophagen auf die metabolische Aktivität von *A. fumigatus* in An- und Abwesenheit von plättchenreichem Plasma untersucht. Es konnte eine gering verstärkte Reifung der DCs durch PRP gezeigt werden. Isolierte Thrombozyten konnten die Phagozytose von DCs steigern, während Makrophagen durch PRP verstärkt Konidien phagozytierten. In einem genomweiten Transkriptomprofiling wurde die Immunantwort von DCs und Makrophagen verglichen. Zudem wurde untersucht, wie PRP die Immunantwort dieser Immunzellen beeinflusst. Es wurden 2 bzw. 24 Gene identifiziert, die signifikant in *A. fumigatus*-stimulierten DCs und Makrophagen reguliert waren. Hierbei wurde gezeigt, dass *KLF4* durch die Zugabe von PRP herabreguliert wurde. Das zuvor beschriebene Zielgen *IL6* wurde durch PRP in *A. fumigatus*-stimulierten DCs gegenüber stimulierten DCs ohne PRP deutlich reduziert, wodurch sich eine immunmodulatorische Fähigkeit des PRP zeigte.

Die Induktion von IL-6, weiteren Zytokinen und der Reifemarker durch *A. fumigatus* in DCs wurden zudem in einem Booleschen Modell simuliert. Dieses Modell soll in Zukunft Vorhersagen über experimentelle Ergebnisse und dadurch eine optimale Versuchsvorbereitung ermöglichen.

1.1. Summary

Fungi are ubiquitously distributed and around 50% of human mucosae are colonized by *Candida albicans*. Spores of *Aspergillus fumigatus*, called conidia, reach the human lung by inhalation of normal air. Still, fungi normally do not cause severe diseases in healthy individuals. Immunosuppression, however, predisposes to systematic and therefore life-threatening infection like invasive aspergillosis and systemic candidiasis. The treatment of those infections can only be improved by a detailed insight in immune defense mechanisms. The most prominent cell type in the lung, the location where *A. fumigatus* conidia can germinate and grow into tissue, are macrophages. Furthermore, the immune response of DCs that bridge innate and adaptive immunity was compared to macrophages. The main focus was on *A. fumigatus* induced changes in gene expression and their regulatory mechanisms.

Especially the regulation of small, regulatory RNAs, called miRNAs, that are important in the post-transcriptional regulation of gene expression, was examined. So far, little is known about miRNA regulations in DCs, confronted with *A. fumigatus* or *C. albicans*. Therefore a complete sequencing of small RNAs was performed to discover all regulated miRNAs. The fungi-induced regulation was compared to DCs, stimulated with the bacterial cell membrane component lipopolysaccharide (LPS). An *A. fumigatus* and *C. albicans* dependent regulation of miR-132-3p/5p, miR-155-5p, miR129-2-3p, miR-129-5p, miR-212-3p/5p and miR-9-5p was observed. In *C. albicans* simulated DCs miR-147a and miR-147b were additionally regulated, whereas miR-129-2-3p was specifically regulated by *A. fumigatus*. Furthermore a genome wide transcriptome profiling was performed and 18 potential miRNA targets were identified.

Beside post-transcriptional regulators of gene expression, an analysis of transcriptional regulators, called transcription factors, was conducted. The transcription factor *KLF4* was identified as the only of all 60 differentially regulated transcription factors that was oppositely regulated comparing fungi and LPS. *KLF4* was induced by LPS, but strongly down-regulated by *A. fumigatus* and *C. albicans* stimulation. Specific Toll-like receptor 4 activation by LPS and ultra-pure LPS induced *KLF4*. However, ligands to TLR2/TLR1 and Dectin-1 significantly reduced *KLF4* mRNA and protein. A *KLF4* knock-down by RNA interference was established to analyze *KLF4* target genes. Little or no effect was observed on the expression of *CCL2*, *RANTES*, *CXCL10* and *TNF*. However, *KLF4* knock down induced a significant reduction of *IL6* gene expression and IL-6 release by LPS treated DCs.

To further examine the *KLF4* regulation another cell type of the innate immune system, called macrophages, was used. The *A. fumigatus*-induced immune response of macrophages was compared to DCs. Furthermore, the role of platelets as immune mediators

was examined. At first, a cytokine profile of untreated and *A. fumigatus* stimulated platelet-rich plasma was performed. RANTES was identified as the only detectable cytokine. Then the influence of PRP on DC maturation, DC and macrophages phagocytosis as well as the metabolic activity of *A. fumigatus* was determined. Only a weak, but still significant, influence of PRP on DCs maturation induced by *A. fumigatus* was observed. In the analysis of phagocytosis of *A. fumigatus* conidia, DCs and macrophages were reacting differently to the addition of PRP and isolated platelets. Isolated platelets were able to enhance the phagocytosis of DCs. On the other hand, PRP and plasma without platelets increased phagocytosis of macrophages. In a genome wide approach the immune response of DCs and macrophages was compared and additionally examined, if PRP alters the DC and macrophage gene expression. PRP induced a significant regulation of 2 and 24 genes of *A. fumigatus* treated DCs and macrophages. Furthermore, an influence of PRP on the *KLF4* expression was monitored. The previously described *KLF4* target gene *IL6* was significantly down-regulated in PRP and *A. fumigatus* stimulated DCs and macrophages, compared to *A. fumigatus* stimulated cells. In conclusion, PRP has only a weak but detectable influence on cell function and gene expression.

Furthermore a Boolean model was established to analyze the influence of *A. fumigatus* stimulation on the cytokine release, especially of IL-6, IL-1B and TNF, and the induction of maturation markers. This model will be used for predictions and optimizations of experimental settings.

2. Einleitung

Pilze gehören zu den häufigsten Mikroorganismen, auf die der Mensch trifft. Sie werden entweder über die Luft eingeatmet oder leben als Kommensalen auf der Haut des Menschen. Obwohl es sich bei den wenigsten Pilzen um Pathogene handelt, können *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* bei Beeinträchtigungen des Immunsystems als pathogene Erreger zu lebensbedrohenden, systematischen Infektionen führen (Wuthrich *et al.* 2012). Durch die Zunahme der Zahl an immunsupprimierten Individuen stiegen auch die Häufigkeiten von Pilz-assoziierten Erkrankungen (Romani 2011).

2.1. *Candida albicans*

Der Hefepilz *Candida albicans* (*C. albicans*) zeichnet sich durch ein polymorphes Wachstum aus (Netea und Marodi 2010). Bei *Candida* Blastokonidien handelt es sich um vegetative Zellen, die Keimschläuche ausbilden können und abhängig von Umweltbedingungen entweder Hyphen oder Pseudohyphen bilden (Netea und Marodi 2010). Bei Pseudohyphen handelt es sich um lange und verzweigte Ketten von Hefezellen mit Einschnürungen im Bereich der Zellwandbildung (Netea und Marodi 2010). Hyphenzellen sind stark verlängert und durch rechtwinklige Septa getrennt (Netea und Marodi 2010). Dieser Wechsel von Wachstumsformen wird als Virulenzfaktor angesehen (Netea und Marodi 2010).

Die wichtigste Strukturkomponente der Zellwand von *Candida* ist β -(1,3)-Glukan, das kovalent an β -(1,6)-Glukan und Chitin gebunden ist. Auf der inneren Seite der Zellwand befinden sich unter anderem glykosilierte Zellwandproteine. In keimenden Hefezellen bleibt nach dem Trennen von Mutterzelle und Keim eine Narbe. Hier werden die Zellwandkomponenten an der Oberfläche der Zelle präsentiert (Netea *et al.* 2008) und können von Oberflächenrezeptoren der Immunzellen erkannt werden (Cheng *et al.* 2012).

50% der Menschen sind auf der Haut oder den Schleimhäuten mit *Candida* kolonisiert, wobei die Kolonisation in den meisten Fällen symptomlos bleibt (Cheng *et al.* 2012). Ist jedoch das Immunsystem gestört, wird aus dem Kommensalen das am häufigsten vorkommenden Pathogen unter den Pilzen (Cheng *et al.* 2012). Beeinträchtigungen des Immunsystems, zum Beispiel durch Chemotherapie, Immunsuppression oder AIDS, stellen eine Prädisposition dar, eine *Candida*-assoziierte Erkrankung zu entwickeln (Netea *et al.* 2008). Auch Operationen, Verbrennungen oder Langzeitaufenthalte auf Intensivstationen mit vorher verabreichten Breitbandantibiotika zählen zu den Risikofaktoren (Spampinato und Leonardi 2013).

Das klinische Spektrum von *Candida* Infektionen reicht von der mukokutanen Kolonisation der Haut und Schleimhäute bis hin zu systemischen Infektionen. Die Inzidenz der Candidose beträgt 1,1 bis 24 Fälle pro 100.000 Individuen und ist mit einer Sterblichkeitsrate von über 30% verbunden (Netea *et al.* 2008).

2.2. *Aspergillus fumigatus*

Die ersten *Aspergillus*-Infektionen wurden im Jahr 1815 in der Lunge einer Bergente und etwa 30 Jahre später bei einem Patienten in Schottland beschrieben (Sales-Campos *et al.* 2013). Bei den über 200 Arten von *Aspergillus* handelt es sich um ubiquitär vorkommende, saprophytische Schimmelpilze (Ben-Ami *et al.* 2010). Der Boden und verwesende Biomasse sind die ökologische Nische für *Aspergillus* (Park und Mehrad 2009), wo er eine wichtige Rolle im Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff spielt (Dagenais und Keller 2009).

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) wächst als vielzellige, verzweigte Hyphen und vermehrt sich asexuell über Konidiophoren (Park und Mehrad 2009). Während bei den meisten *Aspergillus*-Arten keine sexuelle Vermehrungsweise bekannt ist, wurde für *A. fumigatus* 2009 eine sexuelle Reproduktion über Kleistothezienbildung und Ascosporen nachgewiesen (O'Gorman *et al.* 2009, Park und Mehrad 2009). *A. fumigatus* produziert 2,0-3,5 µm kleine, hydrophobe Sporen, die Konidien genannt und die in die Luft freigesetzt werden (Ben-Ami *et al.* 2010). Diese ruhenden und metabolisch inaktiven Konidien beginnen innerhalb kurzer Zeit zu schwellen, sobald sie in warme, feuchte und nährstoffreiche Umgebung gelangen (Ben-Ami *et al.* 2010). Dabei verlieren die Konidien ihre Rodlet-Schicht, eine Schicht aus dem immunologisch inerten Protein RodA (Brakhage *et al.* 2010). Anschließend beginnt die Keimung, bei der erst kurze Keimschläuche gebildet werden, die dann zu Hyphen auswachsen (Park und Mehrad 2009).

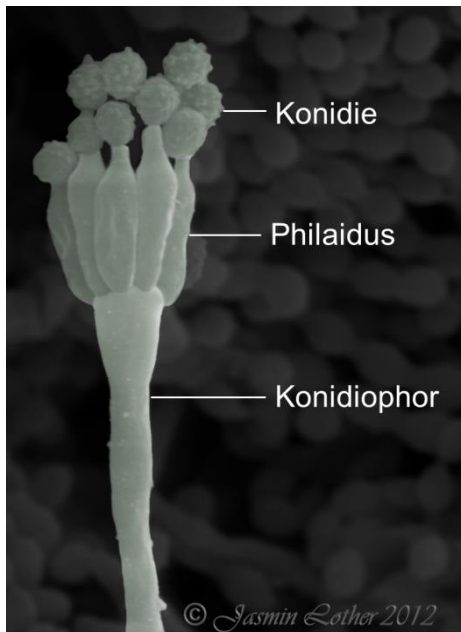


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. fumigatus*. Mit freundlicher Genehmigung von Jasmin Lothar.

2.2.1. Invasive Aspergillose

In der Luft befinden sich zwischen 0,2 bis 15 Konidien/m³, wobei diese Zahl in landwirtschaftlich genutzten Gebieten sogar auf 10⁶ Konidien/m³ ansteigen kann (Park und Mehrad 2009). Daher inhaliert der Mensch täglich hunderte Sporen (Ben-Ami *et al.* 2010). Dennoch treten bei gesunden Individuen meist keine Erkrankungen auf (Park und Mehrad 2009). Ist jedoch das Immunsystem beeinträchtigt, werden verschiedene *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen diagnostiziert (Park und Mehrad 2009). Dabei unterscheidet man drei Kategorien von Erkrankungen. Bei einer Hypersensitivität entstehen bei eingeschränkter Lungenfunktion, zum Beispiel durch zystische Fibrose, allergische bronchopulmonale Aspergillosen. Zudem können Vorerkrankungen der Lunge, wie bei Tuberkulose-Patienten, zur nicht-invasiven Aspergillose führen. Hierbei werden die Schleimhäute zwar kolonisiert, doch das umliegende Gewebe wird nicht infiltriert (Dagenais und Keller 2009). Bei der invasiven Aspergillose von immunsupprimierten Patienten handelt es sich um eine lebensbedrohliche Infektion (Dagenais und Keller 2009). Zu den Hochrisikogruppen gehören Patienten mit hämatologisch malignen Erkrankungen wie Leukämie, sowie nach Organ- und hämatopoetischen Stammzelltransplantationen (Dagenais und Keller 2009). Weiterhin sind Patienten mit ausgedehnter Kortikosteroid-Therapie oder Neutropenie bedroht (Dagenais und Keller 2009). Bei der invasiven Aspergillose infiltrieren Keimschläuche das Gewebe und gelangen in den Blutstrom (Ben-Ami *et al.* 2010). Dabei kommt es zu intravaskulären Thrombosen, hämorrhagischen Infarzierungen und Nekrotisierung des umliegenden Gewebes (Ben-Ami *et al.* 2010). Die Sterblichkeitsrate liegt abhängig von Immunstatus,

Infektionsort und Behandlung bei 40-90% in den Hochrisikopatientengruppen (Dagenais und Keller 2009).

2.3. Die angeborene Immunantwort gegen *A. fumigatus*

Die angeborene Immunantwort liegt den meisten inflammatorischen Antworten zugrunde und besteht aus Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs), Mastzellen, Neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen und natürlichen Killerzellen, wobei auch Endothelzellen, Epithelzellen und Plättchen Eigenschaften von Immunzellen besitzen (Janeway und Medzhitov 2002). Diese Zelltypen werden während einer inflammatorischen Antwort aktiviert und beginnen mit der Bekämpfung des Pathogens (Janeway und Medzhitov 2002). Sie produzieren dazu chemotaktische Faktoren, so genannte Zytokine, um weitere Leukozyten an den Infektionsort zu rekrutieren (Blanco und Garcia 2008). Die Zytokine haben Einfluss auf Angiogenese, Zytokinproduktion und die Antigenpräsentation (Blanco und Garcia 2008). Ist die angeborene Immunantwort nicht in der Lage die Infektion alleine zu bekämpfen, wird eine adaptive Immunantwort induziert (Janeway und Medzhitov 2002). Dabei übernimmt das angeborene Immunsystem die Funktion die adaptive Immunantwort auf das Pathogen zu instruieren (Janeway und Medzhitov 2002). Dafür werden Antigene von antigenpräsentierenden Zellen des adaptiven Immunsystems unter anderem an T-Lymphozyten über Haupthistokompatibilitätskomplex MHC Klasse I und II Moleküle präsentiert (Ni und O'Neill 1997). Während CD8⁺ T-Zellen durch Peptide auf MHC Klasse-I Molekülen proliferieren, erkennen CD4⁺ T-Zellen Peptide, die durch MHC Klasse-II Moleküle präsentiert werden (Ni und O'Neill 1997). Nur DCs sind in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren (Wuthrich *et al.* 2012). Zwar können auch Makrophagen und B-Zellen Antigene präsentieren, eine Aktivierung findet aber nur von bereits geprägten Effektorzellen statt (Théry und Amigorena 2001). Die CD4⁺ T-Zellen differenzieren je nach Zytokinprofil in Th1, Th2 oder Th17-Zellen (Lass-Flörl *et al.* 2013). Eine proinflammatorische und Th1-abhängige Immunantwort wurde als Voraussetzung für die Eliminierung von Pilzinfektionen beschrieben, während die Th2 Antwort mit einer Verminderung der Pilzbekämpfung assoziiert wurde (Romani 2011, Stevens 2006).

2.3.1. Monozyten

Monozyten spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *A. fumigatus*. So konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit *A. fumigatus* eine große Anzahl an Genen der Immunantwort, Apoptose und Initiation der Th1-Antwort induziert werden (Rødland *et al.* 2008). Im Menschen handelt es sich bei peripheren Monozyten um eine heterogene Gruppe,

die unter anderem die Vorläuferzellen von Makrophagen und DCs enthält (Park und Mehrad 2009). Aus diesen Vorläuferzellen wurden in der hier vorliegenden Arbeit *in vitro* Monozyten-abgeleitete DCs und Makrophagen generiert.

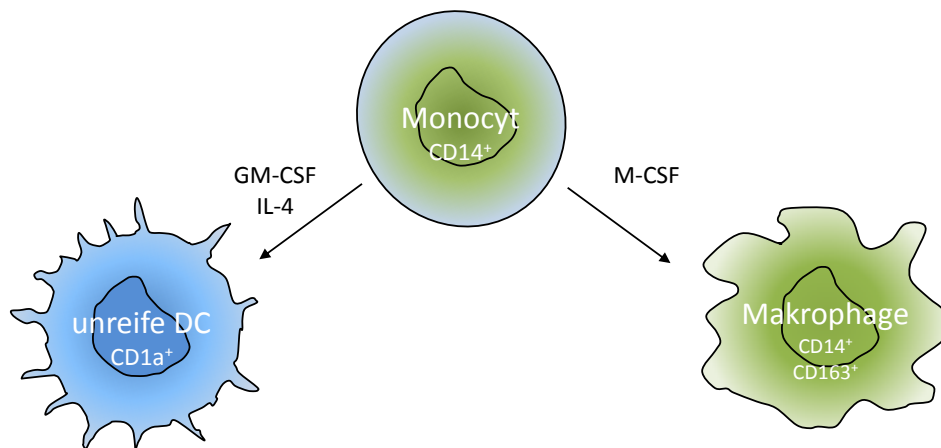


Abbildung 2: Schematische Darstellung der DC- und Makrophagengenerierung aus Monozyten. Geändert nach Hackstein und Thomson (2004) und Imhof und Aurrand-Lions (2004).

2.3.2. Makrophagen

Alveolarmakrophagen sind die häufigsten Phagozyten in der Lunge und die ersten Immunzellen in der Abwehr von *A. fumigatus* Infektionen (Brakhage *et al.* 2010). Je nach Zytokin-Stimulus entwickeln sich unterschiedliche Subtypen von Makrophagen mit einer entweder mehr pro- oder mehr antiinflammatorischen Prägung. Bei Alveolarmakrophagen wurde eine eher antiinflammatorische Subtypengenerierung durch *A. fumigatus* nachgewiesen (Bhatia *et al.* 2011). Eine geringe Anzahl an *A. fumigatus* Sporen kann von den in der Lunge vorhandenen Makrophagen ohne die Rekrutierung weiterer Leukozyten beseitigt werden. (Park und Mehrad 2009). Nach der Aufnahme der Konidien in die Zelle werden die sie in Phagolysosomen zersetzt. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig bekannt, jedoch spielen sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch nicht-oxidative Mechanismen eine Rolle (Brakhage *et al.* 2010, Park und Mehrad 2009). Dabei wird keine proinflammatorische Antwort induziert (Gersuk *et al.* 2006). Werden die Konidien nicht eliminiert, beginnen diese in der Lunge zu schwellen und nach 12-15 h auszukeimen (Lass-Florl *et al.* 2013). Dabei verlieren die Konidien ihre Rodlet-Schicht, eine Schicht aus dem immunologisch inerten Protein RodA, wodurch eine proinflammatorische Antwort ausgelöst und die Infiltration von Neutrophilen und weiteren Antigen-präsentierenden Zellen ins Gewebe induziert wird (Brakhage *et al.* 2010, Gersuk *et al.* 2006, Sales-Campos *et al.* 2013).

2.3.3. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (kurz Neutrophile) sind sowohl in der Lage Hyphen als auch Konidien von *A. fumigatus* zu zerstören (Blanco und Garcia 2008). Neutrophile werden durch Chemokine und die Aktivierung des Komplementsystems dazu veranlasst zum Ort der Infektion zu migrieren. Dort erkennen sie Konidien, die nicht mehr von einem Rodlet-Layer umgeben sind und phagozytieren diese (Brakhage *et al.* 2010). Hyphen können nicht zwar mehr phagozytiert, aber durch die Ausbildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) und der Sekretion von radikalen Sauerstoffspezies angegriffen werden (Blanco und Garcia 2008, Brakhage *et al.* 2010). Etwa 50% der Hyphen werden so innerhalb von 2 Stunden zerstört (Blanco und Garcia 2008).

2.3.4. Dendritische Zellen

Die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenerkennung und fungieren als Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem (Morton *et al.* 2011, Wuthrich *et al.* 2012). Nur DCs sind in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren, sodass ein lebenslanges Gedächtnis des Pathogens bestehen bleibt (Wuthrich *et al.* 2012). DCs können sowohl Konidien als auch Hyphen mit zwei unterschiedlichen Mechanismen phagozytieren (Blanco und Garcia 2008). DCs nehmen beide Pilzmorphologien und migrieren zu den Lymphknoten (Blanco und Garcia 2008). Dabei werden die DCs aktiviert, wodurch die Reifung induziert und die Fähigkeit zur Phagozytose reduziert wird (Platt *et al.* 2010, Wuthrich *et al.* 2012). Die Reifung der DCs ist gekennzeichnet durch die Induktion von *cluster of differentiation* (CD)-Markern CD40, CD80, CD83 und CD86 auf der Zelloberfläche (Ok *et al.* 2009). Diese kostimulatorischen Signale sind nötig für die Induktion des adaptiven Immunsystems in den Lymphknoten. Die Morphologie des aufgenommenen *A. fumigatus* scheint dabei auch die durch DCs induzierte Immunantwort zu beeinflussen. Während durch Konidien eher eine Th1 Antwort induziert wird, wurde die Phagozytose von Hyphen mit IL-4 produzierenden CD4⁺ Th2-Zellen assoziiert (Brakhage *et al.* 2010, Park und Mehrad 2009).

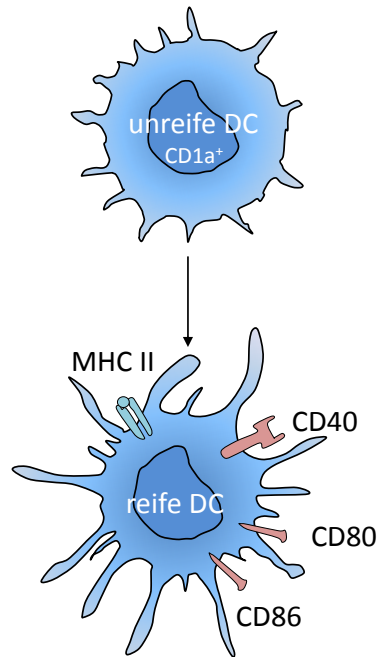


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reifung von DCs. Aus den eher sternförmigen, nicht-adhären Zellen werden bei der Reifung Zellen mit langen Ausläufern, auch Dendriten genannt. Zudem exprimieren sie kostimulatorische Moleküle und Markermoleküle für die Reifung auf ihrer Oberfläche. Geänderte Abbildung nach Hackstein und Thomson (2004).

2.3.5. Pattern Recognition Rezeptoren

So genannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) werden von *pattern recognition* Rezeptoren (PRRs) der Immunzellen erkannt (Blanco und Garcia 2008). Die Aktivierung der PRR auf der Oberfläche von Leukozyten induziert Signalwege, die an der Aktivierung des Immunsystems und damit der Bekämpfung von Pathogenen beteiligt sind (Romani 2011). Die PRR werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) TLR2 und TLR4 und das C-Typ Lectin Dectin-1 (CLEC7A) sind die wichtigsten Rezeptoren in der Erkennung von *A. fumigatus* und *C. albicans* (Ferwerda *et al.* 2008).

2.3.5.1. Toll-like Rezeptoren

Die zehn bislang beschriebenen TLRs sind entweder auf der Zelloberfläche oder intrazellulär in Immunzellen wie DCs und Makrophagen, aber auch auf Fibroblasten und Epithelzellen vorhanden (Kawasaki und Kawai 2014). Intrazelluläre TLRs haben Nukleinsäuren als Liganden, wie TLR3, das doppelsträngige RNA von *A. fumigatus* Konidien in Lungenepithelzellen erkennt (Bourgeois und Kuchler 2012, Kawasaki und Kawai 2014). TLR7 wird durch Einzelstrang-RNA von *Candida* aktiviert und die nicht-methylierten CpG-Motive der genomische DNA verschiedener Pilze werden durch TLR9 erkannt (Bourgeois

und Kuchler 2012). Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 10 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und die TLRs 2 und 4 werden durch für *A. fumigatus* aktiviert (Ferwerda *et al.* 2008, Kawasaki und Kawai 2014).

Ruhende Konidien sind von einer Rodlet-Schicht umgeben, die die Aktivierung der TLRs verhindert (Aimanianda *et al.* 2009). Beim Schwellen und Auskeimen geht diese Schicht verloren und *A. fumigatus* wird über diese PRR erkannt (Sales-Campos *et al.* 2013). TLR4 erkennt neben dem Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien, Hitzeschockproteine aber auch O-verknüpfte Mannane von *C. albicans*. Geschwollene Konidien aktivieren Immunzellen durch TLR2 und TLR4 und induzieren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1a/b, IL-6, MIP-1/2 (Brakhage *et al.* 2010). TNF α wird zuerst von Gewebemakrophagen und anschließend von rekrutierten Leukozyten produziert und ist assoziiert mit der Chemokinproduktion von MIP-1a und MIP-2, wodurch Neutrophile und Monozyten zu infiziertem Gewebe rekrutiert werden (Lass-Florl *et al.* 2013).

Gewisse Pilze haben Strategien entwickelt, die PRR-Erkennung zu nutzen, um den Abwehrmechanismen durch die Induktion einer antiinflammatorischen Immunantwort zu entgehen (Blanco und Garcia 2008). Die durch *C. albicans* induzierte TLR2-Antwort ist charakterisiert durch eine IL-10 Freisetzung und einer Generierung von regulatorischen T-Zellen, die sich durch immunsuppressive Eigenschaften auszeichnen (Blanco und Garcia 2008). Durch die Hyphenbildung von *A. fumigatus* geht die TLR4-PRR-Aktivierung verloren. Die TLR4-vermittelten, proinflammatorischen Signale gehen bei der Keimung zu Hyphen verloren, die TLR2 vermittelten antiinflammatorischen jedoch nicht (Blanco und Garcia 2008, Lass-Florl *et al.* 2013, Netea *et al.* 2003). Dies führt zu einer Freisetzung von IL-10 (Lass-Florl *et al.* 2013), wodurch sich die Th1/Th2 Balance in Richtung IL-10 vermittelte Th2 Antwort verändert (Blanco und Garcia 2008, Brakhage *et al.* 2010).

2.3.5.2. C-Typ Lektin Rezeptoren

Zu der Gruppe der CLRs gehören Dectin-1 (CLEC7A), Dectin-2 (CLEC6A), Mincle (CLEC4E), *DC-specific ICAM3-grabbing non integrin* (DC-SIGN), der Mannoserezeptor Langerin und das *Mannose-binding* Lektin (Romani 2011). Dectin-1 ist der Hauptrezeptor für die Erkennung von β -Glukanen und damit ein wichtiger Rezeptor bei der Erkennung von Pilzen (Romani 2011). So wurde bei Dectin-1 *knock-out* Mäusen beschrieben, dass diese anfälliger für Pilzinfektionen waren und zudem eine veränderte Produktion von IL-1b, TNF α , CCL3, CCL4 und CXCL1 aufwiesen. Dies führte zu einer gestörten Rekrutierung von Neutrophilen und zu einer verminderten proinflammatorischen Antwort von Makrophagen (Sales-Campos *et al.* 2013).

Bei der Aktivierung von Dectin-1 werden die zwei Signalwege SYK-CARD9 und RAF in der Zelle induziert (Romani 2011). Diese Signalwege wirken zusammen, um über die NF- κ B-Signalwegaktivierung die Bildung von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen zu bewirken (Romani 2011). SYK-CARD9 induziert zudem die Bildung von den proinflammatorischen Interleukinen IL-1 β und IL-18. Die Dectin-1 induzierte Phagozytose ist abhängig von β -1,3-Glukan, das hauptsächlich auf geschwollenen und keimenden Konidien zu finden ist (Brakhage *et al.* 2010).

2.4. Rolle der Thrombozyten in der Immunantwort gegen *A. fumigatus*

Thrombozyten sind Mediatoren der Hämostase und an der Blutgerinnung beteiligt. Neue Studien belegen jedoch zudem eine Rolle von Thrombozyten als Immunmediatoren bei der Bekämpfung von Bakterien, Viren und Pilzen (Speth *et al.* 2013d, Yeaman 2010). Neben dem direkten Angriff des Pathogens stimulieren sie auch das angeborene und das adaptive Immunsystem (Ferdous und Scott 2015).

Die 2 μ m kleinen, kernlosen Thrombozyten, auch (Blut-)Plättchen genannt, wurden 1862 von Giulio Bizzozero entdeckt (Semple *et al.* 2011). Ihre primäre Aufgabe ist das Erkennen und Verschließen von Verletzungen im Gefäßendothel (Semple *et al.* 2011). Dies wird durch die Bindung der Plättchen an Kollagen oder andere extrazelluläre Matrixmoleküle initiiert (Semple *et al.* 2011). Der Mensch besitzt $150-400 \cdot 10^9$ Plättchen pro Liter Blut, mit einer Lebensdauer von 8-10 Tagen (Speth *et al.* 2013a). Sie werden von sich im Knochenmark befindlichen Megakaryozyten gebildet (Semple *et al.* 2011). Diese bilden über lange Ausläufer so genannte Proplatelets, die durch das Endothel in den Blutstrom gelangen und nach der Freisetzung in einzelne Plättchen zerfallen (Semple *et al.* 2011). Die scheibenförmigen Plättchen besitzen eine glatte Oberfläche mit regelmäßigen Einschnürungen der Membran, die das Zytoplasma durchziehen und die Zelloberfläche vergrößern (Semple *et al.* 2011). Dadurch können Proteine schnell aufgenommen und wieder freigesetzt werden (Semple *et al.* 2011). Die Speicherung dieser Proteine erfolgt in drei unterschiedlichen Sorten von Granula (Nurden 2011). Die dichten Granula enthalten Moleküle, die an der Plättchenaktivierung und -aggregation beteiligt sind, beispielsweise Phosphate, Kationen, Nukleotide und Amine wie Serotonin (Nurden 2011). In den Lysosomen sind vor allem Enzyme zur Matrix- und Proteindegradation wie Phosphatasen, Protease und Glykosidasen gespeichert (Nurden 2011). Sie enthalten über 300 lösliche und membrangebundene Proteine, darunter Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Proteine, die an der Gerinnungsreaktion beteiligt sind (Blair und Flaumenhaft 2009, Nurden

2011). Zudem wurden proinflammatorische Chemokine, Zytokine und Interleukine nachgewiesen, die bei der Aktivierung der Plättchen durch Fusion der Granula mit der Membran freigesetzt werden (Nurden 2011). Bei einer Aktivierung werden aus den scheibenförmigen Plättchen durch den Einstrom von Kalzium und dem Einfluss des Aktinzytoskeletts stachelige Kugeln mit fingerartigen Filopodien und Pseudopodien, die Rezeptoren zur Adhäsion und Gerinnung auf der Oberfläche exprimieren (Semple *et al.* 2011). Zudem werden Moleküle ausgeschüttet, die zum einen selbst mikrobizid wirken, zum anderen aber auch chemotaktische Wirkung auf Leukozyten besitzen. Hierzu gehören unter anderem CXCL4, RANTES und die Thrombozidine-1 und -2 (Blair und Flaumenhaft 2009). Ebenfalls befinden sich Komplement- und Komplementbindeproteine in den Granula, die die Komplementaktivierung und die Inflammation am Ort der Infektion beeinflussen (Blair und Flaumenhaft 2009). Plättchen exprimieren die TLRs 1-9 auf ihrer Zelloberfläche, was ihre Rolle in der direkten Pathogenerkennung untermauert (Ferdous und Scott 2015, von Hundelshausen und Weber 2007). Zudem ist CD40L nach Aktivierung verstärkt auf der Oberfläche vorhanden, wodurch Plättchen mit DCs interagieren können (Semple *et al.* 2011, von Hundelshausen und Weber 2007). Aktivierte Plättchen fördern die Aktivierung von Monozyten und DCs durch eine CD40-CD40L Interaktion, wodurch eine verstärkte Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen induziert wird (Semple *et al.* 2011).

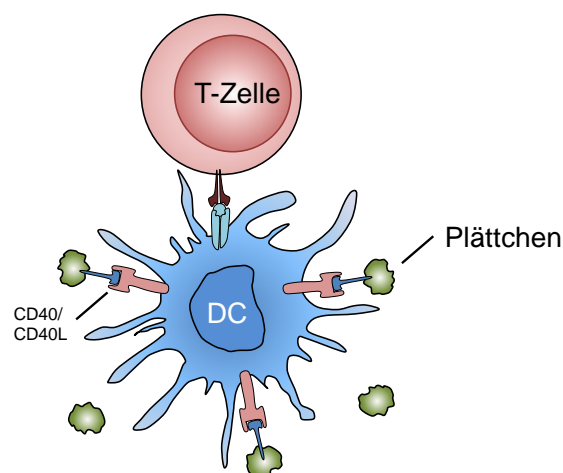


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion von DCs (blau) mit Plättchen (grün) und T-Zellen (rot). Abbildung nach Semple *et al.* (2011).

Zudem wurden direkte Effekte von Plättchen auf *A. fumigatus* beschrieben. So können Plättchen direkt an die Zellwand von *A. fumigatus* Hyphen binden und werden durch Galactosaminogalactan, einer Zellwandkomponente von *A. fumigatus*, aktiviert (Christin *et al.* 1998, Rambach *et al.* 2015, Rodland *et al.* 2010). Dies wurde ebenfalls *in vivo* mit

A. fumigatus-infizierten Mäusen nachgewiesen, deren Thrombozyten ein höheres Aktivierungslevel gegenüber Kontrollmäusen aufwiesen (Speth *et al.* 2013a). Zudem beeinflussen Plättchen sowohl das Hyphenwachstum, die Viabilität des Pilzes als auch die Genexpression von *A. fumigatus* (Perkhofer *et al.* 2015). Aber auch Plättchenüberstände, die eine nicht weiter identifizierte Serinprotease und das Mykotoxin Gliotoxin enthalten, sind hierzu in der Lage. Somit scheinen auch lösliche, bislang nicht bekannte Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen (Speth *et al.* 2013a).

Auch wurden additive Effekte von Kombinationen aus Plättchen und Antimykotika auf das Pilzwachstum nachgewiesen (Perkhofer *et al.* 2013, Perkhofer *et al.* 2011). Daher ist es nicht überraschend, dass ein Zusammenhang zwischen der Plättchenzahl eines Patienten mit Invasiver Aspergillose und seiner Überlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen wurde (Nouér *et al.* 2012). Dies zeigt die wichtige Rolle der Plättchen nicht nur in der Koagulation sondern auch als Immunmediatoren.

2.5. miRNAs

miRNAs (microRNAs) sind 19-22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNAs, welche wichtige endogene Regulatoren der Geneexpression darstellen (Raisch *et al.* 2013). Die erste miRNA (auch microRNA) wurde 1992 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Berezikov 2011). Dort wurde erstmals nachgewiesen, dass die miRNA lin-4 die Gentranslation, aber nicht die Transkription von lin-14 reduzierte (Moreno-Moya *et al.* 2014). Erst 7 Jahre später wurde die zweite miRNA, let-7, in Würmern, Fliegen aber auch im Menschen nachgewiesen (Berezikov 2011, Moreno-Moya *et al.* 2014). Die Zahl der beschriebenen miRNAs nahm seitdem stetig zu, so dass bislang 35828 miRNAs in 223 Spezies beschrieben wurden, darunter auch 1881 Vorläufer und 2588 reife, humane miRNAs (Stand 4/2015. Quelle: www.mirbase.org (Kozomara und Griffiths-Jones 2014)). Beinahe die Hälfte der bekannten miRNAs befinden sich in Introns mit gleicher Orientierung wie das eigentliche Gen, meist zudem noch mit eigenem Promotor (Berezikov 2011). MiRNAs werden von den RNA Polymerasen II und/oder III als 100-1000 Nukleotide lange **primary** oder pri-miRNAs transkribiert (Moreno-Moya *et al.* 2014). Diese zeichnen sich durch eine 5' Cap Struktur und einen poly-A Schwanz am 3'-Ende aus. Diese Vorläuferform wird durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der RNase Drosha und dem RNA-bindenden Protein *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DCRG8) prozessiert (Wilson und Doudna 2013). Die so entstandene 60-70 Nukleotiden lange **prä**-miRNA zeichnet sich durch ein 5'-Phosphat und einen zwei Nukleotid-langen Überhang am 3'-Ende aus (Moreno-Moya *et al.* 2014). Diese prä-miRNA wird durch Exportin-5 und RanGTP in das Zytoplasma exportiert (Raisch *et al.* 2013). Die Ribonuklease Dicer bildet aus der prä-miRNA Doppelstränge, die durch eine Helikase entwunden werden,

sodass reife miRNAs im Zytosol vorliegen (Moreno-Moya *et al.* 2014). Der gegenläufige Strang wird meist degradiert (Raisch *et al.* 2013). Die reife miRNA wird in den *Argonaute* (Ago) des so genannten *RNA-induced silencing complex*, kurz RISC, aufgenommen und bindet an die komplementäre 3'UTR der Ziel-mRNA (Moreno-Moya *et al.* 2014). Dies führt entweder zur Inhibition der Translation oder sogar der Degradation der mRNA (Moreno-Moya *et al.* 2014). Für die Erkennung der Ziel-mRNA ist die so genannte *Seed Region*, eine 7-8 Basen lange Region nach der ersten oder zweiten Base am 5'-Ende der miRNA verantwortlich, die komplementär zur Ziel-mRNA ist, während die Basenpaarung am 3'-Ende weniger wichtig für die Ziel-mRNA Erkennung ist (Moreno-Moya *et al.* 2014). Durch diese kurze Erkennungssequenz können viele verschiedene mRNAs durch eine einzige miRNA reguliert werden (Moreno-Moya *et al.* 2014).

Die über 2000 bekannten humanen miRNAs sind an der Regulation von etwa 30% unserer Gene beteiligt (Pritchard *et al.* 2012, Wilson und Doudna 2013). Dennoch machen sie nur etwa 0,01% der Komplet-RNA-Menge aus (Pritchard *et al.* 2012). Sie sind sowohl beteiligt an der Gewebedifferenzierung, als auch an Zellwachstum und -proliferation (Wilson und Doudna 2013). Fehler in der miRNA-Regulation werden mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs und neurologische Störungen, sowie kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht (Wilson und Doudna 2013). Auch in der Immunantwort spielen miRNAs eine wichtige Rolle. So wurde nicht nur eine TLR-abhängige Regulation von miR-155, miR-146a, miR-132 miR-21, miR-9 und miR-147 in humanen Makrophagen nachgewiesen (Raisch *et al.* 2013), sondern auch eine miRNA-abhängige Regulation von Komponenten des TLR4-NF- κ B-Signalweges beschrieben (Essandoh und Fan 2014). miRNAs bewirken meist eine Herabregulierung von inflammatorischen Signalwegen, wodurch unter anderem weniger TNF- α und IL-6 produziert werden (Raisch *et al.* 2013). Auch wurden bereits einige *A. fumigatus* und *C. albicans* abhängige miRNA Regulationen in Leukozyten beschrieben (Das Gupta *et al.* 2014, Monk *et al.* 2010).

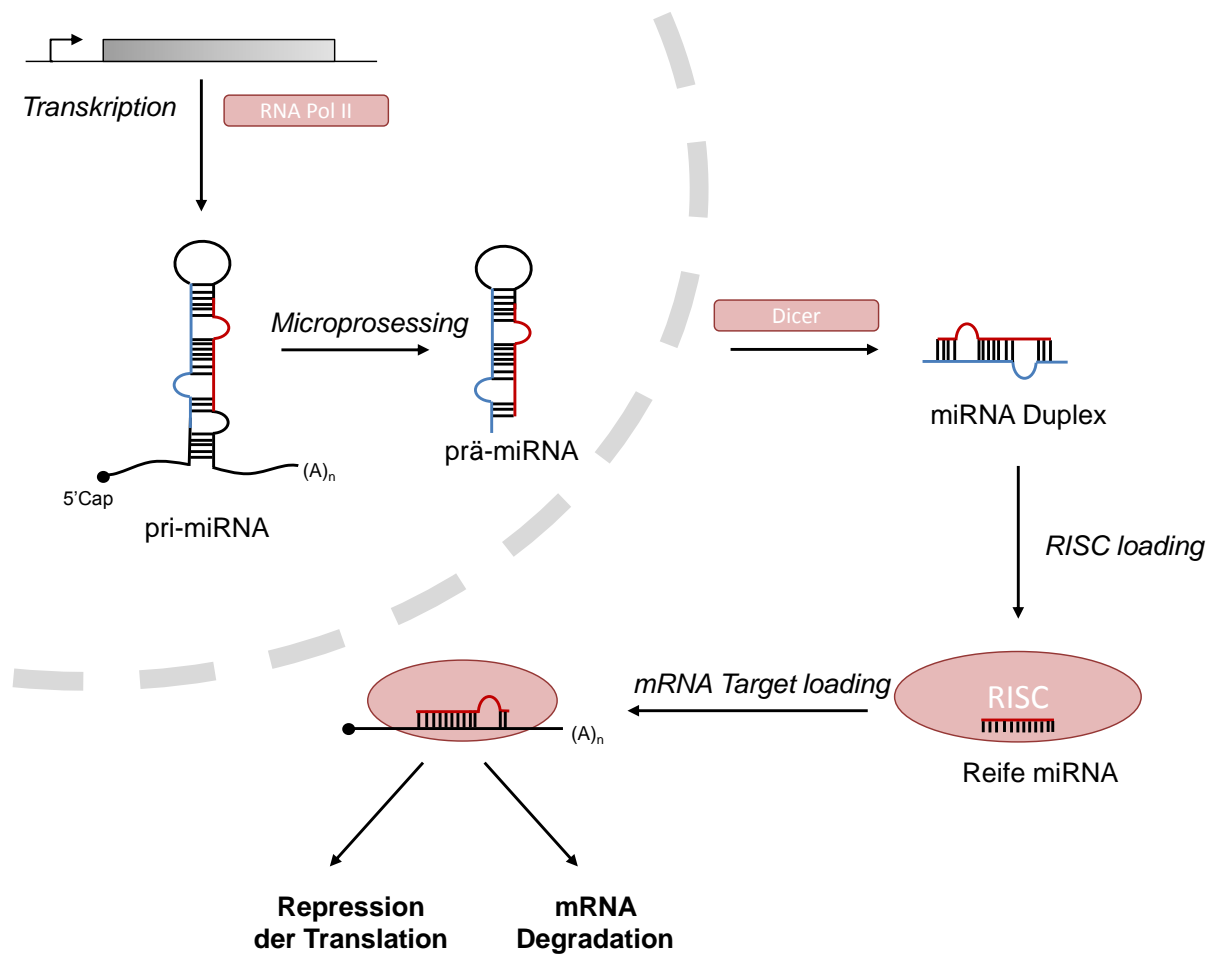


Abbildung 5: Schematische Darstellung der miRNA-Synthese, abgewandelt nach Wienholds und Plasterk (2005).

2.6. Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind ein wichtiges Schlüsselement bei der Regulation der Genexpression. Sie induzieren oder reprimieren die Transkription eines Gens über die Bindung an regulatorische Sequenzen der DNA (Villard 2004). Einige Transkriptionsfaktoren, wie die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren sowie einige Mitglieder der *interferone regulatory factor* (IRF) Familie, werden durch die Aktivierung der TLR-Signalwege induziert (Murphy *et al.* 2012). Zudem sind Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) Kaskade beteiligt. NF- κ B ist an der pro-inflammatorischen Zytokinantwort beteiligt, während die Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie an der Induktion von Typ-I-Interferonen beteiligt sind (Murphy *et al.* 2012). Zudem wurde gezeigt, dass NF- κ B und RelB essentiell für die Reifung von DCs sind (Fang *et al.* 2010). Da Transkriptionsfaktoren einen wichtigen Einfluss auf die proinflammatorische Antwort ausüben, wurden diese auf ihre

Regulation durch *A. fumigatus* und *C. albicans* untersucht, um Unterschiede zu der LPS-induzierten Genexpression zu identifizieren.

2.7. Modellierung eines Aktivierungsnetzwerkes von DCs

Zelltranskription und Protein-Protein-Wechselwirkungen stellen ein kompliziertes Netzwerk aus Interaktionen dar. Die Systembiologie versucht daher, durch das Verständnis der dynamischen Interaktionen in einem biologischen System, Vorhersagen über das Verhalten der einzelnen Komponenten zu treffen. Mit Hilfe von experimentellen Daten und mathematischen Konzepten ist es möglich, computerbasierte Modelle zu entwickeln, die gezielte Vorhersagen über die Zustände der einzelnen Elemente ermöglichen. Hierfür wurde ein Boolesches Modell gewählt, welches bereits ausführlich für andere Zielsetzungen beschrieben ist. So wurden bereits vereinfachte Modelle der Plättchenaktivierung oder der Signalwege zur Initiation der Apoptose veröffentlicht (Mischnik *et al.* 2013, Schlatter *et al.* 2012). In enger Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg, sollte ein vereinfachtes DC-Modell entwickelt werden, mit dem die Reifung, Zytokinfreisetzung und Apoptose nach Induktion von *A. fumigatus* Keimschläuchen simuliert werden kann.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, ein „virtuelles Infektionsmodell“ aus Immunzellen und dem Pathogen *A. fumigatus* zu erstellen, das es ermöglicht, die Konsequenzen von Veränderungen auf Zell- und Proteinebene vorherzusagen.

2.8. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welche miRNAs in DCs durch *A. fumigatus* und *C. albicans* im Vergleich zum bakteriellen LPS reguliert werden. Bei miRNAs handelt es sich um kurze, regulatorische RNAs, die in der post-transkriptionalen Regulation eine wichtige Rolle spielen. Nachdem von unserer Arbeitsgruppe in einer Pilotstudie bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression der miRNAs miR-132 und miR-155 durch *A. fumigatus* induziert werden, wurde dieser Ansatz auf ein komplettes *Profiling* mittels RNA *Deep Sequencing* erweitert und die Regulation mit dem Hefepilz *C. albicans* verglichen. Über eine mRNA-Transkriptomanalyse sollten regulierte miRNA-Zielgene und weitere Gene identifiziert werden, die eine Immunantwort auf Pilze kennzeichnen, wobei auch ein besonderes Augenmerk auf die Regulation der Genexpression über Transkriptionsfaktoren gelegt werden sollte. Dadurch sollten weitere Signal- und Aktivierungswege in DCs durch die Pilze identifiziert werden. Anschließend sollten die in den DC-Experimenten identifizierten Markermoleküle in einer weiteren Immunzellpopulation, den Makrophagen, untersucht werden. Hierbei sollte auch die Frage beantwortet werden, wie sich DCs und Makrophagen in ihrer Antwort auf *A. fumigatus* unterscheiden. Als weiterer Faktor sollte zudem der Einfluss von Thrombozyten auf die Immunantwort von Zellen des angeborenen Immunsystems und deren weiteren funktionalen Eigenschaften untersucht werden. Hierfür sollte die Immunantwort der DCs auf *A. fumigatus* mittels einer Transkriptom-Untersuchung mit der von Makrophagen verglichen werden und analysiert werden, ob PRP einen Einfluss auf die Genexpression von DCs und Makrophagen in ihrer Antwort auf *A. fumigatus* ausübt. Hierbei sollten sowohl spezifisch durch PRP-regulierte Gene sowie der Einfluss auf *A. fumigatus*-induzierte Gene untersucht werden. Weiterhin sollten zum einen die Reifung der DCs und zum anderen die Phagozytose und der Einfluss auf die metabolische Aktivität des Pilzes von DCs und Makrophagen in Kombination mit PRP untersucht werden. Als weiteres, wichtiges Kriterium sollte die Zytokinantwort der DCs und Makrophagen, die mit *A. fumigatus* konfrontiert wurden, verglichen und ein Einfluss von PRP analysiert werden. Diese Genexpressionsdaten sollen ebenso dafür verwendet werden, ein theoretisches Modell der DC-*A. fumigatus*-Interaktion zu validieren.

3. Methoden

3.1. Verwendete Medien

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturmedien mit Zusätzen und Anwendung.

Zelltyp	Medium	Zusätze	Zytokine
DCs	RPMI 1640 mit	10% FBS	100 ng/ml GM-CSF
	GlutaMAX	120 mg/ml Refobacin	10 ng/ml IL-4
Makrophagen	RPMI 1640 mit	10% FBS	500 iU/ml M-CSF
	GlutaMAX	120 mg/ml Refobacin	
Granulozyten	RPMI 1640 mit	5% FBS	-
	GlutaMAX	120 mg/ml Refobacin	

3.2. Verwendete Puffer

Tabelle 2: Hergestellte Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen		
Plättchen-Puffer	ACD Puffer	6,25 g Natrium-Citrat 3,1 g Zitronensäure-Monohydrat 3,4 g D-Glucose Ad 250 ml <i>Aqua dest.</i>
	Tyrode's Puffer	2,73 M NaCl 53,6 mM KCl 238 mM NaHCO ₃ 8,6 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 M HEPES
Western Blot	Lysepuffer	6,65 M Harnstoff 10% Glycerin 1% SDS 10 mM Tris pH 6,8
	Sammgelpuffer	6 g Tris 4 ml 10% SDS-Lösung 50 ml <i>Aqua dest.</i> pH 6,8 Ad 100 ml <i>Aqua dest.</i>

	Trenngelpuffer	36,3 g Tris 8 ml 10% SDS-Lösung pH 8,8 Ad 200 ml <i>Aqua dest.</i>
	10fach TBS	12,18 g Tris 100 mM 87,66 g NaCl 4.4 mM pH 7,5 Ad 1 l <i>Aqua dest.</i>
	TBS	100 ml 10fach TBS 900ml <i>Aqua dest.</i>
	0,1% TTBS	1 l TBS + 1 ml Tween-20
	Blocking-Lösung	5% Milchpulver in TBST
	Ponceau-S-Lösung	5% Ponceau S in Essigsäure
	Elektrophoresepuffer	100 ml 10fach Laemmli Puffer 900 ml <i>Aqua dest.</i>
	Transferpuffer	30,3 g Tris 144,1 g Glyzin pH 8,3 Add 1 l <i>Aqua dest.</i>
ELISA IL-6	10fach PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
	PBS	100 ml 10 x PBS 900 ml <i>Aqua dest.</i>
	Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween-20 pH 7,4
	Blockinlösung	PBS + 1% BSA 5% Succrose 0,05% Natriumazid
	Standardpuffer	PBS + 0,1% BSA
	Zweitantikörperpuffer	20 mM Trizma-base 150 mM NaCl 0,1% BSA

		In <i>Aqua dest.</i>
	Streptavidinpuffer	PBS + 1% BSA
	Stopplösung	1 M Schwefelsäure

3.3. Generierung von *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen

A. fumigatus ATCC 44645 Konidien wurden für vier Tage bei 37°C auf Bierwurzplatten bzw. Minimalmediumplatten angezogen und anschließend mit sterilem Wasser geerntet. Um reine Konidienkulturen zu generieren, wurde die Pilzsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm gefiltert. In diesem blieben größere Pilzstrukturen wie Keimschläuche und Agarosereste zurück. Die Lagerung der Konidien suspension erfolgte bei 4°C. Um Keimschläuche zu generieren, wurde die gewünschte Konidienzahl in RPMI-Medium mit Refobacin bei Raumtemperatur über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen erfolgte eine Inkubation bei 37°C bei 200 rpm bis die gewünschte Keimschlauchlänge erreicht wurde. Diese wurde lichtmikroskopisch bestimmt.

Die Keimschläuche lagerten anschließend entweder bei -20°C, oder wurden inaktiviert. Hierfür erfolgte eine Inkubation der Keimschläuche für 45 min bei RT in 100% EtOH. Nach viermaligem Waschen mit *Aqua dest.* und anschließendem Waschschrift mit HBSS wurden auch die inaktivierten Keimschläuche bei -20°C gelagert.

