



**Interaktion dendritischer Zell-Subtypen  
mit dem human pathogenen Schimmelpilz  
*Aspergillus fumigatus***

**Interaction of dendritic cell subtypes  
with the human pathogenic mould fungus  
*Aspergillus fumigatus***

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

**Jasmin Lothar**

aus

Heilbronn

Würzburg 2015



---

Eingereicht am: .....

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Prüfungsvorsitzender: xx

1. Gutachter: Professor Dr. Jürgen Löffler
2. Gutachter: Professor Dr. Sven Krappmann
3. Gutachter: Professor Dr. Thomas Hünig

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
3.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	7
3.2	Invasive Aspergillose. . . . .	9
3.3	Immunantwort gegen <i>A. fumigatus</i> . . . . .	12
3.4	Dendritische Zellen und <i>A. fumigatus</i> . . . . .	14
3.5	Immunmodulation der DC-Anwort . . . . .	19
3.6	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	23
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
4.1	Kulturbedingungen für <i>Aspergillus</i> . . . . .	25
4.2	Primärzellen. . . . .	26
4.2.1	Isolation von peripheren mononukleären Zellen. . . . .	26
4.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer. . . . .	27
4.2.3	Isolation von myeloiden dendritischen Zellen. . . . .	29
4.2.4	Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen. . . . .	31
4.2.5	Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen. . . . .	32
4.2.6	Isolation von pan T-Zellen. . . . .	33
4.2.7	Einfrieren und Auftauen primärer Zellen. . . . .	34
4.3	<b>Konfrontations-Experimente und deren Analyse. . . . .</b>	<b>35</b>
4.3.1	Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie. . . . .	35
4.3.2	DC-Maturierungsverhalten im Transwellsystem . . . . .	38
4.3.3	Expressionsanalyse bekannter <i>Aspergillus</i> -Rezeptoren. . . . .	39
4.3.4	Apoptose-Assay. . . . .	39
4.3.5	Zytokinanalyse mittels ELISA. . . . .	40
4.3.6	Zytokinanalyse im Multiplex-ELISA. . . . .	41

---

4.3.7	ELISpot	41
4.3.8	T-Zell Proliferation	43
4.3.9	CD154-Aspergillus-spezifische T-Zellen	44
<b>4.4</b>	<b>Umgang mit rekombinanten Proteinen</b>	<b>45</b>
4.4.1	Protein-Quantifizierung	45
4.4.2	Endotoxingehalts-Bestimmung	47
4.4.3	Endotoxin-Entfernung	47
<b>4.5</b>	<b>Genexpressionsanalysen</b>	<b>48</b>
4.5.1	RNA Isolation	49
4.5.2	RNA Konzentrationsbestimmung	49
4.5.3	cDNA Synthese	49
4.5.4	quantitative PCR	50
<b>4.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>DC-Aspergillus Interaktions-Studien</b>	<b>55</b>
5.1.1	moDCs und mDCs maturieren in Aspergillus-Kontakt, pDCs jedoch nicht.	55
5.1.2	moDCs und mDCs tragen Aspergillus Rezeptoren	60
5.1.3	Aspergillus induzierte moDC- und mDC-Zytokine	61
<b>5.2</b>	<b>Etablierung der Protein-Aufreinigung</b>	<b>63</b>
5.2.1	Analysen der Proteinkonzentration	64
5.2.2	Die Proteine waren unterschiedlich stark mit Endotoxin kontaminiert	66
5.2.3	CcpA wurde erfolgreich aufgereinigt	67
5.2.4	SHMT musste zwei Mal aufgereinigt werden	68
<b>5.3</b>	<b>Reaktion von moDCs und mDCs auf verschiedene Antigene</b>	<b>71</b>
5.3.1	CcpA wirkt stark immunogen auf moDCs und mDCs	71
5.3.2	SHMT reift mDCs besser als moDCs	82
5.3.3	Aspergillus Lysat reifte DCs nicht, aktivierte jedoch spezifische T-Zellen	90
5.3.4	CpcB und fg-gap wirkten auf moDCs und mDCs nicht immunogen	95
<b>5.4</b>	<b>Immunmodulation von DCs</b>	<b>99</b>
5.4.1	Medien-abhängige Unterschiede der moDC Differenzierung	99
5.4.2	Hyaluronsäure steigerte die DC Vitalität und Reifung nicht eindeutig	101
5.4.3	Rezeptor-Agonisten zur Unterstützung von DC-Funktionen	103
5.4.4	CryoStor als geeignetes GMP konformes Einfriermedium	105

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
6.1	Humane DCs interagieren auf verschiedene Weise mit <i>A. fumigatus</i>	107
6.1.1	Das unterschiedliche Maturierungs-Verhalten der DC Subtypen.....	108
6.1.2	DC Subtypen sekretieren unterschiedliche Zytokin-Profile.....	110
6.1.3	Aspergillus-Rezeptoren werden nicht von allen DC Subtypen exprimiert ...	112
6.2	Aspergillus Proteine konnten GMP-konform aufgereinigt werden . .	113
6.3	CcpA und SHMT eignen sich als DC-Antigene. . . . .	114
6.3.1	moDCs und mDCs maturierten durch CcpA und SHMT .....	114
6.3.2	DCs sekretieren Zytokine und aktivieren T-Zellen durch CcpA und SHMT	115
6.4	Vorteilhafte Faktoren für die DC-Maturierung und Lagerung . . . . .	116
6.5	Schlussfolgerungen für eine anti-Aspergillus DC-Immuntherapie. . .	118
6.5.1	Die Wahl des DC Subtyps .....	120
6.5.2	Potentielle Protein-Antigene und Adjuvantien.....	121
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>
A.1	Multiplex-ELISA Ergebnisse von mit Aspergillus konfrontierten moDCs, mDCs und pDCs. . . . .	138
A.2	LPS Stimulationen . . . . .	140
A.3	Zeitverlauf-Experimente für Antigen-Stimulation der DCs . . . . .	141
A.4	Lebenslauf und Veröffentlichungen . . . . .	142
A.5	Danksagung . . . . .	144
A.6	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	145





# 1 Zusammenfassung

Die invasive Aspergillose (IA) zählt zu den seltenen, bei immunsupprimierten Patienten jedoch mit einer hohen Letalität verbundenen Infektionskrankheiten. Sie wird, wie alle Aspergillosen, durch den humanpathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ausgelöst. Bis heute ist die oft nicht effektive Therapie einer IA mit hohen Nebenwirkungen und Kosten verbunden. Die Entwicklung von Pathogen-spezifischen Immuntherapien soll durch die Forschung im Bereich der immunologischen Infektionsbiologie vorangetrieben werden. Für neuen Erkenntnisse wird die Interaktion von humanen Immunzellen mit *A. fumigatus* analysiert.

In der vorliegenden Studie wurde mit dendritischen Zellen (DCs) gearbeitet, da diese Pilzmorphologien von *A. fumigatus* phagozytieren können und über Antigenpräsentation das adaptive Immunsystem aktivieren. Es wurden aus humanen Monozyten differenzierte DCs (moDCs) verwendet, mit welchen viele Forschergruppen aufgrund ihrer verfügbar großen Anzahl arbeiten. Allerdings dauert die Generierung von moDCs fünf Tage. Aus dem peripheren Blut entstammende CD1c-positive myeloide DCs (mDCs) oder CD303-positive plasmazytoide DCs (pDCs) können dagegen direkt nach der Isolation verwendet werden. Die beiden DC-Populationen werden aus verschiedenen Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark gebildet. Ihr Phänotyp und ihre Immunfunktionen unterscheiden sich untereinander und auch von denen der moDCs.

In Interaktionsstudien konnte analysiert werden, dass die drei verwendeten DC-Subtypen (moDCs, mDCs, pDCs) unterschiedlich auf *A. fumigatus* reagieren. moDCs und mDCs reifen in direktem Kontakt zu *Aspergillus*, sie sekretierten ein relativ ähnliches Zytokinprofil und exprimierten die bekannten *Aspergillus*-Rezeptoren Dectin-1, TLR2 und TLR4. Im Kontrast dazu verblieben pDCs trotz *Aspergillus*-Kontakt unreif und sekretierten nahezu keine Zytokine. Da moDCs und mDCs eine Immunreaktion auf den Pilz zeigten, wurden sie mit verschiedenen *Aspergillus*-Antigenen beladen und näher untersucht.

Bevor verschiedene Aspergillus-Antigene zur Beladung der DCs eingesetzt werden konnten, wurden diese analysiert und aufgereinigt. Hierfür wurde ein routinierter Arbeitsprozess etabliert. Zwei der vier verfügbaren Proteinantigene waren mit Endotoxin kontaminiert. Da schon geringe Mengen an Endotoxinen auf DCs einen stimulatorischen Effekt ausübten, wurden die Proteine mittels Affinitätschromatografie von den verunreinigenden Endotoxinen befreit.

In den Stimulationsexperimenten wirkten die beiden Proteinantigene CcpA und SHMT immunogen auf moDCs und mDCs. CcpA induzierte eine stärkere Maturierung und Zytokinfreisetzung als SHMT. Auffällig war, dass mDCs im Vergleich zu moDCs die Expression von MHC Klasse II stärker erhöhten und mehr IL18 freisetzten. Die mit CcpA oder SHMT beladenen moDCs und mDCs aktivierten autologe T-Zellen zur IFN $\gamma$  Sekretion und zur Proliferation. Zudem wurden durch die beiden Proteine Aspergillus-spezifische, CD154-positive T-Zellen induziert. Diese Aspergillus-spezifische Immunogenität von CcpA und SHMT macht die beiden Proteine zu interessanten Kandidaten für einen Vakzinierungs-Cocktail einer DC-Immuntherapie. Aspergillus Lysat induzierte als weiteres Antigen eine T-Zell Immunantwort mit CD154-positiven T-Zellen. Zudem war die Proliferation und IFN $\gamma$  Sekretion von T-Zellen induziert, obwohl moDCs und mDCs nicht reiften und nur wenige Zytokine sekretierten. Die beiden Aspergillus-Proteine CpcB und fg-gap induzierten die Reifung und Zytokinsekretion von moDCs und mDCs nicht. Demzufolge sind CpcB und fg-gap für eine DC-Immuntherapie nicht empfehlenswert.

Ein Vakzinierungs-Cocktail enthält in der Regel Adjuvantien, welche die Immunreaktion verstärken. Adjuvante Effekte auf moDCs konnten die getesteten Aspergillus-Rezeptor-Liganden Zymosan, Pam3CSK4, LPS ultrapur und R848 auslösen. Hyaluronsäure konnte keine Verbesserung der Reifung oder Vitalität von moDCs und mDCs bewirken. Die Antigen-bedingte Reifung der DCs für nötige Restimulationen während der Therapie konnte mittels einer tiefgekühlten Lagerung in CryoStor Einfriermedium stabil beibehalten werden.

Die beiden immunogenen Aspergillus-Proteine, die adjuvanten Rezeptor-Agonisten und die stabile Lagerung in CryoStor können als elementare Grundsteine für einen Vakzinierungs-Cocktail einer anti-fungalen DC-Immuntherapie mit moDCs oder mDCs angesehen werden.

## 2 Summary

Invasive aspergillosis (IA) is one of the rare infectious diseases associated with a high mortality rate that occurs in immunocompromised patients. Like all aspergillosis, it is caused by the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. No effective therapy of IA is known to date and the current therapy is associated with high side effects and costs. More in-depth research is needed in the field of immunological infection biology, such as the interactions of human immune cells with *A. fumigatus*, for the development of pathogen-specific immunotherapies.

In the present study dendritic cells (DCs) are investigated due to their ability to phagocytose fungal morphologies of *A. fumigatus* and activate the adaptive immune system via antigen presentation. Monocytes which differentiate into DCs (moDCs) are used by many research groups due to their large numbers; however, their total generation time lasts five days. CD1c-positive myeloid DCs (mDCs) and CD303-positive plasmacytoid DCs (pDCs) found in the peripheral blood can be used directly after isolation. The two DC populations are formed from different precursor cells of the hematopoietic system in the bone marrow and therefore their phenotype and immune functions differ from each other and also from those of moDCs.

Interaction studies have demonstrated that the three DC subtypes (moDCs, mDCs, pDCs) react differently to *A. fumigatus*. Upon direct contact with *Aspergillus*, moDCs and mDCs matured, they secreted a relatively similar cytokine profile and they expressed the known *Aspergillus* receptors Dectin-1, TLR2 and TLR4. In contrast, pDCs remained immature despite *Aspergillus* contact and secreted almost no cytokines. Due to the fact that moDCs and mDCs showed an immune response to the fungus, they were loaded with various *Aspergillus* antigens and examined more closely.

Before various *Aspergillus* antigens for the loading of DCs could be used, they were analyzed and purified. For this purpose, an experienced labor process has been established.

Two of the four available protein antigens were found to be contaminated with endotoxin. Since even a small amount of endotoxin can exert a stimulatory effect on DCs, the proteins were removed by affinity of the contaminating endotoxins.

In the stimulation experiments, the two protein antigens CcpA and SHMT worked immunogenic on moDCs and mDCs. CcpA induced a stronger maturation and cytokine release than SHMT. It was noticeable that mDCs induced a greater expression of the MHC class II and IL18 compared to moDCs. The laden CcpA or SHMT mMoDCs and mDCs activated autologous T cells to IFN $\gamma$  secretion and proliferation. In addition, the two proteins activated *Aspergillus*-specific, CD154-positive T-cells. This *Aspergillus*-specific immunogenicity of CcpA and SHMT makes the two proteins interesting candidates for a vaccination cocktail of DC immunotherapy. *Aspergillus* lysate induced as a further antigen a T-cell immune response with CD154-positive T-cells. In addition, the proliferation and IFN $\gamma$ -secretion of T cells was induced, although moDCs and mDCs remained immature and only secreted a few cytokines. Both *Aspergillus* proteins CpcB and fg-gap did not induce maturation and cytokine secretion of moDCs and mDCs. Accordingly, CpcB and fg-gap are therefore not recommended for a DC immunotherapy.

A vaccination cocktail typically includes adjuvants which enhance the immune response. Adjuvant effects on moDCs were triggered by the tested *Aspergillus* receptor ligands LPS ultrapur, R848, Zymosan and Pam3CSK4. Hyaluronic acid did not cause any improvement in the maturation or vitality of moDCs and mDCs. The antigen-induced maturation of DCs for the necessary restimulation during therapy could be stably maintained by a frozen storage in CryoStor freezing medium.

Both of the *Aspergillus* immunogenic proteins, the adjuvant receptor agonists and the stable mounting in CryoStor can be regarded as elementary foundations for a vaccination cocktail of anti-fungal DC immunotherapy with moDCs or mDCs.



## 3 Einleitung

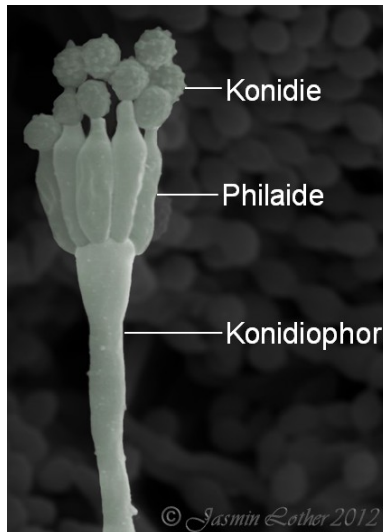
### 3.1 *Aspergillus fumigatus*

Der saprobiontische Gießkannenschimmelpilz *Aspergillus fumigatus* wird systematisch in die Klasse der Schlauchpilze (Ascomyceten) und Ordnung der Eurotiales eingeteilt. Sein Name leitet sich von lateinisch *Aspergillus*, den aspergillenförmigen Sporenträgern (lat. *aspergillum*; *aspergere*, deu. bespritzen) und *fumus*, seiner rauchgrünen Farbe ab. Die rauchgrüne Farbe der Sporen (auch Konidien genannt) wird durch das Pigment 1,8-Dihydroxynaphtalin-Melanin hervorgerufen. Als heterotropher Destruent spielt *A. fumigatus* eine wichtige Rolle im Stoffkreislauf, indem er organische, pflanzliche und auch tierische Substanzen in ihre anorganischen Grundbausteine Kohlenstoff und Stickstoff zersetzt. Diese anorganischen Stoffe stehen dann wieder für Primärproduzenten und Konsumenten zur Verfügung. Aufgrund seiner saprophytischen Lebensweise ist *A. fumigatus* ubiquitär in der Natur vertreten und besiedelt ökologische Nischen wie den Erdboden, Kompost, Blumenerde von Zimmerpflanzen und verschimmelte Lebensmittel [Latgé (1999); Park and Mehrad (2009)].

*A. fumigatus* gehört des Weiteren zu den Deuteromyceten, da lange Zeit nur ein asexueller Vermehrungszyklus bekannt war. Erst durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *A. fumigatus* wurden die Gene des mating-type-Locus (MAT) 1-1 und MAT1-2 entdeckt, welche in anderen filamentösen Pilzen für eine sexuelle Vermehrung zuständig sind [Varga (2003)]. Der sexuelle Lebenszyklus von *A. fumigatus* wurde 2009 von O’Gorman et al. veröffentlicht [O’Gorman et al. (2009)]. Eine sexuelle Vermehrung kann zur längeren Ehaltung der eignen Art führen, da dabei die genetische Variation innerhalb einer Population erhöht wird und dies eine besser Anpassung auf veränderte Umweltfaktoren ermöglicht.

Bei der Vermehrung von *Aspergillus* entstehen durch Zweiteilung 2 bis 3 Mikrometer

kleine, hydrophobe Konidien, die als Sporenkette auf einer konidiogenen Phialide, der Konidiophore angeordnet sind (Abbildung 3.1) [Latgé (1999)].



**Abbildung 3.1: *Aspergillus fumigatus* Konidiophore.** Rasterelektronenmikroskopische und nachträglich angefärbte Aufnahme einer sporulierenden *Aspergillus fumigatus* Konidiophore. Die Aufnahme entstand im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Konidien von *A. fumigatus* können lange Zeit überdauern, da sie gegen viele Umweltfaktoren, wie hohe Temperaturen und Trockenheit widerstandsfähig sind. Sobald sie ausreichender Wärme und Feuchtigkeit ausgesetzt sind, beginnen die Konidien zu schwellen und keimen anschließend zu Keimschläuchen aus. Bei guten Umweltbedingungen wachsen sie weiter zu Hyphen heran und verzweigen sich zu einem Mycel (Hyphengeflecht) [Park and Mehrad (2009)]. An der Oberfläche des Mycels bilden sich einzelne Konidiophoren aus, deren Aufgabe die Produktion neuer Konidien ist. Aufgrund ihrer geringen Größe können Konidien leicht durch Luftverwirbelungen von der Konidiophore gelöst werden und sich längere Zeit in der Luft aufhalten [Mullins et al. (1976)]. Dies kann zu einem weiten Verbreitungsradius führen.

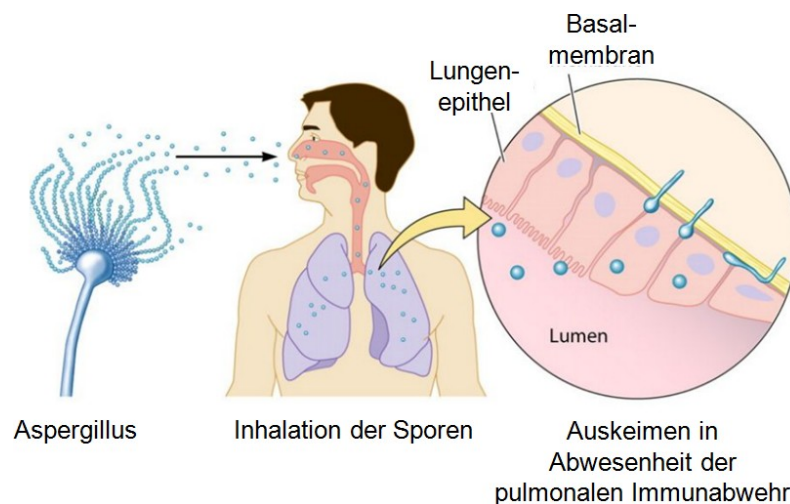
Die 0,2 bis 15 pro Kubikmeter in der Luft schwebenden Sporen können eingeatmet werden und humane Lungenalveolen erreichen [Latgé (1999)]. Tagtäglich atmet jeder Mensch mehrere hundert Konidien ein [Ben-Ami et al. (2010)], die je nach Gesundheitszustand des Betroffenen pathogen sein können. Bei Personen mit intaktem Immunsystem bleibt die Inhalation der Sporen normalerweise folgenlos [Hope et al. (2005)]. Allerdings können



bei dieser Personengruppe vereinzelt allergische Reaktionen auftreten, die sich als bronchopulmonale Aspergillose manifestieren. Bei Tuberkulose-Patienten kann das Einatmen von Konidien zu einem Aspergillom führen, wobei ein Mycelball in einer Lungenhöhle heranwächst [Israel et al. (1969)]. Diese nicht invasiven Aspergillosen zeichnen sich durch eine Kolonisierung des Lungenepithels aus, ohne Infiltrationen in das umliegende Gewebe [Dagenais and Keller (2009)]. Patienten mit geschwächtem Immunsystem können durch die Kolonisierung mit *A. fumigatus*, gefolgt von einer invasiven Infektion, schwere Entzündungen der Atemwege und lebensbedrohliche Symptome erleiden [Latgé (2001)].

### 3.2 Invasive Aspergillose

Jährlich sind in Deutschland nur einige tausend Patienten von einer Invasiven Aspergillose (IA) betroffen, jedoch verläuft diese Infektionskrankheit in 50% bis 95% der Fälle sehr schwerwiegend [Latgé (1999); Herbrecht et al. (2005); Chignard et al. (2007)]. Durch das Einatmen der Pilzsporen ist meist die Lunge der Ausgangspunkt einer IA [Groll (1999)]. Von Aspergillus produzierte Giftstoffe ermöglichen durch die Schädigung der epitheliale Schleimhaut die Infiltration des Pilzes in das umliegende Lungengewebe [Amitani et al. (1995)]. Ist die Immunabwehr wie bei immunsupprimierten Patienten verringert, kann das Pathogen in die alveolaren Blutgefäße gelangen (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Inhalative Infektion mit *Aspergillus fumigatus*.** Durch das Einatmen von Sporen können diese die Lunge kolonisieren. Bei für den Pilz optimalen Bedingungen, keimt dieser aus und infiziert den Patienten über die Blutbahn. Abbildung bearbeitet nach [Dagenais and Keller (2009)].

Ausgehend von der Lunge kann sich *Aspergillus* über den Blutkreislauf im Körper ausbreiten und andere Organe in Mitleidenschaft ziehen. Zur Hochrisikogruppe gehören immunsupprimierte Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen wie Leukämie, sowie Organ- und hämatopoetischen Stammzelltransplantationen [Barnes and Marr (2007); Dagenais and Keller (2009)]. Leukämie-Patienten erkranken beispielsweise mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 10% und 25% an IA, wobei letztendlich 80% bis 90% der Infizierten innerhalb der ersten 14 Tage nach der Infektion versterben [Denning (1998); Dagenais and Keller (2009)]. Für 30% der Pilzinfektionen bei Krebspatienten ist *A. fumigatus* verantwortlich [Latgé (1999)]. Auch andere *Aspergillus*-Spezies, wie *A. terreus*, *A. flavus* und *A. niger* können Verursacher einer IA sein. Durch neuartige und zunehmende Therapien von allogene Stammzell- oder Organtransplantationen mit einhergehender Immunsuppression, wurde im letzten Jahrzehnt ein bemerkenswerter Anstieg an IA beobachtet [Marr et al. (2002); Kontoyiannis et al. (2010); Romani (2011)]. In Deutschland sind derzeit jedes Jahr einige tausend Patienten von einer IA mit schwerwiegendem Krankheitsverlauf betroffen.

Die klinischen Symptome umfassen, insbesondere bei Patienten mit Neutropenie, akut einsetzende Pleuraschmerzen, Fieber und Husten. Sprechen diese Patienten nicht auf Breitspektrum-Antibiotika an, so ist dies ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Erkrankung an IA. Mithilfe verschiedener Verfahren ist es möglich, einen Pilzbefall der Lunge im späten Stadium zu diagnostizieren (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Diagnose einer invasiven Aspergillose.** (A) Die computertomographische Aufnahme der Lunge eines Patienten zeigt dickwandige, kavitäre Läsionen. (B) Autopsiertes Lungengewebe mit kavitären Läsionen, die an den Randzonen fibrotisches Gewebe aufwiesen. (C) Mit einer Silberfärbung behandelter Dünnschnitt von Lungengewebe. Die dunkel angefärbten Pilzbestandteile befanden sich hyphenförmig im pulmonalen Gewebe. Quelle: <http://brighamrad.harvard.edu/Cases/bwh/hcache/342/full.html>

Computertomographie und Histologie liefern leider erst in sehr späten Infektionsstadien verlässliche Befunde. Eine frühe Diagnose ist für eine erfolgversprechende Therapie von entscheidender Bedeutung [Denning (2000)]. Bei Risiko-Patienten, die unter Beobachtung stehen, werden deshalb weitere Nachweisverfahren angewandt:

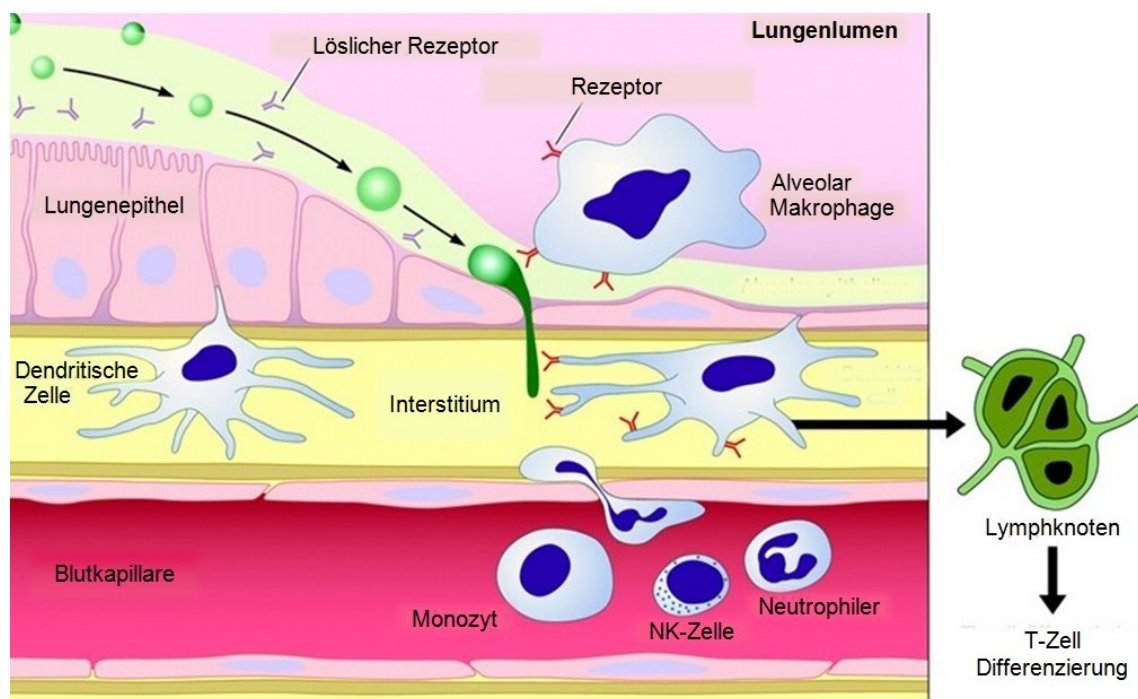
- Pilzkultur: Dem Patienten wird mehrfach Blut entnommen und dieses für mindestens sieben Tage in speziellen Blutkulturflaschen inkubiert. Bei invasiven Infektionen mit Aspergillus ist dieser Nachweis nur zu 50% erfolgreich und benötigt eine relativ lange Inkubationszeit [Ruhnke (2007)].
- Antigennachweis: Mithilfe von monoklonalen Antikörpern kann im Blutkreislauf zirkulierendes Galactomannan aus der Pilz-Zellwand von *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Die Sensitivität dieses Enzym-Immuntests schwankt je nach ausgewählter Patientengruppe von 22% bis 91% [Latgé (1999)].
- Aspergillus-PCR: In dieser Schnell-Diagnostik wird versucht zirkulierende Nukleinsäuren von *A. fumigatus* aus Blutproben nachzuweisen. Das Sensitivitätsniveau liegt gleich auf mit dem des Galactomannan-Tests [Scotter et al. (2005)] und ist abhängig vom verwendeten Probenmaterial [Springer et al. (2013)].

Derzeit wird die Kombination aus Aspergillus-PCR und Galactomannan-Test als bestmögliches Diagnoseverfahren angesehen [Springer et al. (2013); Rogers et al. (2013)]. Aufgrund des schwierigen Nachweises werden Risiko-Patienten, welche beispielsweise nach allogener Stammzelltransplantation eine Neutropenie aufweisen, präventiv mit Antimykotika behandelt. Zum Nachteil der Patienten weisen derzeit verfügbare Antimykotika viele toxische Nebenwirkungen auf und Azol-Resistenzen nehmen zu [Verweij et al. (2009)]. Das Verhältnis zwischen anti-fungalem Wirkungsgrad und Nebenwirkungen lässt die Therapie mit Voriconazol und Posaconazol gegenüber Intraconazol, Fluconazol und Amphotericin B bevorzugen [Ullmann et al. (2002); Cornely et al. (2007b,a); Ullmann et al. (2007)]. Caspofungin zeigte vergleichsweise geringe Nebenwirkungen, bei einer relativ guten Wirkungseffektivität von 42% bis 95% [Herbrecht et al. (2010)].

Vor allem ohne, aber auch mit antimykotischer Therapie, kann das geschwächte Immunsystem immunsupprimierter Patienten nicht ausreichend in der Lage sein, pathogene Pilzzellen zu bekämpfen. Als weitere Therapiestrategie wird derzeit die Etablierung von verschiedenen Immuntherapien angestrebt. Hierfür ist ein Grundverständnis der Interaktionen von Immunsystem und Pathogen nötig, welches nachfolgend erläutert wird.

### 3.3 Immunantwort gegen *A. fumigatus*

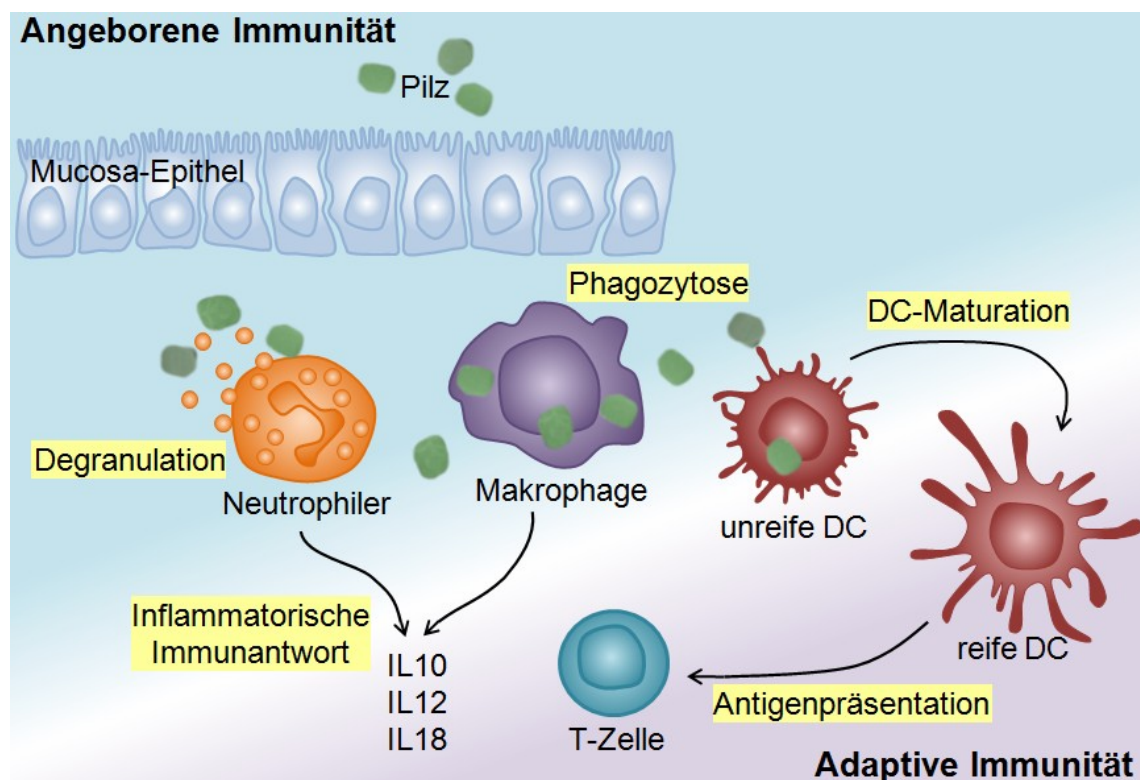
Für eingeatmete Sporen von *A. fumigatus* sind Lungeneithelien des menschlichen Körpers die erste natürliche Barriere des angeborenen Immunsystems. Die Sporen bleiben am Mucus von Schleim-sekretierenden Epithelzellen haften, werden dann aktiv von deren Zilien in Richtung Oropharynx transportiert und dort geschluckt oder ausgehustet [Balloy and Chignard (2009)]. Gelangen Sporen dennoch in die Lungenalveolen, werden sie zuerst mit den von Typ II Pneumozyten sekretierten Surfactant-Proteinen A und D (SP-A, SP-D) konfrontiert. Diese humoralen Faktoren können an *A. fumigatus* Sporen binden und die phagozytische Aktivität und fungizide Effekte von alveolaren Makrophagen und Neutrophilen verstärken [Madan et al. (2001)]. Ist diese unspezifische Immunantwort zu schwach, können die Pilzzellen das Lungengewebe kolonisieren und mit weiteren Immunzellen in Kontakt treten (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der pulmonalen Kontaktstelle zwischen eindringendem Pilz und abwehrenden Immunzellen.** Hauptsächlich an der Rezeptor vermittelten Pilzerkennung und -abwehr beteiligte Zellen sind alveolare Makrophagen, Neutrophile und Dendritische Zellen. Bearbeitet nach [Park and Mehrad (2009)]

Die wichtigsten Immunzellen in der Abwehr gegen *A. fumigatus* sind alveolare Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen. Alveolare Makrophagen sind im respiratori-

schen Gewebeeepithel lokalisiert. Sie internalisieren einen Großteil der eindringenden Sporen und sind in der Lage innerhalb von 30 Stunden 90% der phagozytierten Sporen intrazellulär abzutöten [Schaffner et al. (1983)]. Eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *A. fumigatus* spielen auch polymorphonukleäre Neutrophile. Sie phagozytieren Sporen und eliminieren diese mit reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (NO) [Philippe et al. (2003); Cunha et al. (2014b)]. Dendritische Zellen bilden eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort, indem sie Antigene phagozytieren, prozessieren und zu Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren [Netea et al. (2006)] (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Angeborene und adaptive Immunantwort gegen *A. fumigatus*.** Die Immunantwort gegen den Pilz umfasst das Degranulieren von Neutrophilen, die Phagozytose durch alveolare Makrophagen und das Präsentieren von prozessierten Pilzantigenen durch matrierte dendritische Zellen zu adaptiven Immunzellen. Zudem sekretieren die Zellen inflammatorische Zytokine. Erstellt nach [Romani (2004)]

Des Weiteren wurde beobachtet, dass Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) durch die Freisetzung von Perforin, Granzym [Schmidt et al. (2011)] und Interferon gamma [Bouzani et al. (2011)] gegen *A. fumigatus* reagieren. Wie NK-Zellen *A. fumigatus* erkennen ist bislang noch nicht beschrieben.

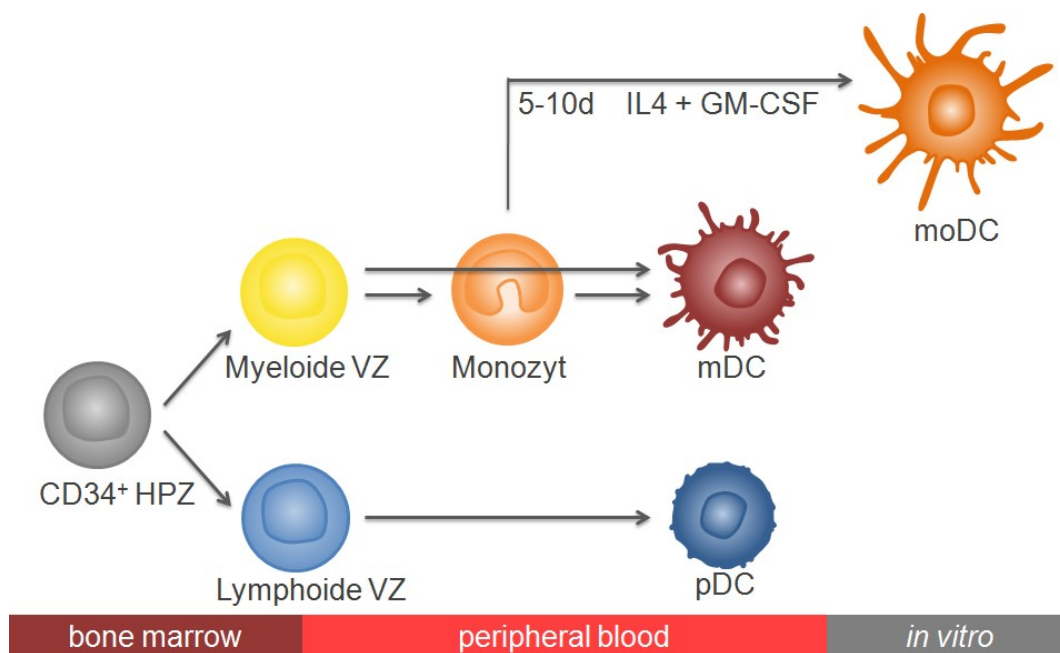
Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen zur Erkennung von Mikroorganismen sogenannte Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRRs). Diese können an mikrobielle Motive binden, welche Pathogen-assoziierte-molekulare-Muster (PAMPs) genannt werden. Aspergillus-PAMPs können sowohl exponierte Zellwandbestandteile wie Glucan und Mannan sein, als auch intrazelluläre Proteine, die bei einer immunologisch bedingten Destruktion freigesetzt werden können. Bis heute bekannte PRRs, die mit *A. fumigatus* interagieren können, sind Pentraxin3 [Garlanda et al. (2002)], Collectine wie SP-D [Madan et al. (2001)], DC-SIGN (engl. dendritic cell-specific ICAM-3-grapping non-integrin) [Serrano-Gómez et al. (2004); Naik (2008)], das C-Typ Lectin Dectin-1 [Taylor et al. (2006); Mezerger et al. (2008)] und verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLRs). Durch die Bindung von PAMPs an PRRs wird eine inflammatorische Antwort der betreffenden Zellen ausgelöst, was die angeborene Immunantwort initiiert, verstärkt und die adaptive Immunantwort aktiviert [Abbas et al. (2010)]. Zur adaptiven, gegen Aspergillus gerichteten Immunantwort tragen die Lymphozyten Populationen von B-Zellen und T-Zellen bei. B-Zellen produzieren Antikörper, die gegen *A. fumigatus* gerichtet sind [Sarfati et al. (2006)]. Naive, antigenspezifische T-Zellen differenzieren durch die Aspergillus-Antigenpräsentation von dendritischen Zellen und deren Zytokinprofil zu verschiedenen T-Zell Subpopulationen [Stuehler et al. (2011); Gaundar et al. (2012); Lass-Flörl et al. (2013)]. Für die Eliminierung von Pilzinfektionen wurde eine proinflammatorische Th1 Immunantwort als voraussetzend beschrieben, währenddessen eine Th2 Antwort mit einer verminderten Pilzbekämpfung assoziiert wird [Stevens (2006); Romani (2011)].

