

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

**Der Einfluss von Hyperthermie auf die Interaktion
humaner dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus***

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

vorgelegt von
Anna Semmlinger
aus
Augsburg

Würzburg, Mai 2015



Referent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Korreferent: Professor Dr. med. Matthias Eyrich

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2016

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.1	Pathobiologie von <i>A. fumigatus</i>	1
1.1.2	Medizinische Bedeutung von <i>A. fumigatus</i>	3
1.1.3	Invasive Aspergillose	4
1.2	Bedeutung von DCs für die Immunantwort gegen <i>A. fumigatus</i>	7
1.2.1	DCs als Teil des angeborenen Immunsystems	7
1.2.2	Funktionen von DCs	8
1.2.2.1	Erkennung und Phagozytose von Pathogenen	8
1.2.2.2	Reifung und Migration in Lymphknoten	9
1.2.2.3	Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen.....	10
1.2.2.4	Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung.....	11
1.3	Fieber bei Infektionen	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3	Reagenzien, Medien und Zytokine.....	20
2.1.4	Kits	21
2.1.5	FACS-Antikörper und Beads	21
2.1.6	Primer.....	22
2.1.7	Zellen und Stämme.....	23
2.1.8	Software	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Modellsystem monozytäre DCs.....	23
2.2.1.1	Isolierung von Monozyten	23
2.2.1.2	Generierungsprozess von moDCs	25
2.2.2	Arbeiten mit <i>A. fumigatus</i>	25

2.2.3	Stimulation von DCs mit Zymosan oder <i>A. fumigatus</i>	26
2.2.4	Durchflusszytometrie	27
2.2.5	Analyse der Viabilität	28
2.2.6	Analyse der Zytokinexpression und -sekretion	30
2.2.6.1	RNA-Extraktion	30
2.2.6.2	cDNA-Umschrieb.....	31
2.2.6.3	Real-Time PCR – Genexpression	32
2.2.6.4	Human Cytokine 10-Plex Panel – Zytokinsekretion	35
2.2.7	Analyse der Antigenaufnahme	36
2.2.8	Analyse der Oberflächenmarkerexpression	39
2.2.9	Statistik.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Erfolgreiche Generierung von DCs aus Monozyten	41
3.2	Viabilität von DCs unter Hyperthermie	43
3.2.1	Vorversuchsreihe zur Apoptoserate von DCs unter Hyperthermie	43
3.2.2	Apoptoserate von DCs bei 24 h Inkubation unter Hyperthermie	45
3.2.3	Anteil toter DCs bei 24 h Inkubation unter Hyperthermie.....	46
3.3	Zytokinexpression und -sekretion durch DCs unter Hyperthermie	47
3.3.1	Expression und Sekretion ohne Stimulation	48
3.3.2	Expression und Sekretion bei Zymosanstimulation	48
3.3.3	Expression und Sekretion bei <i>A. fumigatus</i> -Stimulation.....	49
3.3.4	Expression und Sekretion bei <i>A. fumigatus</i> -Stimulation unter Hyperthermie ...	50
3.3.4.1	IL8-, IL10-, TNF- und CCL20-Expression und Sekretion unter Hyperthermie	50
3.3.4.2	IL6-, IL1B- und CXCL10-Expression und Sekretion unter Hyperthermie	52
3.3.4.3	IL12B-Expression unter Hyperthermie.....	53
3.3.4.4	IL2-, IL5-, IFN γ -, IL4- und GM-CSF-Sekretion unter Hyperthermie.....	54
3.3.4.5	IL12B-, CCL20- und IL8-Expression nach Vorinkubation unter Hyperthermie	54
3.3.4.6	Übersicht des Einflusses der Hyperthermie auf die Zytokininduktion in DCs.....	56
3.4	Antigenaufnahme durch DCs unter Hyperthermie	57
3.4.1	Erfolgreiche Antigenaufnahme durch DCs	57
3.4.2	Aufnahme von Dextran und <i>A. fumigatus</i> -Konidien unter Hyperthermie.....	58
3.4.3	Aufnahme von Dextran und <i>A. fumigatus</i> -Konidien nach Vorinkubation unter Hyperthermie	59

3.5	Expression von Oberflächenmarkern auf DCs unter Hyperthermie	62
3.5.1	Expression der Reifemarker CD25, CD40, CD80, CD83, CD86.....	63
3.5.2	Expression der antigenpräsentierenden Moleküle HLA1 und HLA-DR	66
3.5.3	Expression des moDC-Markers CD1a	67
3.5.4	Expression des PRR Dectin-1	68
3.5.5	Expression der migrationsassoziierten Moleküle ICAM-1 und CCR7	69
3.5.6	Erneute Analyse der Expression von CD80 und HLA-DR	70
4	Diskussion	73
4.1	Festlegung des Hyperthermieprotokolls und Viabilität der DCs	74
4.2	Zytokinexpression und -sekretion durch DCs	76
4.3	Antigenaufnahme durch DCs	79
4.4	Oberflächenmarkerexpression auf DCs.....	81
4.5	Zusammenschau und Ausblick.....	85
5	Zusammenfassung.....	87
6	Summary.....	89
7	Literaturverzeichnis.....	91
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	97
9	Abkürzungsverzeichnis	99
	Danksagung.....	
	Lebenslauf.....	

1 Einleitung

1.1 *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Pathobiologie von *A. fumigatus*

Die Gattung *Aspergillus* (*A.*) bezeichnet saprophytisch wachsende Pilze mit weltweitem Vorkommen, von denen fast 200 Arten bekannt sind. Für den Menschen haben Aspergilli vielseitige Bedeutung: *A. niger* wird bei der Produktion von Zitronensäure, Amylasen und anderen Enzymen verwendet; *A. terreus* wird zur Herstellung des Cholesterinsenkers Lovastatin eingesetzt. Medizinische Relevanz hat beispielsweise *A. flavus*, dessen Aflatoxin beim Menschen zum Leberzellkarzinom führen kann [1]. Obwohl auch *Aspergillus*-Arten wie *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* und *A. nidulans* Infektionen verursachen können, ist *A. fumigatus* mit einem Anteil von ca. 90 % die häufigste Ursache invasiver Infektionen beim Menschen [2; 3]. Eine wichtige biologische Bedeutung kommt der Spezies beim Recycling von Kohlen- und Stickstoff zu [1; 2].

Bereits Micheli beschrieb 1729 die Gattung *Aspergillus*, die Art *A. fumigatus* wurde von Fresenius im Jahr 1863 definiert. Der Lebenszyklus des Pilzes ist sehr einfach: Durch asexuelle Vermehrung (dargestellt in Abbildung 1 A) werden widerstandsfähige Sporen in die Luft freigesetzt. Diese werden als Konidien bezeichnet und können extreme Bedingungen, wie sehr hohe Temperaturen oder Trockenheit, tolerieren. Sind die Konidien Wärme und Feuchtigkeit ausgesetzt, beginnen sie zu schwellen; es bilden sich Keimschläuche, die zu verzweigten Hyphen heranwachsen. Die Gesamtheit aller Hyphen wird als Pilzmyzel bezeichnet. Auf dem Myzel wachsen Konidiophoren heran, die erneut Konidien in die Umwelt freisetzen können [4]. Neben dieser asexuellen Vermehrung ist seit der vollständigen Sequenzierung des *A. fumigatus*-Genoms auch ein sexueller Vermehrungszyklus bekannt. Dadurch ist die genetische Variabilität erhöht und eine Anpassung des Pilzes an veränderte Umweltbedingungen, wie z. B. den verstärkten Einsatz von Antimykotika, erleichtert [5].

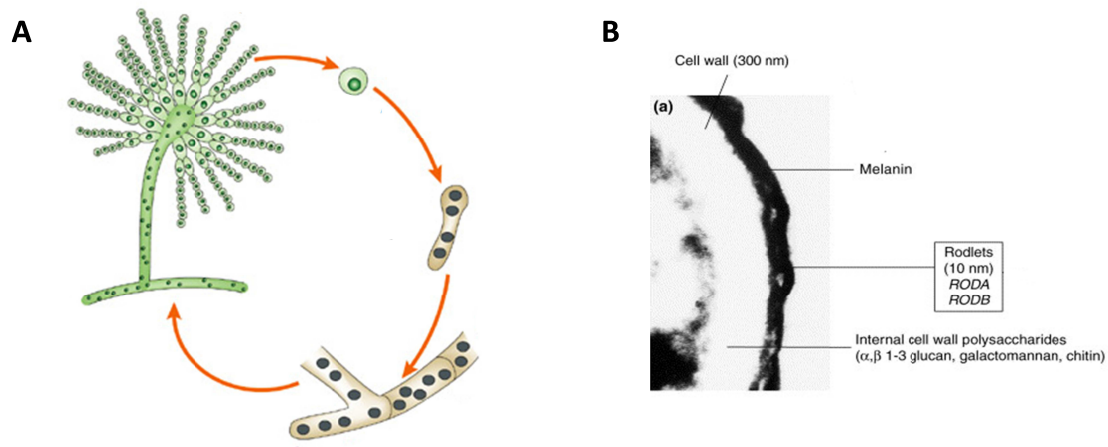


Abbildung 1: Biologie von *A. fumigatus*

A: Asexueller Vermehrungszyklus von *A. fumigatus*

Aus Konidiophoren (links oben) werden Konidien freigesetzt, die schwellen, zu Keimschläuchen und weiter zu Pilzhyphen heranwachsen, auf denen wiederum neue Konidiophoren entstehen.
modifiziert aus Casselton *et al.* 2002 [6]

B: Zellwandaufbau von *A. fumigatus*-Konidien

Die innere Zellwand der Konidien aus Polysacchariden wird von einer Melaninschicht sowie einer Hülle aus hydrophoben Proteinen („rodlets“) umschlossen.
aus Latgé 2001 [4]

Die Konidien des Pilzes finden sich in hohen Konzentrationen (je nach Quelle 0,2–15 Konidien/m³ [7] bis zu 1–100 Konidien/m³ [4]) überall in der Luft. *A. fumigatus*-Konidien sind – im Gegensatz zu anderen Aspergilli wie *A. flavus* und *A. niger* – mit einer Größe von 2–3,5 µm sehr klein, so dass sie in Lungenalveolen des Menschen (Durchmesser ca. 300 µm [8]) vordringen können [9].

Neben der geringen Größe seiner Konidien besitzt *A. fumigatus* noch weitere Eigenschaften, die wahrscheinlich zu seinem Erregerdasein beitragen. *A. fumigatus* ist ein sehr thermotoleranter Pilz, dessen optimale Wachstumstemperatur mit 37–42 °C im Bereich der menschlichen Körpertemperatur liegt [10]. Außerdem besitzen *A. fumigatus*-Konidien einen speziellen Zellwandaufbau (Abbildung 1 B): Die eigentliche Zellwand besteht vor allem aus β-1,3-Glucan, Galactomannan und Chinin, welche für die Erkennung durch das Immunsystem bedeutsam sind ([11; 12], siehe auch Absatz 1.2.2.1). Diese Wand wird von einer Pigmentschicht sowie von einer Hülle aus hydrophoben Proteinen, sogenannten „rodlets“, umschlossen. Diese äußeren Schichten machen die Konidien zum einen sehr widerstandsfähig, zum anderen maskieren sie die

Zellwandbestandteile (z. B. β -1,3-Glucan, siehe oben), die von Immunzellen erkannt werden können. Erst bei Reifung der Konidien geht die Hülle verloren und die Polysaccharide liegen frei [3; 4]. *A. fumigatus*-Konidien können an Wirtsproteine (Fibrinogen, Laminin) binden, was wohl zu einer guten Adhäsion in den Luftwegen beiträgt [2; 3]. Außerdem ist der Pilz mit verschiedenen Proteasen ausgestattet, durch die er Aminosäuren verfügbar machen und sich während einer Infektion vom Wirt ernähren kann [10]. Weitere Enzyme und Toxine, wie Superoxiddismutasen tragen zum Schutz des Pilzes bei [2; 3].

Im Unterschied zu vielen pathogenen Bakterien jedoch ist *A. fumigatus* ein opportunistischer Erreger, der bei immungesunden Personen normalerweise nicht zu Erkrankungen führt [10].

1.1.2 Medizinische Bedeutung von *A. fumigatus*

Der Ablauf einer Infektion mit *A. fumigatus* wird vom Immunstatus der betroffenen Person bedingt. Obwohl *A. fumigatus*-Konidien kontinuierlich inhaliert werden, zeigen die meisten Menschen keine Anzeichen einer Infektion sowie keine antikörper- oder zellvermittelte erworbene Immunität gegen den Pilz. Konidien können also bei immunkompetenten Menschen direkt durch die unspezifische Immunabwehr aus der Lunge entfernt werden [7]. Symptomatisch verlaufende Infektionen mit *A. fumigatus* treten vor allem bei Patienten mit Neutropenie auf, allerdings können auch nicht-neutropene Patienten erkranken [13]. Die zugrundeliegenden Prädispositionen für invasive *A. fumigatus*-Infektionen sind in den meisten Fällen hämatologische Grunderkrankungen (hämatologische Stammzelltransplantationen, Leukämien, Lymphome [10]), aber auch chronisch-pulmonale Erkrankungen, Immunsuppression nach Organtransplantation, systemisch rheumatische Erkrankungen und seltener AIDS [1; 13].

Je nach Reaktivität des Immunsystems verursacht *A. fumigatus* unterschiedliche Krankheitsbilder: Bei Hypersensibilität können nach Kontakt mit dem Pilz allergische Erkrankungen wie Asthma oder die allergisch-pulmonale Aspergillose auftreten. Bei einer nur geringfügigen Schwächung des Immunsystems kommt es zur Kolonisierung der intra- und extrapulmonalen Atemwege des Individuums ohne invasives Wachstum

des Pilzes. Hierbei kann eine asymptomatische Kolonisierung oder ein nicht-invasives Aspergillom – bei Besiedelung einer präformierten Lungenhöhle wie einer abgeheilten Tuberkuloseläsion – vorliegen [1]. Eine deutliche Schwächung vor allem des angeborenen Immunsystems kann schließlich zu invasivem Wachstum des Pilzes führen. Je nach Ort der Primärinvasion wird die daraus folgende Erkrankung als invasive (pulmonale) Aspergillose (häufigste Form), invasive Aspergillus-Rhinosinusitis oder invasive tracheobronchiale Aspergillose bezeichnet [1; 7]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über mögliche Erkrankungsbilder in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirts.

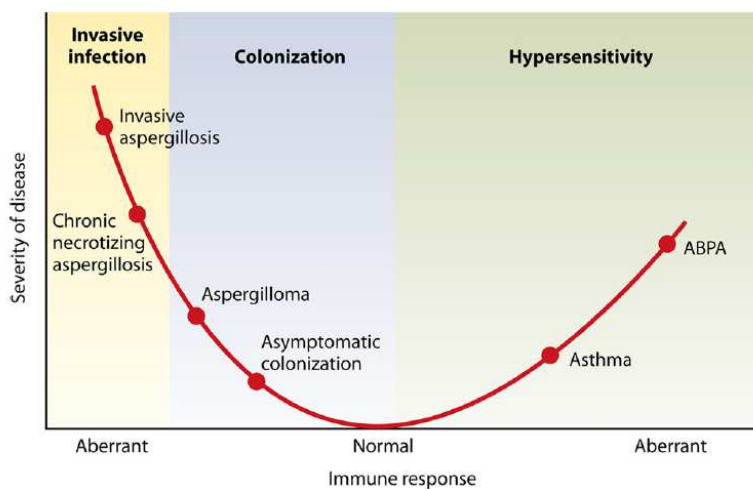


Abbildung 2: Mögliche Verlaufsformen einer *A. fumigatus*-Infektion

Verlauf einer *A. fumigatus*-Infektion in Abhängigkeit von der Immunlage des Wirtes. Kolonisierung und invasive Infektion bei geschwächter Immunlage (links); Hypersensivitätserkrankungen bei hyperreagiblem Immunsystem (rechts).

ABPA= allergische bronchopulmonale Aspergillose
aus Park et al. 2009 [7]

1.1.3 Invasive Aspergillose

Die Pathophysiologie der IA beginnt mit der Inhalation der Konidien in die Lungenalveolen. Bei gesunden Menschen kann bereits ein Großteil der Konidien über einen entscheidenden Abwehrmechanismus des immunkompetenten Wirts, die mukoziliäre Clearance, eliminiert werden [7; 14]. Dieser Abwehrmechanismus des zilienträgenden Respirationstrakts ist beispielsweise bei chronisch-pulmonalen Erkrankungen wie der zystischen Fibrose nicht optimal funktionsfähig, wodurch die Konidien leichter in die Alveolen gelangen [15]. *In vitro* wurde zudem gezeigt, dass *A. fumigatus*-Toxine die

ziliäre Aktivität inhibieren [16]. Somit können – auch aufgrund ihrer Größe – einige Konidien selbst bei immungesunden Personen in die Lungenalveolen vordringen.

In den Alveolen finden sich verschiedenen Zelltypen: Typ I-Pneumozyten und Endothelzellen sind für den Gasaustausch zuständig, Fibroblasten produzieren das bindegewebige Grundgerüst der Alveole. Typ II-Pneumozyten bedecken nur 5 % der alveolären Oberfläche, sind jedoch für die Immunabwehr von Bedeutung: Sie bilden lösliche Surfactant- (primär zur Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen) und Komplementproteine, die als Opsonine die Aufnahme von Pathogenen in Immunzellen erleichtern. In den terminalen Luftwegen patrouillieren Alveolarmakrophagen; im Falle einer Infektion werden aus den unterliegenden Blutgefäßen Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutiert [10; 15; 17].

Die Immunmechanismen gegen *A. fumigatus* sind in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt. Erreichen die Konidien die Alveolen, beginnen sie nach 4 bis 5 Stunden (h) zu schwellen und werden von den Alveolarmakrophagen sowie den löslichen Faktoren (Surfactant, Komplement) erkannt. Die Alveolarmakrophagen sind hauptverantwortlich für die Phagozytose und das Abtöten der *A. fumigatus*-Konidien. Außerdem induzieren sie eine proinflammatorische Immunantwort, indem sie weitere Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten oder dendritische Zellen (DCs) anlocken. Konidien, die der Phagozytose durch Makrophagen entgehen, wachsen nach 12 bis 15 h zu verzweigten, septierten Hyphen heran. Die rekrutierten neutrophilen Granulozyten dienen neben der Phagozytose von Konidien auch der Zerstörung dieser Hyphen. Über DCs erfolgt die Verknüpfung zum adaptiven Immunsystem (siehe Absatz 1.2). Findet bereits ein infiltrierendes Wachstum in die unterliegenden Blutgefäße statt, trägt die Aktivierung der Blutgerinnung ebenfalls zur Immunabwehr bei [1; 4; 7; 10]. Ist auch auf diesem Niveau die Immunabwehr unzureichend, kommt es zur Ausbreitung der IA in andere Organe. Hierbei sind am häufigsten die kontralaterale Lunge und das Gehirn betroffen [7].

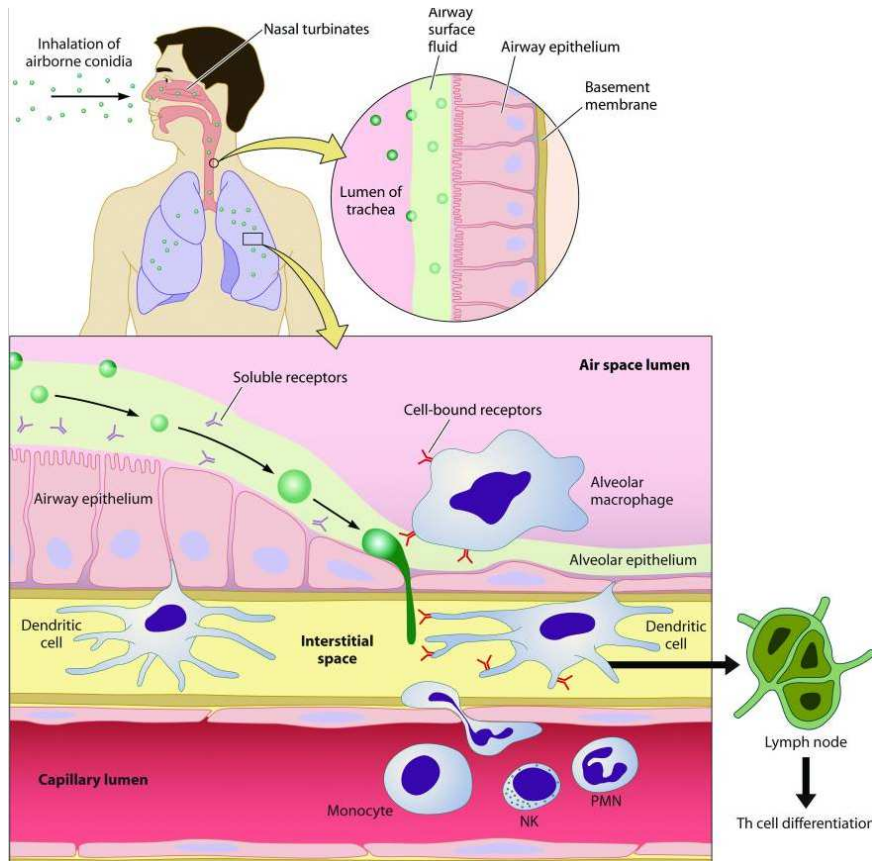


Abbildung 3: Immunmechanismen gegen *A. fumigatus*

Interaktion verschiedener Immunzellen mit *A. fumigatus* im Verlauf der IA von der Inhalation der Konidien in die Alveolen bis zum Eindringen des Pilzes in das Lungeninterstitium.
aus Park et al. 2009 [7]

Die Symptome der IA sind relativ unspezifisch. In einer 6-Jahres-Studie, die den Verlauf der IA bei neutropenen und nicht-neutropenen Patienten verglich, zeigte sich Fieber, das auf Behandlung mit Breitspektrumantibiotika nicht sistierte, als häufigstes klinisches Symptom (85 % der Patienten betroffen). Da der häufigste Ort der Primärinfektion die Lunge war, waren Dyspnoe, Husten, Brustschmerz und Hämoptysen weitere Symptome. Seltener traten kutane Läsionen oder neurologische Symptome bei sekundärer Infektion von Haut bzw. Gehirn auf. Nur 2 von 88 Patienten waren asymptomatisch [13]. Fieber als Symptom der IA kann bei Patienten, die aufgrund ihrer Grunderkrankung mit Kortikosteroiden behandelt werden, fehlen, da diese Medikamente antipyretisch wirken [3]. Dennoch kann Fieber bei neutropenen Patienten das einzige klinische Zeichen einer IA darstellen. Die Mortalität liegt bei 40-90 % in Hochrisikopopulationen [18].

1.2 Bedeutung von DCs für die Immunantwort gegen *A. fumigatus*

1.2.1 DCs als Teil des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen wird klassischerweise in zwei Bereiche eingeteilt, die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunabwehr. Das angeborene Immunsystem dient der primären, unspezifischen Erkennung und Abwehr von Pathogenen, vor allem über die Mechanismen der Phagozytose und der Freisetzung von Zytokinen. Makrophagen, Granulozyten, Monozyten, natürliche Killer (NK)-Zellen und DCs werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Die spezifische Abwehr durch das adaptive Immunsystem erfolgt mittels Freisetzung pathogenspezifischer Antikörper, durch Aktivierung anderer Immunzellen (über Zytokine) oder durch direktes Abtöten infizierter Zellen. Außerdem bilden sich Gedächtniszellen, die im Falle einer Reinfektion für eine schnellere und erleichterte spezifische Abwehr sorgen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems – B- und T-Lymphozyten (z. B. T_H1 -, T_H2 -, T_H17 -Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen) – müssen in den sekundär lymphatischen Organen zunächst von antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden [17].

DCs sind somit Teil des angeborenen Immunsystems. Sie entwickeln sich aus verschiedenen Vorstufen, unter anderem aus Monozyten [19], aus denen DCs auch für *in vitro* Versuche generiert werden können ([20], siehe auch Absatz 2.2.1). Beim Menschen sind verschiedene DC-Subpopulationen bekannt, die als myeloide und plasmazytoide DCs bezeichnet werden [21]. DCs können in verschiedenen Zustandsformen vorliegen. Die unreife DC im Gewebe – in der Epidermis als Langerhanszelle bezeichnet – wird bei Infektionen zum jeweiligen Entzündungsort rekrutiert. Dort erkennt sie Pathogene, nimmt diese auf, setzt Zytokine frei und wandert in Lymphknoten. Hier aktiviert sie – nun als reife DC – T-Zellen und somit das adaptive Immunsystem. Durch diese Verknüpfung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem kommt DCs eine Schlüsselstelle in Abwehr von Pathogenen wie *A. fumigatus* zu [19]. Daher werden die entscheidenden Funktionen von DCs in Bezug auf die Interaktion mit *A. fumigatus* im Folgenden genauer beschrieben.

1.2.2 Funktionen von DCs

1.2.2.1 Erkennung und Phagozytose von Pathogenen

DCs erkennen Pathogene über spezifische Oberflächenrezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs). Die Oberflächenmoleküle auf Pathogenen, die von den PRRs erkannt werden, werden als „pattern associated molecular patterns“ (PAMP) bezeichnet. Bei der Erkennung von *A. fumigatus* durch DCs sind vor allem drei PRRs beteiligt: Dectin-1 [22] und die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 [23]. Darüber hinaus tragen das „dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin“ (DC-SIGN) und der Mannose-Rezeptor zur Erkennung von *A. fumigatus* bei [15; 24]. Außerdem gibt es lösliche Rezeptoren, wie beispielsweise Pentraxin-3, das als Opsonin wirkt und nach *A. fumigatus*-Stimulation vermehrt freigesetzt wird [22].

Innerhalb der Gruppe der TLRs sind zahlreiche Untertypen, die sowohl intra-, als auch extrazellulär exprimiert werden, bekannt [15]. Die Bedeutung von TLR-2 und -4 bei der Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort nach Kontakt mit *A. fumigatus* konnte in mehreren Studien an Monozyten, DCs oder Makrophagen humanen oder murinen Ursprungs verdeutlicht werden [23; 25; 26]. *A. fumigatus*-Konidien bewirken sowohl über TLR-4 als auch über TLR-2, *A. fumigatus*-Hyphen ausschließlich über TLR-2 eine verstärkte Zytokinfreisetzung aus Makrophagen [27]. Die exakten PAMPs für TLR-2 und TLR-4 auf *A. fumigatus* sind nicht bekannt [28].

Das PAMP für Dectin-1 auf *A. fumigatus* ist der Zellwandbestandteil β -1,3-Glucan. Für Stimulationsversuche von Immunzellen kann daher z. B. Zymosan, ein aus Hefe gewonnenes β -1,3-Glucan, verwendet werden [22]. β -1,3-Glucan liegt nur auf geschwollenen Konidien, Keimschläuchen oder Hyphen, nicht auf ruhenden Konidien auf der *A. fumigatus*-Zellwand frei. So kann neben den TLRs 2 und 4 auch über Dectin-1 zwischen den verschiedenen Zustandsformen des Pilzes unterschieden werden [11]. Dectin-1 induziert über seinen intrazellulären Anteil eine Signalkette und moduliert so im Zusammenspiel mit TLR-2 [11] die Immunantwort [15]. Ein Fehlen von Dectin-1 führt zu einer verminderten Freisetzung von Interleukin (IL) 12 und Tumornekrosefaktor α (TNF) aus DCs [22] und einer erhöhten Mortalität von Mäusen bei

Konfrontation mit *A. fumigatus* [29]. Darüber hinaus wirkt Dectin-1 als endozytotischer Rezeptor und erleichtert die Phagozytose des Pilzes [15].

Endozytose beschreibt die Aufnahme von Substanzen in Zellen. Dabei wird die Aufnahme flüssiger Bestandteile als Pinozytose, die Aufnahme fester Partikel oder Pathogene (wie *A. fumigatus*) als Phagozytose bezeichnet [17]. Die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten oder Makrophagen dient hauptsächlich der schnellen, vollständigen Zerstörung des Pathogens. Die Phagozytose durch DCs jedoch ist eher wichtig, um Peptide freizulegen, die als Antigene zur T-Zell-Aktivierung wirken können. Das Pathogen wird in die Zelle aufgenommen und in der entstehenden Vakuole (Phagosom) über proteolytische Mechanismen in Peptide zerkleinert, dies wird als „Prozessierung“ bezeichnet. Ein nahezu neutraler pH-Wert (verglichen mit dem sehr sauren pH-Wert der Phagosomen neutrophiler Granulozyten und Makrophagen) und eine begrenzte proteolytische Aktivität tragen bei DCs dazu bei, dass die Degradierung nicht vollständig, sondern nur partiell erfolgt. Anschließend verschmilzt das Phagosom mit intrazellulären Kompartimenten, in denen „major histocompatibility complex“ (MHC) II-Moleküle (siehe auch Absatz 1.2.2.4) in großer Anzahl vorliegen. Enzymatisch wird nun eine kurze Kette am MHC-Molekül abgespalten und das prozessierte Antigen an das Molekül gebunden. Nach Translokation des Komplexes an die Zelloberfläche kann das Antigen den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert werden [19; 30]. Die phagozytotische Aktivität der DCs reduziert sich während des Reifungsprozesses, ihre Funktion wandelt sich zur Antigenpräsentation [19].

1.2.2.2 Reifung und Migration in Lymphknoten

Die Oberflächenmoleküle auf DCs tragen zu ihren spezifischen Aufgaben, wie Antigenerkennung, -präsentation und Migration in Lymphknoten, bei. Daher wandelt sich das Expressionsmuster dieser Proteine, wenn DCs reifen und ihre Funktion verändern [19].

Unreife DCs zeichnen sich durch hohe Expressionslevels von PRRs und eine starke endozytotische Aktivität aus; kostimulatorische oder antigenpräsentierende Moleküle sind niedrig exprimiert. Durch den Reifungsprozess reduziert sich die endozytotische Aktivität der DC, die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, wie der Proteine

„cluster of differentiation“ (CD) 40, CD80, CD83, CD86 und CD25, nimmt hingegen zu. Außerdem werden antigenpräsentierende MHC-Moleküle hochreguliert sowie Rezeptoren wie das „intercellular adhesion molecule“(ICAM) 1 und der Chemokin-Rezeptor (CCR) 7 verstärkt exprimiert. Auch die DC-Morphologie ändert sich [19].

CD40, CD80 und CD86 sind ebenso wie die antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I und -II bedeutsam für die Aktivierung von T-Zellen ([31], siehe Absatz 1.2.2.4). Eine starke CD83-Expression wurde in vielen Studien mit einem hohen DC-Reifungsgrad assoziiert [32]. Die Stimulation von DCs mit *A. fumigatus* induziert die Expression von CD40 [23], CD80 [23; 33], CD86 [23; 33; 34], CD83 [23; 34] und MHC-II [23; 33].

DCs wandern nach Kontakt mit *A. fumigatus* Konidien über afferente Lymphgefäße von den Lungenalveolen in regionale Lymphknoten [33]. Dazu wird auf DCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* unter anderem CCR7 verstärkt exprimiert [34]. CCR7 erkennt das Chemokin SLC auf Lymphgefäßen [35] – wodurch die DC in den afferenten Lymphstrom gelangt [36] – sowie das Zytokin MIP-3 β im Cortex des Lymphknotens, so dass die DC die T-Zell-Zone erreichen kann [37]. Außerdem exprimieren DCs nach *A. fumigatus*-Stimulation ICAM-1 [22], was für die Migration von T-Zellen in den Parakortex des Lymphknotens bedeutsam ist [38]. ICAM-1 spielt darüber hinaus bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H1-Zellen eine Rolle [31].

1.2.2.3 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen

Immunzellen setzen bei Infektionen Zytokine frei, um miteinander zu kommunizieren und eine abgestimmte Immunantwort zu ermöglichen. Außerdem sind Zytokine an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. Zytokine, die für das Anlocken von Zellen verantwortlich sind, werden Chemokine genannt. Die Bedeutung der Zytokine bei der *A. fumigatus*-Abwehr wurde beispielsweise durch eine Studie am Mausmodell deutlich: Bei immun-supprimierten Mäusen lag neben einer erhöhten Mortalität ein deutlich verändertes Zytokinprofil vor [39].