3.4. Generierung von *C. albicans* Keimschläuchen

C. albicans wurde in enger Zusammenarbeit vom HKI, Fungal Septomics, Jena, generiert. Der *C. albicans* Wildtyp SC5314 wurde auf YPD-Agar (2% D-glucose, 1% Pepton, 5% Hefeextrakt, Roth) angezogen. Die Kolonien wurden in M199-Medium, pH 4, (PAA) transferiert und bei 30°C bis zur stationären Phase kultiviert. Keimschläuche wurden durch die Kultur in M199-Medium mit pH 8 für eine Stunde bei 37°C generiert. Diese wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit PBS mit 0,1% Thimerosal (Sigma Aldrich) über eine Stunde bei 37°C unter Schütteln abgetötet. Anschließend wurden die Keimschläuche fünfmal gewaschen und in RPMI-1640 resuspendiert. Das Abtöten wurde mittels Ausplattieren auf YPD-Agar bestätigt.

3.5. Primärzellen und Zelllinien

3.5.1. Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Um periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zu isolieren, wurden Leukozytenkonzentrate gesunder Freiwilliger (Transfusionsmedizin Uniklinikum Würzburg) verwendet. Diese Konzentrate wurden mit HBSS, dem 1% FCS und 2 mM EDTA (= HBSS mit Zusätzen) zugesetzt wurde, auf 50 ml aufgefüllt und invertiert. Die Suspension wurde zur Dichtegradientenzentrifugation über das Kohlenhydrat-Polymer FICOLL ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) gefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei $800 \times g$ bei Raumtemperatur ohne Bremse. Hierbei wurde eine Separation der mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von anderen Zellpopulationen erzielt.

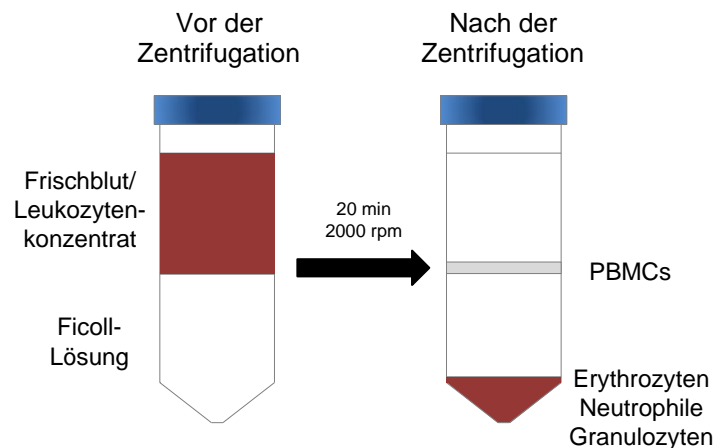


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation von Frischblut/Leukozytenkonzentrat über Ficoll-Lösung.

Die Phase der mononukleären Zellen wurde abgenommen und zwei Mal mit HBSS + Zusätzen auf 50 ml aufgefüllt und bei $300 \times g$ für 15 min ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen erneut in HBSS mit Zusätzen resuspendiert.

3.5.2. Isolation von CD14⁺- Monozyten

Isolierte PBMCs wurden für 10 min bei $300 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in HBSS mit Zusätzen gelöst und $60 \mu\text{l}$ CD14-Antikörper (Miltenyi Biotec) und $340 \mu\text{l}$ HBSS mit Zusätzen je $1 \cdot 10^8$ PBMCs zugegeben. Diese Antikörper waren an paramagnetische MicroBeads gekoppelt. Nach einer Inkubation für 15 min bei 4°C wurde die Zell-Antikörper-Suspension in HBSS mit Zusätzen verdünnt und

erneut für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml HBSS mit Zusätzen gelöst. LS-Säulen wurden an einem Magneten (Miltenyi) befestigt und mit HBSS mit Zusätzen äquilibriert. Nach der Äquilibrierung wurde die Zellsuspension auf die Säule transferiert und dreimal mit HBSS + Zusätze gewaschen. Anschließend wurden die Säulen aus dem Magneten entfernt und die in der Säule verbliebenen Zellen mit Hilfe von HBSS mit Zusätzen isoliert.

3.5.2.1. *In vitro*-Generierung von dendritischen Zellen

Für die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen wurden die Monozyten in 6-Well-Platten mit einer Dichte von $0,83 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI-Medium mit Refobacin (120 mg/l) und 10% FCS ausgesät. Für die Differenzierung zu dendritischen Zellen wurden 100 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml Interleukin 4 (IL-4) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂. Alle zwei Tage wurde ein Drittel des Mediums durch frisches ersetzt, dem GM-CSF und IL-4 in der oben genannten Konzentration zugesetzt wurde. Am sechsten Tag nach der Isolation wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Hartenstein) vom Boden gelöst und die Wells mit HBSS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Hartenstein) ermittelt.

3.5.2.2. *In vitro*-Generierung von Makrophagen

Die zuvor isolierten Monozyten wurden mit Hilfe von M-CSF über sechs Tage zu Makrophagen differenziert. Hierfür wurden die isolierten Monozyten in einer Konzentration von $0,83 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Wellplatten verteilt und mit 500 iU/ml M-CSF (AL Immunotools) versetzt. Jeden zweiten Tag wurde Medium abgenommen und durch frisches Medium mit 500 iU/ml M-CSF ersetzt. Das Priming der Zellen erfolgte 18 h vor der Ko-Kultur mit 10 ng/ml IL-4 (Miltenyi Biotec).

3.5.3. Isolation von Granulozyten

Frischblut von freiwilligen, gesunden Spendern wurde mit HBSS mit 1% FCS und 2 mM EDTA verdünnt und über eine FICOLL ($\rho = 1,077$ g/ml) Lösung geschichtet. Diese Suspension wurde anschließend bei 300 x g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in HBSS mit Zusätzen aufgenommen. Danach wurde erneut bei 200 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in Erythrozytenlysepuffer (EL-Buffer, Qiagen) aufgenommen und bei 4°C für 30 min inkubiert. Die Zentrifugation und Erythrozytenlyse wurden wiederholt, wobei die

Lyse nur noch für 10 min durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS mit Zusätzen gewaschen und in RPMI 1640 mit 5% FCS aufgenommen.

3.5.4. Plättchen

3.5.4.1. Gewinnung des plättchenreichen Plasmas

Um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erzeugen, wurde Blut gesunder Freiwilliger in Natriumzitratröhrchen gesammelt und anschließend bei 300 x g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene Überstand, das PRP, wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 37°C maximal für 1 h gelagert. Die Bestimmung der Plättchenkonzentration erfolgte am Sysmex® Zellzähler.

3.5.4.2. Generierung des plättchenarmen Plasmas

Um plättchenarmes Plasma (PPP) herzustellen, wurde PRP für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Gefäß überführt. Die Absenz der Plättchen wurde erneut am Sysmex® Zellzähler überprüft.

3.5.4.3. Isolation von Plättchen

Das frisch generierte PRP wurde im Verhältnis 1:2 mit 37°C warmen ACD-Puffer verdünnt und 5 min bei 900 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in warmen HBSS resuspendiert und die Zellzahl der isolierten Plättchen am Sysmex® Zellzähler bestimmt.

3.6. Ko-Kulturen mit *A. fumigatus* und *C. albicans*

Um Makrophagen und DCs zu stimulieren, wurde unterschiedlich vorgegangen. DCs konnten mit Hilfe eines Zellschabers vom Plattenboden gelöst und anschließend gezählt werden. Für die Ko-kultivierung wurden die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die stark adhärenenten Makrophagen ließen sich nicht ohne starke Beschädigung der Zellen vom Plattenboden lösen. Somit wurden die Monozyten in einer Konzentration von $0,83 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet und zu Makrophagen differenziert. Es erfolgte keine erneute Ablösung. DCs und Makrophagen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, in den Experimenten mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und Konidien ko-kultiviert. Für die Interaktion mit Thrombozyten wurden diese in einem Verhältnis von 1:30 zu den Immunzellen eingesetzt. Die Ko-Kultivierungen wurden für die jeweils angegebene Dauer durchgeführt.

3.7. *Dye Exclusion Assay* und Bestimmung der Zellzahl

Um die Vitalität der generierten Makrophagen und DCs zu überprüfen, wurde Trypanblau verwendet. Die Membranen vitaler Zellen sind für diesen polyanionischen Azofarbstoff undurchlässig, sie werden daher nicht gefärbt. Tote Zellen jedoch werden im Zellkern blau gefärbt.

Um die Vitalität von Makrophagen zu überprüfen wurde vor jedem Versuch das Medium eines Wells entfernt und die Zellen zwei Mal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1:2 in HBSS verdünntem Trypanblau für 5 min gefärbt. Die Überprüfung der Vitalität erfolgte am Lichtmikroskop. DCs wurden zuerst 1:10 mit HBSS und anschließend 1:2 mit Trypanblau verdünnt und in der Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.8. Messung des Oxidativen Bursts

Bei diesem Versuchsaufbau sollte die Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies durch *A. fumigatus* bei Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Hierfür wurde dem Medium der Granulozyten in einer Konzentration von $4,0 \cdot 10^6$ /ml bzw. pro Well Makrophagen $2,5 \mu\text{M}$ nicht-fluoreszierendes 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) zugegeben.

Als Stimulus wurden zudem in einer MOI von 5 *A. fumigatus* Keimschläuche zugegeben. Als Positivkontrolle diente Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) in einer Konzentration von 50 ng/ml . Durch zelluläre Esterasen und durch radikale Sauerstoffspezies in das fluoreszierende DCF oxidiert wurde. Diese Zunahme der Fluoreszenz wurde zeitabhängig alle 5 bzw. 15 min bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm über 2,5 bzw. 5 h gemessen.

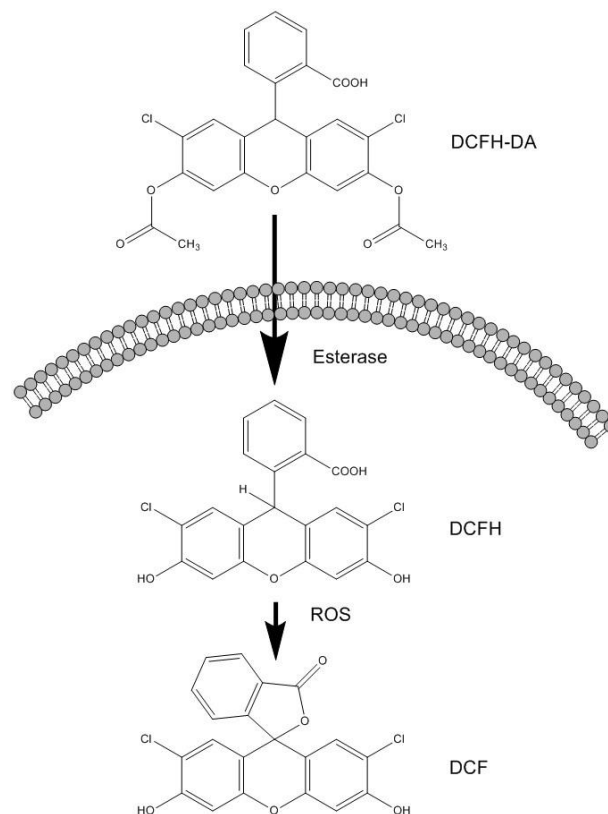


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Reaktion vom nicht-fluoreszierenden DCFH-DA zu DCF durch zelluläre Esterasen (Strukturformeln von der Herstellerseite und Abbildung modifiziert nach Dikalov *et al.* (2007)).

3.9. XTT

Mit dieser Methode wurde die metabolische Aktivität von Zellen analysiert. Metabolisch aktive Zellen können den Farbstoff XTT zum orangenen Formazan reduzieren. Die Bestimmung des gebildeten Formazans erfolgte mittels Absorptionsmessung. Hierfür wurden 0,5 mg/ml 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT, Sigma Aldrich) in HBSS gelöst und für 30 min auf 55°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 µg/ml Coenzym Q₀ 2,3-Dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinon (Sigma Aldrich) zugegeben.

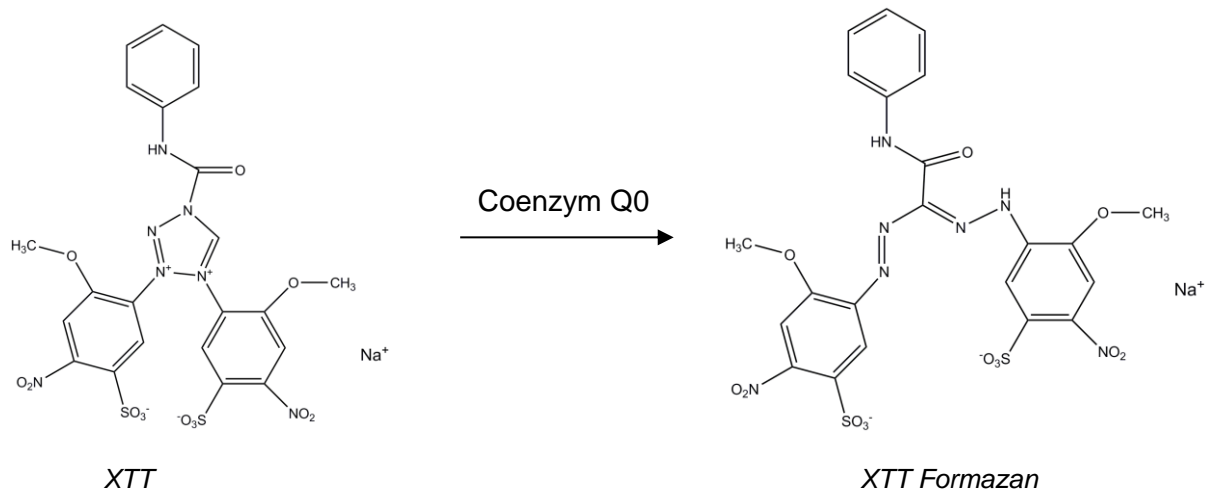


Abbildung 8: Darstellung der Reduktion von XTT in XTT Formazan (Strukturformeln nach Herstellerangaben, Sigma Aldrich).

Die *in vitro* generierten DCs und Makrophagen wurden für 4 h mit *A. fumigatus* Keimschläuchen ko-kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem H₂O lysiert und gewaschen. Die Zentrifugationen der Makrophagen erfolgten bei 3000 x g für 10 min und der DCs bei 14.000 x g für 10 min. Anschließend wurde die XTT-Coenzym-Lösung für 2 h bei 37°C zugeben (Verdünnung 3:1 mit HBSS). Dieser orange Farbstoff wurde bei 450 nm am *Microplate-Reader* gemessen werden. Als Korrektur für unspezifische Absorption wurde zudem bei 650 nm gemessen (Tecan Microplate Reader). Die Auswertung erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{Reduktion der metabolischen Aktivität [\%]} = 1 - \frac{\text{Behandlung} - \text{neg. Kontrolle}}{A. \text{fumigatus}} * 100$$

Hierbei handelt es sich bei „Behandlung“ um mit *A. fumigatus* bzw. PMA-stimulierten Immunzellen, bei der Negativkontrolle um Immunzellen ohne Stimulus und bei „*A. fumigatus*“ um Pilze ohne Immunzellen.

3.10. Phagozytose

Makrophagen und DCs besitzen die Fähigkeit kleine Partikel zu phagozytieren. Um die Aufnahme der Konidien und Keimschläuchen in die Zellen zu verfolgen wurden Konidien/Keimschläuche verwendet, die ein grün fluoreszierendes Protein GFP exprimieren (Lothar *et al.* 2014). Bei Aufnahme oder Bindung von Zellen an diese GFP-Konidien werden

diese Zellen somit fluoreszierend. Hierfür wurden Makrophagen und DCs in RPMI-Medium mit Refobacin und 10% FCS mit GFP-markierten Konidien bzw. Keimschläuchen aufgenommen und für 15 min bzw. 30 min inkubiert. Um den Einfluss von Plättchen auf die Phagozytoserate zu analysieren, wurde PRP und isolierte Plättchen in einem Verhältnis von 1:10 zugegeben. PPP diente als plättchenfreie Kontrolle und wurde in gleichem Volumen wie das PRP zugegeben. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die bei 4°C mit Konidien behandelt wurden. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer.

3.11. Durchflusszytometrie

3.11.1. Analyse von Oberflächenmarkern auf DCs und Granulozyten

Die Zellen wurden geerntet, gezählt und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden sie in HBSS in einer Konzentration $2,5 \cdot 10^6$ /ml resuspendiert. Die Färbung erfolgte mit 250.000 Zellen/Ansatz. Hierfür wurde das entsprechende Volumen an Antikörper zugegeben und für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden nicht-gebundene Antikörper entfernt, indem HBSS zugegeben und anschließend zentrifugiert wurde. Als Kontrollen dienten stets Zellen, die mit Isotyp-Kontrollen gefärbt wurden. Die Analyse erfolgte am FACS Calibur (BD).

3.11.2. Analyse von Oberflächenmarkern auf Thrombozyten

Um die Thrombozyten nicht unspezifisch zu aktivieren, wurde das Färbeprotokoll modifiziert. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 20 min bei RT. Anschließend wurde HBSS zugegeben und die Plättchen direkt analysiert. Es erfolgte kein Zentrifugationsschritt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Firma
CD14	IgG2a	FITC	BD
CD1a	IgG1	FITC	Dako
CD40	IgG2a	PE	Beckman Coulter
CD41	IgG1, κ	FITC	BioLegend
CD62P	IgG1, κ	PE	BioLegend
CD80	IgG1	PE	BD
CD86	IgG1	PE	BD
CD83	IgG1	PE	BD
CD66abce	IgG2a	APC	Miltenyi

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Firma
HLA-DR	IgG2a	PE	BD
IgG1		FITC	BD
IgG1		PE	BD
IgG2a		FITC	BD
IgG2a		APC	Miltenyi
IgG1, κ		FITC	BioLegend
IgG1, κ		PE	BioLegend

3.12. Elektrophoresen und Immunoblotting

3.12.1. Probenvorbereitung für Western Blot

Dendritische Zellen wurden nach der Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, *C. albicans* oder LPS geerntet und anschließend für 10 min bei 500 x g und 4°C pelletiert. Die Lysis erfolgte mittels Zugabe von Lysispuffer. Anschließend wurden die Proben für 15 s sonifiziert. Für die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay (Biorad) angewandt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt und die Proteinbestimmung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 620 nm gemessen. Als Referenz diente eine Messung bei 405 nm. Die Proteinkonzentration wurde so eingestellt, dass in jeder Probe eines Experiments die identische Menge Protein enthalten war. Hierfür wurde die Proteinkonzentration mit Lysispuffer eingestellt und anschließend alle Proben in 4x SDS Probenpuffer (Novagen 70607, 4x SDS Sample Buffer) verdünnt. Es erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 5 min.

3.12.2. Polyacrylamidgel

Um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden diese auf Polyacrylamidgele aufgetragen. Diese wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen gegossen, um eine optimale Auftrennung der Proben zu gewährleisten.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für den Western Blot.

Sammelgel (4,5%)	Trenngel (12%)
0,7 ml PAA (30%)	2,0 ml PAA (30 %)
1,25 ml 4x Trenngelpuffer	1,25 ml 4x Sammelgelpuffer
3 ml VE-Wasser	1,75 ml VE-Wasser
50 µl APS (10%)	50 µl APS (10%)
5 µl TEMED	5 µl TEMED

3.12.3. Proteintransfer und Detektion

Die Auftrennung erfolgte mittels Anlegung eines elektrischen Feldes, wobei die Proteine in Richtung Anode wanderten. Hierfür wurde Strom zuerst bei 100 V für 15 min angelegt. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei 150 V für 1 h. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte *semi-dry* für 90 min bei 75 mA/Membran. Nun wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Inkubation für 1 h bei RT mit 5% Milchpulver in TBST blockiert. Die Antikörper (Konzentrationen siehe Tabelle 5) wurden ebenfalls in 5% Milchpulver verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 1,5 h bei RT unter Schwenken. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h mit einem *horseradish peroxidase* HRP-konjugierten Zweitantikörper (Konzentrationen siehe Tabelle 5) inkubiert. Auch danach wurde dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL-Lösung. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgt mittels ImageJ, wobei diese relativ zum Referenzprotein β -Aktin bestimmt wurde.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper beim Western Blotting.

Epitop	Verdünnung	Isotyp	MW (kDa)	Hersteller
KLF4	1:1000	Kaninchen IgG	62	Cell Signaling
SYK	1:1000	Kaninchen IgG	72	Cell Signaling
β -Aktin	1:100.000	Maus IgG	45	Sigma Aldrich
anti-Kaninchen HRP	1:1000	Ziege IgG	-	Cell Signaling
anti-Maus HRP	1:10.000	Pferd IgG	-	Cell Signaling

3.13. ELISA

3.13.1. Multiplex ELISA

Die Multiplex ELISAs (Merck Millipore) wurden in Kooperation mit dem Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt. Hierfür wurden der *Human Cytokine/Chemokine*-ELISA Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.13.2. IL-6-ELISA

In dieser ELISA-Variante wurde die so genannte „Sandwich“-Methode verwendet. Hierfür wurden 96 Well-Platten mit einem anti-IL-6 *Capture*-Antikörper (2 µg/ml R&D) über Nacht beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer im ELISA-Washer mit 300 µl/Well Waschpuffer erfolgte das Blockieren spezifischer Bindestellen durch Inkubation einer *Blocking*-Lösung unter Schütteln (300 rpm). Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben bzw. die Verdünnungsreihe des Standards in Standardpuffer aufgetragen und für 2 h unter Schütteln inkubiert. Als *Blank* dienten Wells, die nur Standardpuffer enthielten. Nach erneutem Waschen wurde der *Detection*-Antikörper (100 ng/ml in Zweiantikörperpuffer) für 2 h zugegeben. Nach erneutem Waschschritt wurde das Streptavidin-gekoppelte Enzym (Biolegend) 1:1000 im Streptavidinpuffer verdünnt und zugegeben. Nach 20 min Schütteln bei RT wurde wiederholt wie zuvor gewaschen. Nun wurden die TMB-Substratlösungen A und B (Biolegend) 1:2 gemischt und für 3-10 min je nach Färbung im Dunkeln inkubiert. 1 M Schwefelsäure diente als Stoppreagenz. Im Plattenreader wurde die optische Dichte bei 450 nm mit Subtraktionskorrektur bei 570 nm gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe der Standardwerte vorgenommen. Hierfür wurden die gemessenen Werte gegen die bekannten Konzentrationen der einzelnen Standardwerte aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Durch die sich daraus ergebende Standardkurve konnten die Konzentrationen der Proben errechnet werden.

3.14. Genexpressionanalysen

3.14.1. RNA-Interferenz

Bei der RNA Interferenz handelt es sich eigentlich um einen natürlichen Mechanismus zur Abwehr von Viren, der aber zur Abschaltung von Genen genutzt wird, wobei doppelsträngige RNAs in der Zelle erkannt und spezifisch abgebaut werden. Diese Funktion der Zelle wurde genutzt, um künstlich die mRNA von *KLF4* auszuschalten. Hierfür wurden $1 \cdot 10^6$ DCs am Tag 5 in 100 µl RPMI ohne Zusätze mit 133 nM *KLF4*-siRNA (5'-

CAGGGTATAAATTATATCCGT-3', Qiagen) oder Kontroll-siRNA (ns, Qiagen) bei 340 V für 10 ms elektroporiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h bei 37°C und 5% CO₂. Im Anschluss daran wurden die Ko-Kulturexperimente wie beschrieben durchgeführt.

3.14.2. Isolation von mRNA humaner Zellen

Zellen, die zuvor in RNA Protect (Qiagen) gelagert wurden, wurden nach dem Auftauen bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA-Isolation nach Herstellerangaben (Qiagen) des RNeasy® Mini Kits nach dem *Rneasy® Mini Handbook Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology* durchgeführt. Hierfür wurde 350 µl RLT-Puffer zum Pellet zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden 350 µl 70% EtOH zugegeben und erneut durchmischt. Dieses Lysat wurde nun auf Qiagen® Säulen überführt und diese bei 8000 x g für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 8000 x g für 30 s wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Hierfür wurden je Probe 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer gemischt und 80 µl auf jede Säule transferiert. Die Inkubation erfolgte bei RT für 15 min. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8000 x g für 30 s zentrifugiert. Nun wurde zweimal 500 µl RPE zugegeben, wobei jeweils bei 8000 x g zentrifugiert wurde, erst für 30 s und beim zweiten Mal für 2 min. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule erneut in ein frisches Sammelgefäß überführt und 25 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 8000 x g für 1 min. Hierdurch wurde die RNA von der Säule gewaschen und befand sich nun in Sammelgefäß.

3.14.3. Isolation von Total-RNA aus humanen Zellen

Für die Isolation von Total-RNA wurde das miRNeasy Micro Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Mit diesem Kit wurde die Total-RNA isoliert, worunter sich auch kurze RNAs wie die miRNAs befanden. Zu Beginn wurden die in RNA Protect (Qiagen) gelagerten Suspensionen aufgetaut und bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet durch schnipsen des Reaktionsgefäßes mit dem Finger gelöst und 700 µl QIAzol Lysisreagenz zugegeben. Es folgte eine Durchmischung mit Hilfe des Vortexmischers für 1 min. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden zudem 140 µl Chloroform (Sigma Aldrich, 0,5-1% Ethanol als Stabilisierer) hinzugefügt und die Reaktionsgefäße für 15 s stark geschüttelt. Nach erneuter Inkubation für 2 min wurden die Reaktionsgefäße für 15 min bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 1,5fachen

Volumen an 100%igen Ethanol gemischt. 700 µl wurden auf die mitgelieferten Säulen überführt und bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, konnte der Rest der Ethanol/RNA-Lösung auf die Säule geladen werden und die zuvor beschriebenen Schritte konnten wiederholt werden. Anschließend wurde auf der Säule ein DNA-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden zuerst 350 µl des RWT-Puffers auf die Säule pipettiert und anschließend für 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die DNase I, die zuvor nach Herstellerangaben in RDD-Puffer (Qiagen) verdünnt wurde, wurde auf die Säule gegeben und für 15 min inkubiert. Nun wurden 350 µl RWT-Puffer zugegeben und darauf für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die anschließenden Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, mit diesen Parametern durchgeführt. Der Durchfluss wurde verworfen und nun 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation mit Verwurf des Durchflusses wurden 500 µl 80% EtOH auf die Säule pipettiert und für 2 min zentrifugiert. Nach dem Überführen der Säule in ein neues Reaktionsgefäß wurde diese für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser wurde erneut für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Hierdurch wurde die RNA von der Säule gewaschen und befand sich nun in Sammelgefäß.

3.14.4. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Spectrophotometers NanoDrop bestimmt. Dabei wurde bei 260, 280 und 230 nm gemessen. Hierbei wurde die Konzentrationsbestimmung bei 260 nm durchgeführt. Über das Verhältnis von 260 nm / 280 nm bzw. 260 nm / 230 nm wurde die Reinheit der isolierten RNA bezüglich Verunreinigungen DNA bzw. Salzen und Zucker bestimmt.

3.14.5. Reverse Transkription der mRNA zur cDNA Synthese

Zum Umschreiben von RNA in cDNA wurde das cDNA First Strand Synthesis Kit (Thermo Scientific ©) verwendet. Dazu wurden 100-500 ng RNA in 10 µl RNase freiem Wasser (Qiagen) verdünnt. Anschließend wurden pro Ansatz folgende Zusätze zugegeben:

Tabelle 6: Reaktionsreagenzien für die cDNA-Synthese der mRNA.

Reagenzien	Volumen [μ l]
Random hexamer Primer	1
5x Reaction Buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor	1
10 mM dNTP Mix	2
M-MiLV Reverse TRanscriptase	2
RNA 100-500 ng	10
Total-Vol.	20

Nach vorsichtigem Mischen und anschließender Zentrifugation wurden die Ansätze im Eppendorf Cycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Tabelle 7: cDNA-Synthese-Programm für mRNA mit Temperatur und Dauer.

	Dauer	Temperatur
Schritt 1	5 min	25°C
Schritt 2	60 min	37°C
Schritt 3	5 min	70°C
Schritt 4	∞	4°C

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.14.6. Poly-Adenylierung und cDNA Synthese der miRNA

Mit dem miRNA II RT Kit (Qiagen) wurden die miRNAs zuerst poly-adenyliert und zudem in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 100-500 ng RNA in 10 μ l RNase-freiem Wasser (Qiagen) verdünnt. Anschließend wurden pro Ansatz folgende Zusätze zugegeben:

Tabelle 8: Reaktionsreagenzien für die cDNA-Synthese der miRNA.

Reagenzien	Volumen [μ l]
5x miScript HiFlex Buffer	4
10x miScript Nucleis Mix	2
miScript Reverse Transcription Mix	2
RNA 100-500 ng	12
Total-Vol.	20

Nach vorsichtigem Mischen und anschließender Zentrifugation wurden die Ansätze im Eppendorf Cycloer unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Tabelle 9: cDNA-Synthese-Programm und Poly-Adenylierung für miRNA mit Temperatur und Dauer.

	Dauer	Temperatur
Schritt 1	60 min	37°C
Schritt 2	5 min	95°C
Schritt 3	∞	4°C

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.14.7. *Real-time* PCR zur Quantifizierung der mRNA

Um Genexpressionen zu quantifizieren wurden *real-time* PCRs durchgeführt. Für die Quantifizierung der mRNAs wurde der Farbstoff Sybr Green I verwendet. Dieser Cyanin-Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, wodurch seine Fluoreszenz ansteigt. Dadurch lässt sich die Menge an gebildetem PCR-Produkt quantifizieren. Zur Genexpressionsquantifizierung wurde die zuvor generierte cDNA verwendet. Diese wurde 1:5 für mRNA-Analysen verdünnt. Das Primer-Design erfolgte mit Primer3 bzw. Primer-BLAST. Nach Möglichkeit wurden die Primer so gewählt, dass sie Exon überspannend waren. Für die *real-time* PCR wurde der Mastermix SybrGreen von BioRad und folgende Primer (Sigma Aldrich) verwendet:

Tabelle 10: Für die qPCR verwendete Primer mit NM-Nummer und Sequenz.

Gen	NM-Nummer	Richtung	Sequenz
ALAS	NM_000688.5	fw	GGCAGCACAGATGAATCAGA
		rv	CCTCCATCGGTTTTTCACT
CCL2	NM_002982.3	fw	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT
		rv	AGATCTCCTTGCCACAATG
CXCL1	NM_001511.3	fw	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG
		rv	CACCAGTGAGCTTCCTCCTC
CXCL10	NM_001565.3	fw	CCACGTGTTGAGATCATTGC
		rv	ATTTTGCTCCCCTCTGGTTT
CXCL2	NM_002089.3	fw	CTCAAGAATGGGCAGAAAGC
		rv	CTTCAGGAACAGCCACCAAT
IL1B	NM_000576.2	fw	GGACAAGCTGAGGAAGATGC
		rv	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA
IL6	NM_000600.3	fw	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA
		rv	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT
KLF4	NM_004235.4	fw	TACCAAGAGCTCATGCCACC
		vv	CGCGTAATCACAAGTGTGGG
CCL5/ RANTES	NM_002985.2	fw	GAGGCTTCCCCTCACTATCC
		rv	CTCAAGTGATCCACCCACCT
SYK	NM_001135052.2	fw	TGGAGAGCGAGGAGGAGC
		rv	CGGGTGATGTTGCCGAAAAA
TNF	NM_000594.2	fw	TGCTTGTTCTCAGCCTCTT
		rv	TGGGCTACAGGCTTGTTGTCACT

Folgende Komponenten wurden je Reaktion zusammengeführt:

Tabelle 11: Reaktionsreagenzien für die RT-PCR-Reaktion der mRNA.

Reagenzien	Volumen [μ l]
iTaq Mastermix Bio Rad	10
Sonde 10 μ M fw	1
Sonde 10 μ M rv	1
RNase-freies H ₂ O	4
cDNA-Verdünnung	4
Total-Vol.	20

Die real-time PCR wurde am Applied Biosystems Gerät StepOne Plus über 40 Zyklen mit anschließender Schmelztemperaturanalyse durchgeführt.

Tabelle 12: Zyklen der qPCR und deren Temperatur und Dauer.

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

3.14.8. Real-time PCR zur Quantifizierung von miRNAs

Um miRNA-Expressionen zu quantifizieren wurden *real-time PCRs* durchgeführt. Für die Quantifizierung der miRNAs wurde wie zuvor der Farbstoff Sybr Green I verwendet. Zur Genexpressionsquantifizierung wurde die zuvor generierte cDNA verwendet. Diese wurde 1:5 für miRNA-Analysen verdünnt. Das Primer-Design erfolgte mit Primer3. Es wurde nur ein *forward*-Primer gewählt, da als *reverse*-Primer der Universal-Primer von Qiagen verwendet wurde.

Tabelle 13: Für die qPCR verwendete miRNA-Primer mit NM-Nummer und Sequenz.

miRNA	Richtung	Sequenz
hsa-miR-155-5p	fw	TAATGCTAATCGTGATAGGGGTAA
hsa-miR-425-5p	fw	TACACGATCACTCCCGTTGA

Folgende Komponenten aus dem Qiagen miScript-System wurden je Reaktion zusammengeführt:

Tabelle 14: Reaktionsreagenzien für die RT-PCR-Reaktion der miRNA.

Reagenzien	Volumen [μ l]
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix	12,5
10x miScript Universal Primer Primer 10 μ M	2,5
RNase-freies H ₂ O	6,25
cDNA-Verdünnung	2,5
Total-Vol.	20

Die real-time PCR wurde am Applied Biosystems Gerät StepOne Plus über 35 Zyklen mit anschließender Schmelztemperaturanalyse durchgeführt.

Tabelle 15: Zyklen der qPCR und deren Temperatur und Dauer.

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	15 min	Initiation
94°C 58°C	15 s 30 s	40 Zyklen
70°C +0,5°C/Messung 95°C	30 s 15 s	Schmelzkurve

3.14.9. Real-time PCR-Effizienz-Bestimmung und Auswertung

Die PCR-Effizienz E wurde mit Hilfe von LinRegPCR bestimmt. Das Programm bestimmte hierbei die Grundfluoreszenz und die PCR-Effizienz wurde anschließend pro Amplicon ermittelt. Die Expression wurde relativ zu einem Referenzgen, ALAS1, bestimmt.

Die relative Expression R wurde mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet:

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

Formel 1: Formel zur Berechnung der relativen Expression.

3.14.10. Bestimmung der Länge des Amplifikates

Um die Länge des Amplifikates nach einer *real-time* PCR zu bestimmen, wurde das PCR-Produkt auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurde die High Resolution Agarose (Roth) in TAE gelöst und in der Mikrowelle unter gelegentlichem Schwenken erhitzt. Anschließend wurde das durch das Erhitzen verdampfte Wasser durch VE-Wasser ersetzt und die Agarose-Lösung etwas abgekühlt. Anschließend wurde 0,01% Ethidiumbromid zugegeben und in die Agarosekammer gegossen. Nach dem Auskühlen wurde die Kammer mit TAE-Puffer befüllt und die Kämme gezogen. 10 μl der PCR-Produkte wurden mit 2 μl Laufpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung des Plus-Pols und wurden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Als Referenz diente ein Marker mit definierten Basenpaaren, welcher in diesem Fall ein Vielfaches von 25 bp als Markierung darstellte.

3.15. Genomweite Microarrays

In enger Kooperation mit der Universität Tübingen, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik wurden genomweite Microarrays durchgeführt. Hierbei wurden drei unterschiedliche Sets an Experimenten untersucht.

3.15.1. Untersuchung des Transkriptoms von *A. fumigatus*- und *C. albicans*-stimulierten DCs

Hierbei wurden DCs mit inaktivierten *A. fumigatus* Keimschläuchen oder Konidien, *C. albicans* (MOI 1) oder mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen. Nach sechs bzw. zwölf Stunden wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und die RNA in RNA Protect (Qiagen) stabilisiert. Es wurden vier unabhängige Spender verglichen.

3.15.2. Untersuchung zum Einfluss von PRP auf das Transkriptom von *A. fumigatus*-stimulierten DCs

DCs wurden mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (MOI 1) und PRP (1:30) für drei Stunden kultiviert. Als Kontrollen dienten nicht-stimulierte Zellen, bzw. Zellen die entweder nur mit *A. fumigatus* Keimschläuchen oder nur PRP behandelt worden waren. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und die RNA in RNA Protect (Qiagen) stabilisiert. Es wurden drei unabhängige Spender verglichen.

3.15.3. Untersuchung zum Einfluss von PRP auf das Transkriptom von *A. fumigatus*-stimulierten DCs und Makrophagen

Für den Vergleich der Immunantwort von DCs und Makrophagen wurden letztere für 18 h mit IL-4 vorstimuliert und beide Zelltypen für sechs Stunden entweder mit PRP (1:30), *A. fumigatus* Keimschläuchen (MOI 1) oder einer Kombination beider stimuliert. Auch hier dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle. Es wurden drei unabhängige Spender verglichen.

3.15.4. Durchführung und Auswertung der Microarrays

Je nach Projekt wurden die Arrays in Zusammenarbeit mit der jeweiligen Kooperationspartnern ausgewertet. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden verwendet.

Die mRNA wurde mittels RNease Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und die RNA Qualität und Quantität bestimmt. Alle verwendeten Proben hatten eine *RNA integrity number* (RIN) > 8. Die gescannten Aufnahmen wurden nach Hybridisierungsartefakten und nach einer korrekten Gitteranordnung untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse mit AGCC 3.0 (Affymetrix) und die Generierung von CEL-Dateien. Hierbei wurde die Position und Signalintensität jeder Probe bestimmt, ohne die Randwerte zu berücksichtigen.

Die PRP-Arrays über 3 h wurden mittels Partek Genomics Suite (Version 6.6, Partek, St. Louis, MO) analysiert. Eine model-basierte *Robust Multichip*-Analyse wurde für die Probe Set Zusammenfassung durchgeführt, mit Hilfe von Normalisierung und logarithmischer Transformierung. Die p-Werte wurden mit ANOVA bestimmt und ein p-Wert $p \leq 0.05$ als statistisch signifikant determiniert. Alle p-Werte wurden mit der 5%-FDR basierten Methode für multiples Testing von Benjamini und Hochberg korrigiert. Zudem wurde ein Fold Change $|FC| \geq 2$ bzw. 1,5 als minimale Grenze gesetzt.

Die PRP-Arrays über 6 h wurden wie zuvor beschrieben normalisiert. Die Auswertung der Daten wurde mit Software des Bioconductor Projekts (www.bioconductor.org (Gentleman *et al.* 2004)) mit R 3.0.1 (www.r-project.org) ausgewertet. Für alle Gene, die mit mehr als einem

Probe Set auf dem Chip vorhanden waren, wurden das Probe Set verwendet, das die größte Varianz über alle Proben aufwies. Differentiell exprimierte Gene wurden mittels R-Paket Limma (Smyth 2004) bestimmt und die p-Werte wurden für multiples Testing mit einem 5%-FDR-basierten Verfahren der Methode von Benjamini und Hochberg (Benjamini und Hochberg 1995) korrigiert. Gene mit einem angepassten p-Wert von $\leq 0,05$ und ein $|\log_2FC|$ von ≥ 1 wurde als signifikant gesehen. Die Korrespondenzanalysen wurden mittels dem R-Paket „vegan“ erstellt (Oksanen *et al.* 2011).

Der *Candida* und *Aspergillus*-Arrays wurde mit Hilfe der Statistiksoftware R (<http://www.r-project.org>) prozessiert. Die Daten wurden weiter mit der RMA-Methode bearbeitet, dabei wurden sie von Hintergrundrauschen befreit und einer Quantil-Normalisierung sowie Logarithmierung unterzogen. Anschließend wurde ein lineares Modell den Daten angepasst. Transkripte wurden dann als signifikant differentiell reguliert betrachtet, wenn sie einen absoluten Fold Change $|FC| \geq 2$ und einem korrigierten P-Wert (FDR) $p \leq 0.01$ entsprachen. Für *A. fumigatus* Konidien wurde ein Fold Change $|FC| \geq 1,5$ und ein korrigierter P-Wert (FDR) $p \leq 0.05$ gewählt. Für die *A. fumigatus/C. albicans*-Arrays wurde zu noch die Annotation von Affymetrix nach Dai *et al.* (2005) überarbeitet, wobei einzelne Probe Sets gruppiert und als ein Gen bezeichnet wurden.

3.16. Signalwege

Um angereicherte *Gene Ontology* GO-Signalwege zu identifizieren, wurde GOrilla verwendet (Eden *et al.* 2009). GO-Bedingungen mit einem FDR-angepassten p-Wert von < 0.001 wurden als signifikant angereichert betrachtet.

3.17. miRNA Deep Sequencing

Die Schwierigkeit miRNAs zu analysieren liegt zum einen in der Kürze der miRNAs. Mit ihrer Länge von nur ~ 22 nt sind konventionelle Primer nicht für einen Nachweis geeignet. Zum anderen besitzen sie eine hohe Varianz im GC-Gehalt, wodurch sich große Unterschiede in der Schmelztemperatur ergeben. Die *next-generation sequencing*-Methode eignet sich besonders, da sie eine hohe Genauigkeit besitzt, wodurch auch miRNAs mit einer ähnlichen Sequenz unterschieden und zudem bislang unbekannte miRNAs identifiziert und beschrieben werden können (Pritchard *et al.* 2012). In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung mittels der Illumina Plattform *Genome Analyzer Iix* in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universität Tübingen durchgeführt.

Hierfür wurde die Gesamt-RNA der DCs isoliert und über eine Größenauffrennung in einem Gel die miRNAs extrahiert. Im nächsten Schritt wurden an beide Enden der kurzen RNA-Stücke Adaptoren ligiert. Über diese Adaptoren können die RNA-Fragmente auf die so genannte *Flow Cell*, einem Objektträger-ähnlichem Träger mit einer optisch transparenten Oberfläche, mit Oligonukleotidankern auf der Oberfläche hybridisiert werden.

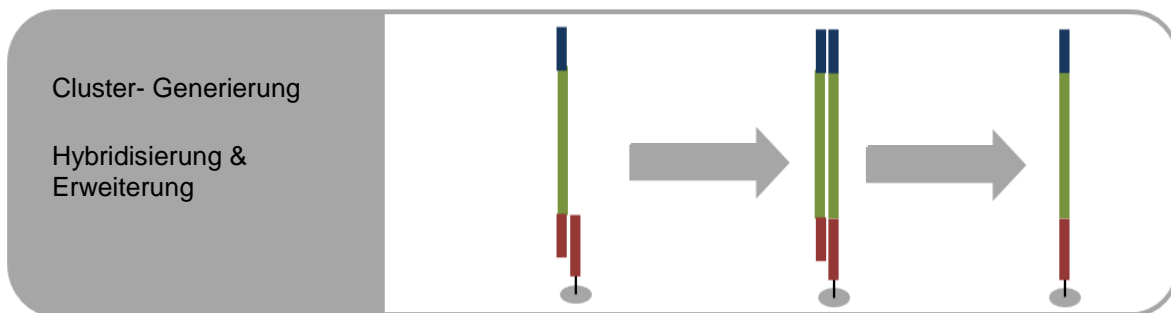


Abbildung 9: Hybridisierung und Strangerweiterung auf der *Flow Cell* (geänderte Abbildung nach Herstellangaben, *Illumina*).

Nach der Strang-Synthese mit anschließender Denaturierung sind die miRNAs fest an die *Flow Cell* gebunden. Nun kann das andere Ende der RNA über den ligierten Adapter ebenfalls mit einem Primer auf der *Flow Cell* interagieren. Dadurch entstehen RNA-Stücke, die an beiden Enden an die *Flow Cell* gebunden sind. Diese besondere Struktur erinnert an eine Brücke und wird daher als *Bridge Amplification* bezeichnet. Hierbei werden die miRNAs amplifiziert.

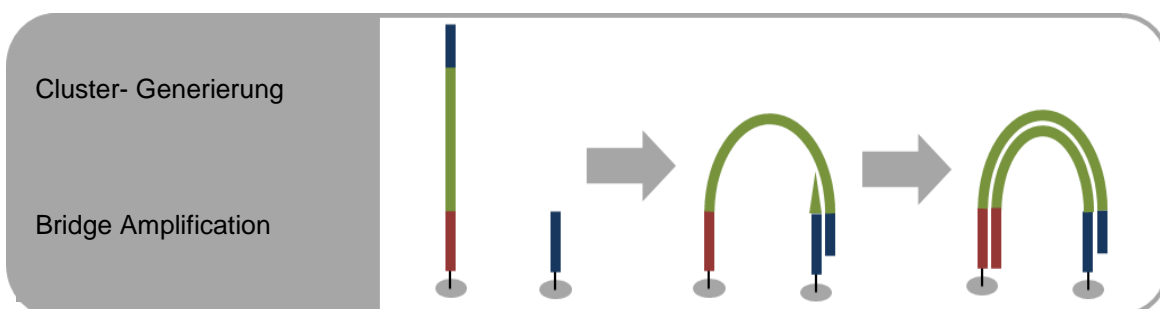


Abbildung 10: Amplifikation der miRNA mittels *Bridge Amplification* (geänderte Abbildung nach Herstellangaben, *Illumina*).

Es folgt erneut eine Strang-Synthese mit anschließender Denaturierung. Diese Schritte von Bindung an die *Flow Cell*, Strang-Synthese und Denaturierung werden wiederholt, sodass Kluster von amplifizierten miRNAs entstehen.

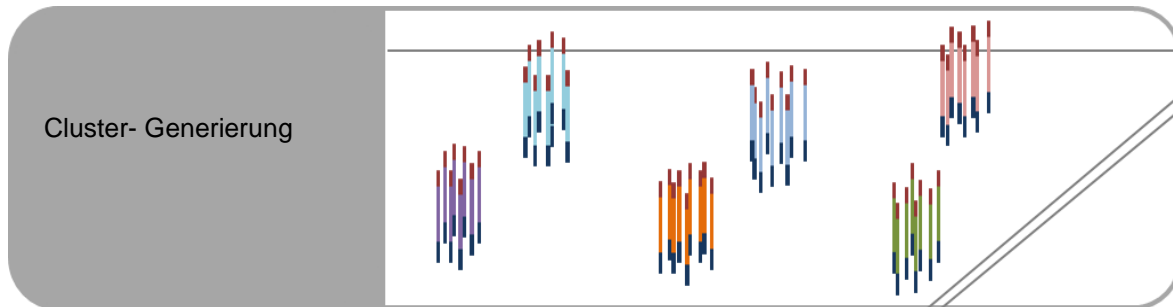


Abbildung 11: Generierung von Clustern aus amplifizierten miRNAs (geänderte Abbildung nach Herstellangaben, Illumina).

Mit der *Sequencing-by-Synthesis*-Methode werden die RNA-Kluster anschließend sequenziert. Hierfür wurden unterschiedlich fluoreszierende Nukleotide verwendet, an die durch einen Terminator keine weiteren Basen gekoppelt werden können. Im ersten Zyklus werden Primer gegen die Adaptoren, eine DNA-Polymerase und die fluoreszierenden Basen zugegeben. Nach einer Anregung durch einen Laser, wird die Fluoreszenz aufgenommen, und die eingebaute Base dadurch identifiziert.

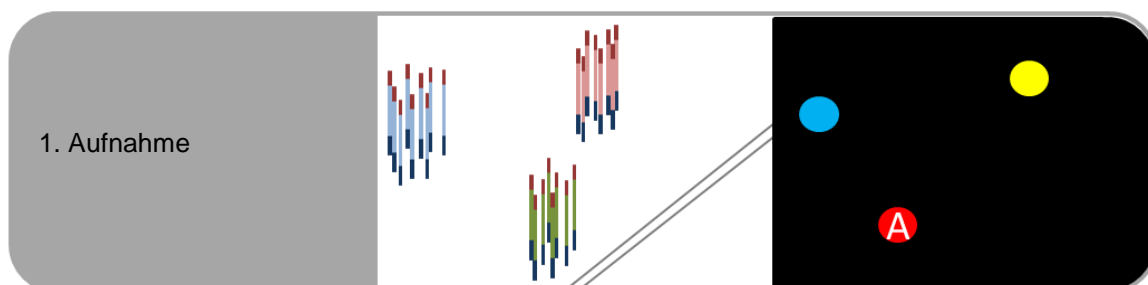


Abbildung 12: Identifikation der der eingebauten Basen mittels Fluoreszenz (geänderte Abbildung nach Herstellangaben, Illumina).

Von den DCs, die in für Genexpressionsanalysen verwendet wurden, wurde ebenfalls ein miRNA Deep Sequencing durchgeführt. Wie schon beschrieben wurden DCs mit *A. fumigatus* Keimschläuchen oder Konidien und *C. albicans* (MOI 1) für 6 und 12 h ko-kultiviert. Als Positivkontrolle diente LPS. Zu diesen Zeitpunkten wurden die Zellen in RNA-Protect (Qiagen) aufgenommen. In einer Kooperation mit den MFT Services Tübingen wurde die Komplet-RNA isoliert und die Qualität und Quantität bestimmt. Hierbei lagen die RIN bei $8,9 \pm 0,9$.

Kleine RNA-Sequencing Libraries wurden von 500 ng RNA mittels TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) nach Herstellerangaben generiert. Diese wurden auf ein E-Gel (Invitrogen) geladen und die miRNA-angereicherten Fraktionen bei 147nt

isoliert, aufgereinigt und quantifiziert an einem Qbit Instrument (Invitrogen). Equimolare Mengen von allen Libraries wurden gepoolt und auf eine Illumina GAIIx single-read flow cell geladen. Cluster wurden an einem cBot Instrument (Illumina) mittels TrueSeq Cluster Generation Kit (Illumina) generiert. Ein 32 nt-Sequencing mit anschließendem 7 nt Sequencing wurde durchgeführt. Die Rohsequenzen wurden mittels CASAVA1.7 (Illumina) in fastq Daten überführt. Die Fastq ASCII Qualitäten wurden von Illumina v1.3 nach Sanger über FastQ Groomer transferiert. Die Linker-Sequenzen wurden mit fastx clipper entfernt und Reads, die kleiner als 15 nt waren wurden entfernt. Reads mit identischen Sequenzen wurden gruppiert und mit Sequenzen der miRBase verglichen.

3.18. Modelling

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg, sollte ein DCs-Netzwerk, für die Stimulation von *A. fumigatus* erstellt werden. Hierfür wurden in einer ausgiebigen Literatursuche Interaktionstypen wie Aktivierung und Inhibierung sowie verschiedene Interaktionen, die mit *A. fumigatus* Infektionen assoziiert sind, identifiziert. Das regulatorische Netzwerk wurde mit Hilfe von yEd (Quelle: <http://www.yworks.com/en/downloads.html#yEd>) erstellt und in Jimena (Karl und Dandekar 2013) exportiert. Jimena ermöglicht zum einen die Analyse von stabilen Zuständen, als auch die dynamische Simulation von Netzwerken, basierend auf allen möglichen Aktivierungsmustern der Netzwerkknoten. Die stabilen Zustände des Netzwerkes wurden mit Jimena bestimmt. Die Berechnungsdauer für die stabilen Zustände wurde auf 10 s gesetzt. Unter diesen resultierenden stabilen Zuständen wurde ein Grundzustand (Knotenwert 1, aktive Gene) gesetzt, während alle anderen Gene nicht aktiv waren (Knotenwert 0). Dieser stabile Zustand wurde als Ausgangspunkt für die dynamische Simulation verwendet. Um verschiedene Intensitäten der Stimulierung durch *A. fumigatus* zu testen, wurde der pathogene Eingangsknoten auf verschiedene Werte (0,18, 0,2 und 0,5) gesetzt. Jimena übersetzte diese Störungen und ihre Auswirkung in eine zeitaufgelöste Aktivierungskurve und kalkulierte die Reaktion jedes Knotens im Netzwerk auf die jeweilige Veränderung. Die Daten dieser Aktivierungskurven wurden mittels *charts function* exportiert und mit R („ggplot“ library) dargestellt. Die Aktivierungszustände der Knoten des Netzwerkes wurden dann mit den jeweiligen differentiell exprimierten Genen des analysierten Datensets von DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* gegenüber unbehandelten Kontrollen verglichen. Die resultierende Liste wurde nach logFold Change (logFC) und p-Werten ($p \leq 0.05$) sortiert. Die übrigen Netzwerkknoten wurden farblich entsprechend ihrem logFC dargestellt.