### **3.4 Dendritische Zellen und *A. fumigatus***

Durch Steinmann *et al.* wurde 1973 der Begriff "dendritische Zelle" geprägt, da diese Zellen typische bäumchenartige Zytoplasma-Ausläufer, ähnlich den Dendriten der Nervenzellen, besitzen [Steinman and Cohn (1973)]. Sie werden als unreife dendritische Zellen (DCs) von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet und wandern über das Blut in die Gewebe [Banchereau and Steinman (1998b)]. DCs bilden keine homogene Immunzellpopulation, sie sind funktionell und auch von ihrer Herkunft her in unterschiedliche Subpopulationen aufgeteilt [Robinson et al. (1999)]. Eine Subpopulation sind plasmazytoide DCs (pDCs), die aus lymphatischen Vorläuferzellen hervorgehen.



Eine andere Subpopulation wird durch Vorläuferzellen des myeloiden Stammes gebildet, weshalb diese Zellen auch myeloide DCs (mDCs) heißen [Schütt and Bröker (2009)]. Da dendritische Zellen im human-peripheren Blut nur in geringen Mengen vertreten sind, generieren viele Forschungsgruppen aus den höher frequentierten Monozyten sogenannte moDCs (Monozyten abgeleitete dendritische Zellen) [Grigoleit et al. (2002); Mezger et al. (2008); Morton et al. (2011)]. Diese Methode wurde durch miteinander kooperierenden Gruppen, in denen unter anderem Ralph M. Steinman (Rezipient des Nobelpreises in Medizin 2011) vertreten war, etabliert [Bender et al. (1996)]. (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Entwicklung dendritischer Zellen (DCs) aus hämatopoetischen Stammzellen (HPSZ).** Myeloide dendritische Zellen (mDCs) differenzieren aus myeloiden Vorläuferzellen (VZ) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) aus lymphoiden Vorläuferzellen. *In vitro* können unter Zytokineinwirkung aus Monozyten moDCs (Monozyten-abgeleitete DCs) differenziert werden. Bearbeitet nach [Banchereau and Palucka (2005)]

Im Allgemeinen sind DCs phagozytische Zellen des angeborenen Immunsystems, wie auch Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Ihre besondere Funktion besteht jedoch nicht in der Aufnahme und Eliminierung von Antigenen durch Phagozytose oder Pinocytose. Ihre Hauptfunktion im Immunsystem ist, als professionelle antigenpräsentierende Zelle, das Körpergewebe zu patrouillieren und bei Kontakt zu Antigenen das angeborene und adaptive Immunsystem zu aktivieren [Janeway et al. (2007)].

DCs werden durch den Kontakt von Antigenen mit ihren Rezeptoren aktiviert [Watts et al. (2007)]. *A. fumigatus* besitzt verschiedene antigene Strukturen, welche über folgenden PRRs von DCs erkannt werden können:

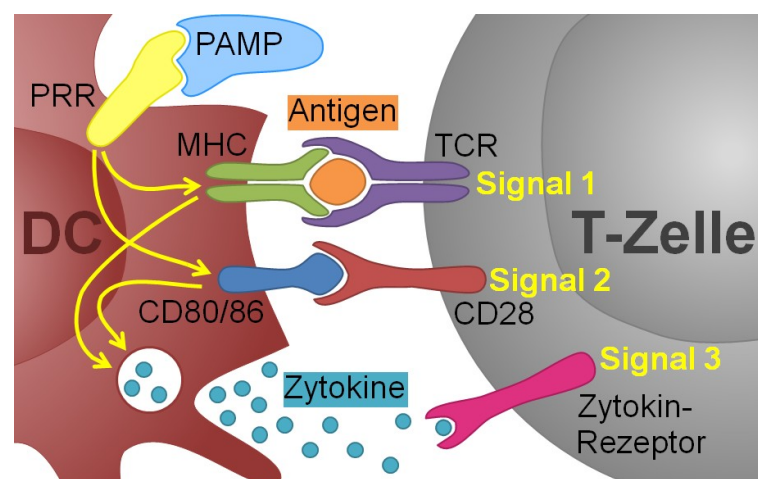
- DC-SIGN (CD209) wird unter anderem von moDCs und Makrophagen exprimiert und verhilft diesen über die Bindung an fungales Mannan der Pilzzellwand zur Internalisierung der Pilzzellen [Cambi et al. (2003); Serrano-Gómez et al. (2004)].
- PTX3 (langes Pentraxin 3) wird bei Kontakt von *A. fumigatus* zu humanen Monozyten, moDCs und mDCs verstärkt produziert [Loeffler et al. (2009); Mezger et al. (2008); Doni et al. (2003)]. Mäuse, denen PTX3 fehlt, zeigten eine höhere Suszeptibilität an IPA (Invasive pulmonale Aspergillose) zu erkranken [Garlanda et al. (2002)]. Der D48A Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im humanen PTX3 Gen begünstigt eine IA [Cunha et al. (2014a)].
- Das C-Typ Lektin Dectin-1 wird als Transmembran-Rezeptor von moDCs, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und bindet  $\beta(1,3)$ -Glucan, ein Hauptbestandteil der Pilzzellwand [Taylor et al. (2002, 2006)]. Dectin-1 ist als Rezeptor für *A. fumigatus* auf humanen moDCs beschrieben [Mezger et al. (2008)] und fungiert bei murinen Makrophagen als Phagozytoserezeptor [Brown et al. (2002); Luther et al. (2007)]. Mithilfe von Dectin-1 kann das Immunsystem verschiedene Zellmorphologien von *A. fumigatus* erkennen [Steele et al. (2005); Gersuk et al. (2006)].
- Die Bindung von Zymosan beziehungsweise eines noch unbekanntem Pilzbestandteils an die Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 aktiviert moDCs [Braedel et al. (2004); Sales-Campos et al. (2013)]. Für das intrazelluläre TLR9 von pDCs wurde eine Bindung an die CpG Motive von unmethylierter Aspergillus DNA beschrieben [Ramirez-Ortiz et al. (2008)]. Durch die Bindung von Liganden dimerisieren TLRs, was den MyD88-Signalweg auslöst, der dann über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Expression von Zytokinen induziert [Medzhitov and Janeway (2000); Akira and Sato (2003); Abbas et al. (2014)].

Die Bindung an PRRs und die Internalisierung von Antigenen lösen intrazelluläre Signaltransduktionen aus, die eine Reifung der DCs hervorrufen [Watts et al. (2007, 2010)]. Reife DCs sind durch die Verringerung ihrer phagozytischen Aktivität [Abbas et al. (2014)] und die erhöhte Expression der Maturierungsmarker CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC,



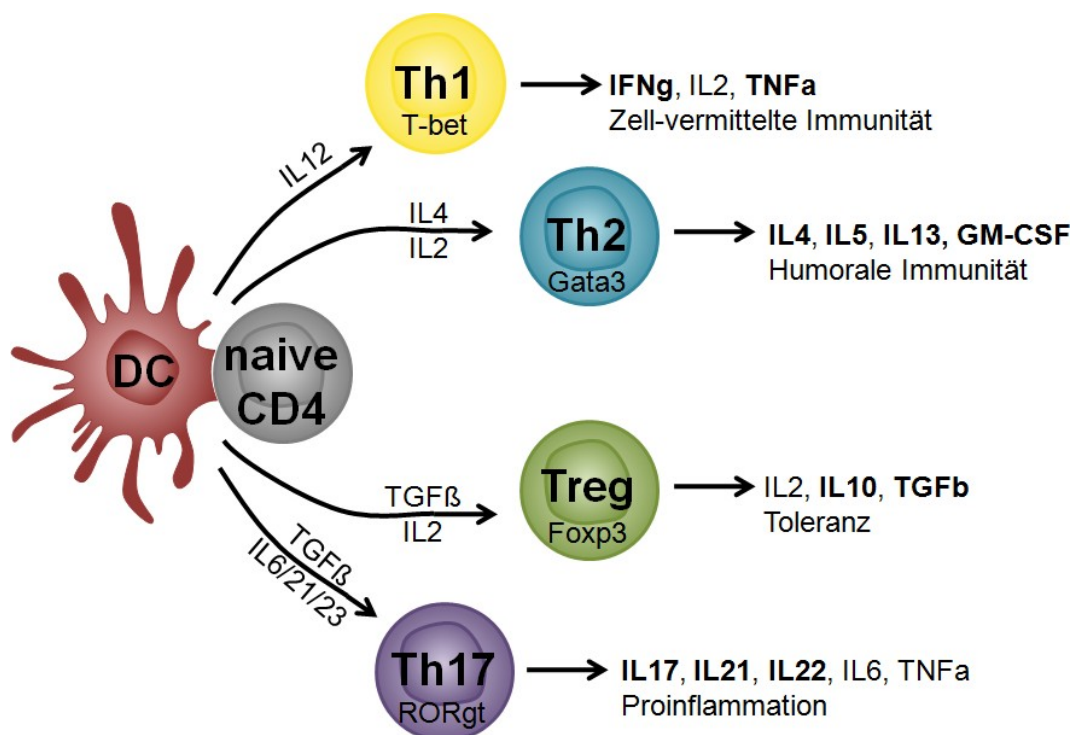
HLA-DR und CCR7 gekennzeichnet [Zhou and Tedder (1996); Cella et al. (1997); Yanagihara et al. (1998); Lutz and Schuler (2002)].

Der Chemokinrezeptor CCR7 kann die Chemokine CCL19 und CCL21 binden, welche von lymphatischen Geweben produziert werden und als Konzentrationsgradient die Migration der DCs zu Lymphknoten fördern [Humrich et al. (2006); Förster et al. (2008)]. Für murine DCs wurde beschrieben, dass sie *Aspergillus* Konidien phagozytieren und diese im Reifungsprozess zu Lymphknoten transportieren [Bozza et al. (2002b)]. Während die DCs migrieren, prozessieren sie mithilfe lysosomaler Enzyme das internalisierte Antigen in endozytischen Vesikeln. In diesen Vesikeln befinden sich gleichzeitig auch MHC Moleküle (deu. Haupthistokompatibilitätsmoleküle), an welche die prozessierten Antigene gebunden, zur Plasmamembran transportiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Für die professionelle Antigenpräsentation migrieren DCs über afferente Lymphgefäße in die T-Zell-Zone der Lymphknoten. T-Zellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) und den Korezeptoren CD4 oder CD8 an den durch DCs präsentierten Antigen-MHC-Komplex. CD4 T-Zellen sind dabei MHC Klasse II und CD8 T-Zellen MHC Klasse I restringiert. An der TCR-MHC-Bindung bildet sich eine immunologische Synapse, an welcher kostimulatorische B7-Moleküle akkumulieren. Diese tragen durch die Bindung an CD28 auf T-Zellen als zweites Signal, nach der TCR-MHC-Bindung zur T-Zell Aktivierung bei. Signal drei liefern die von DCs produzierten Zytokine [Abbas et al. (2014)] (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Auslösen der adaptiven Immunantwort, durch die Interaktion von DCs mit naiven T-Lymphozyten.** Aktivierungssignal 1 erfolgt über den TCR-Antigen-MHC-Komplex, Signal 2 durch Kostimulation und Signal 3 beinhaltet T-Zell polarisierende Zytokine. Erstellt nach [Kapsenberg (2003)]

Durch das von den DCs sekretierte Zytokinprofil erhalten die naiven, antigenspezifischen T-Zellen das dritte Aktivierungssignal, welches diese zur Proliferation und Differenzierung in verschiedene Effektorzellen anregt. CD8 T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen. CD4 T-Zellen können in ein ganzes Repertoire von T-Zell Subpopulationen differenzieren, die durch unterschiedliche Immun-Effektorfunktionen definiert sind [Janeway et al. (2007); Abbas et al. (2014)] (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der T-Zell Polarisation durch eine dendritische Zelle.** Dendritische Zellen sekretieren als drittes Signal ein vom Antigen abhängiges Zytokinprofil. Verschiedene Zytokine leiten T-Zellen zur Differenzierung in unterschiedliche T-Zellpopulationen an, welche durch ihre intrazellulären Transkriptionsfaktoren unterschieden werden können. Die T-Zellpopulationen üben mannigfache Immun-Effektorfunktionen aus. Th1 und Th17 T-Zellen können als proinflammatorisch und Th2 und Treg T-Zellen als antiinflammatorisch eingestuft werden.

Zwar können Makrophagen und B-Lymphozyten auch endozytierte Antigene über MHC Klasse II Moleküle präsentieren, jedoch sind DCs mit ihrer Antigenpräsentation darauf spezialisiert die adaptive Immunantwort in Gang zu setzen. Nur dendritische Zellen können durch Antigenkontakt und DC Maturation zu Lymphknoten migrieren [Kupiec-Weglinski et al. (1988); Austyn (1996)] und dort bis zu 3000 antigenspezifische T-Zellen aktivieren. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass sie zehn bis einhundert Mal mehr MHC-Peptid-

Komplexe auf ihrer Zelloberfläche präsentieren als Monozyten oder B-Lymphozyten [Banchereau and Steinman (1998a); Abbas et al. (2014)]. DCs können zudem andere Immunzellen, wie NK-Zellen [Wehner et al. (2011)], Neutrophile [Schuster et al. (2013)] und B-Zellen [Wykes and Macpherson (2000)] chemotaktisch rekrutieren und deren Immunfunktionen aktivieren.

Die Interaktion von humanen DCs mit *Aspergillus fumigatus* wurde vorwiegend mithilfe von moDCs analysiert. Die Stimulation von moDCs mit *Aspergillus* Konidien steigerte die Genexpression von proinflammatorischen, Th1 vermittelnden und solchen Zytokinen, die Neutrophile chemotaktisch anlocken [Morton et al. (2011)]. Zwei frühere Studien beschrieben die Sekretion von Th1 vermittelten Zytokinen durch *Aspergillus* stimulierte moDCs [Gafa et al. (2006, 2007)]. Zudem induzierte der Überstand der mit *Aspergillus* stimulierten moDCs die Migration von Neutrophilen. Studien zur Interaktion von humanen, *ex vivo* mDCs sind bislang in der Fachliteratur nicht vorhanden. Für pDCs wurde publiziert, dass sie mithilfe des intrazellulären TLR7 unmethylierte CpG-Motive freier DNA von *Aspergillus fumigatus* erkennen können und daraufhin das fungale Wachstum inhibieren, als auch die proinflammatorischen Zytokine IFN $\alpha$  (Interferon alpha) und TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) freisetzen [Ramirez-Ortiz et al. (2008, 2011)]. Der Hauptteil an Fachliteratur zu pDCs beschreibt diese Immunzellen als Experten für die Virusabwehr, da sie vor allem intrazelluläre TLRs exprimieren, welche bei einer Virusinfektion frei werdende Nukleinsäuren detektieren [Kadowaki et al. (2001); Jarrossay et al. (2001); Hémond et al. (2013)] und daraufhin enorm hohe Mengen an IFN $\alpha$  sekretieren, welches die Virus-Proteinproduktion hemmt und den Abbau von viraler RNA bewirkt [Colonna et al. (2004); Barchet et al. (2005); Liu (2005)].

### 3.5 Immunmodulation der DC-Anwort

Bei fungalen Infekten dirigieren DCs in der Lunge und in den Lymphknoten die Immunantwort von anderen Immunzellen [Bozza et al. (2002a)]. Im murinen Modellorganismus wurden mit Konidien beladene DCs als Schutz vor letaler Aspergillose beschrieben [Bozza et al. (2003)]. Der Einsatz von Konidien als Antigen wurde von den vorklinischen Immunmodulations-Studien aufgrund von Sicherheitsgründen bei einer späteren DC-Immuntherapie für Menschen ausgeschlossen. Für die vorklinische Entwicklung einer

Immuntherapie kann eine Modulation der DC-Immunreaktion unter Beachtung von verschiedenen Parametern, wie die biologische Funktion der DC Subpopulation, die Wahl der Antigene und die Rezeptoren für die Wahl von Adjuvantien erfolgen [Ueno et al. (2011)].

DCs sind im gesamten Gewebe des menschlichen Körpers anzutreffen und können mit wenig Aufwand aus dem peripheren Blut isoliert werden. Humanes Blut enthält drei **DC Subtypen**, von welchen CD141-positive mDCs sehr niederfrequent vorkommen [Dzionek et al. (2000)] und aus diesem Grund von dieser Studie ausgeschlossen wurden. pDCs sind funktionell auf die Immunreaktion gegen Viren ausgelegt, sie besitzen große Speicher für antivirale Faktoren wie Typ I Interferone [Barchet et al. (2005)] und Vesikel mit MHC Klasse I und II Molekülen zur Präsentation viraler Antigene [Pucchio et al. (2008)]. Für mDCs wird bislang keine Pathogen-Spezialisierung beschrieben. Für DC-Immuntherapien werden hauptsächlich moDCs verwendet, da sie in großer Anzahl als Monozyten differenziert werden können und ihre Funktionen schon durch viele Studien beschrieben sind. Gerade bei IA Hochrisiko-Patienten ist jedoch die fünftägige Differenzierungszeit der moDCs zu beachten, wohingegen mDCs direkt nach der Isolation mit Antigenen beladen werden können. Eine frühe Diagnose und schnelle Therapiemaßnahmen sind für eine erfolgreiche Therapie von entscheidender Bedeutung [Denning (2000)]. Zudem wurde beschrieben, dass *ex vivo* CD11c-positive DCs eine bessere T-Zell-Proliferation hervorrufen als moDCs [Osugi et al. (2002)]. In klinischen Studien reagieren bisweilen wenige Patienten auf eine moDC-Immuntherapie, was mit einer nicht optimalen Anpassung an ihre Aufgaben *in vivo* zusammenhängen könnte [Aarntzen et al. (2008)]. moDCs werden aus Monozyten differenziert, die *in vivo* andere Aufgaben besitzen als die professionelle Antigenpräsentation. Es ist noch unklar, ob humane mDCs von Monozyten oder von anderen Vorläuferzellen abstammen. Humane pDCs entstammen der lymphoiden Linie und somit nicht von myeloiden Monozyten [O’Keeffe et al. (2003)]. Aufgrund der durch diese Arbeit erlangten Interaktions-Ergebnisse zwischen *A. fumigatus* und moDCs, mDCs und pDCs [Lothar et al. (2014)] wurden moDCs und mDCs für die Experimente zur Immunmodulation verwendet.

Als **Antigene** für DCs können verschiedene Formen, wie Pilz-Lysate, -Proteine und -Peptide in Frage kommen. Die Antigene sollten so gewählt werden, dass sie von den DCs internalisiert werden und dadurch eine Antigenpräsentation und Zytokinsekretion ermöglichen [Delamarre and Mellman (2011)]. Mit Hyphen-Proteinextrakten beladene moDCs lösen eine eher schwache T-Zell Aktivierung aus, was durch immunsuppressive Mycotoxine

des Extraktes bedingt sein könnte [Chaudhary et al. (2010)]. DC-Vakzine mit Einzelpeptiden induzierten keine gewünschte Immunantwort, wohingegen Multipetid DC-Vakzine bessere Erfolge erzielten [Eyrich et al. (2013)]. Für die vorliegende Arbeit wurden Proteinantigene verwendet, da Proteine von verschiedenen Individuen in verschiedene Peptid-Varianten prozessiert werden und nur bestimmte Peptide eines Proteins präsentiert werden [Dudziak et al. (2007)]. Außerdem binden hoch affine Peptide oft extrazellulär an MHC Moleküle der DC und umgehen somit die Internalisierung und Prozessierung, wodurch Signale zur DC Maturation und Zytokinsekretion ausbleiben [Guermontprez et al. (2002)]. Im Speziellen wurden vier Proteine verwendet, die von Kooperationspartnern aus dem Hans-Knöll-Institut in Jena entdeckt und rekombinant produziert wurden.

- CcpA (engl. conidial cell wall protein A) ist ein sehr abundantes Protein in der Zellwand ruhender Aspergillus-Konidien und vertritt vermutlich strukturelle Funktionen [Pächtz et al. (2015)]. Beim Schwellen der Konidien nimmt die Präsenz des Proteins in der Pilzzellwand ab und ist bereits auf kurzen Keimschläuchen nicht mehr vorhanden. Für die vorliegende Arbeit wurde CcpA durch die verringerte Virulenz des CcpA-deletierten Aspergillus-Stamms im Mausmodell interessant. Demnach wurden dem CcpA Protein stark immunogene Eigenschaften zugesprochen, die durch eine Hyper-Inflammation für die höhere Letalität der mit Aspergillus konfrontierten Mäuse verantwortlich sein könnte. Die vorhergesagte Immunogenität von CcpA könnte jedoch für eine spätere Immuntherapie von Nutzen sein, in der eine Immunreaktion gegen Aspergillus initiiert oder verstärkt werden soll.
- Die intrazelluläre Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) wurden von Kooperationspartnern aus Jena für das vorliegende Projekt empfohlen. Kniemeyer, *et al.* detektierten anti-Aspergillus Antikörper in Seren von Aspergillose-Patienten [Teutschbein et al. (2015)]. Die für SHMT spezifischen Antikörper gehörten zu den meist abundanten detektierten Antikörpern und zeugen von einer aktiven Immunreaktion gegen das Aspergillus-Protein. Für die Bildung von Antikörpern müssen antigenspezifische B-Zellen aktiviert worden sein. Durch die Immunreaktion der Patienten wurde SHMT als immunogenes und für die Modulation der DC-Immunantwort interessantes Protein eingestuft.
- Die beiden rekombinant exprimierten Aspergillus-Proteine CpcB (G-Protein Komplex beta) und fg-gap (engl. fg-gap repeat protein) wurden, ebenso wie SHMT,

durch das Screening von Patienten-Seren nach anti-Aspergillus Antikörpern entdeckt. Durch die vollzogene Immunantwort mit einhergehender Bildung spezifischer Antikörper, wurden diese Proteine für die vorliegende Arbeit interessant. Ihre Funktionen sind bislang nicht näher beschrieben.

Die Reifung von moDCs ist für eine effektive Immuntherapie von großer Bedeutung [Zhou and Tedder (1996); McIlroy and Gregoire (2003)], da unreife DCs Toleranz induzierend wirken [Dhodapkar et al. (2001); Figdor et al. (2004)]. Mit siRNA behandelten DCs, die den Reifemarker CD83 nicht mehr exprimieren, wurde eine verminderte T-Zell Proliferation beobachtet [Prechtel et al. (2007)]. Zur Maturierung von moDCs wurden verschiedene **Adjuvantien** für hilfreich befunden, wobei noch kein optimaler Maturierungs-Cocktail definiert ist [Eyrich et al. (2013)]:

- TNFa matriert humane moDCs innerhalb von 48 Stunden [Dauer et al. (2003)] und induziert dabei das kostimulatorische Molekül CD83 [Zhou and Tedder (1996); Prechtel et al. (2007)] und die antigenpräsentierenden Moleküle MHC Klasse I und II [Sallusto and Lanzavecchia (1994)].
- CD40L ist ein Ligand für CD40 auf DCs und induziert die Expression der B7 Moleküle und MHC Klasse I und II. Die Intensität der Maturation durch CD40L ist jedoch geringer, verglichen mit TNFa [Sallusto and Lanzavecchia (1994)].
- Eine Kombination von TNFa, IL1b, IL6 und PGE2 (Prostaglandin E2) hat sich als guter Maturierungs-Cocktail erwiesen [Jonuleit et al. (1997); Dauer et al. (2003)].
- Die 24-stündige Maturation von moDCs mit IFNg, PGE2 und einem TLR8-Ligand ermöglichte die Sekretion von viel IL12, welches für die Induktion einer Th1 und CTL (zytotoxische T-Lymphozyten) Antwort essentiell ist [Zobywalski et al. (2007)].

Die Maturierung durch die oben beschriebenen Adjuvantien ist relativ unspezifisch. Um den adjuvanten Effekt auf moDCs der Immunantwort auf immunogene Pathogene anzunähern, können TLR Agonisten zum Einsatz kommen [Kaisho and Akira (2003); Pashine et al. (2005)]. Für an *A. fumigatus* angenäherte Adjuvantien können sich die Aspergillus Rezeptor-Liganden Zymosan, Pam3CSK4, LPS ultrapur und R848 für die Rezeptoren Dectin-1, TLR2, TLR4 und TLR7/8 eignen.

### 3.6 Zielsetzung der Arbeit

Neue Erkenntnisse über die Interaktion von Immunzellen mit dem humanpathogenen Schimmelpilz *A. fumigatus* sind für das Verständnis der Aspergillose von großer Bedeutung. Dendritische Zellen sind wichtige Immunzellen in der Pilzabwehr und nehmen in der Immunantwort gegen Pathogene eine Schlüsselrolle ein: Sie aktivieren durch die professionelle Antigenpräsentation eine antigenspezifische Antwort des adaptiven Immunsystems. Zur Interaktion von *in vitro* generierten moDCs mit *A. fumigatus* sind bereits viele Daten publiziert. Diese Erkenntnisse sollten erweitert und mit *ex vivo* mDCs und pDCs verglichen werden. Die Interaktionsanalyse umfasste Daten zur kontaktabhängigen Maturierung im Transwellssystem, zur Zytokinfreisetzung im Multiplex-ELISA und zur Expression der bekannten Aspergillus-Rezeptoren im Durchflusszytometer.

Als Antigene für die Immunmodulation von DCs sollten rekombinant hergestellte Aspergillus-Proteine zum Einsatz kommen. Im Hinblick auf eine später mögliche Immuntherapie wurden die Proteine auf Verunreinigungen hin analysiert und aufgereinigt. Vier Proteine und ein Aspergillus-Lysat wurden hinsichtlich ihrer immunogenen Eigenschaften für DCs analysiert. Ein Antigen wurde als immunogen eingestuft, wenn DCs durch dessen Stimulation maturierten und Zytokine sekretierten. Mit einem immunogenen Antigen beladene DCs wurden mit autologen T-Zellen konfrontiert und überprüft, ob sie T-Zellen zur Proliferation und IFN $\gamma$ -Sekretion anregen. Die T-Zell-Proliferation wurde mithilfe einer Anfärbung des Zytoplasmas im Durchflusszytometer analysiert und die IFN $\gamma$ -Sekretion mittels ELISpot. Die Stimulationsversuche wurden durch die Quantifizierung der in PBMCs enthaltenen CD154-positiven, Aspergillus-spezifischen T-Zellen erweitert.

Schließlich sollten weitere Faktoren untersucht werden, welche die Immunmodulation der DCs unterstützen. Für eine mögliche Steigerung der Vitalität wurden die DCs mit Hyaluronsäure behandelt. Die Stimulation mit verschiedenen Rezeptor-Agonisten sollte auf DCs adjuvante Effekte ausüben und eine bessere Maturierung bewirken. Die für eine Immuntherapie notwendige Lagerung der antigenbeladenen DCs wurde durch ein spezielles Einfriermedium realisiert.





## 4 Material und Methoden

### 4.1 Kulturbedingungen für *Aspergillus*

Zur Vermehrung von *A. fumigatus* wurden  $10^7$  Konidien in 100  $\mu$ l einer bei 4°C aufbewahrten Sporensuspension, auf Minimal-Medium-Agar (1:50 Verdünnung von 50 $\times$  AspA (3,5 mM NaNO<sub>3</sub>, 350 mM KCl, 550 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5), 0,25 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 $\times$  Spurenelement-Lösung (25 mM EDTA pH 8, 2,6 mM FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 30,1 mM ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 1,6 mM CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O, 0,89 mM MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0,26 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>10H<sub>2</sub>O, 0,41 mM NaMoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O, 0,68 mM CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O), 2% Agar für feste Medien) ausplattiert und für mindestens 3 Tage bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die hydrophoben Konidien mithilfe eines Watte-stäbchens in 10 ml sterilen HBSS-Puffer (Sigma Aldrich) geerntet und durch ein Zellsieb mit 40  $\mu$ m Porengröße von größeren Pilzstrukturen befreit. Die Konidien-Konzentration der so erhaltenen Sporensuspension wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abschnitt 4.2.2), wobei von einer 10<sup>-2</sup> Verdünnung fünf Kleinquadrate ausgezählt wurden. Die Suspension ruhender Konidien wurde bei 4°C aufbewahrt und für Versuche wurden Konidien verwendet, die nicht älter als zwei Wochen waren.

Zur Anzucht von Keimschläuchen aus Konidien, wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß 30 ml RPMI-Medium (Life Technologies) mit 1 - 3  $\times$  10<sup>8</sup> Konidien gegeben und für 5 - 7 h bei 37°C im Schüttelinkubator mit 200 rpm (engl. rounds per minute) inkubiert. Das Auskeimen der Konidien wurde mithilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Für Versuche wurden Keimschläuche eingesetzt, sobald sie bis auf die zwei- oder dreifache Größe der Konidien herangewachsen waren. Da nur höchstens zwei Wochen alte Konidien verwendet wurden, konnte ein relativ gleichmäßiges Auskeimen aller Konidien gewährleistet werden und nachfolgende Experimente wurden durch ruhende Konidien nicht beeinflusst.

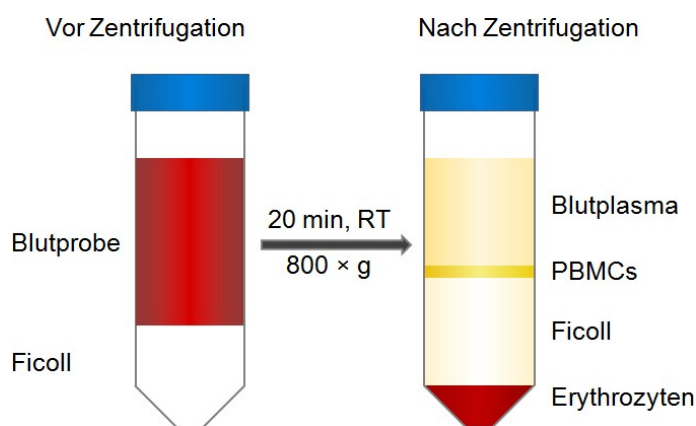
Für einige Experimente war es nötig mit biologisch inaktiven Pilzmorphologien zu arbeiten. Hierfür wurden die Pilzzellen für 1 h in 3% (v/v) Formaldehyd (Sigma Aldrich)

bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 4 Mal mit HBSS-Puffer gewaschen. Danach wurden die fixierten Pilzzellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.2 Primärzellen

### 4.2.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen

Für die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, sogenannten PBMCs (engl. peripheral blood mononuclear cells), wurden Leukozytenkonzentrate von freiwilligen, gesunden Spendern der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg verwendet. Die Leukozytenkonzentrate entstanden als Überbleibsel während der Thrombozytenspende mittels eines Aphereseegerätes [Dietz (2006)]. Mithilfe des Kohlehydratpolymers Ficoll ( $\delta = 1,077 \text{ g/ml}$ ) wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation Leukozyten, Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen des Leukozytenkonzentrats separiert. Die PBMCs, die zu den weißen Blutkörperchen gehören und sich aus Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen zusammensetzen, sammeln sich aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen dem aus Plasma und Thrombozyten bestehenden Überstand und dem Ficoll an. Im Zellsediment befinden sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen, da sie eine höhere Dichte besitzen (Abbildung 4.1).



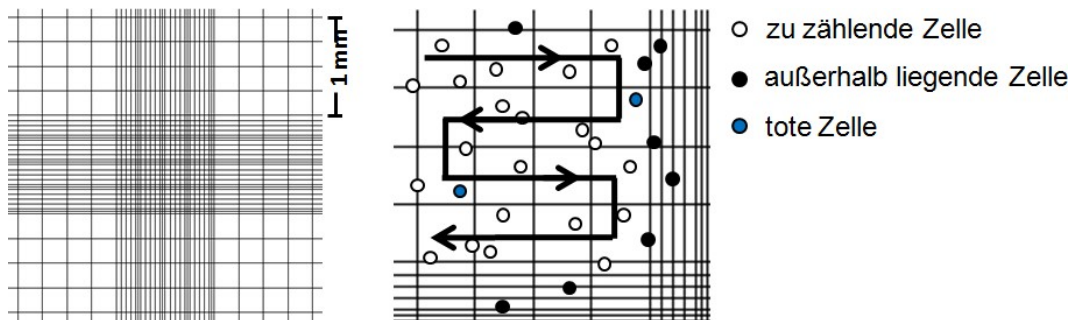
**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der PBMC Isolation.** Durch das Ausbilden des Ficoll-Gradienten mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs von Blutplasma, Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten getrennt.

Zuerst wurde das Leukozytenkonzentrat in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Puffer (HBSS, 5 mM EDTA, Sigma Aldrich) auf ein Endvolumen von 50 ml ergänzt. Mit

25 ml des entstandenen Gemisches wurden jeweils 15 ml Ficoll (Bicoll) in einem 50 ml Reaktionsgefäß überschichtet und anschließend mit der niedrigsten Beschleunigung und ohne Bremse für 20 min mit  $800\times g$  bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Während der Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich die in Abbildung 4.1 beschriebenen Phasen aus, von welchen die PBMC-haltige Interphase mit einer Pasteurpipette vorsichtig aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die vereinigten Interphasen wurden mit Puffer bis auf 50 ml aufgefüllt und pelletiert ( $150\times g$ , 15 min, RT). Dieser Waschschrift dient zur Entfernung von Thrombozyten, die während der Zentrifugation aufgrund geringer Dichte im Überstand verbleiben und durch vorsichtiges Dekantieren verworfen werden. Das so erhaltene Zellpellet wurde nach wiederholtem Waschschrift in 50 ml Puffer resuspendiert. Die Zellzahl konnte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Hierzu wurden  $10\ \mu\text{l}$  der PBMC-Suspension mit  $90\ \mu\text{l}$  Puffer 1:10 verdünnt und, wie im folgenden Abschnitt 4.2.2 mit Trypanblau gefärbt und gezählt. Die isolierten PBMCs wurden für weiterer Isolierungs- und Analyseschritte direkt weiter verwendet.

#### 4.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Für viele Experimente ist der Einsatz einer exakten Zahl an Zellen notwendig. Hierfür kann mithilfe einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch die Zellkonzentration von Zellsuspensionen bestimmt und das erforderliche Volumen für eine bestimmte Zellzahl oder -konzentration berechnet werden. Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, der über ein eingraviertes Gitternetz verfügt (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Gitternetzes einer Neubauer-Zählkammer.** Die Quadrate werden mäandrierend und L-förmig der Pfeillinie entlang ausgezählt. Verändert nach: [www.lo-laboroptik.de](http://www.lo-laboroptik.de)

Das Gitternetz ist in  $3 \times 3$  Großquadrate eingeteilt, die eine Kantenlänge von 1 mm haben. Wird auf die Zählkammer ein Deckgläschen aufgebracht, beträgt der Abstand zwischen Kammer und Deckgläschen 0,100 mm. Das Volumen eines Großquadrats beträgt somit  $0,1 \text{ mm}^3$ , was  $0,1 \text{ } \mu\text{l}$  entspricht. Um das Zählen zu erleichtern, sind die großen Eckquadrate in 16 Kleinquadrate unterteilt. Die Zählung sollte mäanderförmig von links oben beginnend durchgeführt werden. Zellen können auf den begrenzenden Linien der Kleinquadrate liegen, oder diese berühren. Damit keine Zellen doppelt gezählt werden, dürfen nur 2 der 4 begrenzenden Linien mitgezählt werden (L-Form).

Für die Zellzahlbestimmung der vitalen Zellen wurde die jeweilige Zellsuspension 1:2 mit dem Azofarbstoff Trypanblau (Fluka) versetzt. Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen ein und färbt sie blau, während vitale Zellen farblos unter dem Lichtmikroskop erscheinen [Foot (1959)]. Aus der Verdünnung mit Trypanblau wurden  $10 \text{ } \mu\text{l}$  entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden alle vitalen Zellen in den vier großen Eckquadrate mäanderförmig gezählt. Die Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl setzt sich als Produkt aus dem Mittelwert der gezählten Zellen, den Verdünnungsfaktoren, dem Kammerfaktor der Zählkammer (Großquadrat  $10^4$ , Kleinquadrat 50) und dem Volumen, in dem die Zellen aufgenommen wurden, zusammen:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahlmittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktoren} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Volumen}$$

Die Formel zur Berechnung der PBMC-Gesamtzellzahl setzt sich beispielsweise als Produkt aus dem Mittelwert der gezählten Zellen aus vier Großquadraten, dem Kammerfaktor der Zählkammer für Großquadrate (Faktor  $10^4$ ), der Verdünnungen und des Volumens zusammen:

$$\text{PBMC} - \text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 \times 2 \times 10 \times 50$$

Die Formel zur Berechnung der Konidien-Konzentration setzt sich als Produkt aus dem Mittelwert der gezählten Konidien aus fünf Kleinquadraten, dem Kammerfaktor der Zählkammer für Kleinquadrate (Faktor 50) und der Verdünnungen zusammen:

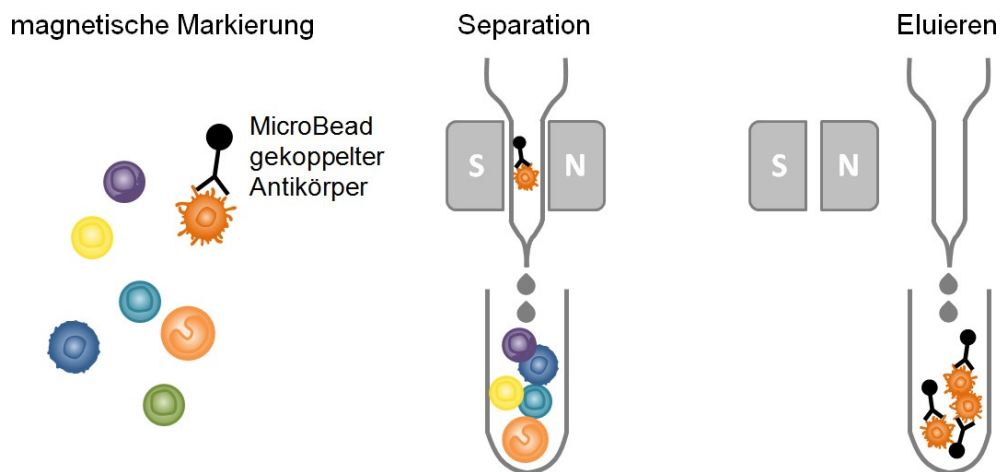
$$\text{Konidien} - \text{Konzentration [Konidien/ml]} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 50 \times 100$$

Das für eine bestimmte Zellzahl erforderliche Volumen kann per Dreisatz berechnet werden:

$$\text{erforderliches Volumen} = \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times \text{gewünschte Zellzahl}$$

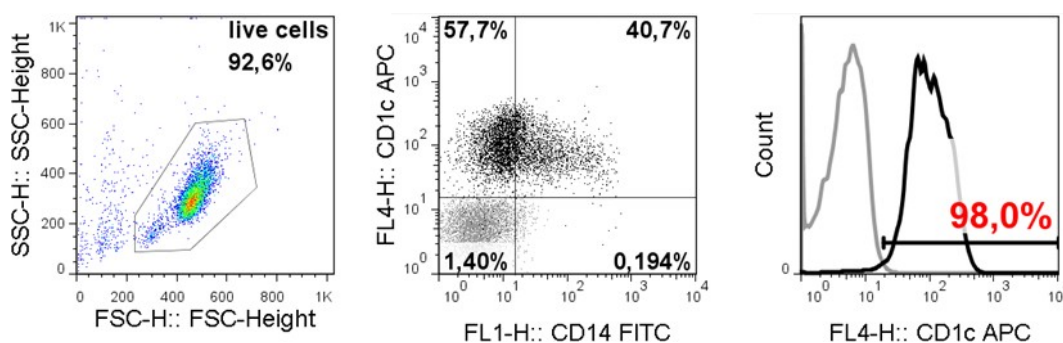
### 4.2.3 Isolation von myeloiden dendritischen Zellen

Durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gelang es Köhler und Milstein 1975 [Köhler and Milstein (1975)] den Grundstein zur Entdeckung der CD-Moleküle (engl. cluster determinant) zu legen. Einige CD-Moleküle werden nur von bestimmten Zellarten exprimiert. Monoklonale Antikörper, die diese zellspezifischen CD-Moleküle binden, können verwendet werden, um eine für die Fragestellung gewünschte Zellart von den restlichen Zellen einer Suspension zu separieren. Myeloide dendritische Zellen (mDCs) exprimieren auf ihrer Zelloberfläche CD1c-Moleküle (auch BDCA1 genannt) [Dzionic et al. (2000), Ziegler-Heitbrock et al. (2010)]. CD1c ist zur Präsentation von Lipidantigenen fähig und wird auf mDCs und ruhenden B-Zellen exprimiert. Durch eine vorherige Depletion der CD19 exprimierenden B-Zellen können mDCs mithilfe von MicroBeads gekoppelten anti-CD1c monoklonalen Antikörpern positiv selektiert werden. Die MicroBeads sind Magnetpartikel, die zusätzlich mit einem für CD1c spezifischen Antikörper konjugiert sind. Sind diese MicroBeads an das CD1c Oberflächenmolekül der mDCs gebunden, bleiben diese in einer Trennsäule haften, die sich in einem magnetischen Feld befindet. CD1c-negative Zellen sind nicht-magnetisch und können durch mehrere Waschschrte aus der Säule entfernt werden. Die noch an die Säule gebundenen mDCs können nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der magnetischen Zell-Isolation.** Nachdem die gewünschte Zellpopulation mittels magnetischem Antikörper gebunden wurde, werden die unerwünschten Zellen über eine magnetische Säule depletiert. Die magnetisch markierten Zellen verbleiben währenddessen in der Säule und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden.