Die proinflammatorische Zytokine, zu denen unter anderem IL1 β , IL12, IL5, TNF, IL6, IL8, IFN γ und „Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) gezählt werden, bewirken eine eher protektive Entzündungsreaktion [24]. TNF stimuliert

neutrophile Granulozyten und verstärkt deren phagozytotische Aktivität [40]; die Abwesenheit dieses Zytokins erhöhte bei Mäusen die Mortalität der IA [41]. Auch IL8, IFN γ und IL12 tragen zur Immunantwort gegen *A. fumigatus* bei [24; 42; 43]. IL12 ist darüber hinaus ein T-polarisierender Faktor (siehe auch Absatz 1.2.2.4) und ist von entscheidender Bedeutung, damit sich aus naiven T-Zellen T_H1-Zellen differenzieren können [44]. IL8, IL6, IL1 und TNF werden außerdem als Pyrogene bezeichnet, da sie in der Lage sind, Fieber zu erzeugen [45].

Antiinflammatorische Zytokine wie IL10, IL4 und der „transforming growth factor“ (TGF) β wirken der Entzündungsreaktion entgegen und sind eher mit invasivem Wachstum von *A. fumigatus* assoziiert [24]. IL10 hemmt beispielsweise die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF oder IL6 sowie die Expression von MHC-II, CD80 und CD86 auf DCs [46]. In einer Studie an nicht-neutropenen Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL10-Levels und einer Progression der IA gezeigt werden [47]. Auch eine verstärkte IL4-Freisetzung führt zu einer verschlechterten Abwehr gegen den Pilz [48].

Der „chemokine (C-C-motif) ligand“ (CCL) 20 und der „chemokine (C-X-C motif) ligand“ (CXCL) 10 werden zu den Chemokinen gezählt. CCL20 bindet an den CCR6-Rezeptor und spielt beim Anlocken von DCs, B- und T-Zellen eine Rolle [49]. Bei *A. fumigatus*-Infektionen ist bei einem CCR6-Defekt auf DCs die Akkumulation von DCs in der Lunge vermindert [50]. Bei Polymorphismen von CXCL10 besteht ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer IA [51].

Nach *A. fumigatus*-Stimulation werden IL6, IL12 und TNF [22; 23] sowie IL1 β [7], IL8, CCL20 und in geringem Ausmaß auch IL10 und CXCL10 [22] in DCs induziert. Hierbei ist CCL20 das am stärksten hochregulierte Zytokin [22].

1.2.2.4 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung

Im Lymphknoten findet durch reife DCs über MHC-I und -II-Moleküle die Antigenpräsentation an T-Zellen und somit deren Aktivierung statt. Über MHC-I-Proteine (auch „human leukocyte antigen“ (HLA) 1) können DCs körpereigene Antigene und über den Prozess der Kreuzpräsentation auch exogene Antigene zur Aktivierung zytotoxischer

T-Zellen präsentieren [30]. MHC-II-Moleküle wie HLA-DR dienen klassischerweise zur Präsentation körperfremder, z. B. der *A. fumigatus*-Antigene. Im Anschluss an die Phagozytose eines Pathogens werden die prozessierten Antigene intrazellulär an MHC-II gebunden (siehe Absatz 1.2.2.1). Die Reifung der DC induziert die Translokation der Komplexe an die Zelloberfläche, wo sie zur Aktivierung von T-Zellen bereit stehen [19; 30].

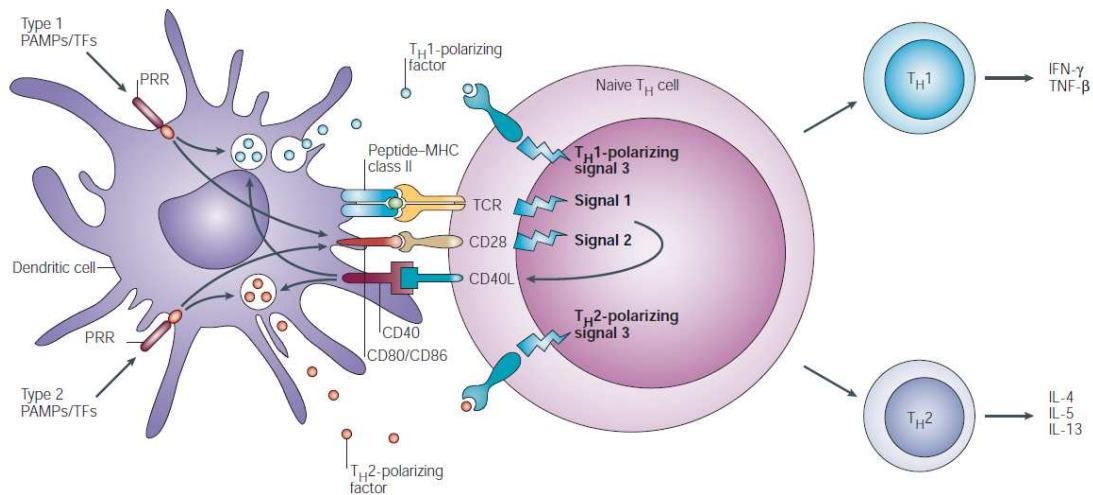


Abbildung 4: Aktivierung von T-Zellen durch DCs

Nach Aktivierung der DC (links) über PRR aktiviert diese die T-Zelle (rechts) über drei entscheidende Signale:

- 1) Bindung MHC-II – TCR.
- 2) kostimulatorisches Signal CD80/CD86 – CD28.
- 3) Freisetzung T-polarisierender Faktoren.

Die rückwirkende Stimulation der DC durch die T-Zelle erfolgt über die Bindung CD40-CD40L.

aus *Kapsenberg et al. 2003* [31]

Für die T-Zell-Aktivierung sind drei durch DCs vermittelte stimulatorische Signale nötig, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Das erste Signal ist die Bindung des über MHC-II präsentierten Peptids an den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der T-Zelle. Dies garantiert die Antigenspezifität der Immunantwort. Das zweite Signal besteht aus der Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der DC mit CD28 auf der T-Zelle. Das dritte Signal entscheidet darüber, ob T_H1 oder T_H2-Zellen induziert werden. Dies geschieht über lösliche T-polarisierende Faktoren wie IL12 und CCL2 oder durch Oberflächenmoleküle wie ICAM-1. Welcher Weg dabei eingeschlagen wird, hängt vom aktivierten PRR und der durch ihn ausgelösten Signalkette ab [19; 31]. Die T-Zelle kann

rückwirkend über die Bindung von CD40L an CD40 die DC stimulieren, wodurch vermehrt T-polarisierende Faktoren freigesetzt werden und sich die Expression von CD80 und CD86 zusätzlich erhöht [52].

Auch durch *A. fumigatus* stimulierte DCs bewirken eine T-Zell-Aktivierung: Nach Stimulation mit dem Pilz ist die Anzahl an T-Helferzellen [34] sowie deren IFN γ -Produktion [33; 34] deutlich vermehrt.

1.3 Fieber bei Infektionen

Die normale Basaltemperatur des Menschen liegt bei ca. 37 °C und unterliegt tageszeitlichen Schwankungen von etwa 0,6 °C [8]. Neben dem Ort der Messung (niedrigere Werte axillär und oral, höhere Werte aurikulär und rektal), haben auch Kleidung und Außentemperatur, körperliche Betätigung sowie der Zeitpunkt im Menstruationszyklus (Temperaturanstieg um ca. 0,5 °C nach der Ovulation) Einfluss auf die Körpertemperatur [53]. Das Zentrum der Thermoregulation liegt im Hypothalamus. Dieser kann bei Abweichung der Kernkörpertemperatur vom Sollwert über das para- und sympathische Nervensystem mittels verschiedener Mechanismen (Schwitzen, innerer Wärmestrom über Gefäße, Zittern, Wärmeproduktion im braunen Fettgewebe) die Körpertemperatur beeinflussen [8].

Bei Fieber ist der Sollwert der Temperatur im Hypothalamus nach oben verstellt. Dies geschieht bei Infektionen initial über exogene Pyrogene wie Lipopolysaccharid (LPS), die zu einer Ausschüttung von endogenen Pyrogenen (z. B. IL6) führen. Diese können über das Prostaglandin (PG) E₂ den Sollwert der Temperatur im Hypothalamus verändern. Hier setzt die Wirkung antipyretischer Medikamente wie Paracetamol oder Ibuprofen an, sie hemmen die PGE₂-Bildung [45].

Fieber ist eine phylogenetisch alte Antwort auf Infektionen und tritt bereits bei Reptilien, Amphibien und Fischen auf. Die meisten Säugetiere zeigen bei Infektionen eine Erhöhung der Körpertemperatur in ähnlichen Bereichen (Anstieg auf ca. 37,8 °C bei Mäusen und bis zu 42,2 °C bei Hunden, [54]). Beim Menschen wird eine Körpertemperatur ab 38,0 °C rektal als Fieber definiert, wobei Temperaturen bis 38,5 °C als „subfebril“ bezeichnet werden [53]. Das Erzeugen von Fieber ist für den Menschen

sehr energieaufwändig [55]. Dass dieser Mechanismus dennoch evolutionär erhalten geblieben ist, spricht für seine Bedeutung bei der Abwehr von Infektionen [54].

Zahlreiche klinische Studien beschreiben vor allem positive, seltener auch negative Effekte des Fiebers auf den Krankheitsverlauf bei Infektionen. Hierbei besteht ein Unterschied zwischen schweren Erkrankungen wie Septitiden und nicht-lebensbedrohlichen Erkrankungen.

Bei nicht-lebensbedrohlichen Erkrankungen konnte ein positiver Einfluss einer erhöhten Körpertemperatur gezeigt werden. Bei Kindern mit Varizellen-Infektionen, die mit dem antipyretischen Medikament Paracetamol behandelt wurden, war die Dauer bis zur Verkrustung und somit Abheilung der Bläschen im Vergleich zu einer Placebogruppe (mit Fieber) verlängert [56]. Andere Studien zeigten ebenso bei Rhinovirus- und Shigelleninfektionen eine negative Korrelation zwischen Körpertemperatur und Krankheitsdauer sowie eine verlängerte Krankheitsdauer bei Anwendung antipyretischer Medikamente. Auch im Mausmodell konnte eine erhöhte Überlebensrate bei viralen und bakteriellen Infektionen gezeigt werden, wenn die Mäuse bei erhöhter Temperatur gehalten und so ihre Körpertemperatur künstlich gesteigert wurde [54].

Bei schweren Erkrankungen ist die Studienlage nicht ganz so deutlich. Bei einer Sepsis sind ca. 90 % der Patienten febril. In mehreren klinischen Studien war die Überlebensrate bei febrilen im Vergleich zu afebrilen Patienten in unterschiedlichem Ausmaß erhöht; andere Studien konnten jedoch keine Überlebensunterschiede feststellen [54; 57]. Bei Vergleich der verschiedenen Studien durch *Hasday et al.* zeigte sich eine Reduktion der Mortalität bei febrilen Patienten umso deutlicher, je weniger gravierend die jeweilige Erkrankung war. Außerdem scheint eine Obergrenze der optimalen Temperatur zu bestehen, die durch die Schwere der Krankheit bedingt sein könnte [54].

Da die meisten Pathogene, wie auch *A. fumigatus*, hohe Temperaturen problemlos tolerieren [10], scheint der positive Einfluss der Hyperthermie das Immunsystem des Wirtes zu betreffen. Im Zuge der Analyse ursächlicher Mechanismen haben zahlreiche *in vitro* Studien die Effekte erhöhter Temperaturen auf verschiedene Immunzellen untersucht. In experimentellen Studien werden fieberähnliche Temperaturen von

1.4 Zielsetzung der Arbeit

DCs spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr des Menschen gegen den Pilz *A. fumigatus*, der den häufigsten Erreger der IA darstellt. Mehrere Studien haben bereits die Interaktion von DCs mit *A. fumigatus* untersucht, allerdings wurden physiologische Aspekte wie eine erhöhte Körpertemperatur bisher nicht in Betracht gezogen. Fieber ist jedoch das führende und häufig das einzige klinische Symptom einer IA. In vielen klinischen Studien zeigte sich Fieber für den Krankheitsverlauf bei Infektionen protektiv. Der Einfluss von Hyperthermie auf Immunzellen wird aktuell in zahlreichen *in vitro* Studien im Rahmen von Infektionen, aber auch als Adjuvans zur Immuntherapie bei Tumorerkrankungen intensiv untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen fieberähnlicher Temperaturen auf die Funktionen des Immunsystems in der *A. fumigatus*-Abwehr genau zu analysieren. Hierzu wurde der *in vitro* Einfluss von Hyperthermie (40 °C) auf die Interaktion von DCs mit *A. fumigatus* untersucht.

Die durchgeführten Versuche im Rahmen dieser Arbeit sind in Abbildung 6 zusammenfassend dargestellt. Um die Toleranz der DCs gegenüber den erhöhten Inkubationstemperaturen zu sichern, wurde zunächst die Viabilität der DCs nach 24 h Stimulation mit *A. fumigatus* oder Zymosan bei 37 °C und 40 °C bestimmt. Anschließend wurden die Expression und Sekretion verschiedener Zytokine durch DCs nach *A. fumigatus*-Stimulation unter dem Einfluss von bis zu 12 h Hyperthermie genau charakterisiert. Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde die Antigenaufnahme (*A. fumigatus*-Konidien und Dextran) durch unreife DCs nach kurzzeitigem (1 h) oder längerfristigem (24 h) Hyperthermieeinfluss bestimmt. Außerdem wurde eine detaillierte Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmarker nach 24 h Stimulation von DCs unter Hyperthermie durchgeführt. Diese Arbeit bietet somit eine differenzierte Analyse des Einflusses von Hyperthermie auf entscheidende DC Funktionen in der Immunantwort gegenüber *A. fumigatus*.

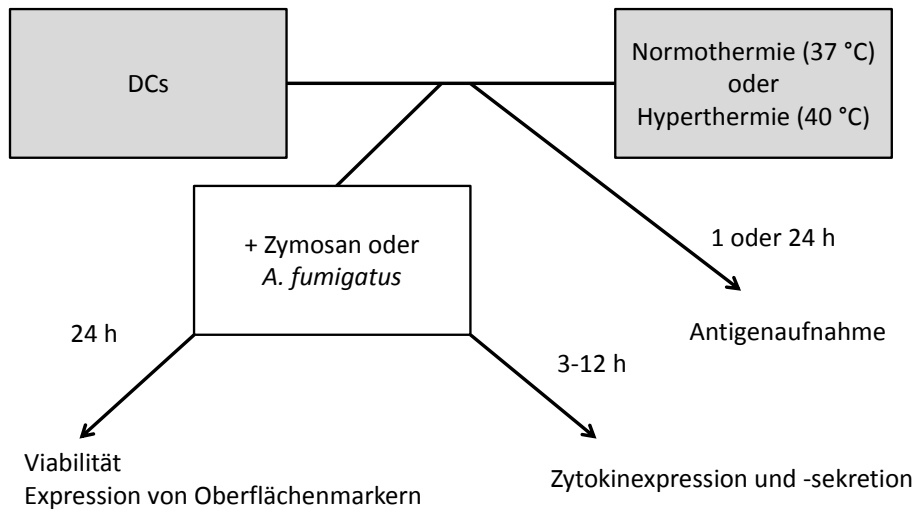


Abbildung 6: Studiendesign der Arbeit

Inkubation von DCs bei Normo- und Hyperthermie über die angegebenen Zeiträume. Ohne weitere Stimulation zur Analyse der Antigenaufnahme, unter Stimulation mit Zymosan oder *A. fumigatus* zur Bestimmung von Viabilität, Zytokinexpression und -sekretion und Expression von Oberflächenmarkern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Es folgt eine Auflistung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Reagenzien, Kits, Primer, Zellen und Software.

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
BD FACSCalibur	BD Biosciences
Brutschrank Heraeus® Function Line	Thermo Fisher Scientific
CO ₂ -Inkubator HERAcCell® 240	Thermo Fisher Scientific
DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR	Biosan
Gefrierschränke -20 °C/-80 °C	Liebherr/Heraeus
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors HT
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Magnethalter QuadroMACS Seperator, MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Mastercycler® ep	Eppendorf
Mikroskope Eclipse 50i und TS100	Nikon
Pipetten Eppendorf Reference® 10/100/1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Sicherheitswerkbank HERAsafe® KS 18	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab
StepOnePlus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
Tischzentrifuge Microcentrifuge 5415R	Eppendorf
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.
Wasserbad Memmert WB7	Memmert
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S und 3S-R	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1000 µl XL graduated Filter Tip	StarLab
96W. Multiply Fast PCR-Platte	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 20 µl und 100 µl	Sarstedt
CELLSTAR® Centrifuge Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One
CELLSTAR® Serologische Pipetten 2/10/25 ml	Greiner Bio-One
CELLSTAR® Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One
FACS-Röhrchen Falcon Round-Bottom Tubes, 5 ml, 12 x 75 mm mit und ohne Deckel	BD Biosciences
Klebefolie, optisch klar, 96 Well Format	Sarstedt
Filtrationssäule MACS LS Column	Miltenyi Biotec
Pasteurpipetten, einzeln steril verpackt	Hartenstein
PCR single Cap 8er – Soft Strips 0,2 ml	Biozym Scientific
Pipettenspitzen für 10 µl Pipette ohne Fiter	Sarstedt
Pipettenspitzen für 100 µl, 1000 µl Pipette ohne Fiter	StarLab
Safe-Lock Tubes 1,5/2 ml	Sarstedt
Zellkulturplatten 6/12/24/96 Well	Corning Inc. LifeSciences
Zellschaber Cell Scraper	SPL Life Sciences

2.1.3 Reagenzien, Medien und Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll (Polysucrose, 1,077 g/ml)	Biochrom AG
Ethanol 100%	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M	Sigma-Aldrich
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
GM-CSF (Leukine sargramostim)250 µg/ml HBSS	Bayer HealthCare Pharmaceuticals

Hanks´Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich
IL4 10 µg/ml HBSS	Miltenyi Biotec
Refobacin® (Gentamicinsulfat 80 mg/ml)	Merck
RNAprotect Cell Reagent	QIAGEN
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Life Technologies
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich
Zymosan 1 mg/ml HBSS	InvivoGen

Bezeichnung	Einzelkomponenten
Medium	500 ml 1640 RPMI Medium, 55 ml FBS (10 %), 120 µg/ml Refobacin®
Puffer	500 ml HBSS, 5 ml FBS, 2 mM EDTA

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
Human Cytokine 10-Plex Panel	Life Technologies
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad
QIAshredder Kit	QIAGEN
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN

2.1.5 FACS-Antikörper und Beads

Bezeichnung	Konjugation	Hersteller	Eingesetztes Volumen/2x10 ⁵ DCs
anti-CCR7 IgG1	APC	Miltenyi Biotec	5 µl
anti-CD14 IgG2a	FITC	BD Biosciences	2 µl
anti-CD1a IgG2a	FITC	BD Biosciences	2 µl
anti-CD25 IgG1	FITC	BD Biosciences	2 µl
anti-CD40 IgG1	PE	Beckman-Coulter	2 µl
anti-CD80 IgG1	PE	BD Biosciences	2 µl

anti-CD83 IgG1	PE	BD Biosciences	6 µl
anti-CD86 IgG1	PE	BD Biosciences	4 µl
anti-Dectin-1 IgG2b	PE	R&D Systems	2,5 µl
anti-HLA1 IgG1	PE	BD Biosciences	2 µl
anti-HLA-DR IgG2a	PE	BD Bioscience	2 µl
anti-ICAM1 IgG1	FITC	R&D Systems	2 µl
CD14	MicroBeads	Miltenyi Biotec	150 µl pro 2,5x10 ⁸ PBMCs
Dextran Conjugates	FITC	Invitrogen	Siehe Absatz 2.2.7
Isotypkontrolle IgG1	PE, FITC, APC	BD Biosciences	2 µl
Isotypkontrolle IgG2a	FITC	BD Biosciences	2 µl
Isotypkontrolle IgG2b	PE	BD Biosciences	2 µl

2.1.6 Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CCL20 fw	GCGCAAATCCAAAACAGACT
CCL20 rv	CAAGTCCAGTGAGGCACAAA
CXCL10 fw	CCACGTGTTGAGATCATTGC
CXCL10 rv	ATTTTGCTCCCCTCTGGTTT
IL10 fw	TTACCTGGAGGAGGTGATGC
IL10 rv	GGCCTTGCTCTTGTTCAC
IL12B fw	AAGGAGGCGAGGTTCTAAGC
IL12B rv	GCAGGTGAAACGTCCAGAAT
IL1B fw	GGACAAGCTGAGGAAGATGC
IL1B rv	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA
IL6 fw	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA
IL6 rv	TTTACCAGGCAAGTCTCCT
IL8 fw	AAGAAACCACCGGAAGGAAC
IL8 rv	ACTCCTTGCAAACACTGCAC
TNF fw	TGCTTGTTCTCAGCCTCTT
TNF rv	TGGGCTACAGGCTTGCTACT

Hersteller: Sigma-Aldrich; Software: Primer 3

2.1.7 Zellen und Stämme

Mononukleäre Zellen („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMCs) wurden aus dem Blut anonymisierter Spender, das in „Leucocyte reduction chambers“ (LRCs) vorlag, gewonnen.

Es wurde der *A. fumigatus*-Stamm „American Type Culture Collection“ (ATCC) 46645 eingesetzt. Zusätzlich wurde ein *A. fumigatus*-Stamm verwendet, der ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Dieser wurde von Sven Krappmann, Universitätsklinikum Erlangen, zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Software

Bezeichnung	Hersteller
FlowJo	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
LinRegPCR	[63]
NanoDrop 3.1.0	PeqLab
Primer3web Version 4.0.0	[64]
StepOne Software	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Modellsystem monozytäre DCs

Als Modellsystem können DCs aus Monozyten *in vitro* generiert werden [20]. Diese sogenannten „monocyte-derived dendritic cells“ (moDCs) zeigen klassisch für DCs keine Expression des Oberflächenmarkers CD14. Dafür exprimieren sie den Oberflächenmarker CD1a, welcher auf natürlichen DCs vor allem auf Langerhanszellen vorkommt [65] und sich außerdem *in vitro* als DC-Marker etabliert hat [20].

2.2.1.1 Isolierung von Monozyten

Zur Generierung von DCs mussten zunächst PBMCs und daraus Monozyten aus dem Blut gesunder Spender aus LRCs isoliert werden. LRCs werden vom Institut für klinische

Hämotherapie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg bei der Herstellung von Blutprodukten verwendet, um Leukozyten aus dem Blut zu filtern und enthalten somit einen hohen Anteil an Leukozyten.

Der Inhalt der LRC wurde mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt und je 25 ml vorsichtig auf 20 ml Biocoll in einem 50 ml Tube gegeben. Bei Zentrifugation (20 min, 800 x g, niedrigste Beschleunigung und Bremse) sammelten sich durch den Dichtegradienten die PBMCs in der Interphase des Gradientenröhrchens, während sich Erythro-, Thrombo- und polymorphkernige Leukozyten am Boden des Gefäßes fanden. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (15 min, 120 x g, ohne Beschleunigung, ohne Bremse). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 50 ml frischem Puffer resuspendiert und der Waschschrift wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 50 ml kaltem Puffer (4 °C) resuspendiert und die Konzentration der Zellen mikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden tote Zellen mit Trypanblau angefärbt, um diese von der Zählung ausschließen zu können.

Zur Selektion der Monozyten aus den PBMCs wurden anti-CD14-Antikörper, die selektiv an das von Monozyten exprimierte CD14 binden, verwendet. Diese Antikörper sind mit MicroBeads konjugiert. Bei Durchfluss der Suspension durch eine Säule (LS-Filtrationssäule) in einem magnetischen Feld bleiben die MicroBeads mit ihren antikörpergebundenen Zellen in den Säulen hängen und können so von unmarkierten Zellen getrennt werden (Positivselektion).

Pro Isolationssäule wurden $2,5 \times 10^8$ PBMCs in einem 50 ml Tube in 850 µl kaltem Puffer suspendiert und mit 150 µl der anti-CD14-MicroBeads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Zum Herauswaschen nicht gebundener Antikörper wurde das Tube mit Puffer auf 20 ml aufgefüllt, zentrifugiert (10 min, 300 x g), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 2000 µl Puffer resuspendiert. Die LS-Filtrationssäulen in einer magnetischen Halterung (MACS Separator) wurden zunächst mit 3 ml Puffer gespült, danach wurden die 2 ml Zellsuspension (mit antikörpergebundenen MicroBeads) auf die Säulen gegeben und diese sobald die Säule leer war 3 Mal mit je 3 ml Puffer gespült, um nicht magnetisch gebundene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen aus dem

Magnethalter genommen, die nun freigegebenen MicroBeads mit ihren gebundenen Zellen mit 5 ml Puffer unter Druck in ein neues 15 ml Tube gespült und mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.1.2 Generierungsprozess von moDCs

Die CD14-positiven Monozyten wurden zentrifugiert (10 min, 300 x g), zunächst in 10 ml Medium resuspendiert, gezählt und dann durch Zugabe von Medium auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/3ml Medium eingestellt. Um die Monozyten zur Entwicklung in DCs zu stimulieren, wurden 10 μg IL4/ml und 100 μg GM-CSF/ml zugegeben und die Zellen anschließend auf 6-Well-Platten verteilt (3 ml Zellsuspension/Well).

Es folgte eine Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 Tage. An Tag 2 und 4 wurde aus jedem Well 1 ml Medium entnommen, gesammelt zentrifugiert (10 min, 300 x g) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium/Well sowie 30 μg IL4/Well und 300 μg GM-CSF/Well (gleiche Menge wie an Tag 0) resuspendiert und 1 ml in jedes Wells gegeben. Dadurch wurden die verbrauchten Zytokine ersetzt.

An Tag 5 wurden die DCs mittels eines Zellschabers vom Wellboden gelöst, der Inhalt in 50 ml Tubes gegeben und die Wells anschließend mit kaltem HBSS nachgespült. Nach Zentrifugation (10 min, 300 x g) und Resuspension des Pellets in 50 ml Medium wurden die Zellen gezählt und für die weiteren Versuche durch Zugabe von Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.2 Arbeiten mit *A. fumigatus*

Der *A. fumigatus* Stamm ATCC46645 und der GFP-exprimierende *A. fumigatus*-Stamm wurden vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg aufbewahrt, Konidien lagen in einer wässrigen Stocklösung bei 4 °C vor.

Um Konidien zu Keimschläuchen heranwachsen zu lassen wurden 1×10^8 Konidien in 30 ml Medium gegeben und über Nacht im Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert; am Folgetag wurde die Inkubation bis zum Auskeimen bei 37 °C fortgesetzt. Die Morphologie wurde mikroskopisch beurteilt, sobald die Konidien zu kurzen

Keimschläuchen ausgekeimt waren, wurden sie abzentrifugiert (5000 x g) und in 1 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie direkt für Versuche eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

Für die 24 h Kokulturen wurden inaktivierte Keimschläuche verwendet. Dazu wurden die kurzen Keimschläuche nach der Zentrifugation mit 20 ml 100 % Ethanol für 30 min inaktiviert. Anschließend wurden sie 3 Mal mit Medium gewaschen (10 min, 300 x g), in 1 ml Medium resuspendiert (Konzentration 1×10^8 Keimschläuche/ml) und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Stimulation von DCs mit Zymosan oder *A. fumigatus*

Zur Analyse von Viabilität und Oberflächenmarkerexpression wurden DCs mit inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen oder Zymosan stimuliert. Nach der Zellernte wurde die DC-Suspension (Konzentration 1×10^6 /ml in Medium) mit 10 µg IL4/ml und 100 µg GM-CSF/ml versetzt und auf 12 Well-Platten verteilt (1,5 ml/Well). DCs wurden mit 10 µg/ml Zymosan (Konzentration Zymosanstock 1 mg/ml, also 15 µl) bzw. inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 1 stimuliert (Stock 1×10^8 Keimschläuche/ml, also 15 µl). MOI 1 bedeutet, dass pro DC eine infektiöse Einheit (Keimschlauch) zugegeben wurde. Die Volumenzunahme wurde in den unstimulierten Kontrollproben durch die Zugabe der entsprechenden Menge Medium (15 µl) ausgeglichen. Teilweise wurden 24-Well-Platten verwendet, in die dann nur 1 ml Zellsuspension sowie Zytokine und Stimulanzen adaptiert an das niedrigere Volumen gegeben wurden.

Die Inkubation mit oder ohne Stimulation erfolgte über 24 h bei 37 °C oder 40 °C (bei den Versuchen zur Oberflächenmarkerexpression und 24 h-Viabilität, Inkubationstemperaturen und -zeiten bei der Zeitreihe zur Viabilität unter Absatz 2.2.5). Anschließend wurden die Zellen mit Pipettenspitzen vom Wellboden gelöst, die Wells mit 500 µl Puffer gespült, der gesamte Inhalt in 2 ml Tubes gegeben, zentrifugiert (4 min, 400 x g) und das Pellet je nach folgendem Versuch im gewünschten Puffer-volumen resuspendiert.

Zur Analyse der Zytokininduktion wurde die Inkubation mit aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1) und Zymosan (10 µg/ml) über einen Zeitverlauf von 3 h, 6 h, 9 h und 12 h durchgeführt. Für die 3 h und 6 h Ansätze wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium verwendet, für die 9 h und 12 h Ansätze aufgrund der längeren Inkubationsdauer $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml Medium. Den Ansätzen wurden – da ja Zytokinkonzentrationen bestimmt wurden – kein IL4 oder GM-CSF mehr zugesetzt. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurden die Überstände in 1,5 ml oder 2 ml Tubes überführt und zentrifugiert (6 min, 400 x g, 4 °C). Die Wells wurden mit 400 µl bzw. 600 µl RNAprotect-Lösung befüllt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände aus den Tubes abpipettiert und für die Sekretionsanalyse in neue 1,5 ml oder 2 ml Tubes gegeben. Das Pellet für die Genexpressionsanalyse wurde mit dem RNAprotect aus dem jeweiligen Well resuspendiert. Überstände und Zellen wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer können Zellen durch Anregung mit Laserstrahlen analysiert werden. Es kann sowohl die Fluoreszenz als auch das Streulicht beurteilt werden. Das gestreute Licht lässt Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle zu. Das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter, FSC) korreliert mit dem Volumen der Zelle, das Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC) ist von ihrer Granularität abhängig. Durch Darstellung eines Dotplots von FSC und SSC können somit verschiedene Zellpopulationen – beispielsweise DCs von Zelltrümmern oder anderen Zelltypen – unterschieden werden. Mittels mehrerer Filter kann Fluoreszenzlicht verschiedener Wellenlängen in sogenannten Kanälen gemessen werden [66]. Den schematischen Aufbau des verwendeten Durchflusszytometers BD FACSCalibur zeigt Abbildung 7. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Software „FlowJo“ (Tree Star Inc.).

Zum Messung der Expression von Oberflächenmarkern werden Antikörper verwendet, die an Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert sind und von verschiedenen Molekülen der Zellen gebunden werden. Die Farbstoffe haben unterschiedliche Fluoreszenzspektren und können somit im Durchflusszytometer in verschiedenen Kanälen gemessen werden. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit Phycoerythrin (PE),

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Allophycocyanin (APC) eingesetzt. Außerdem wurde der sogenannte Totfarbstoff Proponiumiodid (PI), der mit Nukleinsäuren interkaliert, verwendet. Im Versuch zur Antigenaufnahme durch DCs wurden GFP-exprimierende Konidien von *A. fumigatus* eingesetzt, bei denen die Fluoreszenz des Proteins ebenfalls durchflusszytometrisch gemessen werden kann.

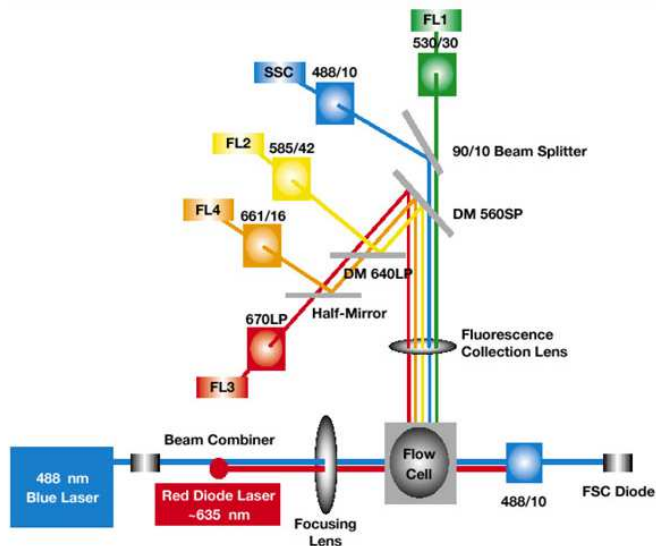


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des BD FACSCalibur

Dargestellt ist der Aufbau des BD FACSCalibur: Nach Anregung der Zellen mit zwei verschiedenen Lasern können Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) sowie über verschiedene Filter Fluoreszenzintensitäten in vier verschiedenen Kanälen bestimmt werden.[67]

Da die Fluoreszenzfarbstoffe teilweise ein breites Spektrum haben und auch in andere Kanäle strahlen, musste bei Doppelfärbungen (Viabilitätsanalyse, siehe Absatz 2.2.5) eine Kompensation durchgeführt werden. Dazu wurden Einzelfärbungen mit den jeweiligen Farbstoffen durchgeführt und die Einstellungen am Durchflusszytometer so angepasst, dass ein Fluoreszenzsignal nur im gewünschten Kanal messbar war.