3.19. Heatmaps

Alle Heatmaps wurden mit dem Multi expression Viewer Mev v4.8.1 erstellt. Hierfür wurden die Mittelwerte der Signalintensitäten der Microarrays verwendet.

3.20. Venn Diagramme

Für die in dieser Arbeit abgebildeten Venn-Diagramme wurden zwei Programme verwendet. zum einen Venny 2.0.2 (Oliveros 2007-2015) und für die Erstellung von *Area proportional* Venns BioVenn (Hulsen *et al.* 2008).

3.21. Graphische Darstellung und Statistik

Alle dargestellten Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, durch drei unabhängige Experimente $n=3$ erzielt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5. Es wurden Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger, gepaarter Student's t-Test berechnet. Die Darstellung von Asterisken in den Graphiken stellen folgende Signifikanzlevel dar: * $p<0,05$, ** $p<0.01$, *** $p<0,001$.

3.22. Förderung

Diese Arbeit wurde zum eine durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung der Universität Würzburg (IZKF) im Projekt A-127 „Hämostase und Invasive Aspergillose: Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen“ zum anderen über ein Promotionsabschlusstipendium im Rahmen des Förderprogramms zur Chancengleichheit an der Universität Würzburg gefördert.

3.23. Ethik

Die Ethikgenehmigung wurde vom Ethik Komitee des Universitätsklinikums Würzburgs für die Verwendung von Blut von gesunden Freiwilligen erstellt. Die schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Studienteilnehmern abgegeben. Die Daten wurden anonym generiert.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kapitel 4.1-4.5 wurden in Kooperation mit Ines Leonhard und Prof. Oliver Kurzai, Hans-Knöll-Institut, Fungal Septomics, Jena, generiert. An der Auswertung der Microarray-Daten und miRNA-Daten waren zudem Andreas Dix und Dr. Jörg Linde, Hans-Knöll-Institut, Systembiologie und Bioinformatik, Jena, beteiligt.

4.1. Charakterisierung der Oberflächenexpression von CD1a und CD14 auf Monozyten

Aus isolierten PBMCs (siehe Abbildung 6) wurden mittels magnetischer Aufreinigung mit anti-CD14-Beads CD14⁺-Monozyten isoliert. Monozyten besitzen kein CD1a auf ihrer Zelloberfläche, während CD14 stark exprimiert wird. Daher wurden diese beiden Marker verwendet, um die Reinheit der Monozytenkulturen zu überprüfen. In den lebenden Zellen waren keine Zellen vorhanden, die CD1a exprimierten. CD14 war jedoch auf der Zelloberfläche vorhanden. Diese isolierten Monozyten wurden in Kultur genommen und daraus sowohl DCs als auch Makrophagen generiert.

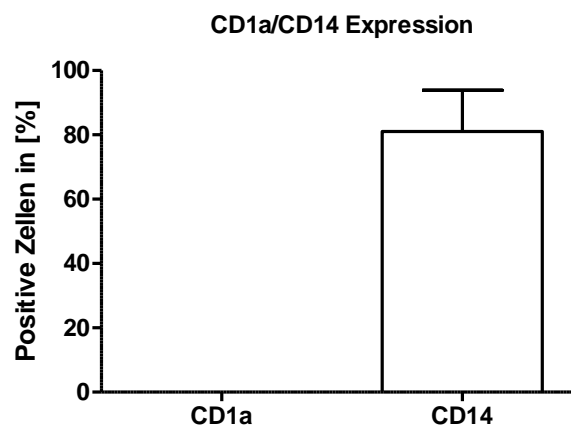


Abbildung 13: Reinheit der Monozyten direkt nach der Isolation aus PBMCs mit CD14-Beads. PBMCs wurden mit anti-CD14-Beads ko-inkubiert und anschließend die CD14⁺-Monozyten über magnetische Separation isoliert. Die Überprüfung der Reinheit für CD1a (schwarz) und CD14 (weiß) erfolgte mittels Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.2. Charakterisierung der Oberflächenexpression von CD1a und CD14 auf DCs

Die isolierten Monozyten wurden durch die Zugabe von IL-4 und GM-CSF über sechs Tage zu DCs differenziert. Um die Reinheit und die Funktion der DCs zu überprüfen, wurden sie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Markermoleküle für DCs wurden, wie zuvor, CD1a und CD14 gewählt. Während Monozyten CD14 stark auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 13), verloren sie dieses Glykoprotein bei der Differenzierung zu DCs. Auf der anderen Seite wurde eine starke Expression von CD1a auf der Oberfläche als wichtige Voraussetzung definiert, um eine möglichst hohe Ähnlichkeit zwischen den unterschiedlichen Spendern zu gewährleisten (Abbildung 14).

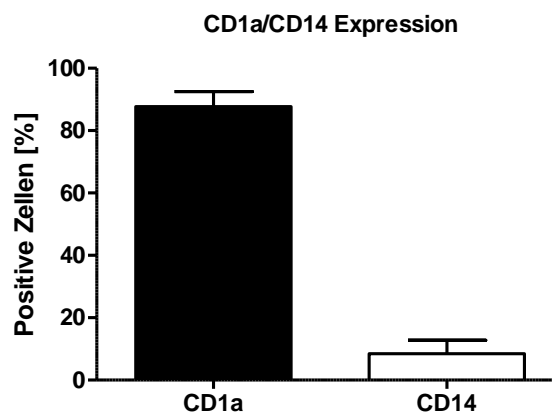


Abbildung 14: Expression von CD1a und CD14 auf der Zelloberfläche von DCs. DCs wurden am Tag 6 mittels Durchflusszytometrie auf Positivität für die Marker CD1a (schwarz) und CD14 (weiß) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.3. miRNA-Regulation mit Analyse des Transkriptoms von *A. fumigatus* und *C. albicans*-stimulierten DCs

Ziel des Projektes war die Charakterisierung der Pilzantwort der DCs auf *A. fumigatus* und *C. albicans* gegenüber dem klassischen bakteriellen Stimulus LPS. Hierbei wurde schwerpunktmäßig eine Transkriptomanalyse sowie ein miRNA *deep sequencing* der

stimulierten DCs durchgeführt, um weitere Schlüsselemente der Immunantwort zu identifizieren.

Folgende Analysen wurden mit den so behandelten DCs durchgeführt:

- miRNA Deep Sequencing (siehe 4.3.1)
- mRNA-Transkriptom Analyse (siehe 4.3.2)
- Durchflusszytometrie der DC-Reifung (siehe 4.4)
- Zytokinprofil (siehe 4.4)

4.3.1. Untersuchung der miRNA-Regulationen in *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs

In einer wichtigen Vorarbeit unseres Labors wurden die miRNAs miR-155 und miR-132 als durch *A. fumigatus* reguliert beschrieben (Das Gupta *et al.* 2014). Durch ein *miRNA Deep Sequencing* sollten alle differentiell regulierten miRNAs beschrieben und zudem mit LPS-induzierten miRNAs verglichen werden.

Für *A. fumigatus* Keimschläuche, *C. albicans* und LPS wurden regulierte miRNAs identifiziert. *A. fumigatus* induzierte die wenigsten miRNAs, während durch *C. albicans* eine weitere miRNA reguliert war. Mit 6 und 22 regulierten miRNAs war LPS der stärkste Stimulus. Es wurden keine regulierten miRNAs nach 6 und 12 h durch Stimulation mit Konidien nachgewiesen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Anzahl regulierter miRNAs je Bedingung.

Bedingung		Anzahl regulierter miRNAs
<i>A. fumigatus</i>	Keimschläuche 6 h	3
	Keimschläuche 12 h	8
	Konidien 6 h	0
	Konidien 12 h	0
<i>C. albicans</i>	6 h	4
	12 h	9
LPS	6 h	6
	12 h	22

Im Detail waren folgende miRNAs durch die unterschiedlichen Stimuli an den beiden Zeitpunkten 6 und 12 h reguliert:

Tabelle 17: Durch die Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS regulierte miRNAs mit logFold Change in DCs nach 6 und 12 h. Die induzierten miRNAs sind rot und die herunterregulierten miRNAs sind grün hinterlegt.

logFold Change	<i>A. fumigatus</i>		<i>C. albicans</i>		LPS	
	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h
hsa-let-7i-3p						2.203
hsa-miR-129-5p		3.256		3.18		
hsa-miR-129-2-3p		2.746				
hsa-miR-1296-5p						-2.217
hsa-miR-1298-5p						2.776
hsa-miR-132-3p	2.075	2.438	2.375	2.518		
hsa-miR-132-5p	2.161	2.253	2.135	2.392		
hsa-miR-147a				2.905		2.729
hsa-miR-147b				3.465		3.357
hsa-miR-152-5p						1.745
hsa-miR-155-3p					2.702	1.982
hsa-miR-155-5p	1.964	3.954	3.129	4.224	5.352	6.125
hsa-miR-191-3p						-1.578
hsa-miR-203a					3.637	4.116
hsa-miR-203b-3p						2.38
hsa-miR-210-5p						1.36
hsa-miR-212-3p		2.834		2.987		
hsa-miR-212-5p		2.562	2.497	2.512		
hsa-miR-222-3p						1.877
hsa-miR-27a-3p						1.616
hsa-miR-27b-3p						1.516
hsa-miR-29b-1-5p					1.811	
hsa-miR-378a-3p						-0.639
hsa-miR-378i						0.912
hsa-miR-4455					3.533	4.54
hsa-miR-449a						3.477
hsa-miR-449c-5p						3.296
hsa-miR-671-3p						-1.824
hsa-miR-9-5p		2.597		2.728	2.249	3.189

Um die zeitabhängige miRNA-Regulation zu untersuchen wurden Venn-Diagramme der drei Stimuli im Vergleich 6 gegen 12 h erstellt. Hierbei wurde für die beiden Pilze 3 bzw. 4 miRNAs nachgewiesen, die nach 6 h reguliert waren (Abbildung 15A und B). Diese waren auch nach 12 h reguliert, wobei zum späteren Zeitpunkt je 5 weitere miRNAs differentiell reguliert waren. Die Stimulation mit LPS induzierte, wie schon beschreiben die höchste Anzahl an regulierten miRNAs, mit 6 miRNAs nach 6 h und 22 nach 12 h. Hierbei war allerdings eine miRNA, die hsa-miR-29b-1-5p, spezifisch für den frühen Zeitpunkt (Abbildung 15C).

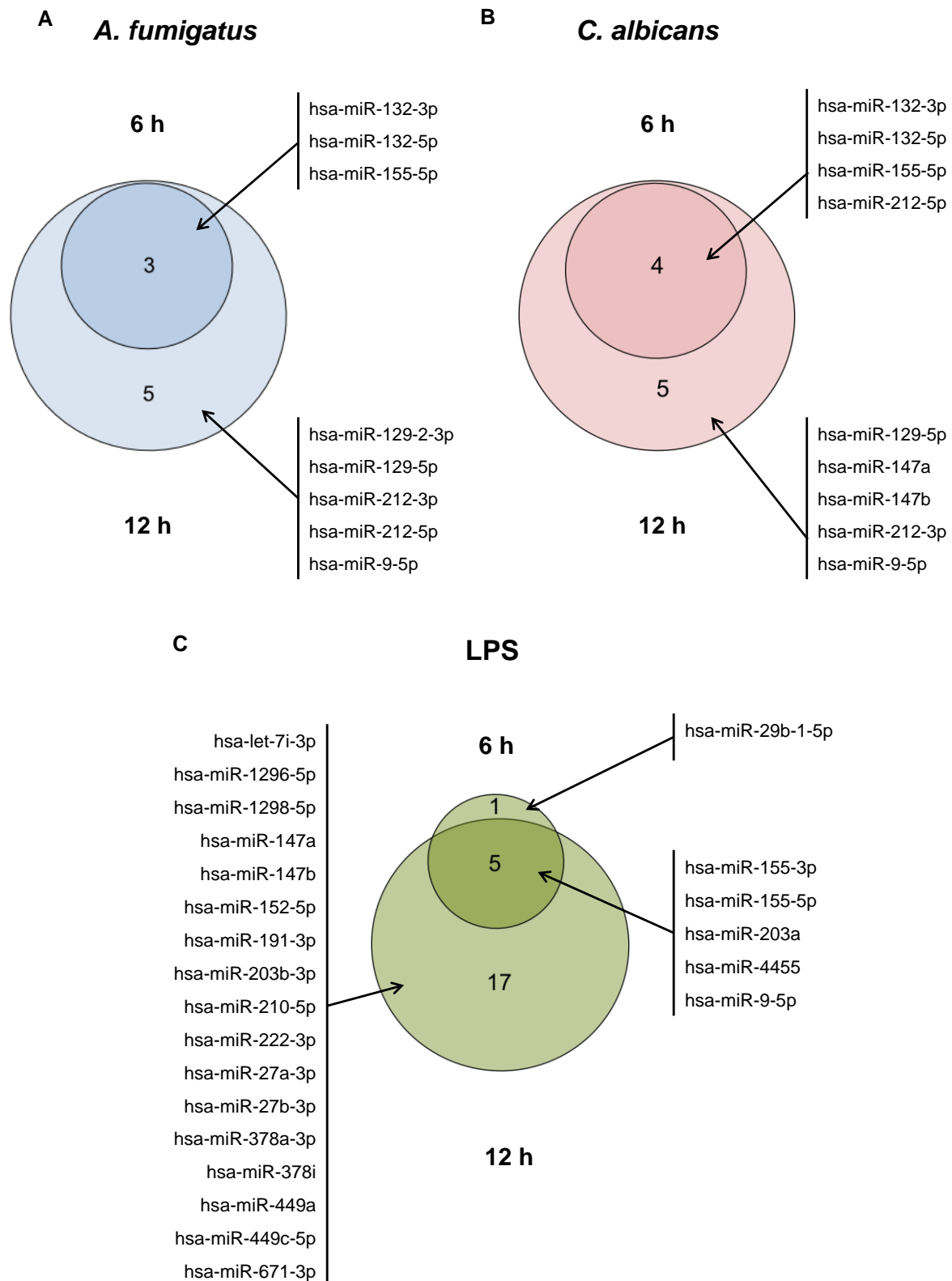


Abbildung 15: Venn-Diagramm, der in DCs durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS regulierten miRNAs im Vergleich 6 gegen 12 h. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 und 12 h ko-kultiviert. Mittels *Next-Generation-Sequencing* wurden regulierte miRNAs identifiziert. A) Venn-Diagramm von *A. fumigatus* stimulierten DCs nach 6 und 12 h. B) Venn-Diagramm von *C. albicans* stimulierten DCs nach 6 und 12 h. C) Venn-Diagramm von LPS stimulierten DCs nach 6 und 12 h.

Von den durch *A. fumigatus* Keimschläuchen, *C. albicans* und LPS regulierten miRNAs in DCs wurden Venn-Diagramme angefertigt, um pilzspezifische miRNAs zu ermitteln. Im ersten Schritt wurde die Zeitabhängigkeit der regulierten miRNAs berücksichtigt. Mit diesem Verfahren wurden miRNAs identifiziert, die eine spezifische Antwort auf eine Stimulation mit den beiden verwendeten Pilzen kennzeichnen. Hierbei war zu erkennen, dass zum frühen Zeitpunkt zwei, beim späteren fünf miRNAs reguliert waren (Abbildung 16).

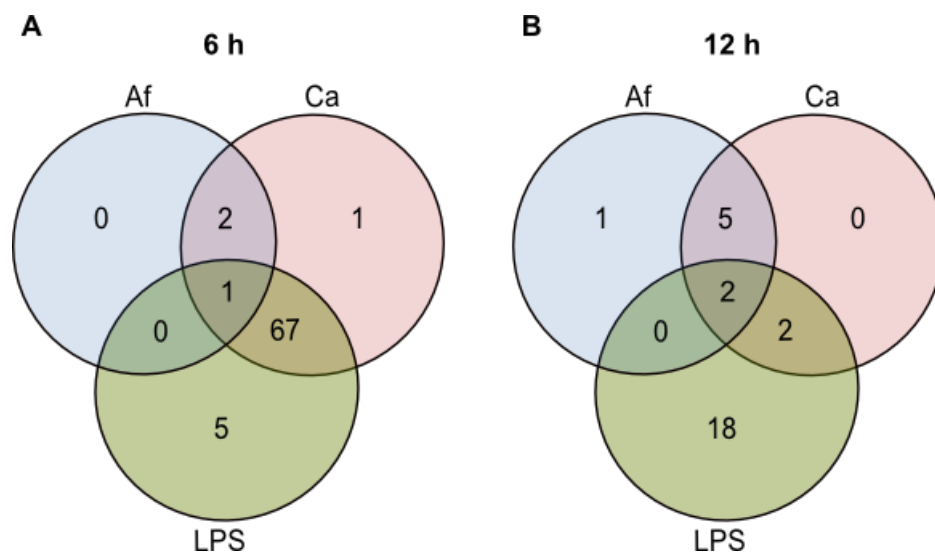
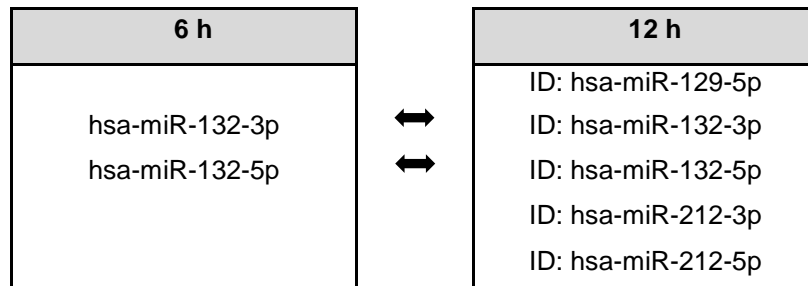


Abbildung 16: Venn-Diagramm differenziell regulierter miRNAs in DCs, ko-kultiviert mit *A. fumigatus*, *C. albicans* oder LPS. DCs wurden am Tag 6 in vier unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) für 6 und 12 h stimuliert und mittels miRNA *Deep Sequencing* analysiert. Die differenziell zu unbehandelten Kontrollen regulierten miRNAs wurden in den einzelnen Bedingungen verglichen und in Venn-Diagramm dargestellt.

Bei den Pilz-spezifischen miRNAs handelt es sich im Detail um die folgenden:

Tabelle 18: MiRNAs, die nach 6 bzw. 12 h in DCs ausschließlich durch *A. fumigatus* und *C. albicans* reguliert wurden, nicht jedoch durch LPS.



Mit Ausnahme der Regulation von miR-132-3p, die bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben wurde (Das Gupta *et al.* 2014), wurde bislang keine dieser miRNAs in Zusammenhang mit *A. fumigatus* oder *C. albicans* beschrieben. Somit konnte die zuvor publizierte miRNA-Regulation von miR-132-3p zum einen bestätigt und noch vier weitere, Pilz-spezifische miRNAs identifiziert werden.

Neben den gemeinsam durch beide Pilze *A. fumigatus* und *C. albicans* regulierte miRNAs, wurden auch für jeden Stimulus eine bzw. mehrere spezifische miRNAs identifiziert:

Tabelle 19: Liste der spezifisch für *A. fumigatus* bzw. *C. albicans* regulierten miRNAs.

<i>A. fumigatus</i>		<i>C. albicans</i>	
6h	12h	6h	12h
	hsa-miR-129-2-3p	hsa-miR-212-5p	

LPS			
6h	12h	6h	12h
hsa-miR-155-3p hsa-miR-203a	hsa-let-7i-3p hsa-miR-1296-5p hsa-miR-1298-5p hsa-miR-152-5p hsa-miR-155-3p hsa-miR-191-3p hsa-miR-203a hsa-miR-203b-3p hsa-miR-210-5p hsa-miR-222-3p	hsa-miR-29b-1-5p hsa-miR-4455 hsa-miR-9-5p	hsa-miR-27a-3p hsa-miR-27b-3p hsa-miR-378a-3p hsa-miR-378i hsa-miR-4455 hsa-miR-449a hsa-miR-449c-5p hsa-miR-671-3p

Um die Sequenzierung zu bestätigen, wurde die Regulation von miR-155-5p und miR-425 mittels RT-PCR überprüft. Die Induktion der miR-155-5p konnte für *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS zeitabhängig bestätigt werden. Zudem wurde die miR-425, eine laut *Sequencing* nicht regulierte miRNA untersucht. Diese zeigte keine Regulation durch die Behandlung von DCs mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS für 6 und 12 h. Somit konnte für diese beiden miRNAs die Regulation in einem exemplarischen Ansatz bestätigt werden.

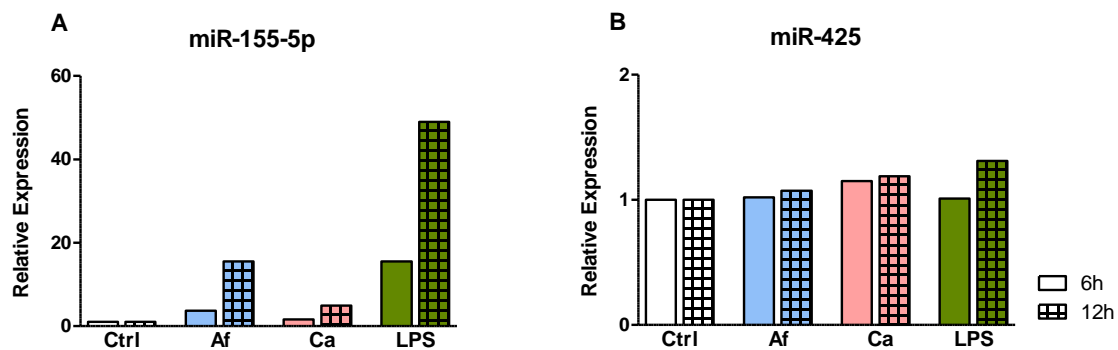


Abbildung 17: Quantifizierung der miR-155-5p und miR-425 mittels RT-PCR in DCs, stimuliert mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS. DCs wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) für 6 (ohne Muster) und 12 h (kariert) stimuliert und mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem exemplarischen Experiment.

4.3.2. Untersuchung des Transkriptoms von *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS-stimulierten DCs

Neben dem miRNA *Deep Sequencing* wurde zudem ein *Transkriptom Profiling* angefertigt, um mögliche Zielgene der regulierten miRNAs zu identifizieren. Hierfür wurden Affymetrix HGU-219 Arrays verwendet. Die isolierte RNA hatte eine durchschnittliche RNA-Integritätsnummer (RIN) von 8.9 ± 0.8 .

4.3.2.1. Hierarchische Clusteranalyse

Zuerst wurden die Signalintensitäten auf ein hierarchisches Klustern untersucht. Bei diesem distanzbasierten Verfahren zur Clusteranalyse wurden die Datensets nach Ähnlichkeit angeordnet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Pilz-stimulierten DC am ähnlichsten verhielten, während sie in der nächsten Ebene mit den LPS-abhandelten DCs klusterten. Am deutlichsten war die Auftrennung aller Stimulationen zu den unbehandelten Kontrollen.

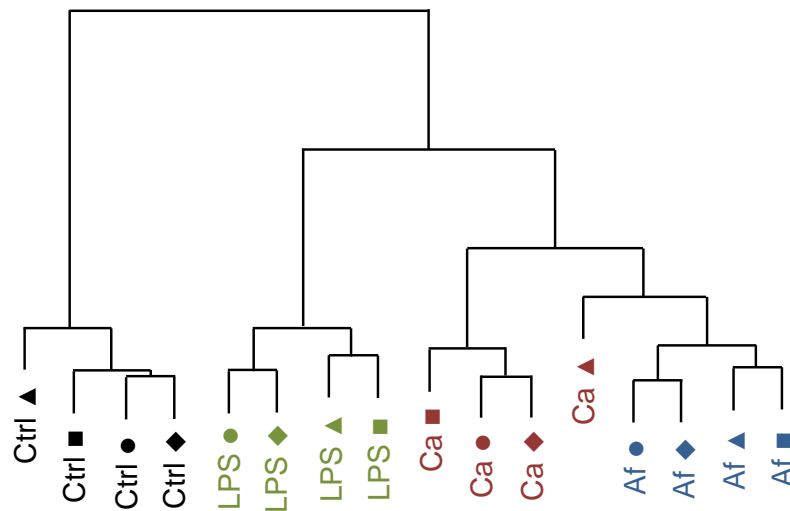


Abbildung 18: Hierarchisches Klustern der differenziell durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS regulierten Gene. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af) (blau), *C. albicans* (Ca)(rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml)(grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 h. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix Microarrays (HGU-219) durchgeführt. Die Symbole kennzeichnen die unterschiedlichen Experimente.

4.3.2.2. Analyse der durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS differenziell exprimierten Gene

Diese Signalintensitäten wurden nun dafür verwendet, differenziell exprimierte Gene zu ermitteln. Alle differenziell regulierte Gene hatten einen *Fold Change* (FC) $|\log_2FC| > 1$ und einen p-Wert ≤ 0.01 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Einzige Ausnahme hierbei war die Auswertung der mit *A. fumigatus* Konidien behandelten DCs. Da durch die Stimulation mit Konidien kaum differenzielle regulierte Gene nachgewiesen werden konnten, wurde ein FC von $|FC| > 1,5$ und ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. Die Stimulation mit LPS induzierte eine Regulation von 2793 Genen nach 6 h und 2627 nach 12 h, während die Konfrontation der DCs mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und *C. albicans* zu 743/1076 und 1729/974 regulierten Genen nach 6 bzw. 12 h führte. Die Stimulation mit Konidien induzierte eine Regulation von 31 Genen nach 12 h.

Für die Signalweganalyse wurde in einem ersten Schritt für *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS eine zeitunabhängige Analyse durchgeführt. Das bedeutet, es wurden alle differenziell

exprimierten Gene, unabhängig von Zeitpunkt, untersucht. Die Anzahl an regulierten Genen ist in der Tabelle 20 als 6+12 h dargestellt.

Tabelle 20: Anzahl differentiell regulierter Gene je Bedingung.

Bedingung		Anzahl regulierter Gene	
<i>A. fumigatus</i>	Keimschläuche	6 h	743
		12 h	1076
		6+12 h	1269
	Konidien	6 h	0
		12 h	31
		6+12 h	2175
<i>C. albicans</i>	6 h	1729	
	12 h	974	
	6+12 h	2175	
LPS	6 h	2793	
	12 h	2627	
	6+12 h	2863	

4.3.2.3. Venn-Diagramme, der durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS differentiell regulierten Gene

Durch die Erstellung von Venn-Diagrammen sollte nun Gene identifiziert werden, welche gemeinsam und welche speziell durch einzelne Behandlungen reguliert waren (Abbildung 19). Mit diesem Verfahren konnten 528 nach 6 h und 729 nach 12 h differentiell regulierte Gene identifiziert werden, die sowohl durch die Stimulation mit LPS als auch durch die verwendeten Pilze reguliert waren. Für *A. fumigatus* wurden 61/136 spezifisch regulierte Gene nachgewiesen, sowie 211/94 für *C. albicans* je nach Zeitpunkt. Dieser Zeitfaktor wurde in Abbildung 19 C eliminiert.

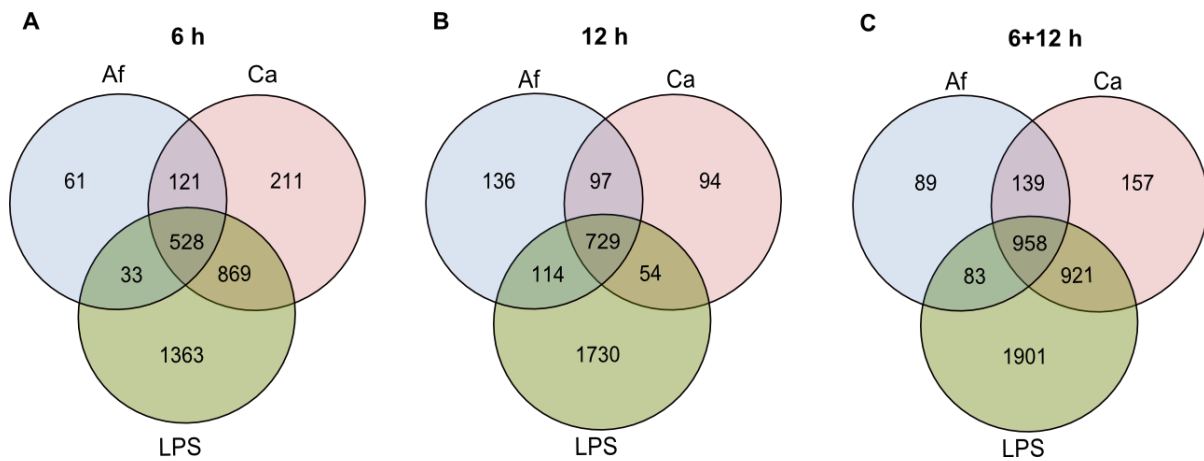


Abbildung 19: Venn-Diagramme, der durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS differenziell regulierten Gene nach 6 und 12 h. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 und 12 h ko-kultiviert. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix *whole genome expression Arrays* (HGU-219) durchgeführt. Venn Diagramme der regulierten Genen nach A) 6 h, B) 12 h und C) 6+12 h.

4.3.2.4. Analyse der zeitunabhängig regulierten Signalwege

Mittels GOrilla Analyse (Gene Ontology enRiChment anaLysis and visualiZation tool) wurden angereicherte GO-Bedingungen identifiziert und regulierte Signalwege identifiziert. Es wurden die Pilz-spezifischen, differenziell regulierten Gene, LPS-spezifischen Gene und gemeinsam durch alle Stimuli regulierten Gene analysiert. Hierfür wurden die 958 zeitunabhängig regulierten Gene der Abbildung 19 C verwendet.

Die Signalweganalyse mittels GOrilla, der gemeinsam durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS regulierten Gene ergab 506 aktivierte Signalwege. Hierbei handelte es sich übergeordnet um die „zelluläre Antwort auf einen externen Stimulus“. Speziell wurde hier auch die „Antwort auf LPS“ angezeigt. Weitere identifizierte Signalwege waren die Regulation der „Antwort auf Stress“, die „Leukozytendifferenzierung“, sowie die Abwehrantwort. Zudem wurde eine inflammatorische Antwort mit der „positiven Regulation der Zytokinproduktion“ und –Sekretion induziert. Hierbei wurden die Signalwege zur Produktion von IL-6, IL-12, IL-2, IFN γ , der TNF-Superfamilie und Chemokinen reguliert, während die Produktion von IL-10 reduziert wurde. Zudem wurden der Serin/Threonin-Kinase-Signalweg, speziell der MAP-Kinase-Signalweg mit Aktivierung der MAPKKK Aktivität und der JNK Kaskade aktiviert. Diese Aktivierung ist mit Genexpression, Zellproliferation und dem programmierten Zelltod assoziiert (Chang und Karin 2001).

Im Bereich der Signaltransduktion wurde neben dem *Toll-like* Rezeptor (TLR) Signalweg auch der JAK-STAT-Signalweg induziert. Die Zellmotilität wurde durch alle drei Stimuli

erhöht. Speziell hierfür wurde die GO-Bedingung der positiven Regulation der Leukozytenmigration erkannt. Die verstärkte Chemokinfreisetzung der DCs führte in allen Bedingungen zu einer positiven Chemotaxis von Leukozyten und NK-Zellen.

Obwohl durch die Behandlung mit LPS die größte Anzahl an regulierten Genen in DCs (1901) identifiziert wurde, wurden nur 162 Signalwege induziert. Bei diesen handelte es sich vor allem um zelluläre, metabolische Prozesse, wie dem Proteinmetabolismus mit Makromolekül- und rRNA-Katabolismus. Hochsignifikant reguliert waren zudem Signalwege zur „Energiebereitstellung über die respiratorische Elektronentransportkette“. Zudem wurde der TOR-Signalweg, der ebenfalls mit Zellmotilität assoziiert ist, induziert (Liu und Parent 2011).

Für die 139 differentiell für beide Pilze regulierten Gene wurden 89 Signalwege gefunden. Kennzeichnend waren hierbei die Zellaktivierung und die „positive Regulation der Zellmigration“ durch die Pilze. Die Signaltransduktion erfolgte laut Auswertung über *Second-messenger* vermittelte Signalwege und über Enzym-gekoppelte Rezeptor-Signalwege. Letzteres induzierte den Tyrosinkinase-Signalweg. Durch die Pilze wurde auch die „Antwort auf einen externen Stimulus“, der jedoch nicht-bakteriellen Ursprungs war, induziert. Über die „Antwort auf Stress“ wurde die Abwehrantwort induziert. Besondere, rein Pilz-spezifische Signalwege wurden hierbei nicht beobachtet.

4.3.2.5. Analyse der Signalwege zum frühen und späten Zeitpunkt

In einer weiterführenden, zeitabhängigen Analyse wurde verglichen, welche Signalwege nur zum frühen Zeitpunkt bzw. späten Zeitpunkt reguliert waren, um Unterschiede zwischen früher und später Immunantwort zu identifizieren. In der frühen durch *C. albicans* und *A. fumigatus* induzierten Pilzantwort wurde zuerst die Signaltransduktion durch Phosphorylierung sowie der Transmembran-Rezeptorprotein-Tyrosinkinase Signalweg induziert. Nur zum frühen Zeitpunkt wurde spezifisch durch die Pilze eine NK-Chemotaxis ausgelöst. Nach 12 h wurde durch beide Pilze eine Regulation der IL-1 und IL-12 Produktion und eine Induktion der Regulation von GM-CSF beobachtet.

Die LPS-behandelten DCs induzierten eine NK-Zell-Chemotaxis sowohl nach 6 als auch nach 12 h. Dafür war die Initiation des TOR-Signalweges und der JAK/STAT Kaskade spezifisch für 6 h. Zudem waren metabolische Prozesse, Genexpressionsregulation, Proteinmodifikationen und die Energiebereitstellung im Vordergrund. LPS induzierte nach 12 h die Regulation der Typ 2-Immunantwort, welche durch Pilze auf Genexpressionsebene weder nach 6 noch nach 12 h initiiert ist. Zudem wurde die Produktion von IL-10 und IL-2 induziert.

Zusammenfassend lässt sich somit für alle Stimuli sagen, dass der frühe Zeitpunkt vor allem durch Signaltransduktion gekennzeichnet war. Der spätere Zeitpunkt zeigte dann die Induktion der inflammatorischen Antwort mit den entsprechenden Zytokinen.

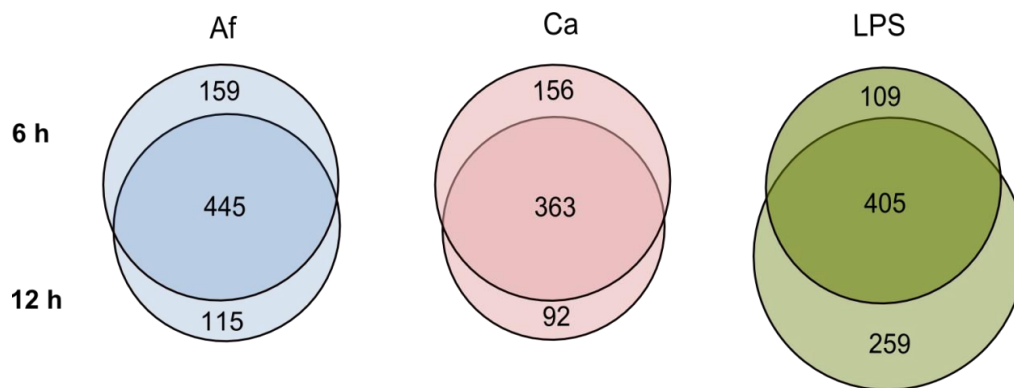


Abbildung 20: Venn-Diagramm der zeitabhängig durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS regulierten Signalwege in DCs. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 und 12 h ko-kultiviert. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix whole genome expression Arrays (HGU-219) durchgeführt.

4.3.3. Identifikation von miRNA Zielgenen

In einer Datenbankabfrage (miRDB und miRanda) wurden potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen überprüft. Hierbei wurden die microRNAs verwendet, die sowohl von *A. fumigatus* als auch von *C. albicans* reguliert waren, nicht aber von LPS.

Die Zielgene wurden dahingehend gefiltert, dass sie entweder in *A. fumigatus* oder in *C. albicans* oder in beiden herunter-reguliert waren ($p < 0.05$, $|\log_2FC| > 1$) und eine negative Korrelation zwischen der microRNA und des Zielgens (mindestens -0.7) vorlag. Bei der Korrelation wurden alle Stimuli, also auch LPS, berücksichtigt.

Die Identifikation der potentiellen miRNA-Zielgene wurde von Andreas Dix, Hans-Knöll-Institut, Jena, Systembiologie und Bioinformatik durchgeführt.

Tabelle 21: Zielgene, der durch *A. fumigatus* und *C. albicans* regulierten miRNAs.

miRNA			mRNA
6h	hsa-miR-132-3p	↑↓	ATP10D ABCG1 BARD1 SAP30L TTC39C
	hsa-miR-132-5p	↑↓	FKBP1B
12h	hsa-miR-129-5p	↑↓	CASP6
	hsa-miR-132-3p	↑↓	MTMR1 SP110 TTC39C
	hsa-miR-132-5p	↑↓	FKBP1B
	hsa-miR-212-3p	↑↓	MTMR1 SP110
	hsa-miR-212-5p	↑↓	DHTKD1 DNPEP IFITM2 SPN TRIM22

Hierbei wird deutlich, dass zum Teil durch die gleichen miRNAs bei den beiden Zeitpunkten unterschiedliche Zielgene reguliert waren. Zudem ist interessant, dass sowohl für die miR-132-3p als auch die miR-212-3p MTMR1 und SP110 als Zielgene beschrieben wurden.

4.3.4. Analyse der regulierten Transkriptionsfaktoren

In einer weiteren Auswertung des Transkriptomts wurden regulierte Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Datenbank Transfac sind alle Transkriptionsfaktoren des Menschen (1896 Gene) gespeichert (Wingender *et al.* 1996). Von diesen waren 302 differentiell reguliert. Um diese Zahl einzuschränken wurden die 528 Gene nach Transkriptionsfaktoren untersucht, die durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS nach 6 h reguliert waren. Hierbei wurden 60 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die differentiell in allen Bedingungen reguliert waren. Diese wurden alle bis auf einen entweder durch LPS und die Pilze induziert bzw. reprimiert (Abbildung 21).

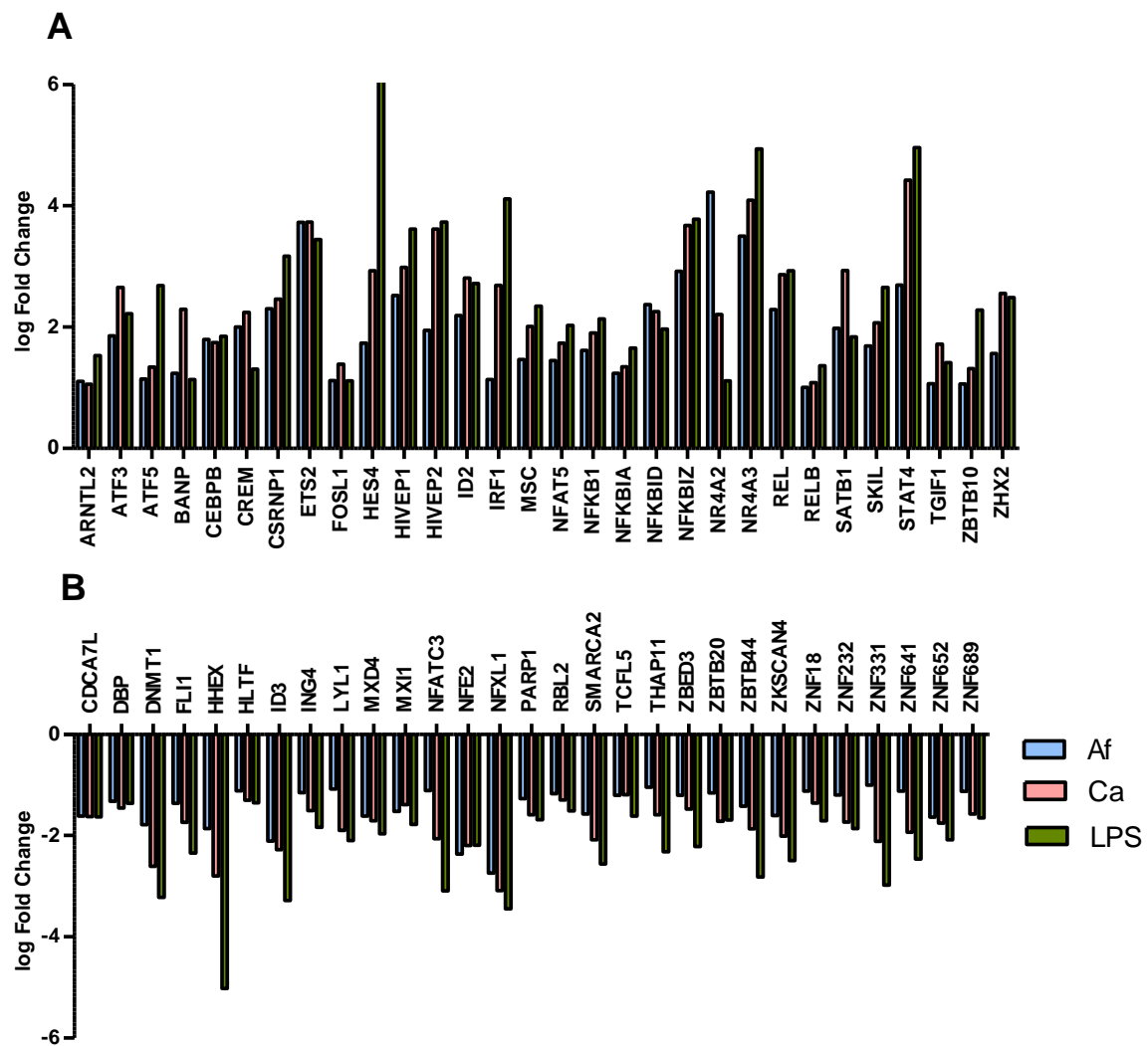


Abbildung 21: Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren in *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS behandelten DCs. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 und 12 h. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix *whole genome expression Arrays* (HGU-219) durchgeführt und mittels Transfac wurden die differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren identifiziert.

4.3.5. Einfluss von *A. fumigatus* und *C. albicans* auf den Transkriptionsfaktor KLF4

Der einzige Transkriptionsfaktor, der durch LPS induziert und durch Pilz hierunterreguliert wurde, war *KLF4* (Abbildung 22). Bei *KLF4* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Inflammation zugeschrieben wird (Feinberg *et al.* 2005, Rosenzweig *et al.* 2013). Dieses Gen wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen mit

einem *Fold Change* von -6 und -11,3 durch *A. fumigatus* und *C. albicans* reduziert. LPS jedoch induzierte das Gen mit einem *Fold Change* von 3.3. Nach 12 h war *KLF4* nicht mehr signifikant reguliert.

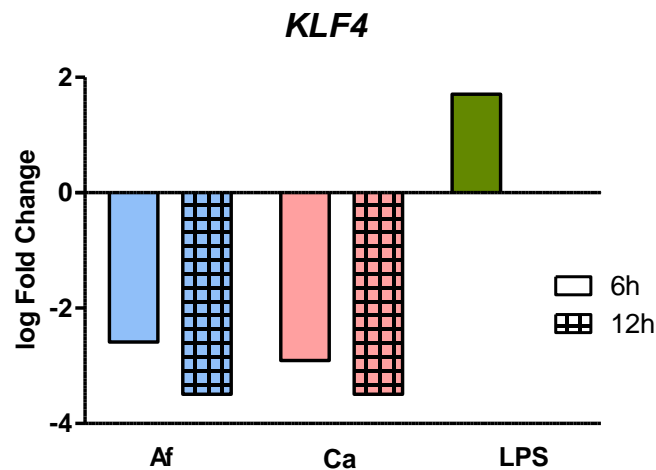


Abbildung 22: logarithmische Fold Changes von *KLF4* in *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs nach 6 und 12 h. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af, blau), *C. albicans* Hyphen (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 µg/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 (ohne Muster) und 12 h (kariert). Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix *whole genome expression Arrays* (HGU-219) durchgeführt. Dargestellt sind die ermittelten logFold Changes der *KLF4* mRNA.

KLF4 wurde nicht nur auf Transkriptebene sondern auch auf Proteinebene analysiert. Hierbei zeigte sich deutlich, dass *KLF4* zeitabhängig durch die Stimulation mit *A. fumigatus* und *C. albicans* in DCs reduziert wurde. Diese Reduktion war nach 12 h Ko-Kultur signifikant. Zudem konnte eine Induktion durch LPS auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

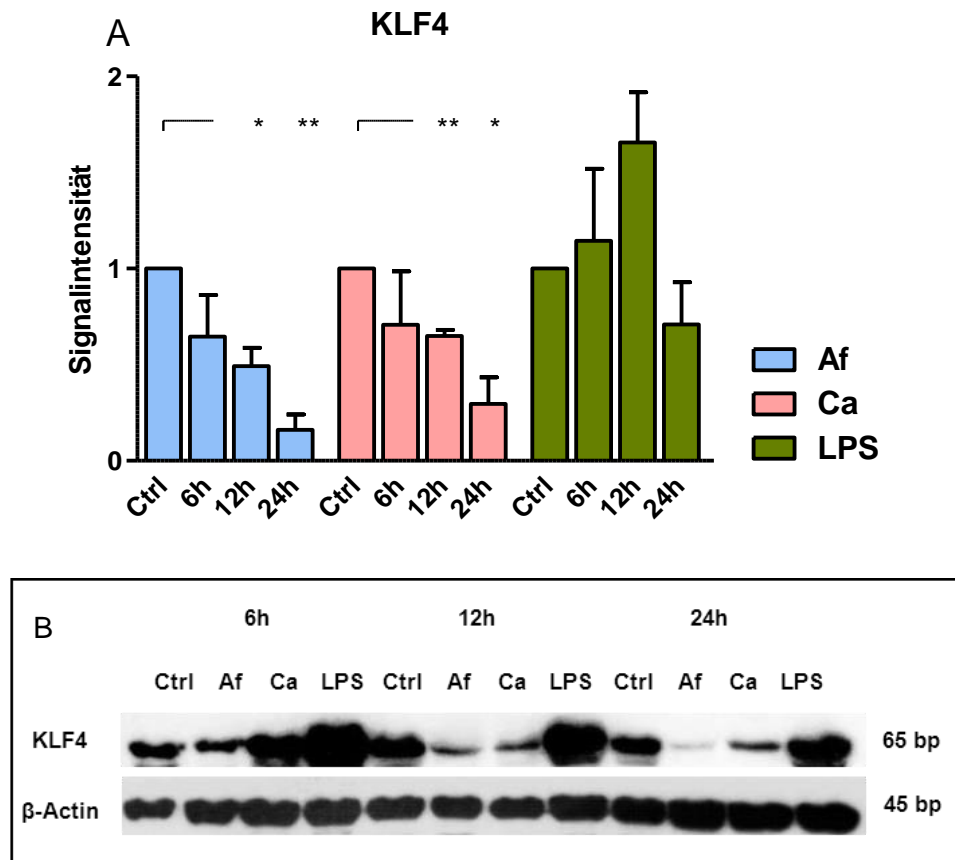


Abbildung 23: Zeitabhängige KLF4-Regulation von *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs. Komplettzelllysate wurden mittels Western Blot auf den Proteingehalt von KLF4 in DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot)(beide MOI 1) oder LPS (grün, 1 μ g/ml) für 6, 12 und 24 h. A) Analyse der KLF4 Proteinmenge mittels ImageJ, relativ zum Referenzprotein β -Aktin und normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. B) Exemplarischer Western Blot eines Experiments.

4.3.5.1. Untersuchung zur TLR-abhängigen Regulation von KLF4

DCs tragen sogenannte *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRR) auf ihrer Oberfläche anhand derer Pathogenmuster erkannt werden. Klassischerweise wird davon ausgegangen, dass *A. fumigatus* und *C. albicans* hauptsächlich durch die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 2 und 4 sowie Dectin-1 erkannt werden. Um zu analysieren, durch welche PRR KLF4 reguliert wird, wurden DCs mit unterschiedlichen Reagenzien stimuliert. Diese aktivieren spezifisch einzelne PRR. So wurde LPS und LPS ultra-rein (up) eingesetzt. Diese binden an TLR4 und TLR4/TLR2. Zudem wurden der TLR2/TLR1 Agonist Pam3CSK4, ein synthetisch triacetyliertes Lipopeptid, und depletiertes Zymosan eingesetzt, das einen reinen Dectin-1 Agonisten darstellt.

Die relative Expression von *KLF4* wurde mittels RT-PCR untersucht und dabei die zuvor gezeigte Induktion (Abbildung 22) durch LPS bestätigt. Diese Induktion war auch durch LPS ultra-rein signifikant. Interessanterweise führte eine Stimulation der DCs mit Pam3CSK4 und depletiertem Zymosan zu einer statistisch signifikanten Reduktion der *KLF4*-Expression.

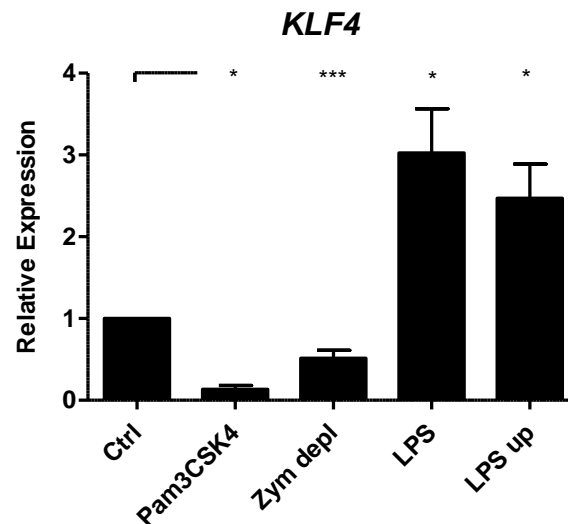


Abbildung 24: TLR-abhängige Regulation von *KLF4* in DCs. DCs wurden am Tag 6 mit LPS, LPS ultra-rein (LPS up, 1 µg/ml), Pam3CSK4 (100 ng/ml) und depletiertes Zymosan (Zym depl, 100 µg/ml) für 6 h stimuliert und die *KLF4*-Regulation mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

In einem weiteren Schritt wurde die Regulation von *KLF4* in Abhängigkeit von PRR-Liganden auch auf Proteinebene analysiert. Hierbei konnte eine signifikante Induktion durch LPS und LPS ultra-rein nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite war eine deutliche und signifikante Reduktion durch Pam3CSK4 zu beobachten. Durch depletiertes Zymosan wurde *KLF4* auf Proteinebene ebenfalls reduziert, aber aufgrund des hohen Standardfehlers ist diese Reduktion nicht signifikant.

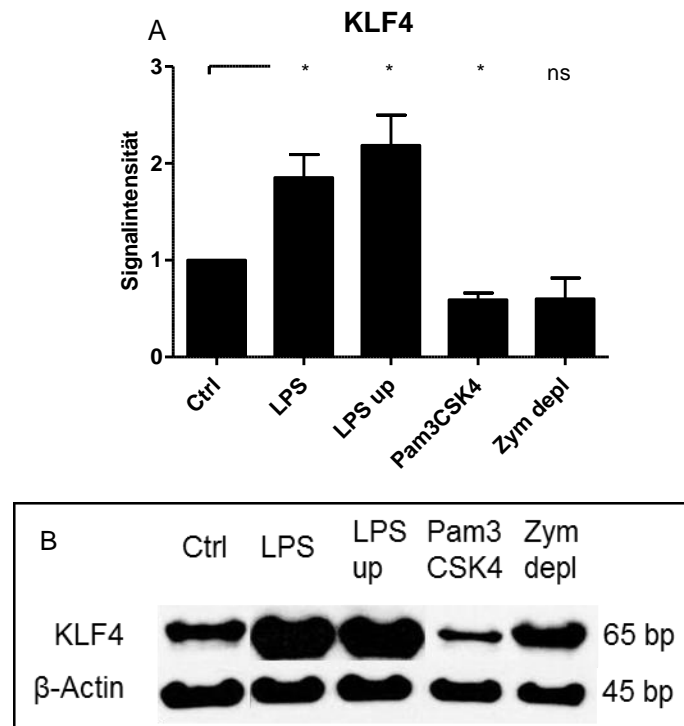


Abbildung 25: TLR-abhängige Regulation von KLF4 in DCs. DCs wurden entweder mit mit LPS (1 µg/ml), LPS ultra-rein (LPS up, 1 µg/ml), Pam3CSK4 (100 ng/ml) und Zymosan depleted (Zym depl, 100 µg/ml) in fünf unabhängigen Experimenten für 12 h ko-kultiviert. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot mit einem anti-KLF4 Antikörper analysiert. Die gemessenen Signalintensitäten wurden relativ zum Referenzprotein β-Aktin und zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Zudem wurde ein exemplarischer Western Blot abgebildet.