Zur Selektion von CD1c<sup>+</sup> mDCs wurde das CD1c (BDCA-1)<sup>+</sup> Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) laut Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden  $1 \times 10^8$  PBMCs in 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert, mit 100  $\mu$ l FcR Blocking reagent, 100  $\mu$ l anti-CD19 Micro-Beads und 100  $\mu$ l biotinylierten anti-CD1c Antikörpern gemischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 10 ml Puffer und Zentrifugation mit  $300 \times g$  für 10 min bei 4°C, wurde das Zellpellet in 500  $\mu$ l Puffer aufgenommen und die magnetisch markierten CD19-positiven B-Zellen über eine mit 3 ml äquilibrierte LS-Säule depletiert. Anschließend wurden die Zellen des Durchflusses mit  $300 \times g$  für 10 min bei 4°C pelletiert und in 400  $\mu$ l Puffer aufgenommen. Die Zugabe von 100  $\mu$ l anti-Biotin MicroBeads markierte die bereits mit anti-CD1c-Biotin gebundenen mDCs magnetisch. Nach 10 min bei 4°C wurde wieder mit 10 ml Puffer gewaschen und das Pellet wurde in 500  $\mu$ l Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde über eine mit 1ml Puffer äquilibrierte MS-Säule separiert. Nach dreimal Waschen mit jeweils 500  $\mu$ l Puffer, wurden die in der MS-Säule zurückgehaltenen Zellen mit 500  $\mu$ l Puffer auf eine zweite MS-Säule eluiert. Diese wurde wieder dreimal gewaschen und die mDCs konnten mithilfe des Säulenstempels und 1 ml Puffer eluiert werden. Für eine hohe Zellreinheit waren unbedingt 2 MS Säulen erforderlich. Die Ausbeute der mDCs ( $\sim 0,4\%$ ) wurde, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, ohne weitere Verdünnung bestimmt und die mDCs direkt für Experimente verwendet. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch (Abschnitt 4.3.1) mithilfe des murinen Antikörpers Maus Anti-Human CD1c-APC (Miltenyi Biotec) bestimmt (Abbildung 4.4).

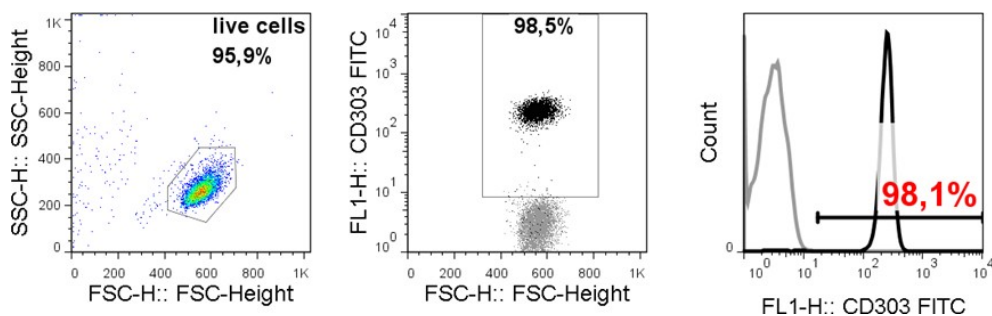


**Abbildung 4.4: Durchflusszytometrische Analyse von isolierten mDCs.** Das linke Punktediagramm zeigt, dass über 92% der isolierten mDCs Eigenschaften vitaler Zellen besaßen. Über 98% dieser vitalen mDCs waren auch für den mDC-spezifischen Marker CD1c positiv, dies ist als Punktediagramm in der Mitte und als Histogramm rechts daneben dargestellt. CD1c positive mDCs exprimieren zum Teil auch den monozytären Marker CD14. Es wurde ein repräsentativer Spender mittlerer Reinheit ( $97,7\% \pm 2,1\%$ ) gewählt.

#### 4.2.4 Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Für die Identifikation von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) können die zellspezifischen Marker CD303 (BDCA2) und CD304 (BDCA4) verwendet werden [Dzionic et al. (2000); Ziegler-Heitbrock et al. (2010)]. Zur Isolation von pDCs wurde in der vorliegenden Arbeit ein Depletions-Kit der Firma Miltenyi Biotec genutzt (Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit, human). Durch eine Depletion werden alle Nicht-Ziel-Zellen mit Antikörper-MicroBeads markiert und über magnetische Säulen aus der PBMC-Suspension selektiert. Im Durchlauf befinden sich dann die nicht-markierten (engl. untouched) pDCs. Die Isolation von Zielzellen über eine Depletion bietet somit den Vorteil, dass keine Zelloberflächenmoleküle durch Isolations-Antikörper für ihre natürlichen Liganden blockiert werden. Außerdem wurde für pDCs publiziert, dass sie bei Bindung von anti-CD303 Antikörpern keine Typ I Interferone mehr produzieren [Dzionic et al. (2001)].

Die Isolierung der pDCs erfolgte mit dem genannten Reaktions-Kit nach Herstellerangaben. Je  $10^8$  PBMCs wurden in 400  $\mu$ l Puffer resuspendiert und mit 100  $\mu$ l Biotin-Antikörper-Cocktail gemischt. Nach 10 min bei 4°C wurde die Zellsuspension zweimal mit 10 ml Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 400  $\mu$ l Puffer resuspendiert und mit 100  $\mu$ l anti-Biotin-MicroBeads vermischt. Nach 15 min bei 4°C und einem Waschschrift konnten die pDCs über eine mit 3 ml Puffer äquilibrierte LS-Säule mit dreimal 3 ml Puffer depletiert werden. Dann wurde die Zell-Ausbeute bestimmt ( $\sim 0,2\%$ , Abschnitt 4.2.2) und die Reinheit mit dem Antikörper Maus Anti-Human CD303-FITC (Miltenyi Biotec) durchflusszytometrisch wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben überprüft (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5: Durchflusszytometrische Analyse der negativ-isolierten pDCs.** Das linke Punktediagramm zeigt, dass über 95% der isolierten pDCs vital waren. Über 98% dieser vitalen pDCs waren auch für den pDC-spezifischen Marker CD303 positiv, dies ist als Punktediagramm in der Mitte und als Histogramm rechts daneben dargestellt. Es wurde ein repräsentativer Spender mittlerer Reinheit ( $98,3\% \pm 1,7\%$ ) gewählt.

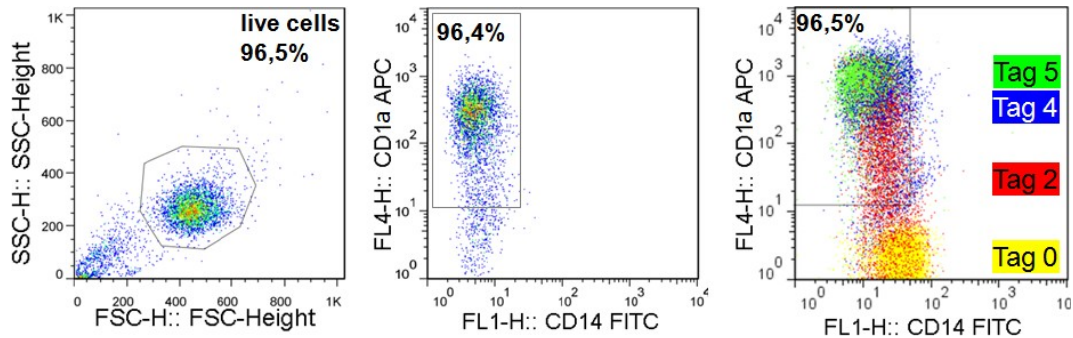
### 4.2.5 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Aus humanen Monozyten können *in vitro* unter mehrtägiger Einwirkung der Zytokine GM-CSF (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und Interleukin 4 (IL4) Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen generiert werden [Bender et al. (1996); Mezger et al. (2008)]. Die Monozyten können mithilfe von CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotec), die gegen den Monozyten-spezifischen Oberflächenmarker CD14 gerichtet sind, positiv selektiert werden.

Zunächst wurde die PBMC-Zellsuspension abzentrifugiert ( $300\times g$ , 10 min,  $4^{\circ}C$ ) und nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 340  $\mu l$  Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen. Pro Ansatz wurden 60  $\mu l$  anti-CD14-MicroBeads hinzugegeben, gemischt und bei  $4^{\circ}C$  für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurde mit 20 ml Puffer gewaschen, um überschüssige MicroBeads zu entfernen. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in 500  $\mu l$  Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert und auf eine im Magnethalter befindliche, mit 3 ml Puffer äquilibrierte LS-Trennsäule gegeben. Die Trennsäule wurde dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen, bevor sie aus dem Magnetfeld genommen wurde, um die in ihr befindlichen Monozyten mit 5 ml Puffer und dem Säulenstempel in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß zu eluieren. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10  $\mu l$  der isolierten Monozyten 1:5 mit Puffer und anschließend 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt (Abschnitt 4.2.2). Die Ausbeute betrug  $\sim 20\%$  der eingesetzten PBMCs. Durch Zentrifugieren bei  $300\times g$  für 10 min pelletierten die Monozyten und das Pellet wurde anschließend in moDC-Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 10 ng/ml Interleukin 4 (R&D Systems), 100 ng/ml GM-CSF, Bayer) aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von  $10^6$  Monozyten pro 1 ml moDC-Medium vorlag. Dann wurde die Monozyten-Suspension zu je 3 ml pro Vertiefung in eine 6-well Platte überführt und 5 Tage lang bei  $37^{\circ}C$  und 5%  $CO_2$  inkubiert. An den Tagen 2 und 4 wurde das Medium teil-erneuert und die Zytokine substituiert. Aus jedem Loch wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen, in ein Röhrchen vereinigt und pelletiert ( $300\times g$ , 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in dieselbe Menge Medium mit 10% FCS und der Menge an Zytokinen vom Tag der Aussaat resuspendiert und 1 ml daraus in jede Vertiefung der 6-well Platte zurückgegeben. Am fünften Tag waren die eingesetzten Monozyten vollständig zu moDCs ausdifferenziert, was durch eine durchflusszytometrische



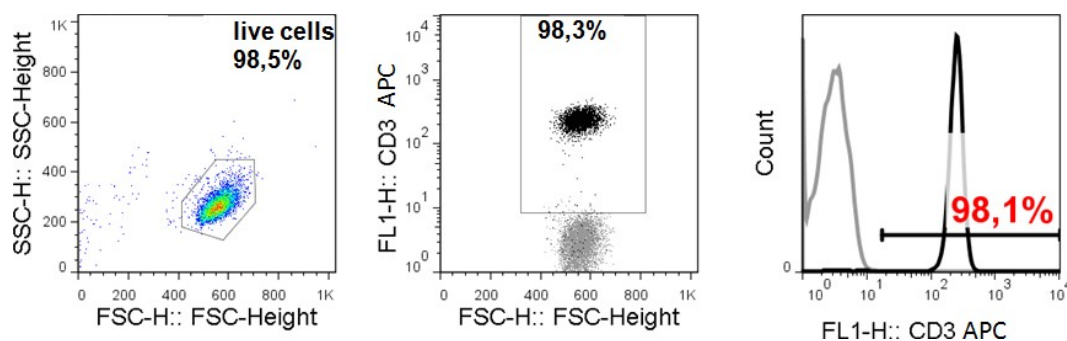
Analyse der Oberflächenmarker CD14 und CD1a validiert wurde (anti-CD14-FITC, BD; anti-CD1a-APC, Miltenyi Biotec). Als vollständig ausdifferenzierte moDCs galten lebende Zellen, die CD1a exprimierten, CD14 jedoch nicht mehr (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Analyse der moDC Differenzierung.** Nach der 5-tägigen Differenzierung aus Monozyten mit IL4 und GM-CSF waren über 96% der moDCs vital. Das Mittel von 96,2% ( $\pm 1,9\%$ ) der vitalen moDCs exprimierte CD1a, ohne gleichzeitig für CD14 positiv zu sein. Das rechte Punktediagramm zeigt die CD1a-Hoch- und CD14-Runter-Regulation während der Differenzierung von Tag 0 bis 5.

#### 4.2.6 Isolation von pan T-Zellen

Eine Immunfunktion dendritischer Zellen ist die antigenspezifische Aktivierung verschiedener T-Zellen. Zur Analyse dieser Funktion wurden zu den DCs autologe pan T-Zellen gewonnen, DCs und T-Zellen stammten dementsprechend von demselben Spender ab. Die T-Zellen wurden mit dem pan T Zell Isolations-Kit von Miltenyi Biotec aus PBMCs negativ selektiert. Hierzu wurden je Ansatz  $10^7$  PBMCs nach Herstellerangaben in 40  $\mu$ l Puffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ l pan T-Zell Biotin Antikörper Cocktail gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 4°C wurden 30  $\mu$ l Puffer und 20  $\mu$ l anti-Biotin-MicroBeads hinzugegeben und weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension auf ein Volumen von 500  $\mu$ l gebracht und über eine äquilibrierte LS-Säule mit dreimal 3 ml Puffer separiert. Die mit dem Durchfluss depletierten T-Zellen wurden dabei in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Mit der Neubauer-Zählkammer wurde die Ausbeute bestimmt ( $\sim 40\%$ , Abschnitt 4.2.2) und mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 4.3.1) und einem anti-CD3 Antikörper wurde die Reinheit der T-Zellen kontrolliert (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7: Durchflusszytometrische Analyse der depletierten T-Zellen.** Die isolierten T-Zellen eines repräsentativen Spenders waren zu 98,5% vital. Im Mittel waren die vitalen Zellen zu 98,2% ( $\pm 1,6\%$ ) positiv für CD3. Dies ist im mittleren Bild als Punktediagramm und rechts als Histogramm dargestellt.

#### 4.2.7 Einfrieren und Auftauen primärer Zellen

Das Einfrieren der Primärzellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank oder in flüssigem Stickstoff ( $-160$  bis  $-196^{\circ}\text{C}$ ) zur wochen- bis monatelangen Lagerung erfolgte in einem speziellen,  $4^{\circ}\text{C}$  gekühltem 5CS-CryoStor-Einfriermedium (BioLifeSolutions). CryoStor beinhaltet Substanzen zum schützenden Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen. DMSO (Dimethylsulfoxid) fungiert dabei als Frostschutzmittel, dass die schädliche Kristallbildung beim Einfrieren des wässrigen Mediums verhindert. Außerdem werden keine Zusätze wie Serum oder Proteine benötigt, dies ist für eine nach GMP (engl. good manufacturing practice) gerichtete Arbeitsweise von Vorteil.

Es wurden jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen in 1 ml CryoStor aufgenommen und sofort in gekühlte Kryogefäße (Hartenstein) transferiert. Nach 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurden die Kryogefäße in eine auf  $4^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Kryo-Einfrierbox (Hartenstein) gestellt und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht tiefgefroren. Die Kryo-Einfrierbox beinhaltet Isopropanol, um ein langsames Einfrieren zu garantieren. Am nächsten Tag konnten die eingefrorenen Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Aufwirbeln im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad, bis keine Eispartikel mehr sichtbar waren. Dann wurde die Zellsuspension sofort 1:10 mit Medium verdünnt, um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  pelletiert und in das gewünschte Medium-Volumen aufgenommen.

### 4.3 Konfrontations-Experimente und deren Analyse

Für die anschließend erläuterten Experimente wurden Morphologien von *A. fumigatus* mit verschiedenen dendritischen Zellen koinkubiert. Daraus sollten Erkenntnisse über eine durch den Pilz ausgelöste Immunzell-Aktivierung gewonnen werden. Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden für jedes Experiment mindestens drei verschiedene Immunzell-Spender analysiert.

#### 4.3.1 Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie

Die Abkürzung FACS steht für „fluorescence activated cell sorting“ und wird häufig als Synonym für die Durchflusszytometrie verwendet. Die Methode beruht, wie in Abbildung 4.8 dargestellt, auf der Detektion verschiedener optischer Signale, die durch verschiedene Eigenschaften von Zellen beeinflusst werden.

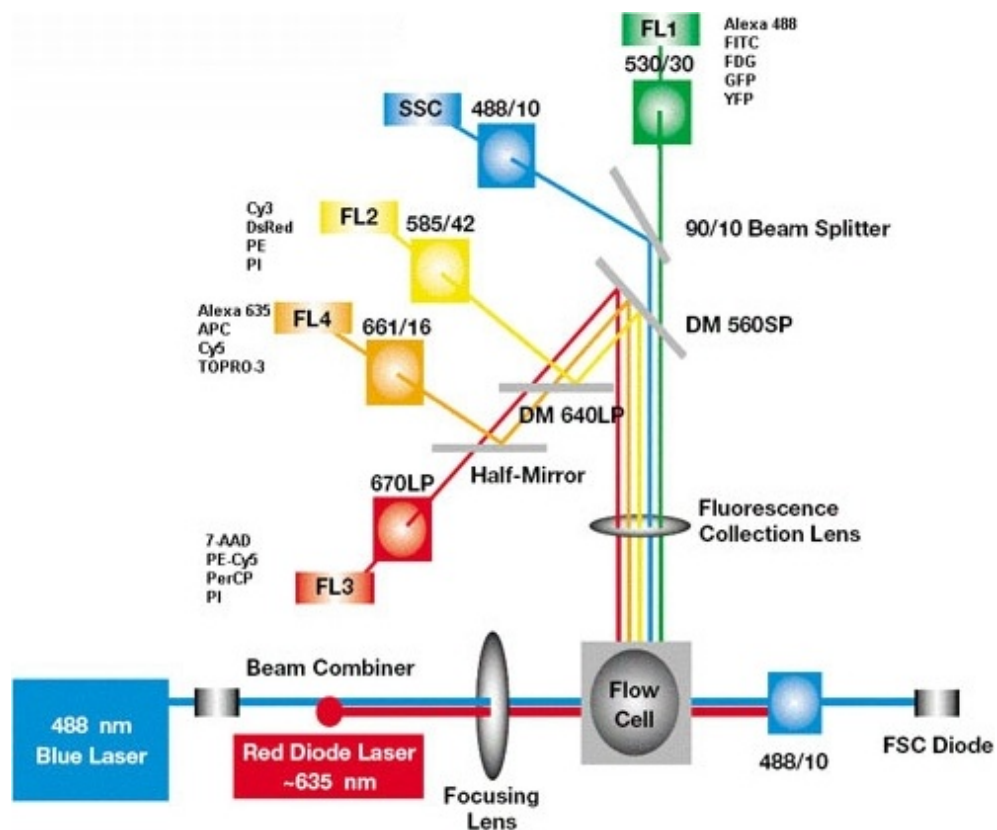


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des optischen Systems eines FACS Calibur Durchflusszytometers. Quelle: [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Die in einer Suspension befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Messbereich einzeln einen Laserstrahl, der dann unterschiedlich stark abgelenkt beziehungsweise in seiner Intensität vermindert wird. Durch die Messung der Lichtbeugung und -streuung werden Informationen über die Größe und Granularität einer Zelle gewonnen. Das in einem geringeren Winkel gebeugte Licht wird als Vorwärtsstreulicht FSC (engl. forward scattering) bezeichnet und hängt von der Zellgröße ab. Das Seitwärtsstreulicht SSC (engl. side scattering) kann im rechten Winkel dazu registriert werden und ist proportional zur Granularität der Zelle. Mit diesen Parametern können beispielsweise Zellen des Blutes bereits recht gut unterschieden werden.

Außerdem können Oberflächenmoleküle von Zellen durch spezifische Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper gebunden und im Durchflusszytometer detektiert werden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluorochroms durch einen monochromatischen Laser (488 nm) werden diese auf ein höheres Niveau angehoben und fallen anschließend unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Durch spannungsabhängige Detektoren werden die emittierten Photonen gemessen, in ein elektrisches Signal konvertiert und durch einen Computer in Diagrammen dargestellt. Es können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden, da die eingesetzten Farbstoffe durch Licht derselben Wellenlänge angeregt werden, aber über unterschiedliche Emissionsspektren verfügen.

Um unspezifische, falsch positive Antikörperbindungen nicht als positiv zu werten, wurde eine Zellprobe mit einem Isotyp-Antikörper inkubiert. Es handelt sich dabei um einen Antikörper derselben Antikörperklasse, mit demselben Farbstoff, jedoch ohne spezifische Bindekapazität. Die Fluoreszenz der Isotyp-Probe diente zur Festlegung der Hintergrundfluoreszenz, die über die Spannungsmodulation der Detektoren unter eine Fluoreszenzintensität von 10 eingestellt wurde.

**Tabelle 4.1: Liste der verwendeten Fluoreszenz-Antikörper für durchflusszytometrische Analysen**

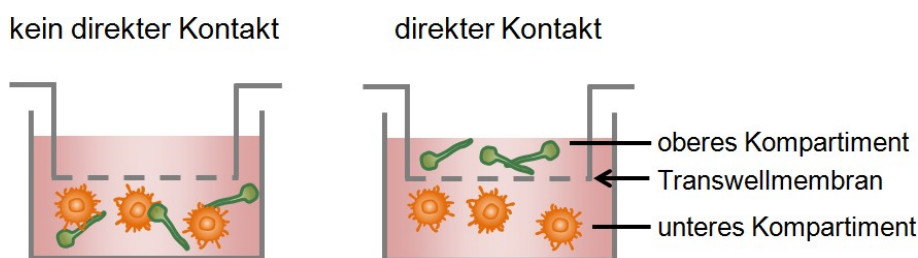
humaner Zelltyp	Oberflächenmarker	Isotyp	Firma
mDCs	CD1c	IgG2a-APC	Miltenyi Biotec
	CD19	IgG1-FITC	BD
pDCs	CD303	IgG1-FITC	Miltenyi Biotec
Monozyten und moDCs	CD14	IgG-2a-FITC	BD
	CD1a	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
DC Maturierung	CD80	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD83	IgG1-PE	BD
	CD86	IgG1-FITC	BD
	CD40	IgG2a-FITC	BD
	HLA-ABC	IgG2b-PE	BD
	HLA-DR	IgG2b-PE	BD
T-Zellen	CCR7	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD3	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD4	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD8	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD69	IgG1-APC	Miltenyi Biotec
	CD25	IgG1-FITC	BD
Aspergillus-Rezeptoren auf DCs	CD154	IgG2a-FITC	Miltenyi Biotec
	Dectin-1	IgG2b-PE	R&D Systems
	TLR2	IgG1-PE	BioLegend
	TLR4	IgG1-PE	BioLegend

Um Zellen mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern zu markieren, wurden mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen in einem 5 ml FACS-Röhrchen pelletiert ( $300 \times g$ , 10 min, RT) und der Überstand abgenommen. Jedes Pellet wurde mit 2 ml Puffer gewaschen und in einem Endvolumen von 20 bis 100  $\mu$ l mit Puffer resuspendiert. Zu jeder Zellsuspension wurde im Dunkeln der entsprechende Antikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml kaltem Puffer, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Das erhaltene Pellet wurde in 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert und mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer (BD) analysiert.

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse wurde ein an das FACS Calibur angeschlossenes Computersystem mit der Software CellQuest Pro (BD) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe der Software FlowJo (Tree Star) ausgewertet.

### 4.3.2 DC-Maturierungsverhalten im Transwellssystem

Werden dendritische Zellen durch bestimmte Immunogene stimuliert, erhöhen sie die Expression von Oberflächenmolekülen zur T-Zell Kostimulation (CD80, CD83, CD86, CD40), für die Antigenpräsentation (HLA-DR, HLA-ABC) sowie einem Rezeptor für die Migration zu Lymphknoten (CCR7). Dendritische Zellen, welche die Expression dieser Maturierungsmarker erhöhen gelten als reife dendritische Zellen, die in der Lage sind andere Immunzellen adäquat auf das jeweilige Immunogen zu aktivieren. Solche Immunogene können in löslicher Form, oder auch zellgebunden auf der Oberfläche von Pathogenen vorkommen. Der Einsatz von Transwellmembranen mit einer sehr kleinen Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  verhinderte im Konfrontationsexperiment mit DCs und *Aspergillus* den direkten Kontakt der Zellen zueinander, jedoch konnten lösliche Bestandteile frei diffundieren. Die Transwellmembran (//) trennt dabei, wie in Abbildung 4.9 gezeigt, die Vertiefung einer Zellkulturplatte in ein oberes und ein unteres Kompartiment. Nach der Konfrontation mit und ohne direktem Kontakt wurden die DCs hinsichtlich ihrer Expression von Maturierungsmarkern durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Transwellsystems in einer Zellkulturplatte.** Links sind dendritische Zellen und *Aspergillus* Keimschläuche mit direktem Zellkontakt im unteren Kompartiment vereint. Rechts sind die beiden Zelltypen durch die Transwellmembran voneinander getrennt, nur flüssige Bestandteile können durch Diffusion über die Transwellmembran ausgetauscht werden.

Für das Konfrontations-Experiment wurden  $3 \times 10^5$  DCs in 600  $\mu\text{l}$  RPMI-10%FCS im unteren Kompartiment einer 24-well Zellkulturplatte platziert und für 18 h mit den folgenden Konditionen inkubiert:

1. unstimuliert (DCs // Medium)
2. stimuliert mit einer Positiv-Kontrolle (moDCs und mDCs mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (Sigma) (DCs + LPS // Medium); pDCs mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  R848 (Invitrogen) einem TLR7/9 Ligand (pDCs + R848 // Medium))
3. mit Keimschläuchen ohne direkten Kontakt (DCs // gt)
4. mit Keimschläuchen in direktem Kontakt (DCs + gt // Medium)

Nach Befüllung des unteren Kompartiments wurde mithilfe einer sterilen Pinzette die Transwellmembran eingesetzt und das obere Kompartiment mit 300  $\mu$ l Volumen und dem jeweiligen Stimulus befüllt. Die für 18 h stimulierten DCs wurden aus dem unteren Kompartiment geerntet, durch ein 40  $\mu$ m Zellsieb von großen Pilzbestandteilen befreit und wie in Abschnitt 4.3.1 durchflusszytometrisch mithilfe von für die Maturierungsmarker spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 4.1) analysiert.

### 4.3.3 Expressionsanalyse bekannter *Aspergillus*-Rezeptoren

Die auf verschiedenen Immunzellen nachgewiesenen Rezeptoren für *A. fumigatus* umfassen das C-Typ Lektin Dectin-1 [Mezger et al. (2008)] und die beiden Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 [Braedel et al. (2004)]. Ob im Vergleich zu moDCs, mDCs und pDCs diese Rezeptoren auch exprimieren, wurde durchflusszytometrisch wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben mithilfe der in Tabelle 4.1 benannten Antikörper anti-Dectin-1, anti-TLR2 und anti-TLR4 analysiert. mDCs und pDCs wurden direkt nach ihrer Isolation und moDCs nach der 5-tägigen Differenzierungszeit hinsichtlich der Rezeptorexpression untersucht.

### 4.3.4 Apoptose-Assay

Die Viabilität von aufgetauten DCs wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Früh apoptotische Zellen translokieren Phosphatidylserin auf die Zellmembranoberfläche, dieses kann durch FITC-gekoppeltes Annexin V gebunden und nachgewiesen werden. Spät apoptotische Zellen weisen bereits eine für PI (Propidiumjodid) permeable Zell- und Kernmembran auf, sodass PI an die DNA solcher Zellen binden kann.

Die pelletierten Zellen wurden mit einer Konzentration von  $10^6$ /ml in Bindepuffer des Apoptose-Kits (BD) resuspendiert und zu 100  $\mu$ l in FACS-Röhrchen überführt. Das erste Röhrchen verblieb ungefärbt, dem zweiten wurde jeweils 2  $\mu$ l Annexin V-FITC und PI (Propidiumjodid) zugegeben. Einer 15 min Inkubation bei RT folgte die Vermessung am Durchflusszytometer. Zur Verhinderung von Überstrahlungseffekten wurde die Fluoreszenz von Annexin V-FITC im FITC-Kanal (Fl 1) und von PI im PerCP-Kanal (Fl 3) detektiert.

### 4.3.5 Zytokinanalyse mittels ELISA

Sekretierte Proteine können im Zellkultur-Überstand durch einen ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) analysiert werden. Dazu wird der für ein bestimmtes Protein spezifische Capture-Antikörper an die Oberfläche einer 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Das zu detektierende Antigen bindet an den Capture-Antikörper und wird dann von einem zweiten spezifischen Antikörper detektiert, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Das Antigen ist somit von den beiden Antikörpern umgeben, weswegen diese Form Sandwich-ELISA genannt wird. Der Detektions-Antikörper ist zusätzlich an Biotin gebunden, welches von dem Streptavidin gekoppeltem Enzym Meerrettichperoxidase (eng. horseradish peroxidase, HRP) gebunden wird. Durch Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) kommt es zu einer der Proteinkonzentration proportionalen Türkisfärbung. Die Farbintensität kann mittels Absorptionsmessung am ELISA-Reader bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Zytokine TNF $\alpha$ , IL10 und IFN $\gamma$  wurden Standard-ELISA-Kits der Firma BioLegend verwendet. Der Erstantikörper wurde 1:200 in Coating Puffer (für 1 L 8,4 g NaHCO<sub>3</sub>, 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1 L destilliertes Wasser lösen und pH 9,5 einstellen) verdünnt und zu jeweils 100  $\mu$ l in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte transferiert. Nach der über Nacht-Inkubation bei 4°C wurde überschüssiger Antikörper durch viermaliges Waschen mit je 200  $\mu$ l Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS; (Phosphatgepufferte-Saline, für 1 L PBS 8 g NaCl, 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl in destilliertem Wasser lösen und pH auf 7,4 einstellen)) mithilfe eines ELISA-Waschgerätes (hydroFlex ELISA-washer, Tecan) entfernt. Es folgte eine Blockierung für 1 h bei RT mit 200  $\mu$ l Assay Diluent (1% BSA (Sigma Aldrich) in PBS), um unspezifische Bindungen des Analyts an die Plattenoberfläche zu verhindern. In der Zwischenzeit wurden die Proben und Standards vorbereitet. Als Standard diente ein im Kit enthaltenes Referenzprotein, das mit Assay Diluent den Herstellerangaben entsprechend als Konzentrationsreihe verdünnt wurde. Die Proben waren eingefrorene Zellkultur-Überstände, die aufgetaut und gut gemischt wurden. Dann wurde erneut viermal gewaschen, 100  $\mu$ l der Proben und Standards als Duplex aufgebracht und für 2 h auf dem Schüttelinkubator bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und viermal gewaschen. Der Detektions-Antikörper wurde 1:200 in Assay Diluent verdünnt und je 100  $\mu$ l pro Vertiefung für 1 h bei RT im Schüttelinkubator



belassen. Nach viermal Waschen wurden 100 µl der 1:1000 verdünnten Avidin-HRP Lösung zugegeben und weitere 30 min bei RT mit Schütteln inkubiert. Es folgten 5 Waschschritte mit 30 s Pausen, um den Signalhintergrund zu minimieren. Das TMB Substrat wurde zu je 100 µl zugegeben und abhängig von der Farbentwicklung für 15 - 30 min bei RT ohne Schütteln inkubiert. War die Türkis-Färbung intensiv genug wurde die Farbreaktion mit 100 µl Stopp-Reagenz (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sigma Aldrich) beendet, wodurch sich ein pH abhängiger Farbumschlag nach gelb einstellte. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm in einem Tecan ELISA-Reader (GENios FL, Tecan).

#### 4.3.6 Zytokinanalyse im Multiplex-ELISA

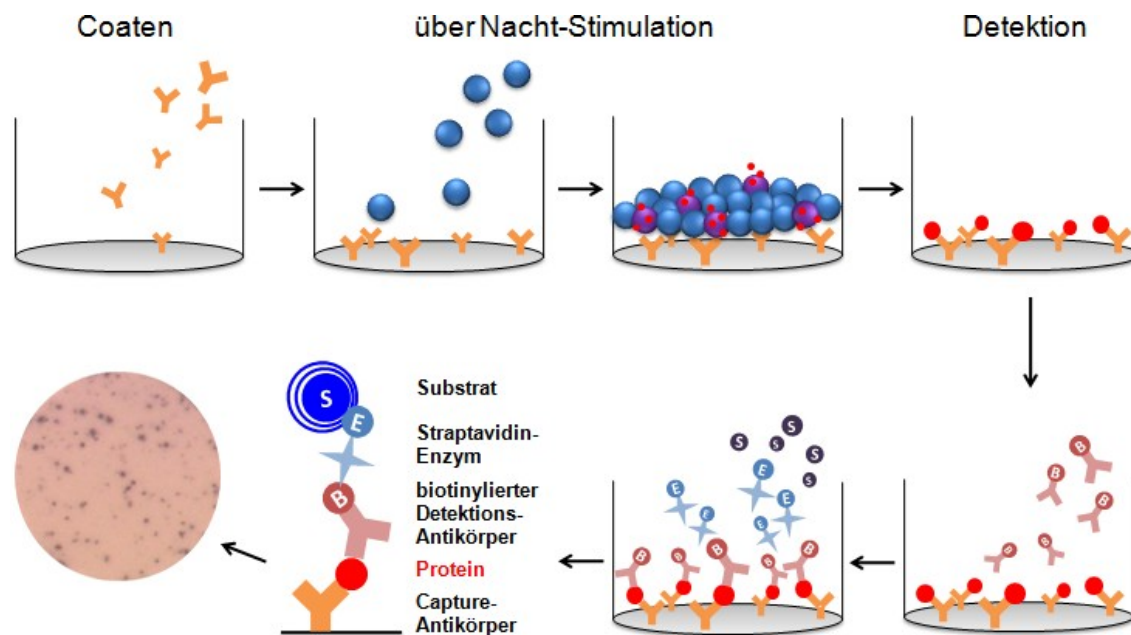
In der vorliegenden Arbeit wurden moDCs, mDCs und pDCs mit *Aspergillus* Morphologien und Proteinen stimuliert und die Kulturüberstände mittels Multiplex-ELISA analysiert, um etwaige Unterschiede der Zytokinprofile verschiedener DCs zu erkunden. In einem Multiplex-ELISA kann die Konzentration mehrere Zytokine in einer Probe simultan analysiert werden.

Für die Stimulation wurden  $2 \times 10^5$  DCs in 200 µl RPMI-Medium mit 10% FCS unstimuliert belassen, mit  $2 \times 10^5$  Konidien oder  $2 \times 10^5$  Keimschläuchen (MOI „multiplicity of infection“ = 1) für 6 Stunden oder mit den im Ergebnisteil 5.3 benannten Proteinen für 18 h kokubiert. Dann wurden die Überstände abgenommen, bei -20°C gelagert und mittels eines Bio-Plex Pro Human Cytokine 25-Plex ELISA (BioRad) in Kooperation mit dem Hans-Knöll-Institut in Jena auf folgende Zytokine analysiert: IL1b, IL1Ra, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12p40, IL12p70, IL15, IL17, IL18, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CXCL10, MCP1, MCP3, MIP1a, MIP1b, CCL5, TNF $\alpha$ , VEGF, GRO $\alpha$ .

#### 4.3.7 ELISpot

Die ELISpot (engl. enzyme-linked-immuno-spot) Analyse ist ein extrem sensitives Verfahren, um Zellaktivierung auf Einzelzellniveau zu messen. Bei ihrer Aktivierung setzen Immunzellen Zytokine frei, die als Botenstoffe zur Zellkommunikation dienen. Die sekretierten Zytokine werden in der ELISpot-Analyse durch monoklonale Antikörper an eine feste Phase gebunden und mit Detektions-Antikörpern sowie zusätzlicher Hilfe einer Substrat-Peroxidase Reaktion detektiert. Jeder entstandene Spot zeigt somit die Zytokin-

ausschüttung einer antigenspezifischen Zelle an (Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10: Schematische Darstellung des ELISpot Experiments.** Nachdem die sekretierten Proteine an Festphasen-gebundene Antikörper gebunden haben, werden sie von biotinylierten Detektions-Antikörpern gebunden und durch eine Biotin-Streptavidin amplifizierte Peroxidase-Substrat-Reaktion als Spot in der Kulturplatte sichtbar.

Zu Beginn wurde die ELISpot-Kulturplatte (Millipore) dreimal mit 200 µl Puffer gewaschen. Der erste Capture-Antikörper (1-D1K, BD) wurde 1:200 auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml mit PBS-Puffer verdünnt und zu 100 µl pro Vertiefung über Nacht bei 4°C an die feste Phase der ELISpot-Kulturplatte gebunden. Am darauffolgenden Tag wurde die Kulturplatte fünfmal mit 200 µl PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 200 µl Medium für 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> blockiert, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen. Nachdem das Medium entfernt wurde, konnten die Zellen als 1 - 5 × 10<sup>5</sup> Zellen in 200 µl Medium inklusive gewünschter Stimuli in die Vertiefungen platziert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Als Hintergrundsignal dienten unstimulierte Zellen, als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 0,5 µg/ml PMA (Sigma Aldrich) und 1 µg/ml Ionomycin (Sigma Aldrich) stimuliert. Die Entwicklung des ELISpots erfolgte am nächsten Tag. Hierfür wurden die Zellen durch 6 Waschschrte mit 200 µl PBS-Puffer entfernt. Der biotinylierte Detektions-Antikörper (7-B6-1 biotin, BD) wurde 1:250 in PBS-Puffer

mit 1 % BSA (Sigma Aldrich) verdünnt und zu je 100 µl in die Vertiefungen gegeben. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln und 5 Waschschrte mit 200 µl PBS-Puffer. Die Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (AP, Southern Biotech) wurde 1:1000 in PBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt und 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde achtmal mit 200 µl PBS-Puffer gewaschen. Das Substrat (NBT/BCIP, Sigma Aldrich) wurde zu je 100 µl in die Vertiefungen transferiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 - 30 min inkubiert, bis sich die violetten Spots entwickelten. Die Farbentwicklung wurde durch das Waschen mit Leitungswasser gestoppt. Im Dunkeln wurde die Kulturplatte bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend konnten die Spots mit einem ELISpot Reader (Immuno-spot® S2A Core Analyzer, CTL) ausgelesen werden.

#### 4.3.8 T-Zell Proliferation

Eine Immunfunktion dendritischer Zellen besteht darin, naive T-Zellen antigenspezifisch zur Proliferation anzuregen. Bei der Proliferation teilen sich die antigenspezifischen T-Zellen, wobei das Zytosol der Mutterzelle auf zwei Tochterzellen geteilt wird. Die Aufteilung des Zytosols kann zur Detektion des Proliferationsverhaltens genutzt werden. Durch den Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) wird das Zytosol aller vitaler Zellen gefärbt und bei jeder Zellteilung erfolgt eine progressive Halbierung des Fluoreszenzfarbstoffes. Die Fluoreszenzintensität von CFSE kann mittels Durchflusszytometer detektiert werden. Die Zellen wurden in dem GMP konformen CellGro Kulturmedium ohne Zugabe von Serum oder Proteinen inkubiert, um jegliche Reaktionen auf Fremdproteine zu vermeiden.