2.2.5 Analyse der Viabilität

Die Viabilität der DCs wurde mit dem FITC-AnnexinV Apoptosis Detection Kit I bestimmt. Der Assay beruht auf der Translokation des Membranphospholipids Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zellmembran in einem frühen Stadium der Apoptose. Das Protein AnnexinV kann dadurch an das externalisierte Phosphatidylserin binden und somit bereits frühe Apoptosestadien detektieren. Zum

durchflusszytometrischen Nachweis ist AnnexinV mit FITC konjugiert. PI ist ein fluoreszierender Totfarbstoff, der durch die perforierte Zellmembran toter Zellen in das Zellinnere eindringen kann und dort mit Nukleinsäuren interkaliert. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob eine PI-positive Zelle durch Apoptose oder Nekrose zugrunde ging. Gesunde Zellen sind nicht PI-permeabel [68].

Zur Viabilitätsanalyse wurden DCs mit Zymosan und inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen stimuliert (Beschreibung der Kokultur in Absatz 2.2.3). Zunächst wurde eine Zeitreihe zur Viabilität durchgeführt, für die DCs über 1 h, 2 h, 4 h und 6 h bei 37 °C und 40 °C und über 17 h und 23 h bei 37 °C und 39 °C mit Zymosan stimuliert wurden. Anschließend wurde die Viabilität nach 24-stündiger Stimulation von DCs sowohl mit Zymosan als auch mit inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen bei 37 °C und 40 °C bestimmt. Nach Ernte der Kokulturen (siehe Absatz 2.2.3) wurden die DC-Pellets in 500 µl Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (6 min, 400 x g) wurden sie in 600 µl Annexinpuffer resuspendiert und noch einmal zentrifugiert (6 min, 400 x g). Jedes Pellet wurde dann in 100 µl Annexinpuffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von je 5 µl AnnexinV und PI wurden die Röhrchen für 15 min im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden in jedes Tube 200 µl Annexinpuffer gegeben, innerhalb 1 h erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Ein zusätzliches Well mit unstimulierten DCs diente für die Kontrollprobe (ungefärbt) sowie für die Einzelfärbungen mit AnnexinV und PI (zur Kompensationseinstellung am Durchflusszytometer, siehe Absatz 272.2.4).

Zur alleinigen Bestimmung des Anteils toter Zellen, wie sie parallel zu den weiteren Versuchen durchgeführt wurde, wurden die Proben nur mit PI gefärbt. Alle übrigen Schritte wurden analog durchgeführt.

Zellen, die sowohl für AnnexinV als auch für PI negativ sind, sind lebende Zellen mit intakter Zellmembran. Zellen in einem Frühstadium der Apoptose sind AnnexinV-positiv, jedoch noch PI-negativ, da letzteres noch nicht in die Zellen eindringen kann. AnnexinV- und PI-positive Zellen befinden sich in einem späten Stadium der Apoptose oder sind bereits tot. Abbildung 8 zeigt beispielhaft einen Dichteplot eines AnnexinV/PI-Assays, in dem die AnnexinV/PI-positiven und -negativen Bereiche als

Quadranten dargestellt sind. Bei einer reinen PI-Färbung, werden allerdings beide obere Quadranten in Abbildung 8 erfasst, es kann nicht mehr zwischen den einzelnen Feldern unterschieden werden. Somit werden im Gegensatz zum AnnexinV/PI-Assay auch rein PI-positive und AnnexinV-negative Signale als tote Zellen erfasst.

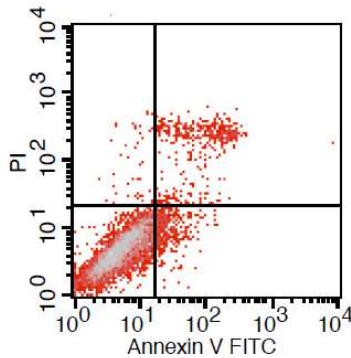


Abbildung 8. Viabilitätsprüfung mittels AnnexinV/PI-Färbung

AnnexinV-FITC/PI-Dichteplot von DCs eines beispielhaften Spenders. Lebende Zellen (linker unterer Quadrant, AnnexinV- und PI-negativ), frühapoptotische Zellen (rechter unterer Quadrant, AnnexinV-positiv und PI-negativ), spätapoptotische bzw. tote Zellen (rechter oberer Quadrant, AnnexinV- und PI-positiv).

2.2.6 Analyse der Zytokinexpression und -sekretion

2.2.6.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA zur Analyse der Zytokinexpression erfolgte mit den Kits QIA-shredder und RNeasy MiniKit. Die in RNAProtect gelagerten Zellen wurden zunächst zentrifugiert (5 min, 5000 x g) und die Überstände abgenommen, um das RNAProtect zu entfernen, welches die RNA in den eingefrorenen Proben stabil erhielt. Das Pellet wurde mit 350 µl RLT-Puffer gut homogenisiert, die Zellsuspension auf QIAshredder Säulen in 2 ml Tubes gegeben, diese erneut zentrifugiert (2 min, maximale Geschwindigkeit) und die Säulen anschließend verworfen. Dieser Schritt diente neben der Zugabe von RNAProtect dazu, die Zellen zu lysieren. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70 % Ethanol vermischt und auf RNeasy MinElute Spin Säulen in 2 ml Tubes gegeben. Diese Säulen binden RNA, durch Spülen mit verschiedenen Puffern werden sonstige Bestandteile herausgewaschen. Die Säulen wurden zunächst zentrifugiert (15 s, 8000 x g), anschließend wurden 700 µl RW-1 Puffer und in der Folge zweimal 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Nach jeder Pufferzugabe wurde zentrifugiert

(15 s, 8000 x g), nach der zweiten RPE-Pufferzugabe für 2 min. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Säule ohne erneute Pufferzugabe noch einmal für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um letzte Pufferreste zu entfernen. Die nun gereinigte RNA wurde durch Zugabe von 34 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (1 min, 8000 x g) eluiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer bestimmt (Absorptionsmaximum bei 260 nm) und die RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.2 cDNA-Umschrieb

Der Umschrieb von RNA in den ersten Strang (1st strand) copy DNA (cDNA) wurde mittels einer reversen Transkriptase mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit durchgeführt. Die Enzymgruppe reverser Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) hat RNA als Matrize und kann diese in komplementäre DNA umschreiben, wobei als Startstelle Primer benötigt werden. Im Primermix sind für den RNA-Umschrieb universelle („random“) Primer enthalten, die auf jeder RNA vorhanden sind, sodass das vollständige Molekül kopiert wird. Die Substrate für das Enzym – Nukleotide (dNTPs) – sind ebenfalls im Kit enthalten. Bei der Reaktion erfolgt zunächst die Anlagerung der Primer an die RNA („Annealing“), der Umschrieb wird bei der optimalen Arbeitstemperatur des Enzyms („Transcription“) durchgeführt. Anschließend folgt eine kurze Phase mit hoher Temperatur („Denaturation“) durch die die reverse Transkriptase inaktiviert wird und das Umschreiben stoppt.

Für die cDNA Synthese wurden jeweils 500 ng RNA eingesetzt (Endkonzentration cDNA 25 ng/µl), der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und 2 µl gDNA Wipeout Puffer zugegeben. Durch Inkubation im Eppendorfcycler (5 min bei 42 °C) fand der Verdau von eventuell noch vorhandener genomischer DNA (gDNA) statt. Dies ist wichtig, da gDNA bei der im Anschluss durchgeführten Real-Time „polymerase chain reaction“ (PCR) zu Probleme führen könnte. Die gDNA könnte bei der PCR durch DNA-Polymerasen (siehe unten) nämlich ebenso wie die cDNA kopiert werden und somit Nebenprodukte bilden.

Pro Ansatz wurden anschließend 1 µl Mastermix, 4 µl Puffer und 1 µl der reversen Transkriptase zugegeben. Die Transkription erfolgte bei 42 °C für 25 min, die Denaturierung bei 95 °C für 3 min. Als Negativkontrolle diente dabei ein Tube, das ausschließlich Wasser statt RNA enthielt. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt. Durch die reverse Transkription von RNA in 1st-strand cDNA lagen in jedem Ansatz nun so viele Kopien cDNA vor, wie auch RNA des jeweiligen Gens in der ursprünglichen Probe vorhanden war.

2.2.6.3 Real-Time PCR – Genexpression

Mit einer Real-Time PCR kann als Erweiterung der klassischen PCR eine relative Bestimmung einer DNA-Menge im Verhältnis zu einer ebenfalls analysierten Kontrolle erfolgen. Bei einer PCR werden durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase von einer DNA-Matrize Genabschnitte, die durch zwei zugegebene spezifische Primer begrenzt sind (forward und reverse Primer), aus ebenfalls zugegebenen Nukleotiden synthetisiert. Wie bei der reversen Transkription erfolgt die zunächst die Anlagerung der Primer („Annealing“), anschließend das Kopieren der DNA-Matrize durch die Polymerase („Transcription“). In der anschließenden „Denaturation“ werden durch die hohe Temperatur die DNA-Doppelstrangbindungen aufgelöst, so dass wieder DNA-Einzelstränge für einen möglichen erneuten Kopierzyklus bereitstehen. Bei der Real-Time PCR werden mehrere PCR-Zyklen nacheinander durchgeführt und nach jedem Zyklus die relative Menge des PCR-Produkts mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Aufgrund der hohen Denaturierungstemperatur muss ein hitzestabiles Enzym (Taq-Polymerase) verwendet werden, das im nächsten Kopierzyklus weiterhin aktiv sein kann [69]. Um eine Fluoreszenz des PCR Produkts zu ermöglichen gibt es verschiedene Möglichkeiten, in dieser Arbeit wurde der iTaq Universal SYBR® Green Supermix verwendet. Der Farbstoff SYBR-Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA und emittiert im Komplex grünes Licht bei 521 nm. Andere Methoden des Produktnachweises sind beispielsweise fluoreszenzmarkierte Sonden, die an den amplifizierten Genabschnitt binden. Es werden 35-40 aufeinanderfolgende PCR-Zyklen mit jeweils anschließender Fluoreszenzmessung durchgeführt. Die sich ergebende Kurve (Abbildung 9 links) zeigt einen Fluoreszenzanstieg, der zeitweise nahezu exponentiell

ist. In diesem Bereich wird ein Fluoreszenzwert als Crossing-Point/Cycle Threshold festgelegt (Ct-Wert, i. d. R. wurde dieser im Rahmen diese Arbeit manuell auf 0,1 gesetzt) und in jedem Ansatz der Zyklus betrachtet, in dem der Ct-Wert erreicht wird. Je höher die Konzentration der jeweiligen cDNA im ursprünglichen Ansatz ist (umso stärker das jeweilige Gen also exprimiert wird), umso früher wird der Ct-Wert erreicht. Abschließend wird die Schmelzkurve des PCR Produkts bestimmt (Abbildung 9 rechts), dabei zeigt das Vorliegen eines einzelnen Peaks pro Gen die Qualität der PCR (keine Nebenprodukte mit anderen Schmelztemperaturen) an.

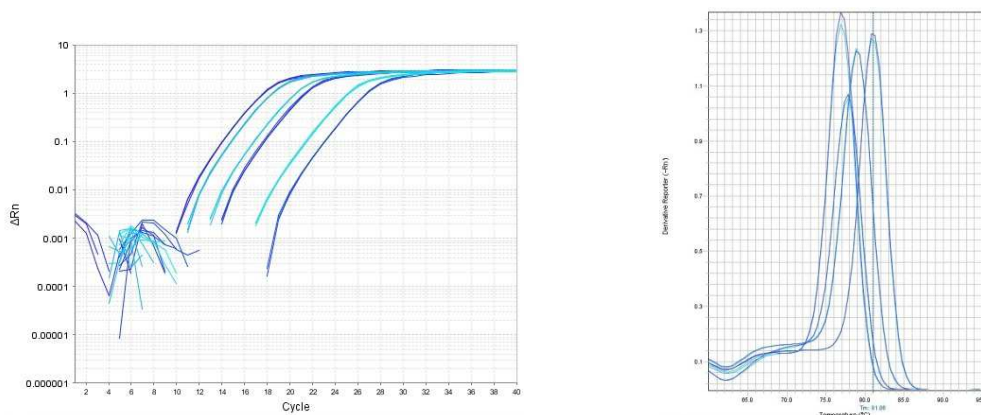


Abbildung 9: Graphen zur Auswertung der quantitativen Real-Time PCR

Links: Amplifikationsplots von 6 Proben. Der Ct-Wert (0,1) wurde in unterschiedlichen PCR-Zyklen erreicht. Je früher er erreicht wurde, umso mehr cDNA war in der Probe enthalten.

Rechts: Schmelzkurve von Proben beim Test von 4 verschiedenen Primerpaaren (Gelelektrophorese in Abbildung 10 rechts). Die Proben des jeweiligen Gens schmelzen bei der gleichen Temperatur, es wurden somit keine Nebenprodukte gebildet.

Die Genexpression wurde relativ als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle berechnet. In jedem Ansatz wurden die analysierten Gene außerdem auf ein Referenzgen normiert. Dadurch werden leichte Variationen in der eingesetzten Menge cDNA ausgeglichen. Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit ALAS1 verwendet, ein housekeeping-Gen das unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert wird.

Um die gewünschten Genabschnitte analysieren zu können mussten zunächst mithilfe der Software Primer3web [64] geeignete Primer für das jeweilige Transkript entworfen werden. Die Länge des Produkts sollte jeweils 70-150 Nukleotide betragen. Mit den generierten Primern wurde zunächst eine InSilico PCR durchgeführt, die sicherstellt,

dass nur cDNA erfolgreich umgeschrieben wird. Die InSilico PCR testet, ob die Primer auf gDNA wie gewünscht ein Intron überspannen (intron-spanning) oder ob beide Primer auf dem gleichen Exon liegen. Das Intron wäre nämlich auf in der Probe noch vorhandener gDNA erhalten und das Genprodukt somit so lang, dass es in einem PCR-Zyklus nicht vollständig umgeschrieben werden könnte beziehungsweise von dem gewünschten Produkt unterscheidbar wäre. Intron-spanning-Primer sind also neben dem DNase-Verdau ein weiterer Schutz gegen wird also das unerwünschte Kopieren von gDNA.

Die Primerpaare wurden vor dem endgültigen Einsatz in Versuchen auf mögliche Nebenprodukte getestet. Die Schmelzkurve zeigte je Paar nur einen Peak (beispielhaft Abbildung 9 rechts), gelelektrophoretisch zeigte sich jeweils nur eine Bande (Abbildung 10). Die Primer waren also selektiv, es wurden keine Nebenprodukte gebildet.

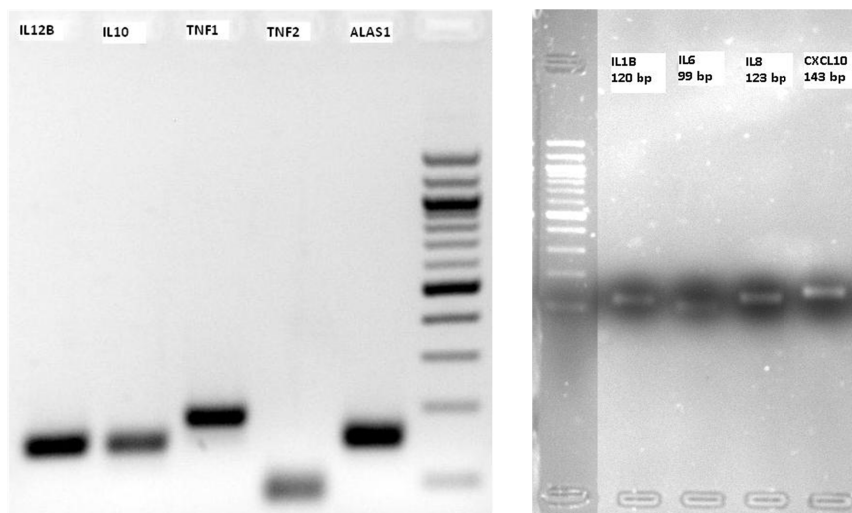


Abbildung 10: Gelelektrophorese der Primerprodukte zur Überprüfung der Primerselektivität

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, die mit den neu entworfenen Primern generiert wurden. Da sich für jedes Primerpaar nur eine Bande und somit ein Produkt darstellte, war die Selektivität der Primer gegeben.

Für die Real-Time-PCR wurde jedes Zytokin im Dreifachansatz analysiert. Es wurden 10 ng cDNA (entsprach 4 µl einer 1:10 Verdünnung der hergestellten cDNA mit 25 ng/µl) eingesetzt. Dazu wurden 10 µl Mastermix iTAQ SYBR, je 1 µl des forward und reverse Primers (Endkonzentration 500 nM) sowie 4 µl Wasser gegeben. Der Ansatz in

96-Well-Platten wurde mit Folie abgeklebt, kurz an zentrifugiert und im StepOnePlus-Real-Time PCR-System nach folgendem Programm analysiert:

- Primäre Polymeraseaktivierung und DNA-Denaturierung: 95 °C, 20–30 s
 - Denaturierung: 95 °C, 15 s
 - Annealing, Transkription und Auslesen der Platte: 60 °C, 60 s
 - Schmelzkurvenanalyse: 65-95 °C, Temperaturerhöhung um 0,5 °C alle 2–5 s
- } 35–40 Zyklen

Aus den Amplifikationsdaten wurde mittels LinRegPCR-Software [63] die Effizienz der PCR im jeweiligen Ansatz berechnet. Die relative Expression des Gens X bei der Bedingung n bezogen auf die Kontrolle (ctrl) berechnete sich nach folgender Formel [70]:

$$Relative\ Expression\ X(n) = \frac{Eff^{Ct\ X(ctrl) - Ct\ X(n)}}{Eff^{Ct\ ALAS(ctrl) - Ct\ ALAS(n)}}$$

X = jeweiliges Gen

n = jeweilige Bedingung

Eff = Effizienz der PCR (berechnet aus Amplifikationsdaten mittels LinRegPCR-Software [63])

Ct = Ct-Wert

ctrl = Kontrolle mit der Bedingung: 37 °C unstimulierte Probe

ALAS = ALAS1, housekeeping Gen zur Normalisierung der Proben

2.2.6.4 Human Cytokine 10-Plex Panel – Zytokinsekretion

Die Analyse der Zytokinsekretion erfolgte mit dem Human Cytokine 10-Plex Panel. Mit diesem Panel kann die Konzentration von 10 vorgegebenen Zytokinen (IL1B, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12B, TNF α , INF γ und GM-CSF) aus einer einzigen Probe bestimmt werden. Dazu werden zur Probe PolystyrenBeads mit einem jeweils definierten Fluoreszenzspektrum gegeben, die an zytokinspezifische Antikörper gekoppelt sind. Nach Bindung der PolystyrenBeads an die Zytokine werden Detektor-Antikörper zugegeben, die die Zytokine an einer anderen Region binden. Anschließend zugegebenes PE-gekoppeltes Streptavidin bindet an die Detektor-Antikörper, die dadurch ebenfalls über Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden können. Über die Messung der

PE-Fluoreszenz wird durch den Vergleich mit einer Standardkurve die Menge des jeweiligen Zytokins bestimmt. Die 10 verschiedenen Zytokine der Probe werden durch die spezifischen Fluoreszenzspektren der PolystyrenBeads unterschieden [71].

Für die Sekretionsanalyse wurden die Kulturüberstände der Proben, die auch für die RNA-Analyse verwendet wurden, eingesetzt (Generierung der Proben in Absatz 2.2.3). Aus den 3 h-Proben wurde noch keine Zytokinsekretion bestimmt, da nach dieser kurzen Inkubationszeit noch keine wesentliche Sekretion zu erwarten war. Es wurden Proben ohne Stimulation oder nach Stimulation mit aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* über 6 h, 9 h und 12 h bei 37 oder 40 °C untersucht. Die Proben wurden von mir generiert, die Analyse wurde von Frau M. Dragan (Molekulare Onkoimmunologie, Universitätsklinikum Würzburg) nach dem Herstellerprotokoll [71] durchgeführt.

2.2.7 Analyse der Antigenaufnahme

Die Aufnahme von Antigenen durch DCs wurde zunächst mit der Modellsubstanz Dextran, welches von DCs aufgenommen wird und daher zur Analyse der endozytischen Aktivität eingesetzt werden kann [72], untersucht. Zur durchflusszytometrischen Analyse war Dextran an FITC gekoppelt (Dextran Conjugates). Um pilzspezifische Effekte beurteilen zu können wurde anschließend die Aufnahme GFP-exprimierender *A. fumigatus*-Konidien durch DCs ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert.

Pro Ansatz wurden 1×10^5 DCs an Tag 5 der Generierung in 100 µl Medium in FACS-Röhrchen gegeben und für 1 h bei 37 oder 40 °C adaptiert. Dann wurden jedem Tube Dextran oder Konidien zugegeben und jeder Ansatz bei der Temperatur weiter inkubiert, bei der er vorher für 1 h adaptiert hatte (37 oder 40 °C). Die eingesetzten Substratmengen und Inkubationszeiten (Aufnahmedauer) sind in Tabelle 1 dargestellt. Als Negativkontrolle dienten DCs bei Raumtemperatur ohne Substratzugabe und DCs, die mit Dextran/Konidien bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben um die Antigenaufnahme zu stoppen auf Eis gestellt, mit ca. 1 ml kaltem Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (4 min, 300 x g) und erneut in ca. 1 ml Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Nach Resuspension in 200 µl Puffer erfolgte unmittelbar die durchflusszytometrische Analyse.

Tabelle 1: Ansätze der Versuche zur Antigenaufnahme

Bedingung	Dextran	<i>A. fumigatus</i> -Konidien
Fluorochrom	FITC	GFP
Temperatur	37 °C und 40 °C	37 °C und 40 °C
Menge Substrat	0,5 mg/ml, 1 mg/ml	MOI = 3; 5; 10
Aufnahmedauer	0,5 h, 1 h	0,5 h, 1 h
Nach 24 h Vorinkubation bei 37 °C oder 40 °C		
Menge Substrat	0,5 mg/ml	MOI = 3; 10
Aufnahmedauer	0,5 h; 1 h	0,5 h; 1 h

In einer 2. Versuchsreihe wurde je ein Well DCs zunächst bei 37 °C oder 40 °C für 24 h vorinkubiert. Jedes vorinkubierte Well wurde daraufhin halbiert und jeweils eine Hälfte für die Ansätze mit Aufnahme bei 37 °C, die andere Hälfte für die Ansätze mit Aufnahme bei 40 °C verwendet, außerdem wurden die Kontrollen (Raumtemperatur und 4 °C) mitgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem Versuchsablauf ohne Vorinkubation. Der Versuchsablauf inklusive Vorinkubation ist schematisch in Abbildung 11 für die Aufnahme von Konidien dargestellt, die eingesetzten Substratmengen sowie Aufnahmedauern finden sich ebenfalls in Tabelle 1 (unten).

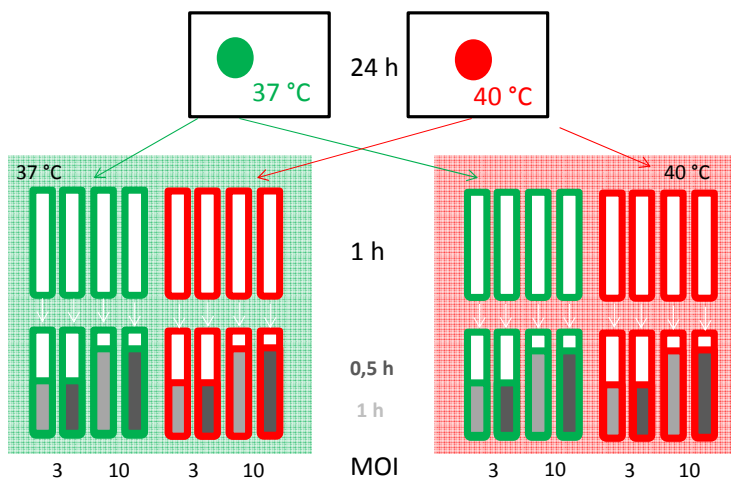


Abbildung 11: Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien nach Vorinkubation von DCs

2 DC-Well, die je für 24 h bei 37 (grün) und 40 °C (rot) vorinkubiert wurden. Jedes Well wurde halbiert. Je 4 Ansätze wurden für 1 h bei 37 (hellgrüner Hintergrund) oder 40 °C (hellroter Hintergrund) inkubiert. Danach wurden Konidien von *A. fumigatus* im MOI 3 (kleine Balken) oder 10 (große Balken) zugegeben und für 0,5 (dunkelgrau) oder 1 h (hellgrau) inkubiert. Außerdem wurden aus jedem vorinkubierten Well die Kontrollansätze mitgeführt (Raumtemperatur und 4 °C, nicht dargestellt).

Abbildung 12 zeigt die Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse. Die DC-Population im Gate (Abbildung 12 A) wurde bezüglich ihrer FITC/GFP-Fluoreszenz im Dichteplot dargestellt. Mithilfe der Negativkontrolle (Abbildung 12 B: 4 °C) wurde die Grenzlinie für FITC/GFP-positive Zellen gesetzt und anschließend in jede Probe der Prozentsatz positiver Zellen bestimmt (Abbildung 12 37 °C: C und 40 °C: D). Der Prozentsatz FITC/GFP-positiver Zellen wurde als Anteil der DCs definiert, die das Antigen erfolgreich aufgenommen hatten und als *Aufnahmerate* bezeichnet. Da häufig ein großer Prozentsatz der Zellen positiv für FITC/GFP und gemessene Unterschiede somit gering waren, wurde zusätzlich die mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der positiven Zellen bestimmt. Diese galt als Maß für das Ausmaß der Antigenaufnahme durch die einzelne Zelle und wurde als *Aufnahmestärke* definiert.

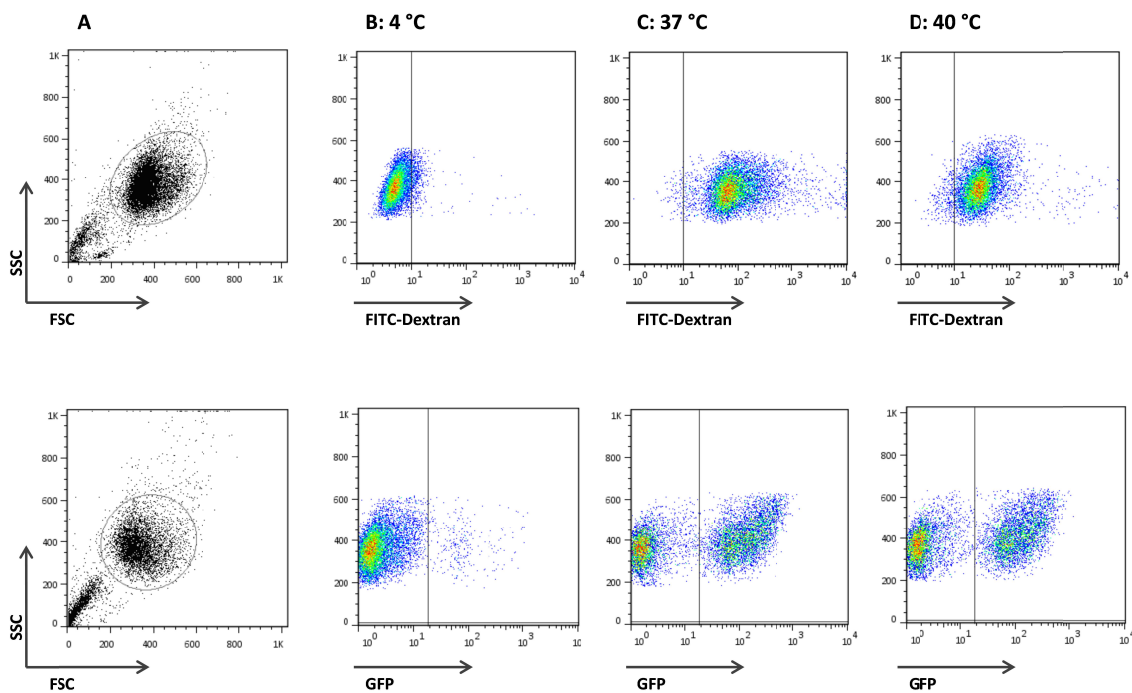


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Dextran und *A. fumigatus*-Konidien

DCs je eines beispielhaften Spenders nach Zugabe von FITC-Dextran (1 mg/ml, *oben*) oder GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien (MOI 10, *unten*) für je 1 h.

FSC/SSC-Dotplot aller Ereignisse (A), das Gate beschreibt die DC-Population. Im Dichteplot keine relevante Aufnahmerate (Prozentsatz FITC/GFP-positiver Zellen) bei Kontroll-DCs bei 4 °C (B), deutliche Aufnahmerate bei DCs bei 37 °C (C) und 40 °C (D).

Mithilfe der Kontroll-DCs (B) wurde die Grenze für die Aufnahmerate gesetzt.

2.2.8 Analyse der Oberflächenmarkerexpression

Zur Analyse der Oberflächenmarkerexpression wurden die DCs nach 24 h Inkubation bei 37 °C oder 40 °C mit oder ohne Stimulation (wie in Absatz 2.2.3 beschrieben) so mit Puffer resuspendiert, dass 100 µl Zellsuspension pro FACS-Röhrchen eingesetzt werden konnten. Es sollten in der Regel ca. 2×10^5 DCs pro FACS-Röhrchen verwendet werden. Ein Ansatz mit $1,5 \times 10^6$ DCs pro Well (aus 12-Well-Platten) wurde also in 750 µl Puffer resuspendiert, ein Ansatz mit 1×10^6 Zellen pro Well (aus 24-Well-Platten) in 500 µl Puffer. Anschließend wurden je 100 µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben und im Dunkeln mit dem jeweiligen Antikörpers gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4 °C wurde zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper 1 ml kalter Puffer auf jedes Tube gegeben, zentrifugiert (10 min, 300 x g) und der Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 2 Mal wiederholt, anschließend wurde das Pellet in 250 µl Puffer resuspendiert und die DCs durchflusszytometrisch analysiert.

Zur Antikörperfärbung wurden zu den 100 µl Zellsuspension jeweils die unter Absatz 2.1.5 angegebene Menge unten genannter Maus-Antikörper gegeben, die gegen Oberflächenmoleküle auf humanen DCs gerichtet und mit FITC, PE oder APC konjugiert waren:

anti-CD1a (FITC)	anti-Dectin1 (PE)	anti-CD25 (FITC)
anti-CD40 (PE)	anti-CD80 (PE)	anti-CD83 (PE)
anti-CD86 (PE)	anti-HLA-1 (PE)	anti-HLA-DR (PE)
anti-ICAM-1 (FITC)	anti-CCR7 (APC)	anti-CD14 (FITC)

Die ebenfalls durchgeführte Isotypenkontrolle diente zum Ausschluss unspezifischer Bindungen über den Fc-Teil des Antikörpers: Die Isoantikörper binden im Fab-Teil nur bei Mäusen vorkommende Epitope, sind jedoch in ihrem Fc-Teil mit dem jeweils für die Oberflächenmarker verwendeten Antikörper identisch. Gäbe es unspezifische Fc-Bindungen würde sich somit auch bei den Isoantikörpern ein Fluoreszenzsignal zeigen. Zu jedem verwendeten Antikörper musste ein Isoantikörper desselben Antikörpertyps untersucht werden (zugehöriger Isoantikörper zum jeweiligen Anti-

körper siehe Tabelle unter Absatz 2.1.5), dies waren anti-IgG1 PE, FITC und APC, anti-IgG2a FITC und anti-IgG2b PE.