4.3.5.2. Untersuchungen zur RNA-Interferenz von *KLF4*

Um Zielgene der Transkriptionsfaktors KLF4 zu identifizieren wurde *KLF4* mittels RNA-Interferenz inhibiert. Hierfür wurde die Target-siRNA und Kontroll-siRNA (ns) via Elektroporation in die Zellen eingebracht. Durch das Einbringen der Target-siRNA konnte *KLF4* um 75% relativ zur Behandlung mit Kontroll-siRNA reduziert werden.

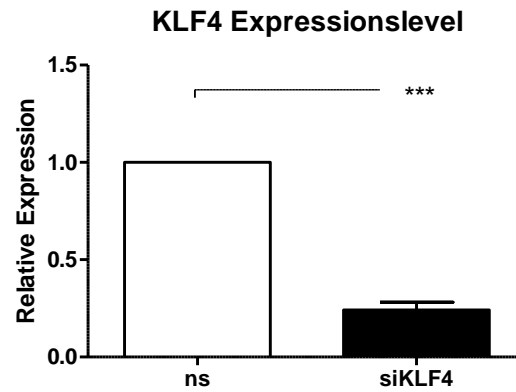


Abbildung 26: Relative Quantifizierung von *KLF4* in siKLF4-RNA elektroporierten DCs. DCs wurden am Tag 5 mittels Elektroporation mit siRNA gegen *KLF4* (schwarz) und einer Kontroll-siRNA (weiß) transfiziert. Nach 24 h wurde *KLF4* relativ quantifiziert durch pPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten relativ zum Referenzgen *Alas* und normiert auf die Kontroll-siRNA.

Dieser *knock-down* wurde ebenfalls auf Proteinebene analysiert. Hierfür wurden mit Target-siRNA und Kontroll-siRNA elektroporierte DCs für 12 h mit *A. fumigatus* Keimschläuchen, *C. albicans* und LPS behandelt. Hierbei wurden hoch-signifikante Reduktionen von 70 bis zu 90% von siKLF4 behandelten Zellen in allen Bedingungen nachgewiesen.

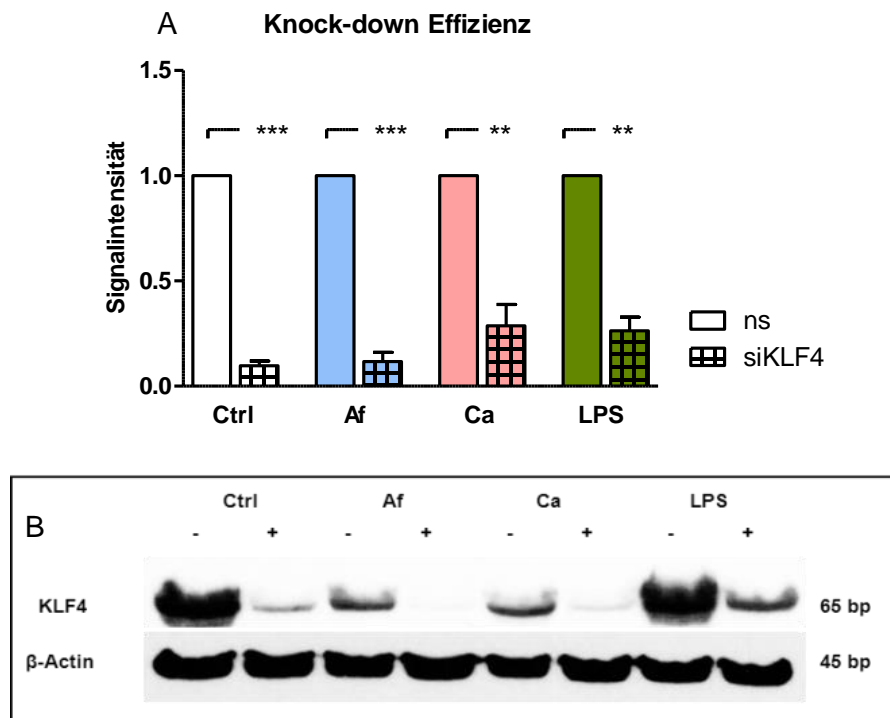


Abbildung 27: Relative Quantifizierung von KLF4 in siKLF4-RNA elektroporierten DCs. DCs wurden am Tag 5 mittels Elektroporation mit siRNA gegen KLF4 (kariert) und einer Kontroll-siRNA (ohne Muster) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) für 12 h ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Ctrl, weiß). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten relativ zum Referenzprotein β-Aktin und normiert auf die Kontroll-siRNA. Zudem wurde ein exemplarischer Western Blot dargestellt.

4.3.5.3. Analyse der KLF4-abhängigen Regulation von Zielgenen

Nach der erfolgreichen Etablierung des KLF4 *knock-downs* wurden potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors analysiert. Hierfür wurde in einer ausgiebigen Literaturrecherche die möglichen Ziele CCL2, RANTES, CXCL10, TNF und IL-6 mit einem immunrelevanten Bezug identifiziert (Guan *et al.* 2010, Hamik *et al.* 2007, Kaushik *et al.* 2010, Liao *et al.* 2011, Liu *et al.* 2012, Liu *et al.* 2007, Rosenzweig *et al.* 2013). Für die ersten Drei wurde kein Einfluss der *KLF4*-RNA-Interferenz auf die Expression festgestellt. Nur für TNF konnte eine geringe Reduktion in den LPS-stimulierten DCs beobachtet werden.

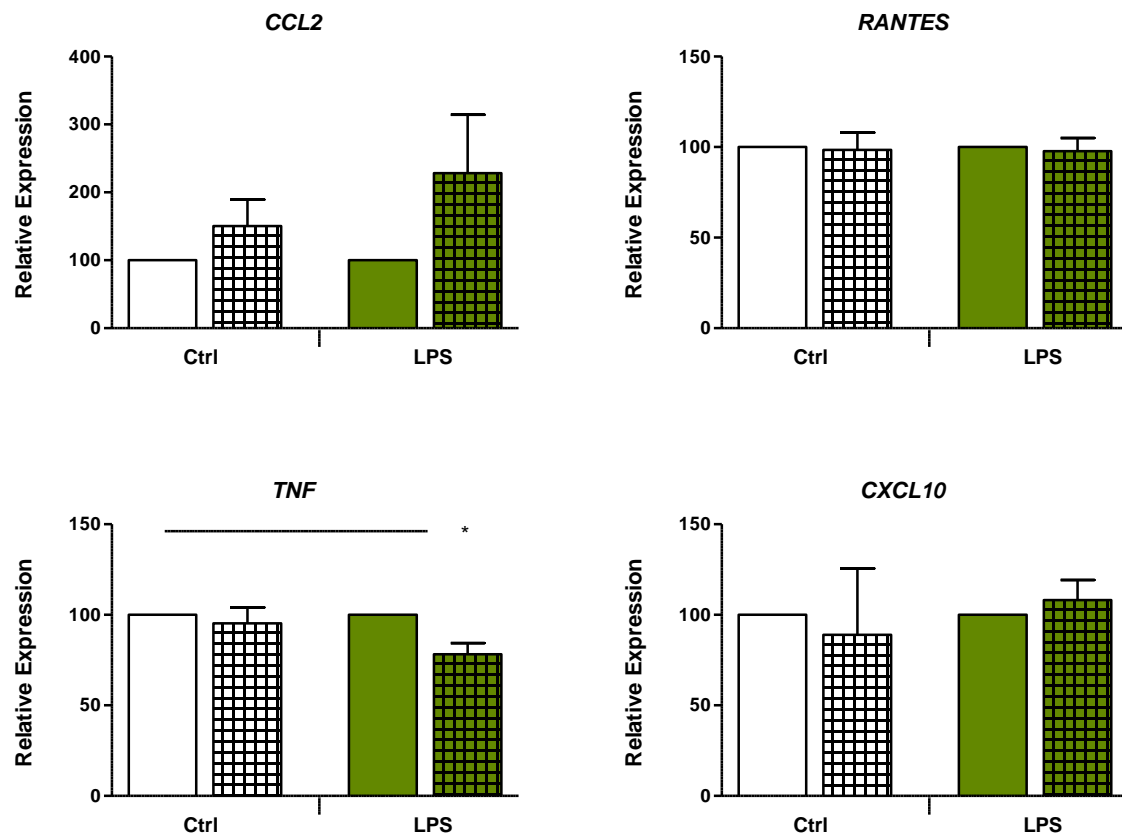


Abbildung 28: Relative Quantifizierung potentieller KLF4-Zielgene *CCL2*, *RANTES*, *TNF* und *CXCL10* in siKLF4-RNA elektroporierten DCs. DCs wurden am Tag 5 mittels Elektroporation mit siRNA gegen KLF4 (kariert) und einer Kontroll-siRNA transfiziert (ohne Muster). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit LPS für 12 h ko-kultiviert (grün). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Ctrl, weiß). Nach 24 h wurden *RANTES*, *TNF*, *CCL2* und *CXCL10* relativ durch qPCR quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten relativ zum Referenzgen Alas und normiert auf die Kontroll-siRNA.

Bei IL-6, einem Interleukin, das die Entzündungsreaktion reguliert, konnte in den unbehandelten Zellen und in den mit Pilz behandelten DCs keine leichte, nicht-signifikante Reduktion gezeigt werden. Eine deutliche KLF4-abhängige Reduktion von über 50% wurde allerdings in den LPS behandelten DCs gezeigt. Dieser Einfluss von KLF4 auf IL-6 war sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erkennbar.

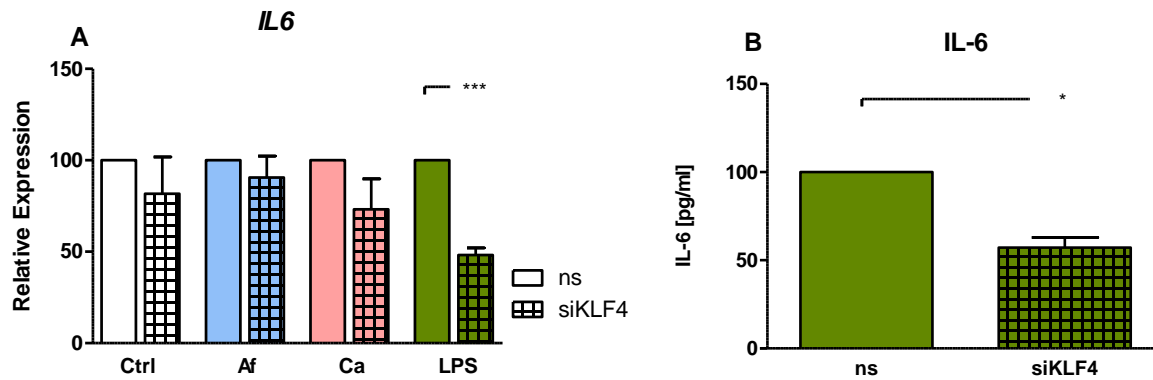


Abbildung 29: Relative Quantifizierung von *IL6* und IL-6 in siKLF4-RNA elektroporierten DCs. DCs wurden am Tag 5 mittels Elektroporation mit siRNA gegen *KLF4* (schwarz) und einer Kontroll-siRNA (weiß) transfiziert. A) 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml grün) für 12 h ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Ctrl, weiß). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten relativ zum Referenzgen Alas und normiert auf die Kontroll-siRNA. B) In den zellfreien Überständen wurde das freigesetzte IL-6 von LPS stimulierten DCs mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die ns-Kontrolle.

4.3.5.4. Genexpression und Sekretion von IL-6 durch DCs

Die IL-6-Induktion durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS wurde nun in nicht-elektroporierten DCs untersucht. Dabei wurde eine starke *IL6*-Genexpression und IL-6-Sekretion durch LPS beobachtet, während *A. fumigatus* und *C. albicans* eine geringere Induktion der IL-6-Freisetzung aufwiesen.

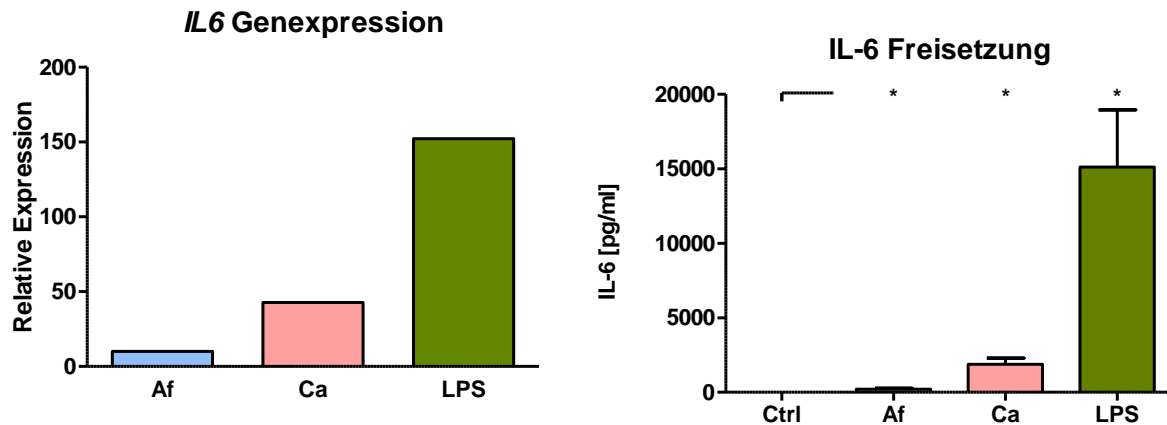


Abbildung 30: IL6/IL-6 Antwort von *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs. DCs von vier unabhängigen Experimenten wurden mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) (beide MOI 1) oder LPS (1 µg/ml, grün) für 6 h stimuliert. A) *IL6*-mRNA-Regulation ermittelt mittels Microarray-Analyse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. B) Freigesetztes IL-6 wurde mittels IL-6 ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.3.6. Einfluss von *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS auf SYK

Bei der *Spleen Tyrosine Kinase* SYK handelt es sich um ein Bestandteil der Dectin-1- und TLR2 Signalwege (Rogers *et al.* 2005, Romani 2011). Die Tyrosinkinase ist an der Immunantwort gegen *C. albicans* und *A. fumigatus* beteiligt (Ramirez-Ortiz und Means 2012, Whitney *et al.* 2014). Ein Einfluss auf die Zytokinantwort von DCs wurde durch einen SYK *-/- knock-out* nachgewiesen und auch Enzym-gekoppelte Rezeptor-Signalwege, die den Tyrosinkinase-Signalweg induzieren, wurden in der Signalweganalyse identifiziert (Abschnitt 4.3.2.4) (Rogers *et al.* 2005). Daher wurde die SYK-Regulation auf RNA- und Proteinebene untersucht. Sowohl die Stimulation mit LPS als auch den Pilze führten zu einer Reduktion in der SYK-mRNA Expression in DCS. Diese Herunterregulierung war für die Pilze nicht zeitabhängig. Bei LPS wurde ein Einfluss der Ko-Kulturdauer beobachtet. Allgemein war die Reduktion durch LPS am stärksten (Abbildung 31 A). Im nächsten Schritt sollte diese Beobachtung auch auf Proteinebene gezeigt werden. Hierfür wurden Western Blots angefertigt (Abbildung 31 B). Es wurde keine Reduktion der Proteinmenge durch die Stimulation mit *A. fumigatus*, *C. albicans* oder LPS beobachtet. Die vermeintlich leichte Reduktion durch LPS, die nach 6 h auf dem Western Blot sichtbar ist, war durch weitere Experimente nicht zu bestätigen.

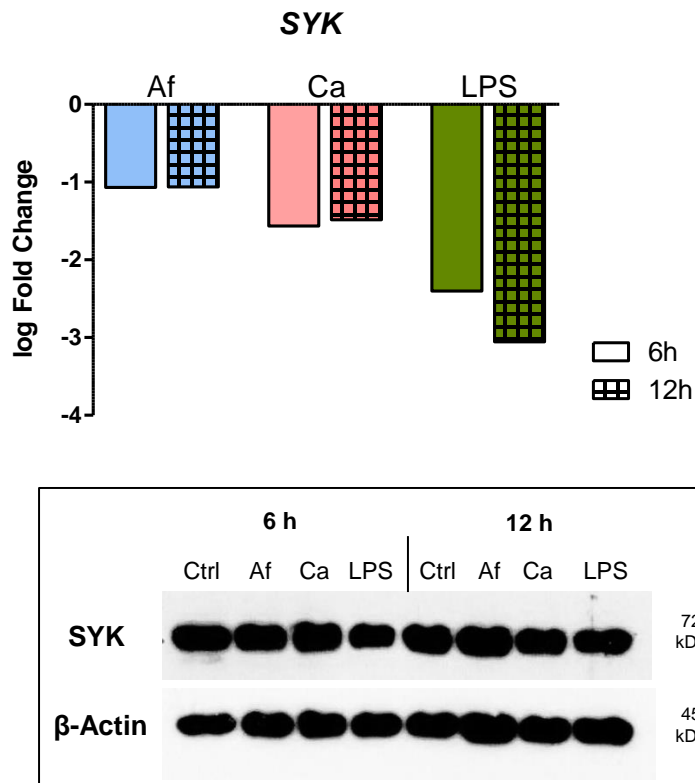


Abbildung 31: Zeitabhängige SYK/SYK Expression von *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs. A) Darstellung der Fold Changes von SYK in DCs, die durch Microarray-Analysen ermittelt wurden. DCs wurden entweder mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (Af, blau), *C. albicans* Hyphen (Ca, rot), beide MOI 1, oder mit LPS (1 μ g/ml, grün) in vier unabhängigen Experimenten für 6 (ohne Füllung) und 12 h (kariert). Dargestellt sind die ermittelten Fold Changes der Transkriptomanalyse von SYK. B) Komplettzelllysate wurden mittels Western Blot auf den Proteingehalt von SYK in DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* (Af), *C. albicans* (Ca, beide MOI 1) oder LPS (1 μ g/ml) für 6 und 12 h untersucht. Es ist ein exemplarischer Western Blot abgebildet.

4.3.7. Microarray-Validierung, der mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS-stimulierten DCs

Um die Microarray Ergebnisse zu bestätigen, wurden von ausgewählten Genen Kontroll-qPCRs durchgeführt. Hierbei war die Reduktion der *KLF4*-Expression durch die Pilze *A. fumigatus* und *C. albicans* deutlich zu erkennen, während LPS *KLF4* nur nach 6 h leicht induzierte. SYK wurde durch alle Stimuli reduziert, während *IL1B* induziert wurde. Durch hohe Standardabweichungen war die Induktion für *IL1B* oftmals nicht statistisch signifikant. *IL6* wurde durch LPS am stärksten, aber aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant induziert. Auch die Pilze induzierten die *IL6* Genexpression, doch deutlich geringer im Vergleich zu LPS. *RANTES* wurde durch die drei Stimuli stark, aber mit hoher

Standardabweichung induziert. Die in der RT-PCR nachgewiesenen Regulationen bestätigen somit die Microarray-Ergebnisse.

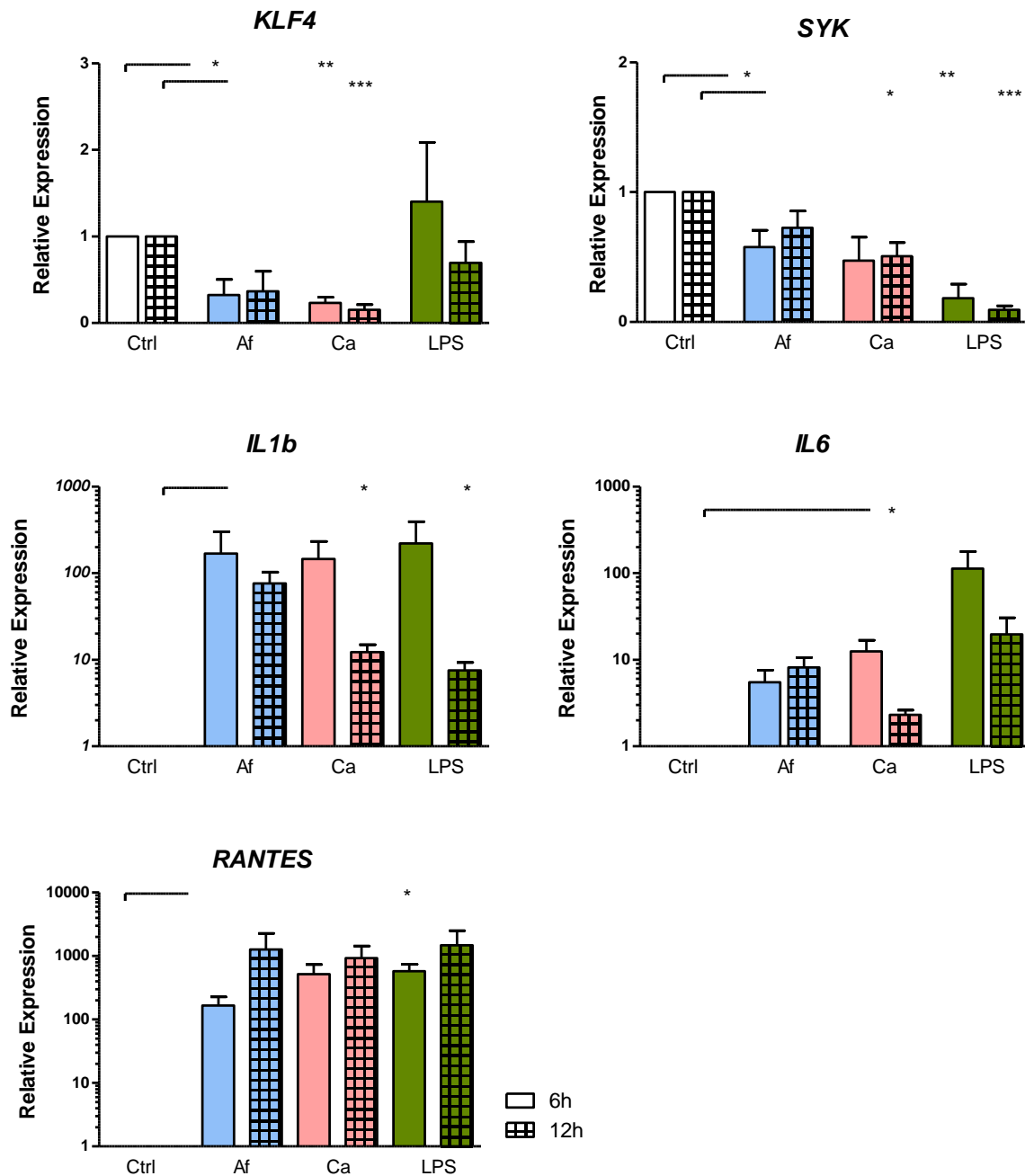


Abbildung 32: Array Validierung mittels qPCR. DCs von vier unabhängigen Experimenten wurden mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) (beide MOI 1) oder LPS (1 µg/ml grün) für 6 h (ohne Muster) und 12 h (kariert) stimuliert. Analyse der Regulation von *KLF4*, *SYK*, *IL1B*, *IL6* und *RANTES* mittels qPCR. Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler.

4.4. Untersuchung der Reifung von DCs

4.4.1. Einfluss von *A. fumigatus* Keimschläuchen, *C. albicans* und LPS auf die DC-Reifung

Die Reifung der DCs wurde anhand der Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Hierfür wurden die Marker CD40, CD83, CD86 und HLA-DR gewählt. Bei CD40 handelt es sich um ein ko-stimulatorisches Protein, das auf unreifen DCs konstitutiv exprimiert wird. Bei der Differenzierung zu reifen DCs wird dieses Molekül zusätzlich hochreguliert (Ma und Clark 2009). Da es auf DCs bereits vorhanden ist, wurde daher nicht mit „Prozent-Positive DCs“ ausgewertet, sondern mit dem geometrischen Mittel (*Geo Mean*) der Fluoreszenz. CD83, CD86 und HLA-DR wurden als Prozent-positive Zellen angegeben. Diese Marker werden von unreifen DCs nur schwach exprimiert, während sie bei einer Reifung verstärkt auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

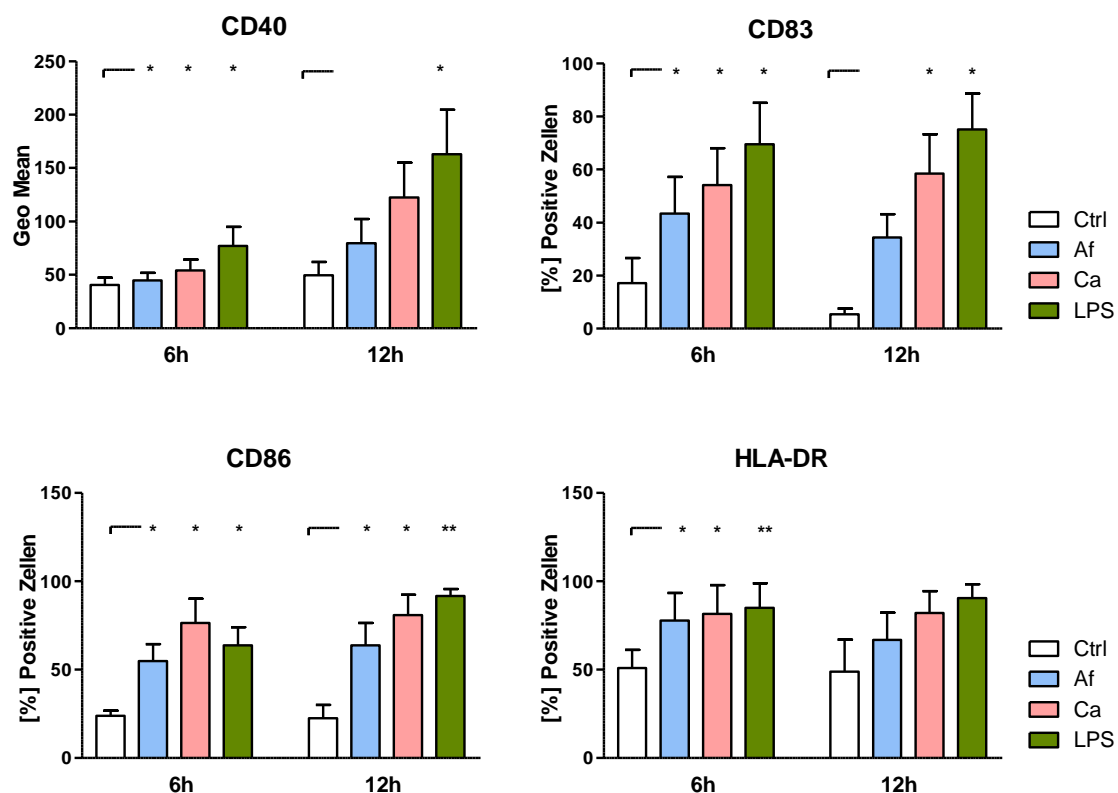


Abbildung 33: Oberflächenexpression von Reifemarkern auf DCs, stimuliert mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS. DCs wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie auf Positivität für die Marker CD40, CD83, CD86 und HLA-DR im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (weiß) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.4.2. Einfluss von *A. fumigatus* Konidien auf die DC-Reifung

Neben Keimschläuchen wurden auch Konidien von *A. fumigatus* verwendet und die Reifung der DCs analysiert. Hierfür wurde, wie zuvor, die Oberflächenexpression von CD40, CD83, CD86 und HLA-DR untersucht. Im Gegensatz zu den verwendeten Keimschläuchen (Abbildung 33) wurde durch die Konidien keine Induktion in der Oberflächenexpression der Reifemarker CD40, CD83, CD86 und HLA-DR induziert.

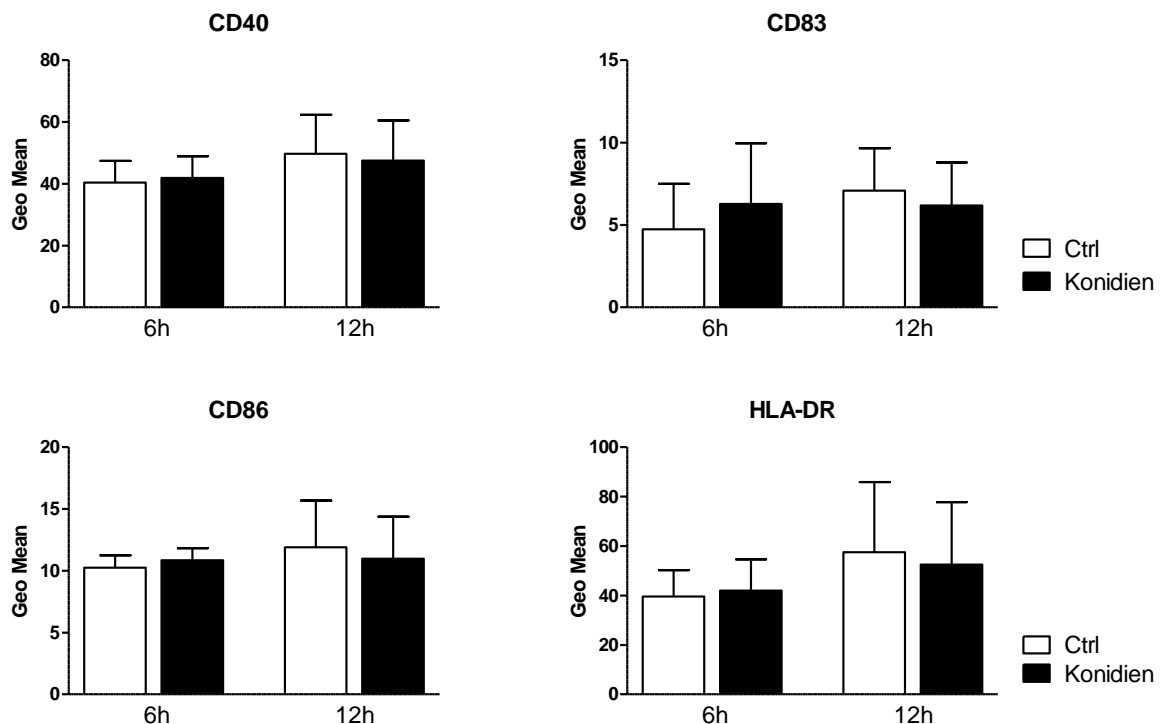


Abbildung 34: Oberflächenexpression von Reifemarkern auf DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* Konidien. DCs wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* Konidien (schwarz) stimuliert. Als Negativkontrolle (Ctrl) dienten unbehandelte Zellen (weiß). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Positivität für die Marker CD40, CD83, CD86 und HLA-DR im Geo Mean analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.5. Untersuchung des Zytokinprofils der mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS stimulierten DCs

4.5.1. Analyse der durch *A. fumigatus* Keimschläuche, *C. albicans* und LPS induzierten Zytokinantwort von DCs

Eine der Hauptaufgaben der DCs ist die Zytokinfreisetzung. Daher wurde ein Zytokinprofil der DCs, die für 6 und 12 h mit *A. fumigatus* Keimschläuchen, *C. albicans* und LPS kultiviert wurden, mittels Multiplex-ELISA erstellt. Hierbei wurden die zellfreien Zellüberstände auf sezernierte Zytokine analysiert. Vor allem proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-8 wurden induziert. Aber auch IL-1A und B wurden in signifikanten Konzentrationen freigesetzt. In den meisten Analyten war ein zeitabhängiger Effekt erkennbar. Auch Interferon γ (IFN γ), ein Zytokin, das von NK-Zellen sezerniert wird, wurde in den Überständen der stimulierten DC in geringer, aber signifikanter Konzentration nachgewiesen (Abbildung 35).

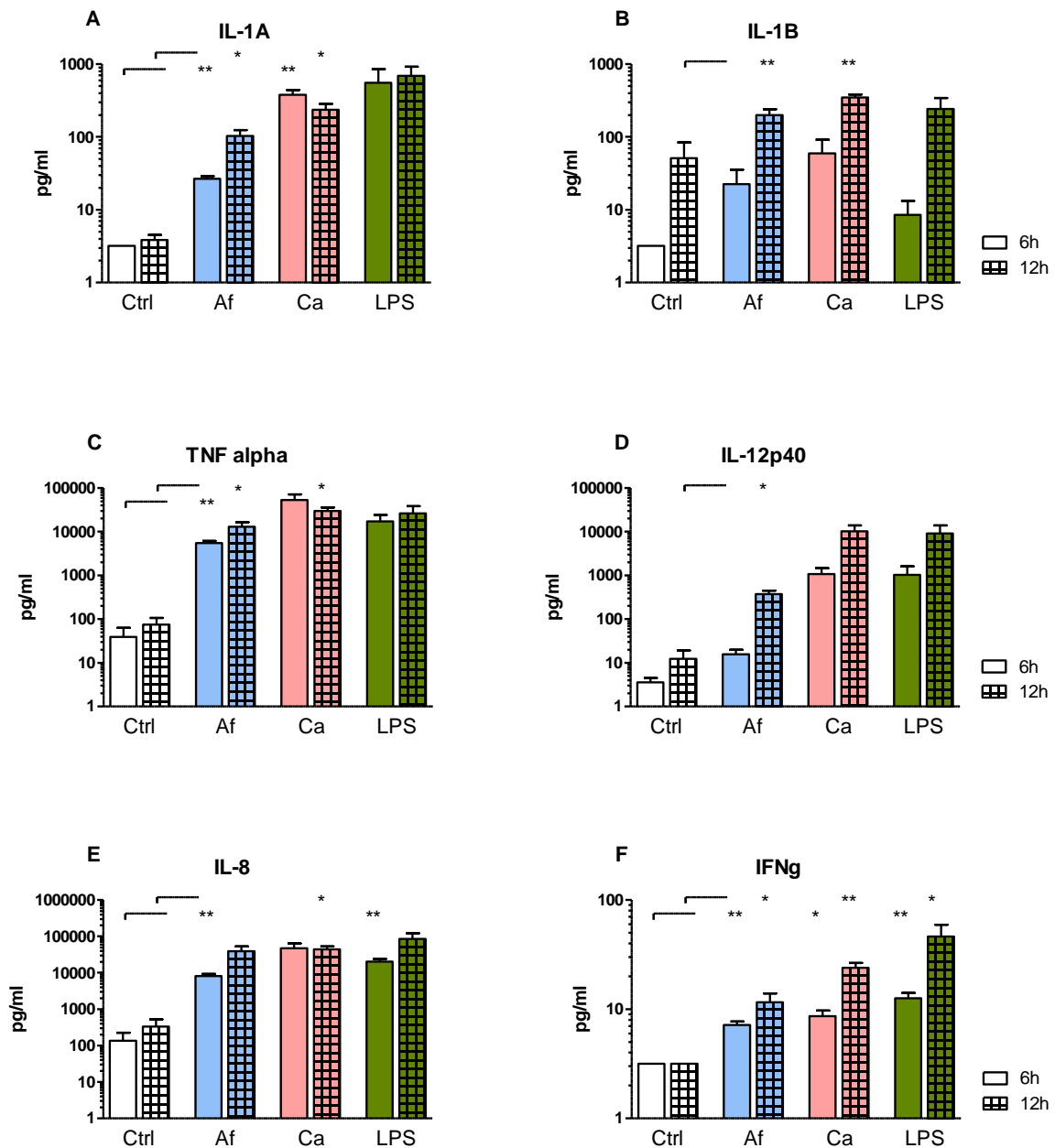


Abbildung 35: Proinflammatorische Zytokinfreisetzung von DCs nach Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS. DCs wurden am Tag 6 in vier unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) für 6 (ohne Muster) und 12 h (kariert) stimuliert und mittels ELISA auf die Zytokinfreisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ctrl, weiß) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Auch die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde induziert, jedoch war diese Induktion nur bei der *A. fumigatus*-Ko-Kultur für 6 h signifikant, während dies in allen weiteren Bedingungen aufgrund der hohen Spendervariabilität nicht der Fall war (Abbildung 36A). Bei IL-1RA handelt es sich um den Interleukin-1 Rezeptorantagonisten. Dieser Antagonist bindet wie IL-1 an den Interleukin-1 Rezeptor und ist somit ein Inhibitor für den

proinflammatorischen Effekt von IL-1 β (Abbildung 36B). IL-1-RA wurde sowohl durch die Pilze als auch durch LPS signifikant induziert. Die Induktion durch LPS nach 6 h war jedoch noch nicht signifikant. Hier ist deutlich eine zeitabhängige Zunahme der IL-1-RA Freisetzung gezeigt.

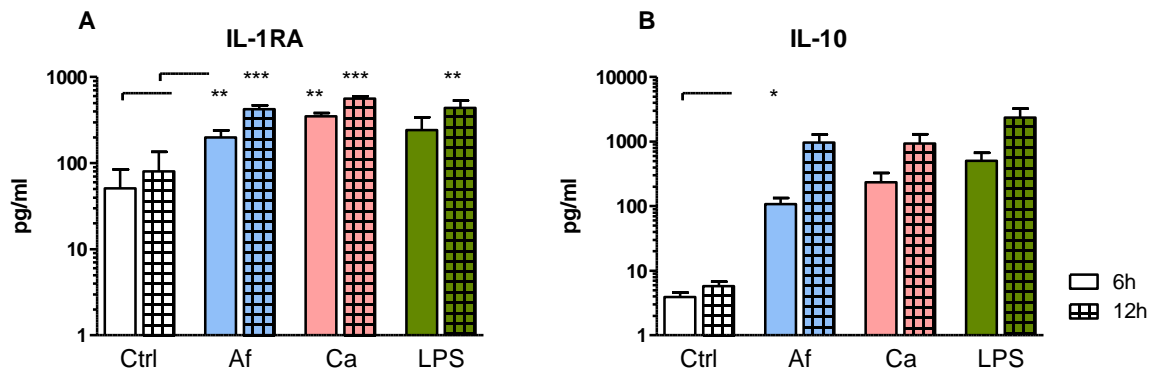


Abbildung 36: Antiinflammatorische Zytokinfreisetzung von DCs nach Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS. DCs wurden am Tag 6 in vier unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 μ g/ml, grün) für 6 (ohne Muster) und 12 h (kariert) stimuliert und mittels ELISA auf die Zytokinfreisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ctrl, weiß) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Neben pro- und antiinflammatorischen Molekülen wurden auch so genannte Chemokine nachgewiesen (Abbildung 37). Ihre Hauptaufgabe ist die Chemotaxis weiterer Immunzellpopulationen. RANTES (CCL5) hat eine chemotaktische Wirkung auf T-Zellen, Eosinophile, NK-Zellen, Mastzellen und Basophile und bringt diese an den Ort der Infektion (Levy 2009). RANTES wurde sowohl durch die Pilze, als auch durch LPS induziert, wobei die Induktion durch LPS am stärksten war.

Bei MCP-1, dem *Monocyte Chemoattractant Protein*, handelt es sich um ein chemotaktisches Molekül für Monozyten. Dieses wurde in allen Bedingungen leicht induziert, ein signifikanter Effekt wurde allerdings nur bei der Ko-Kultur mit *C. albicans* nachgewiesen (Abbildung 37B). Die *macrophage inflammatory proteins* MIP-1a und MIP-1b rekrutieren und aktivieren polymorphonukleäre Leukozyten. Sie wurden sowohl durch die Pilze als auch LPS induziert (Abbildung 37C-D). Eotaxin (CCL11) rekrutiert Eosinophile, Basophile, Th2-Lymphozyten und Mastzellen (Menzies-Gow *et al.* 2002) und wurde nur schwach, aber dafür zum Teil hoch signifikant induziert (Abbildung 37E). Die Ko-Kultur mit *C. albicans* induzierte eine signifikante Freisetzung von *Granulocyte colony-stimulation factor* G-CSF, einem wichtigen

Regulator für die Produktion von Neutrophilen (Beekman und Touw 2010). Obwohl es durch LPS am stärksten sezerniert wurde, war diese Induktion nicht signifikant (Abbildung 37F).

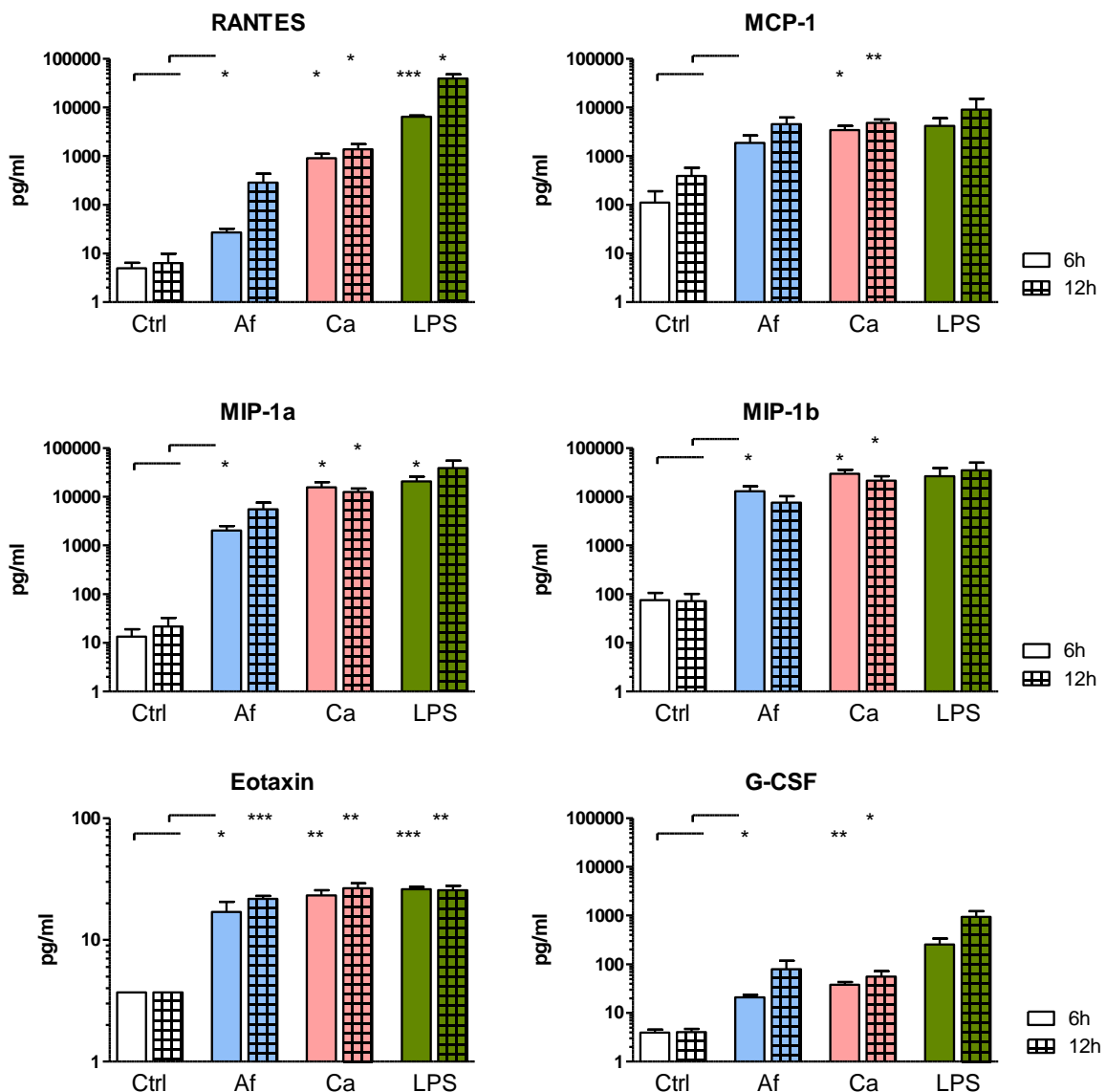


Abbildung 37: Chemokinfreisetzung von DCs nach Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS. DCs wurden am Tag 6 in vier unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau), *C. albicans* (Ca, rot) und LPS (1 µg/ml, grün) für 6 (ohne Muster) und 12 h (kariert) stimuliert und mittels ELISA auf die Zytokinfreisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ctrl, weiß) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS eine stark proinflammatorische Zytokinantwort induzierten. Zudem wurden chemotaktische Moleküle induziert, die weitere Immunzellpopulation an den Ort der Infektion rekrutieren. Interessanterweise wurden auch IL-10 und IL-1RA, welche eine antiinflammatorische Funktion aufweisen, sezerniert.

4.5.2. Untersuchung zum Einfluss von *A. fumigatus* Konidien auf die Zytokinantwort von DCs

Neben der Analyse der Zytokinfreisetzung durch *A. fumigatus* Keimschläuche und *C. albicans*, wurde auch ein Zytokinprofil von DCs erstellt, die mit *A. fumigatus* Konidien stimuliert wurden. Hierbei konnte keine Induktion der Zytokinfreisetzung in allen gemessenen Zytokinen gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden (Abbildung 38).

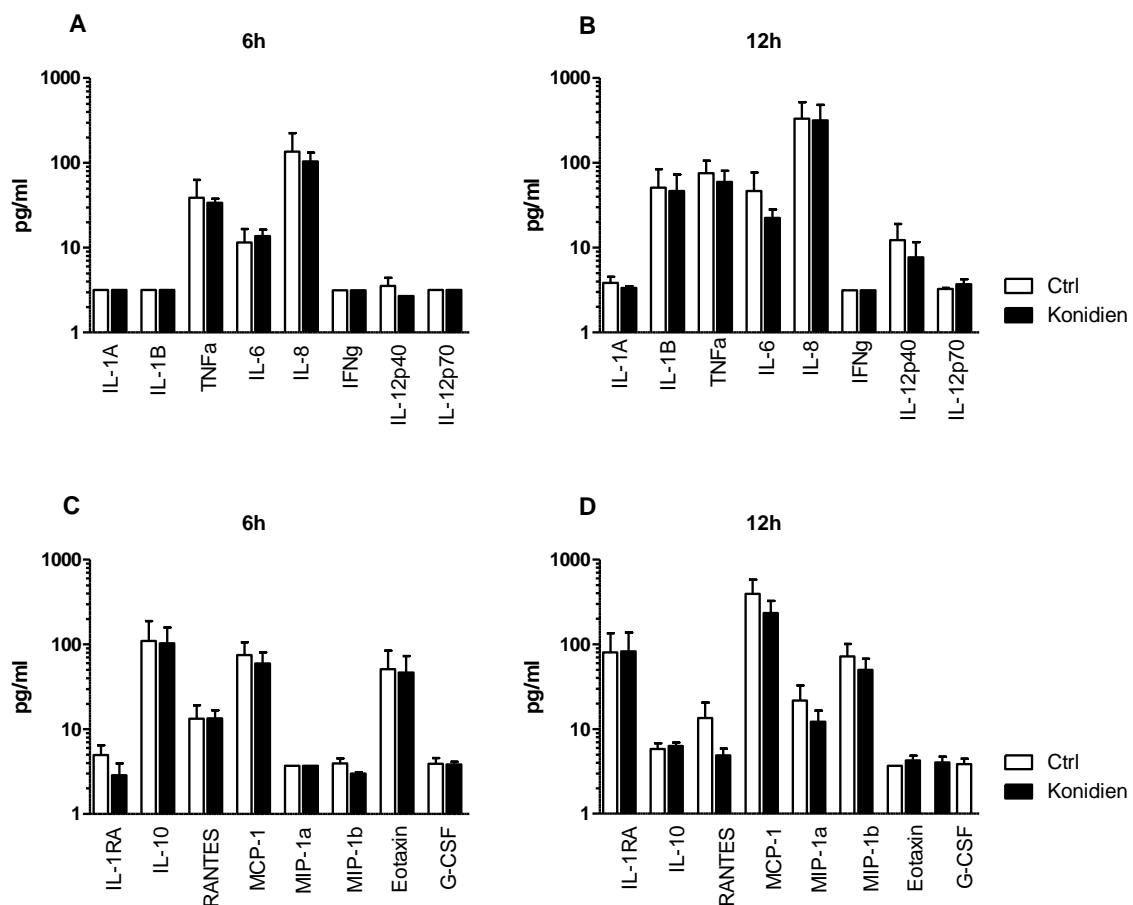


Abbildung 38: Zytokinfreisetzung von DCs nach Ko-Kultur mit *A. fumigatus* Konidien. DCs wurden am Tag 6 mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien (schwarz) für 6 und 12 h ko-kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte DCs (weiß). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.5.3. Zusammenfassung und Vergleich der Genexpressionen, Signalwege und Zytokine/Reifung

Um einen Überblick über die Regulation von Reifemarkern und Zytokinen, die sowohl auf Genexpressionsebene reguliert waren und als Proteine sezerniert wurden, wurden diese Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle noch einem gegenübergestellt. Größtenteils korrelieren Genexpression und Protein sehr gut. Ausnahmen wurden nur für IFN γ , IL-10 und KLF4 und SYK gezeigt.

Tabelle 22: Vergleich der Genregulation mit Proteinmenge. Rot gekennzeichnet sind die Gene/Proteine, die induziert wurden, während reprimierte Gene/Proteine in blau eingefärbt sind. Nicht-regulierte Gene/Proteine sind nicht-gefärbt dargestellt. Pfeile zeigen die Regulationsrichtung nicht-signifikanter Regulationen an, während die Asterisken die jeweiligen p-Werte angeben.

Gen/ Protein	<i>A. fumigatus</i>				<i>C. albicans</i>				LPS			
	Gen		Protein		Gen		Protein		Gen		Protein	
	6h	12h	6h	12h	6h	12h	6h	12h	6h	12h	6h	12h
CD40			*				*				*	*
CD83			*				*	*			*	*
CD86			*	*			*	*			*	**
IL-1A			**	*			**	*				
IL-1B				**				**				
TNF			**	*				*				
IL12				*								
IL8			**					*			**	
IFN γ			**	*			*	**			**	*
IL-10			*									
CCL5			*				*	*			***	*
CCL2							*	**				
CCL3			*				*	*			*	
CCL4			*				*	*				
IL-6			*	*					*		*	
KLF4	*		*	**	**	***	**	**				
SYK	*				*				**	***		

4.6. Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Immunantwort von DCs

4.6.1. Generierung von PRP und Thrombozyten-Isolaten

Von gesunden Freiwilligen wurde Frischblut in Natriumcitratröhrchen abgenommen und anschließend zentrifugiert. Dadurch wurde PRP generiert und dieses mittels Durchflusszytometer auf Oberflächenmarker für Plättchen untersucht. Bei CD41 handelt es sich um einen Plättchenmarker, der auf allen Plättchen vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist CD62P ein Aktivierungsmarker, der auf ruhenden Plättchen nicht vorhanden ist. Dieser Marker, der auch als P-Selektin bezeichnet wird, ist in den Membranen von α -Granula vorhanden. Bei der Aktivierung verschmelzen diese Membranen mit der Zellmembran und es kommt zu einer Expression von CD62P auf der Zelloberfläche (Lu und Malinauskas 2011).

Um den Aktivierungsstatus und die Reaktivität gegen über ADP, einem Aktivator für Plättchen, zu testen, wurden die Marker CD41 und CD62P mittels Durchflusszytometrie untersucht. Sowohl PRP, als auch mit ADP-aktiviertes PRP, war stark positiv für den Thrombozytenmarker CD41 (Abbildung 39A). Die Plättchen zeigten ohne Behandlung nur eine leichte Expression von CD62P (Abbildung 39B, blau und C). Die Zugabe von ADP führte zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von CD62P auf der Zelloberfläche der Thrombozyten (Abbildung 39B, orange und D).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass es bei der hier verwendeten Methode zur PRP-Generierung nicht zu einer ungewollten, starken unspezifischen Voraktivierung der Plättchen kommt. Zudem waren sie auch nach der Isolation noch funktionell und ließen sich durch den entsprechenden Stimulus aktivieren. Dies war essentiell für alle darauf aufbauenden Versuche.