Nachdem DCs aus PBMCs generiert beziehungsweise isoliert wurden, konnten  $6 \times 10^5$  DCs in einer 96-well Platte und 200 µl CellGro-Medium (CellGenix) mit Antigenen stimuliert werden. Die Antigene in der vorliegenden Arbeit umfassten die Aspergillus-Proteine CcpA, CpcB, fg-gap und SHMT. Deren Herkunft, Funktion und Aufreinigung sind in den Abschnitten 5.2 und 5.3 näher beschrieben. Außerdem wurde ein *A. fumigatus* Lysat der Firma Miltenyi Biotec zur Stimulation verwendet. Alle Antigene wurden mit einer Konzentration von 1 - 50 µg/ml für 18 h zu der DC Kultur geben. Am nächsten Tag wurden die antigenbeladenen DCs mit 1 ml CellGro gewaschen und als  $5 \times 10^4$  DCs/50 µl resuspendiert. Die T-Zellen wurden aus autologen, eingefrorenen PBMCs isoliert und mit CFSE

(Life Technologies) gefärbt. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  T-Zellen/ml HBSS-Puffer resuspendiert und mit  $1 \mu\text{M}$  CFSE/ml für 15 min bei RT inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte mit dem 10-fachen Volumen an Puffer. Die pelletierten T-Zellen wurden als  $5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$  in CellGro resuspendiert und zu jeweils  $5 \times 10^5$  in die Vertiefungen einer 48-well Zellkulturplatte transferiert. Dann wurden  $50 \mu\text{l}$  CellGro zu dem unstimulierten Ansatz gegeben,  $5 \times 10^4$  DCs in  $50 \mu\text{l}$  CellGro zu den jeweiligen Stimulationsansätzen und  $1 \mu\text{l}$  zuvor gewaschene CD3/28 DynaBeads (Life Technologies) in  $50 \mu\text{l}$  CellGro zum positiven Kontrollansatz. Die DC-T-Zell Kokultur dauerte 12 Tage, alle 3 Tage wurde das Medium zur Hälfte teilerneuert. Das zu verwerfende Medium wurde zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und mit dem frischen Medium der Kokultur zurückzuführen. Eine Restimulation mit vom Tage der Erststimulation eingefrorenen DCs erfolgte am sechsten Tag. Hierfür wurden  $225 \mu\text{l}$  der DC-T-Zell Kokultur zentrifugiert und das Zellpellet mit  $225 \mu\text{l}$  frischem Medium und  $5 \times 10^4$  aufgetaute DCs resuspendiert und zur DC-T-Zell Kokultur gegeben. An Tag 6 und Tag 12 wurde der Proliferationsprogress im Durchflusszytometer analysiert. Zum Ausschluss von ungefärbten DCs wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, mit anti-CD3 Antikörpern gefärbt und zur genaueren Beurteilung der proliferierten T-Zell Population mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern detektiert. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil an CD3/CD4/CD8-positiven Zellen, der auf den jeweiligen Stimulus im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen proliferierte.

#### 4.3.9 CD154-Aspergillus-spezifische T-Zellen

Aspergillus-spezifische T-Zellen, die durch Antigene von Aspergillus aktiviert werden, induzieren die Expression des Zelloberflächenmoleküls CD154. Somit kann CD154 als Marker für Aspergillus-spezifische T-Zellen angesehen werden [Bacher et al. (2013)]. Durch die Analyse der CD154 Expression wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen, ob die hier verwendeten Aspergillus-Antigene (CcpA, CcpA, fg-gap, SHMT und Aspergillus Lysat) T-Zellen in einer PBMC Population stimulieren können.

Frisch isolierte PBMCs wurden zu  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $100 \mu\text{l}$  RPMI-Medium resuspendiert und in die Vertiefungen einer 96-well Zellkulturplatte transferiert. Dem Medium wurde wie in [Bacher et al. (2013)] beschrieben  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD28 Antikörper (Miltenyi Biotec) zugegeben, um die Antigenstimulation zu verbessern. Die jeweiligen Stimuli wurden für 18 h zugegeben, als Positiv-Kontrolle diente Aspergillus Lysat. Am nächsten Tag wurden

die PBMCs mit anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD154 Fluoreszenz-Antikörpern wie in Abschnitt 4.3.1 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil an CD4- und CD8-positiven Zellen, der zusätzlich CD154 exprimierte.

## 4.4 Umgang mit rekombinanten Proteinen

Die Proteine wurden von verschiedenen Kooperationspartnern synthetisch oder rekombinant mithilfe von *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris* hergestellt. Für das routiniert Arbeiten mit den Proteinen verschiedener Herkunft, wurde ein qualitativ und quantitativer Analyse- und Aufreinigungsprozess im Labor etabliert.

### 4.4.1 Protein-Quantifizierung

Proteinkonzentrationen können mit verschiedenen Methoden quantifiziert werden, die im Folgenden beschrieben sind.

#### **NanoDrop**

Die Proteinkonzentration von hochreinen Einzelproteinen kann mittels Absorptionsmessung bestimmt werden. Die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan absorbieren dabei das Licht der Wellenlänge 280 nm. Die Proteinlösung darf hierbei keine Bestandteile wie Triton-x, NP-9, RIPA oder DTT enthalten, da diese auch bei 280 nm Licht absorbieren. Die Absorptionsmessung kann mithilfe des NanoDrops (Thermo Scientific) vorgenommen werden, wobei Proteinkonzentrationen von 0,1 - 100 mg/ml detektiert werden können.

Für die Messung wurde am Gerät die Einstellung Protein A280 gewählt. Nach Säuberung des Messfeldes mit destilliertem Wasser, wurden 2 µl des Proteinpuffers aufgebracht und mit BLANK das Hintergrundsignal festgelegt. Dann wurden die Proteinproben vermessen und von dem erhaltenen Wert der Hintergrundwert des Puffers subtrahiert.

#### **DC Protein Assay**

Der DC Protein Assay (BioRad) dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan des Proteins reduzieren während der Konzentrationsbestimmung Reagenz B zu einem blauen Farbstoff, dessen Absorption mittels Photometer gemessen werden kann. Das Mitführen einer BSA-Standardreihe (engl. bovine serum

albumin) mit definierten Proteinmengen, ermöglicht die Erstellung einer Standardkurve und durch diese wird auf die Proteinkonzentration der Probe zurückgeschlossen.

Als Standardreihe wurde BSA (Roth) zu 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 mg/ml in Protein-Puffer verdünnt. Jeder Standard und die zu vermessenden Proben wurden zu 5 µl in die Vertiefungen einer 96-well Platte pipettiert. 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B wurden zugegeben, vorsichtig resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde innerhalb einer Stunde bei 750 nm am Photometer (Tecan) gemessen. Mit dem DC Protein Assay können Proteinkonzentrationen von 0,2 - 1,5 mg/ml detektiert werden.

### Coomassie

Die Proteinfärbung mittels Coomassie erforderte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch eine SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Hierfür wurden die Proteine in 1x Tris-Glycin/SDS Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert sowie einheitlich negativ geladen. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem 12%-igem Trenngel, welches von einem 4,5%-igem Sammelgel überschichtet war. An der Grenzschicht des weitmaschigen Sammelgels zum engmaschigen Trenngel sammelt sich die Proteinprobe zu einer dünnen Bande, sodass eine Banden-Auftrennung nach Molekulargewicht möglich wird. Im Trenngel wandern die kleineren Proteine schneller durch die engen Maschen in Richtung der positiv geladenen Anode, während größere Proteine langsamer sind und somit weiter oben im Gel verbleiben.

**Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-PAGE**

Sammelgel (4,5%)		Trenngel (12%)	
PAA (30%, Roth)	0,7 ml	PAA (30%)	2,0 ml
4x Sammelgelpuffer		4x Trenngelpuffer	
(6 g Tris, 4 ml 10% SDS,	1,25 ml	(pro 100 ml 36,3 g Tris, 8 ml 10% SDS,	1,25 ml
VE-Wasser bis 100 ml, pH 6,8)		VE-Wasser bis 100 ml, pH 8,8)	
destillierte Wasser	3,0 ml	desstiliertes Wasser	1,75 ml
APS (10%)	50 µl	APS (10%)	50 µl
TEMED	5,0 µl	TEMED	5,0 µl

Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in eine Elektrophoresekammer (BioRad) eingebracht, diese mit 1x Elektrophoresepuffer (10x Laemmli Puffer (BioRad) mit destil-

liertem Wasser 1:10 verdünnt) befüllt und das Gel mit den denaturierten Proteinproben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 120 V für zirka 40 min, dabei wurde die farbige Lauffront des Bromphenolblaus der Proteinproben beachtet. Nach der Auftrennung wurde das SDS-Gel aus der Kammer entfernt und in 1x Coomassie G-250 (BioRad) über Nacht gefärbt. Dann erfolgte eine sukzessive Entfärbung mit Wasser, bis sich die blauen Banden deutlich vom Hintergrund absetzten. Das Mitführen eines Größenmarkers (5 µl Page Ruler, Thermo Scientific) ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinbanden.

#### 4.4.2 Endotoxingehalts-Bestimmung

Proteine, vor allem solche, die rekombinant mithilfe von *E. coli* produziert werden, müssen hinsichtlich ihres Endotoxin-Gehalt quantifiziert werden. Endotoxine können Immunzellen stimulieren und würden als Verunreinigung im Protein falsch positive Stimulationseffekte verursachen. Die Endotoxin Quantifizierung konnte mithilfe des Thermo Scientific Pierce LAL Chromogenic Kits (Thermo Scientific) erfolgreich etabliert werden. Der Test enthält ein modifiziertes Limulus Amebocyte Lysat des Pfeilschwanzkrebse, das durch Endotoxin katalytisch aktiviert wird. Das aktivierte Proenzym katalysiert nachfolgend die Zersetzung eines Substrats, dies wird durch eine gelbe Farbreaktion sichtbar.

Für die analytische Bestimmung des Endotoxingehalts wurde eine 96-well Zellkulturplatte für 10 min bei 37°C vorgewärmt und dann mit 50 µl der Standardansätze und Proben befüllt. Die Standardreihe bestand aus in Wasser verdünntem Endotoxin mit den Konzentrationen 1, 0,5, 0,25 und 0,125 EU/ml (Endotoxin Units). Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde 50 µl LAL zugegeben, gemischt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 100 µl Substrat bewirkte eine gelbe Färbung, die mit 50 µl einer 25% Essigsäure (Sigma Aldrich) gestoppt wurde und bei 405 nm im Photometer (Tecan) zur Absorptionsbestimmung diente. Durch die Standardansätze konnte eine Standardkurve erzeugt und durch diese die Endotoxinkonzentration der Proben bestimmt werden.

#### 4.4.3 Endotoxin-Entfernung

Proteine, die zur Stimulation von Immunzellen verwendet werden sollen, dürfen nur bedingt Endotoxin enthalten. Einige Literaturangaben verweisen auf eine Endotoxinkon-

zentration von unter 0,1 EU/ml, was bei LPS (Lipopolysaccharid) 0,01 ng/ml entspricht. Endotoxin-Kontaminationen können durch die rekombinante Proteinexpression über gram-negative *E. coli* Bakterien oder auch durch verunreinigte Puffer entstehen. Nachdem die Proteine quantifiziert und hinsichtlich ihres Endotoxingehalts analysiert wurden, konnte die finale Endotoxin-Konzentration für die Immunzell-Stimulation berechnet werden. Lag der Wert über dem der Literaturangaben, wurde die Endotoxin-Kontamination chromatographisch entfernt.

Hierfür wurde eine sterile Säule mit Resin (Thermo Scientific) befüllt, wobei 1 ml Resin die Menge von 2.000.000 EU Endotoxin entfernen kann. Die Säule wurde mit 2M NaCl und danach mit Wasser gewaschen, indem die Flüssigkeiten bis 0,5 cm über das Säulenmaterial befüllt wurde und der Durchfluss die Säule durch die Schwerkraft passierte. Es folgte eine dreimalige Equilibrierung der Säule mit dem Puffer, in dem auch das Protein gelöst war. Die Proteinprobe wurde aufgebracht, sie durfte in das Säulenmaterial einlaufen und während einer 5 - 60 min Inkubation konnte das Endotoxin an das Resin binden (für 100 µl 10 min, für 10 ml 60 min). Die Proteinlösung wurde zu jeweils 5 Tropfen in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert. Die Säule wurde erneut verschlossen, mit 200 - 1000 µl Proteinpuffer überschichtet und für 5 - 60 min inkubiert. Die Eluate wurden solange gesammelt, bis die komplette Proteinlösung das Resin passiert hatte. Die erhaltenen Eluate wurden auf ihre Proteinkonzentration mithilfe des NanoDrops und einer Coomassie-Färbung analysiert. Dann wurden die Protein-haltigen Eluate vereint und der Endotoxingehalt bestimmt. War die Endotoxin-Kontamination immer noch höher als die 0,01 ng/ml Grenze, wurde die Säule mit 0,2N NaOH über Nacht regeneriert und für eine erneute Aufreinigung desselben Proteins verwendet.

### 4.5 Genexpressionsanalysen

Mit *Aspergillus* Proteinen stimulierte Immunzellen wurden mittels Genexpressionsanalyse hinsichtlich der Induktion von Zytokinen auf mRNA-Ebene untersucht. Die stimulierten Zellen wurden hierfür vom Zellkulturüberstand befreit und in 50 µl RNAprotect (Qiagen) resuspendiert. So konnten die Zellen mit besonderem Schutz der RNA-Integrität für Wochen bei -20°C gelagert werden.



### 4.5.1 RNA Isolation

Die in RNAProtect gelagerten Zellen wurden aufgetaut und nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) die RNA isoliert. Hierfür wurden die Zellen in 350  $\mu$ l RLT-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 350  $\mu$ l 70% EtOH zugegeben, durchmischt und das entstandene Lysat auf eine Qiagen Mini-Säule überführt. Nach einer 30 s Zentrifugation mit 8000 $\times$ g wurde der Durchfluss verworfen und die RNA haftete am weißen Säulenmaterial. Die RNA wurde mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer gewaschen und erneut mit 8000 $\times$ g für 30 s vom Puffer befreit. Dann folgte ein DNase Verdau, um für die spätere RNA-Konzentrationsbestimmung störende DNA-Reste zu entfernen. Je Probe wurden 10  $\mu$ l DNase I mit 70  $\mu$ l RDD-Puffer gemischt und auf jede Säule transferiert. Während einer 15 min Inkubation bei RT degradierte die DNase die restliche DNA. Anschließend wurde wieder mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer gewaschen. Es folgten 2 Waschschrte mit jeweils 500  $\mu$ l RPE. Nach dem zweiten Waschschrte wurde für 2 min zentrifugiert und die Säule auf ein neues Sammelgefäß überführt. Die Säule wurde für 1 min mit 13000 $\times$ g komplett trocken zentrifugiert. Für das Eluieren der RNA wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser benetzt. Durch die Zentrifugation bei 8000 $\times$ g für 1 min wurde die RNA von der Säule in das neue Reaktionsgefäß eluiert.

### 4.5.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde mithilfe des Spektrometers NanoDrop ND-1000 (Peqlab) bestimmt. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm und kann zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden. Über das Verhältnis 260 nm/280 nm beziehungsweise 260 nm/230 nm wurde die Reinheit der isolierten RNA bezüglich Verunreinigungen mit DNA oder Salzen und Zuckern bestimmt. Für die Vermessung wurden 1 - 2  $\mu$ l der RNA-Lösung auf die zuvor mit destilliertem Wasser gereinigte Messfläche des NanoDrops gegeben und die Absorption bei 260 nm gemessen.

### 4.5.3 cDNA Synthese

Für die spätere Genexpressionsanalyse mittels quantitativer PCR muss die RNA durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Das Enzym reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, katalysiert zunächst durch komplementäre Basen-

anlagerung die Synthese eines RNA-DNA-Hybridstrangs. Der RNA-Anteil wird durch die Nukleasefunktion einer anderen Untereinheit desselben Enzyms abgebaut, sodass daraus einzelsträngige cDNA resultiert.

Zur reversen Transkription wurden 100 - 500 ng RNA in 10  $\mu$ l RNase freiem Wasser verdünnt und folgende Substanzen des cDNA First Strand Synthesis Kits (Thermo Scientific) zugesetzt:

**Tabelle 4.3: Reaktionsreagenzien zur cDNA Synthese aus mRNA**

Reaktionsreagenz	Volumen [ $\mu$ l]
oligo dT Primer	1
5x Reaktions-Puffer	4
10 nM dNTP Mix	2
RiboLock RNase Inhibitor	1
M-MiLV Reverse Transkriptase	2
RNA 100-500 ng	10
Endvolumen	20

Nach vorsichtigem Mischen und anschließender Zentrifugation wurden die in achter Streifen befindlichen Ansätze in einem Thermocycler (Mastercycler EP S, Eppendorf) unter folgenden Bedingungen inkubiert:

**Tabelle 4.4: cDNA Synthese Programm im Thermocycler**

	Dauer [min]	Temperatur [ $^{\circ}$ C]
Segment 1	5	25
Segment 2	60	37
Segment 3	5	70
Segment 4	$\infty$	4

Die fertig synthetisierte cDNA wurde bis zur Genexpressionsanalyse bei  $-20^{\circ}$ C gelagert.

#### 4.5.4 quantitative PCR

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte durch eine quantitative PCR (engl. polymerase chain reaction) mit dem Farbstoff SYBR Green (BioRad). Während einer PCR werden mithilfe der katalytischen Aktivität einer DNA Polymerase mehrere DNA-Verdopplungszyklen durchlaufen. Zu Beginn wird die PCR durch eine hohe Tempera-

tur von 95°C initiiert, wobei die DNA-Polymerase aktiviert wird. Dann folgen die DNA-Verdopplungszyklen, bei denen die DNA erst in Einzelstränge denaturiert und dann bei moderater Temperatur durch die komplementäre Anlagerung von Nukleotiden mithilfe der DNA-Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt wird. Sobald die DNA als Doppelstrang vorliegt, kann der Cyanin-Farbstoff SYBR Green interkalieren. Die Fluoreszenzintensität des interkalierten SYBR Greens ist somit proportional zur DNA Menge. Der Vergleich der DNA Menge des Zielgens mit der eines Referenzgens ermöglicht die relative Quantifizierung des Genexpression. Das Referenzgen, auch Housekeeping Gen genannt, muss unter den verschiedenen physiologischen Zuständen immer gleich stark exprimiert sein. Klassische Beispiele sind  $\beta$ -Aktin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) [Bustin et al. (2009)]. Für die Expressionsanalyse von mRNAs aus primären Humanzellen eignet sich das Gen ALAS (humane  $\delta$ -Aminolevulinatsynthase), da dessen Expressionsniveau gleichbleibend und auf ähnlicher Höhe wie das der analysierten Gene ist.

Die DNA-Polymerase benötigt als Startpunkt der Amplifikation einen an die cDNA angelagerten Primer. Primer sind 10 - 20 Nukleotid kurze, einzelsträngige DNA-Stücke, die sich Sequenz-spezifisch in vorwärts (engl. forward) und reverser Richtung an die cDNA anlagern. Sie wurden mit Primer3 beziehungsweise Primer-BLAST so designt, dass sie Intron-überspannend waren. Das erhöht die Spezifität des Primers für den gewünschten zu amplifizierenden DNA-Abschnitt.

**Tabelle 4.5: Für die qPCR verwendete Primerpaare mit NK-Nummer und Sequenz. fw = forward, rv = reverse**

Gen	ID	Richtung	Primersequenz
ALAS	NM_000688.5	fw	GGCAGCACAGATGAATCAGA
		rv	CCTCCATCGGTTTTCACT
IFNG	nicht angegeben	fw	GCATCCAAAAGAGTATGAG
		rv	GCAGGCAGGACAACCATTAC
IL1B	NM_000576.2	fw	GGACAAGCTGAGGAAGATGC
		rv	TCGTTATCCCATGTGTCGAA
IL4	NM_000589.3	fw	TGTGCTCCGGCAGTCTACA
		rv	GACAGGAATTCAAGCCCGCC
IL10	NM_000572.2	fw	TTACCTGGAGGAGGTGATGC
		rv	GGCCTTGCTCTTGTTCAC
TNFA	NM_000594.2	fw	TGCTTGTTCTCAGCCTCTT
		rv	TGGGCTACAGGCTTGTGTCACT

Nach der Amplifikation erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse als schrittweise Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 95°C. Dabei liefern DNA Stücke derselben Länge und Sequenz einen Signalausschlag bei derselben Denaturierungstemperatur. Dies überprüft, ob tatsächlich nur ein spezifisches DNA-Stück amplifiziert wurde. Würde die vervielfachte DNA verschiedene Sequenzen enthalten, so würde die Schmelzkurvenanalyse mehrere Signalausschläge anzeigen.

Die von der RNA synthetisierte cDNA wurde 1:5 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und für die quantitative PCR (qPCR) mit folgenden Reagenzien vermischt:

**Tabelle 4.6: Reaktionsreagenzien für die qPCR**

Reaktionsreagenz	Volumen [ $\mu$ l]
RNase-freies Wasser	4
10 $\mu$ M forward Primer	1
10 $\mu$ M reverse Primer	1
iTaq Mastermix BioRad	10
cDNA Verdünnung	4
Endvolumen	20

Nachdem die qPCR Ansätze in eine spezielle 96-well-PCR-Platte transferiert wurden, erfolgte eine kurze Zentrifugation zur Sammlung der Flüssigkeit am Boden der Vertiefungen. Die PCR-Zyklen mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurden mithilfe des PCR-Gerätes StepOne Plus (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 4.7: Zyklen der qPCR mit Schmelzkurvenanalyse**

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

Für die Auswertung der qPCR Daten erfolgte zuerst die Bestimmung der PCR-Effizienz einzelner Gene mithilfe des Programms LinRegPCR (Acronis). Die theoretische PCR-

Effizienz bei einer fortwährenden DNA-Verdoppelung ist 2. Allerdings wird dieser Wert experimentell nie erreicht, da die Effizienz der PCR mit vorgefertigten Kits vor allem durch die Primerspezifität beeinflusst wird.

Die Fluoreszenzintensität des interkalierten SYBR Greens wurde bei jedem Zyklus gemessen und führte bei einer DNA-Amplifikation zu einer exponentiell ansteigenden Fluoreszenzkurve mit anschließender Plateauphase. Die Tangente der Kurve, welche die maximale Steigung aufwies, wurde von der Auswertungssoftware als Schnittgerade zur Basallinie verwendet, wobei der Schnittpunkt den Crossingpoint CP festlegte. Ausgegeben wurde der Zykluswert, an dem der CP vorzufinden war. Die relative Expression R eines Genes wurde relativ zum Referenzgen ALAS mittels der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet:

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

## 4.6 Statistik

Alle dargestellten Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, durch drei unabhängige Versuche erzielt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 5. Die Messwerte von mindestens drei unterschiedlichen Spendern (Einzelwerte  $x$ , Stichprobengröße  $n$ ) wurde innerhalb einer Kondition eines Experiments zum arithmetischen Mittel  $\bar{x}$  zusammengefasst:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Einzelwerte eines Mittelwerts streuen dabei mit dem Standardfehler  $\sigma(\bar{x})$  um diesen.

$$\sigma(\bar{x}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ mit } \sigma(x) = \sqrt{\text{Var}(x)}$$

Der Vergleich von Einzelwerten zweier Konditionen gegeneinander mittels studentischem t-Test, ermittelt ob die Konditionen sich signifikant voneinander unterscheiden.

$$t = \frac{\text{Mittelwert von Stichprobe 1} - \text{Mittelwert von Stichprobe 2}}{\text{Standardfehler der Differenzen beider Mittelwerte}}$$

Die Signifikanzniveaus sind dabei wie folgt gekennzeichnet: ns (nicht signifikant)  $p > 0,05$ ;

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



# 5 Ergebnisse

## 5.1 DC-Aspergillus Interaktions-Studien

Die Interaktions-Studien zur Reaktion der verschiedenen DCs auf *A. fumigatus*, umfassten die Analyse der DCs hinsichtlich ihrer Maturierung im Transwellsystem, der Nachweis von drei bekannten Aspergillus-Rezeptoren, sowie die Quantifizierung ihrer Zytokinexpression.

### 5.1.1 moDCs und mDCs maturieren in Aspergillus-Kontakt, pDCs jedoch nicht

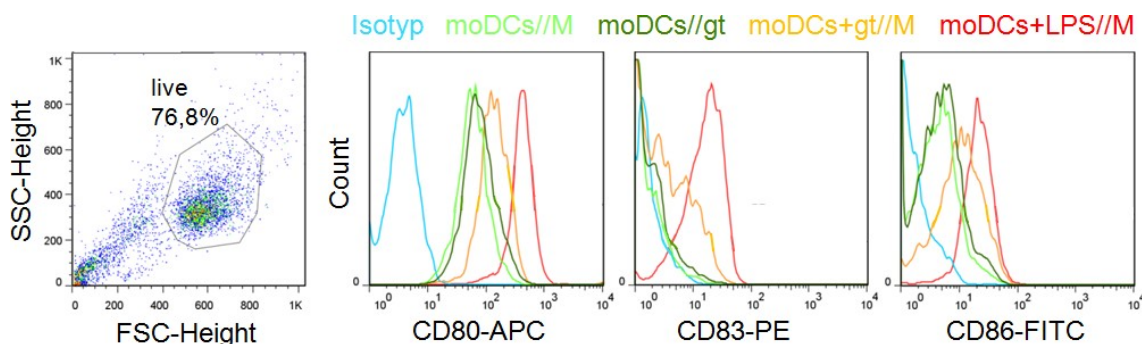
Dendritische Zellen reifen bei Pathogen-Erkennung, indem sie verschiedene Oberflächenmarker in ihrer Expressionsintensität verstärken. Mit diesen Oberflächenmarkern üben DCs ihre Immunfunktionen aus. Unter anderem präsentieren sie Antigene zu T-Zellen, über MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle, die durch Antikörper gegen HLA-ABC und HLA-DR detektiert werden können. CD80, CD83, CD86 und CD40 vermitteln die für eine Aktivierung naiver T-Zellen nötige Kostimulation. CCR7 ist ein Rezeptor, welcher CCL19 und CCL21 erkennt. Diese Zytokine werden von Lymphknoten sekretiert und die DCs migrieren anhand dieser Zytokingradienten hin zu den Lymphknoten, den Orten zur professionellen Antigenpräsentation [Abbas et al. (2014)].

Für die Maturierungsanalyse wurden DCs mit Keimschläuchen von *A. fumigatus* in einem Transwellsystem konfrontiert. Durch diese Methode konnten simultan Informationen gewonnen werden, ob die DCs bei Kontakt zu Keimschläuchen reifen und ob die Maturierung direkte Zell-Zell-Kontakte benötigt. Antigene, die DCs reifen lassen, können sowohl auf der Zelloberfläche von Pathogenen vorkommen, als auch von diesen ins Milieu freigesetzt werden. Durch eine Transwellmembran (abgekürzt mit //) mit 0,4 µm Porengröße entsteht in der Zellkulturplatte ein unteres und ein oberes Kompartiment, wie in Abbildung 4.9 gezeigt ist. Die DCs wurden in das untere Kompartiment gegeben und dann

für 18 h unstimuliert belassen (DCs//M; M = Medium), mit einer Positiv-Kontrolle stimuliert (moDCs/mDCs+LPS//M oder pDCs+R848//M), von Keimschläuchen getrennt stimuliert (DCs//gt) und mit Keimschläuchen in direktem Kontakt im unteren Kompartiment konfrontiert (DCs+gt//M). LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Zellmembranbestandteil von gram-negativen Bakterien und signalisiert über TLR2 und TLR4 [Takeuchi et al. (1999)], welche von humanen Monozyten und pre-DCs exprimiert werden [Kadowaki et al. (2001)]. Da murine pDCs diese toll-like Rezeptoren nicht exprimieren, wurde sie mit dem TLR7/TLR9 Stimulus R848 (Imiquimod) gereift [Jurk et al. (2002)]. Die DCs wurden mit Keimschläuchen und nicht mit Konidien konfrontiert, weil Konidien von einer immunologisch inerten Rodlet-Schicht umgeben sind [Aimanianda et al. (2009)]. Nach der 18-stündigen Inkubation wurden die Maturierungsmarker der DCs durchflusszytometrisch analysiert.

### moDCs maturieren in direktem Kontakt zu *Aspergillus*

Nach der 18-stündigen Stimulation im Transwellssystem wiesen noch über dreiviertel der moDCs im FCS-SSC-Diagramm Eigenschaften vitaler Zellen auf. Diese vitalen Zellen wurden gegatet und hinsichtlich der Expression ihrer Maturierungsmarker untersucht. Die Messung eines beispielhaften Spenders ist in Abbildung 5.1 zu sehen.

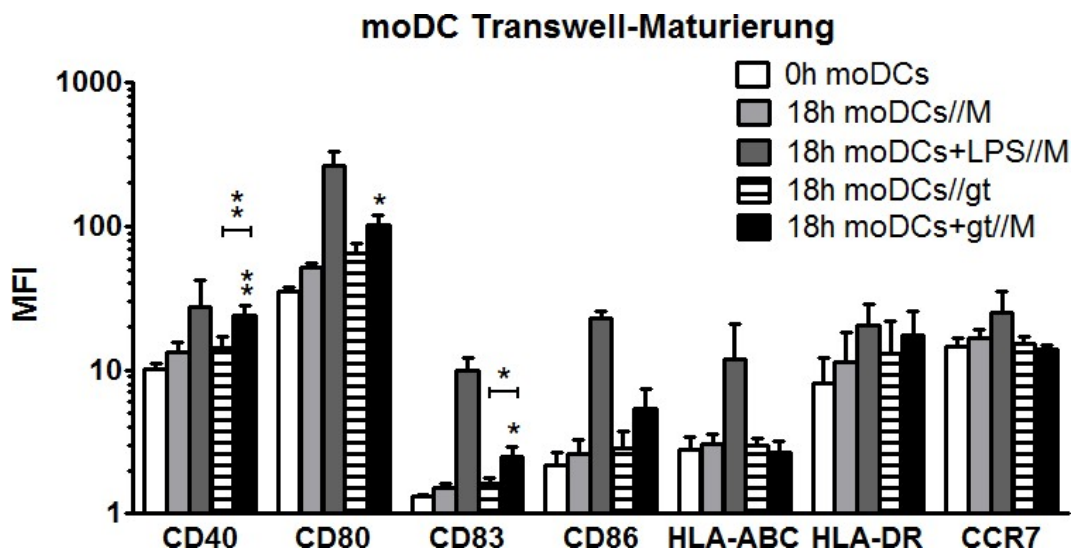


**Abbildung 5.1: Exemplarischer Spender der moDC Transwell-Maturierung.** Nach 18 h Inkubation lebten (live) noch über dreiviertel der moDCs. Durch die Positiv-Kontrolle LPS (moDCs+LPS//M) wurden CD80, CD83 und CD86 induziert. Keimschläuche (gt) in direktem Kontakt (moDCs+gt//M) reiften die moDCs, getrennt von der Transwellmembran (moDCs//gt) jedoch nicht.

Die Analyse wurde mit 3 verschiedenen Spendern durchgeführt, um eine signifikante Aussage über das Maturierungs-Verhalten der moDCs treffen zu können. Unstimulierte moDCs



zeigten eine relativ niedrige Expression aller Maturierungsmarker. Die 18-stündige Inkubation hatte auf die Expressionsintensität der Marker keinen Einfluss. Wurden die moDCs mit LPS als Positiv-Kontrolle stimuliert, reiften sie deutlich. Von moDCs durch die Transwellmembran getrennte Keimschläuche, induzierten keine Reifung. In direktem Kontakt verstärkten Keimschläuche signifikant die Expression von CD40, CD80 und CD83; CD86 war tendenziell leicht induziert. Die Maturierung von moDCs konnte durch Keimschläuche nur in direktem Kontakt und nicht über lösliche Moleküle vermittelt werden. Von den Maturierungsmarkern wurden ausschließlich die kostimulatorischen Moleküle induziert. Die Expression der MHC Klasse I und II Moleküle, sowie die von CCR7 blieb der Expression unstimulierter moDCs (Abbildung 5.2).

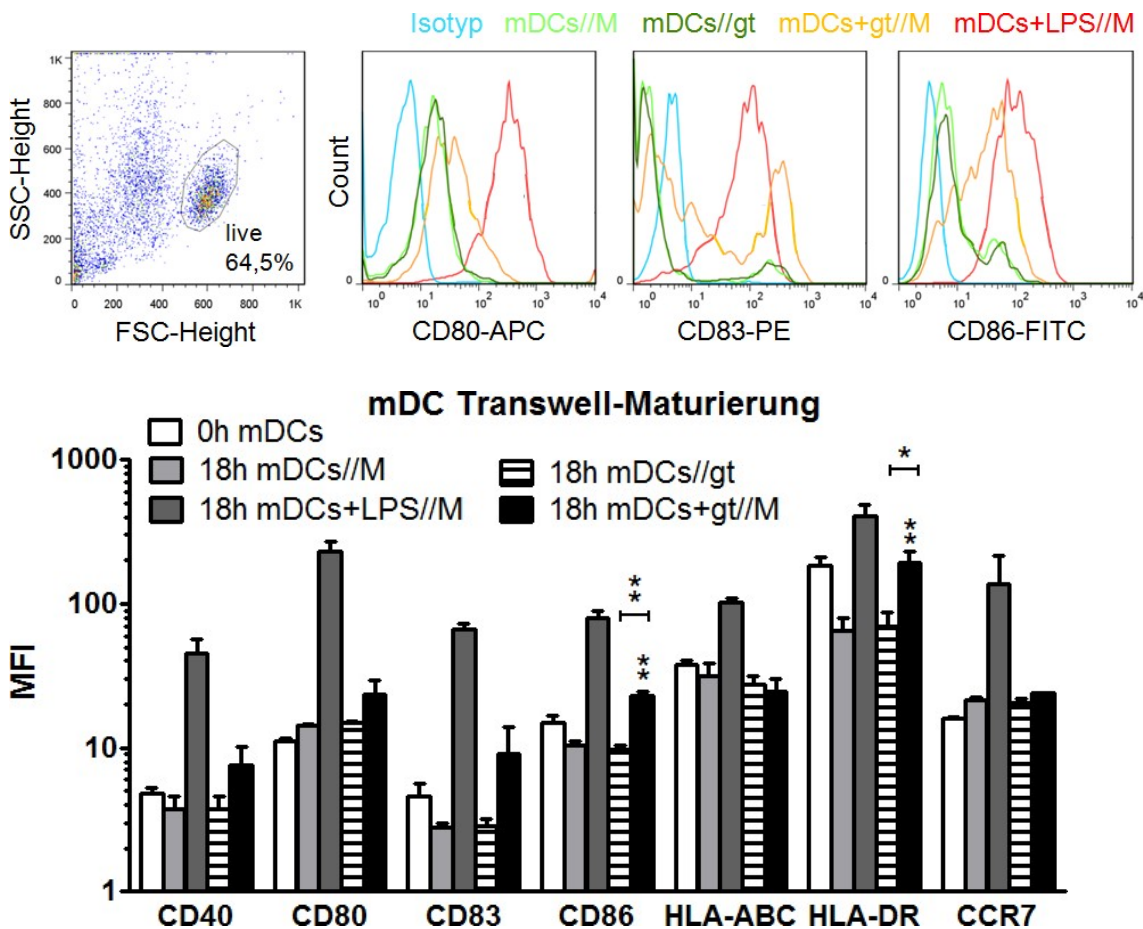


**Abbildung 5.2: moDCs maturieren in direktem Kontakt zu Aspergillus Keimschläuchen.** Die Konfrontation von moDCs und Keimschläuchen (gt) erfolgte für 18 h in einem Transwellssystem (// = Transwellmembran) und die darauffolgende Analyse der Maturierungsmarker mittels Durchflusszytometer. Keimschläuche konnten moDCs in direktem Kontakt (moDCs+gt//M) reifen, verglichen mit unstimulierten moDCs (moDCs//M) und von Keimschläuchen getrennt gehaltenen moDCs (moDCs//gt). Ausschließlich die kostimulatorische Moleküle wurden durch den direkten Aspergillus-Kontakt auf moDCs verstärkt.

#### mDCs maturieren durch Aspergillus-Stimulation mit direktem Kontakt

Das Expressionsprofil von mDCs, die mit Keimschläuchen konfrontiert wurden, ähnelte dem von moDCs. Die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD83 waren tendenziell und CD86 signifikant induziert, wenn mDCs direkten Kontakt zu Aspergillus hatten.

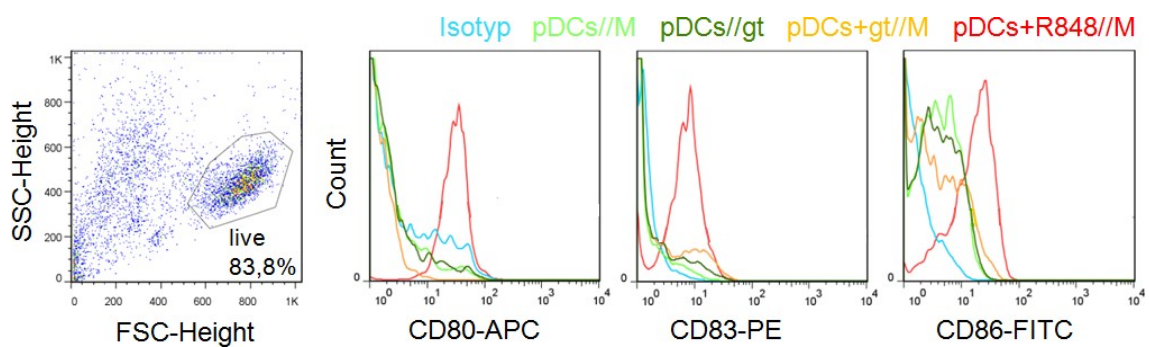
Als Unterschied zu moDCs, induzierten mDCs die Expression von HLA-DR, dem MHC Klasse II Molekül für die Antigenpräsentation zu CD4 T-Zellen. Die Expression von HLA-DR auf mDCs vor der 18-stündigen Inkubation war höher, als auf 18 h unstimulierten mDCs. HLA-ABC (MHC Klasse I) und CCR7 wurden durch die Pilzstimulation nicht reguliert. War der direkte Kontakt durch die Transwellmembran verhindert, maturierten mDCs nicht. Im Vergleich zu moDCs, exprimierten mDCs mehr MHC Klasse I und II Moleküle und sie maturierten durch die Positiv-Kontrolle LPS stärker (Abbildung 5.3).



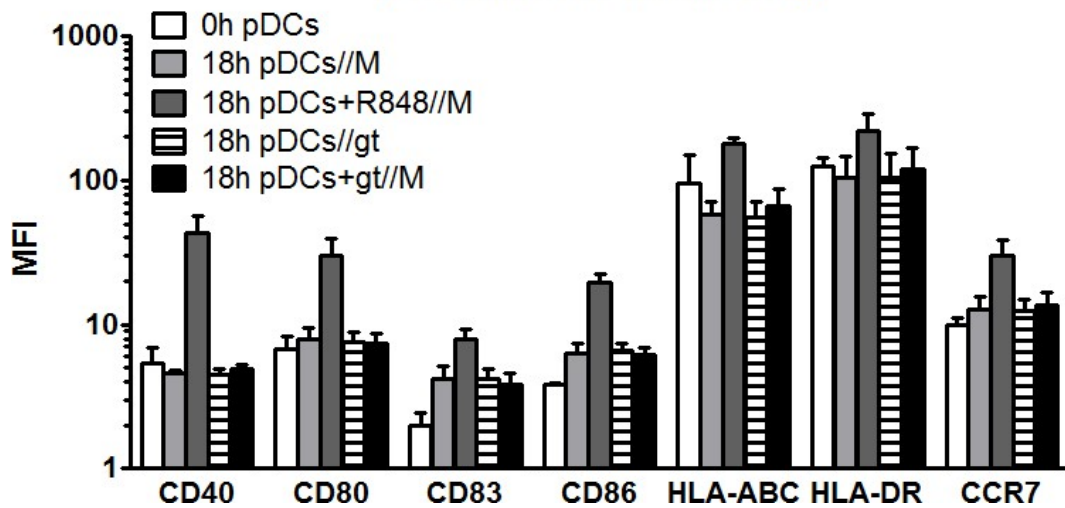
**Abbildung 5.3: mDCs maturieren durch Aspergillus-Stimulation mit direktem Kontakt.** Die Konfrontation von mDCs und Keimschläuchen (gt) erfolgte für 18 h in einem Transwellssystem (// = Transwellmembran) und die Analyse der Maturierungsmarker mittels Durchflusszytometer. Das Punkte-Diagramm zeigt die noch zu 64,5% vitalen (live) mDCs und die Histogramme das Expressionsprofil von drei Maturierungsmarkern eines exemplarischen Spenders. Im Säulen-Diagramm sind die Werte von 3 Spendern zusammen gefasst. Signifikant verstärkten mDCs bei direktem Kontakt zu Keimschläuchen (mDCs+gt//M) CD86 und HLA-DR, tendenziell waren CD40, CD80 und CD83 erhöht. HLA-ABC und CCR7 wurden im Vergleich zu unstimulierten mDCs (mDCs//M) und von Keimschläuchen getrennt gehaltenen mDCs (mDCs//gt) nicht induziert.