Zur Analyse der Oberflächenmarkerexpression wurde in der durchflusszytometrischen Auswertung jeweils die mittlere FI der Probe bestimmt. Je höher die mittlere FI, umso mehr Antikörper waren auf der Zelloberfläche gebunden, umso stärker wurde also das jeweilige Protein exprimiert. Abbildung 13 zeigt beispielhaft Dichteplots ohne positives Fluoreszenzsignal bei Färbung mit dem Isoantikörper (A) sowie mit niedriger (B) und hoher (C) mittlerer FI, also niedriger und hoher Expression eines Oberflächenmarkers (im Beispiel von CD86).

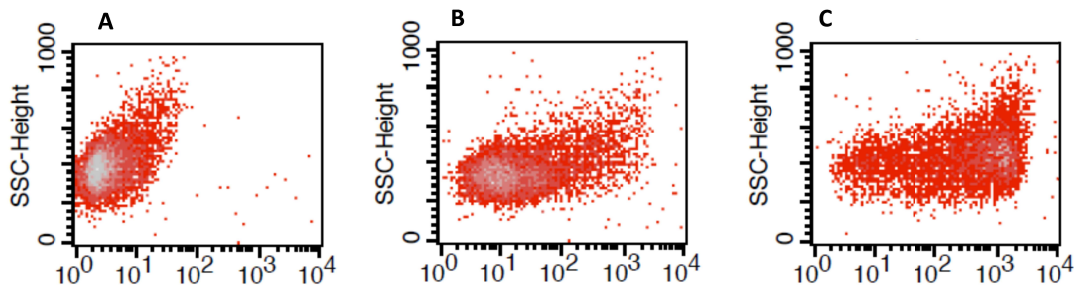


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression

DCs eines beispielhaften Spenders nach Färbung mit verschiedenen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle. Im FI/SSC-Dichteplot kein positives Fluoreszenzsignal nach Färbung mit dem Isoantikörper (A), schwaches (B) und starkes (C) Fluoreszenzsignal nach Färbung mit anti-CD86-Antikörper als Zeichen unterschiedlich starker Expression von CD86 in B und C.

2.2.9 Statistik

Die Anzahl der pro Versuch eingesetzten Spender ist direkt beim Versuchsergebnis angegeben, es wurden jeweils mindestens 3 Spender analysiert (Ausnahmen angegeben, dann keine Mittelwertberechnung). Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Standardfehler errechneten sich nach bekannten Formeln. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Die Signifikanz wurde anhand eines zweiseitigen Student-t-Tests berechnet, dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant angenommen und wie folgend gekennzeichnet: $p < 0,05$ als (*), $p < 0,01$ als (**) und $p < 0,001$ als (***)

3 Ergebnisse

Die IA ist eine gefürchtete Infektionserkrankung, die am häufigsten durch den Pilz *A. fumigatus* bei immunsupprimierten Patienten verursacht wird. Sie zeigt Fieber als klassisches, teilweise einziges Symptom [13]. Zahlreiche Untersuchungen zur Immunabwehr des Menschen gegen *A. fumigatus* analysierten die Interaktion humaner DCs mit dem Pilz [22; 23], die Auswirkungen einer erhöhten Körpertemperatur auf diese Interaktion wurde in bisherigen Studien jedoch nicht berücksichtigt. Die vorliegende Arbeit untersucht daher den Einfluss von Hyperthermie auf die Immunantwort humaner DCs gegenüber *A. fumigatus*. Zunächst wurde der Generierungsprozess der DCs aus Monozyten kontrolliert. Anschließend wurde der Einfluss der erhöhten Temperatur auf die DC-Viabilität untersucht. Weiterhin wurden die Genexpression und Sekretion verschiedener Zytokine und die Aufnahme von Antigenen durch DCs analysiert sowie der Einfluss der Hyperthermie auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf DCs genau charakterisiert.

3.1 Erfolgreiche Generierung von DCs aus Monozyten

DCs wurden aus CD14-positiven Monozyten durch 5-tägige Inkubation mit IL4 und GM-CSF generiert, wie im Methodenteil (siehe Absatz 2.2.1.2) beschrieben. Der Erfolg dieser Generierung kann durch die Expression zweier Oberflächenmarker überprüft werden: Während Monozyten CD14 stark exprimieren, jedoch negativ für CD1a sind, verliert sich die CD14-Expression während des Generierungsprozesses und die Expression von CD1a steigt deutlich an. Der CD14⁺/CD1a⁻ Phänotyp der Monozyten wandelt sich somit zum CD14⁻/CD1a⁺ Phänotyp der DCs. Die Expression dieser Marker wurde mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt.

Um Debris auszuschließen wurde ein Gate um die DC-Population im FSC/SSC-Dichteplot gesetzt (beispielhaft in Abbildung 14, Gate R1). Anschließend wurde mittels Messung der CD1a/CD14-Expression die sichere Generierung von DCs nachgewiesen.

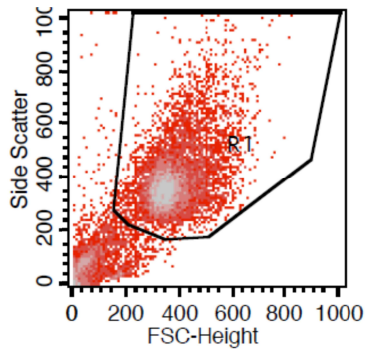


Abbildung 14: Definition der DC-Population

FSC/SSC (Side Scatter)-Dichteplot eines beispielhaften Spenders; das Gate R1 beinhaltet die DC-Population.

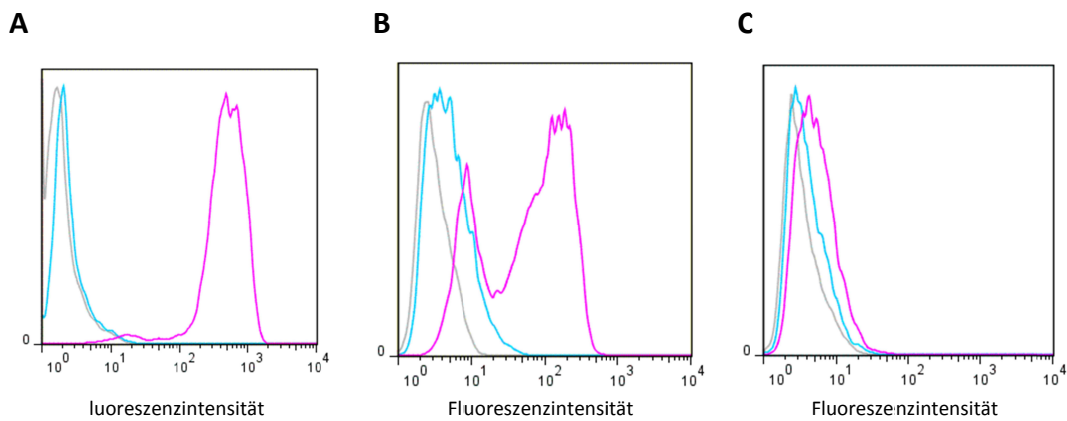


Abbildung 15: Generierungskontrolle der DCs

Histogramme der CD14 Expression (blau) und der CD1a-Expression (pink) im Vergleich zu einer Isotypenkontrolle (grau) je eines beispielhaften Spenders nach 5-tägiger Generierung von DCs aus Monozyten.

A: CD14 negativ, CD1a deutlich positiv: DC-Generierung erfolgreich.

B: CD14 negativ, CD1a deutlich und schwach positiv: DC-Generierung erfolgreich.

C: CD14 negativ, CD1a negativ: Generierung nicht erfolgreich, Spender ausgeschlossen.

Nach dem Generierungsprozess wiesen die meisten Spender den beispielhaft in Abbildung 15 A dargestellten klassischen DC-Phänotyp auf, der als deutlich CD1a positiv und CD14 negativ definiert werden konnte. Bei einigen Spendern zeigten sich in Bezug auf die CD1a-Expression zwei Populationen, von denen eine CD1a stark, die andere diesen Marker allerdings deutlich schwächer exprimierte (Abbildung 15 B). Auch bei diesen Spendern war jedoch – klassisch für DCs – eine CD14-Negativität erkennbar. Die wenigen Spender, die keine klare Hochregulation von CD1a aufwiesen (Abbildung 15 C),

wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen, um für diese sicher von einer Grundpopulation phänotypisch „normaler“ DCs ausgehen zu können.

3.2 Viabilität von DCs unter Hyperthermie

Vor Beginn der funktionellen Charakterisierung sollte überprüft werden, ob DCs die Inkubation bei erhöhter Temperatur ohne signifikanten Viabilitätsverlust tolerieren. Hierzu wurden mehrere aufeinander aufbauende Versuche mit verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt. Es wurden dabei jeweils die Viabilität nach Stimulation im Vergleich zu unstimulierten DCs sowie die Viabilität bei den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen analysiert.

3.2.1 Vorversuchsreihe zur Apoptoserate von DCs unter Hyperthermie

Der Anteil lebender, früh- und spätapoptotischer DCs wurde mittels des FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit I (AnnexinV/PI-Färbung, siehe Absatz 2.2.5) bestimmt.

In einer ersten Vorversuchsreihe wurden dazu DCs eines Spenders über 1 h, 2 h, 4 h und 6 h bei 37 °C und 42 °C ohne Stimulation oder unter Stimulation mit Zymosan inkubiert. Abbildung 16 (*links*) zeigt, dass bei Vergleich der Inkubationstemperaturen keine Unterschiede bezüglich des Anteils lebender (A), früh- (B) und spätapoptotischer (C) Zellen bestanden. Die Viabilität der DCs war nach Stimulation mit Zymosan im Vergleich zu unstimulierten DCs minimal reduziert (Abbildung 16 *links*, Vergleich ctrl mit Zym); es bestand diesbezüglich jedoch ebenfalls kein Unterschied zwischen den Inkubationstemperaturen.

Des Weiteren wurden – ebenso unter Zymosanstimulation oder unstimuliert – DCs eines zweiten Spenders bei 37 °C und 39 °C für 17 h und 23 h inkubiert und analog zu oben die Apoptoseraten bestimmt. Aus Abbildung 16 (*rechts*) wird ersichtlich, dass ebenfalls kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Temperatur und einer veränderten Viabilität bestand. Insgesamt war der Anteil frühapoptotischer Zellen etwas geringer (und damit der Anteil lebender DCs etwas höher) als in der 1–6 h Stimulationsreihe (Abbildung 16 A und B, Vergleich *rechts* mit *links*). Dies betraf jedoch beide Temperaturen, ist also eher als spenderabhängiger Effekt anzunehmen.

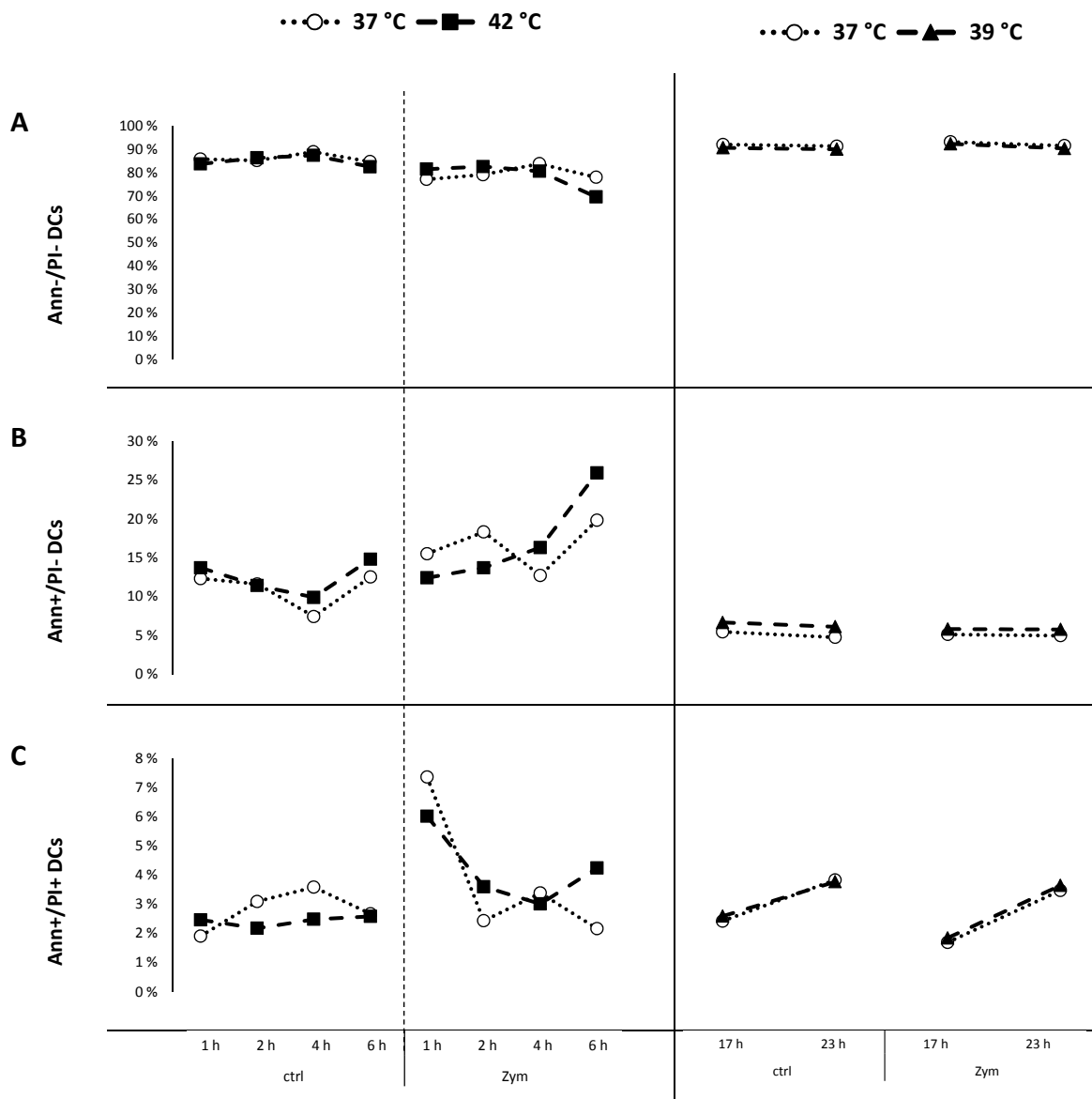


Abbildung 16: Stimulationsreihe zur Viabilität von DCs unter Hyperthermie

DCs ohne Stimulation (**ctrl**) und nach Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) für *links*: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h bei 37 °C (runde, weiße Symbole) und 42 °C (quadratische, schwarze Symbole) *rechts*: 17 h, 23 h bei 37 °C (runde, weiße Symbole) und 39°C (dreieckige, schwarze Symbole). Keine Viabilitätsunterschiede zwischen den Inkubationstemperaturen erkennbar.

- A:** Lebende DCs: AnnexinV FITC negativ (Ann-), PI negativ (PI-).
- B:** Frühapoptotische DCs: AnnexinV FITC positiv (Ann+), PI negativ (PI-).
- C:** Spätapoptotische DCs: AnnexinV FITC positiv (Ann+), PI positiv (PI+).

Die Vorversuchsreihen mit zwei verschiedenen, erhöhten Temperaturen (39 °C, 42 °C) wurden durchgeführt, um eine ideale, nicht zu heiße, aber doch ausreichend hohe Temperatur als „Hyperthermie“ für dieses Projekt zu definieren. Auf Basis der Ergebnisse sowie in Bezugnahme auf weitere Arbeiten mit DCs und Hyperthermie (wie

z. B. Knippertz *et al.* [59]) wurde die Bedingung „Hyperthermie“ für diese Arbeit auf 40 °C festgelegt.

3.2.2 Apoptoserate von DCs bei 24 h Inkubation unter Hyperthermie

Die DC-Viabilität unter dem definierten Hyperthermieprotokoll 40 °C wurde nach 24 h an unstimulierten DCs sowie an DCs unter Stimulation mit Zymosan oder mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* ebenfalls mit dem FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit I analysiert. Zusätzlich wurde jeweils erfasst, welchen Anteil an der Zahl der Gesamt Ereignisse (die auch Signale durch andere Zellen, Zellbruchstücke und sonstige Signale im Durchflusszytometer beinhalteten) jeweils die DCs ausmachten.

Der Anteil der DCs an der Zahl der Gesamt Ereignisse lag über alle Bedingungen bei ca. 80 % (siehe Abbildung 17 A), wobei die übrigen Ereignisse wie aus Abbildung 14 (Seite 42) ersichtlich im niedrigen FSC/SSC-Bereich lagen und somit als Debris anzunehmen waren. Weder mit noch ohne Stimulation zeigte sich ein signifikant unterschiedlicher DC-Anteil zwischen der Inkubation bei 37 °C oder 40 °C. Bei Stimulation mit *A. fumigatus* war der DC-Anteil an den Gesamt Ereignissen im Vergleich zu unstimulierten DCs leicht reduziert, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Ebenso bestand bei allen Bedingungen kein signifikanter Unterschied des Anteils lebender (Abbildung 17 B), früh- oder spätapoptotischer DCs (Abbildung 17 C und D) zwischen den Inkubationstemperaturen von 37 °C und 40 °C. Nach Stimulation mit *A. fumigatus* bei 37 °C war der Anteil frühapoptotischer DCs im Vergleich zu unstimulierten DCs bei 37 °C leicht erhöht (Abbildung 17 C, weiße Balken, Vergleich ctrl mit *A. fumigatus*), dieser Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

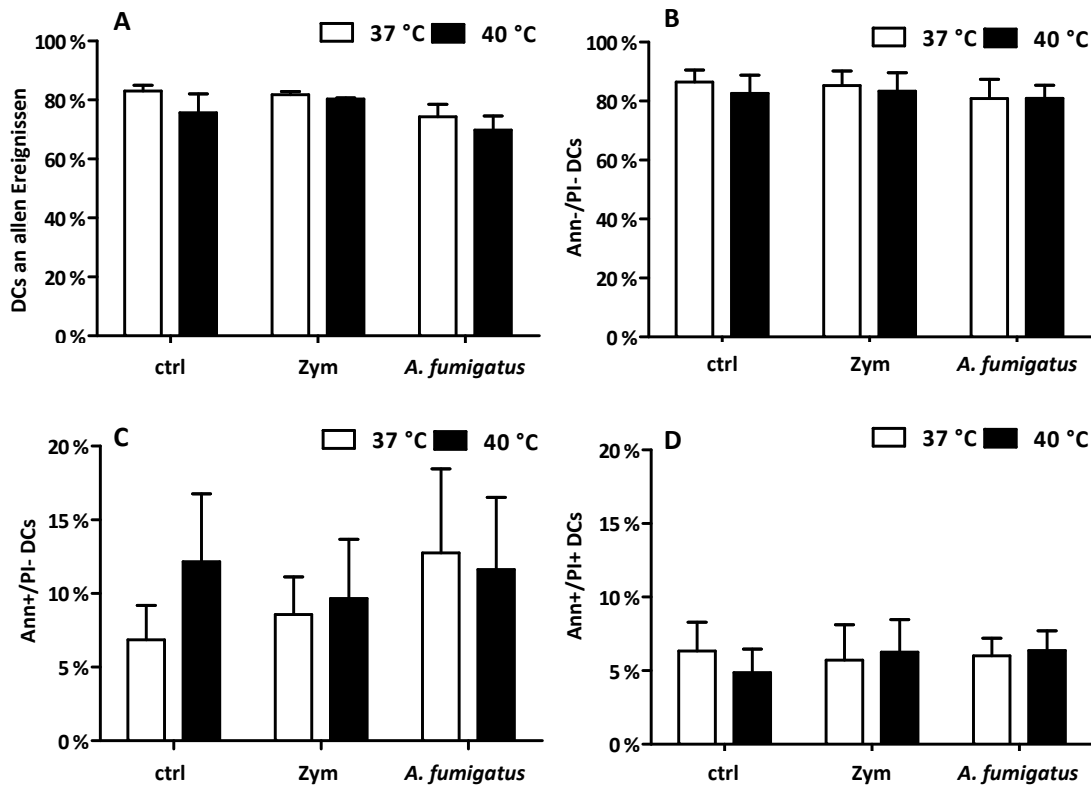


Abbildung 17: Viabilität von DCs nach 24 h Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). Mittelwerte + Standardfehler. ctrl, Zym: n = 6. *A. fumigatus*: n = 3.

Kein signifikanter Unterschied des prozentualen DC-Anteils und der Viabilität.

A: Anteil der DCs an der Zahl der Gesamt ereignisse.

B: Lebende DCs: AnnexinV FITC negativ (Ann-), PI negativ (PI-).

C: Frühapoptotische DCs: AnnexinV FITC positiv (Ann+), PI negativ (PI-).

D: Spätapoptotische DCs: AnnexinV FITC positiv (Ann+), PI positiv (PI+).

3.2.3 Anteil toter DCs bei 24 h Inkubation unter Hyperthermie

Da keine signifikante Veränderung der Viabilität durch 24 h Inkubation bei 40 °C festgestellt werden konnte (siehe Absatz 3.2.2), wurde bei den weiteren Spendern nicht mehr die vollständige Viabilitätsanalyse parallel zu den sonstigen Versuchen durchgeführt. Es wurde jedoch weiterhin der Anteil toter Zellen innerhalb der DC-Population bei jeder Bedingung mittels einfacher PI-Färbung kontrolliert. Dadurch wurde sichergestellt, dass bei einzelnen Spendern nicht doch Temperaturunterschiede bezüglich des Anteils toter Zellen bestanden, die die Ergebnisse der durchgeführten Versuche hätten beeinflussen können.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, zeigte sich bezüglich des Anteils toter Zellen in der einfachen PI-Färbung bei unstimulierten DCs sowie nach Stimulation mit Zymosan oder *A. fumigatus* über 24 h bei 37 °C oder 40 °C ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Inkubationstemperaturen.

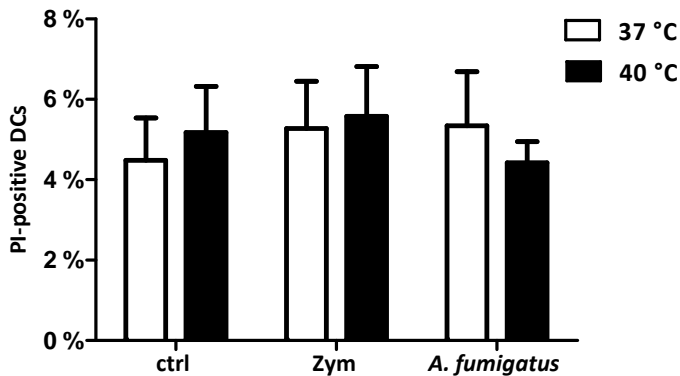


Abbildung 18: Anteil toter DCs nach 24 h Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, ***A. fumigatus***) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). Mittelwerte + Standardfehler. ctrl, Zym: n = 8. *A. fumigatus*: n = 5. PI-positive DCs: Kein signifikanter Unterschied des Anteils toter DCs.

3.3 Zytokinexpression und -sekretion durch DCs unter Hyperthermie

Eine essentielle Funktion reifer DCs ist die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen. Um den Einfluss der Hyperthermie auf die Reifung und Funktion von DCs im Kontakt mit *A. fumigatus* zu analysieren, war es daher von großer Bedeutung, das Zytokinprofil der DCs unter Normo- und Hyperthermie und *A. fumigatus*-Stimulation genau zu charakterisieren. Dabei wurden sowohl die Genexpression der Zytokine als auch ihre Sekretion durch DCs in das umgebende Medium gemessen. DCs wurden ohne Stimulation oder unter Stimulation mit Zymosan oder mit aktiven *A. fumigatus*-Keimschläuchen bei 37 °C oder 40 °C für 3 h, 6 h und 9 h inkubiert (für einige Zytokine auch nach 24 h Vorinkubation bei 37 °C oder 40 °C) und die Genexpression ausgewählter Zytokine bestimmt. Die Sekretion der Zytokine in das umgebende Medium wurde nach 6 h, 9 h und 12 h Inkubation bei den gleichen Bedingungen bestimmt. Die jeweils analysierten Zytokine, Messzeitpunkte sowie die Spenderanzahl zeigt Tabelle 2. Das Zytokin IL12 besteht aus einer p35- und einer p40-Untereinheit, deren jeweilige Expression separat bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Expression der p40-Untereinheit

(IL12B) analysiert. Die Genexpression im vollständigen Zeitverlauf (3 h, 6 h, 9 h) wurde zunächst nur an einem Spender bestimmt; da sich bei diesem nach 3 h noch keine Expressionsinduktion gezeigt hatte, wurde dieser Zeitpunkt bei den übrigen Spendern nicht mehr untersucht.

Tabelle 2: Analyse der Zytokinexpression und -sekretion

Dargestellt ist, bei welchen Zytokinen jeweils Expression und Sekretion, ggf. im Zeitverlauf oder nach Vorinkubation bestimmt wurden. In Klammern jeweils Anzahl der Spender, an denen die Analyse durchgeführt wurde. Spalte 1 und 2: Expression (erste Zahl)/Sekretion (zweite Zahl), Spalte 3: Sekretion, Spalte 4: Expression.

Expression im Zeitverlauf und Sekretion im Zeitverlauf	Expression nach 6 h und Sekretion im Zeitverlauf	Sekretion im Zeitverlauf	Expression nach Vorinkubation
IL8 (4/4)	IL6 (3/4)	IL2 (4)	IL8 (1)
IL10 (4/4)	IL1B (3/4)	IL5 (4)	IL12B (1)
TNF (4/4)	CXCL10 (3/0)	IFN γ (4)	CCL20 (1)
CCL20 (4/0)		IL4 (4)	
IL12B (4/0)		GM-CSF (4)	

3.3.1 Expression und Sekretion ohne Stimulation

Die Expressions- und Sekretionsanalysen der Zytokine wurde stets auch an unstimulierten DCs, die bei 37 °C und 40 °C inkubiert wurden, durchgeführt. Unstimulierte DCs (nach 3 h oder 6 h Inkubation bei 37 °C) exprimierten und sezernierten keine Zytokine. Weder durch eine zunehmende Inkubationsdauer bis 12 h noch durch die erhöhte Temperatur konnte eine Zytokinexpression oder -sekretion in unstimulierten DCs induziert werden (Abbildung 19 bis Abbildung 23, Proben: ctrl, feine, hellgraue Linien).

3.3.2 Expression und Sekretion bei Zymosanstimulation

Die Stimulation der DCs zur Zytokinanalyse wurde mit aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus*, aber auch mit Zymosan, einem β -1,3-Glucan (siehe Absatz 1.2.2.1), durchgeführt. Durch Zymosanstimulation zeigte sich im Vergleich zur *A. fumigatus*-Stimulation ein nur sehr geringer Anstieg der Zytokinexpression und -sekretion (Abbildung 19 bis Abbildung 23, Proben: Zym, Linien mittlerer Stärke). Auf diesem

geringen Expressionslevel war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inkubationstemperaturen feststellbar. Es bestanden lediglich minimale Unterschiede. Hier war die Tendenz zu einer höheren Expression oder Sekretion bei einer der beiden Temperaturen meist vergleichbar zu den mit *A. fumigatus* stimulierten Proben. Lediglich bei IL12B sowie bei IL6 und CXCL10 bei je einem Spender konnte eine deutlichere Induktion durch Zymosan erreicht werden (Abbildung 21 und Abbildung 20).

3.3.3 Expression und Sekretion bei *A. fumigatus*-Stimulation

Zunächst sollten der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der Zytokininduktion nach Stimulation von DCs mit aktiven *A. fumigatus*-Keimschläuchen über den Inkubationszeitraum von bis zu 12 h betrachtet werden. Die zugehörigen Abbildungen, auf denen der Zeitverlauf der Zytokininduktion dargestellt ist, finden sich unter Absatz 3.3.4. Einen Überblick über die Expression und Sekretion der Zytokine bei *A. fumigatus*-Stimulation gibt Tabelle 3.

Die Expression von IL1B, IL6, IL8, IL10, IL12B, TNF und CCL20 in DCs war nach 6-stündiger Stimulation mit *A. fumigatus* im Vergleich zur Kontrolle erhöht und stieg nach 9 h meist weiter an (IL1B und IL6 ohne 9 h Messwert, Verlauf der IL12B-Expression spenderabhängig sehr unterschiedlich). Die IL6- und IL10-Expression war im Vergleich zu den anderen Zytokinen relativ schwach. Eine CXCL10-Expression konnte nach 6 h nur inkonstant induziert werden (bei 1/3 Spendern, kein 9 h Messwert).

Die Sekretion von IL8 und TNF durch DCs nach *A. fumigatus*-Stimulation bestand bereits deutlich nach 6 h und nahm nach 9 h und 12 h weiter zu (Ausnahme: IL8, 40 °C: nach 12 h leichter Abfall). Die IL1B-, IL6- und IL10-Sekretion trat deutlich erst nach 9 h *A. fumigatus*-Stimulation auf und nahm nach 12 h ebenfalls weiter zu. Auch die Sekretion von IL2, IL5 und IFN begann erst nach 9 h, stieg nach 12 h jedoch nur noch geringfügig an. IL4 und GM-CSF wurden durch *A. fumigatus*-Keimschläuche nicht induziert.

Tabelle 3: Zytokininduktion in DCs durch Stimulation mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen

Zytokinsekretion (nach 6 h, 9 h und 12 h) sowie Expression (nach 6 h) bei Stimulation von DCs mit aktiven *A. fumigatus*-Keimschläuchen. Farblich hinterlegt jeweils im Vergleich zu unstimulierten DCs (6 h-Werte) bzw. zum vorherigen Messzeitpunkt (9 h- und 12 h-Werte): Kein deutlicher Sekretionsanstieg (grau), geringer/inkonstanter Anstieg der Sekretion/Expression (hellgrün), deutlicher Anstieg der Sekretion/Expression (dunkelgrün), nicht analysierte Kombinationen (weiß).

Zytokin	Sekretion 6 h	Sekretion 9 h	Sekretion 12 h	Expression 6 h
IL8	↑	↑	↑	↑
TNF	↑	↑	↑	↑
IL1B	–	↑	↑	↑
IL10	–	↑	↑	↗
IL6	–	↑	↑	↗
IL12B				↑
CCL20				↑
CXCL10				↗
IL2	–	↑	↗	
IL5	–	↑	↗	
IFN γ	–	↑	↗	
IL4	–	–	–	
GM-CSF	–	–	–	

3.3.4 Expression und Sekretion bei *A. fumigatus*-Stimulation unter Hyperthermie

Bei den *A. fumigatus*-stimulierten Proben wurde nun das Ausmaß der Zytokinexpression und -sekretion durch DCs bei 37 °C und 40 °C verglichen. Allgemein zeigten die Genexpressionsdaten sehr deutliche spenderabhängige Schwankungen sowohl in der Expressionsstärke als auch in der Bevorzugung einer Inkubationstemperatur. Daher sind in den Abbildungen Expressionsdaten beispielhafter Spender, keine Mittelwerte, dargestellt. Die Zytokinsekretion ist als Mittelwert von 4 Spendern dargestellt.

3.3.4.1 IL8-, IL10-, TNF- und CCL20-Expression und Sekretion unter Hyperthermie

Nach Stimulation von DCs mit *A. fumigatus* über 6 h zeigte sich bei 40 °C eine leicht erniedrigte Expression von IL8, IL10, TNF und CCL20 im Vergleich zu 37 °C. Nach 9 h war die Expression des jeweiligen Zytokins bei 2 Spendern bei 40 °C etwas höher und

bei 2 Spendern etwas niedriger als bei 37 °C. Es wandelte sich im Zeitverlauf also das Bild der leicht erniedrigten Expression bei 40 ° zu einem gemischten Bild ohne Bevorzugung einer der beiden Inkubationstemperaturen (Abbildung 19 *links und Mitte*).