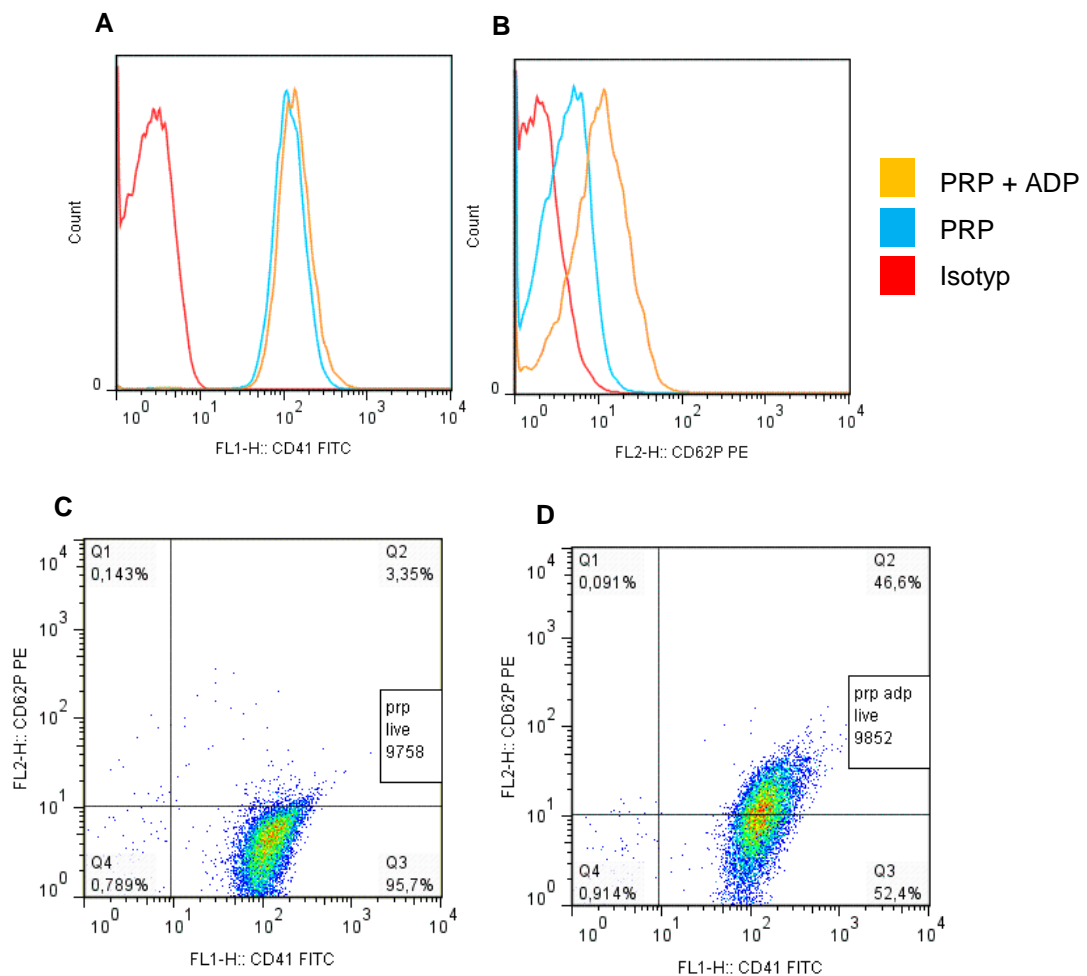


Abbildung 39: Nachweis der Reinheit und Funktionalität von PRP. Histoplot-Analyse der Oberflächenexpression von CD41 (A) und CD62P (B) von unbehandeltem und aktiviertem PRP. Das PRP wurde für 15 min mit den Antikörpern bei RT inkubiert. In den ADP-Proben wurde ADP zugegeben und erneut für 5 min inkubiert. Es folgte die Analyse der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie von CD41 und CD62P von unbehandeltem PRP (blau) und ADP-behandeltem PRP (orange) gegenüber dem entsprechenden Isotypen (rot). Darstellung eines Histoplots eines exemplarischen Experiments. C) Dot-Plot von unbehandeltem PRP, D) Dot Plot von unbehandeltem PRP + ADP.

Im nächsten Schritt wurde die Isolation von ruhenden Plättchen aus PRP etabliert. Hierbei war es zum einen wichtig, eine Methode zu finden, die die Isolation der Plättchen ohne Voraktivierung ermöglichte und zudem die Immunzellen nicht beeinflusste. Zunächst wurden mehrere Methoden getestet, sowohl Zentrifugationen also auch die Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation über Optiprep (Sigma Aldrich). Entweder wurden durch die getesteten Methoden die Plättchen voraktiviert, oder im Fall der Dichtegradientenzentrifugation die Viabilität der humanen Zellen in der Ko-Kultur beeinträchtigt. Bei der letztendlich etablierten Methode wurde das zuvor gewonnene PRP mit ACD-Puffer verdünnt und anschließend zentrifugiert. Die pelletierten Thrombozyten wurden

mit Tyrode's Puffer resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer auf die Expression von CD41 und CD62P analysiert. Hierbei wurde eine weiterhin hohe Expression von CD41 gezeigt. Die isolierten Plättchen zeigten zwar bereits eine leichte Expression von CD62P, diese wurde jedoch mit der Aktivierung durch ADP 4 auf 38% erhöht.

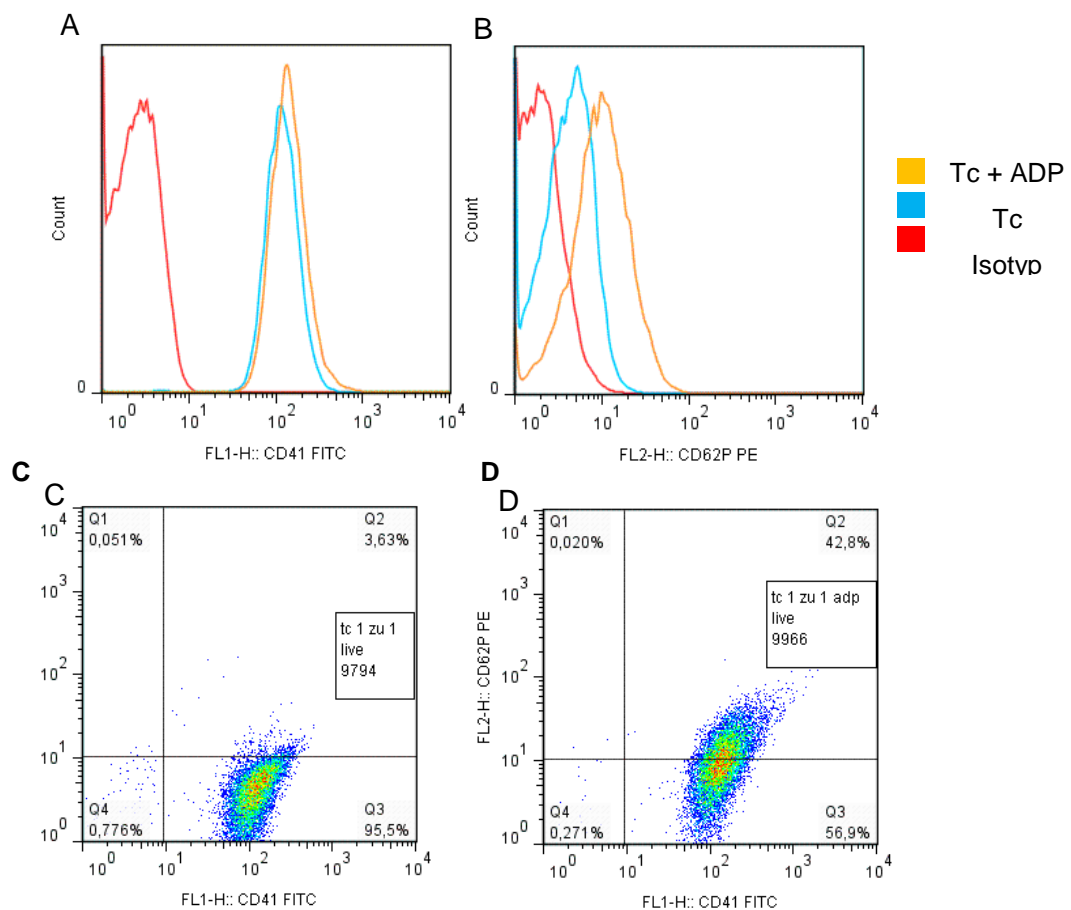


Abbildung 40: Isolierte Plättchen und ihre Reaktivität gegenüber ADP. Die isolierten Plättchen (Tc) wurden für 15 min mit dem Antikörper gegen CD62P bei RT inkubiert. In den ADP-Proben wurde ADP zugegeben und erneut für 5 min inkubiert. Es folgte die Analyse der Oberflächenexpression von CD41 und CD62P von unbehandeltem Plättchen (blau) und ADP-behandeltem Plättchen (orange) gegenüber dem entsprechenden Isotypen (rot). A-B) Darstellung von Histogrammen eines exemplarischen Experiments. C) Dot Plot von unbehandeltem PRP, D) Dot Plot von unbehandeltem PRP + ADP.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass in dieser Arbeit eine Methode zur Gewinnung von PRP mit anschließender Isolierung der ruhenden Plättchen etabliert wurde, deren Reaktivität gegenüber ADP durch die Isolation nicht verändert wurde.

4.6.2. Untersuchung der von Plättchen sezernierten Zytokine

Plättchen enthalten verschiedenste Zytokine in ihren Granula (Semple *et al.* 2011). Da in weiteren Experimenten die Zytokinfreisetzung in Ko-Kulturen von PRP mit DCs und Makrophagen analysiert werden sollte, wurde zuerst die Zytokinfreisetzung des PRPs ohne Immunzellen bestimmt. Hierfür wurden die Zytokine IL1b, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1a/b, PDGF, RANTES, TNF und VEGF analysiert. Bei keinem Zytokin, mit Ausnahme von RANTES, wurden nachweisbare Konzentrationen der analysierten Zytokine gemessen. RANTES jedoch wurde sowohl im Zellüberstand von PRP als auch im Überstand von PRP mit *A. fumigatus* nachgewiesen (Abbildung 41). Durch die Stimulation mit *A. fumigatus* wurde der Mittelwert des freigesetzten RANTES fast verdoppelt. Im PPP, also Plasma ohne Plättchen, wurden nur sehr geringe Konzentrationen an RANTES detektiert. Somit konnte gezeigt werden, dass keine Zytokine in dieser Versuchsanordnung von den Plättchen nachgewiesen werden konnte. RANTES jedoch wurde vom den Plättchen in hoher Konzentration sezerniert. Diese Freisetzung wurde durch *A. fumigatus* zudem verstärkt.

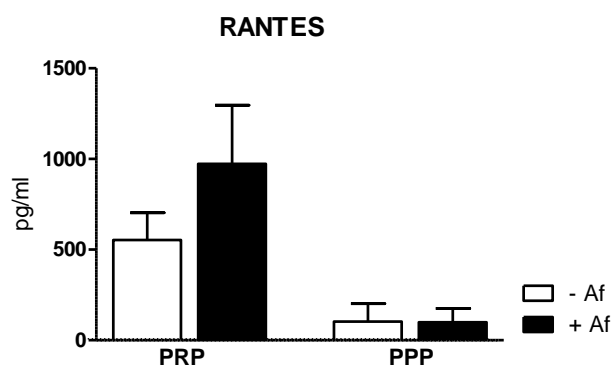


Abbildung 41: Quantifizierung der RANTES-Freisetzung in *A. fumigatus* stimulierten PRP und PPP. PRP und PPP wurden mit *A. fumigatus* Keimschläuchen (scharz)(30:1) für 6 h ko-kultiviert bzw. unstimuliert und anschließend im zellfreien Überstand die Konzentration an sezerniertem RANTES mittels ELISA bestimmt.

4.7. Untersuchung des Einflusses von PRP auf das Transkriptom von *A. fumigatus*-stimulierten DCs

DCs stellen die Brücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. Durch ihre Fähigkeit der Antigenprozessierung und –präsentation sind sie in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen. DCs wurden mit *A. fumigatus* Keimschläuchen, in

Anwesenheit von PRP (im Verhältnis 1:30 von Plättchen zu Immunzellen) bzw. ohne PRP für 3 h ko-kultiviert und danach sofort in RNA-Stabilisierungslösung (RNA Protect) überführt. Für die Untersuchung von differentiell exprimierten Genen wurden Affymetrix HGU-219 Arrays verwendet. Die hierfür isolierte RNA hatte eine durchschnittliche RNA-Integritätsnummer (RIN) von über 8. Die nachfolgenden Microarrays wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Bonin, Institut für medizinische Genetik, Universität Tübingen, durchgeführt.

4.7.1. Hauptkomponentenanalyse

Zuerst wurde von den ermittelten Signalintensitäten der Microarrays eine Hauptkomponentenanalyse (auch *Principal Component Analysis*, PCA) durchgeführt. Bei dieser Auswertung werden ähnlich regulierte Datensätze gruppiert. Je unterschiedlicher die Datensätze, desto weiter entfernt werden diese dargestellt. In der folgenden PCA-Abbildung sind die unterschiedlichen Spender in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die einzelnen Bedingungen wurden durch Symbole gekennzeichnet.

Wie man in Abbildung 42 erkennen kann, wurde ein klarer Spender-abhängiger Unterschied ermittelt. Zudem zeigte sich eine Aufteilung nach der durchgeführten Behandlung. So waren Kontrollen und PRP-behandelte DCs in einer kleineren räumlichen Entfernung als die Behandlungen mit *A. fumigatus* und *A. fumigatus* mit PRP. Auch diese *A. fumigatus* und *A. fumigatus* mit PRP gruppierten sich in den einzelnen Spendern.

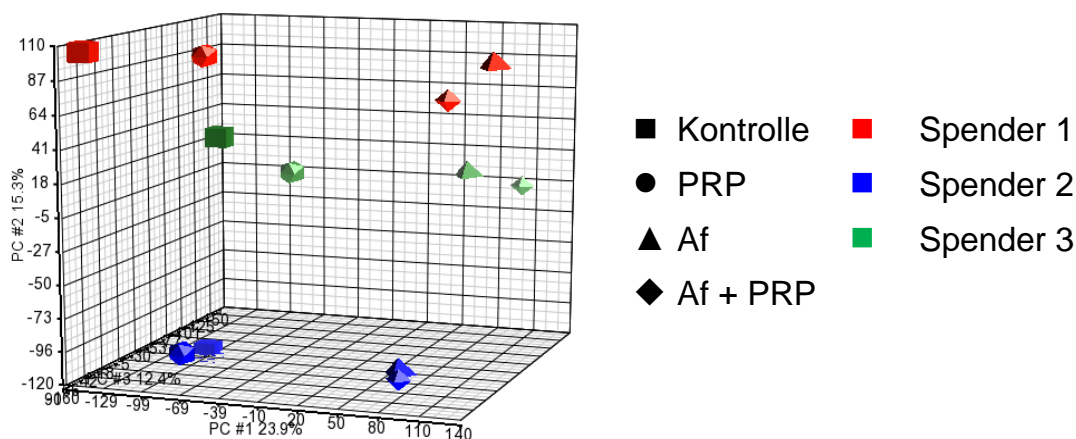


Abbildung 42: Hauptkomponentenanalyse der Microarrays von *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs. DCs/Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 3 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. In der Hauptkomponentenanalyse sind die Spender 1-3 in rot, blau und grün dargestellt. Die unterschiedlichen Stimuli sind durch verschiedene Symbole gekennzeichnet. Rechteck: Kontrolle, Kreis: DCs, stimuliert mit PRP, Dreieck: DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* und Raute: DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* und PRP.

4.7.2. Analyse der differentiell durch PRP und *A. fumigatus* exprimierten Gene

Als differentiell regulierte Gene wurden solche definiert, die einen *Fold Change* (FC) $|FC| \geq 2$ hatten bei einem p-Wert $p \leq 0.01$ zu den unbehandelten Kontrollen aufwiesen. Eine Stimulation von DCs mit PRP übte nur einen geringen Effekt auf die Genexpression aus (28 regulierte Gene). Die Zugabe von *A. fumigatus* (mit oder ohne PRP) bedingte dahingegen eine Regulation von 1100 bzw. 888 Genen.

Tabelle 23: Anzahl differentiell regulierter Gene je Bedingung.

Bedingung	Anzahl regulierter Gene
PRP	28
<i>A. fumigatus</i>	888
<i>A. fumigatus</i> + PRP	1100

Von diesen differentiell exprimierten Genen wurde ein Venn-Diagramm angefertigt, um gemeinsam und unterschiedliche regulierte Gene zu identifizieren. 680 dieser Gene wurden sowohl in *A. fumigatus*- als auch in *A. fumigatus* mit PRP-behandelten DCs reguliert. Interessanterweise wurden durch die Zugabe von PRP zu *A. fumigatus*-infizierten Zellen 399 zusätzliche Gene reguliert. PRP ohne *A. fumigatus* induzierte 7 Gene, die nicht durch *A. fumigatus* Behandlungen reguliert wurden.

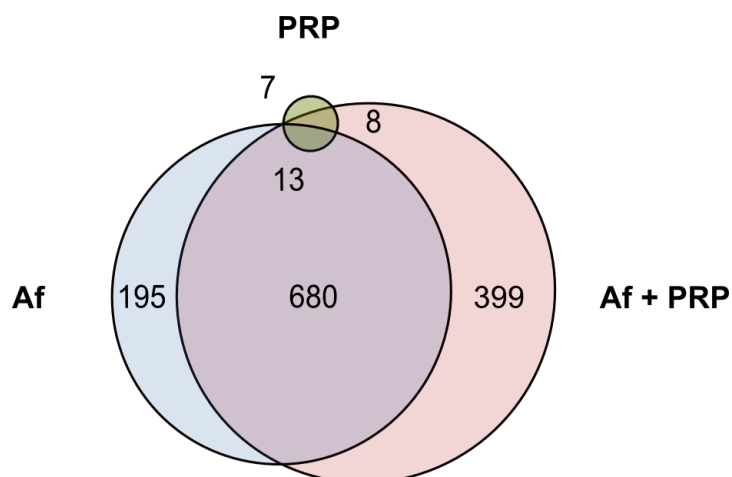


Abbildung 43: Venn Diagramm differentiell regulierter Gene in DCs nach Ko-Kultur mit *A. fumigatus*, PRP oder *A. fumigatus* und PRP für 3 h. DCs wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1, Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die differentiell zu unbehandelten Kontrollen regulierten mRNAs wurden in den einzelnen Bedingungen verglichen und in einem Venn-Diagramm dargestellt.

Bei den spezifisch durch PRP-regulierten Genen handelte es sich um folgende:

Tabelle 24: Differenziell durch PRP regulierte Gene.

PRP spezifische Gene	RPP und PRP+ Af regulierte Gene	PRP und Af und Af + PRP regulierte Gene
<i>ABCD3</i>	<i>C20orf123</i>	<i>CCL4L1</i> /// <i>CCL4L2</i>
<i>BNIP3</i>	<i>C21orf7</i>	<i>CREM</i>
<i>GNG11</i>	<i>CCL2</i>	<i>ETS2</i>
<i>GPRIN3</i>	<i>DUSP6</i>	<i>MAT2A</i>
<i>PDK4</i>	<i>HBB</i>	<i>NLRP3</i>
<i>RASGRP1</i>	<i>HBB</i> /// <i>HBD</i>	<i>NR4A1</i>
<i>WNT5A</i>	<i>PF4</i>	<i>PHLDA1</i>
	<i>PPBP</i>	<i>RILPL2</i>
		<i>SASH1</i>
		<i>SH3PXD2B</i>
		<i>SYT17</i>
		<i>UBASH3B</i>
		<i>UST</i>

4.7.3. Analyse der spezifischen Signalwege, induziert durch *A. fumigatus* und PRP in DCs

Mit Hilfe einer GOrilla-Auswertung wurden GO-angereicherte Bedingungen analysiert. Hierfür wurden die differentiell regulierten Gene gegenüber der Genliste des gesamten Microarrays verglichen und daraus Signalwege identifiziert.

Durch die Stimulation von DCs mit PRP ohne *A. fumigatus* wurden nur 28 Gene und damit keine in der GOrilla-Analyse hoch signifikanten Signalwege identifiziert. Dennoch wurden 81 GO-Bedingungen reguliert (Abbildung 44). Hierbei wurden über die positive Regulation auf einen externen Stimulus die Zelldifferenzierung und die Leukozytenchemotaxis induziert. Im metabolischen Prozess wurde die MAP Kinaseaktivität reguliert. Zudem werden die Signalwege „Antwort auf eine organische Substanz“ und „Antwort auf ein Sauerstoffenthaltendes Objekt“ aktiviert, möglicherweise als Antwort auf die in Plättchen vorhandenen, reaktiven Sauerstoffspezies der Granula (Wachowicz *et al.* 2002). Somit ist wohl auf eine sehr leichte Aktivierung der DCs durch das PRP zu schließen.

Durch *A. fumigatus* wurden als „Antwort auf Stress“, metabolische Prozesse, sowie die Nukleinsäuresynthese mit der „Induktion der Transkription“ induziert. Damit verbunden

wurden Chromatinmodifikationen und –reorganisation, in Kombination mit einer Histonazetylierung aktiviert. Zudem wurde die Leukozytendifferenzierung induziert.

Neben den auch für die Simulation mit *A. fumigatus* beschriebenen Signalwegen der metabolischen Aktivierung mit RNA-Synthese und Leukozytendifferenzierung, wurden durch *A. fumigatus* mit PRP die intrazelluläre Signaltransduktion aber auch die Zellkommunikation und -adhäsion induziert. Neben der Zytokinproduktion von IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF und INF γ , wurden die JNK Kaskade und die MAP-Kinaseaktivität verändert.

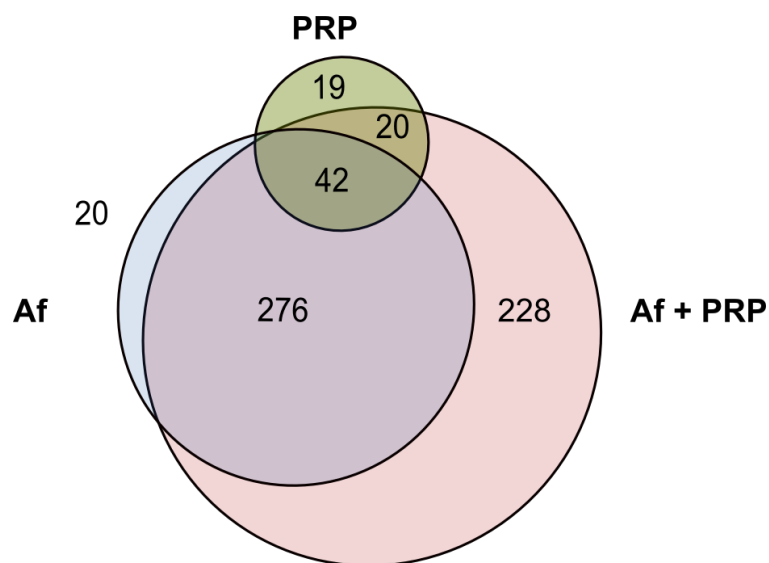


Abbildung 44: Venn-Diagramm differenziell regulierter Signalwege nach Ko-Kultur von DCs mit *A. fumigatus*, PRP oder *A. fumigatus* und PRP für 3 h. DCs wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau)(MOI1), PRP (1:30) (grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die differenziell zu unbehandelten Kontrollen regulierten Signalwege wurden in den einzelnen Bedingungen verglichen und in einem Venn-Diagramm dargestellt.

4.7.4. Untersuchung zum Einfluss von PRP auf die *A. fumigatus*-induzierte Reifung von DCs

Unreife DCs besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose und exprimieren kaum MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Während des Reifungsprozesses werden so genannte Reifemarker (CD40, CD80, CD83, CD86) auf der Oberfläche präsentiert. In einigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass Plättchen diese Reifung beeinflussen (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008). Neben den Oberflächenmolekülen ändert sich mit der Reifung auch das Zytokinprofil der

DCs (Kissel *et al.* 2006). Um ein genaueres Bild über die Reifung der DCs auf Genexpressionsebene zu bekommen, wurde eine Heatmap der mRNAs von Reifemarkern angefertigt. In der Heatmap ist eine starke Hochregulierung der mRNA für alle Reifemarkern durch die Stimulation mit *A. fumigatus* zu sehen. Diese durch *A. fumigatus* ausgelöste Reifung wurde bei *CD40*, *CD80*, *CD83* und *CD86* durch die Zugabe von PRP leicht auf Genexpressionsebene verstärkt.

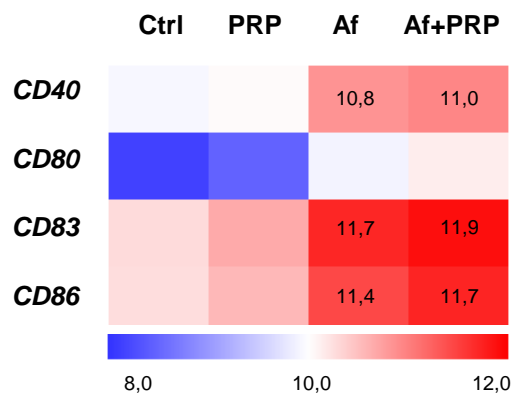


Abbildung 45: Heatmap spezifischer Reifemarkern von *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs nach 3 h Ko-Kultur. DCs wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1)(Af), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30)(Af PRP) für 3 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die Signalintensitäten von Probe Sets ausgewählter Oberflächenmoleküle wurden mittels MeV als Heatmap dargestellt. Blau kennzeichnet hierbei geringere Signalintensitäten, rot starke.

In einem weiteren Schritt wurde die Regulation der Oberflächenexpression der Reifemarkern mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression von *CD80*, *CD83* und *CD86* wurde durch *A. fumigatus* im Vergleich zu den Kontrollen induziert. Diese Induktion war aber nur bei der Kombination mit PRP für *CD83* und *CD86* signifikant. Somit zeigt sich die leichte Induktion der Genexpression auch auf Proteinebene auf der Zelloberfläche.

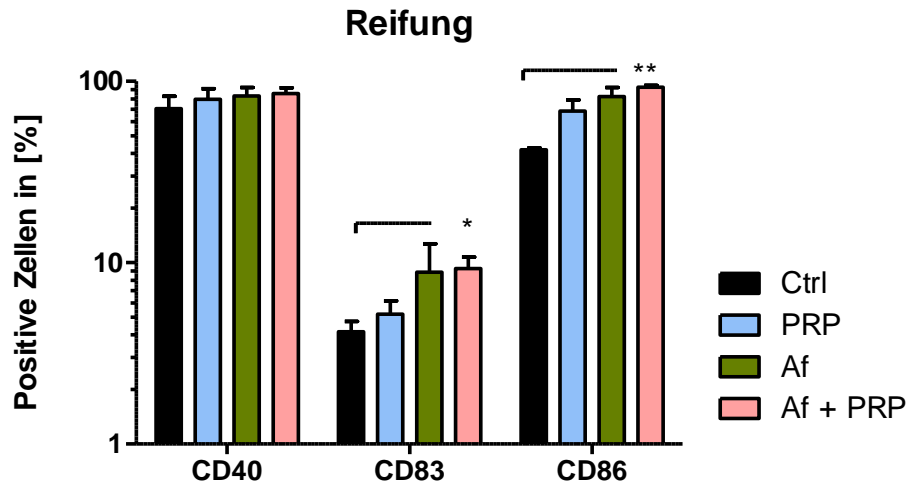


Abbildung 46: Oberflächenexpression von Reifemarkern auf *A. fumigatus*, PRP stimulierten DCs. DCs wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* (MOI1, Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie auf Positivität für die Marker CD40, CD83 und CD86 analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.7.5. Einfluss von PRP auf die Expression des Transkriptionsfaktors *KLF4* in DCs

Der bereits zuvor untersuchte Transkriptionsfaktor *KLF4* (siehe 4.3.5) wurde auch auf seine Regulation in DCs, ko-kultiviert mit PRP untersucht. Hierbei wurde eine signifikante Reduktion der *KLF4*-mRNA-Expression durch PRP nachgewiesen. Die Kombination aus *A. fumigatus* mit PRP reduzierte den *KLF4*-RNA-Gehalt am deutlichsten auf einen Wert von 0,08 in der RT-PCR. Diese Reduktion war auch in der Heatmap von *KLF4* im Microarray deutlich zu erkennen.

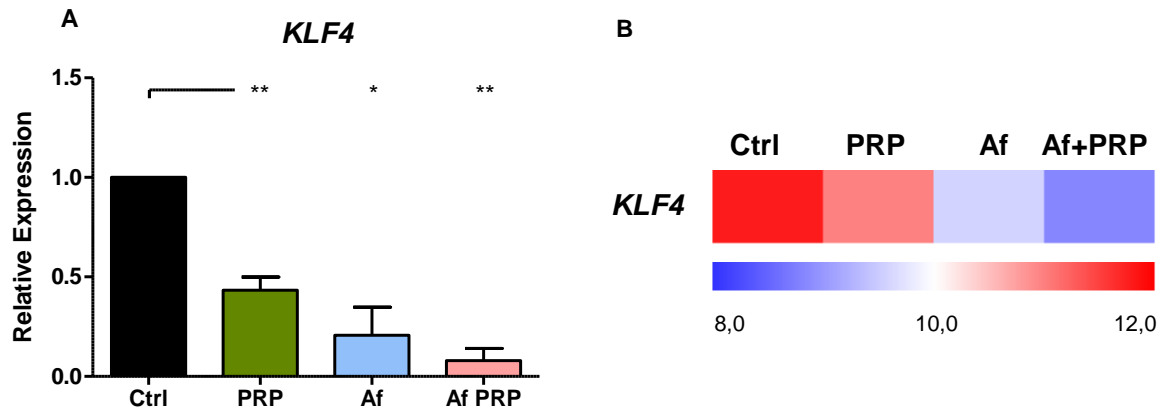


Abbildung 47: KLF4 Regulation in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs, analysiert mit qPCR und Microarray Heatmap. DCs wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, MOI1, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af PRP, rot) für 3 h stimuliert. A) Analyse der KLF4 Regulation mittels qPCR. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler. B) Affymetrix HGU 219 Microarray von KLF4. Die Signalintensitäten KLF4 wurden mittels MeV als Heatmap dargestellt. Blau kennzeichnet hierbei geringere Signalintensitäten, rot starke.

4.7.6. Validierung des DC PRP-Microarrays

Der Microarray wurde mittels qPCR für die zufällig ausgewählten Gene *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1B* und *TNF* validiert. Die Validierung der Regulation von *KLF4* wurde bereits in Abbildung 47 dargestellt. Die Induktion ausgewählter Gene konnte mittels qPCR bestätigt werden.

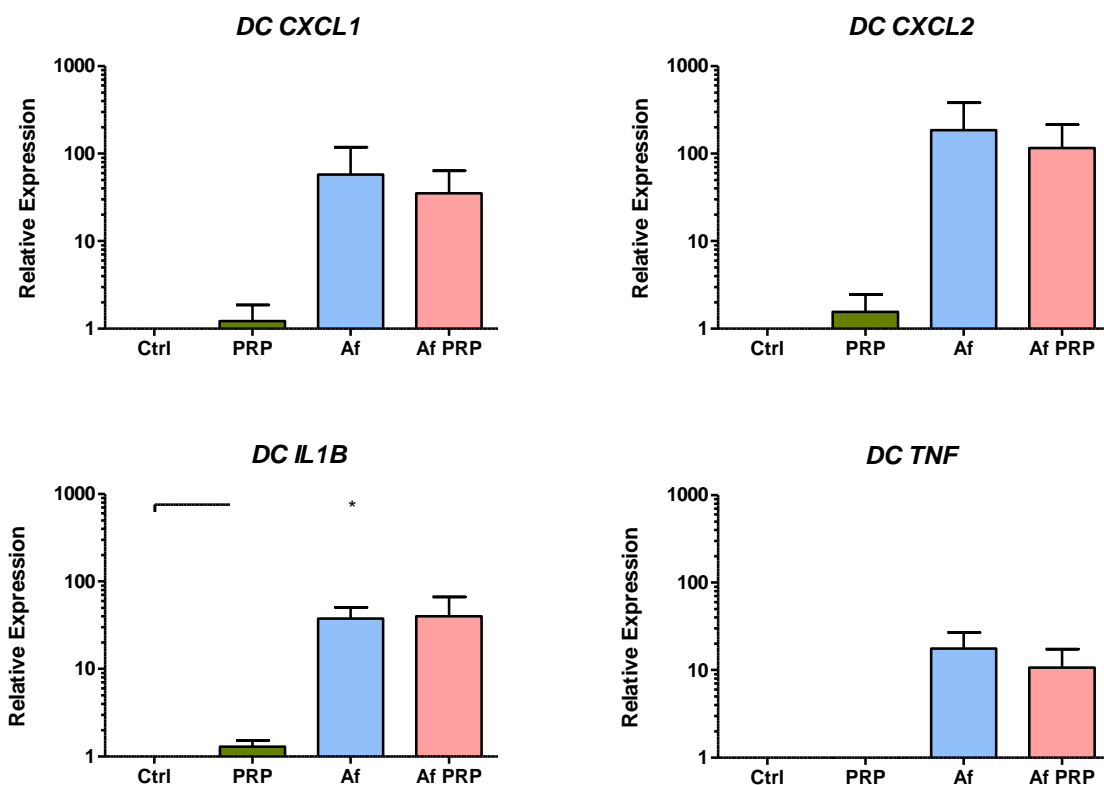


Abbildung 48: DC PRP Array Validierung mittels qPCR. DCs wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau)(MOI1), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30)(Af PRP, rot) für 3 h stimuliert. Analyse der Regulation von *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1B* und *TNF* mittels qPCR. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler.

4.8. Makrophagen

4.8.1. Generierung von Makrophagen

Um Monozyten-abgeleitete Makrophagen zu generieren, wurden Monozyten mit dem Zytokin M-CSF stimuliert. Aus den Monozyten wurden so innerhalb von sechs Tagen Makrophagen differenziert. Diese tragen auch ein spezielles Set an Markern auf ihrer Zelloberfläche. Da es sich bei diesen um stark adhärente Zellen handelt, die durch das Ablösen schwer geschädigt wurden, konnte keine Durchflusszytometeranalyse dieses Zelltyps durchgeführt werden. Stattdessen wurde der charakteristische Makrophagenphänotyp mikroskopisch untersucht und die Viabilität mittels *Dye Exclusion Assay* (3.7) bestimmt.

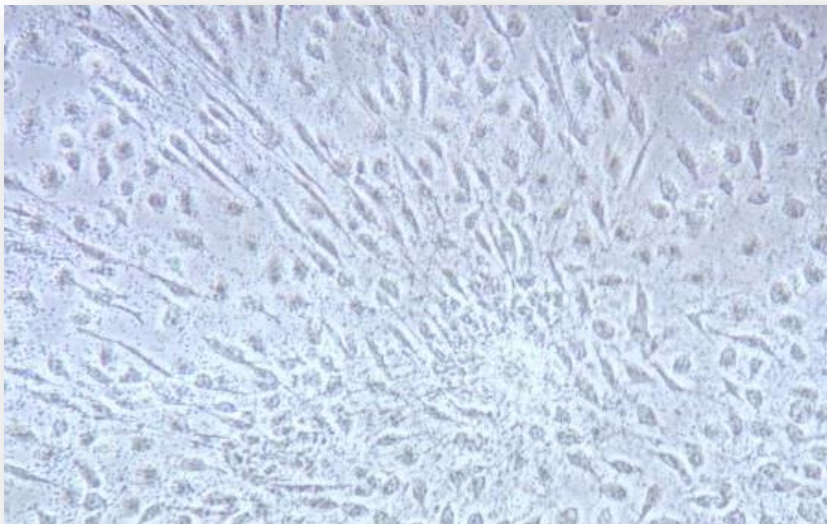


Abbildung 49: Lichtmikroskopische Aufnahme von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen in Ko-Kultur mit *A. fumigatus* Keimschläuchen. Monozyten wurden für sechs Tage mit 500 iU/ml M-CSF zu Makrophagen differenziert.

4.9. Neutrophile Granulozyten

4.9.1. Untersuchung zur Reinheit von neutrophilen Granulozyten

Wie zuvor in 3.5.3 beschrieben, wurden neutrophile Granulozyten isoliert. Um die Reinheit zu überprüfen, wurden diese Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Es wurden stets

über 75% der Zellen als lebende Zellen identifiziert, die zudem stark positiv für die Färbung mit einem CD66abce, einem Granulozytenmarker, waren (Abbildung 50 B, blau).

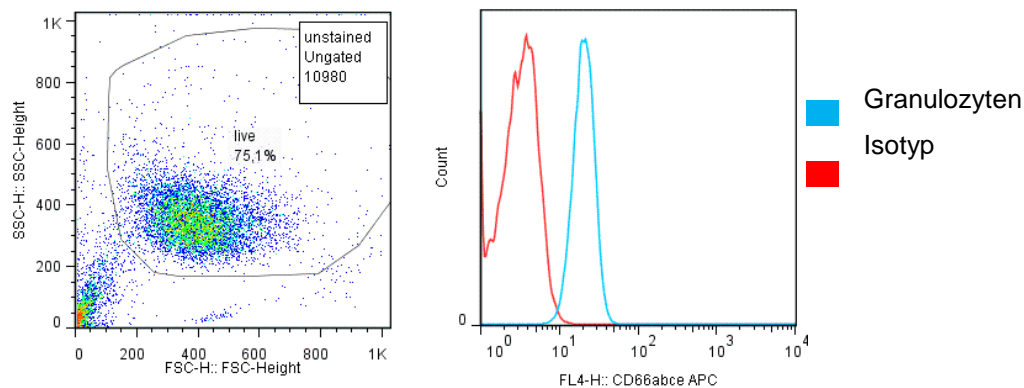


Abbildung 50: Bestimmung der Viabilität und Reinheit isolierter, neutrophiler Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten wurden aus Frischblut mittels Ficoll-Dichtegradientenseparation isoliert. Die isolierten Zellen wurden auf „lebende Zellen“ gegated. Der Histoplot zeigt zudem die Färbung mit einem CD66abce Antikörper (blau) gegenüber dem verwendeten Isotypen (rot).

4.9.2. Untersuchung des Oxidativer Bursts von Makrophagen im Vergleich zu Neutrophilen

Neutrophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu produzieren (Mezger *et al.* 2008c). Diese werden von Neutrophilen bei der Erkennung von geschwollenen Konidien und Keimschläuchen sezerniert (Blanco und Garcia 2008) und sind ein wichtiger Abwehrmechanismus bei *A. fumigatus*-Infektionen (Lapp *et al.* 2014). Auch Makrophagen sind in der Lage reaktive Sauerstoffspezies zu generieren (Forman und Torres 2002). Um diese Funktion der *in vitro* generierten Makrophagen zu überprüfen, wurden sowohl Makrophagen als auch Neutrophile mit *A. fumigatus* stimuliert und die Freisetzung der Sauerstoffradikale über einen Fluoreszenzfarbstoff gemessen. Als Positivkontrolle diente PMA, welches sowohl Neutrophile und Makrophagen bekanntermaßen aktiviert.

Die Neutrophilen zeigten nach 2,5 h eine deutliche Antwort auf die Stimulation mit *A. fumigatus* und PMA. Aufgrund des hohen Standardfehlers war allerdings nur die Stimulation mit PMA signifikant. Die Makrophagen zeigten nach 2,5 h Stimulation mit *A. fumigatus* eine Induktion der ROS-Freisetzung, während PMA eine leichte ROS-Freisetzung induzierte. Auch nach 5 h Ko-Kultur wurden durch *A. fumigatus* nur geringe Mengen an ROS sezerniert.

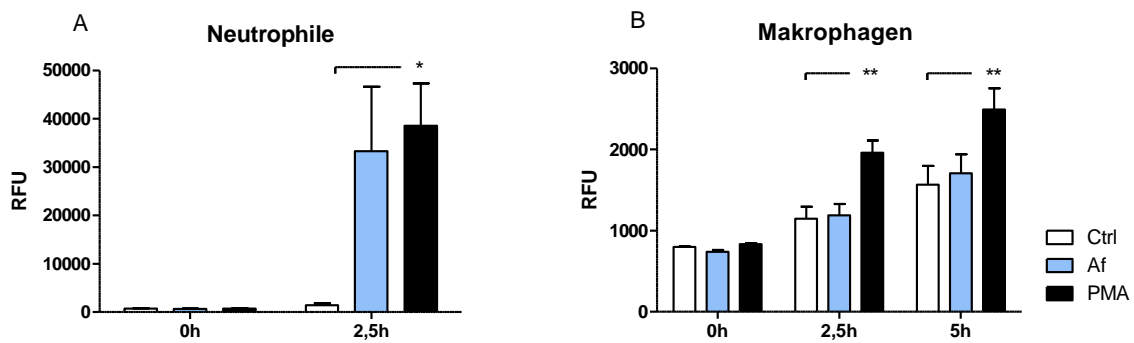


Abbildung 51: Fluoreszenzmessung der freigesetzten Sauerstoffradikale von Neutrophilen und Makrophagen. Granulozyten und Makrophagen wurden für 2,5 bzw. 5 h mit *A. fumigatus* stimuliert. Als Positivkontrolle diente PMA. Die Sauerstoffradikalbildung wurde mittels Oxidation des DCFH-DA zum fluoreszierenden DCF indirekt über die relative Fluoreszenzintensität RFU gemessen. A) Messung der RFU der Neutrophilen über 2,5 h B) Bestimmung der RFU der Makrophagen nach 2,5 h und 5 h.

4.9.3. Untersuchung des Einflusses von PRP und Thrombozyten auf die DC- und Makrophagen-Phagozytose von *A. fumigatus* Konidien

Um die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen zu untersuchen, wurden diese sowohl mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP)-markierten Konidien als auch mit GFP-Keimschläuchen ko-kultiviert. Bei der Bindung bzw. Phagozytose der Konidien/Keimschläuchen von Humanzellen wurden diese ebenfalls GFP-positiv. Diese Färbung wurde mittels Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrollen dienten Zellen ohne Pilze bzw. Humanzellen, die auf 4°C gekühlt wurden. Die niedrige Temperatur verhinderte die Phagozytose von Immunzellen fast vollständig.

Während für die Makrophagen mit Konidien (orange) eine hohe Anzahl an GFP-markierten Zellen nachgewiesen werden konnten, war dies bei Makrophagen mit Keimschläuchen (grün) nicht der Fall (Abbildung 52). Daraus wurde geschlossen, dass Makrophagen zwar Konidien nicht aber Keimschläuche aufnehmen konnten.

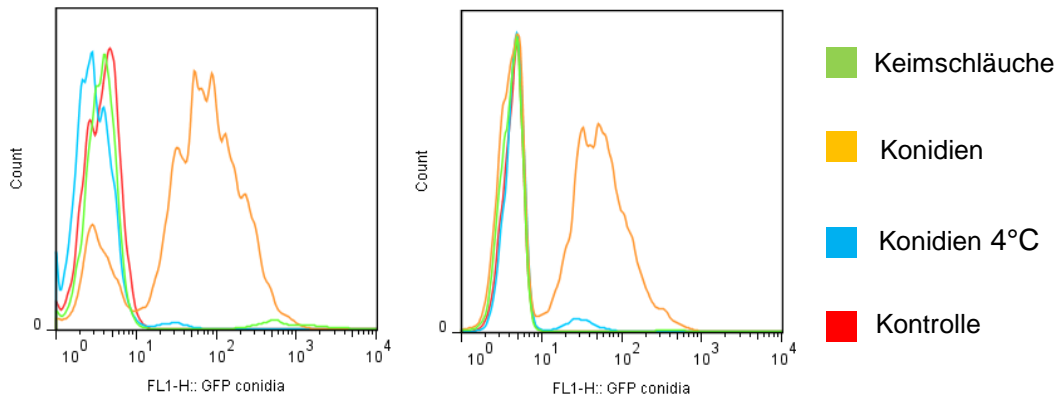


Abbildung 52: Phagozytose der Makrophagen von GFP-Keimschläuchen und GFP-Konidien. Makrophagen wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* Konidien oder Keimschläuchen (MOI10) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Als Negativkontrolle dienten zum einen unbehandelte Makrophagen, zum anderen Makrophagen, die bei 4°C mit Konidien ko-kultiviert wurden.

Im Anschluss daran wurde mit der gleichen Methode wie zuvor, die Phagozytose von GFP-Konidien der DCs und Makrophagen verglichen. Hierbei wurde analysiert, ob PRP oder isolierte Thrombozyten (Tc) einen Einfluss auf die Phagozytose von DCs und Makrophagen von *A. fumigatus* Konidien ausübten. Zudem wurde auch plättchenarmes Plasma (PPP) verwendet.

Hierbei wurde beobachtet, dass die DCs und Makrophagen durch die Ko-Kultur mit den GFP-Konidien zu etwa 20 bzw. 32% positiv fluoreszierten. Durch die Zugabe von PRP wurde diese Positivität noch erhöht. Makrophagen wurden durch diese Zugabe zu etwa 50% und damit statistisch signifikant stärker GFP-positiv. Auch DCs wurden stärker positiv durch die Zugabe von PRP. Allerdings wurde nur durch isolierte Thrombozyten eine statistisch signifikant erhöhte GFP-Markierung erreicht. Interessanterweise führte auch die Zugabe von PPP zu einer deutlichen Erhöhung der Prozent-positiven Makrophagen, aber nicht der DCs. Dabei ist allerdings zu beachten, dass mit dieser Methode eine Phagozytose nicht von einer Bindung der Konidien an die Zellen unterschieden werden konnte.

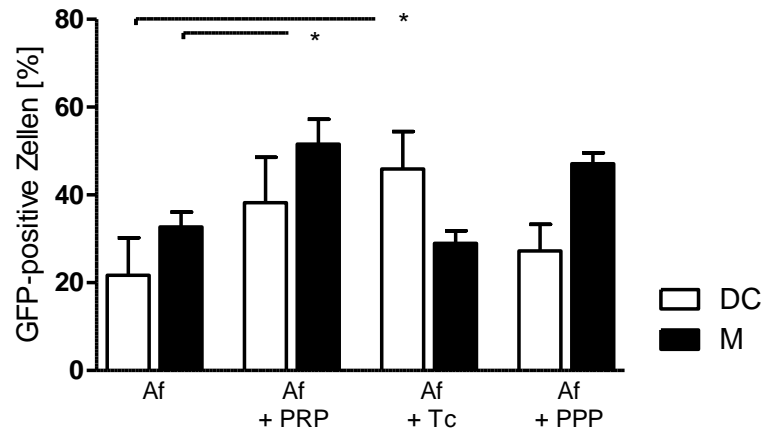


Abbildung 53: Phagozytose der DCs und Makrophagen von GFP-Konidien mit PRP, Tc oder PPP. DCs (weiß) und Makrophagen (M, schwarz) wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* Konidien (MO110) und entweder mit PRP, Tc, oder PPP ko-inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Negativkontrolle dienten DCs/Makrophagen, die bei 4°C mit Konidien ko-kultiviert wurden. Der ermittelte Wert der Negativkontrolle wurde von allen anderen gemessenen Werten subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei (DCs) bzw. vier (Makrophagen) unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.9.4. Untersuchung zum Einfluss von PRP und Thrombozyten auf die metabolische Aktivität von *A. fumigatus*

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob Plättchen in Kombination mit DCs oder Makrophagen einen Einfluss auf die metabolische Aktivität von *A. fumigatus* ausüben, wurden DCs und Makrophagen entweder mit PRP, isolierten Thrombozyten oder PPP und lebenden *A. fumigatus* Keimschläuchen ko-kultiviert. Anschließend erfolgten eine Lyse der humanen Zellen und der Nachweis der metabolischen Aktivität von *A. fumigatus* Keimschläuchen mittels XTT. Parallel wurden PRP, isolierte Thrombozyten und PPP auch ohne Immunzellen mit *A. fumigatus* Keimschläuchen ko-kultiviert. Als Negativkontrolle dienten humane Zellen ohne Pilz und als Positivkontrolle wurde *A. fumigatus* ohne Humanzellen kultiviert. PRP, isolierte Plättchen und PPP hatten ohne Immunzellen keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität des Pilzes (Daten nicht gezeigt). Jedoch wiesen PRP und isolierte Plättchen behandelte DCs und Makrophagen eine statistisch höhere Reduktion der metabolischen Aktivität von *A. fumigatus* auf als ohne. Die Zugabe von PPP zu den Immunzellen hatte keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität des Pilzes.

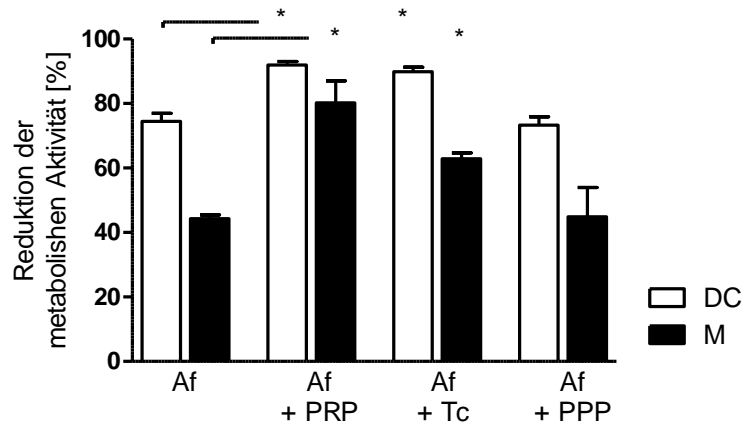


Abbildung 54: Metabolische Aktivität von *A. fumigatus* in Ko-Kulturen mit DCs/Makrophagen und PRP, Tc und PPP. DCs (weiß) und Makrophagen (schwarz) wurden am Tag 6 mit *A. fumigatus* Konidien (MOI5) und entweder mit PRP, Tc oder PPP für 4 h ko-inkubiert. Anschließend wurden die humanen Zellen lysiert und die metabolische Aktivität von *A. fumigatus* Keimschläuchen durch die Reaktion mit XTT quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf bzw. drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.10. Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Immunantwort von DCs und Makrophagen

Bei Makrophagen handelt es sich um phagozytierende Leukozyten. Sie entwickeln sich aus im Blutstrom zirkulierenden Monozyten, die bei einer Infektion ins Gewebe einwandern können. Dort differenzieren sie je nach Zytokin-Stimulus in unterschiedliche Subtypen von Makrophagen mit einer entweder mehr pro- oder antiinflammatorischen Ausprägung. Um die Immunantworten von DCs und Makrophagen direkt zu vergleichen wurden beide aus den gleichen Seldern generiert und genomweite Transkriptomuntersuchungen durchgeführt (Affymetrix HGU219).

Für den Vergleich des Immunresponses von DCs und Makrophagen wurden beide Zelltypen entweder mit PRP (1:30), *A. fumigatus* (Af) Keimschläuchen (MOI1) oder der Kombination stimuliert. Auch hier dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle. Nach 6 Stunden wurde die RNA in *RNA Protect* (Qiagen) stabilisiert. Anschließend erfolgte die Probenaufbereitung und Hybridisierung auf HGU 219 Affymetrix Gene Chips zur genomweiten Analyse der Genexpression. Die nachfolgenden Microarrays wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Bonin, Institut für medizinische Genetik, Universität Tübingen, durchgeführt. An der Auswertung der Microarrays waren Dr. Dr. Marcus Dittrich und Dr. Tobias Müller beteiligt.

4.10.1. Hauptkomponentenanalyse

Zuerst wurden die Signalintensitäten der Microarrays durch eine Hauptkomponentenanalyse (auch *Principal Component Analysis* PCA genannt) verglichen. Hierbei gruppieren sich ähnlich regulierte Daten eng zusammen, während nicht-ähnliche Datensätze weit entfernt dargestellt wurden. In der folgenden Abbildung sind DCs als rote und Makrophagen als blaue Symbole dargestellt. Wie man in Abbildung 55 erkennen kann, sind die blauen Symbole der Makrophagen auf der einen Seite, alle roten Symbole, die DCs symbolisieren auf der anderen. Hierbei wurde deutlich, dass die Datensätze der unterschiedlichen Zelltypen stark verschieden waren. Des Weiteren wurde der Einfluss der *A. fumigatus* Stimulation untersucht. Die Datensätze der *A. fumigatus* stimulierten Zellen gruppieren sich zusammen auf der unteren Hälfte des Diagramms, während die Datensätze ohne *A. fumigatus* in der oberen Hälfte klusterten. Eine von der PRP-Stimulation abhängige Gruppierung wurde nicht gezeigt.