**pDCs reifen durch Aspergillus-Konfrontation nicht**

Im Vergleich zu moDCs und mDCs maturierten pDCs weder ohne, noch mit direktem Kontakt zu Aspergillus Keimschläuchen. Keiner der Maturierungsmarker von stimulierten pDCs unterschied sich zu denen von unstimulierten pDCs. Das TLR7/9 Stimulus R848 induzierte als Positiv-Kontrolle alle analysierten Marker, wodurch die generell mögliche Reifung von pDCs sicher gestellt wurde. Die Grundexpression der MHC-Moleküle (HLA-ABC, HLA-DR) auf unstimulierten pDCs war genau wie bei mDCs deutlich höher als die von moDCs (Abbildung 5.4).



**pDC Transwell-Maturierung**

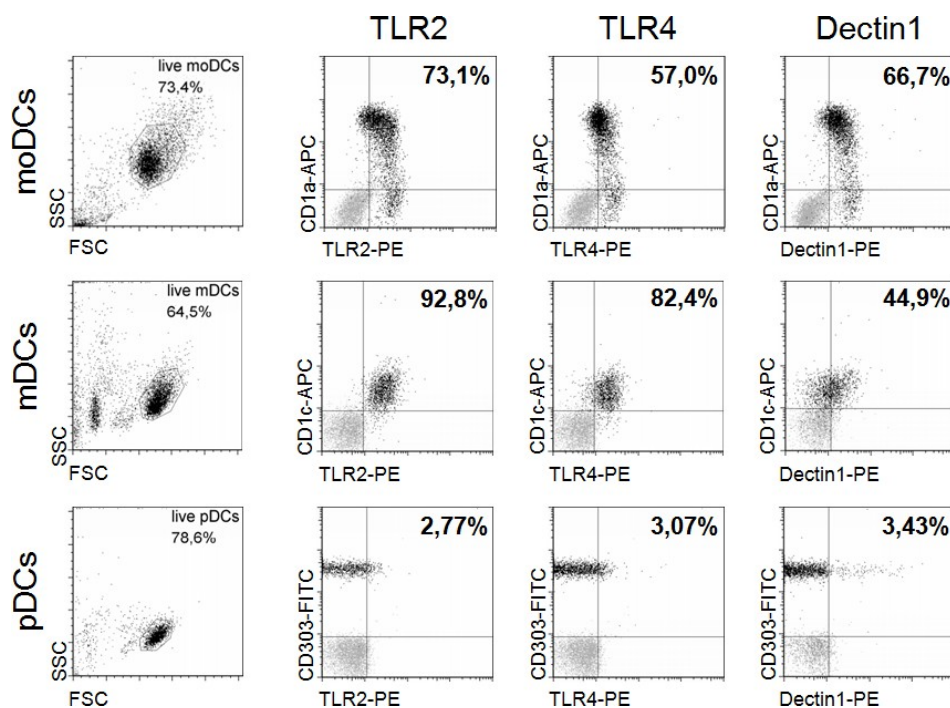


**Abbildung 5.4: Mit Aspergillus konfrontierte pDCs maturieren nicht.** Die Konfrontation von pDCs und Keimschläuchen (gt) erfolgte für 18 h in einem Transwellssystem (// = Transwellmembran) und die Analyse der Maturierungsmarker mittels Durchflusszytometer. Die Histogramme zeigen die Expression der Maturierungsmarker eines exemplarischen Spenders, dessen pDCs zu 83,8% vital (live) waren. Im Säulen-Diagramm sind die Werte von insgesamt 3 Spendern zu sehen. Die Maturierungsmarker von mit Aspergillus konfrontierten pDCs (pDCs+gt//M) glich deren von unstimulierten pDCs (pDCs//M). Mit der Positiv-Kontrolle R848 (pDCs+R848//M) induzierten pDCs alle Reifemarker.

Die kontakt-abhängige Induktion der Maturierungsmarker von moDCs und mDCs durch *A. fumigatus* zeigt, dass die Reifung durch Zelloberflächenmoleküle vermittelt wird. Lösliche Faktoren, die vom Pilz ständig ins umgebende Milieu abgegeben werden, konnten die Reifung nicht induzieren. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die derzeit bekannten Aspergillus-Rezeptoren auf den drei DC Subtypen analysiert.

### 5.1.2 moDCs und mDCs tragen Aspergillus Rezeptoren

Als Aspergillus-Rezeptoren wies [Braedel et al. (2004)] TLR2 und TLR4 auf murinen BMDCs (engl. bone marrow derived DCs) nach. Dectin-1 wurde 2008 von [Mezger et al. (2008)] durch siRNA (engl. silencing ribonucleic acid) behandelte moDCs belegt. Diese drei bekannten Aspergillus-Rezeptoren wurden auf den DC Subtypen direkt nach ihrer Isolation (mDCs und pDCs), beziehungsweise nach einer 5-tägigen Differenzierung (moDCs) durchflusszytometrisch analysiert (exemplarischer Spender Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5: Die Aspergillus-Rezeptoren TLR2, TLR4 und Dectin-1 wurden von moDCs und mDCs exprimiert.** Die verschiedenen DC Subtypen wurden direkt nach Zell-Isolation (mDCs und pDCs) oder Generierung (moDCs) hinsichtlich ihrer Expression der bekannten Aspergillus-Rezeptoren analysiert. Mit den Rezeptoren erfolgte simultan die Analyse der jeweiligen Zellmarker: moDCs CD1a, mDCs CD1c, pDCs CD303. Die graue Population ist die Isotyp-Kontrolle, die schwarze die spezifische Färbung.

Die zu 73% vitalen moDCs exprimierten TLR2, TLR4 und Dectin-1. Der prozentuale Anteil an CD1a und TLR2/TLR4/Dectin-1 positiver Zellen beträgt nicht 100%, jedoch verlagerte sich die komplette Zellpopulation hin zum Rezeptor-positiven Bereich im oberen rechten Quadranten. Demnach werden alle Zellen als Rezeptor-exprimierend betrachtet. Wie bereits im Methoden-Abschnitt gezeigt wurde, sind auch hier nicht alle moDCs positiv für CD1a. mDCs waren zu 65% vital und exprimierten auch alle drei Aspergillus-Rezeptoren. Die Intensität von TLR2 und TLR4 auf mDCs ähnelte der von moDCs, Dectin-1 war etwas weniger intensiv. Dies lässt den Schluss zu, dass mDCs weniger Dectin-1 Rezeptormoleküle auf ihrer Zelloberfläche tragen, als moDCs. Im Vergleich zu moDCs und mDCs exprimierten pDCs die drei Aspergillus-Rezeptoren nicht. Lediglich Dectin-1 wurde von 3% der CD303-positiven pDCs exprimiert.

### 5.1.3 Aspergillus induzierte moDC- und mDC-Zytokine

Die bei der Transwell-Maturierung und Rezeptor-Expression gewonnenen Ergebnisse, werden durch die Analyse der Zytokinsekretion im Multiplex ELISA-System untermauert. Die DC Subtypen wurden für 6 h unstimuliert belassen, mit Konidien oder Keimschläuchen konfrontiert. Dann wurden die Kulturüberstände hinsichtlich des Zytokingehalts analysiert.

Im ersten Überblick wurde deutlich, dass moDCs und mDCs durch Konidien- und Keimschlauch-Stimulation viele Zytokine sekretierten. Konidien induzierten die Zytokine weniger stark, als Keimschläuche. Jedoch konnten im Zytokinprofil von Aspergillus-stimulierten moDC und mDCs auch Unterschiede festgestellt werden. moDCs induzierten die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL8<sup>1</sup> in größerem Maße als mDCs. In diesem Zusammenhang war auffällig, dass unstimulierte mDCs schon eine enorme Menge an IL8 sekretierten. IL8 war im Vergleich zu den anderen Zytokinen, das am höchsten konzentrierte Zytokin. Gleichermäßen stark induzierten moDCs und mDCs durch die Aspergillus-Stimulation folgende Zytokine:

- die pro-inflammatorischen Zytokine IL6, IL17, IL18, IFN $\gamma$ , CXCL1 und TNF $\alpha$
- das Th1 induzierende IL12p70
- das chemotaktische Zytokin CCL3

---

<sup>1</sup>Interleukin

Tendenziell wurden außerdem auch IL1b, G-CSF<sup>2</sup>, M-CSF<sup>3</sup>, GM-CSF, CXCL1<sup>4</sup>, CXCL10, CCL4<sup>5</sup>, CCL5 und VEGFA<sup>6</sup>, sowohl die anti-inflammatorischen Zytokine IL4 und IL10 durch moDCs und mDCs bei Aspergillus-Kontakt induziert (Anhang A.1).

Im Vergleich zu moDCs und mDCs sekretierten pDCs nahezu keine Zytokine. Tendenziell induzierten Aspergillus konfrontierte pDCs pro-inflammatorisches IL8, GM-CSF, und CCL4. Jedoch war deren Konzentration geringer, als bei moDCs und mDCs. Das für pDCs typische Zytokin IFN $\alpha$  wurde durch Aspergillus nicht induziert (Tabelle 5.1, Anhang A.1).

**Tabelle 5.1: Die Aspergillus-Konfrontation veranlasste moDCs und mDCs zur Zytokinsekretion, pDCs induzierten nahezu keine Zytokine.** Konidien (con) induzierten bei moDCs und mDCs weniger Zytokine als Keimschläuche (gt). moDCs induzierten IL8 sehr stark, wobei die Endkonzentration der von mDCs ähnelte.

Zytokine [pg/ml]	moDCs			mDCs			pDCs		
	unst	con	gt	unst	con	gt	unst	con	gt
IL6	9,32	62,03*	281,81	30,59	91,24	494,9**	< 1,21	1,22	2,43
IL8	293,33	2532*	> 19323*	1738	> 23164**	> 26254***	6,06	19,82	74,38
IL12p70	2,89	6,28	15,77*	3,95	8,25	8,25**	< 0,56	< 0,56	0,77
IL17	9,12	19,69	34,43**	6,61	17,85***	23,35**	< 5,99	< 5,99	< 5,99
IL18	0,85	2,05	12,94	2,12	12,29	103,84*	1,32	1,66	1,51
IFN $\gamma$	< 22,37	54,11*	106,53*	< 21,50	48,20**	88,10***	< 21,50	< 21,50	< 21,50
CCL3 (MIP1 $\alpha$ )	153,96	797,54*	> 1262**	8,32	384,02	> 1337***	< 1,28	< 1,36	2,46
TNF	26,68	528,85*	13268	7,23	204,52***	3137**	< 2,14	2,61	9,32
CXCL1 (GRO $\alpha$ )	7,5	40,64	397,24	9,36	158,08	359,84**	< 7,50	< 7,50	< 7,50

> 2-fach erhöht    > 4-fach erhöht    > 10-fach erhöht

Die beschriebenen Ergebnisse wurden 2014 als Artikel im „International Journal of Medical Microbiology“ mit dem Titel „Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*“ publiziert [Lothar et al. (2014)].

Mit pDCs wurden keine Immunmodulations-Experimente durchgeführt, da ihr Immunantwort auf *A. fumigatus* als zu gering angesehen wurde.

<sup>2</sup>granulocyte colony-stimulating factor

<sup>3</sup>macrophage colony-stimulating factor

<sup>4</sup>chemokine (C-X-C motif) ligand

<sup>5</sup>chemokine (C-C motif) ligand

<sup>6</sup>vascular endothelial growth factor



## 5.2 Etablierung der Protein-Aufreinigung

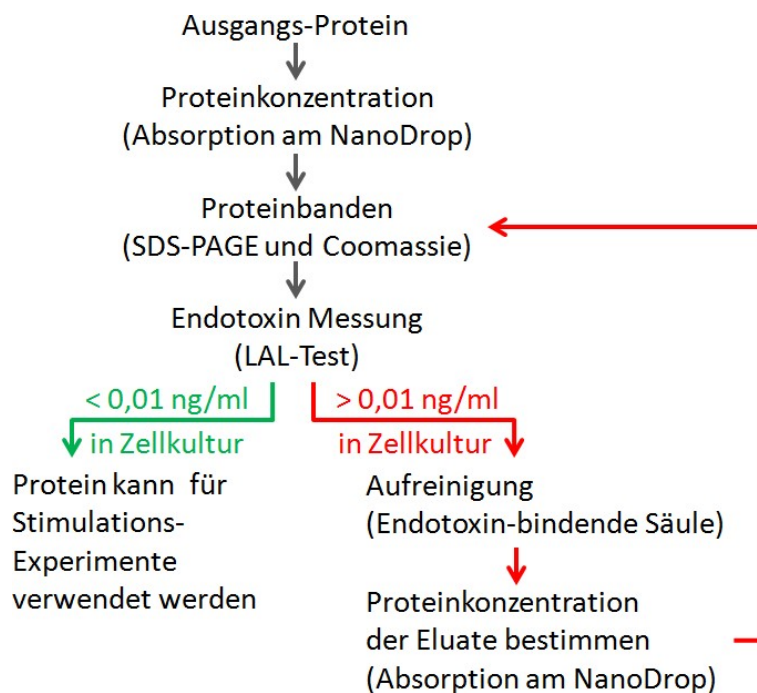
Die Protein-Qualität für DC-Stimulations-Experimente war für die vorliegende Arbeit von entscheidender Bedeutung. Die Proteine SHMT, CcpA und CpcB wurden von Kooperationspartnern des Hans-Knöll-Instituts in Jena rekombinant von *E. coli* Bakterien produziert. Diese gram-negativen Bakterien besitzen als äußerste Zellschicht ihrer Zellmembran Verbindungen aus fettähnlichen (Lipo-) und Zucker-Bestandteilen (Polysacchariden), sogenannte Lipopolysaccharid (LPS). Von der LPS-Schicht abgelöste Teile werden als Endotoxine bezeichnet. Endotoxine gehören zu den Pyrogenen, die für ihre Fieber erzeugende Eigenschaft bekannt sind. Auf zellulärer Ebene aktivieren Endotoxine Immunzellen zur Inflammation oder Apoptose (programmierter Zelltod). Schon niedrigste Konzentrationen sind biologisch wirksam.

Die FDA (engl. Food and Drug Administration) legte 2012 in ihren „Guidance for Industry“ ein Endotoxin-Limit von 0,05 ng/ml und 200 ng/Applikation fest. Für die vorliegende Arbeit wurde durch umfassende Literaturrecherche und eigene Stimulations-Experimente (Anhang A.2) eine Endotoxin-Obergrenze von 0,01 ng/ml festgelegt [Batchu et al. (2005); Fuller et al. (2013); Yuan et al. (2014); Brimnes et al. (2003); Hartmann et al. (1999); Snijders et al. (1998); Kim and Joo (2008)].

Das in einer Proteinlösung enthaltene Endotoxin wurde mithilfe eines chromatographischen LAL-Tests gemessen. Lag die Endotoxin-Konzentration oberhalb von 0,01 ng/ml, galt das Protein als kontaminiert und wurde über eine Endotoxin-bindende Säule chromatographisch aufgereinigt, bis die Kontamination unterhalb des Grenzwertes war. Die Effektivität der Aufreinigung hängt dabei auch von Eigenschaften des Proteins ab. Manche Proteine neigen aufgrund ihrer elektrischen Ladung dazu, Endotoxine anzuziehen. Solche Proteine müssen oft mehrfach aufgereinigt werden. Allerdings verringert sich mit jeder Aufreinigung die Proteinkonzentration, vor allem bei Endotoxin affinen Proteinen. An Endotoxin gebundene Proteine verbleiben in der Aufreinigungs-Säule und können nicht eluiert werden. Hier muss ein Kompromiss zwischen hohem Reinheitsgrad und einer zu niedrigen Proteinkonzentration gefunden werden. Geringe Verunreinigungen von unter 1 ng/ml LPS bewirken noch keine oder nur sehr geringe Stimulationseffekte und können durch mitgeführte Kontrollen überprüft werden (Anhang A.2).

Für die qualitative und quantitative Analyse von Proteinen mit eventueller Aufreinigung

erwies sich das Vorgehen nach folgendem Schema als sinnvoll (Abbildung 5.6):



**Abbildung 5.6:** Schematischer Arbeitsvorgang zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen, sowie einer eventuellen Aufreinigung.

Die Proteinkonzentration, Bandenbildung und Endotoxin-Konzentration des Ausgangs-proteins wird bestimmt und bei mehr als 0,01 ng Endotoxin pro 1 ml in der Zellkultur wird das Protein aufgereinigt. Sobald die Endotoxin-Verunreinigung unterhalb dieser Endotoxin-Obergrenze liegt, kann das Protein für Stimulations-Experimente verwendet werden.

### 5.2.1 Analysen der Proteinkonzentration

Das Volumen, das von einer Proteinlösung zum Stimulationsansatz zugegeben werden muss, hängt von der Proteinkonzentration ab. Die Konzentration von reinen Einzelproteinen darf mittels Absorptionsmessung am NanoDrop bestimmt werden. Für Proteingemische aus Zelllysaten ist diese Methode wegen interferierenden Absorptionseigenschaften von nicht-Protein-Molekülen, nicht empfehlenswert. Zur Verifizierung wurden die Proteinkonzentrationen zudem mit dem DC Protein Assay von BioRad analysiert. Die Werte

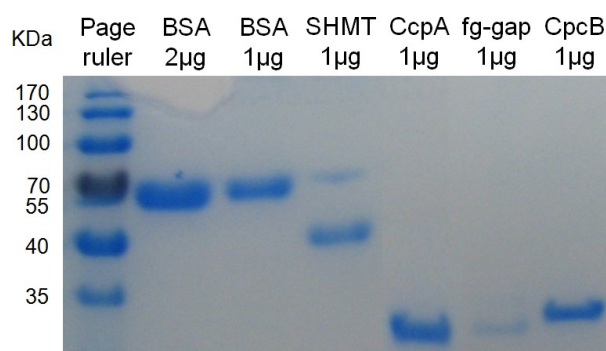


der NanoDrop Messung und des DC Protein Assays unterschieden sich zum Teil voneinander, obwohl beide Analysemethoden dieselben Aminosäuren (Tyrosin und Tryptophan) detektieren (Tabelle 5.2).

**Tabelle 5.2: Quantifizierung der verwendeten Proteine mit verschiedenen Methoden.** Die ermittelten Proteinkonzentrationen unterschieden sich zum Teil, abhängig von der verwendeten Analysemethode. Ein gleichmäßiges Unterscheidungsmuster konnte nicht festgestellt werden.

Protein	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	Nano-Drop	BioRad	Coomassie
SHMT	4,29 ± 0,24	8,44	3,5
CcpA	0,51 ± 0,03	n.g.	0,5
CpcB	0,22 ± 0,02	0,24	0,25
fg-gap	0,59 ± 0,03	0,86	0,05

Wegen der unterschiedlich ermittelten Proteinkonzentrationen zwischen NanoDrop und BioRad, wurde eine dritte Quantifizierungs-Methode hinzugezogen. Die Coomassie-Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diente eigentlich zur qualitativen Beurteilung, konnte aber durch das Mitführen einer BSA-Konzentrationsreihe auch zur relativen Quantifizierung genutzt werden (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7: Coomassie Gel der verwendeten Proteine.** Von den Proteinen wurde nach BioRad 1 µg aufgetragen. Die BSA-Banden dienen als Konzentrationsstandard. CcpA und CpcB enthielten die mit BioRad detektierte Proteinkonzentration, SHMT enthielt die Hälfte und fg-gap weitaus weniger. Die Coomassie-Banden dienen zur quantitativen Abschätzung und qualitativen Beurteilung.

Von den Proteinen wurde 1 µg auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Probenvolumen für 1 µg Protein wurde ausgehend von den BioRad Konzentrationsmessungen berechnet. Die Intensität der Banden von CcpA und CpcB gleichen der 1 µg BSA-Bande. SHMT und

fg-gap hingegen wiesen deutlich weniger als 1 µg Protein auf. Die berechnete Intensität der SHMT-Bande ergab eine Proteinkonzentration von 3,5 mg/ml. Dieser Wert war der NanoDrop Messung ähnlicher, als der von BioRad. SHMT erscheint als zwei Banden im Coomassie-Gel, dies ist laut Hersteller auf die beiden unterschiedlichen Untereinheiten des Protein zurückzuführen.

Für fg-gap wurde durch NanoDrop und BioRad eine relativ gleiche Konzentration ermittelt, jedoch war die Bande im SDS-Gel so schwach, dass sich eine vergleichsweise zehnmal geringere Konzentration ergab. Dieser Konzentrationsunterschied kann durch eine Teil-Degradierung des fg-gap Proteins entstehen. Degradierete Proteine bestehen aus vielen, unterschiedlich großen Proteinstücken, die sich während der SDS-PAGE über die ganze Laufspur verteilen und durch eine Coomassie-Färbung als blaue Schmier-Bande erkennbar werden. Bei fg-gap war oberhalb der schwachen Proteinbande bei 30 KDa eine dünne Bande zu sehen, was auf Degradation hindeutet. Wenn die lokale Proteinkonzentrationen eines degradierten Proteins jedoch zu gering sind, erscheint keine Blaufärbung im SDS-Gel. NanoDrop und BioRad detektieren einzelne Aminosäuren und können somit nicht die Integrität eines Proteins prüfen.

Eine deutliche Bande im SDS-Gel wurde als Qualitätsmerkmal für unversehrte Proteine festgelegt, denn nur solche Proteine können biologisch aktiv sein. Die biologische Aktivität von Proteinantigenen und deren unversehrte Antigenepitope sind für die Entwicklung eines Impfstoffes essentiell.

### **5.2.2 Die Proteine waren unterschiedlich stark mit Endotoxin kontaminiert**

Nachdem die Proteinkonzentration und -integrität der vier Proteinkandidaten ermittelt wurde, konnte mithilfe des LAL-Tests die Endotoxin-Kontamination bestimmt werden. Die Proteine CpcB und fg-gap enthielten nur eine sehr geringe Menge an Endotoxin; 0,0812 ng/ml, beziehungsweise 1,2862 ng/ml. Würden Zellen mit 1 µg/ml des Proteins stimuliert werden, würde die Kultur nur 0,000142 ng/ml, beziehungsweise 0,002173 ng/ml Endotoxin enthalten und damit weniger als die Endotoxin-Obergrenze von 0,01 ng/ml. SHMT und CcpA hingegen enthielten so viel Endotoxin, dass der Wert oberhalb der Detektionsgrenze des LAL-Tests lag. Die genaue Endotoxin-Konzentration von SHMT wurde

anschließend durch Verdünnungen des Proteins als 750 mg/ml ermittelt. Dies entspräche bei Stimulation mit 1 µg/ml SHMT 345,78 ng/ml Endotoxin, womit die Obergrenze deutlich überschritten wäre. Die genaue Endotoxin-Kontamination von CcpA wurde nicht ermittelt, da der Wert oberhalb der Detektionsgrenze lag und die Endotoxin-Obergrenze auf jeden Fall überschritten hätte.

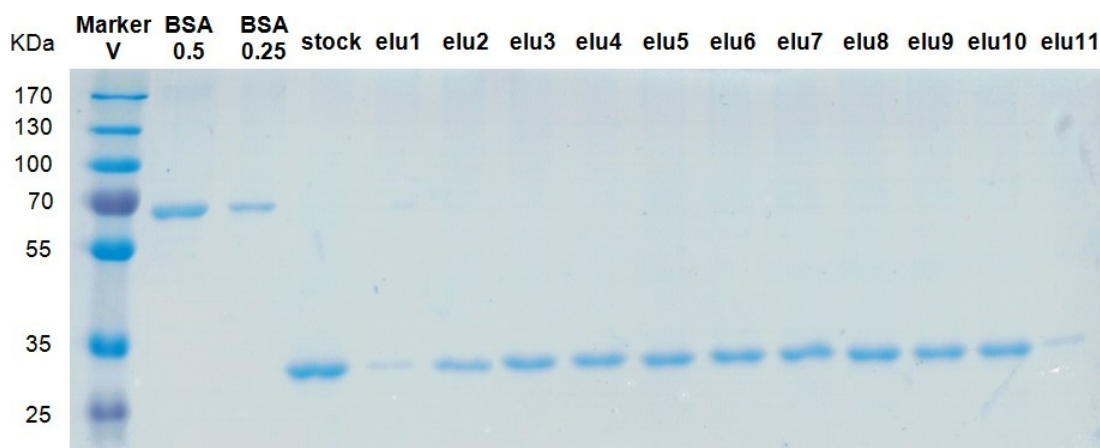
### 5.2.3 CcpA wurde erfolgreich aufgereinigt

Das Überschreiten der Endotoxin-Obergrenze des CcpA Proteins, machte eine Aufreinigung erforderlich. Bereits die erste Aufreinigung von CcpA über eine Endotoxin-bindende Säule führte zum gewünschten Ergebnis. Von den 12 aufgereinigten Eluaten enthielten die Eluate 2 bis 10 CcpA Protein und die Endotoxin-Konzentration dieser vereinigten Eluate 2-10 lag bei 0,875 pg Endotoxin pro 1 µg Protein. Selbst bei einer Stimulation von Zellen mit 5 µg Protein pro 1 ml Zellkultur, würde die Endotoxin-Kontamination mit 0,004374 ng unter der Endotoxin-Obergrenze von 0,01 ng/ml liegen (Abbildung 5.3).

**Tabelle 5.3: Quantitative und qualitative Analyse des aufgereinigten CcpA Proteins.** Von der Eluaten (elu) 1 bis 12 enthielten die Eluate 2 bis 10 CcpA Protein. Die Endotoxin-Kontamination der vereinigten Eluate 2-10 lag mit 0,000875 ng Endotoxin (ET) pro µg Protein bei einer Stimulation von 1 µg Protein pro 1 ml Zellkultur, unter der Endotoxin-Obergrenze von 0,01 ng/ml. >OOR = über Detektionslimit

<b>CcpA 1. Aufreinigung</b>	mg/ml Nano-Drop	µl	µg	ng ET LAL-Test	ng ET in 1 µg Prot	ng ET in 5 µg Prot
<b>CcpA stock</b>	<b>0,51</b>	<b>1000</b>	<b>510,0</b>	<b>&gt;OOR</b>		
elu1	0,04	80	3,2			
elu2	0,14	90	12,6			
elu3	0,24	90	21,6			
elu4	0,27	80	21,6			
elu5	0,33	90	29,7			
elu6	0,40	130	52,0			
elu7	0,39	130	50,7			
elu8	0,40	160	64,0			
elu9	0,39	160	62,4			
elu10	0,22	130	28,6			
elu11	0,08					
elu12	0,06					
<b>eluat 2-10</b>	<b>0,31</b>	<b>1060</b>	<b>343</b>	<b>0,2864</b>	<b>0,000875</b>	<b>0,004374</b>

Eine Coomassie-Färbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Eluate bestätigte, dass die Eluate 2 bis 10 CcpA Protein enthielten. Die Proteinbanden waren deutlich abgegrenzt, sodass von einer guten Integrität ausgegangen werden konnte (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8: Qualitative Analyse der aufgereinigten CcpA Eluate.** Die CcpA Proteinlösung wurde einmal über eine Endotoxin-bindende Säule aufgereinigt, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das unaufgereinigte Protein (stock) ist als Einzelbande bei 30 KDa zu sehen. Die Eluate (elu) 2 bis 10 enthielten nach der Aufreinigung CcpA Protein.

#### 5.2.4 SHMT musste zwei Mal aufgereinigt werden

SHMT überschritt den akzeptablen Endotoxingehalt von 0,01 ng/ml Zellkultur mit 175 ng/ml bei Einsatz von 1 µg Protein pro 1 ml Zellkultur (75 µg in 100 µl bei einem Proteingehalt von 4,29 mg/ml) deutlich und musste deshalb über eine Endotoxin-bindende Säule chromatografisch aufgereinigt werden. Als Ergebnis entstanden 10 Eluate, von welchen die Eluate 2 bis 8 proteinhaltig waren. Die vereinigten Eluate 2-8 enthielten immer noch mehr Endotoxin als gewünscht, sodass das Protein ein zweites Mal über die regenerierte Säule aufgereinigt wurde. Die zweite Aufreinigung erbrachte in den vereinigten Eluaten 1-9 nahezu das forcierte Ergebnis, mit nunmehr 0,0102 ng Endotoxin je µg Protein.

Da die Protein-Konzentration durch die beiden Aufreinigungen deutlich abnahm und die Endotoxin-Reduktion bei der zweiten Aufreinigung weitaus geringer war als beim ersten Mal, wurde keine dritte Aufreinigung durchgeführt. Eine weitere Aufreinigung würde die Proteinkonzentration so stark verdünnen, dass unverhältnismäßig viel Protein zur

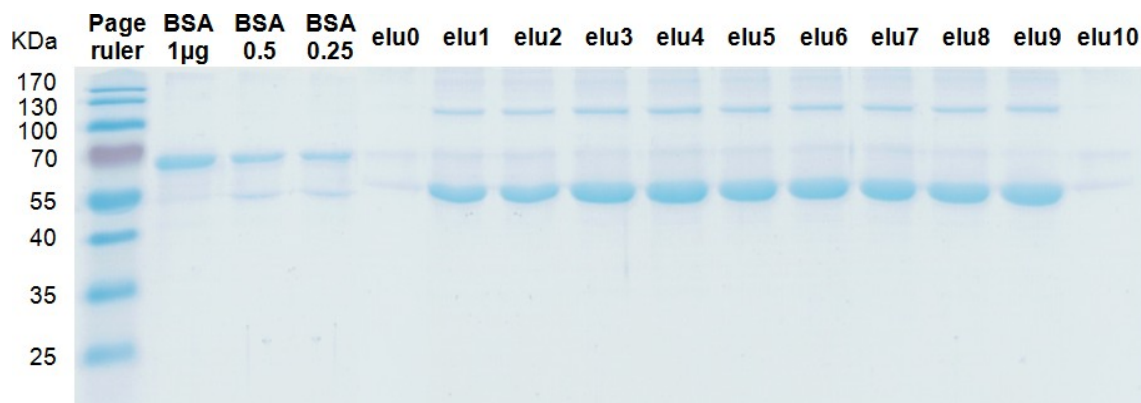
Zellkultur hinzugegeben werden müsste, was das Medium stark verdünnen würde. Stattdessen wurde bei den Stimulations-Experimenten eine Kontrolle mit der jeweiligen LPS-Konzentration mitgeführt. Tabelle 5.4 veranschaulicht die beiden Aufreinigungsschritte von SHMT.

**Tabelle 5.4: Quantitative und qualitative Analyse der SHMT Protein-Aufreinigung.** Die erste chromatografische Aufreinigung konnte die Endotoxin (ET)-Kontamination auf 0,0406 ng ET/ $\mu$ g Protein (Prot) verringern. Dieser Wert lag über dem gewünschten Wert von  $< 0,01$  ng ET/ $\mu$ g Protein. Es folgte eine zweite Aufreinigung mit dem Ergebnis von 0,0102 ng ET/ $\mu$ g Protein in den vereinigten Eluaten (elu) 1-9.

SHMT 1. Aufreinigung	mg/ml Nano-Drop	$\mu$ l	$\mu$ g	ng ET LAL-Test	ng ET in 1 $\mu$ g Prot	ng ET in 5 $\mu$ g Prot
<b>SHMT stock</b>	<b>4,29</b>	<b>100</b>	<b>429</b>	<b>75000</b>		
elu1	0,01	150	2	↓ 8475- fache Reduktion ↓		
elu2	0,14	150	21			
elu3	0,40	150	60			
elu4	0,56	150	84			
elu5	0,35	150	53			
elu6	0,23	90	21			
elu7	0,18	140	25			
elu8	0,13	130	17			
elu9	0,04	130	5			
elu10	0,01	130	1			
<b>eluat 2-8</b>	<b>0,28</b>	<b>960,0</b>	<b>272,91</b>	<b>8,85</b>	<b>0,0408</b>	<b>0,2041</b>
<b>SHMT 2. Aufreinigung</b>				↓ 7-fache Reduktion ↓		
elu0	0,05	100	5,0			
elu1	0,12	100	12,0			
elu2	0,16	150	24,0			
elu3	0,17	80	13,6			
elu4	0,18	110	19,8			
elu5	0,21	150	31,5			
elu6	0,22	110	24,2			
elu7	0,21	70	14,7			
elu8	0,22	100	22,0			
elu9	0,18	100	18,0			
elu10	0,09	110	9,9			
<b>eluat 1-9</b>	<b>0,19</b>	<b>970,0</b>	<b>179,99</b>	<b>1,29</b>	<b>0,0102</b>	<b>0,0512</b>

Die über SDS-PAGE aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Eluate bestätigten, dass die Eluate 1 bis 9 aus der zweiten Protein-Aufreinigung SHMT Protein enthielten. Die Proteinbanden der verschiedenen Untereinheiten waren deutlich zu sehen und enthielten dieselbe Konzentration wie im NanoDrop gemessen, verglichen mit den definierten BSA-

Banden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass SHMT nach der Aufreinigung eine gute Integrität aufwies und biologisch aktiv sein dürfte (Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9: Qualitative Analyse der SHMT Eluate nach der zweiten Aufreinigung.** Nachdem die SHMT Proteinlösung zweimal über eine Endotoxin-bindende Säule aufgereinigt wurde, erfolgte eine SDS-PAGE und eine Coomassie-Färbung. SHMT erscheint durch seine verschiedenen Untereinheiten mehrbandig im Gel, mit einer Hauptbande bei 55 KDa. Die Eluate (elu) 1 bis 9 enthielten nach der Aufreinigung SHMT Protein und wurden vereinigt.

Die aufgereinigten Proteine wurden zur Stimulation von moDCs und mDCs verwendet. Zur Berechnung des einzusetzenden Volumens wurden die mit dem NanoDrop bestimmten Proteinkonzentrationen herangezogen: SHMT Eluate 1-9 0,19 mg/ml, CcpA Eluate 2-10 0,31 g/ml, CpcB 0,22 mg/ml und fg-gap 0,59 mg/ml.

## 5.3 Reaktion von moDCs und mDCs auf verschiedene Antigene

Die Antigen-Stimulationen von moDCs und mDCs sollte möglichst nach GMP<sup>7</sup>-Regeln erfolgen, um die spätere Translationen in den klinischen Gebrauch zu erleichtern. Zur Kultur der DCs wurde das GMP-klassifizierte DC CellGro Medium der Firma CellGenix genutzt. Dieses ist auf die Kultur von DCs ausgelegt, enthält keine tierischen Bestandteile und bedarf keiner weiteren Zusätze. In CellGro generierte moDCs unterschieden sich von solchen, die in RPMI-Medium mit 10% FCS differenziert wurden (Abschnitt 5.4.1). Deshalb wurden die Antigen-Stimulationen von moDCs vergleichsweise in CellGro und RPMI-10%FCS durchgeführt. mDCs wurden ausschließlich in CellGro stimuliert.

Als Antigene wurden vier Proteine eingesetzt, von welchen CcpA und SHMT auf moDCs und mDCs immunogen wirkten. CpcB und fg-gap waren auch in höheren Konzentrationen nicht in der Lage die beiden DC Subtypen zu aktivieren. Ein Lysat aus *Aspergillus*-Hyphen der Firma Miltenyi Biotec stimulierte zwar in PBMCs CD4/CD154-positive *Aspergillus*-spezifische T-Zellen, jedoch wirkte es auf moDCs und mDCs nicht immunogen.

Die mit den Antigenen stimulierten DCs wurden hinsichtlich ihrer Reifung, ihrer Zytokinsekretion und ihrem Vermögen T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren, untersucht. Die T-Zell-Antwort wurde mittels IFN $\gamma$  ELISpot und CFSE T-Zell-Proliferations-Assay analysiert. Außerdem wurden alle Antigene mit PBMCs inkubiert, um die Antwort von CD4/CD154-positiven antigenspezifischen T-Zellen zu ermitteln.

### 5.3.1 CcpA wirkt stark immunogen auf moDCs und mDCs

Das CcpA Protein wurde von Kooperationspartnern aus dem Hans-Knöll-Institut in Jena entdeckt und rekombinant über *E. coli* produziert [Pächtz et al. (2015)]. Es ist sehr abundant in der Zellwand ruhender *Aspergillus*-Konidien und könnte durch die verringerte Virulenz der CcpA-Deletionsmutante im Mausmodell pro-inflammatorische Eigenschaften besitzen.

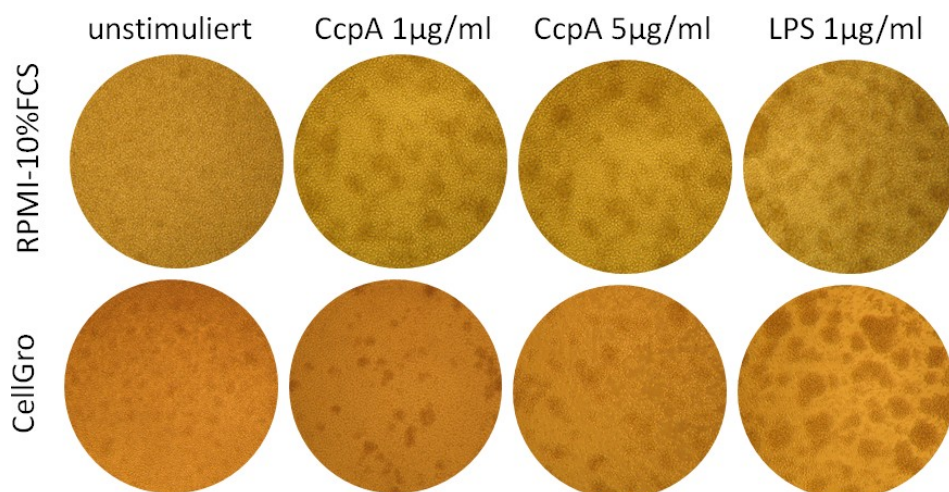
---

<sup>7</sup>engl. Good Manufacturing Practice



**moDCs und mDCs reifen durch CcpA unterschiedlich**

Unstimulierte dendritische Zellen verteilen sich gleichmäßig auf dem Boden einer Zellkultur-Platte. Bei Aktivierung verlieren sie diese gleichmäßige Konfluenz und migrieren zueinander, um Zellhaufen zu bilden. Dieses Clustern fällt je nach Stimulus und DC-Aktivierung stärker oder schwächer aus, was sich an der Größe der Zellhaufen erkennen lässt. Im Lichtmikroskop werden die Zellhaufen als dunkle Bereiche sichtbar, da übereinander liegende Zellen weniger Licht durchlassen. Für 18 h mit CcpA stimulierte moDCs clusterten konzentrationsabhängig in beiden Zellkulturmedien, wobei RPMI10%FCS größere Cluster zeigte als CellGro. Die Cluster der mit 1 µg/ml CcpA stimulierten moDCs waren etwas kleiner, als die der mit 5 µg/ml CcpA stimulierten moDCs. Die Positiv-Kontrolle LPS induzierte noch größere moDC-Cluster (Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.10: CcpA aktivierte das Clustern von moDCs.** Lichtmikroskopische Aufnahmen von 18 h stimulierten moDCs in RPMI10%FCS und CellGro Medium. Im Vergleich zu unstimulierten moDCs clusterten CcpA stimulierte moDCs unabhängig vom Kulturmedium. Die Positiv-Kontrolle LPS rief diesen Effekt noch stärker hervor.