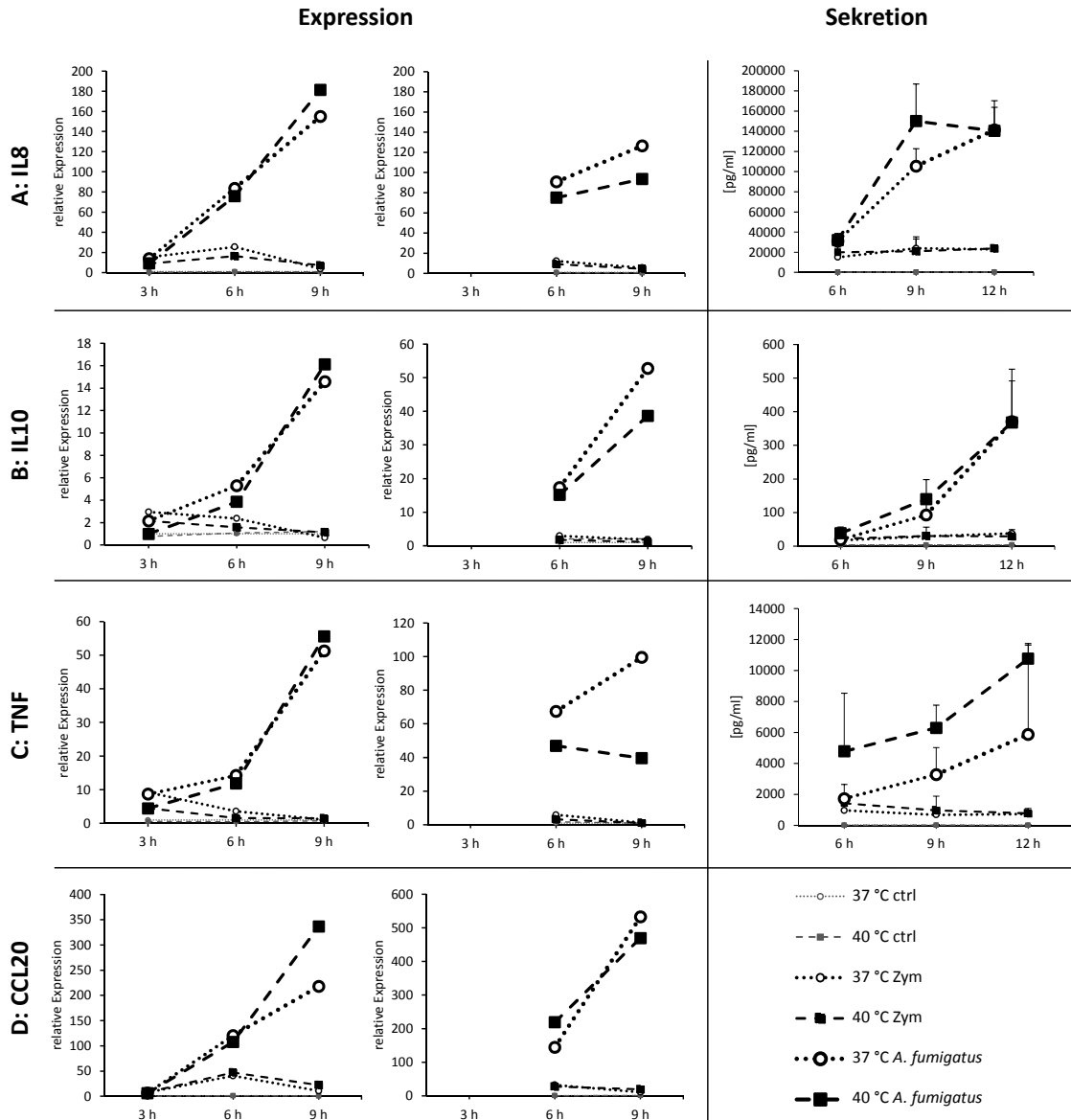


Abbildung 19: IL8-, IL10-, TNF- und CCL20-Expression und Sekretion unter Hyperthermie

DCs nach Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) oder aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 °C (runde, weiße Symbole) und 40 °C (quadratische, schwarze Symbole).

Links und Mitte: Relative Genexpression in Abhängigkeit von der unstimulierten Kontrolle und normalisiert auf ALAS1 nach (3 h), 6 h und 9 h. Jeweils ein Spender mit stärkerer (*links*) und schwächerer (*Mitte*) Expression bei 40 °C nach 9 h *A. fumigatus*-Stimulation.

Rechts: Zytokinkonzentration im Kulturüberstand nach 6 h, 9 h und 12 h. Mittelwerte + Standardabweichung, n = 4. Leicht verstärkte IL8-, IL10- und TNF-Sekretion bei 40 °C + *A. fumigatus*-Stimulation. **Zytokine**: IL8 (**A**), IL10 (**B**), TNF (**C**), CCL20 (**D**).

Die Sekretion von IL10 und TNF durch DCs nach *A. fumigatus*-Stimulation war bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht erhöht (Abbildung 19 B und C *rechts*). Die IL8-Sekretion zeigte starke spenderabhängige Schwankungen (Einzelwerte nicht dargestellt) mit ebenfalls einer Tendenz zu vermehrter Sekretion bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C (Abbildung 19 A *rechts*). Die CCL20-Sekretion wurde nicht bestimmt.

3.3.4.2 IL6-, IL1B- und CXCL10-Expression und Sekretion unter Hyperthermie

Da die Expression dieser Zytokine nur nach 6 h Stimulation, nicht im Zeitverlauf, analysiert wurde, wurde hier eine andere Diagrammform mit Darstellung aller Spender im direkten Temperaturvergleich bei jeder Bedingung gewählt.

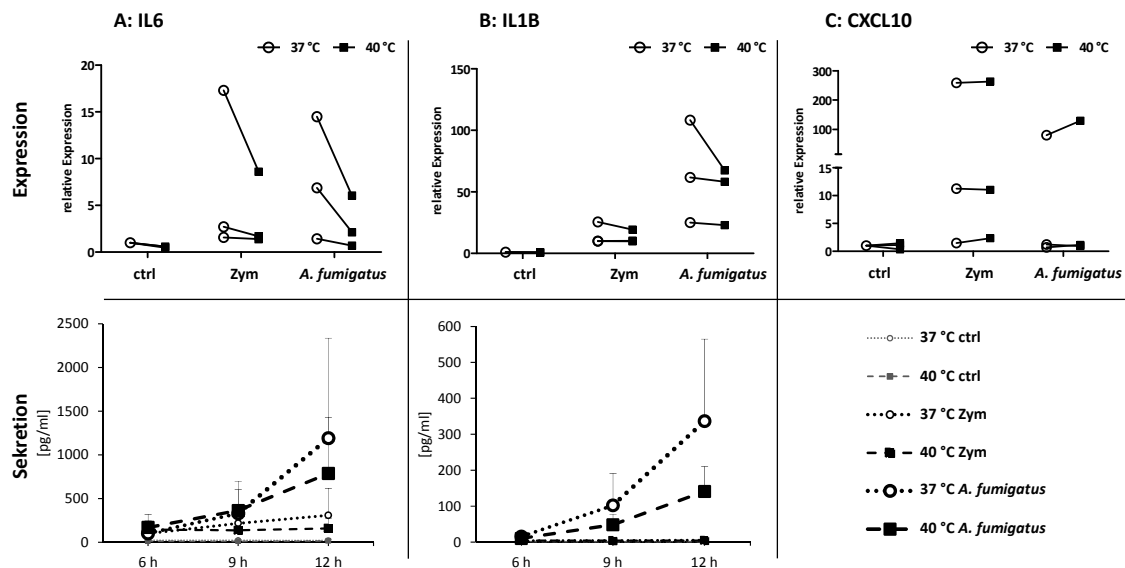


Abbildung 20: IL6-, IL1B- und CXCL10-Expression und Sekretion unter Hyperthermie

DCs nach Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) oder aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 °C (runde, weiße Symbole) oder 40 °C (quadratische, schwarze Symbole).

Oben: Einzelwerte der relativen Genexpression in Abhängigkeit von der unstimulierten Kontrolle und normalisiert auf ALAS1 nach 6 h. Schwacher Trend zu erniedrigter Expression von IL6 und IL1B und erhöhter Expression von CXCL10 bei 40 °C und *A. fumigatus*-Stimulation.

Unten: Zytokinkonzentration im Kulturüberstand nach 6 h, 9 h und 12 h. Mittelwerte + Standardabweichung, n = 4. Schwacher Trend zu erniedrigter Sekretion von IL6 und IL1B bei 40 °C und *A. fumigatus*-Stimulation.

Zytokine: IL6 (A), IL1B (B), CXCL10 (C)

Die Expression von IL6 und IL1B in DCs war nach 6 h Stimulation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht reduziert (Abbildung 20 A und B *oben*). Bei dem einen Spender (von 3 Spendern), bei dem durch *A. fumigatus*-Stimulation eine deutliche CXCL10-

Expression induziert werden konnte, war diese bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht erhöht (Abbildung 20 C).

Die Sekretion von IL6 und IL1B durch DCs bei Stimulation mit *A. fumigatus* war bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C ebenfalls leicht reduziert (Abbildung 20 A und B unten, Sekretion von CXCL10 nicht bestimmt).

3.3.4.3 IL12B-Expression unter Hyperthermie

Die Expression von IL12B in DCs wurde im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zytokinen stark auch durch Zymosan induziert (bereits nach 6 h, keine einheitlichen Temperaturunterschiede, Abbildung 21, Zym). Im Temperaturvergleich zeigte sich bei *A. fumigatus*-Stimulation bei allen 4 Spendern sowohl nach 6 h als auch nach 9 h eine leicht erniedrigte IL12B-Expression bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C (Abbildung 21).

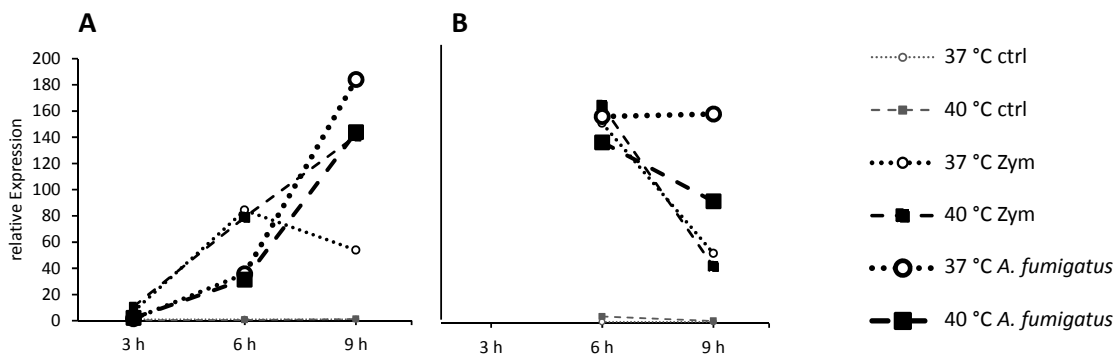


Abbildung 21: IL12B-Expression unter Hyperthermie

DCs nach Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) oder aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, *A. fumigatus*) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 °C (runde, weiße Symbole) und 40 °C (quadratische, schwarze Symbole). Relative Genexpression in Abhängigkeit von der unstimulierten Kontrolle und normalisiert auf ALAS1 nach (3 h), 6 h und 9 h.

Jeweils ein Spender mit erniedrigter (**A**) bzw. erhöhter (**B**) IL12B-Expression bei 40 °C nach 9 h Zymosanstimulation. Expression bei *A. fumigatus*-Stimulation bei beiden Spendern bei 40 °C nach 6 h und 9 h leicht erniedrigt.

3.3.4.4 IL2-, IL5-, IFN γ -, IL4- und GM-CSF-Sekretion unter Hyperthermie

Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Hyperthermie auf die Sekretion dieser Zytokine durch DCs bei Stimulation mit *A. fumigatus* (Abbildung 22, Ausnahme: 12 h *A. fumigatus*-Stimulation: IL5-Sekretion bei 40 °C minimal höher als bei 37 °C).

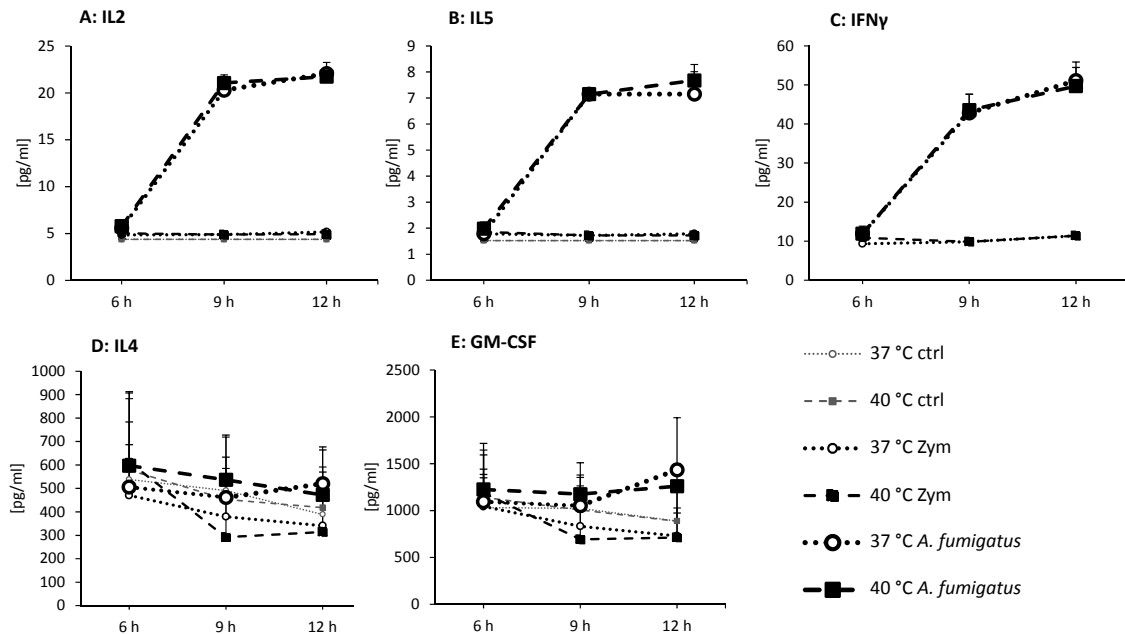


Abbildung 22: IL2-, IL5-, IFN γ -, IL4- und GM-CSF-Sekretion unter Hyperthermie

DCs nach Stimulation mit Zymosan (10 μ g/ml, **Zym**) oder aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, ***A. fumigatus***) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 °C (runde, weiße Symbole) und 40 °C (quadratische, schwarze Symbole). Zytokinkonzentration im Kulturüberstand nach 6 h, 9 h und 12 h. Mittelwerte + Standardabweichung, n = 4.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Inkubationstemperaturen von 37 °C und 40 °C.

Zytokine: IL2 (A), IL5 (B), IFN γ (C): Konzentrationen in Kontrollgruppen unterhalb des Messbereichs, IL4 (D), GM-CSF (E)

3.3.4.5 IL12B-, CCL20- und IL8-Expression nach Vorinkubation unter Hyperthermie

Bei den Versuchen zur Antigenaufnahme (siehe Absatz 3.4) hatten sich nach kurzzeitiger Inkubation bei Hyperthermie nur Tendenzen, nach 24 h Vorinkubation dann signifikante Effekte bezüglich der Aufnahmerate von *A. fumigatus*-Konidien gezeigt. Ein möglicher ähnlicher Effekt auf die Zytokinexpression sollte daher beispielhaft an IL12B, CCL20 und IL8 überprüft werden. Dazu wurde die Zytokinexpression vor Vorinkubation, nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 40 °C, sowie nach 6 h Stimulation mit Zymosan und aktiven *A. fumigatus*-Keimschläuchen bei den jeweiligen Temperaturen bestimmt.

Die Vorinkubation bei 40 °C induzierte keine Genexpression, Zymosanstimulation führte bei CCL20 und IL8 zu einem schwachen, bei IL12B zu einem deutlicheren Expressionsanstieg, nach *A. fumigatus*-Stimulation stieg die Expression aller Zytokine stark an (Abbildung 23).

Im Temperaturvergleich zeigte sich bei allen Zytokinen ein ähnliches Bild zu den Versuchen ohne Vorinkubation: Es bestanden ebenfalls nur sehr geringfügige Expressionsunterschiede zwischen den Inkubationstemperaturen, die durch die längere Vorinkubation also nicht deutlich verstärkt werden konnten (Abbildung 23 A-C). Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse zu den Analysen ohne Vorinkubation wurde dieser Versuch nicht an weiteren Spendern wiederholt.

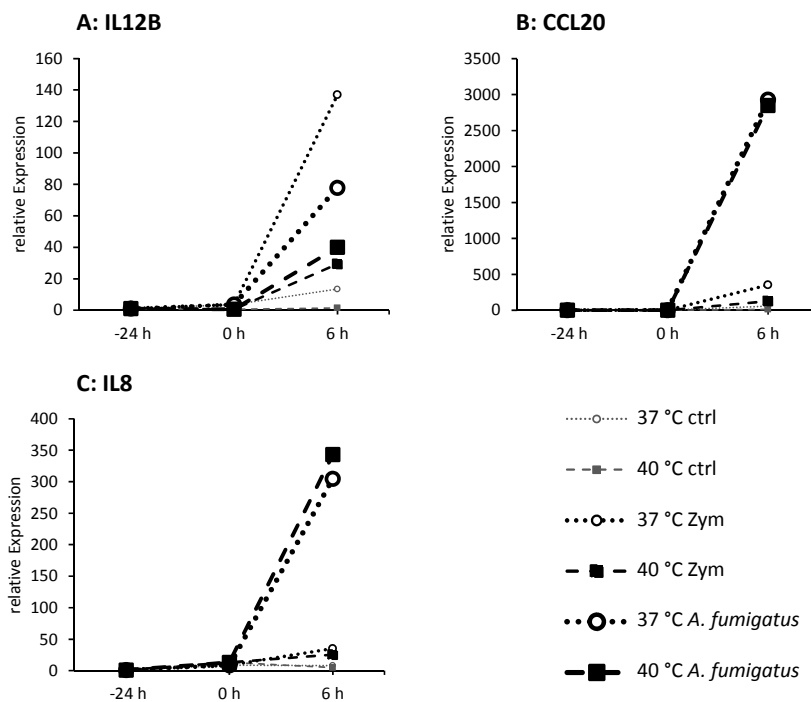


Abbildung 23: IL12B-, IL8- und CCL20-Expression nach Vorinkubation unter Hyperthermie

DCs vor und nach 24 h Vorinkubation sowie nach 6 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) oder aktiven Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, ***A. fumigatus***) sowie DCs ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (runde, weiße Symbole) und 40 °C (quadratische, schwarze Symbole). Relative Genexpression in Abhängigkeit zur unstimulierten Kontrolle und normalisiert auf ALAS1. Vor Vorinkubation (-24h) alle Proben bei 37 °C.

Leicht erniedrigte Expression von IL12B bei 40 °C, IL8 und CCL20-Expression ohne deutliche Temperaturunterschiede.

Zytokine: IL12B (A), CCL20 (B), IL8 (C).

3.3.4.6 Übersicht des Einflusses der Hyperthermie auf die Zytokininduktion in DCs

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass *A. fumigatus* Stimulation von DCs unter Hyperthermie keine signifikant veränderte Zytokininduktion im Vergleich zur Stimulation unter Normothermie bewirkte. Lediglich minimale, nicht signifikante Unterschiede der Expression bzw. Sekretion der Zytokine waren zu erkennen, die in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt sind.

Tabelle 4: Einfluss von Hyperthermie auf Zytokinexpression und -sekretion *A. fumigatus*-stimulierter DCs
 Zytokinexpression und -sekretion bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C nach Stimulation mit aktiven *A. fumigatus*-Keimschläuchen.
 Farblich und symbolisch gekennzeichnet bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C: gleiche Level (→gelb), geringer Anstieg der Sekretion/Expression (↗hellgrün), geringe Abnahme der Sekretion/Expression (↘hellrot), nicht analysierte Kombinationen (weiß). Wert für CXCL10 in Klammern, da Analyse auf Daten eines einzigen Spenders beruhend. Alle Unterschiede nicht signifikant.

Zytokin	Expression	Sekretion
IL8	→	↗
TNF	→	↗
IL10	→	↗
CCL20	→	
CXCL10	(↗)	
IL2		→
IL5		→
IFN		→
IL4		→
GM-CSF		→
IL1B	↘	↘
IL6	↘	↘
IL12B	↘	

3.4 Antigenaufnahme durch DCs unter Hyperthermie

Unreife DCs zeichnen sich durch eine starke Aufnahme von Antigenen aus, eine Eigenschaft, die sich mit der Reifung der DCs verliert [19]. Da die Aufnahmekapazität der DCs also von deren Reifegrad abhängig ist, war es interessant, den Einfluss fieberähnlicher Temperaturen auf die Antigenaufnahme genau zu charakterisieren. Die Aufnahme von FITC-gekoppeltem Dextran und GFP-exprimierenden Konidien von *A. fumigatus* durch DCs wurde bei 37 °C und 40 °C nach 1 h oder 24 h Vorinkubation bei der jeweiligen Temperatur durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde der Prozentsatz FITC/GFP-positiver Zellen als *Aufnahmerate*, die mittlere FI der positiven Zellen als *Aufnahmestärke* definiert (siehe auch Methodenteil, Absatz 2.2.7). *A. fumigatus*-Konidien werden von DCs über Phagozytose [7], Dextran über Makropinozytose und einen Mannose-Rezeptor-gekoppelten Mechanismus aufgenommen [73]. Daher wird im Folgenden allgemein von „Antigenaufnahme“ gesprochen. Es wurden verschiedene Substratmengen und Inkubationszeiträume verwendet und Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Antigenaufnahme sowie Temperaturunterschiede analysiert.

3.4.1 Erfolgreiche Antigenaufnahme durch DCs

Sowohl Dextran als auch GFP-exprimierende *A. fumigatus*-Konidien wurden bei beiden Inkubationstemperaturen erfolgreich durch DCs aufgenommen: Im Vergleich zu den Negativkontrollen (4 °C und Raumtemperatur) zeigte sich nach Dextran-/Konidienzugabe bei 37 °C und 40 °C im DC-Gate eine deutliche FITC/GFP-positive Population (beispielhaft dargestellt in Abbildung 12, Seite 38). Dabei nahmen meist über 90 % der DCs FITC-Dextran auf, während für GFP-exprimierende *A. fumigatus*-Konidien deutlich weniger (ca. 60 %) der DCs positiv waren.

Im FSC/SSC-Dotplot der DCs nach Inkubation mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien (siehe Abbildung 12 unten und Abbildung 24 A) zeigte sich ein großer Anteil von Ereignissen im niedrigen FSC/SSC-Bereich außerhalb des Gates. Diese Ereignisse (Abbildung 24 A, Gate R) waren deutlich GFP-positiv (Abbildung 24 B). Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um nicht-aufgenommene Konidien handelt, die im Waschvorgang nicht vollständig entfernt werden konnten.

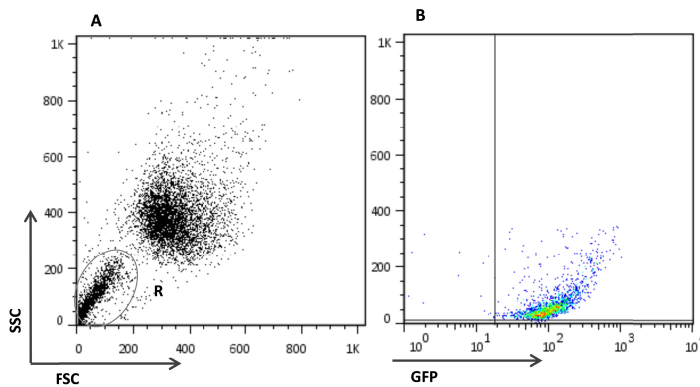


Abbildung 24: GFP-Expression der Population R

A: FSC-/SSC-Dotplot eines beispielhaften Spenders nach Zugabe von GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien zu DCs (gleicher Plot wie in Abbildung 12 unten). Das Gate (R) beschreibt die Population, in der die nicht-aufgenommenen Konidien vermutet wurden.

B: GFP-/SSC-Dichteplot der Population R. Nahezu alle Ereignisse lagen im GFP-positiven Bereich, es war also wahrscheinlich, dass es sich um Konidien handelte.

3.4.2 Aufnahme von Dextran und *A. fumigatus*-Konidien unter Hyperthermie

Zur Analyse der Antigenaufnahme unter Hyperthermie wurden DCs für 1 h bei 37 °C oder 40 °C adaptiert und anschließend mit FITC-Dextran (0,5 mg/ml oder 1 mg/ml) oder mit GFP-markierten *A. fumigatus*-Konidien (MOI 3, 5 oder 10) bei der jeweiligen Temperatur für 0,5 h oder 1 h inkubiert.

Die Aufnahme von Konidien durch DCs zeigte eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit: Bei zunehmender MOI war bei einigen Wertepaaren die Aufnahmerate signifikant erhöht (Abbildung 25 C), außerdem bestand ein Trend zu einer erhöhten Aufnahmestärke (Abbildung 25 D). Bei Dextran zeigte sich ebenfalls einen Trend zu einer Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme, jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 25 A und B).

Bei Inkubation mit Dextran lag jedoch eine signifikante Zeitabhängigkeit vor: Hier bestand für einige Wertepaare mit zunehmender Aufnahmedauer eine signifikant steigende Aufnahmerate und Aufnahmestärke (Abbildung 25 A und B). Die Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien war tendenziell, jedoch nicht signifikant zeitabhängig (Abbildung 25 C und D).

Bei Vergleich der Aufnahmetemperaturen war die Aufnahme von Dextran in einigen Proben bei Inkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C tendenziell verringert

(Abbildung 25 A und B), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Aufnahme von Konidien zeigte keine klaren Unterschiede bezüglich der verschiedenen Inkubationstemperaturen (Abbildung 25 C und D). Kurzzeitige Hyperthermie von 40 °C beeinflusste die Aufnahme von Antigenen durch DCs also nicht signifikant.

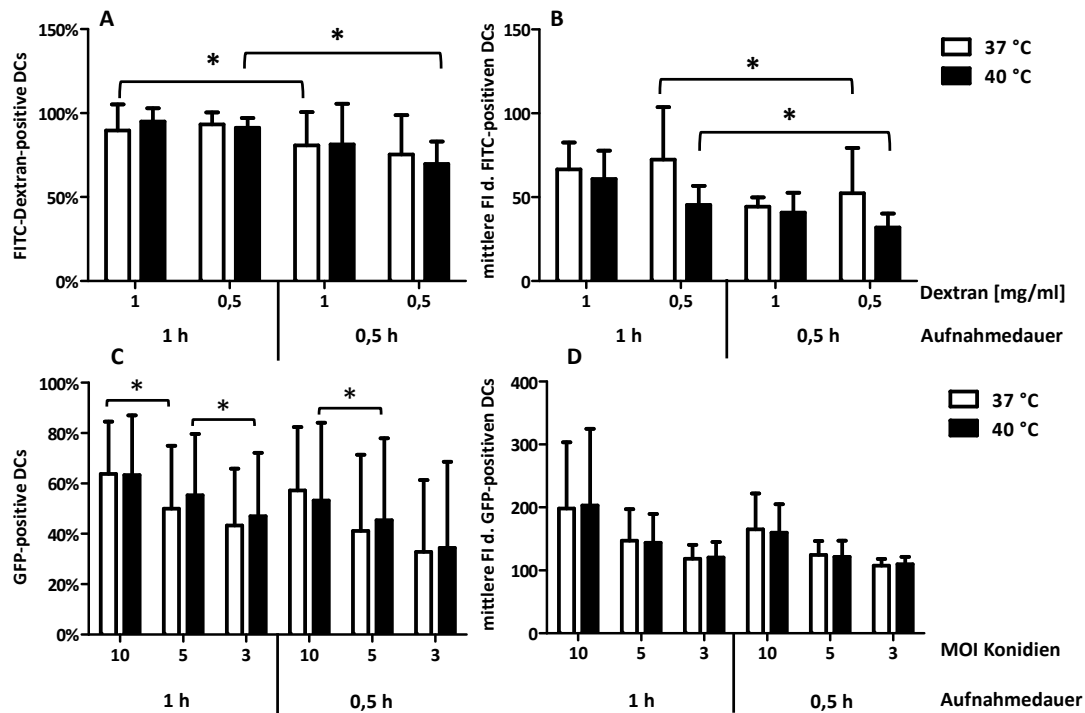


Abbildung 25: Aufnahme von Dextran und *A. fumigatus*-Konidien unter Hyperthermie

DCs nach Inkubation mit 1 mg/ml oder 0,5 mg/ml FITC-Dextran (*oben*) oder GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien (MOI 10, 5 oder 3, *unten*) für 0,5 h oder 1 h bei 37 °C (weiß) oder 40 °C (schwarz). Mittelwerte + Standardabweichung. Dextran: n = 4, Konidien: n = 3. Gepaarter Student-t-Test, *p<0,05. Prozentsatz positiver DCs (Aufnahmerate, **A** und **C**) und mittlere FI der positiven DCs (Aufnahmestärke, **B** und **D**).

Für einige Wertepaare signifikante Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Antigenaufnahme. Keine eindeutigen Temperaturunterschiede.

3.4.3 Aufnahme von Dextran und *A. fumigatus*-Konidien nach Vorinkubation unter Hyperthermie

Nachdem sich nach kurzzeitiger Adaptation (1 h) und anschließender Antigenzugabe bei 37 °C oder 40 °C keine signifikanten Temperaturunterschiede bezüglich der Antigenaufnahme gezeigt hatten (siehe Absatz 3.4.2), wurde die Vorinkubationszeit auf 24 h verlängert, um den Einfluss der Hyperthermie zu verstärken. Nach 24 h Vorinkubation der DCs bei 37 °C oder 40 °C wurde jede Probe halbiert und je eine Hälfte für

die weiteren Ansätze bei 37 °C und die andere Hälfte für die Ansätze bei 40 °C verwendet (Darstellung des Versuchsschemas siehe Absatz 2.2.7, Abbildung 11). Die vorinkubierten DCs wurden mit Dextran (0,5 mg/ml) oder Konidien von *A. fumigatus* (MOI 3 oder 10) für 0,5 h und 1 h erneut bei 37 °C und 40 °C inkubiert.

Bei Inkubation mit *A. fumigatus*-Konidien zeigte sich wie im Versuch ohne Vorinkubation eine signifikante Konzentrations- und nun auch signifikante Zeitabhängigkeit der Antigenaufnahme (Abbildung 27, Signifikanz nicht eingezeichnet). Die Aufnahme von Dextran war in diesem Versuch nun nicht mehr signifikant zeitabhängig (Abbildung 26, bei Dextran wurde nur eine Konzentration verwendet, daher konnte die Konzentrationsabhängigkeit nicht überprüft werden).

Die Dextranaufnahme war im alleinigen Vergleich der Aufnahmetemperaturen (wie unter 3.4.2) bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht verringert (Abbildung 26, weiß und grau hinterlegte Bereiche). Im Vergleich der Vorinkubationstemperaturen bestand ein schwacher Trend zu einer erniedrigten Dextran-Aufnahmerate (Abbildung 26 A) und Aufnahmestärke (Abbildung 26 B) bei den DCs, die bei 40 °C vorinkubiert worden waren (schwarze Balken). Dieser Effekt trat leicht bei einer Aufnahmetemperatur von 37 °C auf (Abbildung 26, weiß hinterlegte Bereiche) und war nur in einem Ansatz bei einer Aufnahmetemperatur von 40 °C erkennbar (grau hinterlegte Bereiche).

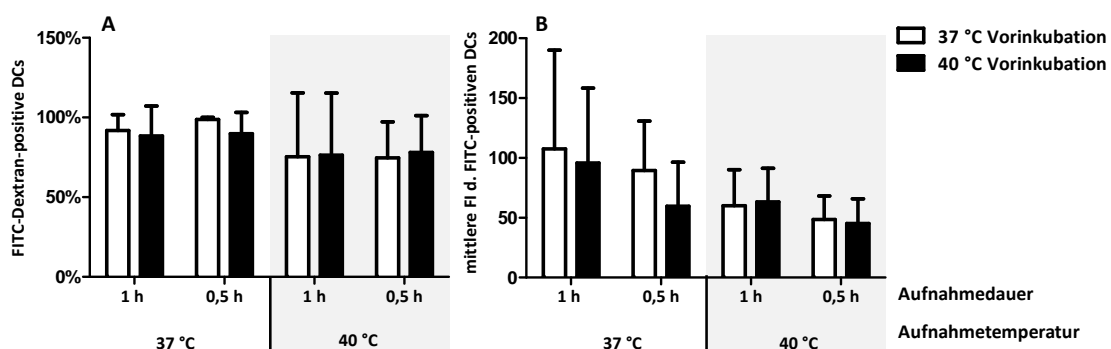


Abbildung 26: Aufnahme von Dextran unter Hyperthermie nach Vorinkubation bei Hyperthermie

DCs nach 24 h Vorinkubation bei 37 °C (weiß) oder 40 °C (schwarz) und darauffolgender Inkubation mit FITC-Dextran (0,5 mg/ml) für 0,5 h oder 1 h bei 37 °C (weiß hinterlegt) oder 40 °C. (grau hinterlegt). Mittelwerte + Standardabweichung, n = 3. Prozentsatz Dextran-positiver DCs (Aufnahmerate, **A**) und mittlere FI der positiven DCs (Aufnahmestärke, **B**).