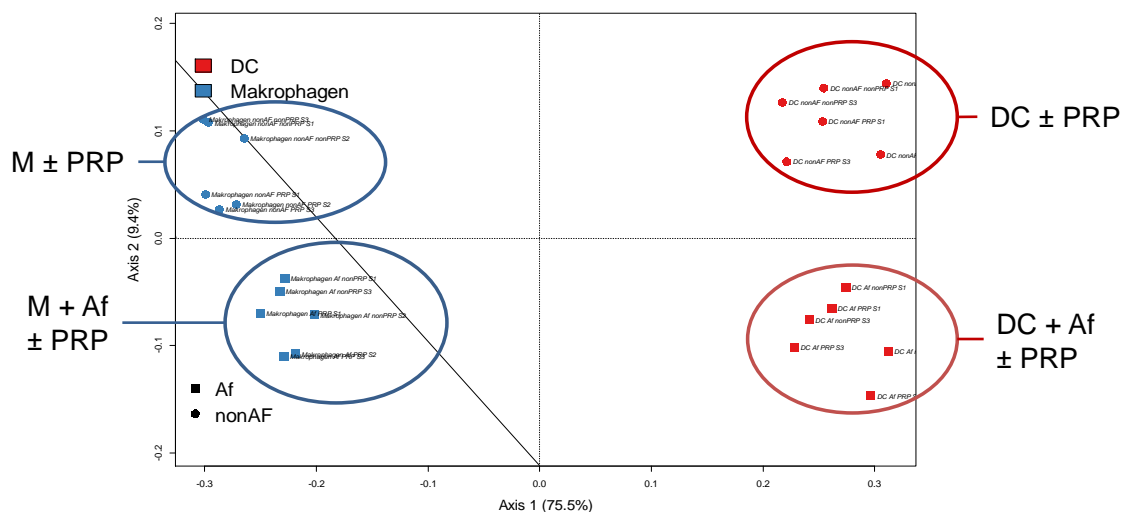


Abbildung 55: Hauptkomponentenanalyse von *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs (rot) und Makrophagen (blau) wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 6 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert.

4.10.2. Analyse der Differenzierung zu DCs und Makrophagen

Um die Differenzierung in die Zelltypen DCs und Makrophagen aus den Monozyten des gleichen Spenders zu bestätigen, wurde die Microarray-Daten zuerst nach bestimmten Markern untersucht. Da sich DCs und Makrophagen bekannterweise in der Oberflächenexpression gewisser Proteine unterscheiden, wurden diese auf Genexpression untersucht. Wie schon beschrieben, ist CD1a charakteristisch für DCs, während es deutlich

geringer von Makrophagen exprimiert wird. Auf der anderen Seite sind CD14 und CD163 charakteristische Marker für Makrophagen.

Wie in der Heatmap der Signalintensitäten (Abbildung 56) zu erkennen, wurde *CD1A* in DCs stark exprimiert (rot, entsprach einer Signalstärke von 11,34), während das Signal bei Makrophagen deutlich schwächer war. *CD14* zeigte ein entgegengesetztes Expressionsmuster. Während die mRNA für *CD14* in DCs praktisch nicht nachweisbar war, war die Signalstärke in Makrophagen sehr hoch. Gleiches traf auch auf CD163, einem Monozyten- und Makrophagenmarker zu. Somit konnten die Zellen auch auf Genexpressionsebene anhand dieser Marker klar voneinander unterschieden werden.

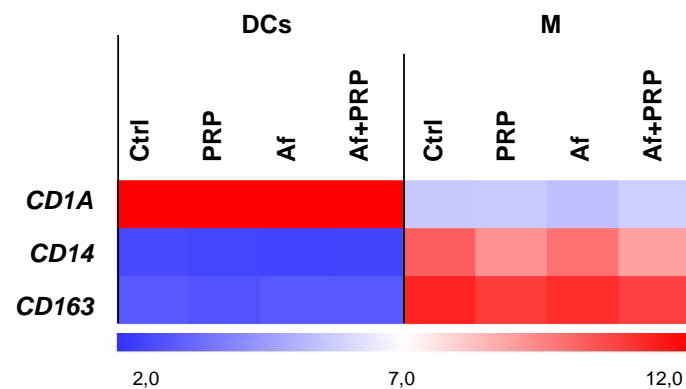


Abbildung 56: Heatmap spezifischer Marker für die Differenzierung in DCs und Makrophagen. DCs/Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 6 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die Signalintensitäten von Probe Sets ausgewählter Oberflächenmoleküle wurden mittels MeV als Heatmap dargestellt. Blau kennzeichnet hierbei geringere Signalintensitäten, rot starke.

4.10.3. Untersuchung des Einflusses von PRP auf das Transkriptom von *A. fumigatus* stimulierten DCs und Makrophagen

Für die Analyse der normalisierten Daten wurde ein *Fold Change* von $|FC| \geq 2$ und ein p-Wert $p \leq 0.05$ als Signifikanzlevel gesetzt. Es wurden drei unabhängige Experimente verglichen. Die Erkenntnisse der Hauptkomponentenanalyse wurden auch durch die Anzahl der regulierten Gene bestätigt. Der deutlichste Unterschied in der Genexpression wurde zwischen den beiden Zelltypen gefunden. 2213 Gene wurden unterschiedlich in Makrophagen im Vergleich zu DCs exprimiert (Abbildung 57, rot).

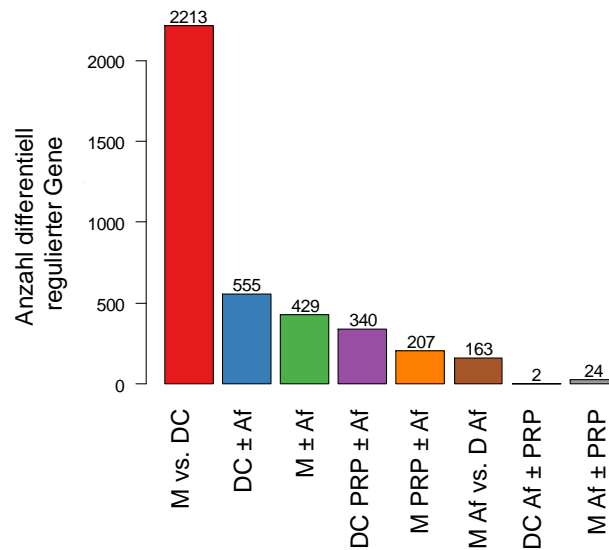


Abbildung 57: Anzahl der differentiell regulierten Gene in den einzelnen Kontrasten. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 6 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert.

Anschließend wurde untersucht, welche Gene durch welchen Stimulus in den jeweiligen Zelltypen reguliert waren. Durch PRP wurden in DCs 144 und in Makrophagen 328 Gene reguliert, während *A. fumigatus* die Genexpression von 574 und 429 Genen in DCs und Makrophagen beeinflusste. In der Kombination auf *A. fumigatus* und PRP wurden in beiden Zelltypen die meisten Gene reguliert mit 851 in DCs und 846 in Makrophagen. Um zu untersuchen, welche Gene durch die Stimuli gemeinsam und welche spezifisch reguliert waren, wurden Venn-Diagramme angefertigt. In diesen Diagrammen sieht man, dass nur sehr wenige Gene (2 bzw. 10 in DCs/Makrophagen) bei der Stimulation von PRP und *A. fumigatus* übereinstimmten. Auch wurden 74 und 109 Gene, sowohl durch PRP, *A. fumigatus* und der Kombination von *A. fumigatus* mit PRP reguliert. Die größte Anzahl an Genen war sowohl in den DCs als auch in den Makrophagen spezifisch für die Stimulation mit *A. fumigatus* und PRP.

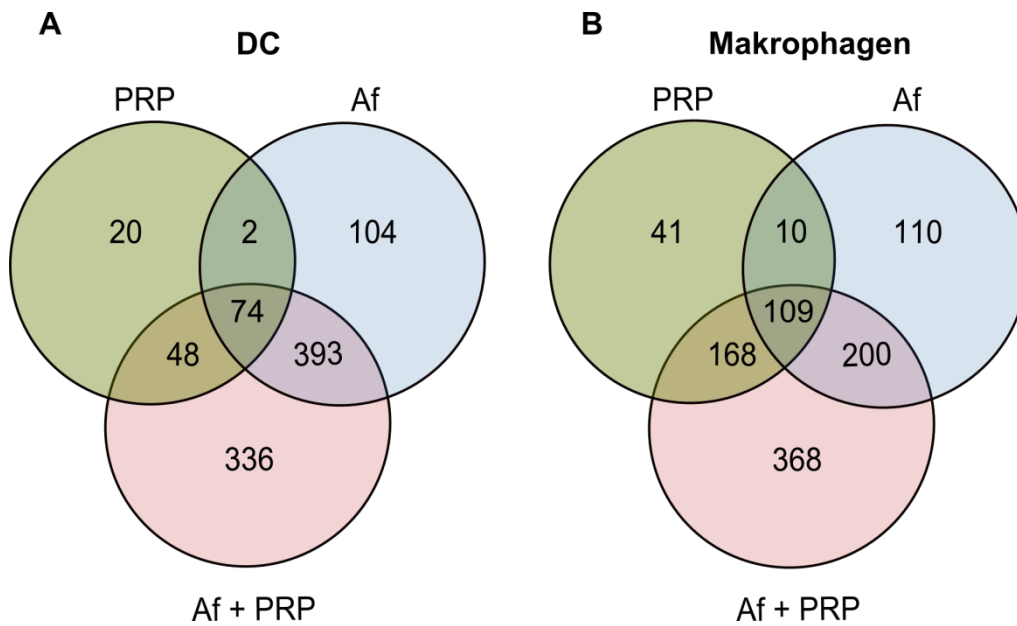


Abbildung 58: Venn-Diagramm, der durch PRP und *A. fumigatus* regulierten Gene in DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 6 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix *whole genome expression Arrays* (HGU-219) durchgeführt. Venn-Diagramm regulierter Gene in A) DCs B) Makrophagen.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob es zelltypabhängige Unterschiede in der Genexpression gab. Hierfür wurden DCs und Makrophagen mit dem gleichen Stimulus über Venn-Diagramme verglichen. Hier sieht man deutlich, dass zwar auch gemeinsam regulierte Gene zwischen den Zelltypen vorhanden waren, der Großteil der regulierten Gene jedoch abhängig vom Zelltyp reguliert wurde.

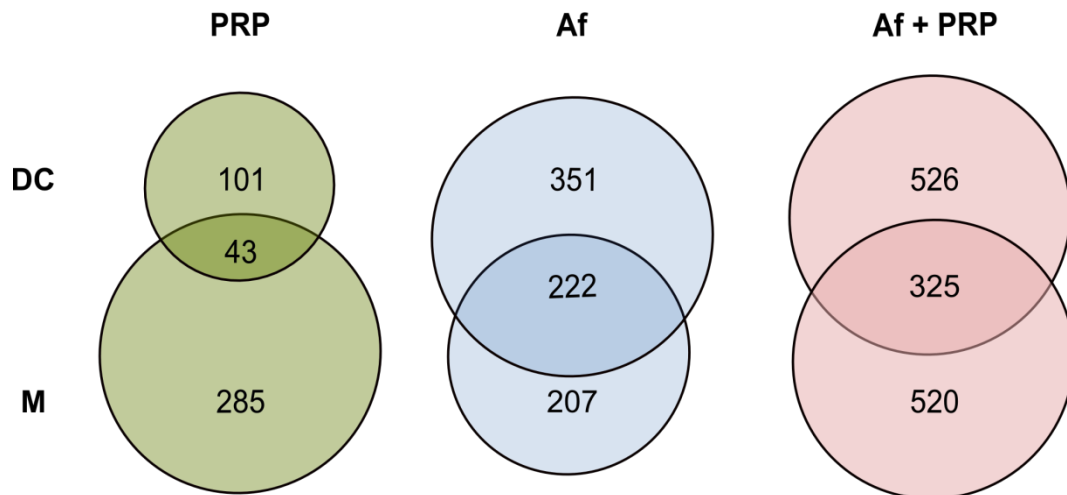


Abbildung 59: Venn-Diagramm zum Vergleich der Genexpression zwischen den Zelltypen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) für 6 h stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Die Transkriptomanalyse wurde mit Affymetrix *whole genome expression Arrays* (HGU-219) durchgeführt und mittels eines Venn-Diagramms analysiert.

Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob es signifikant unterschiedlich regulierte Gene in den *A. fumigatus*-stimulierten Zellen gibt, je nachdem ob PRP in der Kultur vorhanden war oder nicht. Hierfür wurden die differentiell regulierten Gene der DCs/Makrophagen, stimuliert mit *A. fumigatus* und PRP mit den Genen der nur mit *A. fumigatus* behandelten Zellen verglichen. Hierbei konnten für DCs 2 und für Makrophagen 24 statistisch signifikant regulierte Gene nachgewiesen werden, die zudem auch noch vom Zelltyp abhängig waren.

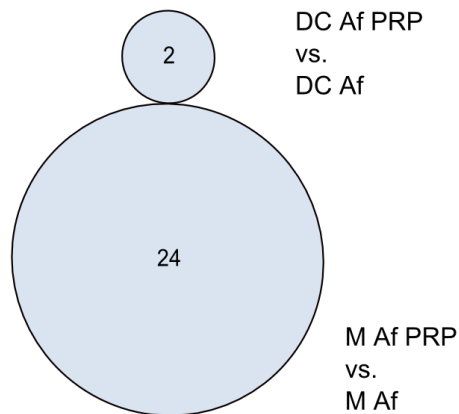


Abbildung 60: Venn Diagramme differentiell regulierter Gene in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DC und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert. Regulierte Gene mit einem Fold Change $|\log_2FC| \geq 1$ und einem p-Wert $p \leq 0.05$ wurden als differentiell reguliert definiert.

Bei dieser Auswertung fiel besonders auf, dass *IL6* durch die Zugabe von PRP zu den *A. fumigatus*-stimulierten Makrophagen statistisch signifikant reduziert war.

Bei den in Abbildung 60 identifizierten Genen handelte es sich um:

Tabelle 25: Differentiell durch PRP regulierte Gene in der Immunantwort von DCs und Makrophagen stimuliert mit *A. fumigatus*.

Macrophages			Macrophages		
Symbol	logFC	Adj. P-Wert	Symbol	logFC	Adj. P-Wert
<i>DEPTOR</i>	2.349	0.003	<i>STAT4</i>	-1.718	0.046
<i>TLR7</i>	1.469	0.045	<i>SGPP2</i>	-1.914	0.005
<i>GAPT</i>	1.409	0.049	<i>GAL3ST4</i>	-1.932	0.046
<i>MGAT4A</i>	1.324	0.043	<i>CCL4L1</i>	-2.163	0.038
<i>GPR155</i>	1.010	0.047	<i>SLC7A11</i>	-2.187	0.009
<i>ICOSLG</i>	-1.140	0.028	<i>GP1BA</i>	-2.232	0.016
<i>PEAK1</i>	-1.161	0.011	<i>IL6</i>	-2.479	0.013
<i>NAMPT</i>	-1.236	0.011	<i>CLEC4E</i>	-2.497	0.003
<i>CYP7B1</i>	-1.414	0.009	<i>THBS1</i>	-2.911	0.049
<i>FZD7</i>	-1.425	0.049			
<i>HBEGF</i>	-1.504	0.049			
<i>IER3</i>	-1.529	0.049			
<i>RGS1</i>	-1.547	0.045			
<i>ZHX2</i>	-1.574	0.009			
<i>RGS2</i>	-1.602	0.046			

DCs		
Symbol	logFC	Adj. P-Wert
<i>NFE2</i>	1.329	0.022
<i>TLR2</i>	1.356	0.022

Die durch PRP induzierten Gene in *A. fumigatus*-stimulierten Makrophagen wurden in einer Signalweganalyse betrachtet. Die 24 regulierten Gene wurden mit 28 Signalwegen assoziiert. Unter den regulierten Signalwegen waren die Zellaktivierung und die Antwort auf Stress, gefolgt von der Regulation der Wundheilung. Neben der Zytokinbiosynthese, vor allem von *IL6*, wurde auch der Signalweg zur Regulation des reaktiven Sauerstoffspezies-Metabolismus aktiviert. Bei den beiden PRP-abhängigen Genen in DCs handelt es sich zum einen um *TLR2*, einen der Rezeptoren für *A. fumigatus* und *NFE2*, *nuclear factor, erythroid 2*, einen Transkriptionsfaktor, der eigentlich an der Plättchenbildung beteiligt ist (Shivdasani 1996). Funktionen in DCs wurden bislang nicht für *NFE2* beschrieben. Der *NF-E2 p45-related factor-2* (*Nrf2*) wurde jedoch mit DC-Immunfunktionen wie der Expression von ko-stimulatorischen Molekülen assoziiert (Al-Huseini *et al.* 2013).

4.10.4. Untersuchung zum Einfluss von PRP auf die Zytokingenexpression der *A. fumigatus*-stimulierten DCs und Makrophagen

Da bereits in 4.10.3 gezeigt wurde, dass PRP die Zytokinantwort veränderte, wurden die ermittelten Signalintensitäten der Zytokine anschließend mit Hilfe von Heatmaps analysiert, um einen genaueren Einblick in die Zytokinregulation zu bekommen. Hierbei wurden vor

allem die Chemokin- und Interleukin-Antwort der DCs und Makrophagen auf die Stimulation mit *A. fumigatus* und Plättchen untersucht.

Bei Chemokinen handelt es sich Signalmoleküle, die eine Chemotaxis der Zielzellen auslösen. Die Chemokine *CXCL10*, *CCL3 (MIP1a)*, *CCL4 (MIP1b)*, *CCL5 (RANTES)*, *CXCL1* und *CXCL2* wurden, wie in Abbildung 61 dargestellt, durch die Stimulation beider Zelltypen mit *A. fumigatus* induziert. Auf andere untersuchte Chemokine konnte kein Einfluss festgestellt werden. Interessanterweise wurde bereits ein Unterschied in der Expression der Chemokinen *CCL3 (MIP1a)*, *CCL4 (MIP1b)*, *CXCL2* und *CCL18* zwischen unbehandelten DCs und Makrophagen festgestellt. In der Immunantwort der DCs gegen *A. fumigatus* konnte kein signifikanter Unterschied zur Reaktion von Makrophagen auf *A. fumigatus* beobachtet werden. Der Einfluss von PRP auf *A. fumigatus* stimulierte Zellen war nicht signifikant.

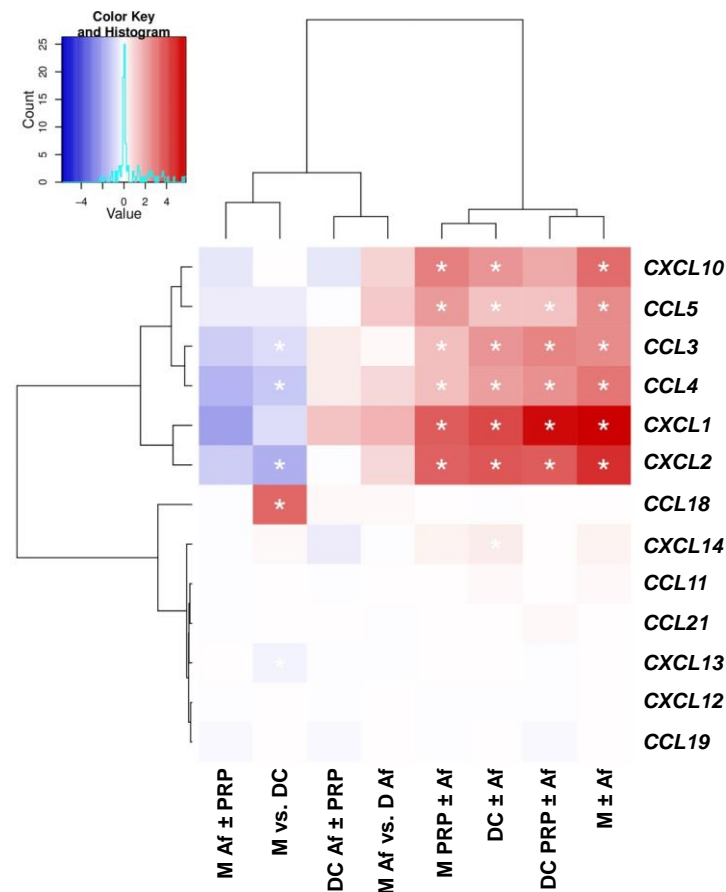


Abbildung 61: Heatmap von Chemokinen in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert.

Interleukine sind wichtige Botenstoffe in der körpereigenen Kommunikation zwischen Immun- und Körperzellen und besitzen je nach Interleukin unterschiedliche Funktionen. Ein Unterschied in der Genexpression zwischen unbehandelten DCs und Makrophagen für die Interleukine *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL8* und *TNF* konnte nachgewiesen werden. Die Interleukine *IL1A*, *IL1B*, *TNF* und *IL8* wurden in beiden Zelltypen durch die Stimulation mit *A. fumigatus* induziert, unabhängig von PRP. *IL6* jedoch wurde nur in *A. fumigatus* behandelten Makrophagen ohne PRP induziert, während in DCs kein PRP-abhängiger Unterschied in der *IL6*-Induktion gezeigt werden konnte. *IL6* wurde jedoch signifikant reduziert durch die Zugabe von PRP zu *A. fumigatus* stimulierten Makrophagen (siehe roter Kreis, Abbildung 62).

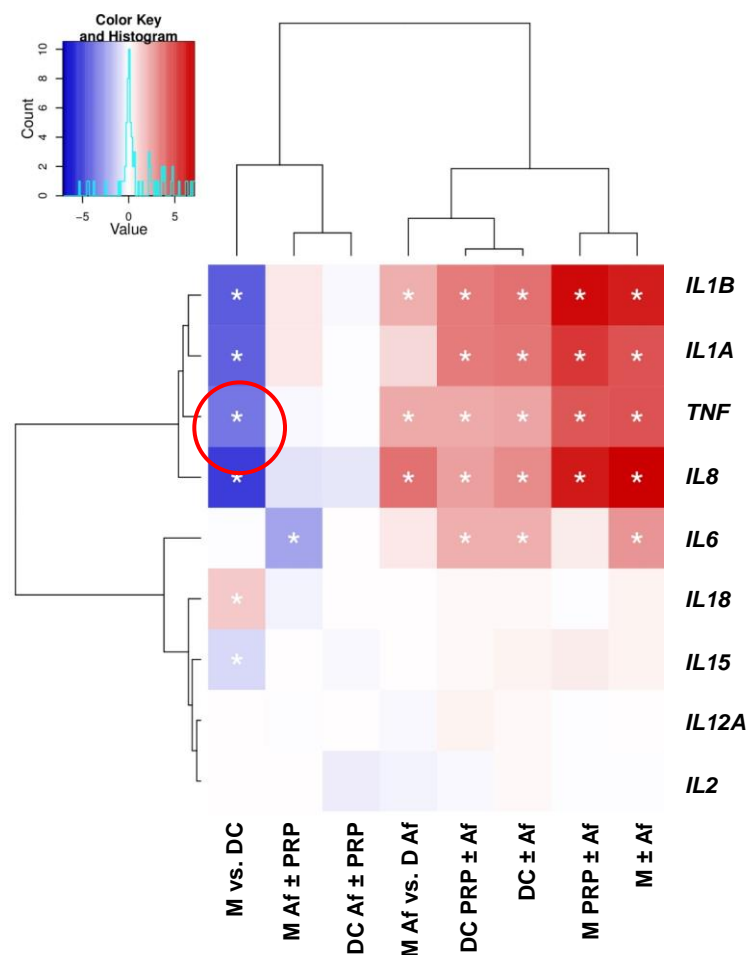


Abbildung 62: Heatmap von proinflammatorischen Interleukinen in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert.

Auch antiinflammatorische Interleukine wurden untersucht. In den *A. fumigatus* behandelten Da *IL6* nicht nur pro- sondern auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt wurde es auch hier aufgeführt. Zudem wurden Unterschiede in der *IL10* und *IL18*-Expression zwischen den unbehandelten Zelltypen gezeigt. *IL10* wurde auch in PRP-behandelten DCs \pm *A. fumigatus* reguliert. Andere antiinflammatorische Interleukine wurden nicht reguliert.

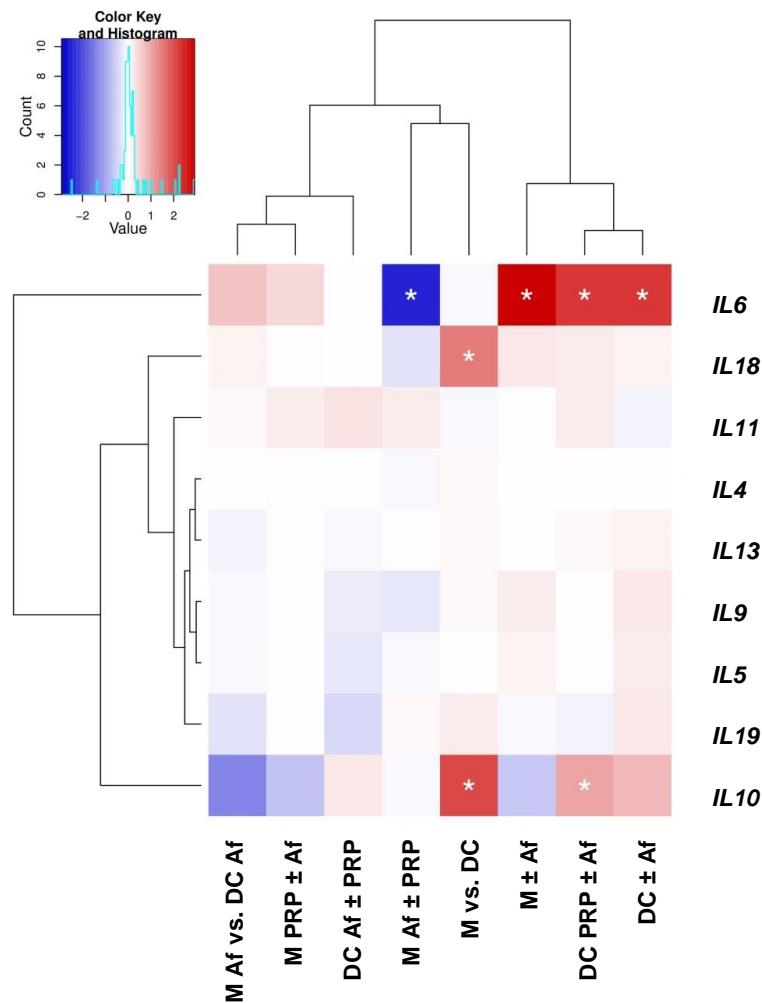


Abbildung 63: Heatmap von antiinflammatorischen Interleukinen in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1), PRP (1:30) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) stimuliert und mittels Affymetrix HGU 219 Microarray analysiert.

4.10.5. Untersuchung zum Einfluss von PRP auf die Zytokinsekretion von *A. fumigatus*-stimulierten DCs und Makrophagen

Da die Zugabe von PRP zu *A. fumigatus*-stimulierten Makrophagen Einfluss auf die Zytokingenexpression von *IL6* hatte, wurde ein umfangreiches Zytokinsekretionsprofil erstellt. Hierbei wurden die Konzentration an freigesetztem G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p40, IL12p70, IL-1RA, IL-1A, IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1a/b, RANTES, TNF und CXCL1 mittels ELISA bestimmt.

Makrophagen sezernierten durch die Stimulation mit PRP, *A. fumigatus* und der Kombination beider Stimuli signifikante Konzentrationen an TNF α . Durch die Kombination von *A. fumigatus* und PRP wurde signifikant mehr TNF α freigesetzt als durch PRP oder *A. fumigatus* alleine. Auch in DCs wurde eine Induktion der Zytokinfreisetzung beobachtet, diese war allerdings nicht signifikant. Bei IL-1RA konnte nur in DCs eine signifikante Freisetzung nachgewiesen werden, welche allerdings in der Kombination aus *A. fumigatus* und PRP gegenüber *A. fumigatus* signifikant reduziert war. Das antiinflammatorische IL-10 wurde zwar in höherer Konzentration von Makrophagen sezerniert, war aber statistisch nur für DCs, stimuliert mit *A. fumigatus* und *A. fumigatus* mit PRP signifikant. Interessanterweise wurde die Sezernierung von IL-10 durch *A. fumigatus* mit PRP signifikant reduziert. MIP-1a und MIP-1b wurden sowohl in DCs als auch Makrophagen durch die Stimulation mit *A. fumigatus* und *A. fumigatus* mit PRP vermehrt sezerniert. Während dies für MIP-1b signifikant war, konnte nur von Makrophagen sezerniertes MIP-1a signifikant bestimmt werden. CXCL1 wurde sowohl von DCs als auch Makrophagen durch jeden der Stimuli signifikant sezerniert.

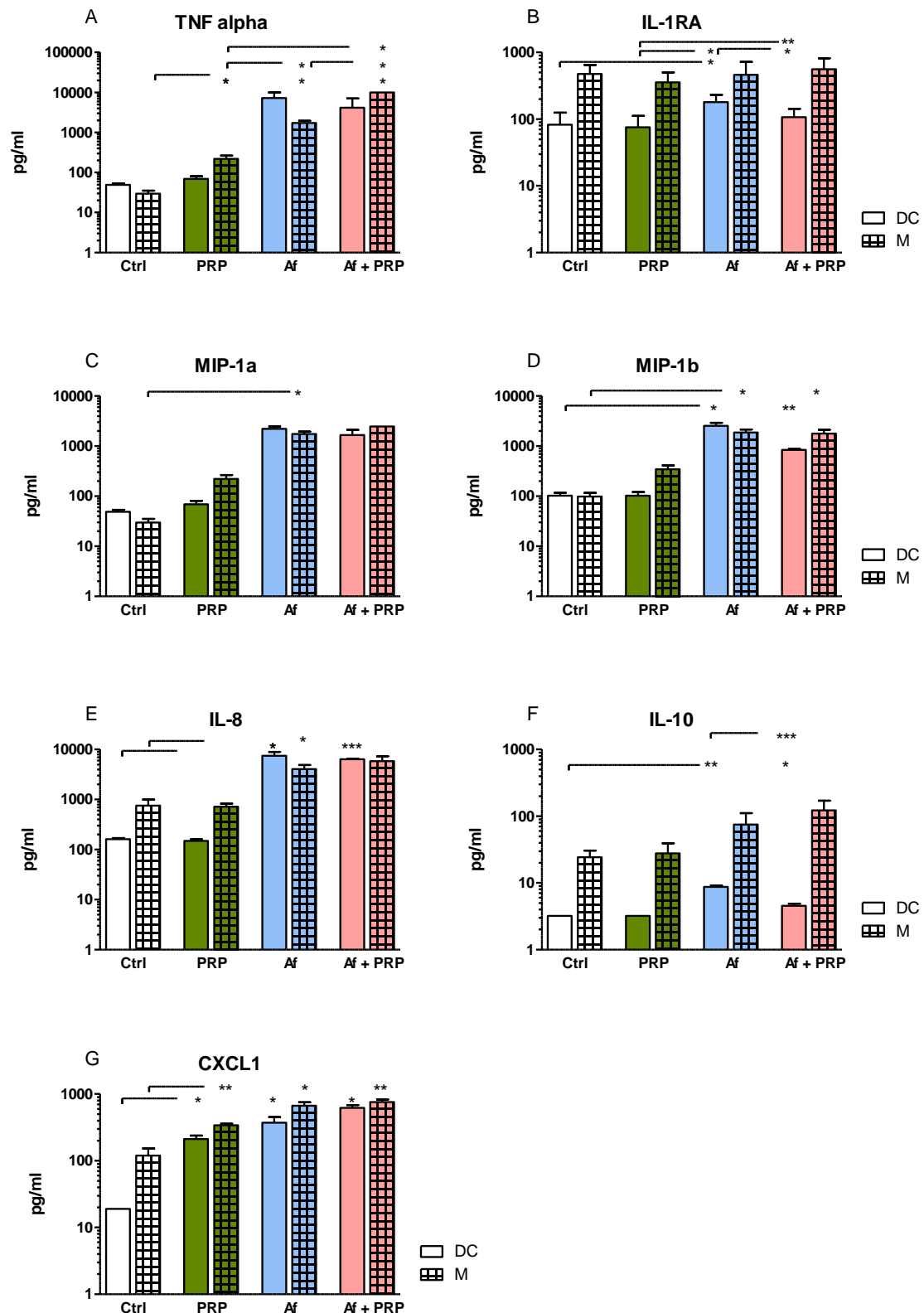


Abbildung 64: Zytokinfreisetzung der mit *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs (ohne Muster) und Makrophagen (M, kariert) wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) stimuliert. Die zellfreien Überstände wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.10.5.1. Untersuchung der RANTES-Sezernierung von DCs und Makrophagen

Die besondere Rolle von RANTES wurde bereits bei der Zytokinantwort von PRP ohne Immunzellen beschrieben (siehe 4.6.2). Dort wurde gezeigt, dass RANTES bereits in signifikanten Mengen von PRP sezerniert wurde. Diese freigesetzte Konzentration von RANTES spiegelte sich auch in der Anwesenheit der Immunzellen wieder (Abbildung 65B). Während *A. fumigatus* nur eine geringe, von aber DCs signifikante, RANTES Freisetzung induzierte, wurde es in hoher Konzentration bei PRP und PRP+ *A. fumigatus* bestimmt. Auf Genexpressionsebene wurde durch PRP keine Induktion des *RANTES* beobachtet. Stattdessen induzierte die Ko-Kultur mit *A. fumigatus* eine leichte *RANTES*-Expression. Diese wurde durch die Zugabe von Plättchen zu DCs komplett reduziert, während in Makrophagen nur eine leichte Reduktion der *RANTES*-Induktion beobachtet wurde. Daher wurde angenommen, dass dieses freigesetzte RANTES von den Plättchen und nicht von DCs und Makrophagen sezerniert wurde. Eine leichte Zunahme der RANTES-Sekretion konnte auch zwischen PRP und *A. fumigatus* mit PRP behandelten Immunzellen gezeigt werden.

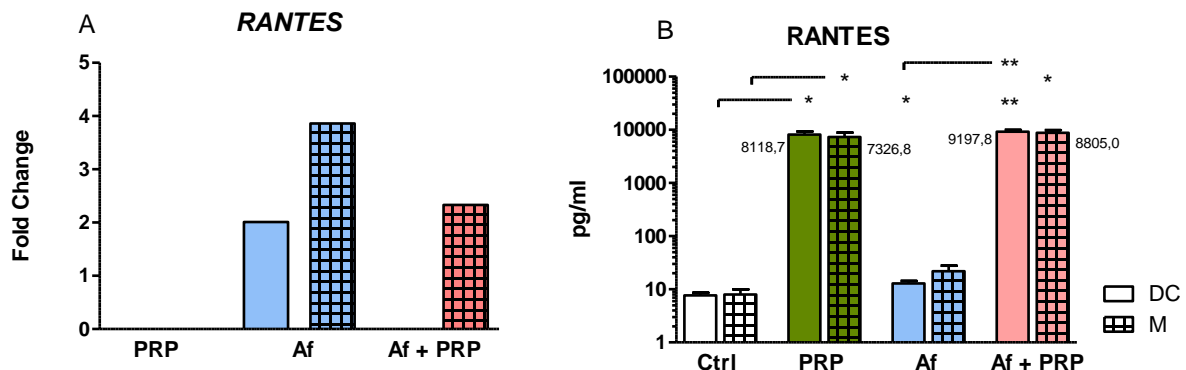


Abbildung 65: RANTES-Regulation und Freisetzung der mit *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs (ohne Muster) und Makrophagen (M, kariert) wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1) (Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + RPR, rot) stimuliert. A) Fold Change aus Microarray. B) Die zellfreien Überstände wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

4.10.6. Untersuchung des Einflusses von PRP auf die IL-6-Antwort

Nachdem in 4.10.4 gezeigt wurde, dass in Microarrays durch die Addition von PRP zu den *A. fumigatus*-stimulierten Makrophagen *IL6* statistisch signifikant reduziert wurde, sollte dies mittels qPCR bestätigt werden.

Hierfür wurden die beiden Zelltypen entweder mit PRP, *A. fumigatus* oder der Kombination aus *A. fumigatus* und PRP für 6 h stimuliert und die IL-6 Konzentration im zellfreien Überstand quantifiziert. Hierbei konnte man zeigen, dass durch PRP die Freisetzung von IL-6 statistisch nicht signifikant reduziert wurde. Die Stimulation mit *A. fumigatus* induzierte eine signifikante IL-6 Freisetzung in beiden Zelltypen. Diese IL-6 Sekretion war auch für die Stimulation mit *A. fumigatus* und PRP signifikant zur Negativkontrolle. Allerdings wurde die IL-6-Freisetzung durch die Kombination von *A. fumigatus* mit PRP in beiden Zelltypen reduziert. Diese Reduktion war in DCs sogar statistisch signifikant gegenüber *A. fumigatus*-behandelten DCs.

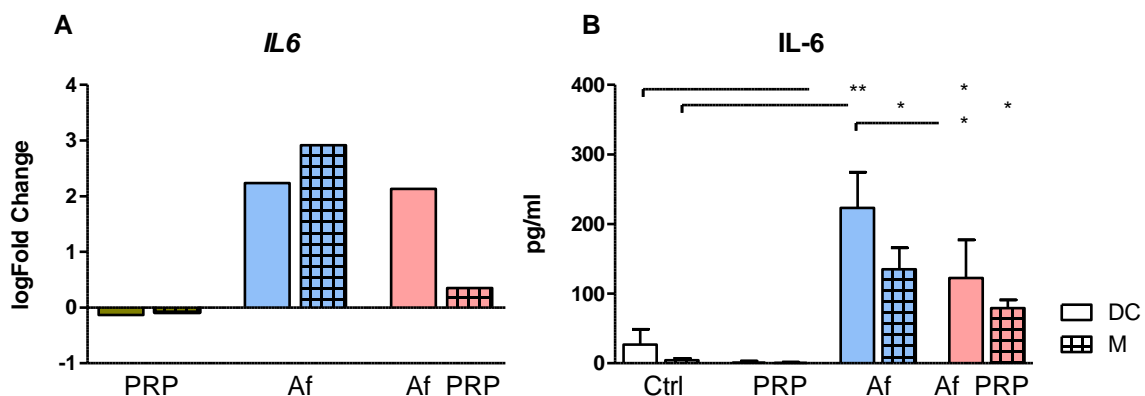


Abbildung 66: Analyse des Zytokines IL-6 von *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1) (Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) stimuliert. Die zellfreien Kulturüberstände wurden mittels IL-6 *in-house* ELISA analysiert. A) DCs, B) Makrophagen (M).

4.10.7. Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Expression von *KLF4* in *A. fumigatus*-stimulierten DCs und Makrophagen

Die Rolle von *KLF4* in der Immunantwort auf Pilze wurde in dieser Arbeit bereits dargestellt (siehe 4.3.5). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *KLF4* durch *A. fumigatus* und *C. albicans*

signifikant reduziert in den Zellen vorhanden war im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zudem wurden nun die Regulation in Makrophagen und der Einfluss von PRP auf die Regulation von *KLF4* überprüft. Hierfür wurden sowohl Microarray-Analysen als auch qPCRs verwendet. Es konnte erneut gezeigt werden, dass *KLF4* durch die Stimulation mit *A. fumigatus* reduziert wurde. Dieser Einfluss wurde hier auch für Makrophagen beschrieben (Abbildung 67A). Interessanterweise wurde die *KLF4* Expression von PRP beeinflusst. So wurde *KLF4* durch PRP ohne *A. fumigatus* reduziert. Dieser Stimulus war bereits ausreichend, für eine signifikante Reduktion von *KLF4* in Makrophagen. Die Herunterregulierung mit *A. fumigatus* alleine war weniger deutlich. Die Kombination von *A. fumigatus* mit PRP induzierte zudem die stärkste *KLF4* Reduktion. In DCs war eine Stimulation mit PRP nicht ausreichend für eine signifikante Reduktion von *KLF4*. Durch *A. fumigatus* und *A. fumigatus* mit PRP wurde *KLF4* jedoch signifikant reduziert. Die Kombination aus *A. fumigatus* mit PRP reduzierte *KLF4* zudem statistisch signifikant gegenüber *A. fumigatus*. Diese Ergebnisse der qPCR wurden auch durch die Heatmap der Signalintensitäten des Microarrays bestätigt (Abbildung 67B). Hier wurde zudem deutlich, dass *KLF4* in den unterschiedlichen Zelltypen bereits in den Kontrollen unterschiedlich stark vorhanden war. Während unbehandelte DCs *KLF4* mit einer relativ hohen Signalintensität exprimierten, wurde es in Makrophagen weniger stark exprimiert. Die Stimulus-abhängige Reduktion von *KLF4* wurde aber auch hier deutlich.

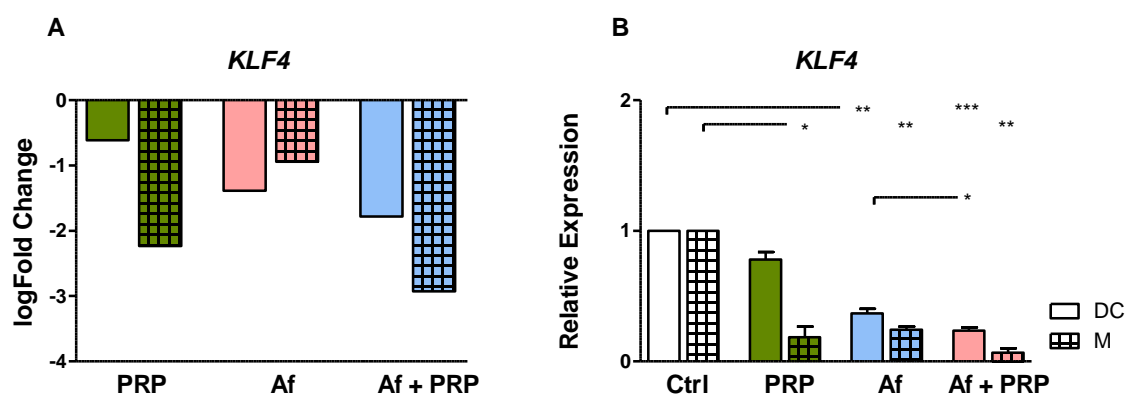


Abbildung 67: *KLF4* Regulation in *A. fumigatus*, PRP und *A. fumigatus* mit PRP stimulierten DCs und Makrophagen. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1) (Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) für 3 h stimuliert. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler. A) Analyse der *KLF4* Regulation mittels Microarray B) Analyse der *KLF4* Regulation mittels qPCR.

4.10.8. Validierung des DC/Makrophagen PRP-Microarrays

Der Microarray wurde mittels qPCR für die zufällig ausgewählten Gene *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1B* und *TNF* validiert. Die Validierung der Regulation von *KLF4* wurde bereits dargestellt. Die Induktion der ausgewählten Gene konnte mittels qPCR bestätigt und somit auch die Microarray-Ergebnisse validiert werden.

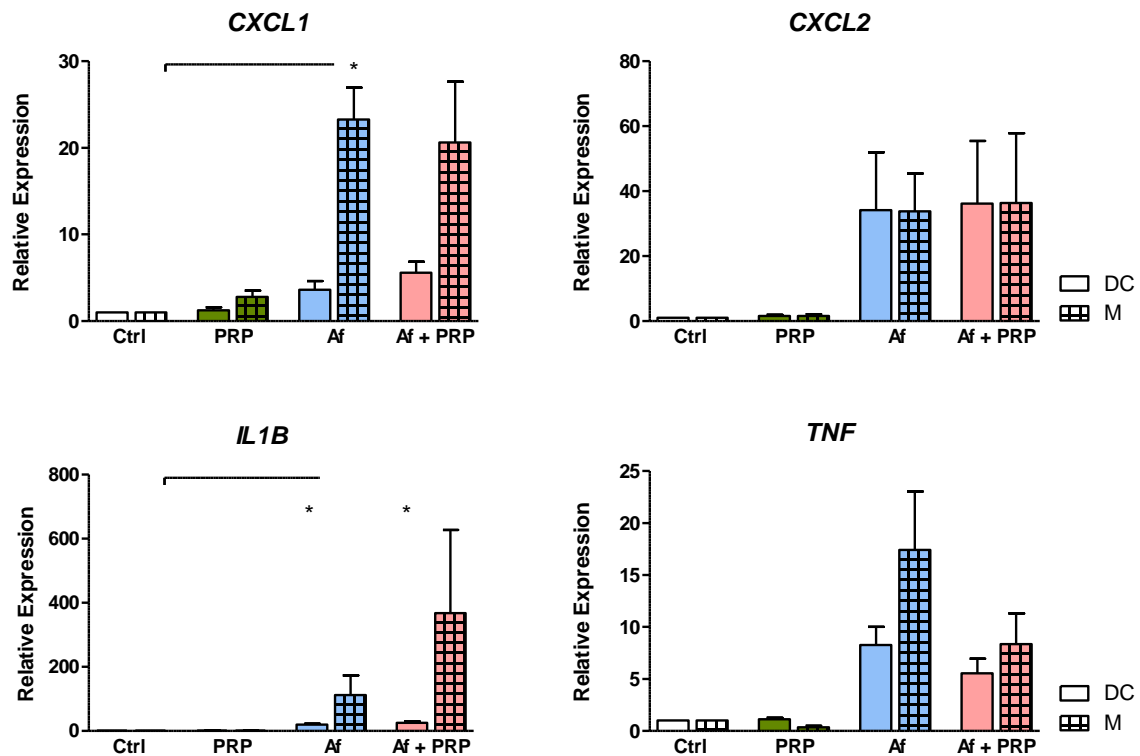


Abbildung 68: Array Validierung der DC und Makrophagen Microarrays mittels qPCR. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (MOI1) (Af, blau), PRP (1:30, grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) für 6 h stimuliert. Analyse der Regulation von *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1B* und *TNF* mittels qPCR. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler.

Neben der eigentlichen Validierung wurden weitere interessante Gene validiert. Diese wurden spezifisch in den einzelnen Zelltypen reguliert.

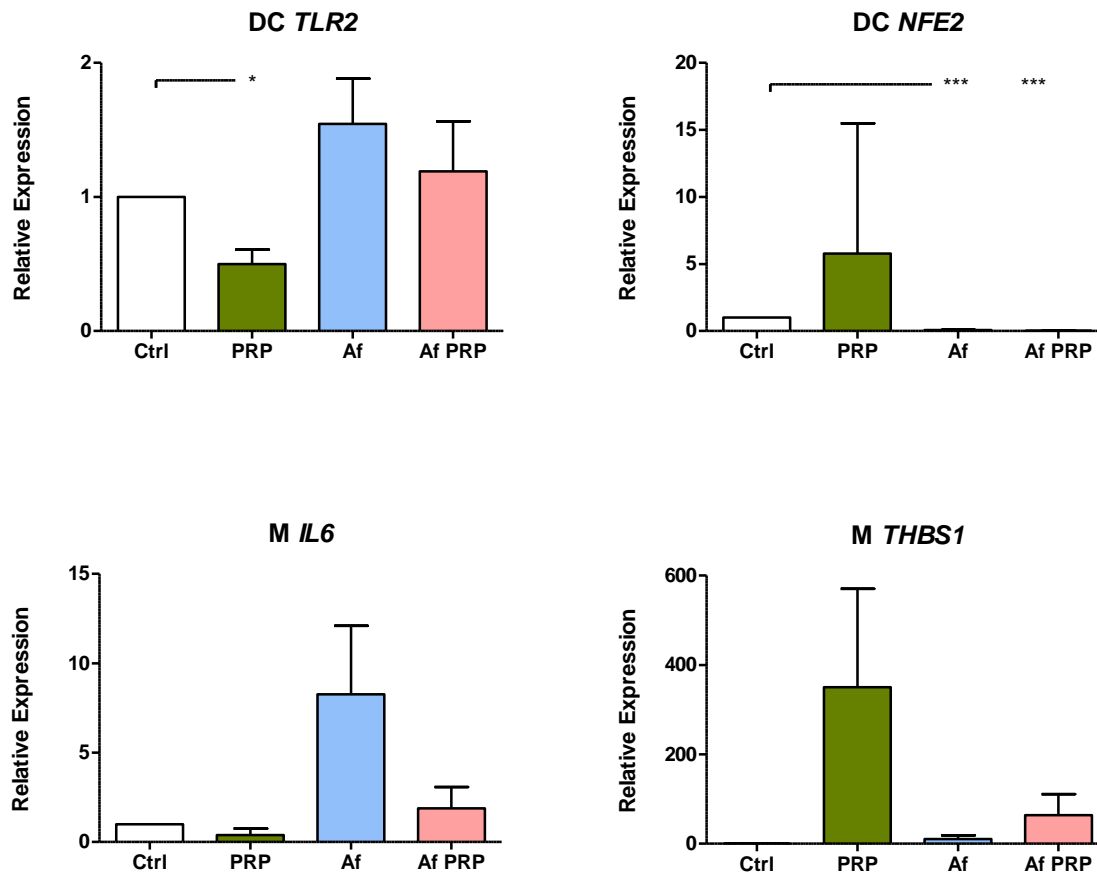


Abbildung 69: Array Validierung des DC und Makrophagen Mikro Arrays von *TLR2*, *NFE2*, *IL6* und *THBS1* mittels qPCR. DCs und Makrophagen wurden am Tag 6 in drei unabhängigen Experimenten mit *A. fumigatus* (Af, blau, MOI 1), PRP (1:30 grün) oder *A. fumigatus* (MOI1) + PRP (1:30) (Af + PRP, rot) für 6 h stimuliert. Analyse der Regulation von *TLR2*, *NFE2*, *IL6* und *THBS1* mittels qPCR. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit Mittelwert und Standardfehler.

4.11. Erstellung eines Boolesches Models

In enger Kooperation mit Martin Kaltdorf und Prof. Thomas Dandekar wurde ein Boolesches Model erstellt. Das Netzwerk wurde über eine ausgiebige Literatursuche generiert in der Interaktionstypen wie Aktivierung und Inhibierung sowie Interaktionen, die mit *A. fumigatus* Infektionen assoziiert sind, beschrieben waren. Das Programm Jimena ermöglicht die Analyse von stabilen Zuständen, sowie die dynamische Simulation von Netzwerken, basierend auf allen möglichen Aktivierungsmustern der Netzwerkknoten. Jeder induzierte

Knoten kann somit die Aktivität des Zielknotens oder der Zielknoten verändern, je nachdem ob er einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss hat und damit das ganze Netzwerk beeinflussen.

Im ersten Schritt wurde dieses Modell mit den im Microarray gewonnenen Genexpressionen unterlegt. Hierbei wurden besonders die Kategorien Apoptose, Reifung von DCs und die Zytokinantwort als Hauptgruppen gewählt. Als Stimulus diente dem Netzwerk *A. fumigatus* Keimschläuche. Hier wurden die induzierten Gene in grün und die reprimierten Gene in rot dargestellt.