Die mithilfe eines Lichtmikroskops beobachtete DC-Aktivierung (Clustern) konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der Maturierungsmarker-Expression bestätigt werden. In RPMI10%FCS-Medium gehaltene moDCs erhöhten durch die CcpA Stimulation die Expression ihrer Maturierungsmarker. Die Reifung erfolgte konzentrationsabhängig, 5 µg/ml CcpA induzierte eine höhere Markerexpression als 1 µg/ml CcpA. CcpA reifte die moDCs so stark, dass deren Markerprofil dem von LPS-stimulierten moDCs ähnelte. Bis auf den homing-Rezeptor CCR7, dieser wurde durch CcpA nicht induziert. In CellGro-



Medium kultivierte moDCs reiften durch CcpA tendenziell (Abbildung 5.11).

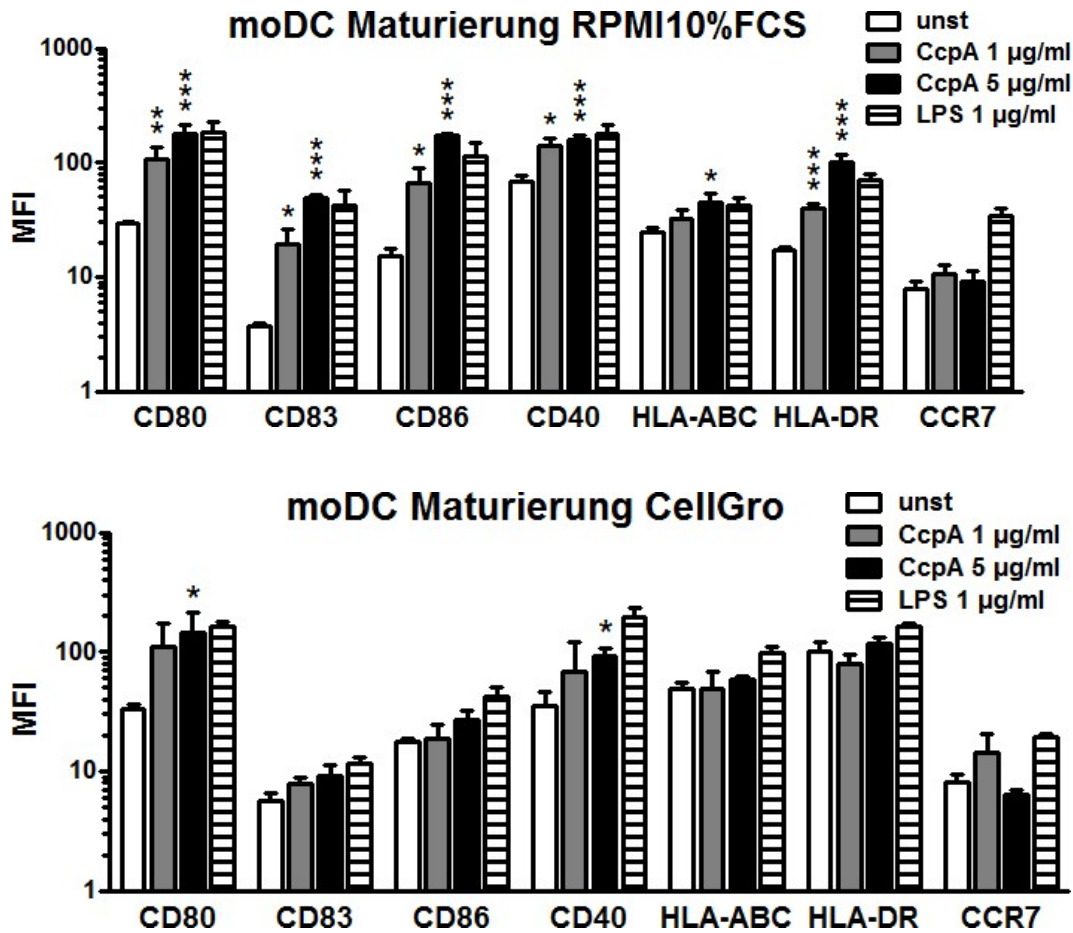
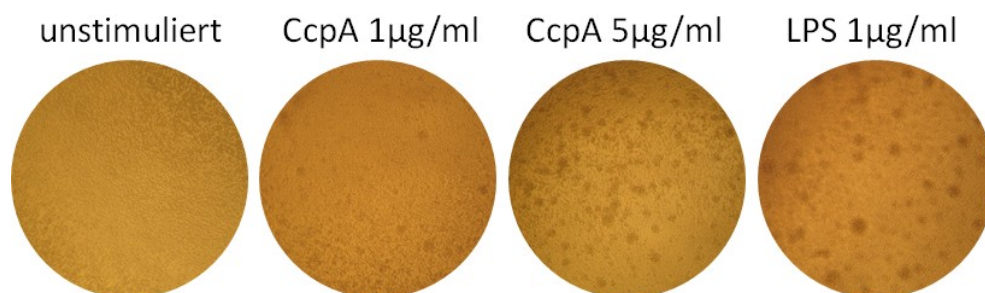


Abbildung 5.11: CcpA induzierte die Reifung von moDCs in RPMI10%FCS-Medium deutlich, in CellGro-Medium tendenziell. Im Vergleich zu unstimulierten (unst) moDCs erhöhten für 18 h mit CcpA stimulierte moDCs in RPMI10%FCS die Expression aller Maturierungsmarker, bis auf CCR7. Das Maturierungsniveau der von CcpA-moDCs induzierten Marker ähnelte sogar dem der Positiv-Kontrolle LPS. Die durch CcpA induzierte Reifung von CellGro-kultivierten moDCs war deutlich geringer als bei RPMI10%FCS kultivierten moDCs. CellGro-moDCs induzierten durch CcpA bis auf CD80 und CD40 keinen der Marker.

Signifikant erhöht waren die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD40, alle anderen Marker wurden nicht induziert. Die Positiv-Kontrolle LPS reifte die in CellGro kultivierten moDCs, jedoch war die Reifung weniger stark als in RPMI10%FCS. Vor allem CD83 und CD86 wurden durch LPS in RPMI10%FCS stärker induziert als in CellGro. Sowohl in RPMI10%FCS, als auch in CellGro kultivierte moDCs induzierten durch Stimulation mit CcpA kein CCR7. Deshalb wären CcpA beladene moDCs wohl nicht in der Lage nach einer Vakzinierung *in vivo* zu peripheren Lymphknoten zu migrieren. Dennoch könnten sie durch

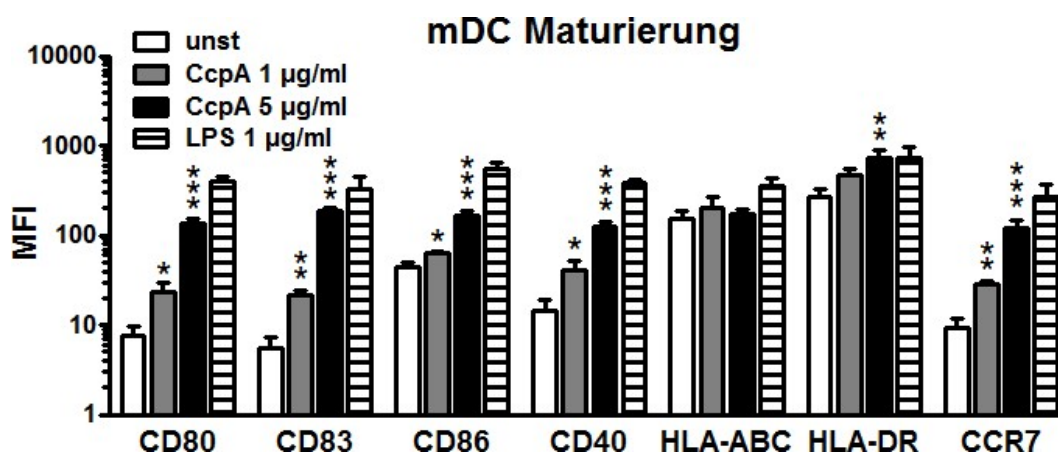
die CcpA induzierten MHC- und kostimulatorischen Moleküle, vor Ort CcpA-Antigen zu T-Zellen präsentieren und diese dabei kostimulieren.

mDCs wurden ausschließlich in CellGro-Medium gehalten. Die 18-stündige Stimulation mit CcpA führte zum konzentrationsabhängigen Clustern der mDCs. Die Positiv-Kontrolle LPS rief die größten Zellhaufen hervor (Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.12: CcpA ließ mDCs konzentrationsabhängig clustern.** mDCs bilden durch Stimulation mit 5 µg/ml CcpA mehr Zellhaufen, als mit 1 µg/ml. Unstimulierte mDCs waren gleichmäßig konfluent, die Positiv-Kontrolle LPS clusterte mDCs stark.

Die lichtmikroskopisch beobachtete Aktivierung der mDCs durch CcpA konnte durch das Maturierungsprofil bestätigt werden. Bis auf das MHC Klasse I Molekül HLA-ABC induzierte CcpA konzentrationsabhängig alle Maturierungsmarker auf mDCs. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 und CD40, sowohl HLA-DR und CCR7 wurden durch 5 µg/ml CcpA höher induziert als durch 1 µg/ml CcpA (Abbildung 5.13).

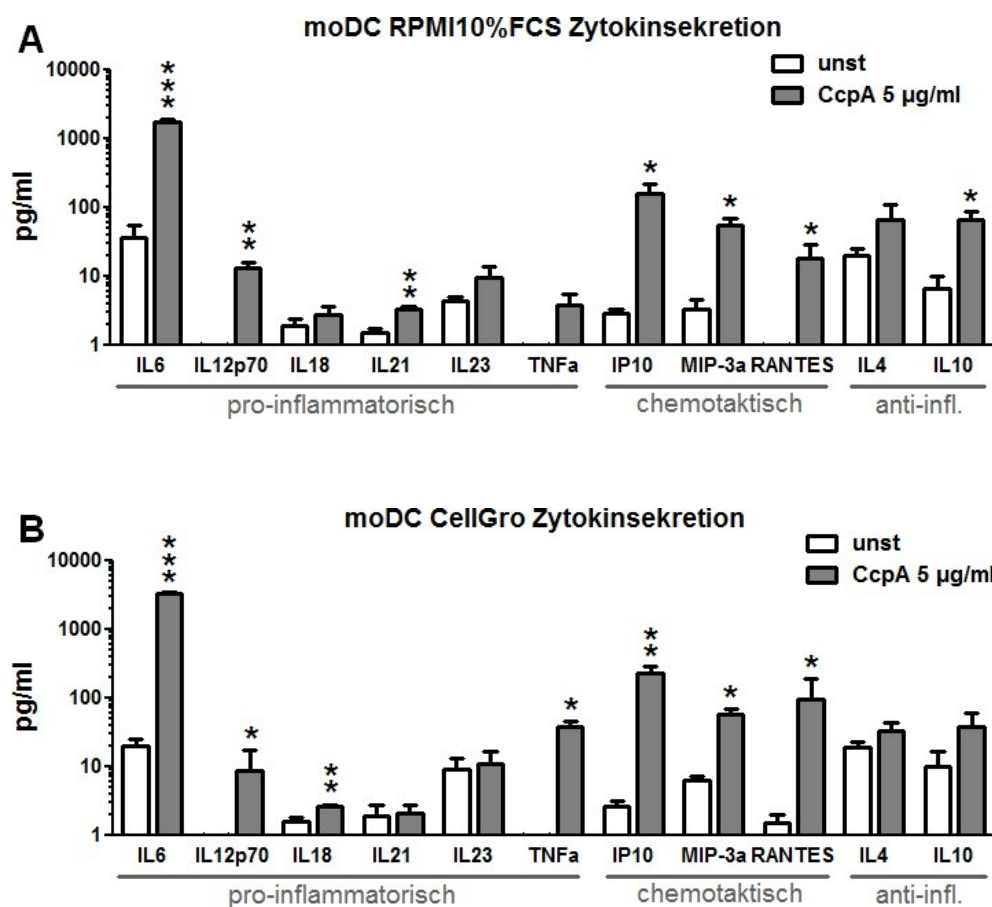


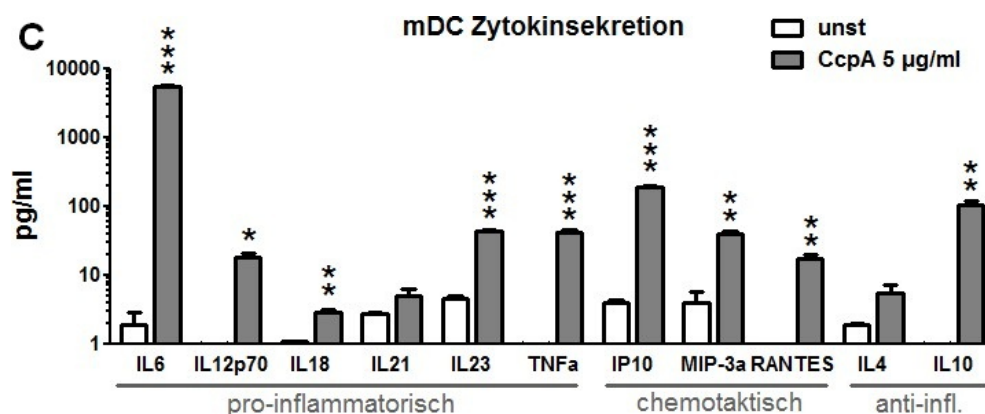
**Abbildung 5.13: mDCs reiften durch CcpA-Stimulation konzentrationsabhängig.** Die Expression der Kostimulatoren CD80, CD83, CD86 und CD40, sowie von CCR7 war auf unstimulierten (unst) mDCs in CellGro relativ niedrig. Die MHC Moleküle HLA-ABC und HLA-DR waren im Vergleich dazu relativ hoch exprimiert. Die 18 h Stimulation mit CcpA induzierte bis auf HLA-ABC alle Maturierungsmarker konzentrationsabhängig.

Im Vergleich zu CcpA beladene moDCs induzierte das Protein bei mDCs den homing-Rezeptor CCR7. CcpA-mDCs wären damit in der Lage zu peripheren Lymphknoten zu migrieren. Außerdem exprimierten mDCs mehr MHC Klasse II Moleküle, womit eine bessere Antigenpräsentation verbunden sein könnte. Beide DC Subtypen wurden durch 5 µg/ml CcpA besser gereift, als mit 1 µg/ml CcpA. Für Zytokinsekretions-Analysen und funktionelle T-Zell-Analysen wurden moDCs und mDCs mit 5 µg/ml CcpA beladen. Die 18-stündige Antigen-Stimulation wurde zuvor durch Zeitverlauf-Experimente festgelegt (Anhang A.3).

### CcpA induziert ein immunomodulatorisches Zytokinprofil von moDCs und mDCs

Zur Analyse der Zytokinsekretion wurden die Überstände von unstimulierten und mit 5 µg/ml CcpA stimulierten moDCs und mDCs mittels Multiplex-ELISA vermessen. Die 18-stündige Stimulation durch CcpA veranlasste moDCs und mDCs zur Sekretion von chemotaktischen, pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (Abbildung 5.14 A-C).





**Abbildung 5.14: CcpA stimulierte moDCs und mDCs sekretierten ein immunomodulatorisches Zytokinprofil.** RPMI10%FCS-moDCs (A), CellGro-moDCs (B) und mDCs (C) induzierten durch CcpA-Stimulation chemotaktische, pro- und anti-inflammatorische Zytokine. Das pro-inflammatorische Interleukin IL6 war das mit Abstand am höchsten sekretierte Zytokin. IL23 wurde von CcpA stimulierten mDCs, jedoch nicht von moDCs induziert.

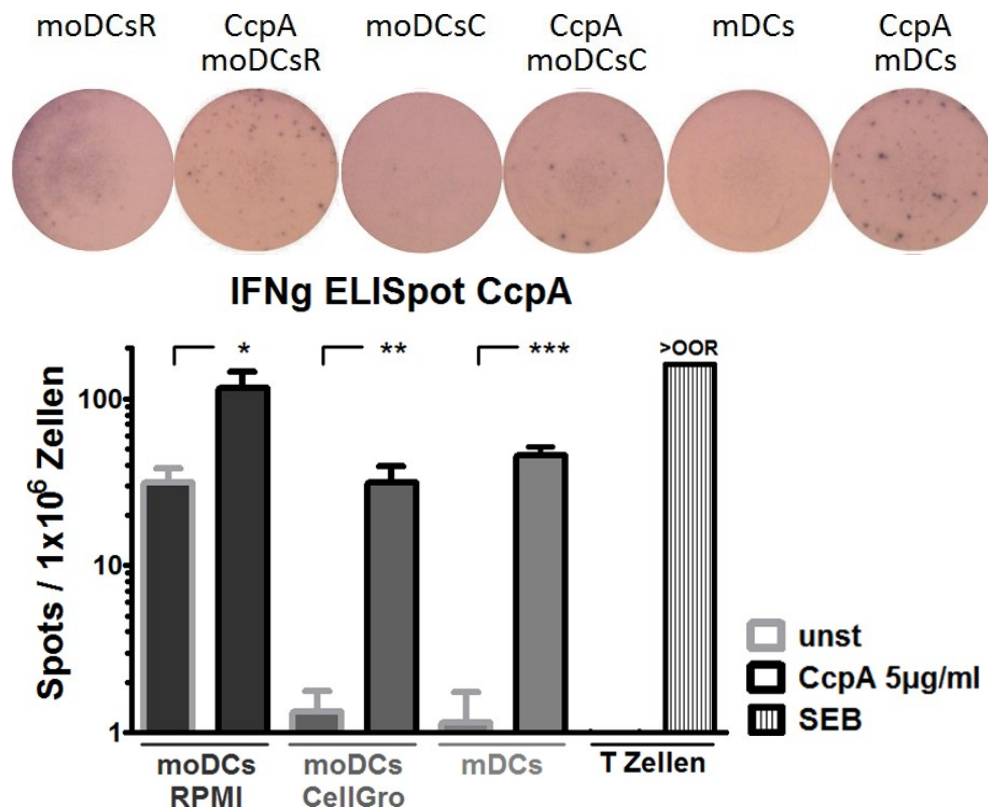
Besonders hoch induzierten die DCs das pro-inflammatorische Zytokin IL6. Auch das Th1 induzierende IL12p70 wurde von beiden DC Subtypen durch CcpA-Stimulation vermehrt sekretiert. Chemotaktische Zytokine, wie IP10, MIP-3a und RANTES, waren auch durch CcpA induziert. IL4 und IL10, als anti-inflammatorische Vertreter, wurden von moDCs durch CcpA-Stimulation tendenziell erhöht. mDCs induzierten IL10 stärker als moDCs, jedoch war IL4 nur tendenziell und deutlich weniger als bei moDCs induziert. IL23 wurde als pro-inflammatorisches Zytokin von CcpA stimulierten mDCs induziert, jedoch nicht von moDCs. Obwohl die in CellGro kultivierten moDCs durch CcpA weniger stark maturierten als RPMI10%FCS-moDCs, induzierten sie dennoch ein sehr ähnliches Zytokinprofil. IL6 und TNFα wurden durch CellGro-moDCs sogar höher induziert, als durch RPMI10%FCS-moDCs.

### CcpA beladene moDCs und mDCs induzierten eine deutliche T-Zell Antwort

Die T-Zell Antwort auf antigenbeladenen DCs wurde mittels IFNγ ELISpot und CFSE T-Zell-Proliferations-Assay analysiert. Im T-Zell-Proliferations-Assay werden naive T-Zellen durch Stimulation mit DCs aktiviert und die Zellteilungen der T-Zellen gemessen. Der IFNγ ELISpot diente zum Nachweis von einer über DCs vermittelten Aktivierung von antigenspezifischen, IFNγ sekretierenden Gedächtnis-T-Zellen.

Die für 18 h unstimulierten oder mit 5 µg/ml CcpA stimulierten moDCs und mD-

Cs wurden im Anschluss über Nacht mit autologen T-Zellen im IFN $\gamma$  ELISpot konfrontiert. T-Zellen, die durch CcpA-DCs aktiviert wurden, sekretierten IFN $\gamma$ , welches durch eine Farbreaktion als dunkel-violette Punkte in der Zellkulturplatte sichtbar wurde. Jeder Spot kann damit auf eine aktivierte, IFN $\gamma$  sekretierende T-Zelle zurückgeführt werden. Abbildung 5.15 zeigt Fotos der Mikrotiterplatte eines exemplarischen Spenders und im Säulendiagramm die Mittelwerte von 3 Spendern.



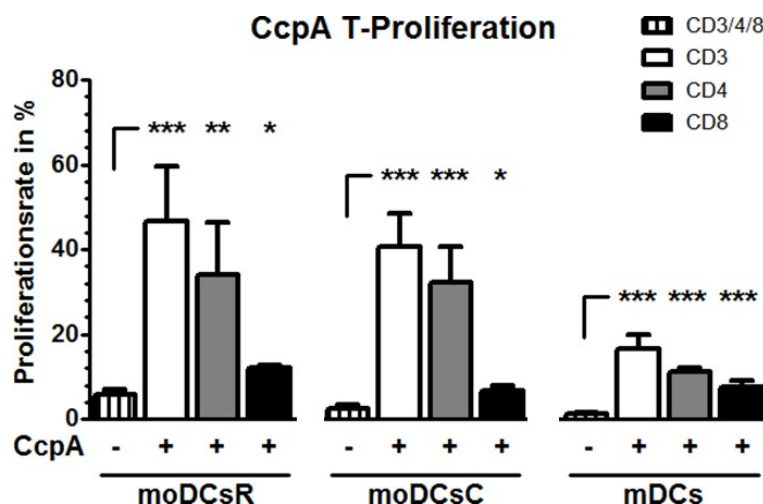
**Abbildung 5.15: CcpA beladene moDCs und mDCs induzierten die IFN $\gamma$  Sekretion von T-Zellen.** DCs wurden für 18 h mit 5  $\mu$ g/ml CcpA beladen und anschließend im IFN $\gamma$  ELISpot mit autologen T-Zellen konfrontiert. Die mit einem ELISpot Reader aufgenommenen Fotos eines repräsentativen Spenders zeigen, dass CcpA beladene moDCsR/C (RPMI-10%FCS/CellGro) und mDCs schwarze Spots, also IFN $\gamma$  sekretierende T-Zellen induzierten. Im Säulen-Diagramm sind die Werte von 3 Spendern zusammengefasst. Sobald moDCs oder mDCs mit CcpA stimuliert wurden, aktivierten sie signifikant mehr T-Zellen, als unstimulierte (unst) DCs. Die als Positiv-Kontrolle mit SEB (Staphylokokken-Enterotoxin-B) stimulierten T-Zellen induzierten eine nicht mehr definierbare Spotanzahl (>OOR).

In RPMI10%FCS kultivierte moDCs aktivierten bereits im unstimulierten Zustand durchschnittlich 30 von  $10^6$  T-Zellen. In CellGro gehaltene moDCs und mDCs induzierten im Vergleich dazu fast keinen Hintergrund von unspezifisch aktivierten T-Zellen. Mit CcpA

beladene DCs aktivierten signifikant mehr T-Zellen als unstimulierte DCs. CcpA-moDCs in RPMI10%FCS aktivierten mehr T-Zellen, als CcpA-moDCs und -mDCs in CellGro, jedoch induzierten sie im unstimulierten Zustand einen höheren Hintergrund. Auffällig war, dass CcpA-mDCs größere Spots induzierten, als moDCs in RPMI10%FCS oder CellGro. Je größer ein Spot ist, desto mehr IFN $\gamma$  wurde von der aktivierten T-Zelle freigesetzt. Als Kontrollen dienten unstimulierte T-Zellen, die keine Spots hervorbrachten und mit SEB (Staphylokokken-Enterotoxin-B) stimulierte Zellen, die sehr viele Spots induzierten.

Eine Aktivierung durch CcpA beladene moDCs und mDCs konnte auch im T-Zell-Proliferations-Assay gemessen werden. Die für 18 h mit 5  $\mu$ g/ml CcpA stimulierten DCs wurden für 12 Tage mit autologen, CFSE gefärbten T-Zellen kultiviert. Am Tag 6 wurden die T-Zellen mit aufgetauten DCs ein Mal restimuliert. Die Analyse der Proliferationsrate erfolgt durchflusszytometrisch an Tag 12 durch Messung der CFSE-Fluoreszenz. Eine simultane Analyse der CD3-positiven Zellen schloss die ungefärbten DCs von der Proliferationsanalyse aus. Des Weiteren wurden die Zellen mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern gefärbt, um zu untersuchen, welche T-Zell Populationen aktiviert wurde.

Alle mit 5  $\mu$ g/ml CcpA beladenen DCs induzierten eine signifikante Proliferation autologer CD3 T-Zellen, im Vergleich zu unbeladenen DCs. In RPMI10%FCS und CellGro mit CcpA beladene moDCs induzierten eine stärkere Proliferation, als mDCs. CcpA induzierte die Proliferation von CD4 T-Zellen stärker, als von CD8 T-Zellen (Abbildung 5.16).



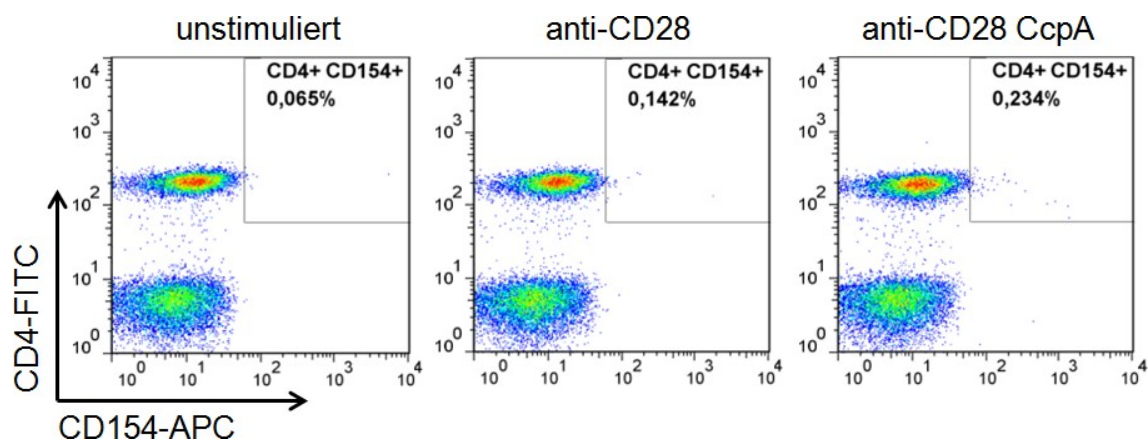
**Abbildung 5.16: CcpA beladene moDCs und mDCs aktivierten autologe T-Zellen zur Proliferation.** Durch 5  $\mu$ g/ml CcpA aktivierte moDCs in RPMI10%FCS (moDCsR) und CellGro (moDCsC) induzierten eine stärkere T-Zell-Proliferation als mDCs. CD4 T-Zellen proliferierten stärker als CD8 T-Zellen.



### In PBMCs induzierte CcpA eine spezifische CD154-T-Zell Antwort

Die ELISpot- und Proliferations-Ergebnisse wurden durch einen Test zum Nachweis Aspergillus-spezifischer T-Zellen ergänzt. Für die Analyse wurden PBMCs stimuliert und nach 18 h auf die Anzahl CD4-CD154-positiver T-Zeller im Durchflusszytometer vermessen. T-Zellen, die für das Antigen spezifisch sind, regulieren durch die Stimulation den Oberflächenmarker CD154 hoch [Bacher and Scheffold (2013)]. Zur Signalverstärkung wurden die PBMCs zusätzlich mit anti-CD28 Antikörpern stimuliert und zur Kontrolle unspezifische anti-CD28 Effekte blieb ein Ansatz unstimuliert.

Die CD4-positiven Zellen von unstimulierten PBMCs exprimierten im Mittel zu  $0,0667\% \pm 0,0072\%$  den Marker CD154. Sobald sich anti-CD28 Antikörper mit in der Kultur befanden, erhöhte sich der unspezifische Hintergrund auf  $0,1597\% \pm 0,0214\%$ . Die Stimulation mit CcpA bewirkte einen weiteren Anstieg von CD154-positiven CD4 T-Zellen auf  $0,243\% \pm 0,0099\%$  (Abbildung 5.17).



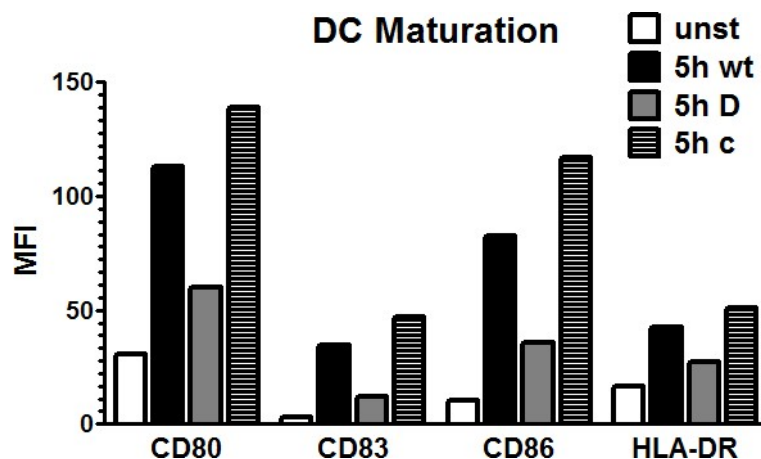
**Abbildung 5.17: CcpA induzierte Aspergillus-spezifische T-Zellen.** PBMCs wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  CcpA und anti-CD28 Antikörpern zur Signalverstärkung stimuliert und durchflusszytometrisch vermessen. Die Punktdiagramme eines repräsentativen Spenders zeigen, dass einige T-Zellen antigenspezifisch waren. CcpA induzierte im Vergleich zu anti-CD28 und unstimulierten PBMCs auf einigen CD4 T-Zellen die Expression von CD154.

Der Anteil an CcpA-spezifischen T-Zellen war im ELISpot und in der CD154-Analyse sehr gering, weil die Frequenz an Aspergillus-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut an sich niedrig ist und zudem nur ein Protein zur Stimulation eingesetzt wurde. Während dem Proliferations-Assay verändert sich der Anteil an CcpA-spezifischen T-Zellen zu nicht spezifischen T-Zellen, da sich die spezifischen T-Zellen durch Zellteilung vermehren und unspezifische T-Zellen durch fehlende Überlebenssignale apoptotisch werden.

### Reaktion von moDCs auf die *Aspergillus CcpA* Deletionsmutante

In einem Kooperationsprojekt wurde die Reaktion von moDCs auf eine *Aspergillus*-Mutante analysiert, bei welcher *CcpA* durch homologe Rekombination deletiert wurde. Zum Vergleich diente wildtypischer *Aspergillus*, als auch ein komplementierter Stamm. Die Komplementante entstand durch das Wiedereinbringen des *CcpA* Gens und sollte dieselbe Reaktion wie der Wildtyp hervorrufen. Zur Stimulation der moDCs wurden für 3 bis 5 Stunden geschwollene, fixierte Konidien eingesetzt. Erst durch das Schwellen verändert sich die Zellwand der Konidien, sodass sie immunologisch nicht mehr inert erscheinen [Aimanianda et al. (2009)]. Vermutlich wird durch die Zellwandveränderung das Zellmembran-ständige *CcpA* Protein dem Immunsystem erst zugänglich.

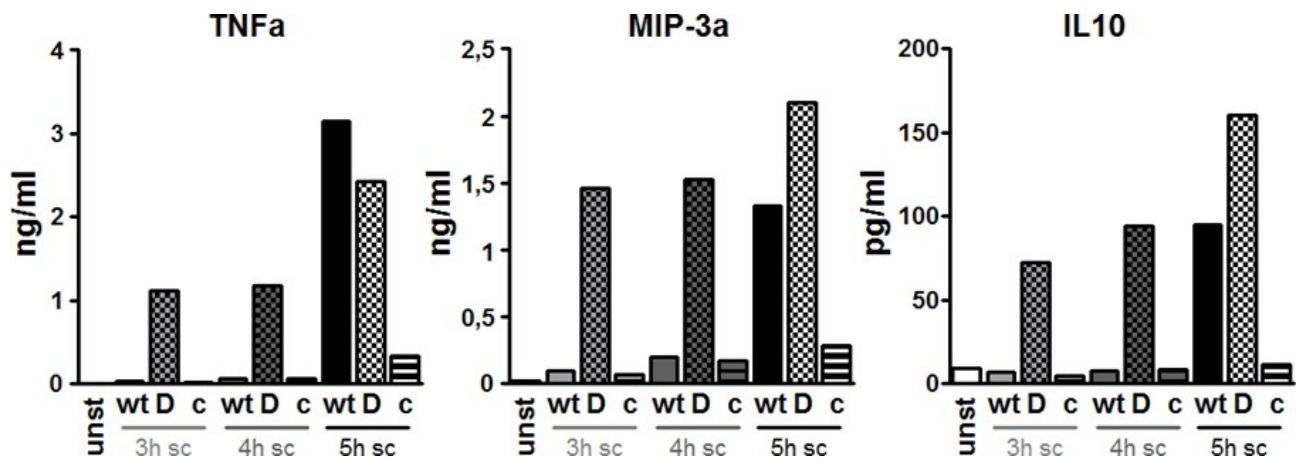
Die Stimulation mit ruhenden, nicht geschwollenen Konidien ließ moDCs kaum reifen und Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletante konnten nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Sobald moDCs mit geschwollenen Konidien stimuliert wurden, erhöhten sie die Expression von Maturierungsmarkern. Besonders schön waren die Effekte mit 5 h geschwollenen Konidien, die als Wildtyp und Komplementante CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf moDCs erhöhten. Die *CcpA*-Deletante erhöhte die Expression der Maturierungsmarker deutlich geringer als der Wildtyp und die Komplementante (Abbildung 5.18).



**Abbildung 5.18:** Das Fehlen von *CcpA* auf geschwollenen Konidien führt zu einer verringerten moDC Maturierung. Für 5 h geschwollene und fixierte Wildtyp-Konidien (wt) und komplementierte Konidien (c) induzierten bei moDCs nach 18 h eine höhere Expression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR als Konidien, bei denen das *CcpA* Protein deletiert (D) wurde.



In Kulturüberständen der mit *Aspergillus* stimulierten moDCs wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine gemessen. Darunter waren das pro-inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$ , das chemotaktische Chemokin MIP-3 $\alpha$  und das anti-inflammatorische Interleukin IL10. Wurden moDCs mit dem CcpA-deletierten Stamm stimuliert, erhöhten sie unerwartet die Sekretion aller genannten Zytokine. 3 bis 4 h geschwollene Wildtyp-Konidien induzierten keine Zytokine. Erst 5 h geschwollene wildtypische Konidien waren für moDCs immunogen und induzierten die Zytokine (Abbildung 5.19).



**Abbildung 5.19: Die CcpA-Deletante stimulierte moDCs zur Sekretion von immunomodulatorischen Zytokinen.** Die 3 bis 5 h geschwollenen Konidien der Deletante (D) induzierten nach 18 h in moDCs TNF $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$  und IL10, im Vergleich zum Wildtyp (wt) und zur Komplementante (c). Sobald die wildtypischen Konidien durch das Schwellen ihre Zellwand modulierten, induzierten sie auch die analysierten Zytokine.

Erwartungsgemäß induzierte die Komplementante der 3 und 4 h geschwollenen Konidien in 18 h stimulierten moDCs dieselben Zytokinkonzentrationen von TNF $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$  und IL10, wie der Wildtyp. Allerdings induzierten die 5 h geschwollenen, komplementierte Konidien im Vergleich zum Wildtyp keine Zytokine. Dennoch induzierten die mit 5 h geschwollenen Wildtyp-Konidien stimulierten moDCs gleich viel Zytokine wie mit Komplementante-Konidien.

Die verringerte moDC-Maturierung durch CcpA-deletierte, geschwollene Konidien untermauerte die zuvor beschriebene immunogene Wirkung des CcpA Proteins auf moDCs und mDCs.

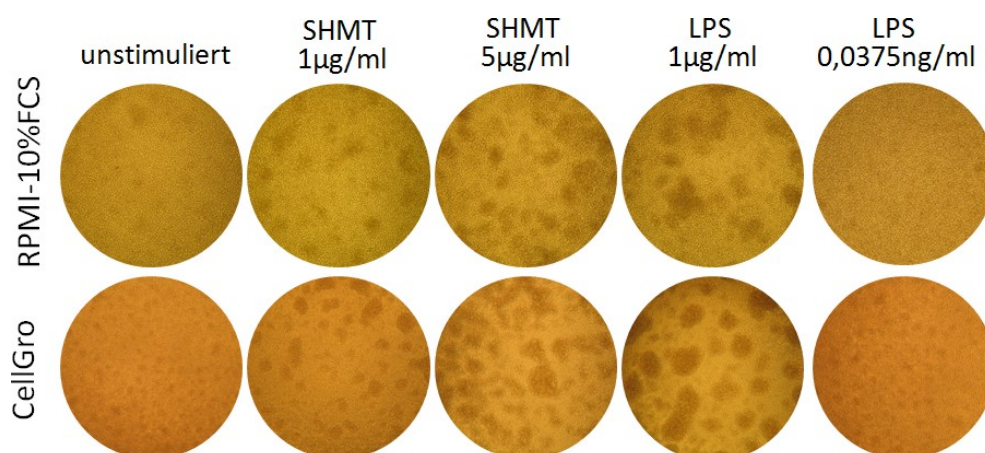
### 5.3.2 SHMT reift mDCs besser als moDCs

In Seren von Aspergillose-Patienten wurden für das Protein SHMT (Serinhydroxymethyltransferase) spezifische Antikörper detektiert [Teutschbein et al. (2015)], die von einer aktiven Immunreaktion gegen das Enzym zeugen. Durch die Immunreaktion der Patienten wurde SHMT als immunogenes und für die DC-Immunmodulation interessantes Protein eingestuft.

Die rekombinante Expression von SHMT erfolgt mithilfe von *E. coli*. Nachdem das Protein zweimal mittels Affinitätschromatografie von Endotoxinen aufgereinigt wurde, blieb eine geringe Endotoxin-Konzentration von 0,0357 ng/ml bei einer Stimulation mit 5 µg/ml SHMT im Protein enthalten. Da diese Kontamination oberhalb der Grenze von 0,01 ng/ml lag, wurden Kontrollen mit der genannten LPS-Konzentration mitgeführt.

#### SHMT induziert die kostimulatorischen Reifemarker von moDCs

Mit 5 µg/ml SHMT stimulierte moDCs bildeten mehr und auch größere Zellhaufen, als mit 1 µg/ml SHMT stimulierte moDCs. Die Positiv-Kontrolle mit 1 µg/ml LPS induzierte die größten moDC-Cluster. Die mitgeführte LPS-Kontrolle mit 0,0357 ng/ml glich in ihrer moDC-Konfluenz den unstimulierten Proben. Es konnte kein durch das Kulturmedium verursachter Unterschied im Cluster-Verhalten der SHMT stimulierten moDCs festgestellt werden (Abbildung 5.20).



**Abbildung 5.20: SHMT induziert konzentrationsabhängig das Clustern von moDCs.** Wurden moDCs mit 5 µg/ml SHMT stimuliert, bildeten sie mehrere und größere Zellhaufen, als mit 1 µg/ml stimulierte moDCs. Die 0,0357 ng/ml LPS-Kontrolle glich den unstimulierten Proben.

Bei Analyse der Maturierungsmarker-Expression traten Kulturmedium bedingte Unterschiede auf. Auch hier waren, wie schon bei den CcpA Stimulationen, die MHC Moleküle HLA-ABC und HLA-DR auf unstimulierten moDCs in CellGro deutlich höher exprimiert, als in RPMI10%FCS. Die Stimulation mit SHMT veranlasste eine leichte, eher tendenzielle Reifung der moDCs in beiden Kulturmedien. Die Reifung der moDCs fiel mit 5 µg/ml SHMT höher aus, als mit 1 µg/ml. moDCs induzierten mit 5 µg/ml SHMT CD80 signifikant, sowie CD83, CD86 und CD40 in CellGro. In RPMI10%FCS erhöhten moDCs durch 5 µg/ml SHMT tendenziell CD83, CD86, CD40 und HLA-DR. Die LPS-Kontrolle mit 0,0357 ng/ml LPS war in allen Fällen im Rahmen der unstimulierten Proben (Abbildung 5.21).