Schwacher Trend zu einer erniedrigten Aufnahme von Dextran bei einer Aufnahmetemperatur von 40 °C sowie nach Vorinkubation bei 40 °C.

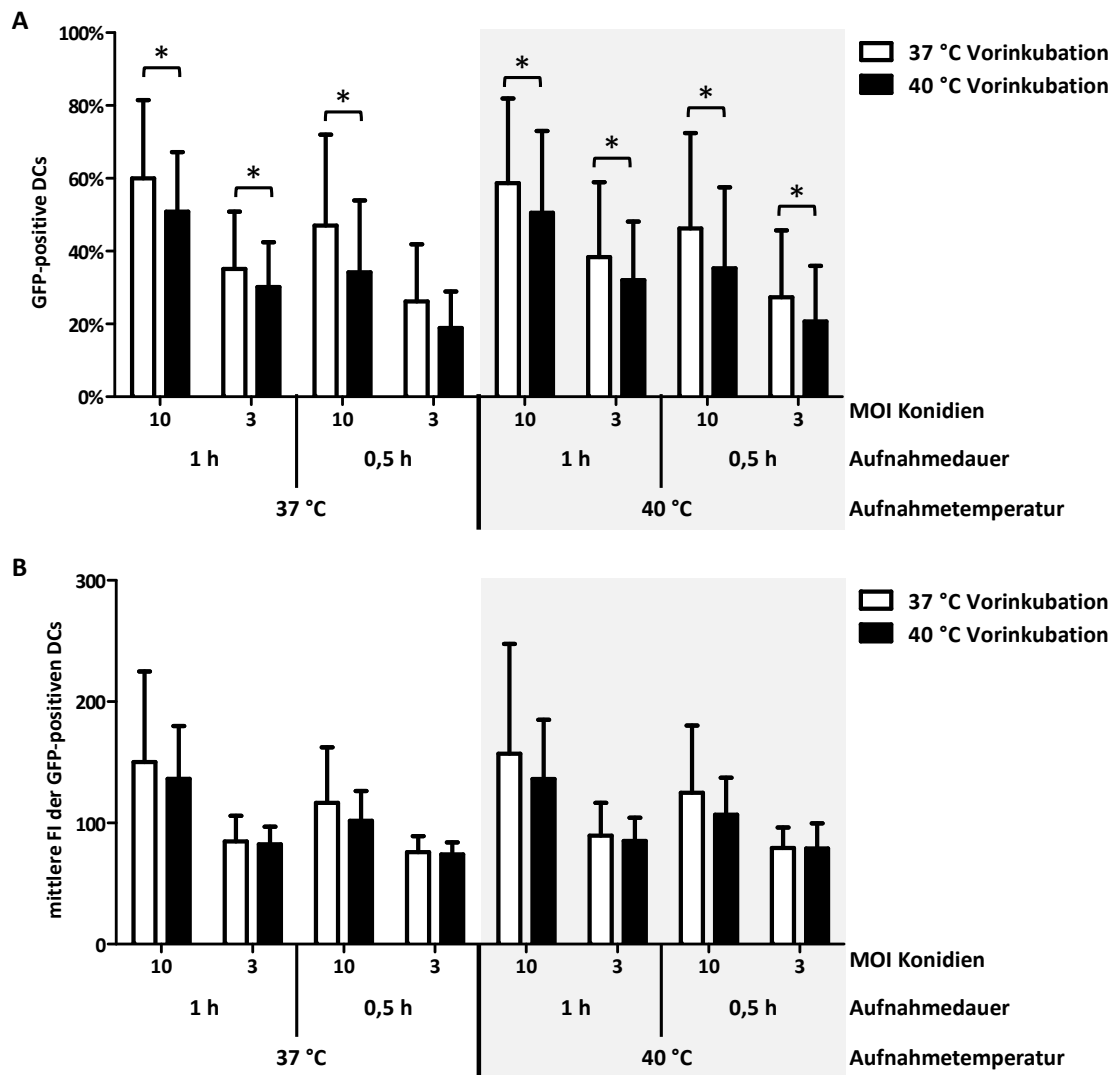


Abbildung 27: Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien unter Hyperthermie nach Vorinkubation bei Hyperthermie
 DCs nach 24 h Vorinkubation bei 37 °C (weiß) oder 40 °C (schwarz) und darauffolgender Inkubation mit GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien (MOI 10 oder 3) für 0,5 h oder 1 h bei 37 °C (weiß hinterlegt) oder 40 °C (grau hinterlegt). Mittelwerte + Standardabweichung, n = 5. Gepaarter Student t-Test, *p<0,05. Prozentsatz GFP-positiver DCs (Aufnahmerate, **A**) und mittlere FI der positiven DCs (Aufnahmestärke, **B**).
 Signifikant erniedrigte Aufnahmerate und Trend zu erniedrigter Aufnahmestärke von *A. fumigatus*-Konidien durch DCs nach Vorinkubation bei 40 °C.

Im Vergleich der Aufnahmetemperaturen zeigte die Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 27, weiß und grau hinterlegte Bereiche). Bei einer Vorinkubationstemperatur von 40 °C war die Aufnahmerate von *A. fumigatus*-Konidien im Vergleich zur Vorinkubation bei 37 °C jedoch signifikant reduziert (Abbildung 27 A, Vergleich der schwarzen mit den weißen Balken). Diese

Reduktion trat unabhängig von der Konzentration der Konidien, der Aufnahmedauer sowie der Aufnahmetemperatur (weiß und grau hinterlegte Bereiche) auf. Auch die Aufnahmestärke war nach Vorinkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C tendenziell erniedrigt (Abbildung 27 B).

Zusammenfassend zeigte sich somit bei der Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien und Dextran durch DCs eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Antigenaufnahme. Die Temperatur während der Inkubation mit dem Antigen oder einer kurzzeitigen Vorinkubation (1 h) hatte keinen signifikanten Einfluss, während eine längere Vorinkubation (24 h) bei 40 °C die Aufnahmerate von *A. fumigatus*-Konidien im Vergleich zur Vorinkubation bei 37 °C signifikant verringerte.

3.5 Expression von Oberflächenmarkern auf DCs unter Hyperthermie

DCs exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Proteine, deren Expression vor und nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli im Zusammenhang mit dem Funktionswandel der DCs (siehe Einleitung, Absatz 1.2.2) unterschiedlich hoch sein kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte genau charakterisiert werden, ob und wenn ja wie sich die Expression dieser Proteine durch die Inkubation bei Hyperthermie und Stimulation mit *A. fumigatus* verändert, um so auf mögliche Einflüsse fieberähnlicher Temperaturen auf DC-Funktionen schließen zu können. Dazu wurden die Gruppe der Reifemarker (CD25, CD40, CD80, CD83, CD86), der antigenpräsentierenden Moleküle (HLA1, HLA-DR), der DC-Marker CD1a, der PRR Dectin-1 sowie verschiedene migrationsassoziierte Moleküle (ICAM-1, CCR7) analysiert. Nach 24 h Inkubation ohne Stimulation oder unter Stimulation mit Zymosan oder inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen bei 37 °C oder 40 °C (CD25 und CD80 nur Zymosanstimulation durchgeführt) wurde durchflusszytometrisch die mittlere FI der Marker in jeder Probe bestimmt (Beschreibung im Methodenteil, Absatz 2.2.8). Diese wurde als Maß für die Expressionsstärke des Markers zwischen unstimulierten und stimulierten Proben sowie zwischen den beiden Inkubationstemperaturen verglichen.

3.5.1 Expression der Reifemarker CD25, CD40, CD80, CD83, CD86

Als Reifemarker werden verschiedene Proteine (CD25, CD40, CD80, CD83, CD86) bezeichnet, deren Expressionsstärke in DC-Studien zur Beurteilung der Zellreifung bestimmt wird. Diese Proteine sind beispielsweise als kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 für die T-Zell-Aktivierung durch DCs entscheidend ([31], siehe auch Absatz 1.2.2). Um diese wichtige Aufgabe der Aktivierung des adaptiven Immunsystems erfüllen zu können, exprimieren DCs oben genannte Moleküle nach Antigenkontakt im Rahmen ihrer Reifung verstärkt [19], weshalb sie als gutes Kriterium für die fortschreitende Maturierung der Zelle genutzt werden können (daher „Reifemarker“).

Die Expression von CD25 war nach 24 h Stimulation mit Zymosan im Vergleich zu unstimulierten DCs erhöht (Abbildung 28, bei 37 °C tendenziell, bei 40 °C signifikant, Signifikanz nicht eingezeichnet). Es zeigten sich bei beiden Bedingungen jedoch keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Inkubationstemperatur, auch nicht anhand der Einzelmesswerte (Abbildung 28 *links*). Daher wurde die Bestimmung der CD25-Expression an *A. fumigatus*-stimulierten DCs nicht zusätzlich durchgeführt.

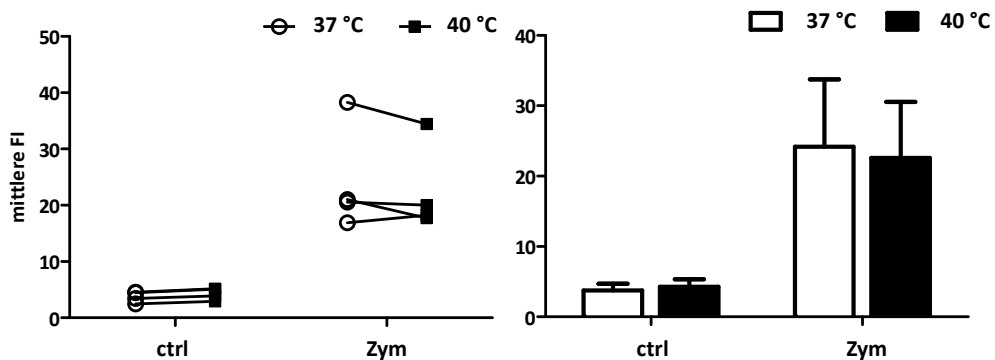


Abbildung 28: Expression von CD25 unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 °C (weiß) oder 40 °C (schwarz). *Links*: Einzelmesswerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI, n = 4.

Kein signifikanter Expressionsunterschied bei beiden Bedingungen.

Die CD40-, CD80-, CD83- und CD86-Expression war nach 24 h Stimulation mit Zymosan oder inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen im Vergleich zu unstimulierten DCs ebenfalls erhöht (Abbildung 29 A bis D. Bei CD80 nur Zymosanstimulation durchgeführt).

CD40 wurde unter allen Bedingungen nach Inkubation bei 40 °C niedriger exprimiert als bei 37 °C (Abbildung 29 A). Dieser Unterschied war jedoch nur bei *A. fumigatus*-stimulierten DCs signifikant und zeigte sich hier bei allen untersuchten Spendern (Abbildung 29 A, *A. fumigatus*, Einzelwerte links).

Die CD80- und CD83-Expression unterschied sich auf unstimulierten DCs zwischen beiden Inkubationstemperaturen nicht (Abbildung 29 B und C, ctrl). Nach Zymosanstimulation war die CD80-Expression bei 3/3 Spendern und die CD83-Expression bei 5/6 Spendern bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C erhöht (Abbildung 29 B und C links, Zym). Nach *A. fumigatus*-Stimulation war die CD83-Expression bei 3/3 Spendern bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C erhöht (Abbildung 29 C links, *A. fumigatus*). All diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Deutlichere Unterschiede zeigte die Expressionsanalyse des kostimulatorischen Moleküls CD86 (Abbildung 29 D): Dieser Marker war bei 40 °C sowohl nach Stimulation mit Zymosan oder *A. fumigatus*-Keimschläuchen, als auch auf unstimulierten DCs signifikant höher exprimiert als bei 37 °C. Dieser Effekt war bei jedem einzelnen Spender zu beobachten (Abbildung 29 D links).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass Hyperthermie die Expression der Reifemarker CD86 (signifikant), CD80 und CD83 verstärkte und die CD40-Expression leicht reduzierte. Ein signifikanter Effekt auf die CD80-Expression zeigte sich in einem weiteren, von der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuch (siehe Absatz 3.5.6).

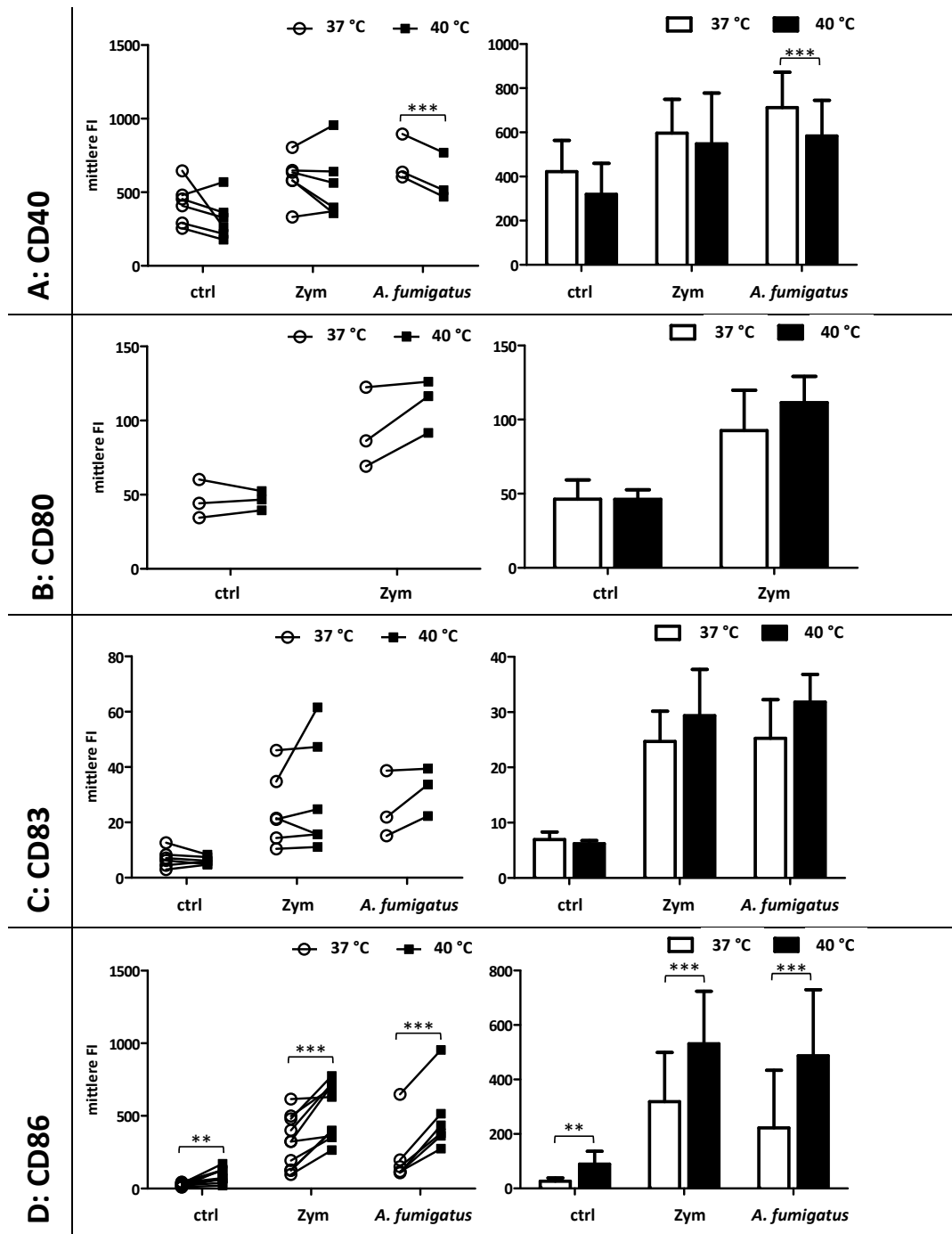


Abbildung 29: Expression von CD40, CD80, CD83 und CD86 unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). *Links*: Einzelwerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI. Gepaarter Student t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

A: CD40: ctrl, Zym: n = 6, *A. fumigatus*: n = 3. Reduzierte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

B: CD80: n=3. Erhöhte Expression bei 40 °C nach Stimulation.

C: CD83: ctrl, Zym: n = 6, *A. fumigatus*: n = 3. Erhöhte Expression bei 40 °C nach Stimulation.

D: CD86: ctrl, Zym: n = 10, *A. fumigatus*: n = 6. Signifikant erhöhte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

3.5.2 Expression der antigenpräsentierenden Moleküle HLA1 und HLA-DR

Antigenpräsentierende Moleküle werden ebenfalls auf maturierenden DCs hochreguliert und können somit als zusätzliches Reifekriterium hinzugezogen werden [19]. Es wurde die Expression von HLA1 (MHC-Klasse I) sowie von HLA-DR (MHC-Klasse II) bestimmt.

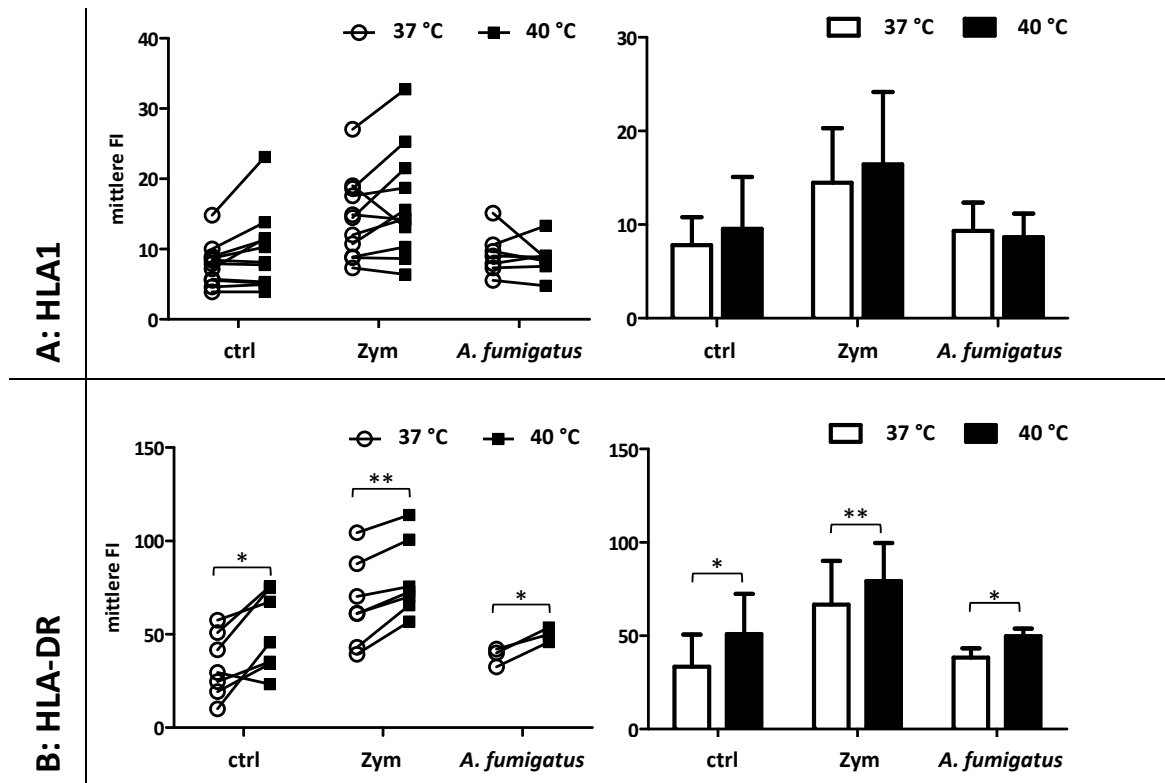


Abbildung 30: Expression von HLA1 und HLA-DR unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz).
Links: Einzelwerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI.
 Gepaarter Student t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A: HLA1: ctrl, Zym: n = 11, *A. fumigatus*: n = 7.

Kein signifikanter Expressionsunterschied bei allen Bedingungen.

B: HLA-DR: ctrl, Zym: n = 7, *A. fumigatus*: n = 3.

Signifikant erhöhte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

Die HLA1-Expression war im Vergleich zu unstimulierten DCs nur nach Stimulation mit Zymosan signifikant erhöht (Abbildung 30 A Zym, Signifikanz nicht eingezeichnet); *A. fumigatus*-Stimulation führte zu keinem signifikanten Expressionsanstieg. Es ließ

sich kein Trend zugunsten einer der beiden Inkubationstemperaturen, auch nicht anhand der Einzelmesswerte (Abbildung 30 A links), feststellen.

Die HLA-DR-Expression wurde (ebenso wie bei HLA1) im Vergleich zu unstimulierten DCs nur durch Stimulation mit Zymosan, nicht durch *A. fumigatus*, induziert (Abbildung 30 B, Zym). Im Temperaturvergleich war die HLA-DR-Expression bei allen 3 Bedingungen bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C signifikant erhöht (Abbildung 30 B). Die Einzelmesswerte zeigten, dass diese höhere Expression bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C für jeden Spender bei jeder Bedingung (bis auf einen Spender bei unstimulierten DCs) bestand (Abbildung 30 B links).

Die Expression von HLA-DR auf DCs scheint also im Gegensatz zur HLA1-Expression durch Hyperthermie signifikant verstärkt zu werden. Ein weiterer von der Arbeitsgruppe durchgeführter Versuch zeigte allerdings keinen signifikanten, sondern nur einen tendenziellen Effekt der Hyperthermie auf die HLA-DR-Expression (siehe Absatz 3.5.6).

3.5.3 Expression des moDC-Markers CD1a

CD1a ist ein klassischer Marker für moDCs und wird auf unreifen DCs stark exprimiert [74].

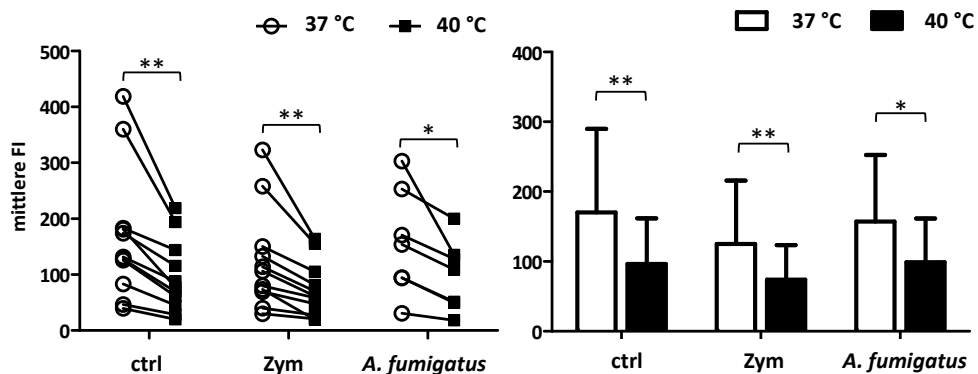


Abbildung 31: Expression von CD1a unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). *Links*: Einzelmesswerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI. ctrl, Zym: n = 11; *A. fumigatus*: n = 7. Gepaarter Student t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Signifikant reduzierte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

Die CD1a-Expression wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Generierung von DCs bei jedem durchgeführten Versuch an einer Probe mitbestimmt (siehe Absatz 3.1). Die genaue Charakterisierung des Expressionsverhaltens zeigte eine verminderte CD1a-Expression nach Stimulation im Vergleich zu unstimulierten DCs (nach Zymosanstimulation signifikant, nach Stimulation mit *A. fumigatus* tendenziell, Abbildung 31, Signifikanz nicht dargestellt). Bei 40 °C bestand außerdem im Vergleich zu 37 °C eine signifikant erniedrigte CD1a-Expression bei allen 3 Bedingungen sowie bei jedem einzelnen Spender (Abbildung 31, Einzelwerte *links*).

3.5.4 Expression des PRR Dectin-1

Dectin-1 ist ein wichtiger PRR auf DCs und erkennt den Zellwandbestandteil β -1,3-Glucan von *A. fumigatus* [22].

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich, war die Expression von Dectin-1 auf unstimulierten DCs am höchsten und nach Zymosan- oder *A. fumigatus*-Stimulation verringert. Zudem war Dectin-1 sowohl auf unstimulierten DCs als auch nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* bei 40 °C signifikant niedriger exprimiert als bei 37 °C. Der Vergleich der Einzelwerte zeigte die niedrigere Expression bei 40 °C bei jedem einzelnen Spender (Abbildung 32 *links*).

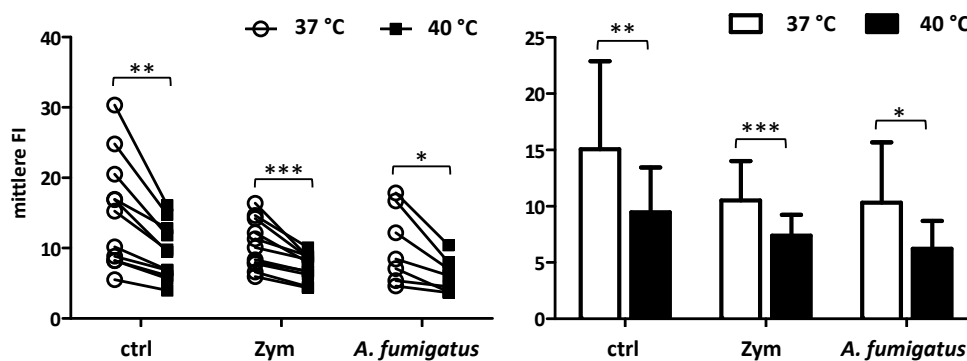


Abbildung 32: Expression von Dectin-1 unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 μ g/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). *Links*: Einzelwerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI. ctrl, Zym: n = 11; *A. fumigatus*: n = 7. Gepaarter Student t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Signifikant reduzierte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

3.5.5 Expression der migrationsassoziierten Moleküle ICAM-1 und CCR7

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Oberflächenproteine ICAM-1 und CCR7, die für die Migration reifer DCs in den Lymphknoten essentiell sind [37; 38], analysiert.

ICAM-1 wurde nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* signifikant höher exprimiert als auf unstimulierten DCs (Abbildung 33 A, Signifikanz nicht dargestellt). Im Temperaturvergleich zeigte sich auf unstimulierten DCs kein Unterschied, nach Zymosanstimulation war eine signifikant höhere Expression bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C messbar (Abbildung 33 A). Bei *A. fumigatus*-Stimulation bestanden keine signifikanten Temperaturunterschiede; auch anhand der Einzelmesswerte wurde kein deutlicher Trend ersichtlich (Abbildung 33 A links).

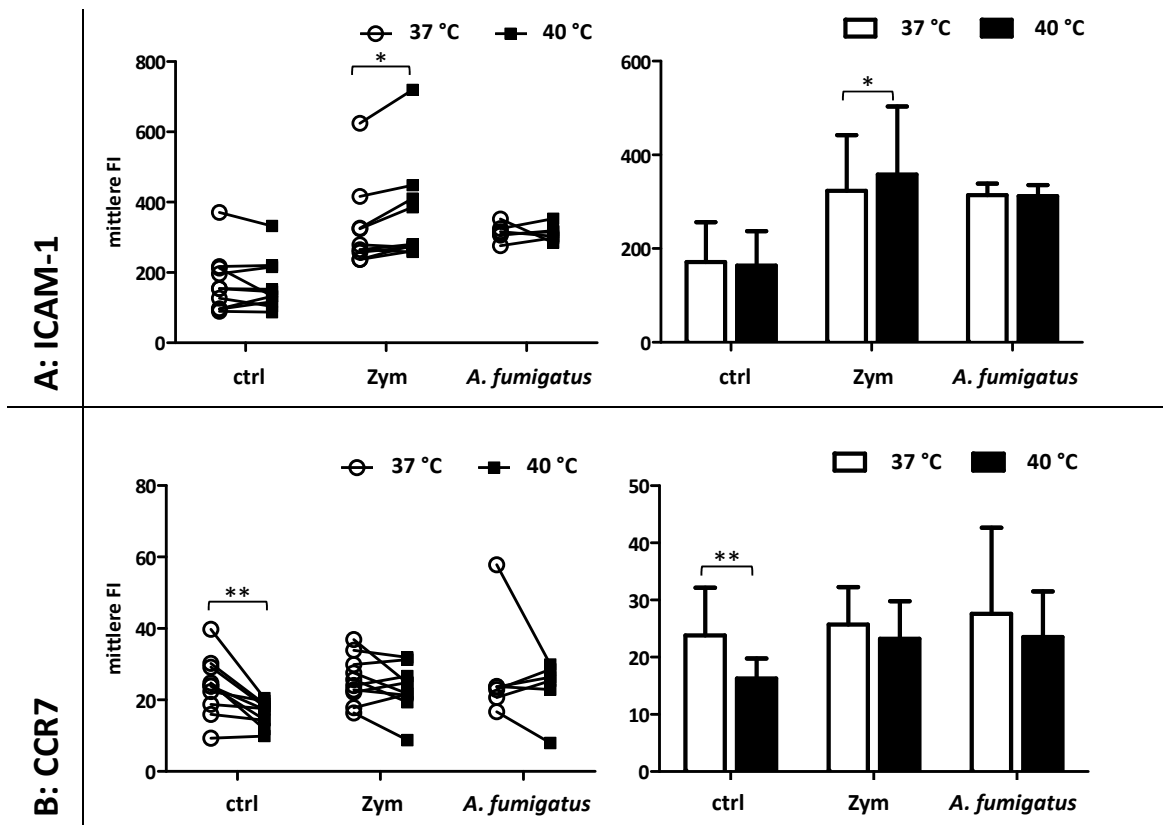


Abbildung 33: Expression von ICAM-1 und CCR7 unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz). *Links*: Einzelmesswerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI. ctrl, Zym: n = 10; *A. fumigatus*: n = 6. Gepaarter Student t-Test, *p<0,05, **p<0,01.

A: ICAM-1: Signifikant erhöhte Expression nach Zymosanstimulation bei 40 °C.

B: CCR7: Signifikant erniedrigte Expression bei unstimulierten DCs bei 40 °C.

Die CCR7-Expression nahm nach Stimulation mit Zymosan oder *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten DCs nicht deutlich zu. Auf unstimulierten DCs zeigte sich eine signifikant verminderte Expression nach Inkubation bei 40°C im Vergleich zu 37 °C (Abbildung 33 B). Nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* zeigten sich keine signifikanten Temperaturunterschiede, auch anhand der Einzelmesswerte war kein eindeutiger Trend zugunsten einer der beiden Inkubationstemperaturen feststellbar (Abbildung 33 B links).

Nach Stimulation von DCs mit Zymosan oder *A. fumigatus*-Keimschläuchen wurde somit die Expression von ICAM-1 durch Hyperthermie minimal induziert (bei Zymosanstimulation), die Expression von CCR7 jedoch nicht beeinflusst (diese war auf unstimulierten DCs hingegen unter Hyperthermie reduziert).

3.5.6 Erneute Analyse der Expression von CD80 und HLA-DR

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter dem Titel „Fever-range temperature modulates activation and function of human dendritic cells confronted with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*“ publiziert [75]. Zur Vervollständigung der Daten für diesen Artikel wurde die Expressionsanalyse von CD80 und HLA-DR noch einmal von Mirjam Fliesser und Hannes Schlossnagel (Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt. In der wiederholten Analyse zeigte sich eine nun signifikant erhöhte Expression von CD80 bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C auf unstimulierten DCs und nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* (Abbildung 34 A, tendenzieller Effekt bei Versuchen dieser Arbeit bei ausschließlich durchgeführter Zymosanstimulation, siehe Absatz 3.5.1). Die Expression von HLA-DR hingegen zeigte nun bei allen Bedingungen nur tendenzielle, keine signifikanten Temperaturunterschiede (Abbildung 34 B, signifikant erhöhte Expression unter Hyperthermie bei Versuchen dieser Arbeit, siehe Absatz 3.5.2). Parallel wurde ebenfalls die Viabilität kontrolliert, hier zeigte sich bei unstimulierten DCs ein leicht verringerter Anteil von DCs an der Gesamtzellzahl bei Inkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C (Daten nicht gezeigt, keine Unterschiede in den Versuchen dieser Arbeit, Absatz 3.2.2).