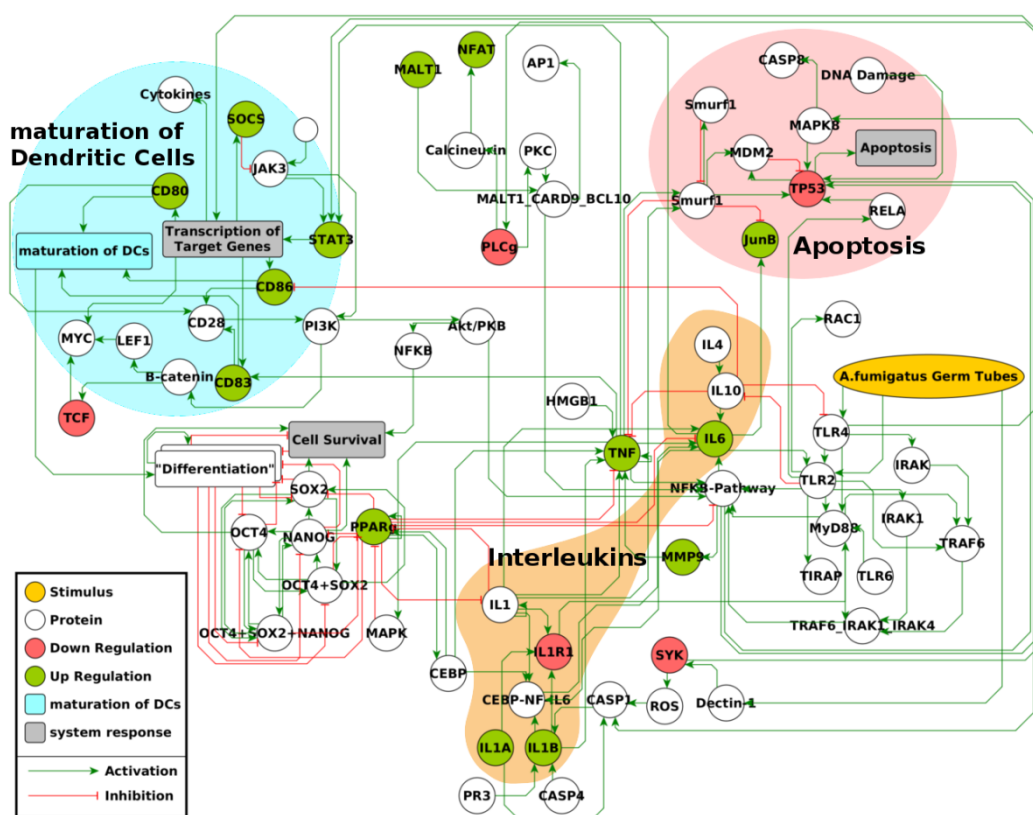


Abbildung 70: Netzwerk der Reifung, Zytokinfreisetzung und Apoptose einer DC, stimuliert mit *A. fumigatus*. Proteine, die mit der Reifung assoziiert sind, wurden in blau markiert, während Apoptose-assoziierte Proteine und Interleukine hellrot bzw. orange hinterlegt wurden. Gene, die durch die Stimulation mit *A. fumigatus* in DCs differenziell exprimiert waren, wurden farblich im Netzwerk dargestellt. Dabei wurden induzierte Gene in grün und herunter-regulierte Gene in rot dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde das Modell getestet. Als Ausgangsstatus wurde ein kalkulierter stabiler Zustand gewählt, bei dem keine Proteine der Maturierung induziert waren. Die Simulationen wurden in „Arbitrary Time Units“ (ATU) dargestellt. Hierbei wurde dem in Abbildung 70 dargestellten Netzwerk unterschiedliche Knotenwerte für den Ausgangsstimulus *A. fumigatus* gesetzt und die Regulation von den Reifemarkern, TLR2,

TLR4 und Dectin-1 sowie den Interleukinen IL1B, IL6 und TNF untersucht. Als Knotenwerte für *A. fumigatus* wurden 0,18, 0,2 und 0,5 gewählt. In einer ersten Simulation wurde ein sehr niedriger Knotenwert für *A. fumigatus* mit einem Wert von 0,18 angelegt. Hierauf wurde in der Simulation fast keine Reaktion der DCs beobachtet (Abbildung 71A). Bei einer erhöhten Aktivität des Knotens für *A. fumigatus* auf 0,2 wurde eine TLR2 abhängige, systematische Antwort (ATU ~8) induziert, wobei sowohl die Reifemarker als auch TNF und IL-6 initiiert wurden (Abbildung 71B). Wurde der Knotenwert von *A. fumigatus* auf 0,5 gesetzt, konnte eine umgehende Reaktion der Reifemarker und Interleukine beobachtet werden (Abbildung 71C).

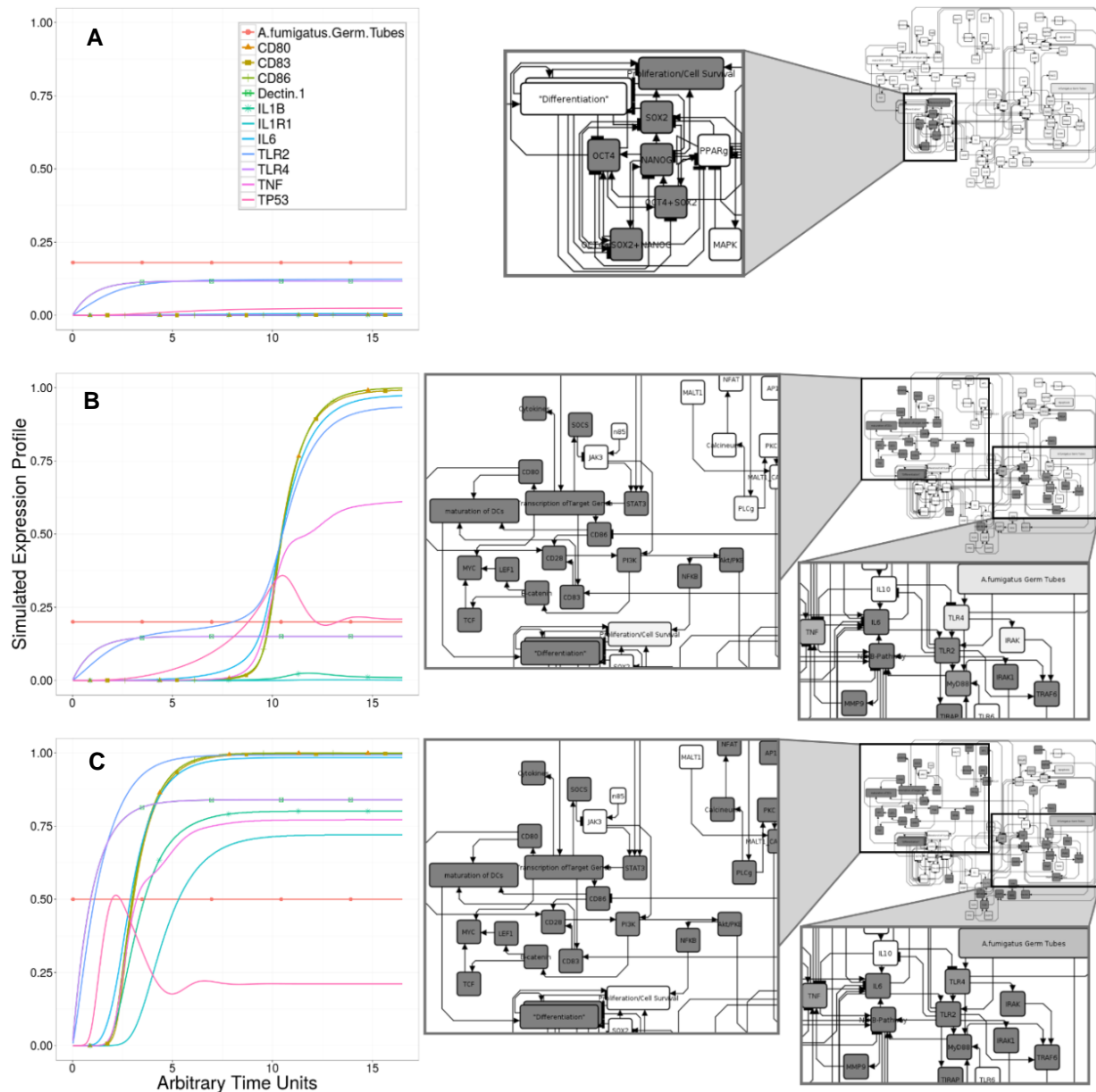


Abbildung 71: Dynamische Simulation basierend auf dem Netzwerk in Abbildung 70. Das Netzwerk wurde mit Jimena nach stabilen Zuständen untersucht und als Ausgangsstatus ein kalkulierter stabiler Zustand gewählt, bei dem keine Proteine der Maturierung aktiv waren. Die Simulationen wurden in „Arbitrary Time Units“ (ATU) dargestellt. Es wurden die Kontenwerte für *A. fumigatus* Keimschläuche von 0,18, 0,2 und 0,5 getestet.

5. Diskussion

5.1. *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS induzieren eine spezifische miRNA-Antwort

miRNAs sind kurze, nicht-codierende RNAs, die selber nicht translatiert werden, welche aber eine wichtige Rolle in der Regulation der Translation von mRNAs spielen. Die Bildung von miRNA:mRNA-Duplexe kann zur Hemmung oder sogar der Degradation der Ziel-mRNA führen (Raisch *et al.* 2013). Auf diese Weise nehmen miRNAs als Regulatoren der Genexpression weitreichenden Einfluss auf zelluläre Prozesse wie beispielsweise der Differenzierung von Monozyten zu DCs und deren Subtypen (Hohl *et al.* 2005, Turner *et al.* 2011). Die Regulation von miR-132 und miR-155 durch den humanpathogenen Pilz *A. fumigatus* wurde von unserer Arbeitsgruppe in Monozyten und DCs beschrieben (Das Gupta *et al.* 2014). Diese Studie zeigte, dass miR-132 PRR-abhängig in einer TLR2- und Dectin-1-abhängigen Antwort durch *A. fumigatus*, aber nicht durch den TLR4-Liganden LPS induziert wurde, während LPS und auch *A. fumigatus* die miR-155 hoch-regulierten (Das Gupta *et al.* 2014).

Da in bisherigen Studien nur miR-132 und miR-155 bezüglich ihrer Regulierung im Zuge einer Infektion mit *A. fumigatus* betrachtet wurden, bestand ein Ziel der vorliegenden Arbeit in der kompletten Sequenzierung, der durch *A. fumigatus* regulierten miRNAs in DCs. Hierfür wurden eine genomweite Sequenzierung kurzer RNAs durchgeführt, um anschließend anhand der miRBase-Datenbank bereits beschriebenen miRNAs identifizieren zu können. Unbehandelte DCs dienten als Negativkontrolle. Mit ihnen wurden DCs verglichen, die entweder mit Keimschläuchen oder Konidien von *A. fumigatus*, oder Keimschläuchen des Hefepilzes *C. albicans* für 6 bzw. 12 h ko-kultiviert wurden. Als bakteriellen Vergleichsstimulus wurde LPS verwendet. Neben der Analyse des Transkriptoms wurde auch die DC-Maturierung, sowie das Zytokinprofil untersucht.

Die mit Konidien stimulierten DCs zeigten weder eine Induktion von Reifemarkern, noch Veränderungen im Zytokinprofil oder im Muster der Genexpression. Wie die Sequenzierung ergab, führte die Stimulation der DCs mit *A. fumigatus* nicht zu einer differentiellen Regulation von miRNAs. Dass Konidien keine oder nur eine geringe Immunreaktion auslösten, ist vereinbar mit anderen Studien. So zeigten murine Knochenmarks-abgeleitete DCs und Makrophagen zwar eine starke Immunantwort auf lebende Konidien nach 18 h, aber nicht auf abgetötete (Hohl *et al.* 2005). Lebende Konidien können während dieser Inkubationszeit auskeimen. Immunzellen erkennen das β -Glukan von keimenden Konidien und Keimschläuchen, nicht aber von ruhenden (Hohl *et al.* 2005). Verantwortlich hierfür ist

der so genannte *Rodlet Layer*. Dieser umgibt ruhende Konidien und besteht aus hydrophobem RodA-Protein, welches immunologisch inert ist und eine Erkennung, Aktivierung und Reifung bei DCs und Alveolarmakrophagen verhindert. Auch eine T-Zellantwort wurde durch dieses Protein *in vivo* nicht ausgelöst (Aimanianda *et al.* 2009). Während eine geringe Anzahl an Genen 12 h nach der Konidien-Stimulation differentiell reguliert wurde, konnte kein Effekt auf die Regulation von miRNAs beobachtet werden. Somit konnte die fehlende Immunantwort der DCs auf ruhende Konidien bestätigt (Hohl *et al.* 2005) und erstmals auch auf miRNA-Ebene gezeigt werden.

Im Gegensatz zur Stimulation mit Konidien führte die Stimulation durch *A. fumigatus* Keimschläuche zu einer veränderten Expression von 3 bzw. 8 verschiedenen miRNAs nach 6 und 12 h verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Durch *C. albicans* wurden 4 und 9 und durch LPS 6 und 22 miRNAs nach 6 bzw. 12 h reguliert. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine zeitabhängige Zunahme regulierter miRNAs im Vergleich zwischen dem frühen und späten Endpunkt.

5.1.1. Induktion von miR-155

Bei der einzigen miRNA, die sowohl durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und LPS reguliert war, handelte es sich um miR-155-5p. Diese relativ gut beschriebene miRNA ist in Zellen des adaptiven Immunsystems und wie auch in Monozyten, Makrophagen und DCs nachgewiesen worden und wurde mit der Kontrolle der Immunantwort assoziiert (Vigorito *et al.* 2013). miRNA-155 wird durch verschiedene TLR-Liganden, sowie TNF α und IFN- α induziert und reduziert über den TLR/IL-1 Signalweg die inflammatorische Antwort in LPS stimulierten humanen DCs (Ceppi *et al.* 2009, Turner *et al.* 2011). Eine Funktion von miR-155 in der Zytokinexpression von DCs konnte gezeigt werden, da miR-155 *knock-out* DCs eine reduzierte Freisetzung von IL-12p70 und TNF α vorweisen (Turner *et al.* 2011). Diese miRNA scheint somit an der Feinregulation in der TLR-Antwort beteiligt zu sein, indem sie eine Amplifikation des TLR-Signals verhindert (Quinn und O'Neill 2011).

Der Einfluss von miR-155 auf die Oberflächenexpression von Reifemarkern wird kontrovers diskutiert (Turner *et al.* 2011). Zumindest eine Studie zeigt, dass über das miR-155-Zielgen c-Fos die Reifemarker MHCII, CD40 und CD86 reguliert wurden (Dunand-Sauthier *et al.* 2011). Ohne miR-155 waren DCs somit nicht mehr in der Lage, T-Zellen vollständig zu aktivieren (Dunand-Sauthier *et al.* 2011, Turner *et al.* 2011). Zudem wurde gezeigt, dass miR-155 indirekt über den Transkriptionsfaktor PU.1 auch an der Regulation von DC-SIGN beteiligt ist (Martinez-Nunez *et al.* 2009). Bei DC-SIGN handelt es sich, wie bei Dectin-1, um ein C-Typ-Lektin, das an der Erkennung und Bindung von *A. fumigatus* beteiligt ist (Sainz *et al.* 2012). Die Überexpression von miR-155 führt zu einer Reduzierung von PU.1 und damit

auch von DC-SIGN. Dadurch wird eine geringere Bindungsfähigkeit der DCs an Pilze verursacht (Martinez-Nunez *et al.* 2009).

5.1.2. Pilze induzieren eine spezifische Regulation von RNAs und deren Zielgene

Neben der Induktion von miR-155 durch alle Stimuli wurden auch fünf regulierte miRNAs in der vorliegenden Arbeit identifiziert, die ausschließlich durch *A. fumigatus* und *C. albicans* reguliert waren. Die miRNAs miR-129-5p, miR-132-3p/-5p und miR-212-3p/5p wurden durch die Stimulation der DCs mit *A. fumigatus* und *C. albicans* induziert, nicht aber durch LPS. miR-129-2-3p wurde spezifisch durch die Stimulation mit *A. fumigatus* nach 12 h reguliert.

Bisherige Studien konzentrierten sich größtenteils auf Analysen im murinen System. Eine Reduktion der mmu-miR-204 und mmu-miR-211In wurde in den Nieren von systemisch mit *C. albicans* infizierten Mäusen beschrieben (Li *et al.* 2014). Monk *et al.* (2010) konnten in murinen Makrophagen, die mit *C. albicans* stimuliert wurden, die Induktionen von sieben verschiedenen miRNAs mmu-miR-146, mmu-miR-155, mmu-miR-455, mmu-miR-125a, mmu-miR-135, mmu-miR-192 und mmu-miR-139 zeigen. In der Studie wurden murine Knochenmarksmakrophagen mit Hitze-inaktivierten *C. albicans* für 16 h stimuliert. Wie in dieser vorliegenden Arbeit wurde LPS als bakterielle Kontrolle verwendet. Bei Monk *et al.* (2010) wurden durch LPS mmu-miR-155, mmu-miR-125a, mmu-miR-146a und mmu-miR-99b reguliert (Monk *et al.* 2010). Wie man sehen kann, wurde keine der in Mäusen regulierten miRNAs, mit Ausnahme der miR-155, auch in humanen DCs durch LPS oder *C. albicans* reguliert. Dies mag zum einen an den unterschiedlichen Zelltypen, aber auch den verschiedenen Versuchsorganismen liegen. In einem Vergleich mit der Datenbank *Ensembl* wurde für jede hier regulierte miRNA auch eine orthologe humane miRNAs gefunden. Dennoch scheint nur miR-155 spezieübergreifend sowohl im murinen als auch humanen System induziert zu werden.

Für miR-132 und miR-212 sind bereits Effekte auf die Funktion und Aktivierung von Immunzellen beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit konnte die zuvor beschriebene Regulation von miR-155 und miR-132 bestätigt werden und darüber hinaus auch ein Pilz-spezifischer Effekt auf miR-132 aufgezeigt werden (Das Gupta *et al.* 2014). In THP-1 Zelllinien, PBMCs und Makrophagen wurde eine TLR2-abhängige Induktion von miR-132 und miR-212 gezeigt, welche als reife miRNAs die gleiche *Seed*-Region besitzen (Das Gupta *et al.* 2014, Nahid *et al.* 2013). Als Zielgen für die miR-132/-212-Regulation wurde IRAK4, eine Komponente des MyD88-Signalweges identifiziert. Zudem beeinflussen miR-132 und miR-212 die Expression von CD80 (Wu *et al.* 2014). MiR-132 wurde zudem als Regulator der Inflammation und Immunantwort beschrieben. Es reduziert die Inflammation über die

Acetylcholinesterase in Mausgehirnen und den p300-Transkription-Coaktivators in Endothelzellen (Das Gupta *et al.* 2014, Nahid *et al.* 2013).

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob hier regulierte und in den Datenbanken miRanda und mirTarget2 beschriebene Zielgene durch die Pilze auf Genexpressionsebene beeinflusst waren. Für **miR-132-3p** wurden die regulierten Ziel-Gene *ATP10D*, *ABCG1*, *BARD1*, *SAP30L*, *TTC39C*, *MTMR1* und *SP110* identifiziert. Dass miR-132-3p und miR-212-3p die gleiche *Seed*-Region besitzen, zeigte sich auch in den gefundenen Zielgenen. So wurden *MTMR1* und *SP110* auch als Zielgene für **miR-212-3p** beschrieben. Für einige der vorhergesagten Zielgene ist die Rolle in der Immunantwort weitestgehend unklar. Die Funktion von **TTC39C** (*tetratricopeptide repeat domain 39C*) ist unbekannt und für **MTMR1** (*Myotubularin-related protein 1*) wurde bislang nur eine Funktion bei der Muskeldifferenzierung beschrieben (Santoro *et al.* 2010). **ATP10D** und **ABCG1** wurden in einer GOrilla GO-Bedingungsuntersuchung mit dem Phospholipidtransport in Verbindung gebracht. Bei **ATP10D** handelt es sich um eine P4 ATPase, die am Wechsel von Aminophospholipiden von der exoplasmatischen zur zytoplasmatischen Membranseite beteiligt ist. Diese Phospholipidtranslokation könnte im Zusammenhang mit der Vesikelformierung und der Aufnahme von Signalmolekülen stehen (Folmer *et al.* 2009, Takatsu *et al.* 2011). Der *ATP-Binding-Cassette transporter G1* **ABCG1** ist sowohl ein Bestandteil des Lipidexportkomplexes als auch des TLR4-abhängigen, IRAK-1 und GSK3 β -Signalweges. Geringe Konzentrationen an LPS wurden mit einer inhibierten ABCG1-Expression in Mausmakrophagen in Verbindung gebracht (Maitra und Li 2013). **BARD1** (*BRCA1-associated RING domain 1*) wurde im Zusammenhang mit BRCA1 und damit bei Brustkrebs beschrieben. In der Interaktion zwischen BRCA1 und BARD1 wirken sie tumorsuppressiv und besitzen Funktionen im Zellzyklus. Zudem vermittelt BARD1 zwischen pro-apoptischen Stresssignalwegen und dem p53-abhängigen Apoptosesignalweg und besitzt Bindestellen für NF- κ B. Neben dem direkten Einfluss auf Chromatinmodifikationen konnte *in vitro* zudem gezeigt werden, dass BARD1 die Poly-A-Adenylierungsmaschinerie hemmt und somit einen negativen Einfluss auf die Transkription ausübt (Review siehe Irminger-Finger und Jefford (2006)). Auch **SAP30L**, das an den Sin3A Komplex bindet, beeinflusst die Transkription über die Deacetylierung von Histonen (Viiri *et al.* 2009). Die Herunterregulierung ist somit mit der beobachteten Induktion der Genexpression zu erklären. Für **SP110** wurde ein Einfluss auf Immunfunktionen bislang nur bei Patienten mit VODI (*veno-occlusive disease with immunodeficiency*) einer autosomal rezessiven Immunkrankheit mit beschrieben. Betroffene wiesen eine gestörte T- und B-Zellvermittelte Immunität durch das Fehlen von SP110 auf (Roscioli *et al.* 2006). Ein international angemeldetes Patent (WO 2012055878 A2) beschreibt die Funktion von SP110 in DCs. Dort wurde gezeigt, dass SP110-siRNA behandelte CD4⁺-Zellen reduzierte Mengen an IFN- γ produzierten, während

LPS in Monozyten-abgeleiteten DCs SP110 induzierte. Mit siRNA-SP110 behandelte und LPS stimulierte DCs produzierten weniger inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-12 und IL-6. Zudem wird die T-Zellstimulation von SP110-siRNA behandelten DCs reduziert (Lee und Tough 2013).

Es wurde nur ein potentiell, reguliertes Zielgen für **miR-132-5p** identifiziert. Bei FKBP1B (*FK506-binding protein, Immunophilin superfamily*) handelt es sich um einem zytosolischen Rezeptor für FK506, welcher an der immunsuppressiven Wirkung von FK506 und Rapamycin beteiligt ist (Gant *et al.* 2014). Weitere Funktionen sind bislang unbekannt.

Für **miR-212-5p** wurden fünf potentielle, regulierte Zielgene gefunden. Dabei handelte es sich zum einen um **DHTKD1** (*dehydrogenase E1 and transketolase domain-containing 1*), welches über ATP-Produktion an der Energiebereitstellung beteiligt ist. Eine verminderte DHTKD1-Synthese wurde mit einer gestörten Mitochondrien-Biosynthese und einer erhöhten ROS-Produktion und Apoptoserate in Verbindung gebracht (Xu *et al.* 2013). Die Funktion von **DNPEP**, einer Membran-assoziierten Metallopeptidase, das auch als Zielgen für miR-140 beschrieben wurde, ist in Säugetierzellen weitestgehend unklar. Es scheint jedoch am Protein- und Peptidmetabolismus beteiligt zu sein (Chen *et al.* 2014, Nakamura *et al.* 2011). Darüber hinaus wurden zwei Zielgene identifiziert, die mit der Abwehr von Viren in Verbindung stehen. Zum einen wurde **IFITM2** (*interferon-induced transmembrane 2*), das den Eintritt von Viren über den Lipidbilayer in das Zytoplasma verhindern kann, herabreguliert. (Bailey *et al.* 2014). Ein weiteres Protein zur Virusabwehr ist **TRIM22** (*Tripartite motif 22*), das den NF- κ B-Signalweg aktivieren kann (Qiu *et al.* 2014) und eine zentrale Rolle in der Immunabwehr gegen Viren spielt (Kelly und Barr 2014). Da es sich bei *A. fumigatus* und *C. albicans* nicht um Viren handelt, ist eine Reduktion dieser Abwehrmechanismen durch die Zelle naheliegend.

Bei **SPN** (Sialophorin, auch CD43) handelt es sich um ein weiteres interessantes Zielgen. Das potentiell durch hsa-miR-212-5p regulierte Gen wird auch als „Anti-Adhäsionsmolekül“ bezeichnet und von Monozyten-abgeleiteten DCs in großer Anzahl auf der Zelloberfläche exprimiert. Wird dieses Protein durch einen Antikörper blockiert, werden vermehrt Cluster von DCs mit T-Zellen und eine erhöhte Proliferation von naiven, allogenen T-Zellen beobachtet (Fanales-Belasio *et al.* 1997). Die Zugabe des anti-CD43-Antikörpers wurde mit erhöhten Expressionen von HLA-DR, ICAM-1, CD40 und CD83 assoziiert (Fanales-Belasio *et al.* 1997).

Interessanterweise ist **miR-129-5p** eine von sechs miRNAs, die im Serum von AML-Patienten in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurden (Zhi *et al.* 2013). Bislang wurde allerdings keine inflammatorische oder immunrelevante Funktion für diese miRNA beschrieben. Bei der Transfektion von humanen, fötalen Astrozyten mit miR-129 ist eine

Reduktion der CASP6 beobachtet worden (Noorbakhsh *et al.* 2010). Caspase-6 ist Bestandteil der Caspase-Aktivierungskaskade, welche eine zentrale Rolle in der Initiation der Apoptose spielt.

Bei der einzigen spezifisch durch *A. fumigatus* induzierten miRNA handelte es sich um miR-129-2-3p, welche eine reife miRNA darstellt, die vom gleichen miRNA-Vorläufer wie die miR-129-5p gebildet wird.

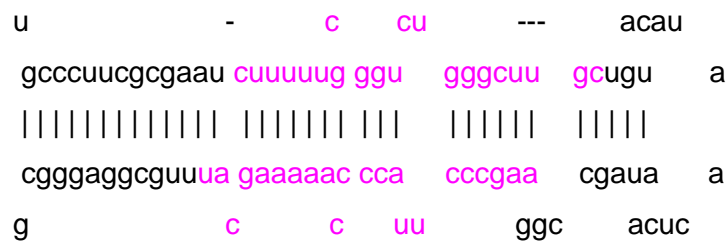


Abbildung 72 miR-129 Vorläufer, mit den markierten miRNAs miR-129-5p (oben) und miR-129-2-3p (unten).

Direkte Immunfunktionen wurden für miR-129-2-3p (früher miR-129-3p) nicht beschrieben. Allerdings konnte in humanen Hautfibroblasten eine Induktion dieser miRNA durch metabolischen Stress beobachtet werden (Kálmán *et al.* 2014). Eine Überexpression von miR-129-2-3p wurde zudem mit einer Reduktion in der Zellproliferation von HepG2-Zellen und einem Einfluss in der SOX4 Expression beschrieben (Chen *et al.* 2013).

Bislang sind weder vollständigen Studie zur miRNA-Antwort humaner Immunzellen gegenüber humanpathogenen Pilzen beschrieben noch Vergleiche zu bakteriellen Stimuli erstellt worden. Alle in dieser Arbeit durch *C. albicans* in humanen DCs regulierten miRNAs wurden erstmalig in diesem Zusammenhang beschrieben. Auch für *A. fumigatus* konnten weitere regulierte miRNAs identifiziert werden. Auch wenn es sich bei miRNAs um wichtige Regulatoren der Genexpression handelt und deren vielseitige Funktionen zu Zeit intensiv erforscht werden, konnte in dieser Arbeit nur eine eher geringe Anzahl an Pilz-regulierten miRNAs und deren Zielgene gefunden werden. Gerade die Zielgene vieler miRNAs sind bislang oft nicht validiert oder gänzlich unbekannt. Durch weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet werden möglicherweise neue Ziel-Gene beschrieben. Die erhobenen Daten können dann neu analysiert werden. Ob sich die spezifisch durch Pilze regulierten miRNAs möglicherweise auch als Marker für Pilzinfektionen in Patienten eignen, muss noch validiert werden.

5.2. KLF4 stellt einen wichtige Komponente in der IL-6-Immunantwort dar

Neben der Analyse für miRNA-Zielgene wurde in der vorliegenden Arbeit das Transkriptom weiter nach Markern für eine Pilzantwort untersucht. Durch *A. fumigatus* wurden 743 nach 6 h und 1076 Gene nach 12 h reguliert. *C. albicans* induzierte im selben Zeitraum eine differentielle Expression von 1729 bzw. 974 Genen, während LPS der stärkste Stimulus mit 2627 und 2863 regulierten Genen in DCs war. In einer Venn-Diagramm-Analyse wurden für jeden Stimulus spezifische Gene identifiziert. Zudem wurden in einer zeitunabhängigen Auswertung 139 regulierte Gene gefunden, die durch die beiden Pilze, aber nicht durch LPS reguliert waren. Mit 958 Genen waren viele Gene gemeinsam durch die drei Stimuli reguliert. In einer nachfolgenden Untersuchung der regulierten GO-Bedingungen mittels GOrilla konnten regulierte Signalweg identifiziert werden. Alle drei Stimuli induzierten eine Reaktion auf einen externen Stimulus mit „Leukozytendifferenzierung“, „Antwort auf Stress“ und Zytokinproduktion induziert. Hierbei wurden die Signalwege zur Produktion der Zytokine IL-6, IL-12, IL-2 IFN γ , der TNF Superfamilie und Chemokinen induziert, während die anti-inflammatorische Antwort über IL-10 reduziert wurde. Diese Zytokinantwort wurde mittels ELISA auch auf Proteinebene untersucht. Die Induktion der Interleukine IL-6, IL-12p40, IFN- γ und TNF α konnte hier bestätigt werden, auch wenn zum Teil nur Trends erkennbar waren. Überdies wurden die gemessenen Chemokine RANTES, MCP-1, MIP-1a/b und Eotaxin induziert. Interessanterweise wurde in der Analyse der Signalwege der IL-10- Signalweg auf Genexpressionsebene negativ reguliert, dennoch konnte eine Freisetzung von IL-10 in den Zellüberstand gemessen werden. Die Leukozytendifferenzierung wurde sowohl in der Signalweganalyse auch durch die tatsächlich gemessene Veränderung der Oberflächenexpression der Reifemarker gezeigt.

Die 139 durch die Pilze regulierten Gene kennzeichneten eine Antwort auf einen externen Stimulus, der nicht-bakteriellen Ursprungs war. Diese Antwort wurde über *second-messenger* vermittelte Wege und Enzym-gekoppelte Rezeptorsignalwege vermittelt und induzierte einen Tyrosinkinase-Signalweg. Bei SYK handelt es sich um eine Tyrosinkinase, mit einer großen Bandbreite an Funktionen (Mócsai *et al.* 2010). Für *A. fumigatus* wurde gezeigt, dass SYK unterhalb im Signalweg von Dectin-1 an der Inflammasom- und Caspase-1 Aktivierung beteiligt ist. Diese steht im Zusammenhang mit der IL-1 β -Generierung (Saïd-Sadier *et al.* 2010). Interessanterweise wurde SYK zwar auf Transkriptions- nicht aber auf Proteinebene herabreguliert.

Charakteristische Signalwege oder Unterschiede in der Zytokinantwort, die eine eindeutige Differenzierung zwischen den Stimuli ermöglicht hätte, wurden nicht gefunden. Allerdings

wurde ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der ein einzigartiges Expressionsprofil aufzeigt. *KLF4* war der einzige von 60 regulierten Transkriptionsfaktoren und insgesamt eines von nur zwei Genen, der eine entgegengesetzte Regulation im Vergleich zwischen den Pilzen und LPS aufwies. Es wurde durch die Stimulation der DCs mit LPS induziert, während die Ko-Kultur mit den Pilzen *A. fumigatus* und *C. albicans* die Genexpression reprimierte. Diese Beobachtung war zeitabhängig, während zum frühen Zeitpunkt (6 h) wurde *KLF4* durch LPS induziert wurde, konnte nach 12 h keine Induktion auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden. Die Zeitabhängigkeit der *KLF4*-Regulation wurde auch auf Proteinebene bestätigt. Hierbei zeigte sich eine zeitlich verzögerte Reaktion der *KLF4*-Regulation bei LPS. Bei der Ko-Kultivierung mit den Pilzen konnte eine zeitabhängige Abnahme der Proteinmenge nachgewiesen werden.

Als Mitglied der *Krüppel-like factor* Familie wurde *KLF4* zuerst in Epithelzellen des Darms und der Haut nachgewiesen, wird aber auch in hohem Maße in murinen und menschlichen embryonalen Stammzellen exprimiert (Kaushik *et al.* 2010). Für *KLF4* konnte zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, dass eine Reprogrammierung von murinen Fibroblasten zu pluripotenten embryonalen Stammzellen möglich ist (Alder *et al.* 2008, Kaushik *et al.* 2010). Zudem wurde die Beteiligung von *KLF4* in inflammatorischen Prozessen nachgewiesen. In Endothelzellen, die mit proinflammatorischen Stimuli behandelt wurden, hatte *KLF4* einen inhibierenden Effekt auf die Expression von CCL2, RANTES und PAI-1 (Hamik *et al.* 2007). Im murinen System wurde gezeigt, dass LPS *KLF4* induzieren kann, was zu einer Aktivierung der *inducible nitric-oxide* Synthase (iNOS), einem Schlüsselement der angeborenen Immunantwort in Makrophagen, führt (Feinberg *et al.* 2005). Feinberg *et al.* (2005) konnten zudem zeigen, dass *KLF4* die TGF- β 1/Smad3-Funktion negativ beeinflusst, möglicherweise über eine kompetitive Interaktion mit p300. In murinen Mikrogliazellen wurden durch einen *KLF4 knock-down* das proinflammatorische Zytokin IL-6 reduziert (Kaushik *et al.* 2010). Dies wurde in murinen DCs und Monozyten bestätigt, wo gezeigt wurde, dass *KLF4* an den IL-6 Promotor binden und diesen aktivieren kann (Rosenzweig *et al.* 2013, Srivastava *et al.* 2010). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die *KLF4*-abhängige Regulation von IL-6 in humanen DCs mittels RNA-Interferenz analysiert. Es konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen der IL-6 Antwort und dem *KLF4* Level bestätigt werden. Ein *knock-down* von *KLF4* resultierte in einer reduzierten Induktion und Sezernierung von IL-6 in LPS-stimulierten DCs. Die schwache Induktion von IL-6 in Pilz-behandelten DCs könnte erklären, warum der *KLF4 knock-down* nur einen geringen Einfluss in die IL-6 Expression aufwies. Andere inflammatorische Moleküle wie RANTES, IL10, CXCL10 und IL1 β wurden durch das *KLF4 Silencing* nicht beeinflusst und nur eine geringe Reduktion von TNF α wurde beobachtet. Dies zeigt die hohe Spezifität der *KLF4*-abhängigen IL-6 Regulation. Dennoch wurde IL-6 auch durch Pilze induziert.

Für die Erkennung von Pathogenen tragen DCs und andere mononukleäre Phagozyten PRRs auf ihrer Zelloberfläche. Dabei ist TLR2, ein Toll-like Rezeptor, hauptsächlich involviert in der Erkennung von Peptidoglykanen, dem Hauptbestandteil der Oberfläche von gram-positiven Bakterien. TLR4 wird durch die Bindung von LPS der Membran von gram-negativen Bakterien aktiviert (Mezger *et al.* 2008a). Auch in der Erkennung von *A. fumigatus* und *C. albicans* spielen diese Rezeptoren eine Rolle, wie Versuche mit TLR-defizienten Mäusen belegen (Mezger *et al.* 2008a). Dennoch handelt es sich bei dem Hauptrezeptor für *A. fumigatus* und *C. albicans* um Dectin-1 (Chai *et al.* 2009, Gantner *et al.* 2005). Dieses Typ-II Transmembranprotein bindet β -Glukan, ein Hauptbestandteil der Pilzellwand (Gantner *et al.* 2005).

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rezeptoraktivierung eine KLF4-Regulation induziert. Hierfür wurden spezifische Liganden für die einzelnen Rezeptoren verwendet. LPS und LPS ultra-rein stellen Liganden für TLR4/TLR2 bzw. TLR4 dar. Die Stimulation mit beiden Formen von LPS induzierte die KLF4 Expression auf Gen- und Proteinebene. Auf der anderen Seite wurde KLF4 durch die Stimulation der DCs mit Pam3CSK4 stark reduziert. Bei diesem synthetischen Lipoprotein handelt es sich um einen TLR2/TLR1 Liganden. Der Effekt von *depleted* Zymosan, einem Agonisten für Dectin-1, war schwächer als Pam3CSK4, aber dennoch auf Genexpressionsebene hochsignifikant.

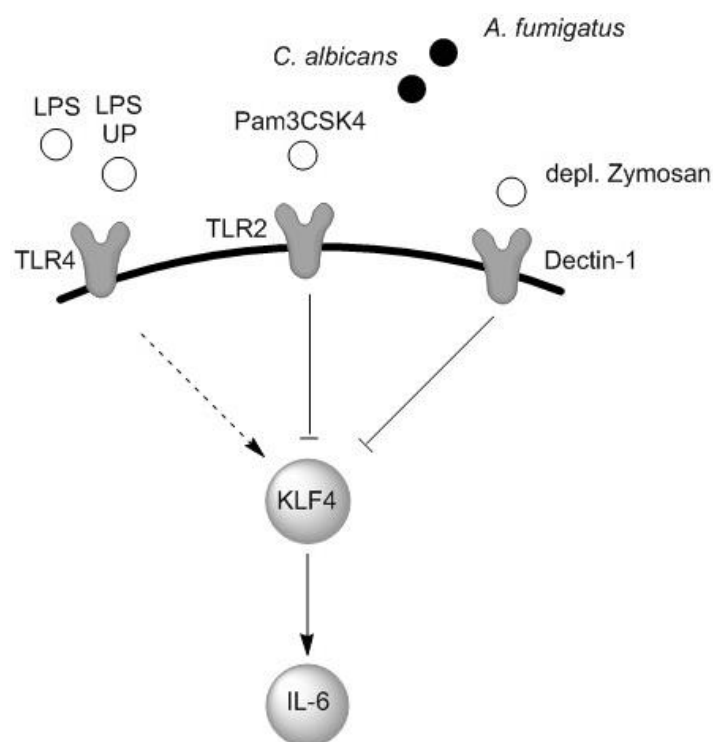


Abbildung 73: Schematische Darstellung der TLR- und Dectin-1-abhängigen Regulation von IL-6.

In einem frühen Stadium der Inflammation stellen DCs und Makrophagen die wichtigsten Produzenten für IL-6 dar (Neveu *et al.* 2011). Während IL-6 auf Gen- und Proteinlevel durch den KLF4 *knock-down* bei LPS-behandelten DCs deutlich reduziert wurden, war dieser Effekt geringer bei Pilz-stimulierten DCs. Möglicherweise aktiviert die Bindung von β -Glukan an Dectin-1 zudem weitere Signalwege, wie zum Beispiel die CD37-Kolokalisierung. Meyer-Wentrup *et al.* (2007) konnten zeigen, dass CD37 ein wichtiger Stabilisator für Dectin-1 darstellt und ebenfalls an der Dectin-1 vermittelten IL-6-Antwort beteiligt ist. Zudem kollaborieren TLR2 und Dectin-1, wobei Dectin-1 möglicherweise die TLR2-abhängige Zytokinantwort amplifiziert (Ferwerda *et al.* 2008, Gantner *et al.* 2005). Somit scheint die IL-6 Antwort abhängig vom jeweiligen Stimulus zu sein, wobei KLF4 als Regulator fungiert. Diese Annahme wurde durch Chai *et al.* (2011) gestärkt, die eine TLR4-abhängige Änderung der IL-6-Freisetzung durch α - und β -Glukan und Galaktomannan, sowie eine α -Glukan-abhängige IL-6 Antwort über den TLR2-Signalweg beschrieben. Diese TLR-Antworten wurden in Abhängigkeit von der Pilzmorphologie gezeigt. Nur Hyphen, aber keine Konidien, reduzierten die TLR4-Antwort (Chai *et al.* 2009). Dies könnte eine Strategie der Pilze darstellen, um die Immunantwort zu umgehen, indem die Aktivierung des Immunsystems reduziert wird.

Zusammenfassend beschreibt dieser Arbeit KLF4 als wichtigen Faktor in der Immunantwort gegen Pilz-Infektionen und seine PRR-abhängige Regulation. Zudem wurde die Funktion von KLF4 in der Regulation von IL-6 in humanen DCs gezeigt. IL-6 spielt eine wichtige Rolle beim Übergang von angeborener zur erworbener Immunität dar (Scheller *et al.* 2011). Eine Hauptaufgabe von IL-6 ist die Rekrutierung von T-Zellen, sowie seine Beteiligung an der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung, wodurch die Th2 und Th17-Antwort gefördert werden (Scheller *et al.* 2011). Die Th1/Th2-Balance ist ein kritischer Faktor, der den Ausgang von Pilzinfektionen beeinflusst (Romani 2011). KLF4 könnte daher über den Einfluss auf die IL-6-Sekretion diese Balance beeinflussen und ein wichtiges Stellglied in der Kontrolle von Pilzinfektionen darstellen.

5.3. Plättchen beeinflussen die Immunfunktionen von DCs und Makrophagen

Plättchen sind lange Zeit nur als Bestandteil der Hämostase gesehen worden. Ihre Rolle in der Immunantwort verdeutlichte sich in den letzten Jahren und wurde immer besser beschrieben. So ist mittlerweile bekannt, dass Plättchen aktiv an der Bekämpfung von Pathogenen beteiligt sind (Speth *et al.* 2013d). Auch für Infektionen mit *A. fumigatus* wurde eine Immunabwehrfunktion beschrieben. So können Plättchen mit *A. fumigatus* Konidien

interagieren, diese aber nicht internalisieren (Perkhofer *et al.* 2008). Sie werden aber sowohl durch Konidien als auch Hyphen von *A. fumigatus* aktiviert (Rodland *et al.* 2010). Die Aktivierung scheint durch das Galactosaminogalactan, einer Komponente der *A. fumigatus*-Zellwand, zu erfolgen (Rambach *et al.* 2015). Eine weitere Komponente der Zellwand, das Galactomannan, wird von wachsenden Hyphen freigesetzt und dient als wichtiger Marker in der Diagnostik von *A. fumigatus*-Infektionen (Badiie und Hashemizadeh 2014). Plättchen konnten diese Galactomannan-Freisetzung beeinflussen und das Hyphenwachstum reduzieren (Perkhofer *et al.* 2008). Neben der aktiven Bekämpfung enthalten Plättchen eine Vielzahl an Signalmolekülen in ihren Granula, die bei Aktivierung freigesetzt werden (Nurden 2011). Ob und wie Plättchen die Immunantwort von Zellen des angeborenen Immunsystems gegen *A. fumigatus* beeinflussen, ist bislang kaum untersucht. Daher wurden sowohl Analysen zur Genexpression, als auch der klassischen Funktionen von DCs und Makrophagen, wie der Phagozytose und ihr Einfluss auf die metabolische Aktivität des Pilzes durchgeführt.

5.3.1. RPP beeinflusst leicht die Reifung von *A. fumigatus*-stimulierten DCs

Nur DCs sind als einzige Zellen in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren (Wuthrich *et al.* 2012). Dafür werden bei der Reifung kostimulatorische Moleküle und MHC-Moleküle vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser als DC-Reifung bezeichnete Prozess wird auch durch die Stimulation mit *A. fumigatus* induziert und ist charakterisiert durch die verstärkte Expression von CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR (Blanco und Garcia 2008, Braedel *et al.* 2004). In dem hier entwickelten Booleschen Modell wurde die Induktion von den Reifemarkern ebenfalls durch *A. fumigatus* gezeigt. In der Literatur wurde auch ein Einfluss von Plättchen auf die DC-Generierung und Reifung beschrieben (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008, Kissel *et al.* 2006, Langer *et al.* 2007). Daher untersuchte diese Arbeit, ob Plättchen auch einen Einfluss auf die Reifung von DCs durch *A. fumigatus* haben. Hierfür wurden die DCs aus Monozyten über 5 Tage differenziert und für 6 h mit *A. fumigatus* Keimschläuchen stimuliert. PRP wurde entweder mit oder ohne *A. fumigatus*-Stimulation zugegeben, so dass sie in einem physiologischen Verhältnis von 30:1 zu DCs vorhanden waren. Wie bereits gezeigt, wurde CD40 auch von nichtstimulierten DCs auf fast allen Zellen exprimiert. Eine leichte Zunahme durch die Stimulationen konnte allerdings gezeigt werden. Interessanterweise wurde bei den kostimulatorischen Molekülen CD83 und CD86 bereits eine leichte Induktion durch PRP beobachtet. Auch durch die Behandlung mit *A. fumigatus* zeigten die DCs bereits nach 6 h eine leichte Induktion. Diese Induktion war durch die Kombination von PRP und *A. fumigatus* am stärksten und damit signifikant.

Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu einer Veröffentlichung von Kissel *et al.* (2006). In dieser Studie wurde gezeigt, dass weder ruhende und noch aktivierte Plättchen einen Einfluss auf Reifemarker nach 24 h Ko-Kultur mit LPS zeigten. Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass nach 24 h sowohl die PRP-, als auch die Kontrollzellen stark positiv für jeden untersuchten Marker waren. Möglicherweise war daher keine zusätzliche, verstärkte Präsentation der Marker mehr möglich und der Einfluss in der frühen Regulation der Marker wurde verpasst. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine Induktion der DC-Reifung durch Plättchen beschrieben. Langer *et al.* (2007) zeigten eine Induktion von CD83 und CD86 auf 24 h kultivierten DCs. Einhergehend damit konnte eine verstärkte Lymphozyten-Proliferation durch die mit Plättchen kultivierten DCs gezeigt werden. Die Bindung von CD40L, welches auf aktivierten Plättchen auf der Zelloberfläche exprimiert wird, an CD40 der DCs schien diese Reifung zu induzieren (Czapiga *et al.* 2004). Auch bei Hagihara *et al.* (2004) wurde die Induktion von CD83, CD80 und CD86 durch Scherbelastung-aktivierte Plättchen gezeigt. Von ihnen wurde allerdings eine CD40L-unabhängige Maturierung über eine Interaktion mit CD162 (Selectin P-Ligand) mit Plättchen vermutet. Sie konnten auch einen Einfluss löslicher, nicht genauer bestimmter Faktoren auf die DC-Reifung beobachten (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008).

5.3.2. PRP beeinflusst die Zytokinantwort von DCs und Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokinantwort der DCs und Makrophagen auf die Stimulation mit *A. fumigatus* und der Kombination aus *A. fumigatus* und PRP auf Transkriptom- und Proteinebene analysiert. Durch die Zugabe von PRP zu den DCs und Makrophagen wurde keine oder nur eine geringe Induktion der Zytokinsekretion beobachtet. Ausnahmen hierbei waren die TNF α -Freisetzung der Makrophagen und die CXCL1-Sekretion beider Zelltypen. Während es sich bei TNF α um ein Zytokin mit vielfältigen Funktionen handelt, ist die Funktion von CXCL1 recht eindeutig. Bei CXCL1 handelt es sich um ein Chemokin, das chemotaktisch auf Neutrophile wirkt und sie an den Ort der Inflammation dirigiert (De Filippo *et al.* 2013). Möglicherweise ist dies eine Reaktion auf Gewebeschädigung ohne Zusammenhang mit einem Pathogen. Durch die Chemotaxis von Neutrophilen könnten mögliche Pathogene bekämpft werden, die nun in das geschädigte Gewebe eindringen. Auch in der Literatur wurden bereits Veränderungen in der Zytokinsekretion durch Plättchen beschrieben. So führe die Ko-Kultur von DCs mit Plättchen für 48 h zu einer Reduktion in der TNF α - und IL-1 β -Sekretion (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008). Interessanterweise wurde eine Sekretion von IL-12 nur bei durch eine Membran getrennte Ko-Kultur von Plättchen und DCs beobachtet (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008). Nach 6 h Ko-Kultur wurde diese Zytokinregulationen in dieser Arbeit nicht beobachtet.

Möglicherweise war hierfür der gewählte Zeitpunkt zu früh. Zytokine von Makrophagen, die mit PRP kultiviert wurden, sind bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Interessanterweise wurden hohe Konzentrationen von RANTES in den Zellüberständen von PRP-behandelten Zellen gemessen, während die Genexpression des *RANTES*-Gens von PRP-behandelten Zellen nicht induziert war. Erst durch die Zugabe von *A. fumigatus* wurde eine erhöhte Genexpression beobachtet. Um den Ursprung von RANTES zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit dieses Zytokin und alle weiteren bei Immunzellen gemessenen Zytokine auf ihre Freisetzung durch PRP ohne Immunzellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass PRP keine Zytokine an das umgebende Medium in messbarer Menge in der eingesetzten Konzentration abgab. Als einzige Ausnahme wurde RANTES identifiziert. Dieses Zytokin wurde in einer hohen Konzentration in den Überständen von PRP nachgewiesen. Die Aktivierung durch *A. fumigatus* induzierte eine Verdopplung der RANTES-Sezernierung der Plättchen. Diese RANTES-Induktion durch *A. fumigatus* wurde bereits beschrieben und zeigt, dass die Plättchen durch den Pilz aktiviert werden (Rodland *et al.* 2010). Daraus wurde geschlossen, dass das gemessene RANTES im Überstand der Immunzellen nicht bzw. nur zu einem geringen Teil von den Immunzellen stammt. Stattdessen wurde es wahrscheinlicher von den Plättchen sezerniert. Dies wurde von einer Veröffentlichung bestätigt, die zeigte, dass die Menge an mRNA für *RANTES* in DCs durch Plättchen nach 48 h sogar reduziert ist (Hamzeh-Cognasse *et al.* 2008). Die inhibierende Wirkung von PRP konnte in dieser Arbeit auch bei *A. fumigatus* Stimulierung auf Genexpressionsebene bestätigt werden.

Beide Zelltypen reagierten in dieser Arbeit mit der Induktion der Genexpression und Sezernierung von Zytokinen wie TNF α , RANTES, MIP-1a und MIP-1b auf die Stimulation mit *A. fumigatus*. Um den Einfluss von PRP weiter zu untersuchen, wurde dieses zu *A. fumigatus*-stimulierten DCs zugegeben. Nach 6 h konnte keine IL-12-Sekretion gezeigt werden. Wie bereits beschrieben (siehe Abbildung 35), konnte IL12p40 erst nach 12 h statistisch signifikant nachgewiesen werden. Kissel *et al.* (2006) zeigten nach 24 h eine Reduktion der IL-12p70- und TNF α -Antwort, wenn LPS-gereiften DCs Plättchen zugegeben wurden. Bei einer Stimulation von LPS-behandelten Makrophagen mit aktivierten Plättchen wurde von Scull *et al.* (2010) eine verstärkte TNF α , IL-6 und IL-23-Sekretion beschrieben. Dies wurde nur teilweise in dieser Arbeit bestätigt. Eine leichte, nicht signifikante Reduktion der TNF α -Sezernierung konnte für die unreifen DCs bestätigt werden, während TNF α von Makrophagen verstärkt sezerniert wurde. Die verstärkte IL-6-Induktion durch PRP konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Kissel *et al.* 2006). Stattdessen wurde eine Reduktion der IL-6- und IL-10 Sekretion auf Proteinebene gezeigt. Die Regulation von IL6 war zudem eines von 24 statistisch signifikant regulierten Genen von *A. fumigatus* stimulierten

Makrophagen mit PRP im Vergleich zu ohne PRP. Auch im Booleschen Modell war es möglich eine Induktion von IL-6, IL1B und TNF durch *A. fumigatus* in DCs zu simulieren.

Als einzige Veröffentlichung untersuchte Rodland *et al.* (2010) den Einfluss von *A. fumigatus* und Plättchen auf eine Monozyten-Zelllinie und isolierte humane Monozyten. Von beiden Zelltypen fand ein verstärkte Sekretion von IL-8 durch *A. fumigatus*-aktivierte Plättchen statt (Rodland *et al.* 2010). Eine verstärkte Sekretion von IL-8 konnte in dieser Arbeit zwar für *A. fumigatus*-behandelte DCs und Makrophagen gezeigt werden, nicht allerdings eine Verstärkung durch PRP.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sekretion von TNF α , IL-1RA, MIP-1b und IL-10 der DCs durch PRP reduziert wurde, während eine leichte Induktion von CXCL1 beobachtet werden konnte. Bei Makrophagen führte die Kombination von *A. fumigatus* mit PRP zu einer Induktion von TNF α , IL-10 und CXCL1 und einer nicht signifikante Reduktion von MIP-1b. Teilweise konnten in dieser Arbeit, die in der Literatur beschriebenen Modifikationen der Zytokinsekretion bestätigt werden, teilweise wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt. In den meisten Veröffentlichungen erfolgte die Stimulation mit dem bakteriellen LPS und nicht einer pilzlichen Komponente. In der einzigen Veröffentlichung mit *A. fumigatus* als Stimulus wurden Monozyten, aber keine DCs oder Makrophagen verwendet. Somit scheint nicht nur der initiale Stimulus neben PRP, sondern auch der Zelltyp die Zytokinantwort zu beeinflussen.