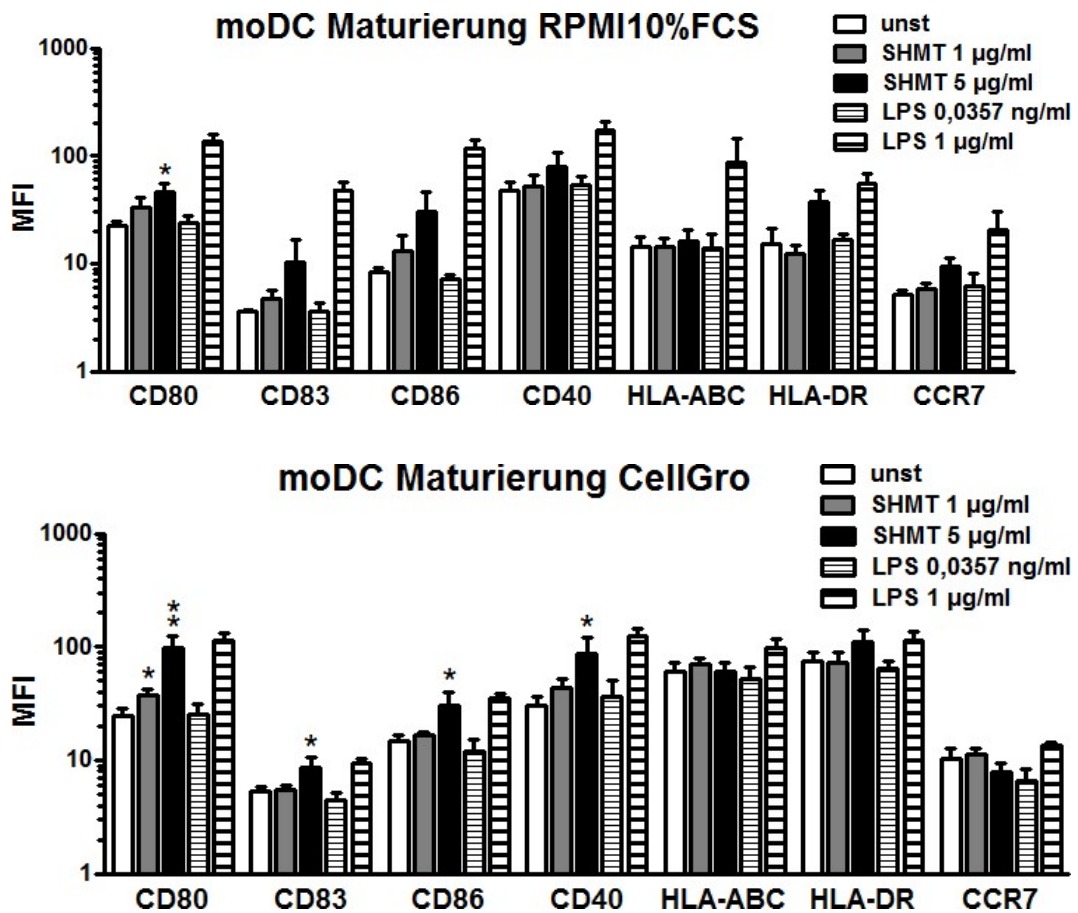
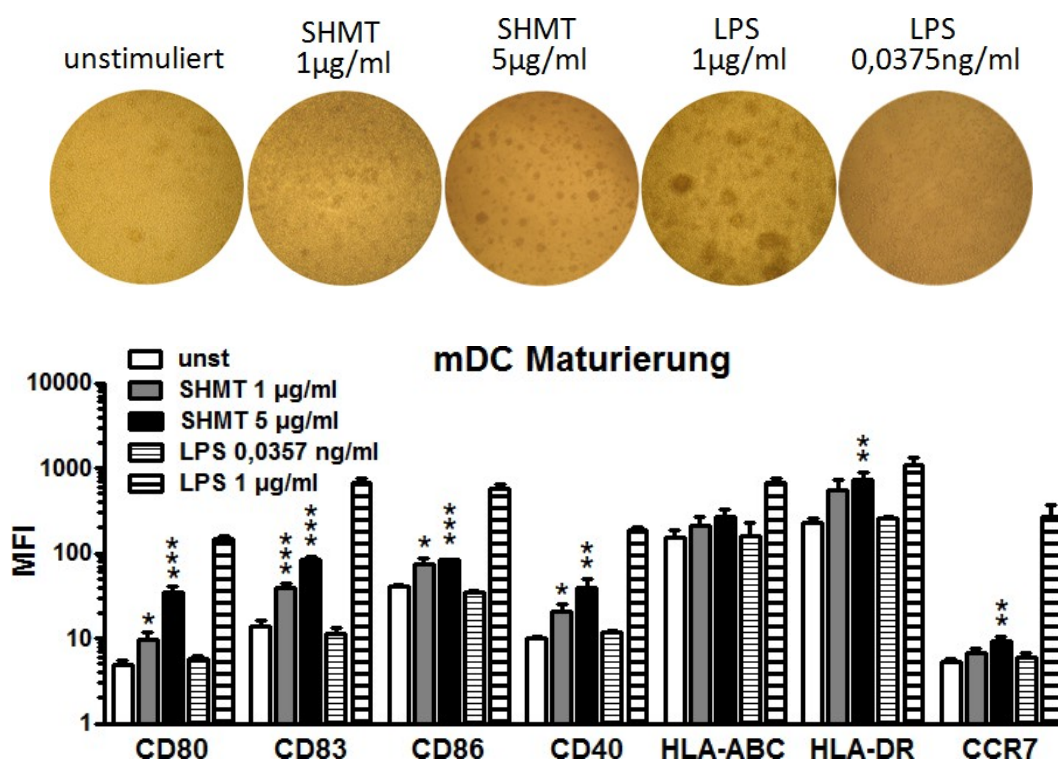


Abbildung 5.21: SHMT rief bei moDCs eine leichte Maturierung hervor. Die Reifung der moDCs war mit 5 µg/ml SHMT besser, als mit 1 µg/ml. SHMT induzierte vor allem die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 und CD40.

### mDCs maturieren durch SHMT Stimulation zu voll funktionsfähigen DCs

Das Clustern der mDCs durch SHMT Stimulation fiel geringer aus, als bei moDCs. Sie gruppierten auch konzentrationsabhängig mit 5 µg/ml SHMT mehr und zu größeren Zellhaufen, als mit 1 µg/ml. Die 0,0357 ng/ml LPS-Kontrolle glich in ihrer Konfluenz der unstimulierten Probe. Obwohl die lichtmikroskopische Betrachtung eine geringere Reifung der mDCs, im Vergleich zu moDCs, vermuten ließ, induzierten mDCs wesentlich mehr Reifemarker. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 und CD40 waren schon durch 1 µg/ml SHMT signifikant induziert. Durch 5 µg/ml konnte die Reifung der mDCs noch verstärkt werden. HLA-ABC wurde durch SHMT nicht induziert, wohl aber HLA-DR. Dies könnte auf eine Präsentation von SHMT über MHC Klasse II Moleküle hindeuten. Der homig-Rezeptor CCR7 wurde durch SHMT auch induziert. Im Vergleich zur LPS-Kontrolle und zur CcpA-Stimulation allerdings eher leicht (Abbildung 5.22).



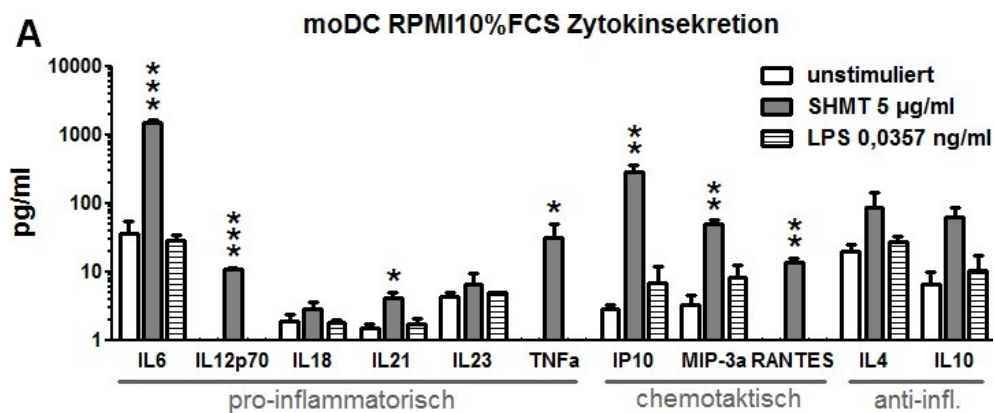
**Abbildung 5.22: SHMT induzierte eine Reifung der mDCs.** Die mDC-Cluster nahmen mit steigender SHMT an Anzahl und Größe zu. Die Stimulation mit 1 µg/ml SHMT induzierte bereits alle Marker, außer HLA-ABC und CCR7. Bei einer Stimulation mit 5 µg/ml SHMT wurde die Reifung der mDCs noch verstärkt und CCR7 leicht induziert. Durch die 0,0357 ng/ml LPS-Kontrolle wurden keine mDC-Cluster und Maturierungsmarker induziert.

Der Expressions-Unterschied der Reifemarker von unstimulierten mDCs zu SHMT stimulierten mDCs war signifikant größer als bei moDCs. SHMT induzierte viele Reifemarker auf mDCs bereits bei 1 µg/ml, moDCs benötigten für eine Reifung 5 µg/ml. Außerdem erhöhten nur mDCs die Expression von HLA-DR und CCR7, die wichtig für die Antigenpräsentation und die Migration zu peripheren Lymphknoten sind. SHMT beladene mDCs dürften durch die bessere Reifung eine vollständigere Immunfunktion besitzen, als moDCs.

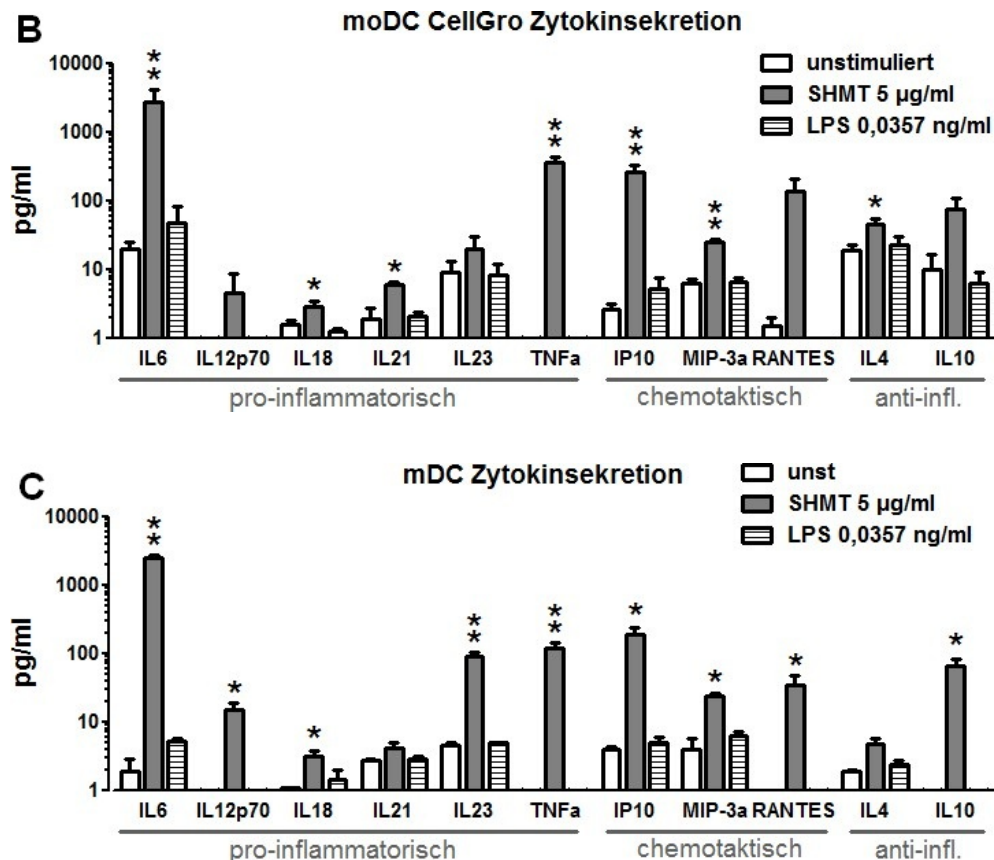
### mDCs induzierten durch SHMT eine deutlichere Zytokinantwort als moDCs

Auch in der Multiplex-ELISA Analyse zeigten SHMT stimulierte mDCs durch eine deutlichere Zytokinfreisetzung eine bessere Stimulation als moDCs. Nach der 18-stündigen Stimulation mit 5 µg/ml SHMT setzten moDCs und mDCs verschiedene Zytokine frei. Das pro-inflammatorische Interleukin IL6 wurde von beiden DC Subtypen am stärksten induziert. Außerdem sekretierten sie das Th1 induzierende Zytokine IL12p70, die pro-inflammatorischen Zytokine IL21 und TNFα und die chemotaktischen Zytokine IL-10, MIP-3a und RANTES. Die anti-inflammatorischen Zytokine IL4 und IL10 wurden nur von moDCs in CellGro (IL4) und mDCs (IL10) induziert. IL23 wurde von SHMT stimulierten mDCs induziert, jedoch nicht von moDCs.

Die verwendeten Kulturmedien RPMI10%FCS und CellGro verursachten nur geringe Unterschiede auf die Zytokinfreisetzung von moDCs. Die LPS-Kontrolle mit 0,0357 ng/ml induzierte in moDCs und mDCs keine Zytokinfreisetzung. So wurde sichergestellt, dass die geringe LPS-Kontamination in SHMT keine stimulierenden Effekte auf die DCs hatte (Abbildung 5.23).







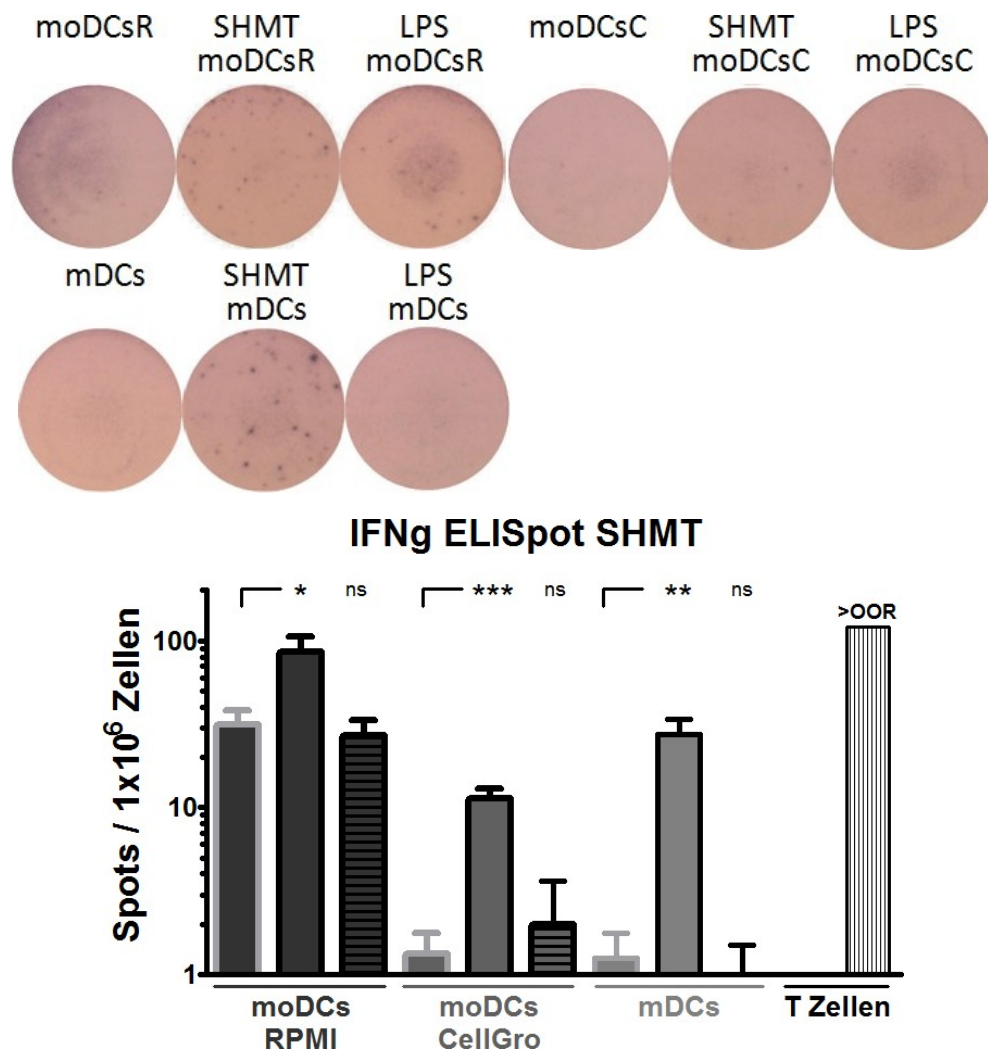
**Abbildung 5.23: Mit SHMT stimulierte moDCs und mDCs sekretierten immunomodulatorische Zytokine.** Für 18 h mit SHMT stimulierte moDCs und mDCs sekretierten sehr viel IL6, im Vergleich zu den unstimulierten DCs. Deutlich erhöht waren TNFa, IP-10 und RANTES. Die verschiedenen Medien, RPMI10%FCS und CellGro, bewirkten nur kleine Unterschiede in der moDC-Zytokinsekretion. mDCs wurden im Vergleich zu moDCs durch SHMT besser stimuliert, vor allem wegen der niedrigen Werte bei unstimulierten mDCs. Außerdem induzierten mDCs deutlich mehr IL23. Das Th1 induzierende Zytokin IL12p70 wurde durch SHMT stimulierte mDCs und in RPMI10%FCS gehaltene moDCs signifikant mehr sekretiert.

Da SHMT auf mDCs und moDCs maturierende Effekte bewies, wurden die DC Subtypen mit SHMT beladen und hinsichtlich ihres Stimulations-Vermögens für autologe T-Zellen analysiert.

### SHMT beladene moDCs und mDCs induzierten Aspergillus-spezifische T-Zellen

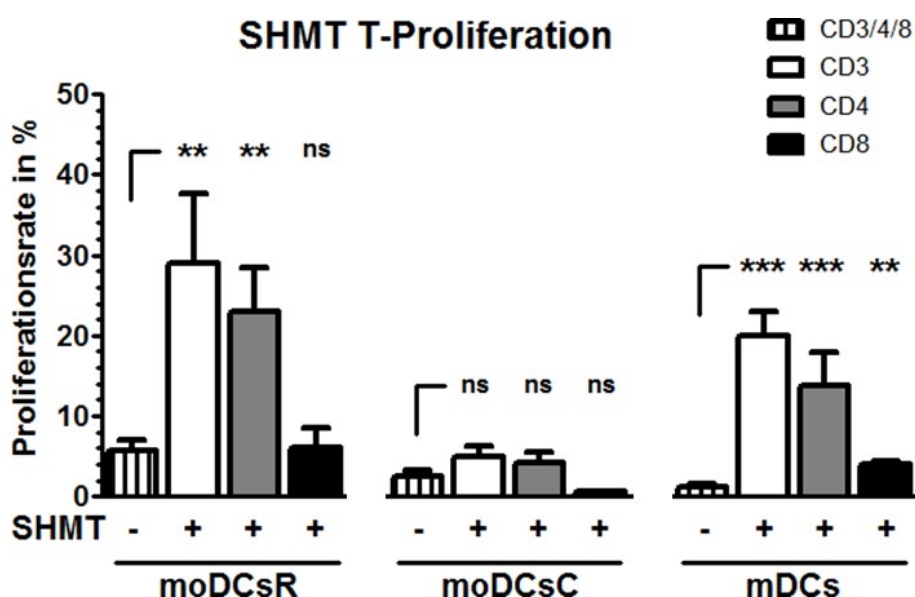
Die mit 5 µg/ml SHMT beladenen DCs wurden mit autologen T-Zellen im IFN $\gamma$ -ELISpot konfrontiert. T-Zellen, die aktivieren und IFN $\gamma$  sekretieren, erscheinen im ELISpot als dunkelvioletter Punkt. Wurde RPMI10%FCS als Kulturmedium eingesetzt, entstanden bereits bei unstimulierten moDCs dunkelviolette Spots. Diese sind als Hintergrund anzusehen,

der durch eine unspezifische Stimulation des im Medium enthaltenen FCS entstehen kann. SHMT beladene moDCs und mDCs induzierten deutlich mehr Spots als die unstimulierten DCs und die mit 0,0357 ng/ml LPS stimulierten Kontroll-DCs. Diese Spot-Induktion zeigt, dass mit SHMT stimulierte moDCs und mDCs in der Lage waren, T-Zellen zur Sekretion von IFN $\gamma$  anzuregen. Die durch SHMT beladene mDCs, induzierten IFN $\gamma$ -Spots waren im Vergleich zu moDCs sehr dunkel und etwas größer (Abbildung 5.24).



**Abbildung 5.24: SHMT beladene moDCs und mDCs induzieren eine IFN $\gamma$ -Sekretion autologer T-Zellen.** Die DCs wurden für 18 h mit 5  $\mu$ g/ml SHMT beladen und anschließend mit autologen T-Zellen im IFN $\gamma$ -ELISpot konfrontiert. In RPMI10%FCS kultivierte DCs induzierten einen vergleichsweise hohen Hintergrund, der durch SHMT jedoch deutlich übertroffen wurde. In CellGro gehaltene moDCs und mDCs induzierten wenige und mit SHMT stimuliert über zehnmals mehr IFN $\gamma$ -sekretierende T-Zellen. Die Fotos zeigen einen repräsentativen Spender, das Diagramm die Mittelwerte von 3 Spendern. T-Zellen alleine sekretierten kein IFN $\gamma$ , solche mit der Positiv-Kontrolle SEB (Staphylokokkus-Enterotoxin-B) sehr viele (> OOR, oberhalb des Detektionslimits).

Die mit 5 µg/ml SHMT beladenen DCs wurden anschließend hinsichtlich ihres Vermögens, autologe und CFSE-gefärbte T-Zellen zur Proliferation anzuregen, analysiert. Wurden SHMT beladene moDCs in RPMI10%FCS kultiviert, induzierten sie T-Zellen zur Proliferation; in CellGro-Medium konnte keine Proliferation festgestellt werden. SHMT beladene mDCs veranlassten eine etwas geringere Proliferation der T-Zellen als moDCs in RPMI10%FCS. CD4 T-Zellen proliferierten durch die Konfrontation mit SHMT beladenen RPMI10%FCS moDCs und mDCs. CD8 T-Zellen proliferierten nur in Kontakt zu SHMT beladenen mDCs und hier auch nur in sehr geringem Maße (Abbildung 5.25).



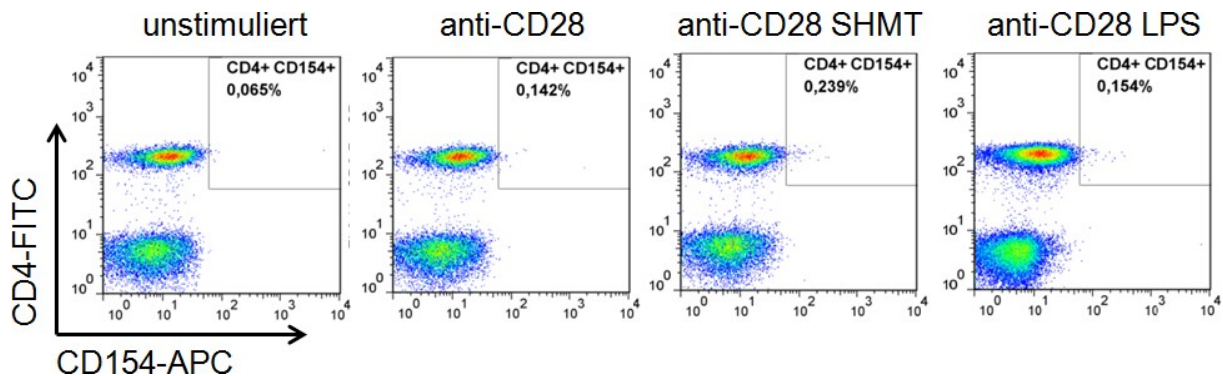
**Abbildung 5.25: SHMT beladene moDCs und mDCs induzierten die Proliferation von autologen CD4 T-Zellen.** Mit 5 µg/ml SHMT, in RPMI10%FCS kultivierte moDCs (moDCsR) induzierten mehr T-Zellen zur Proliferation als mDCs. In CellGro gehaltene moDCs (moDCsC) induzierten keine T-Zell-Proliferation. CD8 T-Zellen wurden nur von SHMT beladenen mDCs zu einer leichten Proliferation angeregt.

#### In PBMCs induzierte SHMT eine spezifische CD154-T-Zell Antwort

Die für 18 h stimulierten PBMCs wurden hinsichtlich ihrer CD154 Induktion durchflusszytometrisch analysiert. Lebende CD4-positive Zellen von 3 Spendern exprimierten im unstimulierten Ansatz zu  $0,0667\% \pm 0,0072\%$  den CD154 Marker. Mit anti-CD28 und 5 µg/ml SHMT stimuliert, induzierten sie CD154 signifikant auf  $0,2713\% \pm 0,3201\%$ . Die mit anti-CD28 Antikörpern unspezifisch stimulierten PBMCs hatten im Mittel  $0,1597\% \pm$



0,0214% CD4/CD154-positive Zellen. Die LPS-Kontrolle mit der SHMT kontaminierten Konzentration von 0,0357 ng/ml wurde auch mit anti-CD28 stimuliert und befand sich mit  $0,1605\% \pm 0,0065\%$  CD4/CD154-positiven Zellen im Bereich des anti-CD28 Hintergrunds. Die Induktion der CD154-positiven Zellen durch SHMT-Stimulation wird damit nicht durch die leichte LPS-Kontamination verursacht, sondern durch SHMT selbst (Abbildung 5.26).



**Abbildung 5.26: SHMT induzierte Aspergillus-spezifische T-Zellen.** PBMCs wurden mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SHMT und einem anti-CD28 Antikörper zur Signalverstärkung, stimuliert und im Anschluss durchflusszytometrisch vermessen. Die Punktdiagramme eines repräsentativen Spenders zeigen, dass nur wenige T-Zellen antigenspezifisch sind. SHMT induzierte im Vergleich zu anti-CD28 stimulierten und unstimulierten PBMCs auf einigen CD4-positiven T-Zellen die Expression von CD154.

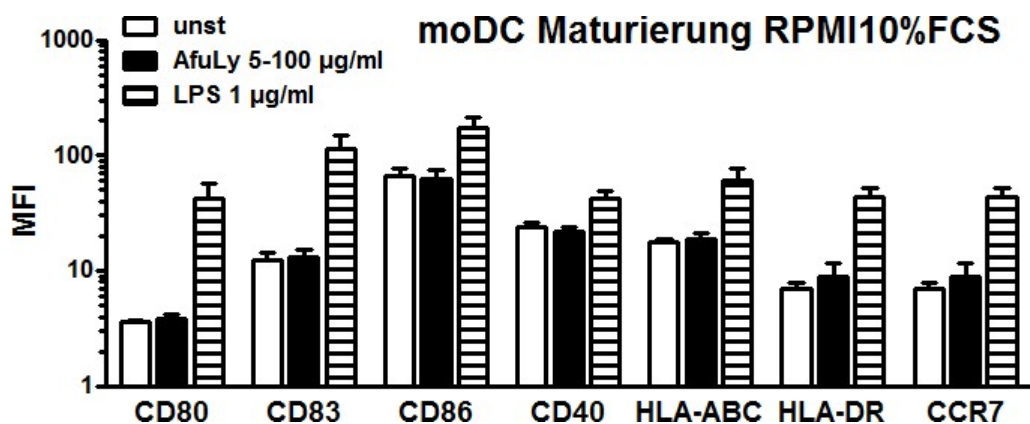
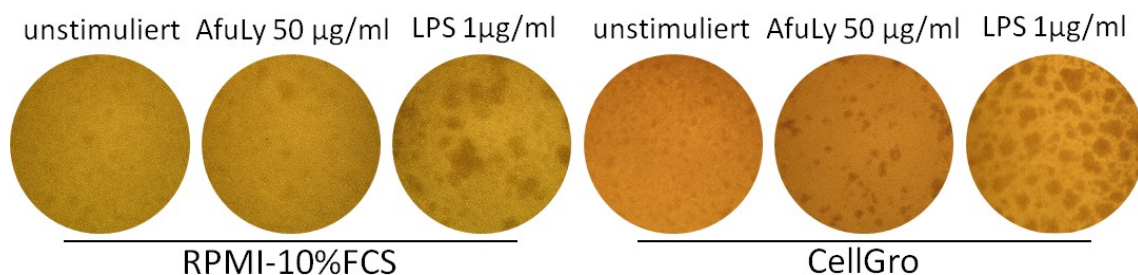
SHMT beladene DCs zeigten im Vergleich zu CcpA beladenen DCs eine etwas niedrigere Induktion von IFN $\gamma$  sekretierenden T-Zellen (ELISpot) und CD154 exprimierenden CD4 T-Zellen (CD154-Analyse). T-Zellen wurden durch SHMT beladene DCs in geringerem Maße zur Proliferation angeregt als durch CcpA beladene DCs. Beide Proteine induzierten auf moDCs und mDCs die Expression von HLA-DR, weshalb eine Antigenpräsentation der prozessierten Proteine über MHC Klasse II Moleküle wahrscheinlich ist. Unterstützt wird diese Annahme von den Proliferations-Experimenten. Hier proliferierten durch beide Proteine deutlich mehr CD4 als CD8 T-Zellen. CD4 T-Zellen sind MHC Klasse II restringt und können durch die hohe Expression an MHC Klasse II Molekülen auf SHMT und CcpA stimulierten DCs zur Proliferation werden. Der homig-Rezeptor CCR7 wurde durch CcpA deutlich stärker induziert, als durch SHMT. Deshalb wird eine unterschiedlich gute Migration der jeweiligen DCs zu peripheren Lymphknoten vermutet.

### 5.3.3 Aspergillus Lysat reife DCs nicht, aktivierte jedoch spezifische T-Zellen

Die Firma Miltenyi Biotec vertreibt ein Lysat von Aspergillus-Mycel, das auf die Stimulation von Aspergillus-spezifischen T-Zellen abgestimmt ist. Das lysierte Mycel dürfte eine Menge an unterschiedlichen Pilzbestandteilen beinhalten, die im Produktdatenblatt aber nicht näher erläutert sind. Dieses Produkt ist insbesondere aus dem Grund interessant, weil es auch als GMP konform erhältlich ist.

#### moDCs und mDCs maturierten durch eine Stimulation mit Aspergillus Lysat nicht

Die DCs wurden mit 50 µg/ml Aspergillus Lysat laut Herstellerangaben stimuliert. Nach 18 h bildeten in CellGro kultivierte moDCs wenige und kleine Zellhaufen. In RPMI10%FCS gehaltene moDCs zeigten keine Zell-Cluster. Die Positiv-Kontrolle LPS rief viele und große Cluster hervor. Das niedrige Clustern durch die Stimulation mit Aspergillus Lysat, ließ eine schwache Maturierung vermuten. Die durchflusszytometrisch analysierten Maturierungsmarker wurden auf moDCs in RPMI10%FCS und CellGro nicht induziert. Obwohl in CellGro kultivierten moDCs leicht clusterten, regulierten sie keinen der Maturierungsmarker. Die Positiv-Kontrolle LPS konnte jedoch eine Reifung auslösen (Abbildung 5.27).



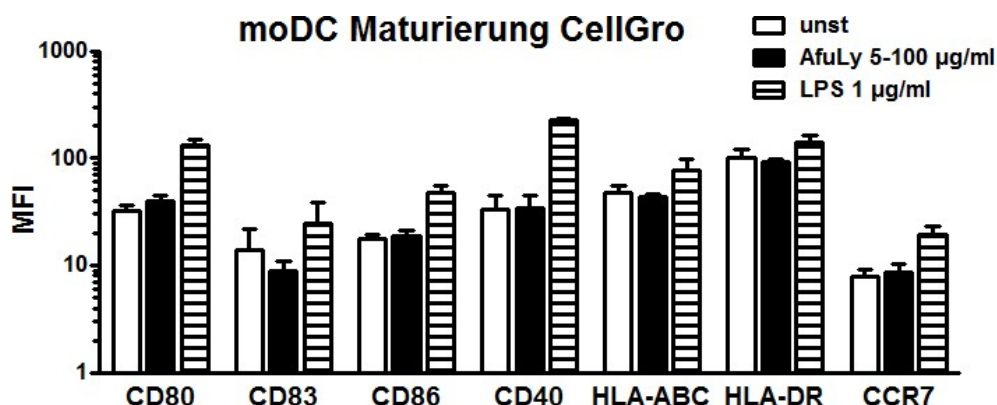


Abbildung 5.27: moDCs reifen durch Stimulation mit Aspergillus Lysat (AfuLy) nicht. Im Lichtmikroskop zeigten nur in CellGro kultivierte moDCs kleine Zell-Cluster durch AfuLy. moDCs in RPMI10%FCS und CellGro maturierten durch AfuLy nicht. Die Positiv-Kontrolle LPS induzierte DC-Cluster und Maturierungsmarker.

mDCs bildeten durch die 18 h Stimulation mit Aspergillus Lysat keine Cluster, die Zell-Konfluenz glich der von unstimulierten mDCs. Die vermutlich schwache Maturierung wurde durch die durchflusszytometrische Analyse der Maturierung bestätigt. mDCs induzierten durch die Stimulation mit Aspergillus Lysat keine Maturierungsmarker. Die Positiv-Kontrolle LPS ließ mDCs wie gewohnt clustern und maturieren (Abbildung 5.28).

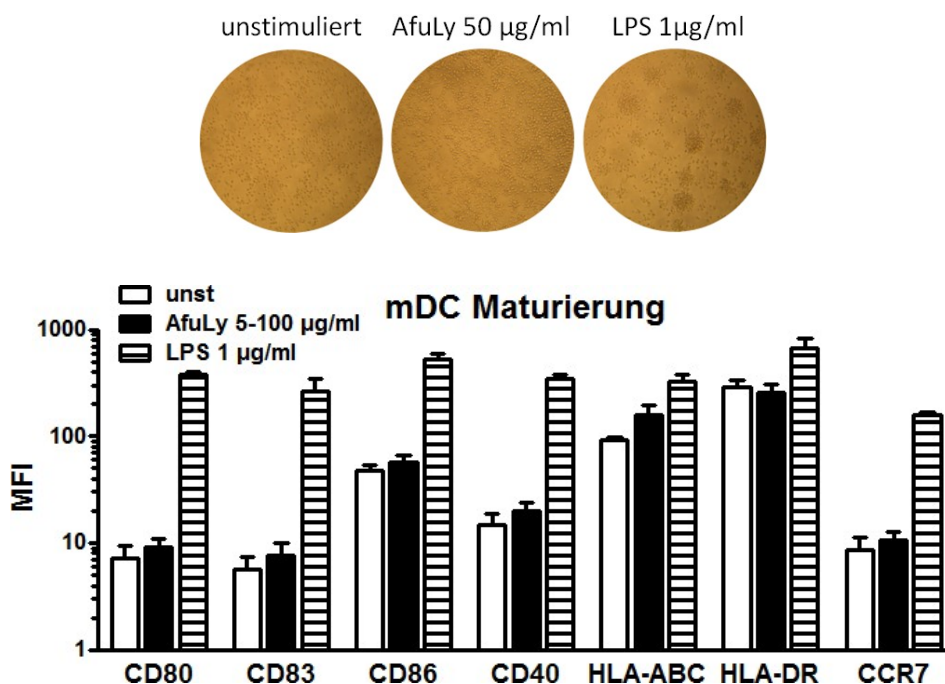
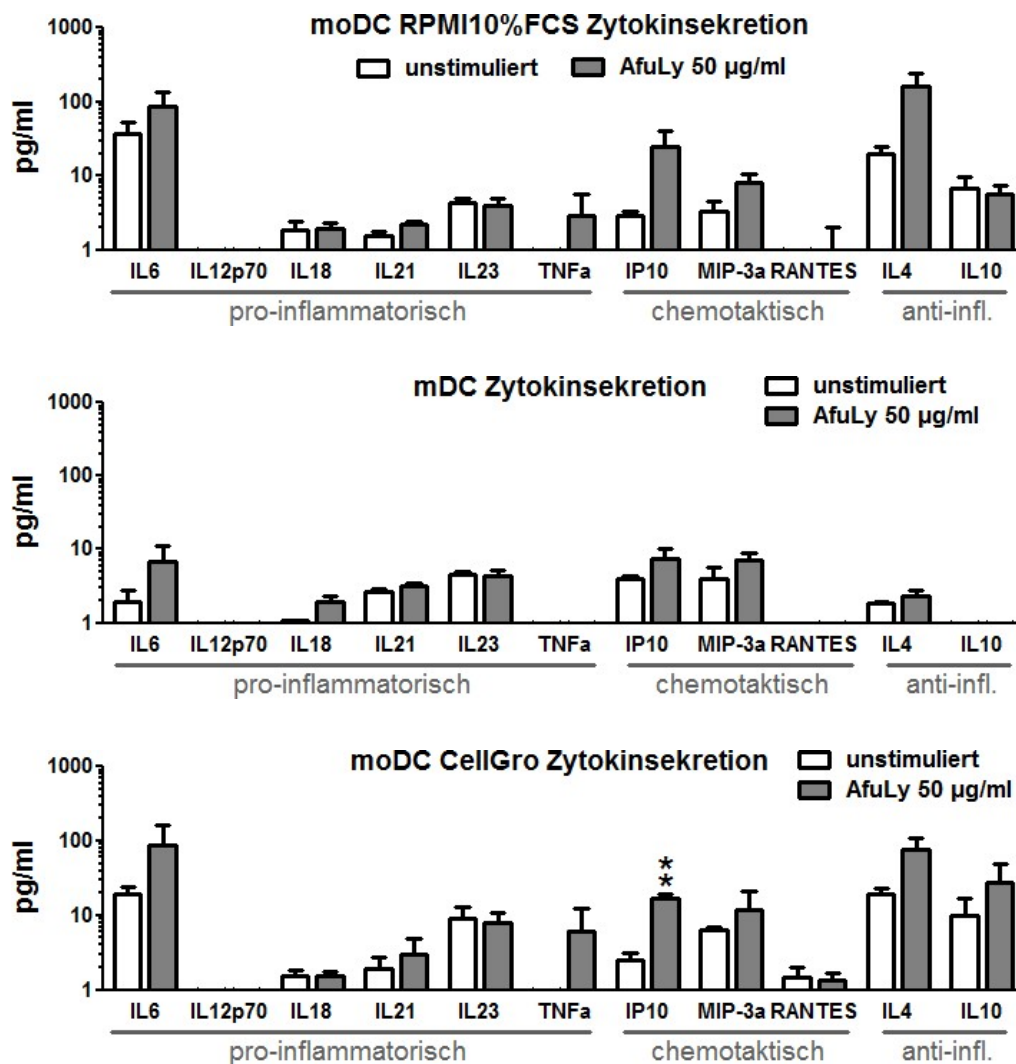


Abbildung 5.28: Aspergillus Lysat (AfuLy) löste bei mDCs keine Maturierung aus. Im Lichtmikroskop konnten keine mDC-Cluster durch AfuLy beobachtet werden. Auch die Maturierungsmarker wurden durch AfuLy auf mDCs nicht erhöht. Die Positiv-Kontrolle LPS induzierte mDC-Cluster und Maturierungsmarker.

**Aspergillus Lysat induzierte in moDCs tendenziell und in mDCs fast keine Zytokine**

Die geringe Maturierung von Aspergillus Lysat stimulierten, in CellGro gehaltenen moDCs wurde durch eine niedrige Zytokinsekretion begleitet. Das chemotaktische Zytokin IP-10 wurde als einziges Zytokin signifikant induziert. Tendenziell waren die pro-inflammatorischen Zytokine IL6, TNF $\alpha$  und das anti-inflammatorische Zytokin IL4 induziert. In RPMI10%FCS kultivierte moDCs induzierten tendenziell IL6, IP-10 und IL4 mDCs induzierten durch Aspergillus Lysat nahezu keine Zytokine. Lediglich das pro-inflammatorische IL6 wurde tendenziell etwas erhöht (Abbildung 5.29).