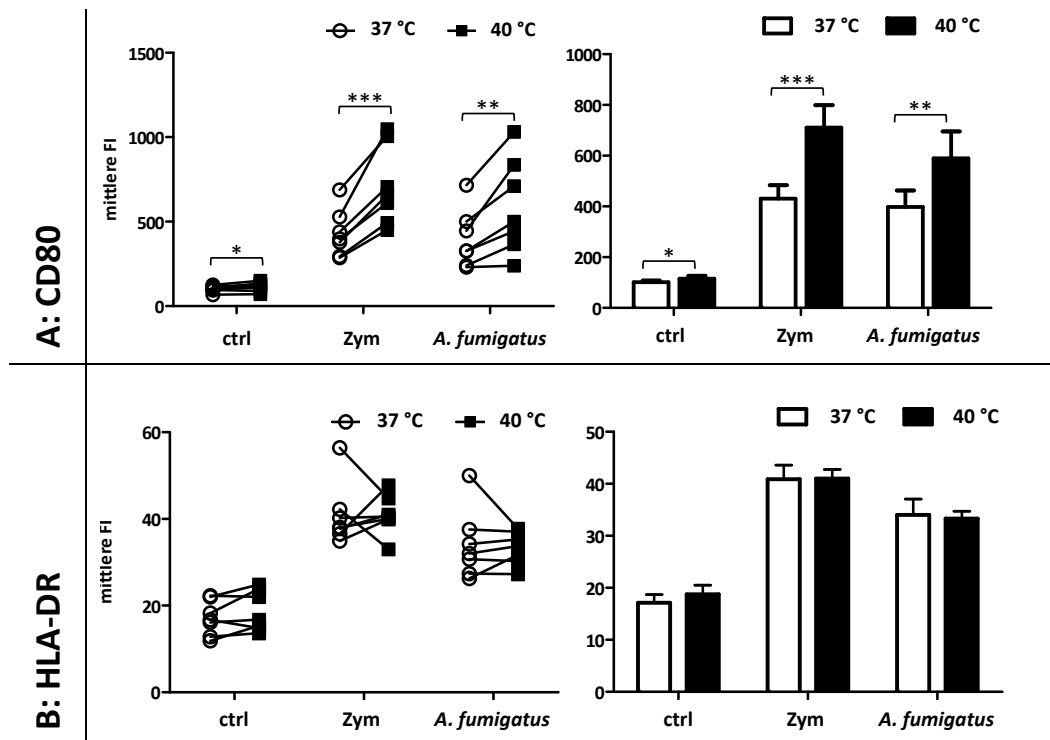


Abbildung 34: Erneute Analyse der CD80 und HLA-DR Expression unter Hyperthermie

DCs nach 24 h Stimulation mit Zymosan (10 µg/ml, **Zym**) bzw. inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (MOI 1, **A. fumigatus**) oder ohne Stimulation (**ctrl**) bei 37 (weiß) oder 40 °C (schwarz).
Links: Einzelwerte der mittleren FI. *Rechts*: Mittelwerte + Standardabweichung der mittleren FI.
 Gepaarter Student t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. n = 7.

A: CD80: Signifikant erhöhte Expression bei 40 °C bei allen Bedingungen.

B: HLA-DR: Keine signifikanten Temperaturunterschiede.

4 Diskussion

Die IA ist eine systemische Infektionserkrankung, die durch den Schimmelpilz *A. fumigatus* verursacht wird. Trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie ist sie eine gefürchtete Infektionserkrankung immunsupprimierter Patienten. Daher ist es von großem Interesse, pathogenetische Faktoren der Erkrankung genau zu verstehen. Mehrere Studien haben bereits die Interaktion des menschlichen Immunsystems mit *A. fumigatus* untersucht. Bei der Analyse dieser Interaktion wurden physiologische Aspekte wie eine erhöhte Körpertemperatur jedoch bis dato nicht in Betracht gezogen. Unter den unspezifischen Symptomen der IA, wie Husten oder Atemnot, ist Fieber allerdings das häufigste [13]. Der Pilz *A. fumigatus* ist zudem sehr thermotolerant und hat sein Wachstumsoptimum im Bereich der menschlichen Körpertemperatur [10].

Bei vielen Infektionserkrankungen ist der Einfluss einer erhöhten Körpertemperatur schon lange von Interesse: *in vivo* Studien zeigten beispielsweise bei Kindern mit Varizellen-Infektionen eine kürzere Krankheitsdauer bei Patienten mit Fieber im Vergleich zu Patienten unter antipyretischer Therapie [56]. Auch *in vitro* wird der Einfluss einer erhöhten Temperatur auf verschiedene Immunzelltypen aktuell intensiv untersucht. Hierbei ist Hyperthermie neben ihrer Rolle bei Infektionserkrankungen unter anderem in der onkologischen Therapieforschung bedeutsam. Dort wird der Einsatz von Hyperthermie als Adjuvans bei der Generierung antigenspezifischer, gegen Tumorzellen gerichteter DCs erprobt [62].

Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Analyse des Einflusses fieberähnlicher Temperaturen auf die humane *in vitro* Immunantwort gegenüber *A. fumigatus*. Als Immunzelltyp wurden DCs verwendet, da sie eine wichtige Rolle in der *A. fumigatus*-Abwehr spielen (beschrieben im Einleitungsteil Absatz 1.2.2). Ihre entscheidende Bedeutung liegt in der Verknüpfung der angeborenen mit der adaptiven Immunantwort. Um diese Verknüpfung zu ermöglichen, verändern sich nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli die biologischen Eigenschaften der DC, wie Zytokinfreisetzung, Aufnahme von Antigenen, Migrationsaktivität und Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, entscheidend [19]. Daher können diese DC-Eigenschaften unter verschiedenen

Stimulationsbedingungen beleuchtet werden, um so einen Einfluss des jeweiligen Stimulus genau zu charakterisieren. Diese Arbeit bietet somit eine differenzierte Analyse des Einflusses von Hyperthermie auf verschiedenste Ebenen der DC-Funktion bei Stimulation mit dem Pathogen *A. fumigatus*.

4.1 Festlegung des Hyperthermieprotokolls und Viabilität der DCs

Mehrere publizierte Studien zum Einfluss der Hyperthermie auf die Funktion von DCs arbeiteten mit unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiträumen. Manche Arbeiten mit sogenannten „Hitzeschock“-Protokollen verwendeten Temperaturen von bis zu 42 °C und kurze Inkubationszeiten von beispielsweise 30 min [76]. In anderen Studien zum Einfluss von Hyperthermie im Rahmen fieberähnlicher Temperaturen wurden DCs für bis zu 24 h bei 39-40 °C inkubiert [59; 77]. Teilweise wurde die erhöhte Temperatur mehrmals kurzzeitig während des Generierungsprozesses der DCs appliziert [78] bzw. die DCs nach der Hitzebehandlung nochmals bei 37 °C adaptiert [61]. In diesen Arbeiten wurden humane moDCs oder aus dem Knochenmark von Mäusen generierte DCs (bone marrow-derived DCs, BMDCs) eingesetzt.

Um eine Temperatur zu bestimmen, die von DCs ohne signifikanten Viabilitätsverlust toleriert wird, führte ich zunächst eine Vorversuchsreihe durch. DCs wurden mit Zymosan über 1 h, 2 h, 4 h und 6 h bei 37 °C und 42 °C sowie über 17 h und 23 h bei 37 °C und 39 °C inkubiert, um einen vermehrten Zelltod bereits unter diesen Inkubationsbedingungen auszuschließen. Da die Viabilität der DCs erhalten war, legte ich anschließend das Hyperthermieprotokoll für diese Arbeit – in Anlehnung an *Knippertz et al.* [59] – auf 24 h Inkubation bei 40 °C (Kontrollen bei 37 °C) fest. Unter dem definierten Hyperthermieprotokoll wurden anschließend ebenfalls die Raten lebender, früh- und spätapoptotischer Zellen bei unstimulierten DCs sowie nach Stimulation von DCs mit Zymosan und nun auch mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen untersucht.

Sowohl unter den Bedingungen des definierten Protokolls, als auch bei den Vorversuchen zeigte sich kein signifikanter Viabilitätsunterschied zwischen den Temperaturgruppen. Sowohl der Anteil der lebenden, als auch der der früh- und spätapoptotischen Zellen war bei Normo- und Hyperthermie vergleichbar. Auch bei

zunehmender Inkubationsdauer (bis 24 h) war die Viabilität der DCs unter Hyperthermie erhalten. Nach 17 h und 23 h war der Anteil frühapoptotischer Zellen etwas geringer (und damit der Anteil lebender Zellen etwas höher) als in der 1-6 h Stimulationsreihe (siehe Abbildung 16, Seite 44). Für diese 2. Reihe wurden allerdings Zellen eines neuen, unabhängigen Spenders verwendet; solch spenderabhängige Schwankungen im Anteil apoptotischer Zellen konnten auch in den folgenden Versuchen festgestellt werden. Da diese Unterschiede stets beide Inkubationstemperaturen betrafen, waren sie eher als spenderabhängiger Effekt, nicht als temperaturinduzierte Veränderung, anzunehmen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit weiteren Studien, die ebenfalls eine unveränderte Viabilität von unstimulierten moDCs und BMDCs sowie von Zytokincocktailgereiften moDCs nach Inkubation bei Hyperthermie (bis 40 °C) zeigen konnten [59; 61; 79]. Erst Temperaturen von 41 °C über 24 h bewirkten eine verminderte Viabilität unstimulierter BMDCs [61]. *Hatzfeld-Charbonnier et al.* führten eine detaillierte Versuchsreihe zum Einfluss von Hyperthermie auf die Viabilität unstimulierter moDCs durch. Hier zeigte sich, dass Temperaturen von 42 °C und 43 °C bereits nach 60 min hochtoxisch für die Zellen waren, während Temperaturen von 41 °C und 41,5 °C erst nach 24 h und 48 h zu Viabilitätsverlusten führten. Niedrigere Temperaturen bewirkten analog zu meinen Ergebnissen jedoch keine Viabilitätsveränderungen [78].

Nach Stimulation mit *A. fumigatus* zeigten sich in meinen Versuchen im Vergleich zu unstimulierten DCs bei beiden Temperaturen eine nahezu unveränderte Viabilität und lediglich ein leicht reduzierter Anteil der DCs an der Zahl der Gesamt Ereignisse. In bisherigen Versuchen der Arbeitsgruppe, war der Anteil toter DCs nach Pilzstimulation häufig leicht erhöht [mündliche Mitteilung].

Insgesamt hatte eine 24-stündige Inkubation und Stimulation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C also keine signifikanten Auswirkungen auf die Viabilität von DCs. Eine veränderte Lebensdauer von DCs unter Hyperthermie, die die Immunantwort beeinflussen könnte, wurde somit ausgeschlossen. Die erhaltene Viabilität unter Hyperthermie war außerdem eine wichtige Grundlage für die folgenden Versuche, damit der Einfluss einer reduzierten Zellzahl auf deren Ergebnisse ausgeschlossen war. Aus diesem Grund

wurde auch parallel zu jedem weiteren Versuch der Anteil toter Zellen innerhalb der DC-Population bei beiden Temperaturen kontrolliert.

4.2 Zytokinexpression und -sekretion durch DCs

Reife DCs sezernieren eine Reihe unterschiedlicher Zyto- und Chemokine, die eine wichtige Bedeutung in der Koordination der Immunantwort haben (siehe Absatz 1.2.2.3). Daher erstellte ich ein differenziertes Profil der Zytokininduktion in DCs, indem ich sowohl Expression als auch Sekretion der Zytokine nach verschiedenen Inkubationszeiträumen mit zwei unterschiedlichen Stimuli (Zymosan und *A. fumigatus*) bestimmte und die Beeinflussung der Zytokininduktion durch fieberähnliche Temperaturen analysierte.

Bei insgesamt 13 untersuchten Zytokinen wurde von einigen Proteinen Genexpression und Sekretion in das umgebende Medium (teilweise im Zeitverlauf), von anderen Proteinen jedoch nur eines der beiden bestimmt. Der labortechnische Aufwand und die Vorgaben des 10-Plex Panels (zur Sekretionsanalyse, siehe Absatz 2.2.6.4) waren Gründe, weshalb nicht von allen Zytokinen ein vollständiges Profil bezüglich Expression und Sekretion erstellt werden konnte. Darüber hinaus hatten sich für einige Zytokine in ersten Versuchen keine Temperaturunterschiede gezeigt, weshalb weitere Analysen zur genaueren Differenzierung nicht sinnvoll erschienen.

Unstimulierte DCs bildeten keine Zytokine. Die Sekretion und/oder Expression von IL1B, IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12B, TNF, IFN γ , und CCL20 konnte durch Inkubation mit *A. fumigatus* bei beiden Temperaturen induziert werden und nahm teilweise im Zeitverlauf weiter zu (siehe Absatz 3.3.3). Eine CXCL10-Expression wurde nur inkonstant induziert; die IL6- und IL10-Expression war im Vergleich zu den anderen Zytokinen relativ schwach. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit weiteren Studien, bei denen DCs beispielsweise mit Antigenpräparationen von *A. fumigatus* stimuliert wurden (IL12B- und TNF-Expression erhöht [23]). *Mezger et al.* konnten eine Zytokininduktion durch *A. fumigatus*-Keimschläuche in DCs zeigen, die ebenfalls zeitabhängig (bis 6 h) war. Hier wurden vergleichbar zu den Resultaten dieser Arbeit IL10 und CXCL10 nur sehr schwach exprimiert, während CCL20 das am stärksten induzierte Zytokin war [22].

Diese Arbeit stellte jedoch keine Vergleiche der Zymosan- zur *A. fumigatus*-Stimulation an. In meinen Versuchen induzierte die Stimulation mit Zymosan die Zytokinexpression und -sekretion deutlich schwächer als *A. fumigatus*. Lediglich die Expression von IL12B sowie von IL6 und CXCL10 bei je einem Spender konnte durch Zymosan in ähnlichem Ausmaß wie durch *A. fumigatus*-Keimschläuche induziert werden. Außerdem blieb die schwache Induktion durch Zymosan im Zeitverlauf konstant bis abnehmend, während die Induktion durch aktive *A. fumigatus*-Keimschläuche stark zunahm. Möglicherweise lässt sich der Effekt im Zeitverlauf dadurch erklären, dass der Pilz mit fortschreitender Inkubationszeit wuchs und die Zellen immer stärker zu stimulieren vermochte. Mikroskopisch war in den Zellkulturschalen nach 12 h ein sehr großes Myzel zu sehen. Zymosan hingegen könnte abgebaut und dessen stimulierender Effekt somit im Laufe der Zeit geringer geworden sein.

Die im Zeitverlauf zunehmende Zytokinexpression und -sekretion bestand sowohl bei 37 °C als auch bei 40 °C. Einen ebenfalls im Zeitverlauf (bis 48 h) kontinuierlichen Anstieg der Sekretion von IL12B unter Hyperthermie konnte auch an DCs, die mit dem bakteriellen Extrakt Ribomunyl bei 39,5 °C stimuliert wurden, gezeigt werden [80].

Im Temperaturvergleich trat bei unstimulierten DCs keine Zytokininduktion durch Inkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C auf. Dies zeigt, dass fieberähnliche Temperaturen alleine keine Zytokine induzieren können. Auch *Joshi et al.* konnten durch Inkubation unstimulierter BMDCs bei 42 °C für 30 min keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion zeigen [76]. Auch 18- oder 24-stündige Inkubation von unstimulierten BMDCs bei 39 °C oder 40 °C [77; 81] oder 24-stündige Inkubation von moDCs bei 39,5 °C oder 40 °C [59; 80] hatten ebenso wie Hitzeschocks von bis zu 41,5 °C während des Generierungsprozesses von moDCs keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinsekretion [78].

Die Expression und Sekretion der Zytokine durch *A. fumigatus*-stimulierte DCs wurde durch die verschiedenen Inkubationstemperaturen nur geringfügig beeinflusst: Es bestand lediglich ein Trend zu einer leicht vermehrten Sekretion von IL8, TNF und IL10 unter Hyperthermie (Abbildung 19, Seite 51), während deren Expression nicht eindeutig beeinflusst wurde. Außerdem waren die Expression und Sekretion von IL6 und IL1B (Abbildung 20, Seite 52) und die Expression von IL12B (Abbildung 21, Seite 53) bei

40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht reduziert. IL2, IL5, CXCL10, CCL20 und IFN γ zeigten keinerlei klare Temperaturunterschiede. Eine Vorinkubation (24 h) bei 40 °C vor *A. fumigatus*-Stimulation verstärkte den Einfluss der Hyperthermie auf die Zytokinexpression ebenfalls nicht. Um der *in vivo* Realität der IA näher zu kommen, hätten die Versuche auch immer direkt mit Vorinkubation über 24 h durchgeführt werden können. Die Versuche zur Antigenaufnahme – die Hinweise auf die Bedeutung der Vorinkubation erbracht hatten – wurden zeitlich allerdings erst nach den Zytokinversuchen durchgeführt, dieses Ergebnis war also noch nicht bekannt.

Meine Ergebnisse an stimulierten DCs stehen somit teilweise im Gegensatz zu weiteren Studien, in denen DCs unter Hyperthermie mit anderen Stimuli inkubiert wurden. Diese Arbeiten zeigten häufig signifikante, bei Vergleich der Studien jedoch unterschiedliche Einflüsse der erhöhten Temperatur auf die Zytokinsekretion stimulierter DCs (jeweils im Vergleich zur Stimulation bei 37 °C): *Tournier et al.* konnten eine verstärkte IL12B- und eine verminderte IL10- und TNF-Sekretion durch BMDCs nach 18 h Inkubation bei 39 °C oder 40 °C und Maturierung mit LPS oder *Salmonella (S.) typhimurium* zeigen [77]. IL12B wurde auch von humanen moDCs nach Stimulation mit Ribomunyl über 24 h bei 39,5 °C vermehrt sezerniert, hier wurden allerdings IL10 und TNF nicht beeinflusst [80]. Auch mehrmalige Hitzeschocks bis 41,5 °C während und nach der moDC-Generierung bewirkten eine verstärkte IL12B-Sekretion (nach LPS-Stimulation), hier war die IL10-Sekretion jedoch ebenfalls erhöht und die TNF-Sekretion unverändert [78]. Kurzzeitige starke Hyperthermie (30 min) von 42 °C und Reifung von BMDCs mit LPS bewirkte hingegen eine verminderte IL12B-, leicht erhöhte IL10- und unveränderte TNF-Sekretion [76]. Bei *Knippertz et al.* hatte eine 24-stündige Hyperthermie von 40 °C (Maturierung mit Zytokincocktail) keinen Einfluss auf IL12B, IL6 und IL1B, bewirkte jedoch eine verstärkte IL10- und TNF-Sekretion durch moDCs [59]. Analog zu meinen Daten konnten diese Studie außerdem keine Temperaturunterschiede für IL2 und IL5 zeigen.

Der Vergleich oben genannter publizierter Studien zeigt also, dass der Einfluss der erhöhten Temperatur auf die Induktion einzelner Zytokine bei stimulierten DCs stark

vom verwendeten Hyperthermieprotokoll (Temperaturhöhe, Dauer, Erholungsphase), Zelltyp und applizierten Stimulus abhing.

Eine im wesentlichen erhaltene Zytokinfreisetzung durch DCs unter Hyperthermie könnte für den Verlauf der IA Bedeutung haben: Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Zytokinen, z. B. an TNF durch Behandlung mit TNF-Antagonisten, eine Prädisposition für IA darstellt [82]. Die leicht verminderte Sekretion der endogenen Pyrogene IL1B und IL6 unter Hyperthermie könnte einen Schutz vor zu starker Fieberentwicklung darstellen, allerdings war die Reduktion der Sekretion dieser Zytokine in meinen Versuchen nicht signifikant. Das Fehlen einer vermehrten Zytokinproduktion bei Hyperthermie hingegen könnte einen protektiven Mechanismus darstellen, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden. Die genauen Mechanismen des Einflusses von Hyperthermie sowie mögliche Rückkopplungen und Wechselwirkungen der Zytokine auf ihre Freisetzung aus DCs, können hier Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.3 Antigenaufnahme durch DCs

Die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen ist eine wichtige Eigenschaft unreifer DCs. Nach der Antigenaufnahme reifen DCs, um diese an das adaptive Immunsystem präsentieren zu können und reduzieren im Rahmen dieses Prozesses ihre endozytotische Kapazität. Unreife DCs zeichnen sich also durch eine hohe Fähigkeit zur Antigenaufnahme aus, während reife DCs eine niedrigere Aufnahmeaktivität zeigen [19].

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte ich durch den Vergleich verschiedener Inkubationszeiträume und Substratmengen ein geeignetes Versuchsprotokoll zur Analyse der Antigenaufnahme durch DCs. Ich setzte Dextran (als Modellsubstanz für die Antigenaufnahme) sowie *A. fumigatus*-Konidien ein. Ich konnte die erfolgreiche Aufnahme von Dextran und Konidien durch DCs sowohl bei 37 °C als auch bei 40 °C, wie in anderen Arbeiten bereits gezeigt [33; 72; 78; 83], bestätigen.

Weiterhin zeigte sich eine signifikante Zeitabhängigkeit der Dextranaufnahme sowie eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch DCs. Dies steht im Einklang mit einer Arbeit von *Gafa et al.*, die nach 2-stündiger

Koinkubation im Vergleich zu 30 min (bei 37 °C) einen erhöhten Anteil an moDCs mit adhären A. *fumigatus*-Konidien zeigen konnte [34].

Bezüglich des Einflusses von Hyperthermie zeigte sich in meinen Versuchen im Temperaturvergleich nach kurzzeitiger Hyperthermie (1 h) kein signifikanter Unterschied der Aufnahme von Dextran oder A. *fumigatus*-Konidien durch DCs. Eine mehrmalige, kurzzeitige Hitzebehandlung (bis 41,5 °C) während des Generierungsprozesses von moDCs durch *Hatzfeld-Charbonnier et al.* beeinflusste die Aufnahmekapazität für Dextran ebenfalls nicht [78]. Bei murinen peritonealen Makrophagen hingegen führte eine kurzzeitige Hyperthermie von 39 °C über 2 h zu einer Erhöhung der Phagozytoserate von Hefepartikeln, während bei 41 °C (ebenfalls 2 h) die Phagozytoserate im Vergleich zur Normothermie deutlich erniedrigt war [84].

Durch langfristigen (24 h) Einfluss fieberähnlicher Temperaturen konnte ich hingegen eine signifikante Reduktion der Aufnahme von A. *fumigatus*-Konidien (nicht aber von Dextran) durch DCs zeigen (Abbildung 27, Seite 61). Möglicherweise war diese verringerte Aufnahme durch eine verstärkte Reifung der DCs bei 24-stündiger Inkubation unter Hyperthermie bedingt. Eine verringerte Aufnahmekapazität für Antigene stellt bekanntermaßen ein Charakteristikum reifer DCs dar [19] und konnte beispielsweise an TNF-maturierten DCs im Vergleich zu unreifen DCs gezeigt werden [74].

In Einklang mit einer reduzierten Aufnahme unter Hyperthermie steht das Ergebnis einer erhöhten Expression von Reifemarkern (Diskussion in Absatz 4.4), was die These einer Reifungsinduktion durch Hyperthermie stützt. Dass die verringerte Aufnahmekapazität durch einen reduzierten Anteil lebender Zellen bedingt sein könnte, hatte ich durch begleitende Viabilitätsprüfungen ausgeschlossen. Für zukünftige Studien wären konfokalmikroskopische Versuche interessant, um Temperaturunterschiede auch in Bezug auf Adhärenz oder Internalisierung der Konidien genauer zu klären.

Die Aufnahme von Dextran hingegen wurde durch die 24-stündige Vorinkubation bei 40 °C nur minimal beeinflusst. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass Dextran durch einen anderen Mechanismus als Konidien aufgenommen wird, wie *Sallusto et al.* beschrieben [73]. Diese Arbeit zeigte jedoch unter anderem, dass die Aufnahme von

Dextran durch LPS-gereifte DCs geringer ist als durch unreife DCs, Reifung die Dextran-aufnahme also reduziert. Möglicherweise bewirkt nun aber Hyperthermie eine DC-Reifung über einen anderen Mechanismus, der die Dextranaufnahme kaum beeinflusst, als bakterielle Stimuli wie LPS. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass DCs unter Hyperthermie verstärkt reifen könnten, die Aufnahme von Dextran im Gegensatz zur Aufnahme von Konidien jedoch nicht beeinflusst würde. Um dies genauer zu klären, müssen beteiligte Signalwege und der Mechanismus, über den Hyperthermie eine DC-Reifung bewirken könnte ebenso wie dessen Auswirkung auf den Aufnahme-mechanismus von Dextran genau analysiert werden.

4.4 Oberflächenmarkerexpression auf DCs

DCs können über ein spezifisches Expressionsmuster an Oberflächenmarkern charakterisiert werden. Diese Moleküle dienen den spezifischen Funktionen der DCs, daher unterscheidet sich ihre Expressionsstärke im Rahmen des Aufgabenwandels für unreife und reife DCs ([19], siehe auch Einleitung Absatz 1.2.2). Durch die Analyse von Oberflächenmarkern verschiedener Funktionsgruppen (PRR, Rezeptoren zur T-Zell-Aktivierung, migrationsassoziierte Moleküle) sowohl unter Zymosan-, als auch unter *A. fumigatus*-Stimulation, war eine genaue Charakterisierung des Einfluss von Hyperthermie auf die verschiedenen DC-Funktionen möglich.

Primär konnte ich über die Oberflächenmarkerexpression zeigen, dass die Generierung von DCs aus Monozyten nach dem bekannten Protokoll (5-tägige Stimulation mit IL4 und GM-CSF [20]) erfolgreich war: Es verlor sich die CD14-Expression der Monozyten, dafür wurde CD1a exprimiert. Diese Voraussetzung konnte ich bei allen eingesetzten Spendern bestätigen, Spender mit fehlender CD1a-Expression schloss ich von weiteren Versuchen aus.

Um den Einfluss der Hyperthermie auf die DC-Reifung zu erfassen, bestimmte ich die Expression des antigenpräsentierenden Moleküls HLA-DR und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie von CD25, CD40 und CD83. Auf unreifen DCs, deren Funktion die Erkennung und Aufnahme von Pathogenen ist, liegt eine sehr geringe Expression dieser Marker vor. Nach Antigenkontakt exprimieren DCs diese Moleküle

vermehrt (daher „Reifemarker“), um mit ihnen T-Zellen und somit das adaptive Immunsystem zu aktivieren zu können ([19], siehe auch Einleitung Absatz 1.2.2).

Bei beiden Inkubationstemperaturen nahm nach Stimulation mit Zymosan oder *A. fumigatus* die Expression von HLA-DR, CD25 und CD80 (nur Zymosanstimulation) sowie von CD40, CD83 und CD86 im Vergleich zu unstimulierten DCs deutlich zu, was einer Reifung von DCs entsprach [19]. Sowohl *A. fumigatus* als auch Zymosan konnten DCs somit bei Normo- und Hyperthermie reifen. Die Expressionsinduktion dieser Marker auf DCs durch *A. fumigatus*-Stimulation konnte bereits mehrfach belegt werden [22; 23]. Die Induktion einer signifikanten CD25-Expression auf DCs durch Zymosanstimulation wurde in diesen Studien bisher jedoch noch nicht gezeigt.

Im Temperaturvergleich zeigte sich, dass nach Inkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C CD86 und HLA-DR (MHC II) bereits auf unstimulierten DCs signifikant vermehrt exprimiert wurden, nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* bei 40 °C ebenso. CD80 und CD83 zeigten eine tendenziell verstärkte Expression nach Stimulation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C. Ergänzende Versuche der Arbeitsgruppe zur Oberflächenmarkerexpression konnten eine signifikant erhöhte CD80-Expression auf stimulierten und unstimulierten DCs nach 24 h Inkubation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C zeigen.

Die Reifemarkeranalyse dieser Arbeit zeigt also, dass bereits Hyperthermie alleine eine verstärkte Expression der wichtigen kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des antigenpräsentierenden Moleküls HLA-DR (und somit eine Reifung der DCs) bewirken und die Reifung durch andere Stimuli (wie *A. fumigatus*) weiter verstärken kann. Die phänotypische DC-Reifung durch Hyperthermie ohne weiteren Stimulus steht im Einklang mit Studien an BMDCs und moDCs mit Temperaturexposition von 39,5 bis zu 42 °C [59; 61; 76; 81]. Auch ein *in vivo* Experiment, bei dem die Kernkörpertemperatur von Mäusen für 20 min auf 41 °C erhöht wurde, führte zu einer Hochregulierung von CD86 und MHCII auf BMDCs [81]. Die vermehrte Expression dieser Reifemarker unter Hyperthermie auf stimulierten Zellen konnte an BMDCs nach Inkubation bei 42 °C und LPS-Maturierung [76] sowie an moDCs unter Stimulation mit Ribomunyl und IFN γ bei 39,5 °C [80] gezeigt werden. Zytokincocktail-gereifte moDCs bei 40 °C exprimierten nach 24 h im Vergleich zu 37 °C nur CD80 und CD25 vermehrt, die

übrigen Reifemarker hingegen nicht (diese wurden nur auf unstimulierten DCs durch Hyperthermie induziert, siehe oben [59]). Die CD25-Expression wurde in meinen Versuchen jedoch durch die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen nicht beeinflusst.

Mehrere der Studien, die eine verstärkte DC-Reifung unter Hyperthermie beschrieben, zeigten außerdem eine verstärkte Expression des Markers CD40 [61; 76; 81]. CD40 war in meinen Versuchen allerdings unter allen Bedingungen bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C leicht vermindert exprimiert.

Im Gegensatz zu oben genannten Arbeiten zeigten andere Studien an BMDCs (39 °C und 40 °C; LPS- und *S. typhimurium*-Stimulation [77]) und moDCs (40 °C, LPS-Stimulation [60]) keinen Einfluss der Hyperthermie auf die phänotypische DC-Reifung. Auch *Hatzfeld-Charbonnier et. al.*, die moDCs während und nach dem Generierungsprozess mehrmals kurzzeitiger Hyperthermie von bis zu 41,5 °C aussetzen, beobachteten keinen Einfluss auf die Expression von HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 auf unstimulierten und LPS-stimulierten moDCs. Diese Studie hatte im Gegensatz zu meinen Versuchen auch keinen Einfluss der Hyperthermie auf die Aufnahmerate von Dextran gezeigt [78].

Der Vergleich aktueller Studien ergibt also, dass der Einfluss von Hyperthermie auf die phänotypische Maturierung von DCs – ähnlich wie auf die Zytokininduktion – in Abhängigkeit von Hyperthermieprotokoll (Dauer, Höhe, Erholungsphase), Zelltyp und Stimulus sehr unterschiedlich ausfallen kann (diskutiert auch in [60]). Bei *A. fumigatus*-Stimulation von DCs bewirkte eine 24-stündige Hyperthermie von 40 °C im Rahmen meiner Arbeit jedoch eine verstärkte phänotypische DC-Reifung.

Um diese These genauer zu überprüfen, wurde die Expression weiterer Oberflächenmarker analysiert. Die Expression von CD1a nahm durch Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* ab und war sowohl auf stimulierten als auch auf unstimulierten DCs unter Hyperthermie im Vergleich zu Normothermie reduziert. Frühere Versuche der Arbeitsgruppe hatten ebenfalls eine reduzierte CD1a-Expression auf *A. fumigatus*-stimulierten DCs im Vergleich zu unstimulierten DCs gezeigt [mündliche Mitteilung]. Auch *Cao et al.* konnten eine verminderte CD1a-Expression auf TNF-maturierten DCs zeigen [74]. Eine abnehmende CD1a-Expression scheint also mit einem reiferen DC-Phänotyp assoziiert

zu sein; somit spricht dieses Ergebnis ebenso für eine verstärkte DC-Reifung unter Hyperthermie.

Die Expression von Dectin-1 war ebenfalls nach Stimulation mit Zymosan und *A. fumigatus* schwächer als auf unstimulierten DCs und unter allen Bedingungen bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C reduziert. Somit könnte eine verminderte Dectin-1-Expression ebenfalls mit einer verstärkten DC-Reifung assoziiert sein. PRR wie Dectin-1 sind für die Antigenerkennung, eine Funktion unreifer DCs, bedeutsam [22].