5.3.3. KLF4 ist ein potentieller Regulator in der Reduktion der IL-6-Sezernierung von DCs und Makrophagen

IL-6 war das einzige Zytokin, dass in dem Vergleich Makrophagen, stimuliert mit *A. fumigatus* und PRP, im Vergleich zu Makrophagen, die nur mit *A. fumigatus* behandelt waren, signifikant reduziert exprimiert war. Da diese Arbeit KLF4 bereits als wichtiger Faktor in der Regulation von IL-6 identifizierte, wurde die Expression von *KLF4* auch in den PRP-behandelten DCs und Makrophagen untersucht. Die Zugabe von PRP zu nichtstimulierten DCs führte zu einer leichten, nicht-signifikanten Reduktion, während *KLF4* in Makrophagen stark und signifikant reduziert war (Abbildung 67A). Durch die Stimulation mit *A. fumigatus* wurde *KLF4* nicht nur, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt, in DCs sondern auch in Makrophagen signifikant herabreguliert, während die Reduktion durch die Kombination beider Stimuli am deutlichsten war. Dies bestätigte sich auch in den Signalintensitäten des Microarrays.

Ob es durch eine direkte Interaktion oder einen sezernierten Faktor der Plättchen zur Reduktion von *KLF4* in Immunzellen kommt, muss weiter untersucht werden. Einzig für die isolierte Zugabe des Plättchen sezernierten *Platelet factor 4* (PF4) konnte gezeigt werden,

dass es die KLF4-Expression und damit auch die IL-6 Sekretion nach 48 h in murinen Monozyten und der THP-1-Zelllinie induziert (Srivastava *et al.* 2010). Somit zeigt sich, dass Plättchen und deren Zytokine je nach Bedingung und Zelltyp konträre Wirkung erzielen können.

5.3.4. PRP und Thrombozyten beeinflussen die Phagozytose und metabolische Aktivität von *A. fumigatus* zelltypabhängig

Eine wichtige Aufgabe von DCs und Makrophagen ist die Aufnahme von Pathogenen mit der anschließenden Präsentation auf der Zelloberfläche. Diese Aufnahme von Konidien wird durch Phagozytose ermöglicht (Brakhage *et al.* 2010). In dieser Arbeit wurden die Fähigkeit zur Aufnahme in die Zelle und der Einfluss von PRP und isolierten Thrombozyten untersucht. Dabei konnten Unterschiede in der Phagozytose der *A. fumigatus*-Konidien beobachtet werden, wenn Plättchen oder PRP ebenfalls in der Kultur vorhanden waren. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede zwischen PRP und isolierten Thrombozyten. Während Makrophagen durch die Zugabe von PRP stärker phagozytiert, war keine Induktion mit isolierten Plättchen zu beobachten. Auch PPP, also Plasma ohne Plättchen sorgte für eine, allerdings nicht-signifikante, Erhöhung. Im Gegensatz dazu wurde eine verstärkte Phagozytose von DCs mit isolierten Thrombozyten gezeigt, während PRP die Phagozytose nur leicht verstärkte. Hier wurden somit klare Unterschiede zwischen den verwendeten Zelltypen deutlich.

Ein Grund hierfür könnten Bestandteile im Plasma wie zum Beispiel Komplementfaktoren und die unterschiedliche Ausstattung von Rezeptoren auf den Zellen sein. Für Neutrophile wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Opsonisierung, Phagozytose und Abtöten von *A. fumigatus* bereits bestätigt (Braem *et al.* 2015). Sowohl Hyphen als auch Konidien können die Komplementkaskade aktivieren, was zu einer Bindung von Komplementfaktoren auf der Pilzoberfläche führt (Speth und Rambach 2012). DCs und Makrophagen besitzen beide den CR3-Rezeptor (ein Heterodimer aus CD11b und CD18) auf der Oberfläche, der mit Komplementfaktor iC3b auf dem Pathogen interagiert (Speth und Rambach 2012). Während in dieser Arbeit alle Komplementrezeptoren gleichermaßen in DCs und Makrophagen exprimiert waren, konnten Unterschiede bei *C5AR1* beobachtet werden. Dieses Gen wurde in unbehandelten DC nicht exprimiert. Die Ko-Kultur mit PRP, *A. fumigatus* und der Kombination aus *A. fumigatus* und PRP induzierte dieses Gen. Makrophagen exprimierten *C5AR1* bereits in den unbehandelten Zellen mit einer Signalintensität von 7,6. Diese wurde durch jeden der Stimuli erhöht. Bislang beschrieben waren vor allem C3b und iC3b als Faktoren für die Phagozytose. Möglicherweise spielt die Aktivierung der Makrophagen über *C5AR1* mit C5a ebenfalls eine Rolle.

Auch eine Bindung von Plättchen an Pathogene über Fibrinogen wurde bereits gezeigt. Fibrinogen bindet an die Pilzelloberfläche von *C. albicans*, wodurch Plättchen an dieses Pathogen binden (Perkhofer *et al.* 2008). Möglicherweise trifft dies auch auf *A. fumigatus* zu. Wird das Plasma entfernt und somit auch das Fibrinogen, kommt es möglicherweise zu einer geringeren Bindung der Plättchen. Allerdings war die Opsonisierung von *A. fumigatus* mit Fibrinogen alleine nicht ausreichend um die Plättchen vollständig zu aktivieren, während Plasma dazu in der Lage war (Christin *et al.* 1998). Dies zeigt, dass Plasma wichtige Faktoren für die Plättchen-Immunzell-Interaktion enthält.

In der Reduktion der metabolischen Aktivität von *A. fumigatus* Keimschläuchen konnten in dieser Arbeit ebenfalls Unterschiede zwischen DCs und Makrophagen beschrieben werden. DCs zeigten bereits ohne Plättchen oder Plasma eine hohe Fähigkeit den Pilzmetabolismus zu reduzieren. Wurden den DCs PRP oder isolierte Plättchen zugegeben, wurde diese Fähigkeit signifikant erhöht. Makrophagen alleine reduzierten die metabolische Aktivität von *A. fumigatus* in einem geringeren Ausmaß als DCs. Wurde ihnen PRP oder isolierte Thrombozyten zugegeben, wurde diese Fähigkeit signifikant erhöht. Interessanterweise war der Unterschied bei den DCs zwischen PRP und isolierten Thrombozyten gering. Bei Makrophagen jedoch hatte PRP einen stärkeren Einfluss. PPP konnte weder bei DCs noch bei Makrophagen die Reduktion der metabolischen Pilzaktivität erhöhen. Hierbei ist zu bemerken, dass, wie schon bei der Phagozytose, das Plasma für die Makrophagen ein wichtiger Faktor zu sein scheint, während es für DCs nicht relevant war. Dennoch war das Plasma ohne Plättchen nicht ausreichend, um einen Einfluss auf die metabolische Aktivität des Pilzes gegenüber *A. fumigatus* mit Immunzellen zu erzielen. Ergänzend sollte zudem erwähnt werden, dass PRP oder Plättchen keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität in der hier verwendeten Konzentration und Inkubationsdauer aufwiesen (Daten nicht gezeigt). In Experimenten, die einen Einfluss auf die metabolische von *A. fumigatus* ebenfalls mittels XTT-Analyse zeigten, wurden mehr Plättchen pro Hyphe verwendet (Christin *et al.* 1998).

Wie diese Arbeit zeigt, haben Plättchen einen Einfluss auf die Phagozytose und die Reduktion der metabolischen Aktivität und beeinflussen sowohl die Genexpression als auch die Zytokinantwort von Zellen des angeborenen Immunsystems. Gerade in den funktionalen Assays wurde gezeigt, dass Plättchen an der Bekämpfung von *A. fumigatus* Infektionen beteiligt sind und einen positiven Einfluss auf die Bekämpfung durch die Immunzellen haben könnten. Dies wurde auch bei Patienten bestätigt. Eine Thrombozytopenie ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko ein Pilzerkrankung nach Lebertransplantationen zu entwickeln (Perkhofer *et al.* 2008). Auch bei Patienten mit multiplen Myelom, die eine Neutropenie bedingte invasive Aspergillose entwickelt haben wurde der Einfluss vom Plättchenwert auf den Ausgang der Infektion beschrieben (Nouér *et al.* 2012). Diese Arbeit zeigt, dass die Plättchen, neben ihrer Funktion in der Hämostase, auch einen wichtigen Einfluss auf das

angeborene Immunsystem bewirken können. Daher sollten die genauen, zugrunde liegenden Mechanismen der Plättchen als Immunzellen weiter untersucht werden.

Auch das hier entwickelte Boolesche Modell soll um die Interaktion mit Plättchen erweitert werden. Mit der Entwicklung es DC-Modells ist hier bereits ein Schritt in die Richtung zur Entwicklung eines „virtuelles Infektionsmodells“ aus Immunzellen und *A. fumigatus* gelungen. In einem nächsten Schritt soll das Modell auch für prädiktive Vorhersagen genutzt und diese anschließend experimentell bestätigt werden. Somit wurde ein neues Instrument für die Interaktion von humanen DCs mit dem humanpathogenen Pilz *A. fumigatus* geschaffen.

Literaturverzeichnis

- Aimanianda, V., J. Bayry, S. Bozza, O. Knemeyer, K. Perruccio, S. R. Elluru, C. Clavaud, S. Paris, A. A. Brakhage, S. V. Kaveri, L. Romani und J.-P. Latge (2009). "Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores." Nature **460**(7259): 1117-1121.
- Al-Huseini, L. M., H. X. Aw Yeang, S. Sethu, N. Alhumeed, J. M. Hamdam, Y. Tingle, L. Djouhri, N. Kitteringham, B. K. Park, C. E. Goldring und J. G. Sathish (2013). "Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune function through regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factor 1 signaling." J Biol Chem **288**(31): 22281-22288.
- Alder, J. K., R. W. Georgantas, 3rd, R. L. Hildreth, I. M. Kaplan, S. Morisot, X. Yu, M. McDevitt und C. I. Civin (2008). "Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo." J Immunol **180**(8): 5645-5652.
- Badiee, P. und Z. Hashemizadeh (2014). "Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management." The Indian Journal of Medical Research **139**(2): 195-204.
- Bailey, C. C., G. Zhong, I. C. Huang und M. Farzan (2014). "IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense." Annual review of virology **1**: 261-283.
- Beekman, R. und I. P. Touw (2010). G-CSF and its receptor in myeloid malignancy.
- Ben-Ami, R., R. E. Lewis und D. P. Kontoyiannis (2010). "Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection." Br J Haematol **150**(4): 406-417.
- Benjamini, Y. und Y. Hochberg (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J Roy Stat Soc B Met **57**: 289-300.
- Berezikov, E. (2011). "Evolution of microRNA diversity and regulation in animals." Nat Rev Genet **12**(12): 846-860.
- Bhatia, S., M. Fei, M. Yarlagadda, Z. Qi, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, N. van Rooijen, G. A. Gibson, C. M. St. Croix, A. Ray und P. Ray (2011). "Rapid Host Defense against *Aspergillus fumigatus* Involves Alveolar Macrophages with a Predominance of Alternatively Activated Phenotype." PLoS ONE **6**(1): e15943.
- Blair, P. und R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." Blood Rev **23**(4): 177-189.
- Blanco, J. L. und M. E. Garcia (2008). "Immune response to fungal infections." Vet Immunol Immunopathol **125**(1-2): 47-70.
- Bourgeois, C. und K. Kuchler (2012). "Fungal pathogens—a sweet and sour treat for toll-like receptors." Frontiers in Cellular and Infection Microbiology **2**: 142.

Braedel, S., 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." British Journal of Haematology **125**(3): 392-399.

Braem, S. G., S. H. Rooijackers, K. P. van Kessel, H. de Cock, H. A. Wosten, J. A. van Strijp und P. J. Haas (2015). "Effective Neutrophil Phagocytosis of Aspergillus fumigatus Is Mediated by Classical Pathway Complement Activation." J Innate Immun.

Brakhage, A. A., S. Bruns, A. Thywissen, P. F. Zipfel und J. Behnsen (2010). "Interaction of phagocytes with filamentous fungi." Curr Opin Microbiol **13**(4): 409-415.

Ceppi, M., P. M. Pereira, I. Dunand-Sauthier, E. Barras, W. Reith, M. A. Santos und P. Pierre (2009). "MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2735-2740.

Chai, L. Y., B. J. Kullberg, A. G. Vonk, A. Warris, A. Cambi, J. P. Latge, L. A. Joosten, J. W. van der Meer und M. G. Netea (2009). "Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by Aspergillus fumigatus." Infect Immun **77**(5): 2184-2192.

Chai, L. Y., A. G. Vonk, B. J. Kullberg, P. E. Verweij, I. Verschueren, J. W. van der Meer, L. A. Joosten, J. P. Latge und M. G. Netea (2011). "Aspergillus fumigatus cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses." Microbes Infect **13**(2): 151-159.

Chang, L. und M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.

Chen, X., L. Zhang, T. Zhang, M. Hao, X. Zhang, J. Zhang, Q. Xie, Y. Wang, M. Guo, H. Zhuang und F. Lu (2013). "Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC." Liver Int **33**(3): 476-486.

Chen, Y., H. Tang, W. Seibel, R. Papoian, K. Oh, X. Li, J. Zhang, M. Golczak, K. Palczewski und P. D. Kiser (2014). "Identification and Characterization of Novel Inhibitors of Mammalian Aspartyl Aminopeptidase." Molecular Pharmacology **86**(2): 231-242.

Cheng, S. C., L. A. Joosten, B. J. Kullberg und M. G. Netea (2012). "Interplay between Candida albicans and the mammalian innate host defense." Infect Immun **80**(4): 1304-1313.

Christin, L., D. R. Wysong, T. Meshulam, R. Hastey, E. R. Simons und R. D. Diamond (1998). "Human Platelets Damage Aspergillus fumigatus Hyphae and May Supplement Killing by Neutrophils." Infection and Immunity **66**(3): 1181-1189.

Czapiga, M., A. D. Kirk und J. Lekstrom-Himes (2004). "Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: A potential bridge between injury and immune activation." Experimental Hematology **32**(2): 135-139.

Dagenais, T. R. und N. P. Keller (2009). "Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis." Clin Microbiol Rev **22**(3): 447-465.

Dai, M., P. Wang, A. D. Boyd, G. Kostov, B. Athey, E. G. Jones, W. E. Bunney, R. M. Myers, T. P. Speed, H. Akil, S. J. Watson und F. Meng (2005). "Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data." Nucleic Acids Res **33**(20): e175.

Das Gupta, M., M. Fliesser, J. Springer, T. Breitschopf, H. Schlossnagel, A.-L. Schmitt, O. Kurzai, K. Hünninger, H. Einsele und J. Löffler (2014). "Aspergillus fumigatus induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells." International Journal of Medical Microbiology **304**(5–6): 592-596.

De Filippo, K., A. Dudeck, M. Hasenberg, E. Nye, N. van Rooijen, K. Hartmann, M. Gunzer, A. Roers und N. Hogg (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation.

Dikalov, S., K. K. Griendling und D. G. Harrison (2007). "Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies." Hypertension **49**(4): 717-727.

Dunand-Sauthier, I., M.-L. Santiago-Raber, L. Capponi, C. E. Vejnar, O. Schaad, M. Irla, Q. Seguí-Estévez, P. Descombes, E. M. Zdobnov, H. Acha-Orbea und W. Reith (2011). Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function.

Eden, E., R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson und Z. Yakhini (2009). "GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists." BMC Bioinformatics **10**: 48-48.

Essandoh, K. und G.-C. Fan (2014). "Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1842**(11): 2155-2162.

Fanales-Belasio, E., G. Zambruno, A. Cavani und G. Girolomoni (1997). "Antibodies against sialophorin (CD43) enhance the capacity of dendritic cells to cluster and activate T lymphocytes." The Journal of Immunology **159**(5): 2203-2211.

Fang, F., Y. Wang, R. Li, Y. Zhao, Y. Guo, M. Jiang, J. Sun, Y. Ma, Z. Ren, Z. Tian, F. Wei, D. Yang und W. Xiao (2010). "Transcription factor E2F1 suppresses dendritic cell maturation." J Immunol **184**(11): 6084-6091.

Feinberg, M. W., Z. Cao, A. K. Wara, M. A. Lebedeva, S. Senbanerjee und M. K. Jain (2005). "Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages." J Biol Chem **280**(46): 38247-38258.

Ferdous, F. und T. R. Scott (2015). "A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity." Immunology Letters **163**(1): 32-39.

Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea und G. J. Adema (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-2066.

Folmer, D. E., R. P. J. O. Elferink und C. C. Paulusma (2009). "P4 ATPases - Lipid flippases and their role in disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1791**(7): 628-635.

Forman, H. J. und M. Torres (2002). "Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling." Am J Respir Crit Care Med **166**(12 Pt 2): S4-8.

Gant, J. C., E. M. Blalock, K. C. Chen, I. Kadish, N. M. Porter, C. M. Norris, O. Thibault und P. W. Landfield (2014). "FK506-binding protein 1b/12.6: a key to aging-related hippocampal Ca²⁺ dysregulation?" Eur J Pharmacol **739**: 74-82.

Gantner, B. N., 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.

Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang und J. Zhang (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.

Gersuk, G. M., D. M. Underhill, L. Zhu und K. A. Marr (2006). "Dectin-1 and TLRs Permit Macrophages to Distinguish between Different *Aspergillus fumigatus* Cellular States." The Journal of Immunology **176**(6): 3717-3724.

Guan, H., L. Xie, F. Leithäuser, L. Flossbach, P. Möller, T. Wirth und A. Ushmorov (2010). KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma.

Hackstein, H. und A. W. Thomson (2004). "Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs." Nat Rev Immunol **4**(1): 24-34.

Hagihara, M., A. Higuchi, N. Tamura, Y. Ueda, K. Hirabayashi, Y. Ikeda, S. Kato, S. Sakamoto, T. Hotta, S. Handa und S. Goto (2004). "Platelets, after Exposure to a High Shear Stress, Induce IL-10-Producing, Mature Dendritic Cells In Vitro." The Journal of Immunology **172**(9): 5297-5303.

Hamik, A., Z. Lin, A. Kumar, M. Balcells, S. Sinha, J. Katz, M. W. Feinberg, R. E. Gerzsten, E. R. Edelman und M. K. Jain (2007). "Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation." J Biol Chem **282**(18): 13769-13779.

Hamzeh-Cognasse, H., F. Cognasse, S. Palle, P. Chavarin, T. Olivier, O. Delézay, B. Pozzetto und O. Garraud (2008). "Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation." BMC Immunology **9**: 54-54.

Hohl, T. M., H. L. Van Epps, A. Rivera, L. A. Morgan, P. L. Chen, M. Feldmesser und E. G. Pamer (2005). "Aspergillus fumigatus Triggers Inflammatory Responses by Stage-Specific β -Glucan Display." PLoS Pathog **1**(3): e30.

Hulsen, T., J. de Vlieg und W. Alkema (2008). "BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams." BMC Genomics **9**(1): 488.

Imhof, B. A. und M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." Nat Rev Immunol **4**(6): 432-444.

Irminger-Finger, I. und C. E. Jefford (2006). "Is there more to BARD1 than BRCA1?" Nat Rev Cancer **6**(5): 382-391.

Janeway, C. A., Jr. und R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Kálmán, S., K. Garbett, A. Vereczkei, R. C. Shelton, Z. Korade und K. Mirnics (2014). "Metabolic stress-induced microRNA and mRNA expression profiles of human fibroblasts." Experimental cell research **320**(2): 343-353.

Karl, S. und T. Dandekar (2013). "Jimena: efficient computing and system state identification for genetic regulatory networks." BMC Bioinformatics **14**: 306-306.

Kaushik, D. K., M. Gupta, S. Das und A. Basu (2010). "Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation." J Neuroinflammation **7**: 68.

Kawasaki, T. und T. Kawai (2014). "Toll-Like Receptor Signaling Pathways." Frontiers in Immunology **5**: 461.

Kelly, J. N. und S. D. Barr (2014). "In Silico Analysis of Functional Single Nucleotide Polymorphisms in the Human TRIM22 Gene." PLoS ONE **9**(7): e101436.

Kissel, K., S. Berber, A. Nockher, S. Santoso, G. Bein und H. Hackstein (2006). "Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines." Transfusion **46**(5): 818-827.

Kozomara, A. und S. Griffiths-Jones (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D68-73.

Langer, H. F., K. Daub, G. Braun, T. Schönberger, A. E. May, M. Schaller, G. M. Stein, K. Stellos, A. Bueltmann, D. Siegel-Axel, H. P. Wendel, H. Aebert, M. Roecken, P. Seizer, S. Santoso, S. Wesselborg, P. Brossart und M. Gawaz (2007). "Platelets Recruit Human Dendritic Cells Via Mac-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function In Vitro." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **27**(6): 1463-1470.

Lapp, K., M. Vödisch, K. Kroll, M. Strassburger, O. Kniemeyer, T. Heinekamp und A. A. Brakhage (2014). "Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence." Frontiers in Microbiology **5**: 469.

Lass-Flörl, C., E. Roilides, J. Löffler, D. Wilflingseder und L. Romani (2013). "Minireview: host defence in invasive aspergillosis." Mycoses **56**(4): 403-413.

Lee, K. und D. F. Tough (2013). Method of treatment, Google Patents.

Levy, J. A. (2009). "The Unexpected Pleiotropic Activities of RANTES." The Journal of Immunology **182**(7): 3945-3946.

Li, X.-Y., K. Zhang, Z.-Y. Jiang und L.-H. Cai (2014). "miR-204/miR-211 downregulation contributes to Candidemia-induced kidney injuries via derepression of Hmx1 expression." Life Sciences **102**(2): 139-144.

Liao, X., N. Sharma, F. Kapadia, G. Zhou, Y. Lu, H. Hong, K. Paruchuri, G. H. Mahabeleshwar, E. Dalmas, N. Venteclef, C. A. Flask, J. Kim, B. W. Doreian, K. Q. Lu, K. H. Kaestner, A. Hamik, K. Clement und M. K. Jain (2011). "Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization." J Clin Invest **121**(7): 2736-2749.

Liu, J., T. Yang, Y. Liu, H. Zhang, K. Wang, M. Liu, G. Chen und X. Xiao (2012). "Krüppel-like factor 4 inhibits the expression of interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages." FEBS Letters **586**(6): 834-840.

Liu, J., H. Zhang, Y. Liu, K. Wang, Y. Feng, M. Liu und X. Xiao (2007). "KLF4 regulates the expression of interleukin-10 in RAW264.7 macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **362**(3): 575-581.

Liu, L. und C. A. Parent (2011). "Review series: TOR kinase complexes and cell migration." J Cell Biol **194**(6): 815-824.

Lothar, J., T. Breitschopf, S. Krappmann, C. O. Morton, M. Bouzani, O. Kurzai, M. Gunzer, M. Hasenberg, H. Einsele und J. Loeffler (2014). "Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*." International Journal of Medical Microbiology **304**(8): 1160-1168.

Lu, Q. und R. A. Malinauskas (2011). "Comparison of Two Platelet Activation Markers Using Flow Cytometry After In Vitro Shear Stress Exposure of Whole Human Blood." Artificial Organs **35**(2): 137-144.

Ma, D. Y. und E. A. Clark (2009). "The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells." Semin Immunol **21**(5): 265-272.

Maitra, U. und L. Li (2013). "Molecular Mechanisms Responsible for the Reduced Expression of Cholesterol Transporters From Macrophages by Low-Dose Endotoxin." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **33**(1): 24-33.

Martinez-Nunez, R. T., F. Louafi, P. S. Friedmann und T. Sanchez-Elsner (2009). "MicroRNA-155 Modulates the Pathogen Binding Ability of Dendritic Cells (DCs) by Down-regulation of DC-specific Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing Non-integrin (DC-SIGN)." The Journal of Biological Chemistry **284**(24): 16334-16342.

Menzies-Gow, A., S. Ying, I. Sabroe, V. L. Stubbs, D. Soler, T. J. Williams und A. B. Kay (2002). "Eotaxin (CCL11) and Eotaxin-2 (CCL24) Induce Recruitment of Eosinophils, Basophils, Neutrophils, and Macrophages As Well As Features of Early- and Late-Phase Allergic Reactions Following Cutaneous Injection in Human Atopic and Nonatopic Volunteers." The Journal of Immunology **169**(5): 2712-2718.

Meyer-Wentrup, F., C. G. Figdor, M. Ansems, P. Brossart, M. D. Wright, G. J. Adema und A. B. van Spruiel (2007). "Dectin-1 Interaction with Tetraspanin CD37 Inhibits IL-6 Production." The Journal of Immunology **178**(1): 154-162.

Mezger, M., S. Kneitz, I. Wozniok, O. Kurzai, H. Einsele und J. Loeffler (2008a). "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.

Mezger, M., I. Wozniok, C. Blockhaus, O. Kurzai, H. Hebart, H. Einsele und J. Loeffler (2008c). "Impact of Mycophenolic Acid on the Functionality of Human Polymorphonuclear Neutrophils and Dendritic Cells during Interaction with *Aspergillus fumigatus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(7): 2644-2646.

Mischnik, M., D. Boyanova, K. Hubertus, J. Geiger, N. Philippi, M. Dittrich, G. Wangorsch, J. Timmer und T. Dandekar (2013). "A Boolean view separates platelet activatory and inhibitory signalling as verified by phosphorylation monitoring including threshold behaviour and integrin modulation." *Mol Biosyst* **9**(6): 1326-1339.

Mócsai, A., J. Ruland und V. L. J. Tybulewicz (2010). "The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions." *Nat Rev Immunol* **10**(6): 387-402.

Monk, C. E., G. Hutvagner und J. S. C. Arthur (2010). "Regulation of miRNA Transcription in Macrophages in Response to *Candida albicans*." *PLoS ONE* **5**(10): e13669.

Moreno-Moya, J. M., F. Vilella und C. Simón (2014). "MicroRNA: key gene expression regulators." *Fertility and Sterility* **101**(6): 1516-1523.

Morton, C. O., J. J. Varga, A. Hornbach, M. Mezger, H. Sennefelder, S. Kneitz, O. Kurzai, S. Krappmann, H. Einsele, W. C. Nierman, T. R. Rogers und J. Loeffler (2011). "The temporal dynamics of differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* interacting with human immature dendritic cells in vitro." *PLoS One* **6**(1): e16016.

Murphy, K., P. Travers, M. Walport und C. Janeway (2012). *Janeway's immunobiology*. New York, Garland Science.

Nahid, M. A., B. Yao, P. R. Dominguez-Gutierrez, L. Kesavalu, M. Satoh und E. K. L. Chan (2013). "Regulation of TLR2-Mediated Tolerance and Cross-Tolerance through IRAK4 Modulation by miR-132 and miR-212." *The Journal of Immunology* **190**(3): 1250-1263.

Nakamura, Y., J. B. Inloes, T. Katagiri und T. Kobayashi (2011). "Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling." *Molecular and Cellular Biology* **31**(14): 3019-3028.

Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg und N. A. Gow (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." *Nat Rev Microbiol* **6**(1): 67-78.

Netea, M. G. und L. Marodi (2010). "Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species." *Trends Immunol* **31**(9): 346-353.

Netea, M. G., A. Warris, J. W. M. Van 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." *Journal of Infectious Diseases* **188**(2): 320-326.

Neveu, W. A., E. Bernardo, J. L. Allard, V. Nagaleekar, M. J. Wargo, R. J. Davis, Y. Iwakura, L. A. Whittaker und M. Rincon (2011). "Fungal allergen beta-glucans trigger p38 mitogen-activated protein kinase-mediated IL-6 translation in lung epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**(6): 1133-1141.

Ni, K. und H. C. O'Neill (1997). "The role of dendritic cells in T cell activation." Immunol Cell Biol **75**(3): 223-230.

Noorbakhsh, F., R. Ramachandran, N. Barsby, K. K. Ellestad, A. LeBlanc, P. Dickie, G. Baker, M. D. Hollenberg, É. A. Cohen und C. Power (2010). "MicroRNA profiling reveals new aspects of HIV neurodegeneration: caspase-6 regulates astrocyte survival." The FASEB Journal **24**(6): 1799-1812.

Nouér, S. A., M. Nucci, N. S. Kumar, M. Graziutti, A. Restrepo und E. Anaissie (2012). "Baseline Platelet Count and Creatinine Clearance Rate Predict the Outcome of Neutropenia-Related Invasive Aspergillosis." Clinical Infectious Diseases **54**(12): e173-e183.

Nurden, A. T. (2011). "Platelets, inflammation and tissue regeneration." Thromb Haemost **105 Suppl 1**: S13-33.

O'Gorman, C. M., H. Fuller und P. S. Dyer (2009). "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*." Nature **457**(7228): 471-474.

Ok, M., J. P. Latge, C. Baeuerlein, F. Ebel, M. Mezger, M. Topp, O. Kurzai, D. Killian, M. Kapp, G. U. Grigoleit, H. Sennefelder, J. Arroyo, H. Einsele und J. Loeffler (2009). "Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant *Aspergillus fumigatus* antigen Asp1." Clin Vaccine Immunol **16**(10): 1485-1492.

Oksanen, J., F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. Stevens und H. Wagner (2011). "vegan: Community Ecology Package. ."

Oliveros, J. C. (2007-2015). "Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>."

Park, S. J. und B. Mehrad (2009). "Innate immunity to *Aspergillus* species." Clin Microbiol Rev **22**(4): 535-551.

Perkhofer, S., B. E. Kehrel, M. P. Dierich, J. P. Donnelly, W. Nussbaumer, J. Hofmann, C. von Eiff und C. Lass-Flörl (2008). "Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms." J Infect Dis **198**(8): 1243-1246.

Perkhofer, S., B. Striessnig, B. Sartori, B. Hausott, H. W. Ott und C. Lass-Flörl (2013). "Interaction of platelets and anidulafungin against *Aspergillus fumigatus*." Antimicrob Agents Chemother **57**(1): 626-628.

Perkhofer, S., K. Trappl, B. Striessnig, W. Nussbaumer und C. Lass-Flörl (2011). "Platelets enhance activity of antimycotic substances against non-*Aspergillus fumigatus* *Aspergillus* species in vitro." Med Mycol **49**(2): 157-166.

Perkhofer, S., C. Zenzmaier, E. Frealle, M. Blatzer, H. Hackl, B. Sartori und C. Lass-Flörl (2015). "Differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* induced by human platelets in vitro." International Journal of Medical Microbiology **305**(3): 327-338.

Platt, C. D., J. K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R. A. D. Carano, I. Mellman und L. Delamarre (2010). "Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(9): 4287-4292.

Pritchard, C. C., H. H. Cheng und M. Tewari (2012). "MicroRNA profiling: approaches and considerations." Nat Rev Genet **13**(5): 358-369.

Qiu, H., F. Huang, J. Gong, H. Xiao, B. L. Sun und R. G. Yang (2014). "TRIM22 can activate the noncanonical NF-kappaB pathway by affecting IKKalpha." J Recept Signal Transduct Res: 1-6.

Quinn, S. R. und L. A. O'Neill (2011). "A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling." International Immunology **23**(7): 421-425.

Raisch, J., A. Darfeuille-Michaud und H. T. T. Nguyen (2013). "Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer." World Journal of Gastroenterology : WJG **19**(20): 2985-2996.

Rambach, G., G. Blum, J.-P. Latgé, T. Fontaine, T. Heinekamp, M. Hagleitner, H. Jeckström, G. Weigel, P. Würtinger, K. Pfaller, S. Krappmann, J. Löffler, C. Lass-Flörl und C. Speth (2015). "Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets." Journal of Infectious Diseases.

Ramirez-Ortiz, Z. G. und T. K. Means (2012). "The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*)." Virulence **3**(7): 635-646.

Rødland, E. K., M. Mattingsdal, O. K. Olstad, R. Øvstebø, P. Kierulf, F. Müller und S. S. Frøland (2008). "Expression of genes in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*." Medical Mycology **46**(4): 327-336.

Rodland, E. K., T. Ueland, T. M. Pedersen, B. Halvorsen, F. Muller, P. Aukrust und S. S. Frøland (2010). "Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis." Infect Immun **78**(3): 1269-1275.

Rogers, N. C., 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. Reis 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.

Romani, L. (2011). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **11**(4): 275-288.

Roscioli, T., S. T. Cliffe, D. B. Bloch, C. G. Bell, G. Mullan, P. J. Taylor, M. Sarris, J. Wang, J. A. Donald, E. P. Kirk, J. B. Ziegler, U. Salzer, G. B. McDonald, M. Wong, R. Lindeman und M. F. Buckley (2006). "Mutations in the gene encoding the PML nuclear body protein Sp110 are associated with immunodeficiency and hepatic veno-occlusive disease." Nat Genet **38**(6): 620-622.

Rosenzweig, J. M., J. D. Glenn, P. A. Calabresi und K. A. Whartenby (2013). "KLF4 modulates expression of IL-6 in dendritic cells via both promoter activation and epigenetic modification." J Biol Chem **288**(33): 23868-23874.

Said-Sadier, N., E. Padilla, G. Langsley und D. M. Ojcius (2010). "Aspergillus fumigatus Stimulates the NLRP3 Inflammasome through a Pathway Requiring ROS Production and the Syk Tyrosine Kinase." PLoS ONE **5**(4): e10008.

Sainz, J., C. B. Lupiáñez, J. Segura-Catena, L. Vazquez, R. Ríos, S. Oyonarte, K. Hemminki, A. Försti und M. Jurado (2012). "Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection." PLoS ONE **7**(2): e32273.

Sales-Campos, H., L. Tonani, C. R. B. Cardoso und M. R. V. Z. Kress (2013). "The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in Aspergillus fumigatus Lung Infection." BioMed Research International **2013**: 693023.

Santoro, M., A. Modoni, M. Masciullo, T. Gidaro, A. Broccolini, E. Ricci, P. A. Tonali und G. Silvestri (2010). "Analysis of MTMR1 expression and correlation with muscle pathological features in juvenile/adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and in myotonic dystrophy type 2 (DM2)." Exp Mol Pathol **89**(2): 158-168.

Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras und S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.

Schlatter, R., N. Philippi, G. Wangorsch, R. Pick, O. Sawodny, C. Borner, J. Timmer, M. Ederer und T. Dandekar (2012). "Integration of Boolean models exemplified on hepatocyte signal transduction." Brief Bioinform **13**(3): 365-376.

Scull, C., W. Hays und T. Fischer (2010). "Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets." Journal of Inflammation **7**(1): 53.

Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. und J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." Nat Rev Immunol **11**(4): 264-274.

Shivdasani, R. A. (1996). "The role of transcription factor NF-E2 in megakaryocyte maturation and platelet production." Stem Cells **14 Suppl 1**: 112-115.

Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Statistical applications in genetics and molecular biology **3**: Article3.

Spampinato, C. und D. Leonardi (2013). "Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents." BioMed Research International **2013**: 204237.

Speth, C., M. Hagleitner, H. W. Ott, R. Wurzner, C. Lass-Flörl und G. Rambach (2013a). "Aspergillus fumigatus activates thrombocytes by secretion of soluble compounds." J Infect Dis **207**(5): 823-833.

Speth, C., J. Löffler, S. Krappmann, C. Lass-Flörl und G. Rambach (2013d). "Platelets as immune cells in infectious diseases." Future Microbiology **8**(11): 1431-1451.

Speth, C. und G. Rambach (2012). "Complement Attack against *Aspergillus* and Corresponding Evasion Mechanisms." Interdiscip Perspect Infect Dis **2012**: 463794.

Srivastava, K., D. J. Field, A. Aggrey, M. Yamakuchi und C. N. Morrell (2010). "Platelet Factor 4 Regulation of Monocyte KLF4 in Experimental Cerebral Malaria." PLoS ONE **5**(5): e10413.

Stevens, D. A. (2006). "Th1/Th2 in aspergillosis." Medical Mycology **44**(Supplement 1): S229-S235.

Takatsu, H., K. Baba, T. Shima, H. Umino, U. Kato, M. Umeda, K. Nakayama und H.-W. Shin (2011). "ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), Localizes to the trans-Golgi Network in a CDC50 Protein-independent Manner." The Journal of Biological Chemistry **286**(44): 38159-38167.

Théry, C. und S. Amigorena (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." Current Opinion in Immunology **13**(1): 45-51.

Turner, M. L., F. M. Schnorfeil und T. Brocker (2011). "MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function." J Immunol **187**(8): 3911-3917.

Vigorito, E., S. Kohlhaas, D. Lu und R. Leyland (2013). "miR-155: an ancient regulator of the immune system." Immunological Reviews **253**(1): 146-157.

Viiri, K. M., J. Jänis, T. Siggers, T. Y. K. Heinonen, J. Valjakka, M. L. Bulyk, M. Mäki und O. Lohi (2009). "DNA-Binding and -Bending Activities of SAP30L and SAP30 Are Mediated by a Zinc-Dependent Module and Monophosphoinositides." Molecular and Cellular Biology **29**(2): 342-356.

Villard, J. (2004). "Transcription regulation and human diseases." Swiss Med Wkly **134**(39-40): 571-579.

von Hundelshausen, P. und C. Weber (2007). "Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease." Circulation Research **100**(1): 27-40.

Wachowicz, B., B. Olas, H. M. Zbikowska und A. Buczyński (2002). "Generation of reactive oxygen species in blood platelets." Platelets **13**(3): 175-182.

Whitney, P. G., E. Bär, F. Osorio, N. C. Rogers, B. U. Schraml, S. Deddouche, S. LeibundGut-Landmann und C. Reis e Sousa (2014). "Syk Signaling in Dendritic Cells Orchestrates Innate Resistance to Systemic Fungal Infection." PLoS Pathogens **10**(7): e1004276.

Wienholds, E. und R. H. Plasterk (2005). "MicroRNA function in animal development." FEBS Lett **579**(26): 5911-5922.

Wilson, R. C. und J. A. Doudna (2013). "Molecular Mechanisms of RNA Interference." Annual Review of Biophysics **42**(1): 217-239.

Wingender, E., P. Dietze, H. Karas und R. Knuppel (1996). "TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites." Nucleic Acids Res **24**(1): 238-241.

Wu, R., F. Li, J. Zhu, R. Tang, Q. Qi, X. Zhou, R. Li, W. Wang, D. Hua und W. Chen (2014). "A functional variant at miR-132-3p, miR-212-3p, and miR-361-5p binding site in CD80 gene alters susceptibility to gastric cancer in a Chinese Han population." Medical Oncology **31**(8): 1-8.

Wuthrich, M., G. S. Deepe, Jr. und B. Klein (2012). "Adaptive immunity to fungi." Annu Rev Immunol **30**: 115-148.

Xu, W., H. Zhu, M. Gu, Q. Luo, J. Ding, Y. Yao, F. Chen und Z. Wang (2013). "DHTKD1 is essential for mitochondrial biogenesis and function maintenance." FEBS Letters **587**(21): 3587-3592.

Yeaman, M. R. (2010). "Platelets in defense against bacterial pathogens." Cellular and Molecular Life Sciences **67**(4): 525-544.

Zhi, F., X. Cao, X. Xie, B. Wang, W. Dong, W. Gu, Y. Ling, R. Wang, Y. Yang und Y. Liu (2013). "Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Myeloid Leukemia." PLoS ONE **8**(2): e56718.

6. Anhang

6.1. Chemikalien

Tabelle 26: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

2	2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
	2',7'-DCFA-DA	Sigma Aldrich
B	BSA	Carl Roth
C	Coenzym XTT	Sigma Aldrich
D	D-Glucose	Sigma Aldrich
E	ECL	BioRad/Thermo Scientific
	EDTA	Sigma Aldrich
	EL-Buffer	Qiagen
	EtOH	Sigma Aldrich
F	FACS Flow/Clean/Rinse	BD Pharmingen
	Fötales Kälberserum FCS	Sigma Aldrich
	Ficoll	Merck Millipore
G	Glycerin	Carl Roth
	Glyzin	Merck Millipore
	GM-CSF	Bayer
H	Harnstoff	Sigma Aldrich
	HBSS	Sigma Aldrich
	HEPES	Sigma Aldrich
I	IL-4	Miltenyi Biotec
K	KCl	Merck Millipore
	KH ₂ PO ₄	Carl Roth
L	Lipopolysaccharid LPS	Sigma Aldrich
	LPS ultra-rein	Invivogen
M	M-CSF	AL-Immunotools
	Magermilchpulver	Carl Roth
N	Natrium-Citrat	Sigma Aldrich
	Natriumazid	Merck Millipore
	NaH ₂ PO ₄	Applichem
	NaHCO ₃	Carl Roth
P	Pam3CSK4	Invivogen
	PMA	Sigma Aldrich
	Ponceau S	Sigma Aldrich
R	Refobacin	Bayer
	RNA Protect	Qiagen

	RNase-freies Wasser	Qiagen
	RPMI 1640 GlutaMAX mit Phenolrot	Life Technologies
S	Schwefelsäure	Carl Roth
	SDS	Carl Roth
	Succrose	Calbiochem
T	TAE	Invitrogen
	Tris	Carl Roth
	Trizma Base	Sigma Aldrich
	Trypan Blau	Fluka
	Trypsin	PAA
	Tween-20	Sigma Aldrich
X	XTT	Sigma Aldrich
Z	Zitronensäure-Monohydrat	Sigma Aldrich
	Zymosan	Invivogen

6.2. Geräte

Tabelle 27: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Thermo
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD
Elektrophoresekammer	MiniProtean	Biorad
	Elektrophorese-System	
Elektroporationsgerät	EPI 2500	Fischer Heidelberg
ELISA	GENios FL	Tecan
ELISA Washer	hydroFlex	Tecan
Entwickler Western Blot		
Feinwaage	AEJ	Kern
Gefrierschränke -20°C/-80°C		Liebherr/Heraus
Gel-Dokumentationssystem	Multiimage Light Cabinet	Biozym
Gel-Kamera	Alpha Innotech	Biozym
Inkubator	Hera Cell 240	Thermo Scientific
MACS Magent	Seperation Columns LS	Miltenyi Biotec
Magentrührer	Monotherm	Variomag
Microarray Gene Chips	HG-U219	Affymetrix
Mikroskope	Eclipse 50i	Nikon
	Eclipse TS100	
Nanodrop	ND-1000	Peqlab
PCR-Gerät		Eppendorf
ph-Meter	ph211 Microprocessor pH	Hanna Instruments

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
	Meter	
Pipetten		Eppendorf
Präzisionswaage	GF-200	A & D Instruments
Röntgenfilmentwickler	CP1000	Agfa
RT-PCR	StepOne Plus	Applied Biosystems
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph
Schüttler	TH30	Edmund Bühler
	Mitron	Infors HT
Semi-Dry Blotter	Blue Flash M	Serva
Spannungsgeräte	PowerPac Basic	Bio Rad
	Standard Power Pack P25	Biometra
Sterilbank	Herasafe KS18	Thermo
	Herasafe K9	
Sysmex		Sysmex
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA-Works Inc.
Wasserbad	Memmert WB7	Memmert
Zentrifugen	Centrifuge 5451R	Eppendorf
	Multifuge 3S	Thermo
	Multifuge 3S-R	
	Galaxy Mini	VWR

6.3. Abkürzungen

6.3.1. Verwendete Abkürzungen

	µl	Mikroliter
	µm	Mikrometer
A	Abb.	Abbildung
B	bp	Basenpaare
	BSA	bovine serum albumin
C	cDNA	copy DNA
	CD	cluster of differentiation
D	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DCs	dendritische Zellen
	dest.	destillata (destilliert)
E	EtOH	Ethanol
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	FBS	Fötales Kälberserum

	fw	forward
G	g	Erdbeschleunigung
	GFP	green fluorescent protein
H	h	Stunde(n)
	H ₂ O	Wasser
	HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	IFN	Interferon
	IL	Interleukin
K	kb	Kilobasenpaare
	KCL	Kaliumchlorid
	kDa	Kilo-Dalton
L	LPS	Lipopolysaccharid
M	min	Minuten(n)
	miRNA	microRNA
	ml	Milliliter
	mRNA	messenger RNA
	MOI	multiplicity of infection
N	NaCl	Natriumchlorid
	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
	nm	Nanometer
P	PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
	PBS	phosphate-buffered saline
	PCR	Polymerasekettenreaktion
	PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
	PMNs	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
	PPP	Plättchenarmes Plasma
	PRR	pattern recognition receptor
	PRP	Plättchenreiches Plasma
Q	qRT-PCR	quantitative real-time PCR
R	RIN	RNA integrity number
	RISC	RNA induced silencing complex
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNAi	RNA-Interferenz
	RNase	Ribonuklease
	rpm	rounds per minute
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	RT	Raumtemperatur
	rv	reverse
S	s	Sekunden(n)

T	SDS	Natriumdodecylsulfat
	siRNA	small interfering RNA
	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
	TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
	TBS	tris-buffered saline
	TEMED	Tetramethylethylendiamin
	TLR	Toll-like Rezeptor

6.3.2. Verwendete Gen- und Proteinbezeichnungen

Tabelle 28 Verwendete Gen- und Proteinbezeichnungen. In der linken Spalte sind die verwendeten Proteine nicht-kursiv, die verwendeten mRNA-Bezeichnungen kursiv geschrieben.

Abkürzung	Name/Bezeichnung
ABCD3	ATP-binding cassette sub-family D member 3
ABCG1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
ATP10D	ATPase, class V, type 10D
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
CCL1	Chemokine ligand 1
CCL11/ <i>CCL11</i>	Chemokine ligand 11
CCL15	Chemokine ligand 15
CCL18	Chemokine ligand 18
CCL19	Chemokine ligand 19
CCL2/ <i>CCL2</i>	Chemokine ligand 2 (MCP-1)
CCL20/ <i>CCL20</i>	Chemokine ligand 20
CCL21	Chemokine ligand 21
CCL24	Chemokine ligand 24
CCL3/ <i>CCL3</i>	Chemokine ligand 3 (MIP-1a)
CCL4/ <i>CCL4</i>	Chemokine ligand 4 (MIP-1b)
CCL5/ <i>CCL5</i>	Chemokine ligand 5 (RANTES)
CCL7/ <i>CCL7</i>	Chemokine ligand 7
CCL8/ <i>CCL8</i>	Chemokine ligand 8
CCL17	Chemokine ligand 17
CD14/ <i>CD14</i>	Cluster of differentiation 14
CD163	Cluster of differentiation 163 (M130)
CD1a/ <i>CD1A</i>	Cluster of differentiation 1a
CD40	Cluster of differentiation 40

Abkürzung	Name/Bezeichnung
CD41	Cluster of differentiation 41(GPIIb)
CD62P	Cluster of differentiation 62P (P-selectin)
CD69	Cluster of differentiation 69 (AIM)
CD80	Cluster of differentiation 80 (B7.1, BB1),
CD83/CD83	Cluster of differentiation 83 (HB15)
CD86/CD86	Cluster of differentiation 86 (B7.2)
CXCL1/CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL10/CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
CXCL2/CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4
DHTKD1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1
DNPEP	aspartyl aminopeptidase
FKBP1B	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa
G-CSF	granulocyte-colony stimulating facto
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GNG11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
GPRIN3	GPRIN family member 3
HLA-DR	major histocompatibility complex, class II
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL12B	Interleukin 12B
IL-12p40	Interleukin 12p40
IL15	Interleukin 15
IL17RB	Interleukin 17 Rezeptor B
IL18	Interleukin 18
IL-1B/IL1B	Interleukin 1b
IL1R2	Interleukin 1 Rezeptor 2
IL-1RA	Interleukin 1 Rezeptor-Antagonist
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6/IL6	Interleukin 6
IL7R	Interleukin 7 Rezeptor
IL-8/IL8	Interleukin 8
KLF4/KLF4	Krüppel-like factof
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor (CSF-1)

Abkürzung	Name/Bezeichnung
MTMR1	myotubularin related protein 1
NFE2	nuclear factor, erythroid 2
PAI-1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1
SAP30L	SAP30-like
SP110	SP110 nuclear body protein
SPN	sialophorin
SYK/SYK	spleen tyrosine kinase
THBS1	Thrombospondin 1
TLR1	Toll-like Rezeptor 1
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TNF α /TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIM22	tripartite motif containing 22
TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A

I

6.4. Kongressbeiträge

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2012

„Gene expression profiling reveals a potential role of thrombocytes on human dendritic cells confronted with *Aspergillus fumigatus*“

Czakai K., Schedler A., Krappmann S., Bonin M., Einsele H., Löffler J.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2013

„Platelet-rich plasma modulates the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with *Aspergillus fumigatus*“

Czakai K., Schedler A., Krappmann S., Bonin M., Einsele H., Löffler J.

International Congress of Immunology 2013

„High-throughput miRNA sequencing of human monocyte-derived dendritic cells confronted with *Aspergillus fumigatus*“

Czakai K., Leonhardt I., Walter M., Bonin M., Kurzai O., Einsele H., Loeffler J.

Advanced Against Aspergillosis 2014

“Platelet-rich plasma modulates the immune response of dendritic cells and macrophages in *Aspergillus fumigatus* infections”

Czakai K., Schedler A., Krappmann S., Bonin M., Einsele H., Löffler J.

6.5. Veröffentlichungen

„Perturbation of Mitosis through Inhibition of Histone Acetyltransferases: The Key to Ochratoxin A Toxicity and Carcinogenicity?“

Czakai K., Müller K, Mosesso P, Pepe G, Schulze M, Gohla A, Patnaik D, Dekant W, Higgins JM, Mally A.

Toxicol Sci. 2011 Aug; 122(2):317-329.

6.6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank geht an....

... Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik eine wissenschaftliche Doktorarbeit anzufertigen.

... Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Vergabe des interessanten Themas und die Unterstützung und Betreuung in der Umsetzung. Auch möchte ich mich bedanken, für die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen.

... Prof. Dr. med. Thomas Dandekar, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Bioinformatik, für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit, sowie der Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen. Besonderer Dank geht hierbei an Martin Kaldorf, mit dessen Hilfe das Boolesche Modell erstellt wurde.

... Prof. Dr. med. Oliver Kurzai, vom Septomics Research Center, Friedrich Schiller Universität-Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, für die enge Kooperation, die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und die konstruktive Kritik am gemeinsamen Manuskript. Besonderer Dank geht auch an die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe, ins besondere Ines Leonhardt und Dr. Kerstin Hünninger. Ines danke ich für die nette Zusammenarbeit, die auch lange Tage im Labor angenehm gemacht haben und Kerstin für die Durchführung der Multiplex-ELISAs.

... Prof. Dr. rer. nat. Sven Krappmann, Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg und Uniklinikum Erlangen, Mikrobiologisches Institut, für die vielen, angenehmen und konstruktiven Besprechungen. Besonders danken möchte ich hiermit auch Anette Schedler für die Einarbeitung in den Umgang mit Plättchen.

... Dr. rer. nat. Michael Bonin, Universitätsklinikum Tübingen, Microarray Genechip Facility, für die Durchführung der Microarray Analysen in seinem Institut, sowie Dr. Michael Walter, für die erste miRNA-Auswertung und Dr. Karin Schäfferhof, für die in dieser Arbeit nicht auftauchenden Luziferase-Assays.

... Dr. Jörg Linde und Andreas Dix, Systembiologie und Bioinformatik – Hans-Knöll-Institut, Jena, für die Auswertung der regulierten miRNAs und der Unterstützung bei der Microarray-Auswertung.

...Dr. Dr. Marcus Dittrich und Dr. Tobias Müller, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Bioinformatik, für die Unterstützung bei der Plättchen-Microarray-Auswertung und dem Mitwirken an der gemeinsamen Publikation.

... Prof. Dr. Bernhard Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum, Vaskuläre Biologie, für die Möglichkeit in seinem Labor die Plättchenkonzentrationen zu bestimmen. Besonders sei hier Viola Lorenz erwähnt, die für das einwandfreie Funktionieren des Sysmex gesorgt hat.

... die ganze AG Löffler. Besonderer Dank geht an Mirjam Fließner, Dr. rer. med. Sabrina Brüggemann, Jasmin Lothar und Dr. med. Maria Bouzani und Dr. rer. nat Jan Springer für die Unterstützung, Kritik und Hilfe, sowohl bei experimentellen Problemen als auch den schriftlichen Korrekturen. Zudem möchte ich mich bei Anna-Lena Schmitt Denise Michel, Oana Butto und Hannes Schlossnagel für die experimentelle Einarbeitung und die Organisation im Labor bedanken.

.... den „Biologen-Stammtisch“, der zum Glück nicht nur aus Biologen bestand. Vielen Dank für viele nette Abende mit gutem Essen und vielen Arbeits- und Nichtarbeitsthemen.

.... meine Familie. Vielen Dank, dass ihr mich immer unterstützt und ermutigt habt. Durch euch ist diese Arbeit erst möglich geworden.

Herzlichen Dank!!!