Die Expression des antigenpräsentierenden MHC I-Moleküls HLA1 unterschied sich zwischen den Inkubationstemperaturen nicht. Einige der hier zitierten Studien konnten ebenso keine Unterschiede [59; 60], andere hingegen eine verstärkte Expression von MHC I-Molekülen unter Hyperthermie zeigen [81]. Über MHC I-Moleküle wird für exogene Antigene über den Weg der Kreuzpräsentation eine zytotoxische Immunantwort initiiert [30]. Inwiefern Hyperthermie diesen Mechanismus (über die HLA1-Regulation) beeinflussen kann, kann durch die Ergebnisse oben genannter Studien nicht eindeutig festgestellt werden. Meine Versuche im Zusammenhang mit *A. fumigatus* konnten zumindest keine Effekte zeigen.

Im Rahmen der DC-Reifung müssen DCs zur T-Zell-Aktivierung in lymphatische Organe wandern, wozu unter anderem der Marker CCR7 hochreguliert wird [19]. Die Expression dieses Markers war in meinen Versuchen jedoch auf unstimulierten DCs bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C signifikant vermindert. Dies überraschte, da im Zusammenhang mit der verstärkten Reifemarkerexpression (und somit DC-Reifung unter Hyperthermie) auch eine stärkere CCR7-Expression möglich gewesen wäre, wie sie z. B. *Joshi et al.* auf reifen und unreifen BMDCs unter Hyperthermie zeigen konnten [76]. Unter Stimulation konnte ich wiederum, ebenso wie andere Studien [59], eine unveränderte CCR7-Expression unter Hyperthermie zeigen.

Auch ICAM-1 hat Bedeutung in der DC-Migration [38]. Dieser Marker war in meinen Versuchen nach Zymosanstimulation bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C (im Gegensatz zu CCR7) signifikant vermehrt exprimiert. ICAM-1 hat jedoch nicht nur Bedeutung für die Migration der DCs, sondern trägt auch zur T-Zell-Differenzierung bei [31].

Insgesamt muss also die Bedeutung des Einflusses der Hyperthermie auf die molekularen Effekte der Migration im Zusammenhang mit *A. fumigatus* noch ausführlicher geklärt werden. *Ostberg et. al* postulierten, dass Langerhanszellen in Maus-Hautexplantaten unter Hyperthermieeinfluss schneller aus der Epidermis migrieren [85]. Auch die Migration reifer DCs entlang eines Chemokingradienten war nach kurzzeitigen Hitzeschocks von bis zu 41,5 °C vermehrt, allerdings konnten *Hatzfeld-Charbonnier et al.* in dieser Arbeit keine verstärkte DC-Reifung (wohl aber eine Induktion der Sekretion einiger Zytokine) durch die erhöhte Temperatur feststellen [78]. Im Zusammenhang mit *A. fumigatus* könnten Migrationsversuche von DCs entlang Chemokingradienten *in vitro* oder die Bestimmung der Expression weiterer migrationsassoziierter Marker wie CXCR4 zur detaillierteren Beurteilung dieser Frage beitragen.

4.5 Zusammenschau und Ausblick

Die Experimente dieser Arbeit zeigen den *in vitro* Einfluss von Hyperthermie auf DC-Funktionen in der Immunantwort gegenüber *A. fumigatus*. Dabei tragen vor allem zwei essentielle Ergebnisse zur Thesenbildung bei: Hyperthermie bewirkte auf DCs eine vermehrte Expression von CD80, CD86 und HLA-DR sowie eine reduzierte phagozytische Aktivität. Eine Abnahme der phagozytotischen Aktivität zeigt sich bei DCs im Rahmen des Funktionswandels von der Antigenaufnahme bei unreifen DCs zur Antigenpräsentation bei reifen DCs. Diese Präsentation erfolgt über HLA-DR an T-Zellen, durch Kostimulation über CD80 und CD86 werden die T-Zellen aktiviert, weshalb all diese Moleküle auf reifen DCs vermehrt exprimiert werden müssen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass DCs durch fieberähnliche Temperaturen verstärkt reifen. Interessant ist dabei vor allem, dass die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zur T-Zell-Aktivierung vermehrt exprimiert wurden. Somit könnten die unter Hyperthermie gereiften DCs zu einer verstärkten T-Zell-Stimulation im Patienten und somit zu einer verbesserten Abwehrleistung gegen *A. fumigatus* beitragen. Ob die T-Zell-Aktivierung im Rahmen der *A. fumigatus*-Abwehr tatsächlich durch Hyperthermie beeinflusst wird und diesem Faktor somit physiologische Relevanz zukommt, müssen weitere, funktionelle Versuche zur DC-T-Zell-Interaktion zeigen.

Auch ob die Beobachtungen *in vivo* Relevanz haben, eine erhöhte Körpertemperatur also mit einer verstärkten *A. fumigatus*-Abwehr und einem verbesserten Outcome der IA korreliert, muss in Studien geprüft werden. Zudem müssen auch mögliche negative Folgen einer verstärkten DC-Reifung – wie eine überschießende Immunreaktion mit konsekutiver Gewebsschädigung – in Betracht gezogen werden.

Aus der verstärkten Reifung der DCs unter Hyperthermie ergibt sich außerdem das Potential für Immuntherapien, wie sie in der Tumorforschung erprobt werden [62]. Hierbei könnte Hyperthermie als Adjuvans in der Generierung antigenspezifischer DCs dienen. Allerdings zeigt sich im Vergleich verschiedener Studien, dass sich der Einfluss der Hyperthermie je nach eingesetztem Protokoll unterscheidet. *Joshi et al.* schlagen als Ursache der Unterschiede zwischen den Studien verschiedene Mechanismen des Hyperthermieeinflusses in Abhängigkeit vom Temperaturbereich vor [76]. Dies beruht unter anderem auf der Beobachtung, dass bei mild erhöhten Temperaturen von bis zu 40 °C die DC-Reifung unabhängig von HSPs erfolgen kann [81]. Neben der exakten Höhe der Temperatur scheinen die Dauer der Inkubation sowie eine Erholungsphase Einfluss auf die DC-Effekte zu haben. Für den Einsatz von Hyperthermie in der Generierung *A. fumigatus*-spezifischer DCs müsste daher in weiteren Studien das optimale Hyperthermieprotokoll definiert werden. Um dies festzulegen ist es von entscheidender Bedeutung, den genauen Mechanismus des Hyperthermieeinflusses im Zusammenhang mit *A. fumigatus* zu analysieren. Dazu muss überprüft werden, ob und wenn ja welche der bekannten HSPs [59; 61] in Zusammenhang mit *A. fumigatus* in welchem Temperaturbereich aktiviert werden. Auch der Mechanismus der Hyperthermiewahrnehmung durch DCs bedarf weiterer Forschung. Möglicherweise exprimieren DCs ähnliche Moleküle, wie sie als Hitzerezeptoren auf sensorischen Neuronen bekannt sind [61].

Diese Arbeit zeigt, dass Hyperthermie auch im Rahmen der *A. fumigatus*-Abwehr DC-Funktionen entscheidend beeinflussen kann und wahrscheinlich zu einer verstärkten Reifung von DCs führt. Dies könnte den Verlauf und das Outcome der IA beeinflussen und möglicherweise in Zukunft, in Zusammenhang mit weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien zu Hyperthermie, einen Beitrag zu einer optimierten Therapie der IA leisten.

5 Zusammenfassung

Der Schimmelpilz *Aspergillus (A.) fumigatus* stellt den häufigsten Erreger der invasiven Aspergillose (IA) dar, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten auftritt. Unter den unspezifischen klinischen Symptomen dieser Erkrankung ist Fieber das häufigste. Dennoch wurden physiologische Aspekte wie eine erhöhte Körpertemperatur in Arbeiten zur Interaktion menschlicher Immunzellen mit *A. fumigatus* bisher nicht berücksichtigt. Zahlreiche Studien konnten den Einfluss einer erhöhten Temperatur auf den Verlauf von Infektionserkrankungen *in vivo* sowie auf die Funktionen verschiedener Immunzellen – einschließlich dendritischer Zellen (DCs) – *in vitro* zeigen. DCs spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegenüber *A. fumigatus*, ihre besondere Bedeutung liegt in der Verknüpfung der angeborenen mit der erworbenen Immunantwort.

Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Analyse des Einflusses einer erhöhten Temperatur auf die Immunantwort humaner DCs gegenüber *A. fumigatus*. Dazu wurden DCs mit *A. fumigatus* oder Zymosan, einem β -1,3-Glucan, bei Normo- (37 °C) und Hyperthermie (40 °C) für bis zu 24 h inkubiert und spezifische DC-Funktionen charakterisiert. Hierbei tolerierten DCs die Inkubation und Stimulation unter Hyperthermie ohne signifikanten Viabilitätsverlust. Die Zytokinexpression und -sekretion durch *A. fumigatus*-Stimulation wurde durch Hyperthermie nicht signifikant verändert. Die Fähigkeit zur Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien wurde durch eine kurzzeitige (1 h) Hyperthermie nicht beeinflusst, längerfristige (24 h) Hyperthermie reduzierte diese Fähigkeit jedoch signifikant. Ebenso bestand unter Hyperthermie eine verstärkte Expression von CD86 und HLA-DR auf unstimulierten DCs sowie von CD80, CD86 und HLA-DR auf stimulierten DCs.

Die reduzierte Aufnahmekapazität für *A. fumigatus*-Konidien und die verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle unter Hyperthermie zeigten, dass Hyperthermie *in vitro* einen reiferen Phänotyp unstimulierter DCs bewirkt sowie die DC-Reifung durch *A. fumigatus*-Stimulation verstärken kann. Diese reiferen DCs könnten zu einer verbesserten T-Zell-Aktivierung und Abwehr von *A. fumigatus* und zu einem verbesserten Outcome der IA beitragen. Außerdem könnte Hyperthermie als Adjuvans zur *in vitro* Generierung *A. fumigatus*-spezifischer DCs eingesetzt werden.

6 Summary

In immunocompromised patients, invasive aspergillosis (IA) is the most frequent disease caused by the pathogenic mould *Aspergillus (A.) fumigatus*. Fever is one of the most common yet nonspecific clinical symptoms of IA. However, physiological aspects such as febrile body temperature have never been taken into account in studies investigating the interaction between human immune cells and *A. fumigatus in vitro*. It has been shown that elevated body temperatures can influence the course and outcome of infectious diseases *in vivo* as well as the functions of different immune cells *in vitro*, including dendritic cells (DCs). DCs play an important role in the immune response to *A. fumigatus*, as they act as a bridge between the innate and adaptive immune system.

In order to determine the influence of elevated body temperature during IA, I investigated the effect of hyperthermia on human DCs confronted with *A. fumigatus in vitro*. DCs were stimulated with germ tubes of *A. fumigatus* or the fungal cell wall component zymosan, a β -1,3-glucan, at 37 °C or 40 °C for up to 24 h, followed by characterization of specific DC functions. My results demonstrate that DC viability was maintained under hyperthermia. Expression and secretion of cytokines by DCs following *A. fumigatus*-stimulation were not influenced by hyperthermia. Short-time hyperthermia did not affect antigen uptake, however, long-time hyperthermia reduced uptake of *A. fumigatus*-conidia by DCs significantly. Hyperthermia enhanced CD86 and HLA-DR expression on unstimulated DCs as well as CD80, CD86 and HLA-DR expression on *A. fumigatus*-stimulated DCs.

As the expression of costimulatory molecules on DCs was enhanced and uptake of *A. fumigatus*-conidia by DCs was reduced at 40°C, hyperthermia might cause a more mature phenotype in unstimulated DCs and enhance DC-maturation caused by *A. fumigatus*-stimulation. This could contribute to an increased T-cell-activation and to an improved *A. fumigatus*-defense and might influence the course and outcome of IA. Moreover, hyperthermia might even be a useful adjuvant in the *in vitro* generation of *A. fumigatus*-specific DCs for immunotherapy.

7 Literaturverzeichnis

- [1] T.R. Dagenais, N.P. Keller, Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22 (2009) 447-465.
- [2] J.-P. Latgé, *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (1999) 310-350.
- [3] D.W. Denning, Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 26 (1998) 781-803.
- [4] J.-P. Latgé, The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* 9 (2001) 382-389.
- [5] C.M. O'Gorman, H.T. Fuller, P.S. Dyer, Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457 (2009) 471-474.
- [6] L. Casselton, M. Zolan, The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* 3 (2002) 683-697.
- [7] S.J. Park, B. Mehrad, Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2009) 535-551.
- [8] S. Silbernagel, A. Despopoulos, *Taschenatlas Physiologie*, 2006.
- [9] R. Ben-Ami, R.E. Lewis, D.P. Kontoyiannis, Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British Journal of Haematology* 150 (2010) 406-417.
- [10] A. McCormick, J. Loeffler, F. Ebel, *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology* 12 (2010) 1535-1543.
- [11] G.M. Gersuk, D.M. Underhill, L. Zhu, K.A. Marr, Dectin-1 and TLRs Permit Macrophages to Distinguish between Different *Aspergillus fumigatus* Cellular States. *The Journal of Immunology* 176 (2006) 3717-3724.
- [12] T. Fontaine, C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C.E. Vorgias, M. Diaquin, J.P. Latge, Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of biological chemistry* 275 (2000) 27594-27607.
- [13] A. Cornillet, C. Camus, S. Nimubona, V. Gandemer, P. Tattevin, C. Belleguic, S. Chevrier, C. Meunier, C. Lebert, M. Aupée, S. Caulet-Maugendre, M. Faucheux, B. Lelong, E. Leray, C. Guiguen, J.-P. Gangneuw, Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6-Year Survey. *Clinical Infectious Diseases* 43 (2006) 577-584.
- [14] M.R. Knowles, R.C. Boucher, Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation* 109 (2002) 571-577.
- [15] V. Balloy, M. Chignard, The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11 (2009) 919-927.
- [16] R. Amitani, G. Taylor, E.N. Elezis, C. Llewellyn-Jones, J. Mitchell, F. Kuze, P.J. Cole, R. Wilson, Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity* 63 (1995) 3266-3271.
- [17] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*, 2006.

- [18]S.-J. Lin, J. Schranz, S.M. Teutsch, Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* 32 (2001) 358-366.
- [19]J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka, Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18 (2000) 767-811.
- [20]L.J. Zhou, T.F. Tedder, CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 2588-2592.
- [21]N. Kadowaki, The divergence and interplay between pDC and mDC in humans. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14 (2009) 808-817.
- [22]M. Mezger, S. Kneitz, I. Wozniok, O. Kurzai, H. Einsele, J. Loeffler, Proinflammatory Response of Immature Human Dendritic Cells is Mediated by Dectin-1 after Exposure to *Aspergillus fumigatus* Germ Tubes. *Journal of Infectious Diseases* 197 (2008) 924-931.
- [23]S. Braedel, M. Radsak, H. Einsele, J.-P. Latgé, A. Michan, J. Loeffler, Z. Haddad, U. Grigoleit, H. Schild, H. Hebart, *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *British Journal of Haematology* 125 (2004) 392-399.
- [24]C. Lass-Flörl, E. Roilides, J. Löffler, D. Wilflingseder, L. Romani, Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* 56 (2013) 403-413.
- [25]J.E. Wang, A. Warris, E.A. Ellingsen, P.F. Jørgensen, T.H. Flo, T. Espevik, R. Solberg, P.E. Verweij, A.O. Aasen, Involvement of CD14 and Toll-Like Receptors in Activation of Human Monocytes by *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *Infection and Immunity* 69 (2001) 2402-2406.
- [26]S.S. Mambula, K. Sau, P. Henneke, D.T. Golenbock, S.M. Levitz, Toll-like Receptor (TLR) Signaling in Response to *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 39320-39326.
- [27]M.G. Netea, 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, B.J. Kullberg, *Aspergillus fumigatus* Evades Immune Recognition during Germination through Loss of Toll-Like Receptor-4-Mediated Signal Transduction. *Journal of Infectious Diseases* 188 (2003) 320-326.
- [28]R.T. Figueiredo, L.A. Carneiro, M.T. Bozza, Fungal surface and innate immune recognition of filamentous fungi. *Frontiers in microbiology* 2 (2011) 248.
- [29]J.L. Werner, A.E. Metz, D. Horn, T.R. Schoeb, M.M. Hewitt, L.M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G.D. Brown, C. Steele, Requisite Role for the Dectin-1 β -Glucan Receptor in Pulmonary Defense against *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Immunology* 182 (2009) 4938-4946.
- [30]A. Savina, S. Amigorena, Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews* 219 (2007) 143-156.
- [31]M.L. Kapsenberg, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 984-993.
- [32]A. Prechtel, A. Steinkasserer, CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 299 (2007) 59-69.

- [33] S. Bozza, R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco, L. Romani, Dendritic Cells Transport Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the Airways to the Draining Lymph Nodes and Initiate Disparate Th Responses to the Fungus. *The Journal of Immunology* 168 (2002) 1362-1371.
- [34] V. Gafa, R. Lande, M.C. Gagliardi, M. Severa, E. Giacomini, M.E. Remoli, R. Nisini, C. Ramoni, P. Di Francesco, D. Aldebert, R. Grillot, E.M. Coccia, Human Dendritic Cells following *Aspergillus fumigatus* Infection Express the CCR7 Receptor and a Differential Pattern of Interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 Cytokines, Which Lead to a Th1 Response. *Infection and Immunity* 74 (2006) 1480-1489.
- [35] V.W.F. Chan, S. Kothakota, M.C. Rohan, L. Panganiban-Lustan, J.P. Gardner, M.S. Wachowicz, J.A. Winter, L.T. Williams, Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine (SLC) Is Chemotactic for Mature Dendritic Cells. *Blood* 93 (1999) 3610-3616.
- [36] H. Saeki, A.M. Moore, M.J. Brown, S.T. Hwang, Cutting Edge: Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine (SLC) and CC Chemokine Receptor 7 (CCR7) Participate in the Emigration Pathway of Mature Dendritic Cells from the Skin to Regional Lymph Nodes. *The Journal of Immunology* 162 (1999) 2472-2475.
- [37] C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M.C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, A. Vicari, Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer seminars in immunopathology* 22 (2000) 345-369.
- [38] T. Katakai, K. Habiro, T. Kinashi, Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1. *The Journal of Immunology* 191 (2013) 1188-1199.
- [39] M. Duong, N. Ouellet, M. Simard, Y. Bergeron, M. Olivier, M.G. Bergeron, Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *The Journal of infectious diseases* 178 (1998) 1472-1482.
- [40] E. Roilides, A. Dimitriadou-Georgiadou, T. Sein, I. Kadiltoglou, T.J. Walsh, Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 66 (1998) 5999-6003.
- [41] B. Mehrad, R.M. Strieter, T.J. Standiford, Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* 162 (1999) 1633-1640.
- [42] E. Roilides, S. Tsaparidou, I. Kadiltoglou, T. Sein, T.J. Walsh, Interleukin-12 Enhances Antifungal Activity of Human Mononuclear Phagocytes against *Aspergillus fumigatus*: Implications for a Gamma Interferon-Independent Pathway. *Infection and Immunity* 67 (1999) 3047-3050.
- [43] R.M. Winn, C. Gil-Lamaignere, E. Roilides, M. Simitopoulou, C.A. Lyman, A. Maloukou, T.J. Walsh, Selective Effects of Interleukin (IL)-15 on Antifungal Activity and IL-8 Release by Polymorphonuclear Leukocytes in Response to Hyphae of *Aspergillus* Species. *Journal of Infectious Diseases* 188 (2003) 585-590.
- [44] G. Trinchieri, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 133-146.
- [45] S. Silbernagel, F. Lang, *Taschenatlas Pathophysiologie*, 2009.

- [46]J.W. Steinke, L. Borish, 3. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (2006) S441-S445.
- [47]E. Roilides, T. Sein, M. Roden, R.L. Schaefele, T.J. Walsh, Elevated Serum Concentrations of Interleukin-10 in Nonneutropenic Patients with Invasive Aspergillosis. *Journal of Infectious Diseases* 183 (2001) 518-520.
- [48]E. Cenci, A. Mencacci, G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, C.F. d'Ostiani, P. Mosci, M. Bachmann, F. Bistoni, M. Kopf, L. Romani, Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *The Journal of infectious diseases* 180 (1999) 1957-1968.
- [49]E. Schutyser, S. Struyf, J. Van Damme, The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews* 14 (2003) 409-426.
- [50]A.P. Phadke, G. Akangire, S.J. Park, S.A. Lira, B. Mehrad, The Role of CC Chemokine Receptor 6 in Host Defense in a Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (2007) 1165-1172.
- [51]M. Mezger, M. Steffens, M. Beyer, C. Manger, J. Eberle, M.R. Toliat, T.F. Wienker, P. Ljungman, H. Hebart, H.J. Dornbusch, H. Einsele, J. Loeffler, Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 111 (2008) 534-536.
- [52]C. Caux, C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, J. Banchereau, Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1994) 1263-1272.
- [53]G. Herold, *Innere Medizin*, 2010.
- [54]J.D. Hasday, K.D. Fairchild, C. Shanholtz, The role of fever in the infected host. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2 (2000) 1891-1904.
- [55]V.E. Baracos, W.T. Whitmore, R. Gale, The metabolic cost of fever. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65 (1987) 1248-1254.
- [56]T.F. Doran, C. De Angelis, R.A. Baumgardner, E.D. Mellits, Acetaminophen: more harm than good for chickenpox? *The Journal of pediatrics* 114 (1989) 1045-1048.
- [57]L. Rojas, P. Munoz, M. Kestler, D. Arroyo, M. Guembe, M. Rodriguez-Creixems, E. Verde, E. Bouza, Bloodstream infections in patients with kidney disease: risk factors for poor outcome and mortality. *The Journal of hospital infection* (2013).
- [58]H.G. Zhang, K. Mehta, P. Cohen, C. Guha, Hyperthermia on immune regulation: a temperature's story. *Cancer letters* 271 (2008) 191-204.
- [59]I. Knippertz, M.F. Stein, J. Dorrie, N. Schaft, I. Muller, A. Deinzer, A. Steinkasserer, D.M. Nettelbeck, Mild hyperthermia enhances human monocyte-derived dendritic cell functions and offers potential for applications in vaccination strategies. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 27 (2011) 591-603.

- [60] J.R. Ostberg, E.A. Repasky, Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 55 (2006) 292-298.
- [61] S. Basu, P.K. Srivastava, Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *International immunology* 15 (2003) 1053-1061.
- [62] J.J. Skitzki, E.A. Repasky, S.S. Evans, Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 10 (2009) 550-558.
- [63] J.M. Ruijter, C. Ramakers, W.M. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M.J. van den Hoff, A.F. Moorman, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 37 (2009) e45.
- [64] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm, S.G. Rozen, Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40 (2012) e115.
- [65] N. Karthaus, R. Torensma, J. Tel, Deciphering the Message Broadcast by Tumor-Infiltrating Dendritic Cells. *The American Journal of Pathology* 181 733-742.
- [66] L.A. Herzenberg, R.G. Sweet, Fluorescence-activated cell sorting. *Scientific American* 234 (1976) 108-117.
- [67] LS&E-Infrastructure-Unit, FACSCalibur Analyzer. Available online at <http://isu.technion.ac.il/ISU/Templates/showpage.asp?DBID=1&LNGID=1&TMID=84&FID=603>.
- [68] BD-Biosciences, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, Technical Data Sheet, in.
- [69] Roche, PCR: Eine ausgezeichnete Methode. Available online at http://www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf.
- [70] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29 (2001) e45.
- [71] LifeTechnologies, Human Cytokine 10-Plex Panel, in, http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/LMC0001M_Protocol.pdf.
- [72] M. Kato, T.K. Neil, D.B. Fearnley, A.D. McLellan, S. Vuckovic, D.N.J. Hart, Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *International immunology* 12 (2000) 1511-1519.
- [73] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia, Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182 (1995) 389-400.
- [74] X. Cao, M. Sugita, N. Van Der Wel, J. Lai, R.A. Rogers, P.J. Peters, M.B. Brenner, CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. *J Immunol* 169 (2002) 4770-4777.
- [75] A. Semmlinger, M. Fliesser, A.M. Waaga-Gasser, M. Dragan, C.O. Morton, H. Einsele, J. Loeffler, Fever-range temperature modulates activation and function of human dendritic cells stimulated with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology* 52 (2014) 438-444.

- [76]N. Joshi, V. Duhan, N. Lingwal, S. Bhaskar, P. Upadhyay, Adjuvant properties of thermal component of hyperthermia enhanced transdermal immunization: effect on dendritic cells. *PLoS one* 7 (2012) e32067.
- [77]J.-N. Tournier, A.Q. Hellmann, G. Lesca, A. Jouan, E. Drouet, J. Mathieu, Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 73 (2003) 493-501.
- [78]A.S. Hatzfeld-Charbonnier, A. Lasek, L. Castera, P. Gosset, T. Velu, P. Formstecher, L. Mortier, P. Marchetti, Influence of heat stress on human monocyte-derived dendritic cell functions with immunotherapeutic potential for antitumor vaccines. *J Leukoc Biol* 81 (2007) 1179-1187.
- [79]A.M. DeFillipo, J. Dai, Z. Li, Heat shock-induced dendritic cell maturation is coupled by transient aggregation of ubiquitinated proteins independently of heat shock factor 1 or inducible heat shock protein 70. *Molecular immunology* 41 (2004) 785-792.
- [80]J.C. Peng, C. Hyde, S. Pai, B.J. O'Sullivan, L.K. Nielsen, R. Thomas, Monocyte-derived DC primed with TLR agonists secrete IL-12p70 in a CD40-dependent manner under hyperthermic conditions. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 29 (2006) 606-615.
- [81]H. Zheng, I.J. Benjamin, S. Basu, Z. Li, Heat shock factor 1-independent activation of dendritic cells by heat shock: implication for the uncoupling of heat-mediated immunoregulation from the heat shock response. *European journal of immunology* 33 (2003) 1754-1762.
- [82]S. Tsiodras, G. Samonis, D.T. Boumpas, D.P. Kontoyiannis, Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clinic proceedings* 83 (2008) 181-194.
- [83]R. Bauer, M. Mezger, C. Blockhaus, A.L. Schmitt, O. Kurzai, H. Einsele, J. Loeffler, 40-O -[2-Hydroxyethyl]rapamycin modulates human dendritic cell function during exposure to *Aspergillus fumigatus*. *Journal of basic microbiology* 52 (2012) 269-276.
- [84]I. van Bruggen, T.A. Robertson, J.M. Papadimitriou, The effect of mild hyperthermia on the morphology and function of murine resident peritoneal macrophages. *Experimental and Molecular Pathology* 55 (1991) 119-134.
- [85]J.R. Ostberg, E. Kabingu, E.A. Repasky, Thermal regulation of dendritic cell activation and migration from skin explants. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 19 (2003) 520-533.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Biologie von <i>A. fumigatus</i>	2
Abbildung 2:	Mögliche Verlaufsformen einer <i>A. fumigatus</i> -Infektion	4
Abbildung 3:	Immunmechanismen gegen <i>A. fumigatus</i>	6
Abbildung 4:	Aktivierung von T-Zellen durch DCs.....	12
Abbildung 5:	Mögliche positive und negative Effekte einer erhöhten Körpertemperatur.....	15
Abbildung 6:	Studiendesign der Arbeit	17
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau des FACSCalibur	28
Abbildung 8:	Viabilitätsprüfung mittels AnnexinV/PI-Färbung.....	30
Abbildung 9:	Graphen zur Auswertung der quantitativen Real-Time PCR	33
Abbildung 10:	Gelelektrophorese der Primerprodukte zur Überprüfung der Primerselektivität.....	34
Abbildung 11:	Konidienaufnahme nach Vorinkubation.....	37
Abbildung 12:	Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Dextran und <i>A. fumigatus</i> -Konidien	38
Abbildung 13:	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression	40
Abbildung 14:	Definition der DC-Population.....	42
Abbildung 15:	Generierungskontrolle der DCs	42
Abbildung 16:	Stimulationsreihe zur Viabilität von DCs unter Hyperthermie	44
Abbildung 17:	Viabilität von DCs nach 24 h Hyperthermie.....	46
Abbildung 18:	Anteil toter DCs nach 24 h Hyperthermie	47
Abbildung 19:	IL8-, IL10-, TNF- und CCL20-Expression und Sekretion unter Hyperthermie.....	51
Abbildung 20:	IL6-, IL1B- und CXCL10-Expression und Sekretion unter Hyperthermie.....	52
Abbildung 21:	IL12B-Expression unter Hyperthermie	53
Abbildung 22:	IL2-, IL5-, IFN γ -, IL4- und GM-CSF-Sekretion unter Hyperthermie	54
Abbildung 23:	IL12B-, IL8- und CCL20-Expression nach Vorinkubation unter Hyperthermie.....	55

Abbildung 24: GFP-Expression der Population R	58
Abbildung 25: Aufnahme von Dextran und <i>A. fumigatus</i> -Konidien unter Hyperthermie	59
Abbildung 26: Aufnahme von Dextran unter Hyperthermie nach Vorinkubation bei Hyperthermie	60
Abbildung 27: Aufnahme von <i>A. fumigatus</i> -Konidien unter Hyperthermie nach Vorinkubation bei Hyperthermie	61
Abbildung 28: Expression von CD25 unter Hyperthermie	63
Abbildung 29: Expression von CD40, CD80, CD83 und CD86 unter Hyperthermie	65
Abbildung 30: Expression von HLA1 und HLA-DR unter Hyperthermie	66
Abbildung 31: Expression von CD1a unter Hyperthermie	67
Abbildung 32: Expression von Dectin-1 unter Hyperthermie	68
Abbildung 33: Expression von ICAM-1 und CCR7 unter Hyperthermie	69
Abbildung 34: Erneute Analyse der CD80 und HLA-DR Expression unter Hyperthermie	71
Tabelle 1: Ansätze der Versuche zur Antigenaufnahme	37
Tabelle 2: Analyse der Zytokinexpression und -sekretion	48
Tabelle 3: Zytokininduktion in DCs durch Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> - Keimschläuchen	50
Tabelle 4: Einfluss von Hyperthermie auf Zytokinexpression und -sekretion <i>A. fumigatus</i> -stimulierter DCs	56

9 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aspergillus</i>
ALAS1	aminolevulinate delta-synthase 1
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
BMDCs	bone marrow-derived DCs
CCL	chemokine (C-C-motif) ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
ctrl	Kontrolle
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DCs	dendritische Zellen
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
gDNA	genomische DNA
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
HLA	human leukocyte antigen
HSP	heat shock Protein
IA	invasive Aspergillose
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IL12B	Interleukin 12, p40-Untereinheit
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	leukocyte reduction chamber
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MIP-3 β	macrophage inflammatory protein-3-beta (CCL19)
moDCs	monocyte-derived DCs, monozytäre DCs
MOI	Multiplicity of infection
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
PAMP	pattern associated molecular patterns
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandin
PI	Proponiumiodid
PRR	pattern recognition receptor
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
s	Sekunde
S.	<i>Salmonella</i>
SLC	secondary lymphoid tissue-chemokine (CCL21)
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H 1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
T _H 2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLR	toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor α
Zym	Zymosan

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei

- Herrn Professor Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Doktorarbeit anzufertigen.
- Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, für die Vergabe des Themas, für die Möglichkeit, in einem modernen Labor arbeiten zu können und für die Unterstützung zu jeder Zeit.
- Herrn Professor Dr. med. Matthias Eyrich für die Übernahme des Gutachtens.
- Frau Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser und Frau Mariola Dragan für die Durchführung der 10-Plex Analyse zur Zytokinsekretion.
- Frau Dr. Mirjam Fließner für die ausgezeichnete Betreuung und die hervorragende Unterstützung von der Versuchsplanung bis zum Lesen diverser Entwürfe und die schöne Zeit.
- dem ganzen Laborteam der AG Löffler für die Bereitschaft, für Fragen oder Probleme immer ein offenes Ohr zu haben und für die schönen Momente und die unterhaltsamen Pausen im Labor.
- meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während meines Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Anna Semmlinger
Anschrift: Beim Schnarrbrunnen 4
86150 Augsburg
geboren: 7. Mai 1988, Augsburg

SCHULAUSSBILDUNG

09/1994 - 07/2003 Private Montessori Grund- und Hauptschule Wertingen
09/2003 - 07/2007 Gymnasium Wertingen, Abitur

STUDIUM

10/2007 - 05/2014 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
09/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02 - 07/2011 Auslandssemester an der Universität „La Sapienza“ Rom, Italien
05/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2010 - 03/2013 Begleitstudium „Experimentelle Medizin“, Universität Würzburg
09/2014 - 05/2015 Masterstudium „Experimentelle Medizin“, Universität Würzburg

Seit 04/2012 Dissertation im molekularbiologischen-infektiologischen Labor
der Medizinischen Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg
(Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler)

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 12/2014 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe des Klinikums der Universität München,
Campus Großhadern

Augsburg, 20. Mai 2015