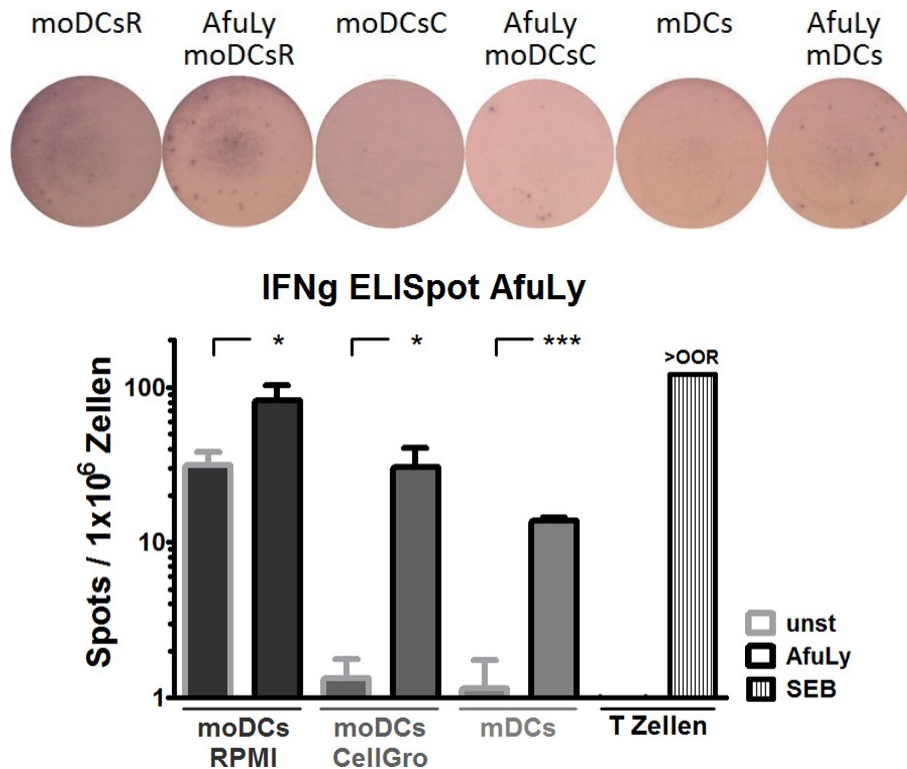


**Abbildung 5.29: Aspergillus Lysat (AfuLy) induzierte nur eine tendenziell erhöhte Zytokinsekretion von moDCs und mDCs.** In CellGro gehaltene moDCs induzierten signifikant IP-10 und tendenziell IL6, TNF $\alpha$  und IL4. In RPMI10&FCS kultivierte moDCs induzierten tendenziell IL-10 und IL4. mDCs induzierten durch Aspergillus Lysat (AfuLy) nur das pro-inflammatorische Zytokin IL6 tendenziell.

Die niedrige Zytokinsekretion von Aspergillus Lysat stimulierten moDCs und mDCs wurde, wie durch die geringe Maturierung vermutet, in den Multiplex-ELISA Analysen bestätigt. Unreife DCs sind nicht in der Lage ihre Zytokinsekretion auf eine bedeutsame Menge anzuheben. Da moDCs und mDCs durch Aspergillus wenig maturierten und wenige Zytokine sekretierten, wurden sie nicht hinsichtlich ihrer T-Zell-Aktivierung analysiert.

**Lysat beladene moDCs und mDCs induzierten eine moderate Aspergillus-spezifische T-Zell Antwort**

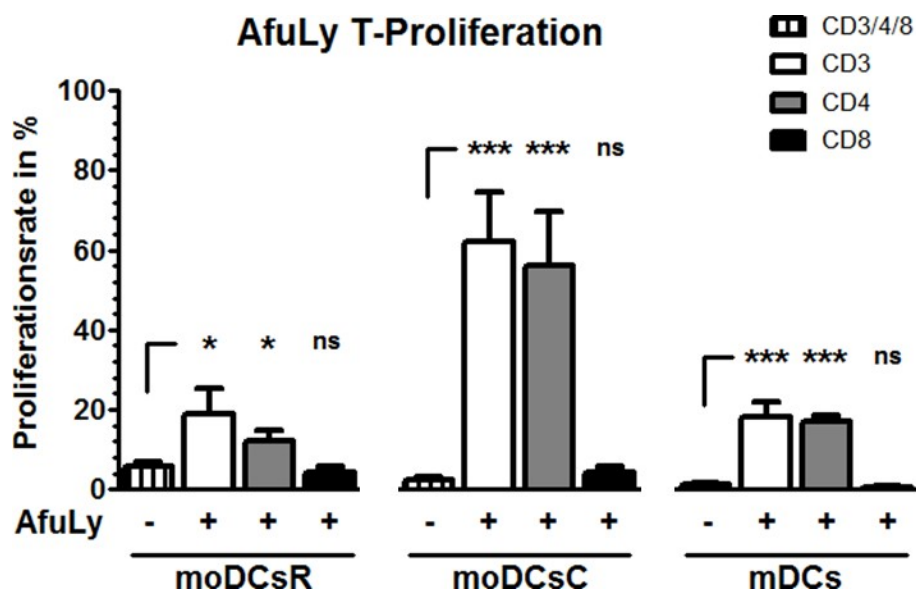
Für 18 Stunden mit und ohne Aspergillus Lysat (50 µg/ml) stimulierte moDCs und mDCs wurden im IFNγ ELISpot mit autologen T-Zellen konfrontiert. In RPMI10%FCS kultivierte moDCs induzierten bereits ohne Stimulus einige Spots, die aber mit Aspergillus Lysat Stimulation signifikant zunahm. Der Hintergrund von unstimulierten moDCs und mDCs in CellGro war niedrig. Durch Aspergillus Lysat Stimulation induzierten diese DCs signifikant mehr Spots (Abbildung 5.30).



**Abbildung 5.30: Aspergillus Lysat (AfuLy) beladene moDCs und mDCs aktivieren autologe T-Zellen zur IFNγ Sekretion.** Die Erhöhung der Spot-Anzahl war durch AfuLy beladene moDCs und mDCs gegeben, im Vergleich zu unstimulierten DCs. Unstimulierte T-Zellen sekretierten kein IFNγ, mit SEB (Staphylokokken-Enterotoxin-B) stimulierte sehr viel (über Detektionslimit, >OOR).

Obwohl moDCs und mDCs durch die Stimulation mit *Aspergillus* Lysat nicht maturierten und nur wenige Zytokine mit geringer Konzentration induzierten, aktivierten sie im ELISpot autologe T-Zellen zur IFN $\gamma$  Sekretion. Im Vergleich zu SHMT-DCs und CcpA-DCs fiel die T-Zell Aktivierung durch AfuLy-DCs im ELISpot geringer aus.

Anschließend wurden die mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Aspergillus* Lysat (AfuLy) beladenen DCs mit autologen, CFSE gefärbten T-Zellen konfrontiert und deren Proliferation analysiert. Mit AfuLy beladen, zeigten in CellGro kultivierte moDCs die höchste Proliferationsrate der CD3 T-Zellen im Vergleich zu in RPMI10%FCS gehaltenen moDCs und mDCs. Durch alle AfuLy-DCs proliferierte ausschließlich die CD4 T-Zellpopulation und CD8 T-Zellen teilten sich nicht (Abbildung 5.31).



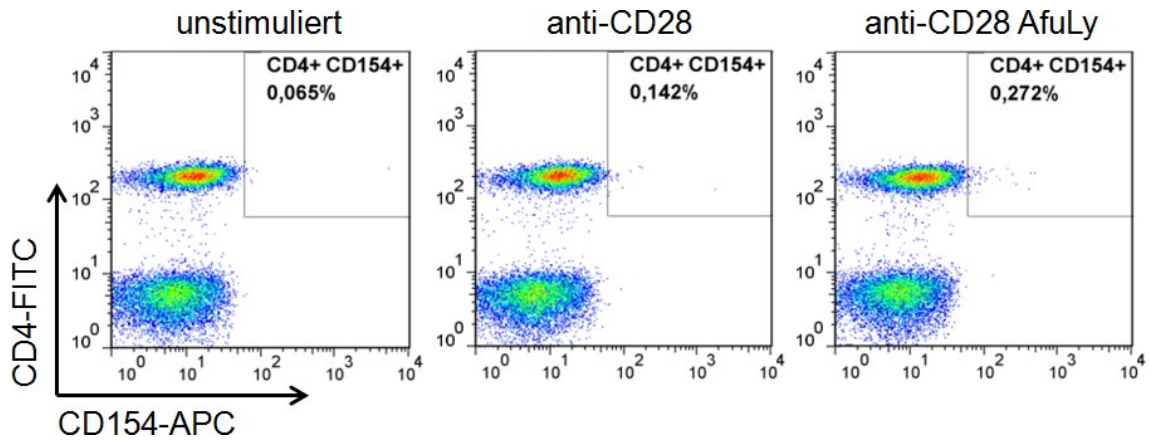
**Abbildung 5.31:** Mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Aspergillus* Lysat (AfuLy) beladene DCs proliferierten ausschließlich die CD4 T-Zellpopulation. In CellGro gehaltene moDCs (moDCsC) induzierten durch AfuLy die höchste T-Zellproliferationsrate, im Vergleich zu mDCs und in RPMI10%FCS gehaltene moDCs (moDCsR). CD8 T-Zellen proliferierten durch AfuLy beladenen DCs nicht.

#### In PBMCs induzierte das *Aspergillus* Lysat *Aspergillus*-spezifische CD154 T-Zellen

Die bereits publizierte Induktion des CD154 Oberflächenmarkers auf CD4-positiven Zellen in PBMCs durch *Aspergillus* Lysat [Bacher et al. (2014a)] konnte durch eigene Experimente bestätigt werden. CD4-Zellen von unstimulierten PBMCs waren im Mittel zu 0,0667%  $\pm$  0,0072% CD154-positiv. Bei Stimulation mit *Aspergillus* Lysat und dem Signalverstärker



anti-CD28, erhöhte sich dieser Anteil auf  $0,2958\% \pm 0,0591\%$ . Der unspezifische anti-CD28 Hintergrund betrug  $0,1587\% \pm 0,0214\%$  (Abbildung 5.32).



**Abbildung 5.32: Aspergillus Lysat (AfuLy) induzierte Aspergillus-spezifische T-Zellen.** PBMCs wurden mit  $50 \mu\text{g/ml}$  AfuLy und einem anti-CD28 Antikörper zur Signalverstärkung, stimuliert und im Anschluss durchflusszytometrisch vermessen. Die Punktdiagramme eines repräsentativen Spenders zeigen, dass nur wenige T-Zellen anti-genspezifisch sind. AfuLy induzierte im Vergleich zu anti-CD28 stimulierten und unstimulierten PBMCs auf einigen CD4-positiven T-Zellen die Expression von CD154.

Aspergillus Lysat (AfuLy) rief bei moDCs und mDCs keine Maturierung und die Sekretion weniger Zytokine in geringer Konzentration hervor. Dennoch waren diese AfuLy beladene DCs in der Lage, wenige T-Zellen zur IFN $\gamma$  Sekretion (ELISpot), zur T-Zellproliferation und zur CD154 Induktion anzuregen.

Im Vergleich zu CcpA und SHMT fiel die Immunreaktion der DCs auf AfuLy weitaus geringer aus. Im ELISpot reagierten weniger T-Zellen mit einer IFN $\gamma$  Sekretion auf AfuLy-DCs als auf CcpA- und SHMT-DCs. Die CD154 Induktion war dagegen durch AfuLy am stärksten.

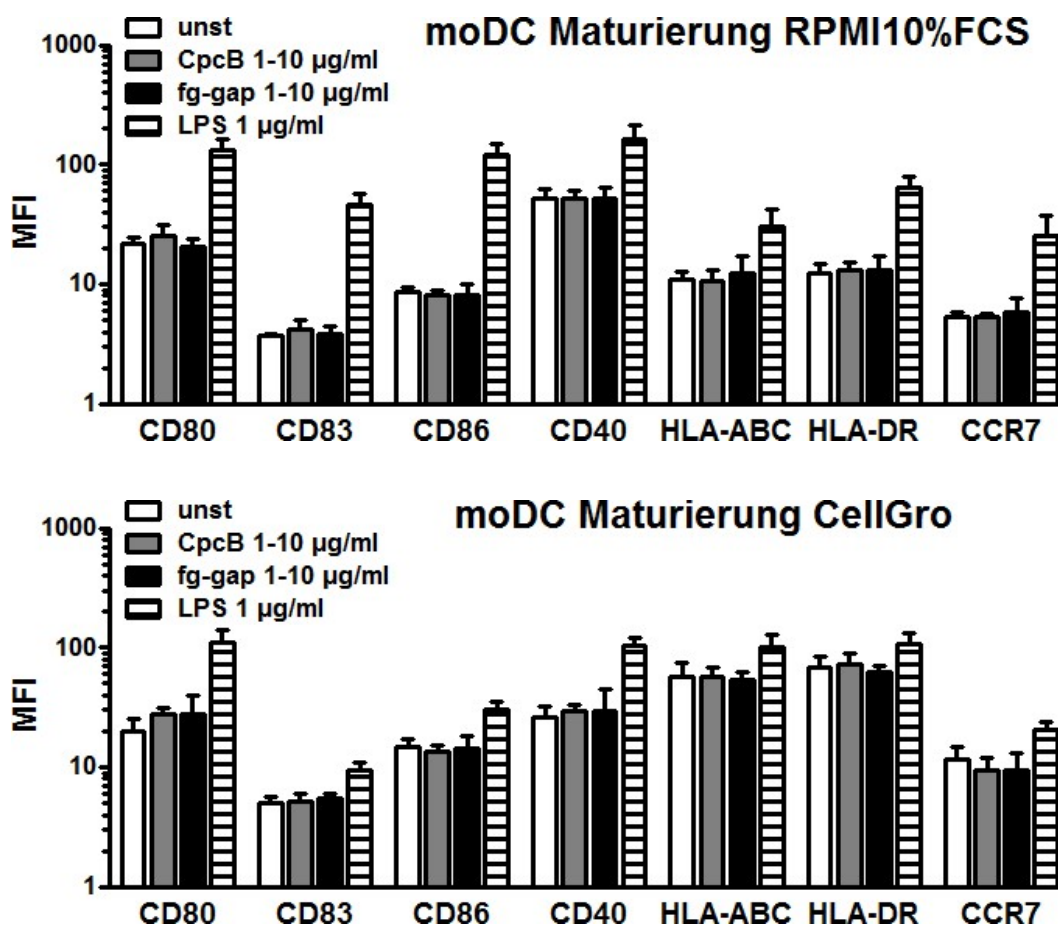
#### 5.3.4 CpcB und fg-gap wirkten auf moDCs und mDCs nicht immunogen

Die beiden rekombinant exprimierten Aspergillus-Proteine CpcB und fg-gap wurden von Kooperationspartnern aus dem Hans-Knöll-Institut in Jena bereitgestellt. Sie wurden, ebenso wie SHMT, durch das Screening von Patienten-Seren nach anti-Aspergillus Antikörpern entdeckt. Durch die vollzogene Immunantwort mit einhergehender Bildung spezifischer Antikörper, wurden diese Proteine für die vorliegende Arbeit interessant. fg-gap

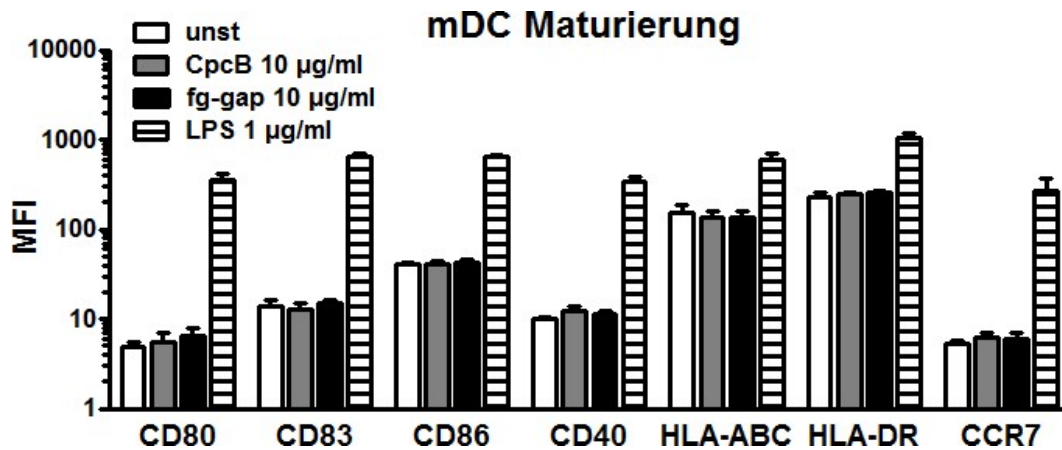
wurde durch den Hefepilz *Pichia pastoris* rekombinant exprimiert und SHMT durch *E. coli*. Die Endotoxin-Messung ergab für beide Proteine so niedrige Werte, dass keine Aufreinigung nötig war.

### CpcB und fg-gap konnten moDCs und mDCs nicht maturieren

Die für 18 Stunden mit 1-10 µg/ml CpcB oder fg-gap stimulierten moDCs und mDCs wurden mit dem Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Maturierungsmarker-Expression analysiert. In RPMI10%FCS und CellGro kultivierte moDCs und die in CellGro gehaltenen mDCs induzierten durch Stimulation mit CpcB oder fg-gap keine der analysierten Maturierungsmarker, wohingegen die Positiv-Kontrolle LPS eine deutliche Maturierung von moDCs und mDCs auslöste (Abbildung 5.33).



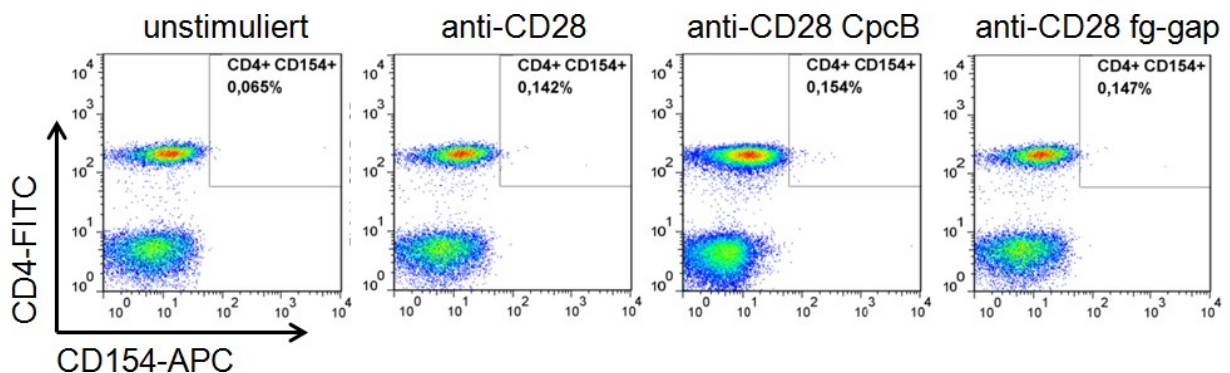




**Abbildung 5.33: CpcB und fg-gap maturieren moDCs und mDCs nicht.** Für 18 h mit CpcB und fg-gap stimulierte moDCs und mDCs exprimierten dasselbe Maturierungsmarker-Profil wie unstimulierte moDCs und mDCs. Die Positiv-Kontrolle LPS induzierte eine deutliche Maturierung beider DC Subtypen.

#### In PBMCs induzierten CpcB und fg-gap keine spezifische CD154-positive CD4-Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse von CD154 exprimierenden CD4-positiven Zellen der 18 h stimulierten PBMCs zeigte keine immunogene Wirkung von CpcB und fg-gap (Abbildung 5.34).



**Abbildung 5.34: CpcB und fg-gap induzierten keine Aspergillus-spezifische T-Zellen.** PBMCs eines repräsentativen Spenders wurden mit 5 µg/ml CpcB, 5 µg/ml fg-gap und einem anti-CD28 Antikörper zur Signalverstärkung stimuliert und im Anschluss durchflusszytometrisch vermessen. Die Punktdiagramme eines repräsentativen Spenders zeigen, dass nur wenige T-Zellen antigenspezifisch sind. CpcB und fg-gap induzierten im Vergleich zu anti-CD28 stimulierten und unstimulierten PBMCs kein CD154 auf CD4-positiven T-Zellen.

Mit CpcB und anti-CD28 stimulierte PBMCs waren im Mittel zu  $0,1735\% \pm 0,0095\%$  CD154- und CD4-positiv. Mit dem Signalverstärker anti-CD28 und fg-gap stimulierte PBMCs waren zu  $0,1745\% \pm 0,0175\%$  CD154 und CD4-positiv. Der unspezifische Hintergrund der anti-CD28 Stimulation lag bei  $0,1587\% \pm 0,0214\%$  CD154/CD4-positiven Zellen. Der prozentuale Anteil an CD154/CD4-positiven Zellen wurde durch CpcB und fg-gap im Vergleich zum anti-CD28-Hintergrund nicht erhöht.

Die Proteine CpcB und fg-gap waren weder in der Lage moDCs und mDCs zur Maturation anzuregen, noch in PBMCs Aspergillus-spezifische CD154-positive T-Zellen zu induzieren. Obwohl in Patientenseren spezifische Antikörper detektiert wurden [Teutschbein et al. (2015)], sollten diese Proteine aufgrund ihrer nicht immunogenen Wirkung auf moDCs, mDCs und PBMCs vom Gebrauch für antigene Immunmodulationen von DCs ausgeschlossen werden.

## 5.4 Immunmodulation von DCs

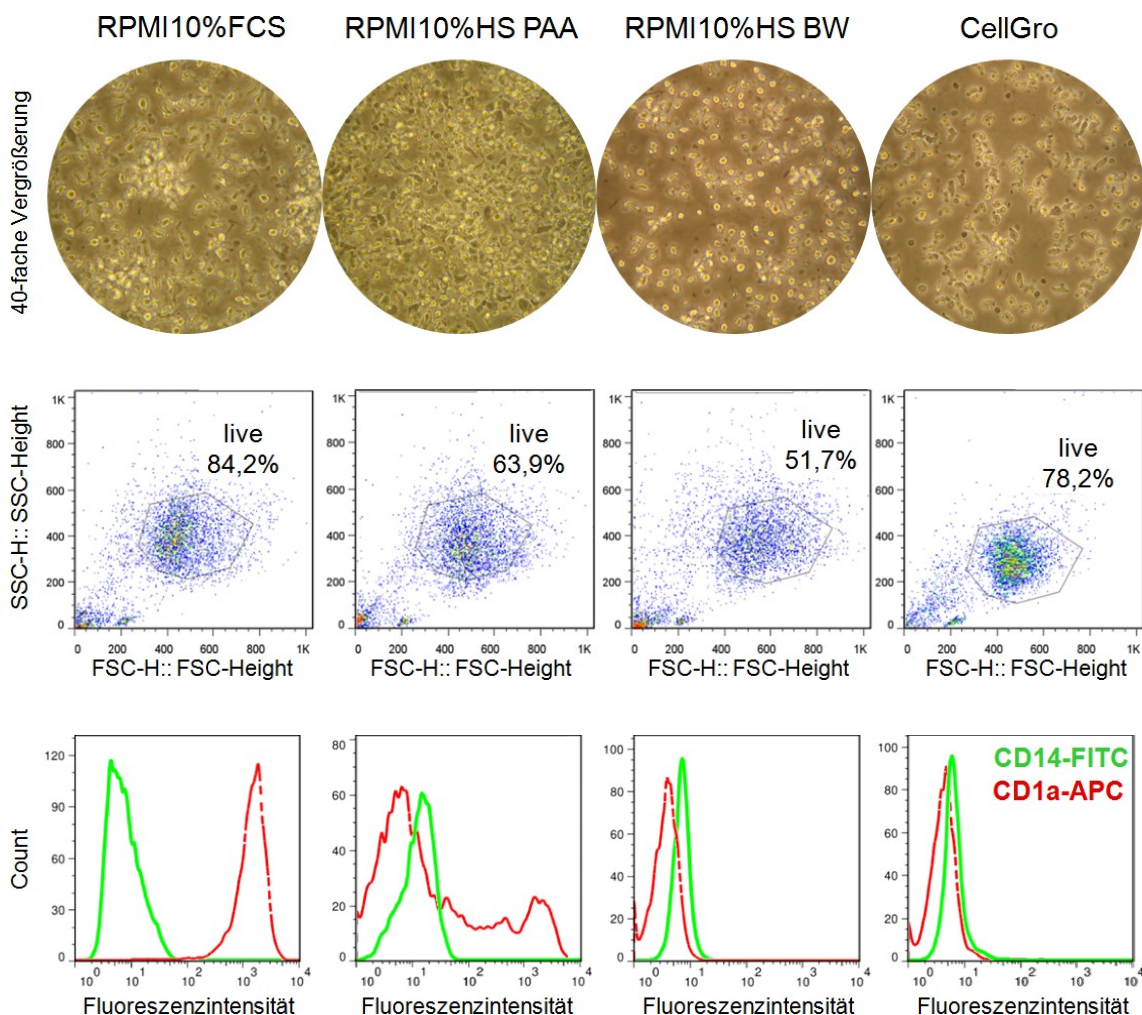
Die getesteten Parameter sollten eine mögliche anti-Aspergillus DC-Immuntherapie an verschiedenen Punkten verbessern. Als Kulturmedium diente bislang immer RPMI mit 10% FCS, welches nicht GMP konform ist und deshalb durch CellGro ausgetauscht wurde. moDCs zeigten in den beiden Medien unterschiedliche Differenzierungsverhalten und leichte Unterschiede in ihrer Reaktion auf Aspergillus-Antigene (Abschnitt 5.3). Durch die Zugabe von Hyaluronsäure sollte die Vitalität der Zellen gesteigert werden. DC-Funktionen können durch einzelne Proteine oft nicht optimal stimuliert werden (Abschnitt 5.3), zur Unterstützung wurden Rezeptor-Agonisten titriert. DCs wurden mit verschiedenen konzentrierten Rezeptor-Agonisten stimuliert, um für den adjuvanten Effekt einen geringe Maturation hervorzurufen. Für eine spätere Immuntherapie sind Restimulationen mit antigenbeladenen DCs nötig, weshalb die Zellen möglichst verlustfrei an Vitalität und Immunogenität gelagert werden müssen. Diese anspruchsvolle Lagerung konnte für moDCs mit dem Einfriermedium CryoStor der Firma Bio Life Solutions ermöglicht werden.

### 5.4.1 Medien-abhängige Unterschiede der moDC Differenzierung

Die herkömmliche Differenzierung von moDCs aus Monozyten in Kulturmedium mit FCS ist aufgrund dem zugesetzten tierischem Serum problematisch für ein GMP konformes Arbeiten. Tierische und humane Fremdproteine bergen das Risiko unspezifische Immunreaktion zu induzieren und infektiöse Pathogene oder Prionen zu übertragen [Mackensen et al. (2000); Selvaggi et al. (1997)]. Autologes Plasma kann zirkulierende, Tumor-induzierende Faktoren enthalten [Yang L (2004)]. Aus diesen Gründen wurde eine vergleichende Differenzierung von moDCs mit herkömmlichem RPMI10%FCS, RPMI10%HS PAA/BW (Humanserum von PAA oder Biowest) und serumfreiem CellGro durchgeführt.

In RPMI10%FCS differenzierte moDCs zeigten eine semi-adhärenente Konfluenz mit dendritischer Zellform bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Im FSC-SSC-Diagramm einer durchflusszytometrischen Messung bildeten sie eine einheitliche Population mit 84,2% vitalen Zellen. CD14 wurde für moDCs typisch, am fünften Tag nicht mehr exprimiert, währenddessen CD1a exprimiert wurde. Mit humanem Serum in RPMI differenzierte moDCs waren zellmorphologisch eher abgerundet (Biowest) oder verkrümmt (PAA). Die Zellvitalität war prozentual niedriger als bei in RPMI10%FCS differenzierten moDCs. Insbe-

sondere exprimierten RPMI10%HS moDCs den moDC-Marker CD1a nicht. In CellGro differenzierte moDCs ähnelten zellmorphologisch und in ihrer prozentualen Vitalität den in RPMI10%FCS moDCs. Allerdings wurde CD1a nur von einem Teil der CellGro moDCs exprimiert und CD14 nicht vollständig herunter reguliert (Abbildung 5.35).



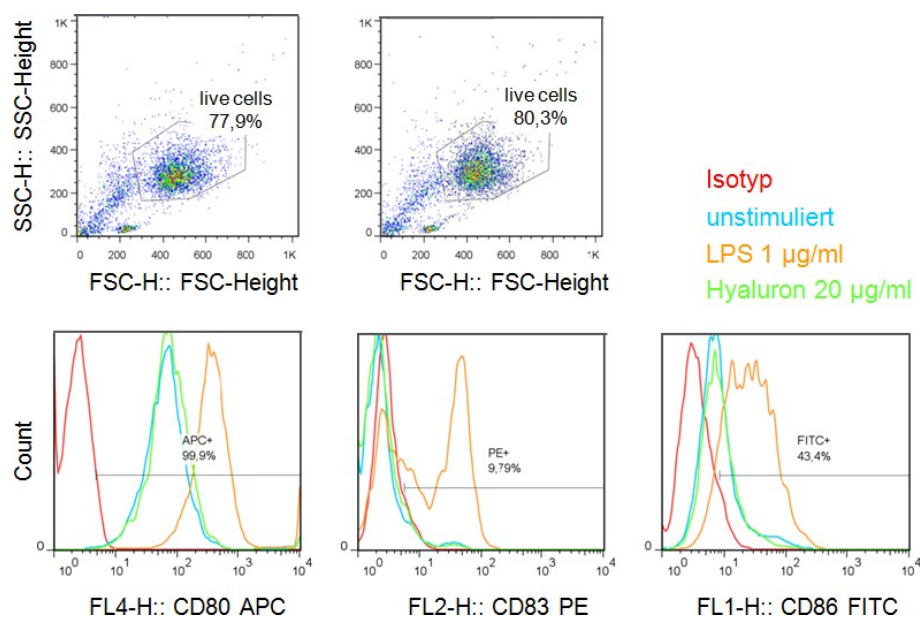
**Abbildung 5.35: moDCs differenzieren in verschiedenen Kulturmedien unterschiedlich.** Mit RPMI10%FCS differenzierte moDCs zeigten die typischen moDC-Merkmale, wie die dendritische Zellmorphologie, eine gute Vitalität und die Expression von CD1a, währenddessen CD14 nicht exprimiert ist. Mit RPMI10%HS (Humanserum von PAA oder Biowest) differenzierte moDCs waren zellmorphologisch wenig dendritisch, hatten eine geringere Vitalität und exprimierten kein CD1a. CellGro induzierte eine dendritische Zellmorphologie mit guter Vitalität und einer teilweisen Expression von CD1a.

Aufgrund der fehlenden CD1a-Expression wurden mit Humanserum differenzierte moDCs von weiteren Experimenten ausgeschlossen. In CellGro differenzierte moDCs experi-

mierten zum Teil CD1a und wurden in den Protein-Stimulationen (Abschnitt 5.3) mit RPMI10%FCS differenzierten moDCs verglichen.

### 5.4.2 Hyaluronsäure steigerte die DC Vitalität und Reifung nicht eindeutig

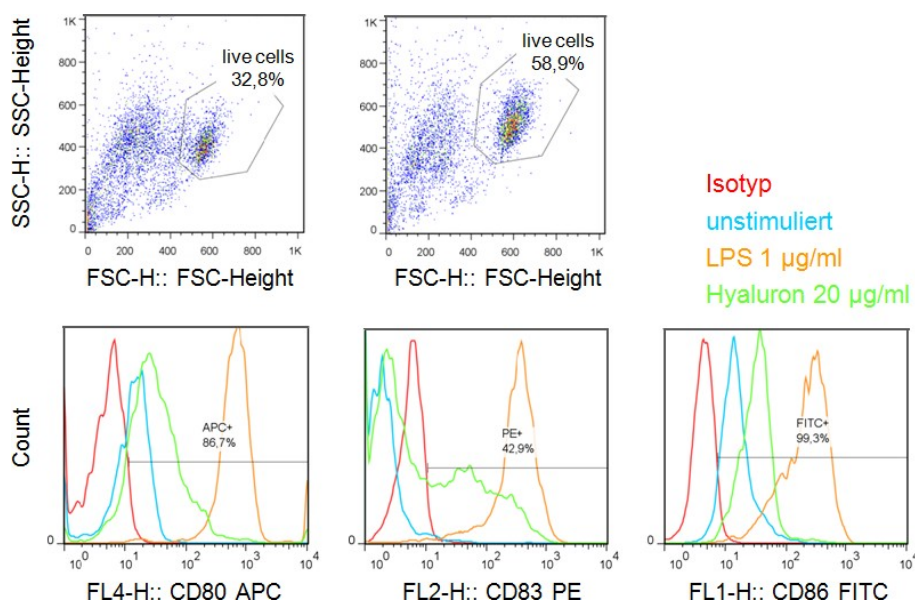
Hyaluron ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und ist beteiligt an der Gewebe-Hydratisierung, der Gelenkschmierung und an Immunregulationen [reviewed in Jiang et al. (2011)]. Während einer Gewebeerletzung und der Wundheilung wird Hyaluron produziert und durch Enzyme sowie reaktiven Sauerstoffspezies fragmentiert. Je nach Fragmentgröße ist Hyaluron in der Lage verschiedene Immunreaktionen hervorzurufen [reviewed in Stern et al. (2006)]. Hyaluron-Oligosaccharide können murine, aus Knochenmark differenzierte dendritische Zellen und humane moDCs über TLR4 zur Reifung stimulieren [Termeer et al. (2000, 2002)]. Zudem induzierten murine Knochenmarks-DCs unter Einfluss von Hyaluron eine bessere T-Zellproliferation durch eine verbesserte Antigenpräsentation [Do et al. (2004)]. Durch diese publizierte Beobachtungen wurde Hyaluron hinsichtlich einer verbesserten Vitalität und Reifung der verwendeten DCs getestet (Abbildung 5.36).



**Abbildung 5.36: Hyaluron verbesserte die Vitalität und die Reifung der moDCs nicht.** Gezeigt ist ein repräsentativer Spender von insgesamt 3 analysierten Spendern.

moDCs zeigten durch die Zugabe von 20 µg/ml Hyaluron (Sigma) für 24 h keine Unterschiede zu unstimulierten moDCs. Die Vitalität unstimulierter und mit Hyaluron stimulierter moDCs unterschied sich mit  $80,3\% \pm 6,9\%$  und  $82,1\% \pm 3,4\%$  nicht. Die Maturierungsmarker CD80, CD83 und CD86 konnten durch 1 µg/ml LPS induziert werden. Hyaluron rief auf moDCs dieselbe Markerexpression wie auf unstimulierten moDCs hervor.

Für mDCs konnten keine positiven Effekte auf die Vitalität oder die Reifung durch Hyaluron bewirkt werden. Bis auf einen von insgesamt vier Spendern, waren keine Unterschiede zwischen mit Hyaluron stimulierten und unstimulierten mDCs erkennbar. Vital waren  $31,9\% \pm 5,7\%$  der unstimulierten mDCs und  $34,1\% \pm 4,3\%$  der mit Hyaluron stimulierten mDCs. Die Expression der Maturierungsmarker CD80, CD83 und CD86 konnte durch die Positiv-Kontrolle LPS deutlich erhöht werden. Die Hyaluron stimulierten mDCs exprimierten das gleiche Markerprofil wie unstimulierte mDCs. Abbildung 5.37 zeigt den Spender, der mit erhöhter Vitalität und Reifung auf die Hyaluron-Stimulation reagierte.



**Abbildung 5.37: Hyaluron verbesserte die Vitalität und Reifung von nur einem mDC-Spender.** Diese Verbesserung konnte durch 3 weitere Stimulations-Experimente nicht bestätigt werden.

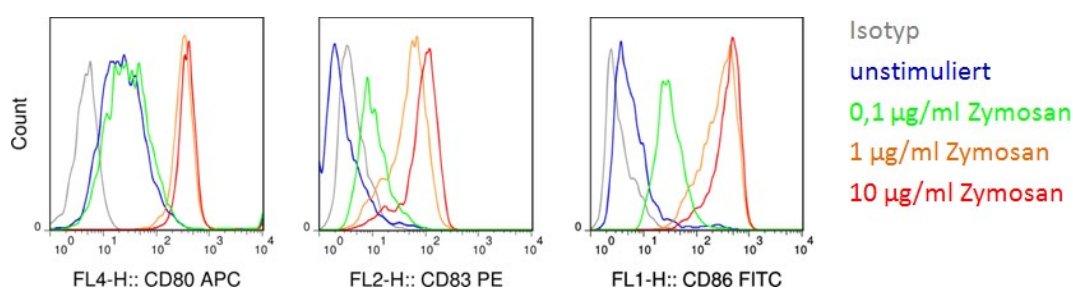
Die knapp um die Hälfte verbesserte Vitalität und leichte Erhöhung der Maturierungsmarker-Expression konnte durch kein weiteres Stimulations-Experiment bestätigt werden. Aufgrund unveränderter Vitalität und Reifung der moDCs und mDCs fand Hyaluron keine Verwendung in Antigenstimulations-Experimenten.



### 5.4.3 Rezeptor-Agonisten zur Unterstützung von DC-Funktionen

Einzelne Proteinantigene können DCs oft nicht zu einer vollständigen Immunfunktion stimulieren. Zudem kann es sein, dass diese DCs nicht die gewünschte T-Zell Population aktivieren. Zur Erfüllung der Anforderungen wurden Rezeptor-Agonisten gewählt, die dieselben Rezeptoren wie *Aspergillus* binden. Die einzusetzende Konzentration wurde so austitriert, dass eine leichte Maturierung von moDCs erkennbar war. Diese Konzentration soll gewährleisten, dass DCs ihre Immunfunktionen hauptsächlich auf stimulierende Antigen abstimmen und diese durch Rezeptor-Agonisten verstärkt und in die gewünschte Immunantwort gelenkt werden.

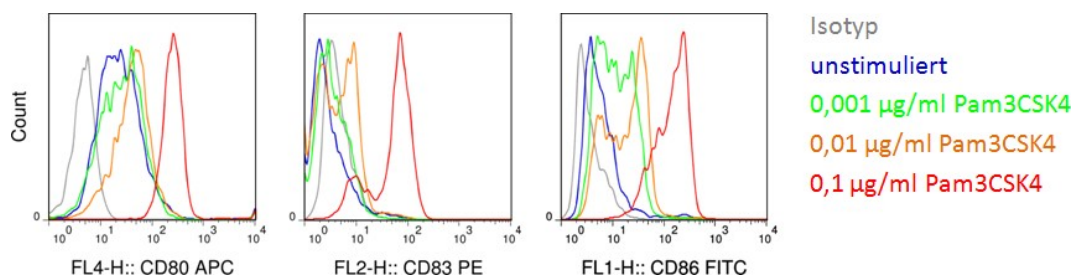
Zymosan ist ein Homoglykan in der fungalen Zellwand und bindet auf DCs an das C-Typ Lectin Dectin-1 und TLR2, beides Rezeptoren für *Aspergillus fumigatus* [Braedel et al. (2004); Mezger et al. (2008)]. moDCs wurden unstimuliert belassen und mit einer Zymosan-Konzentrationsreihe von 0,1 bis 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Zehner-Schritten für 18 h bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende Analyse der Maturierungsmarker am Durchflusszytometer ergab, dass 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan moDCs stark stimulierten. Mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan war bereits eine verringerte Expression von CD83 und CD86 zu erkennen. Als adjuvante Konzentration zur leichten Stimulation von moDCs erwies sich 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan für gut, durch welche CD80 nicht mehr und CD83/CD86 leicht induziert wurden (Abbildung 5.38).



**Abbildung 5.38:** Zymosan rief bei moDCs mit 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine leichte Maturierung hervor.

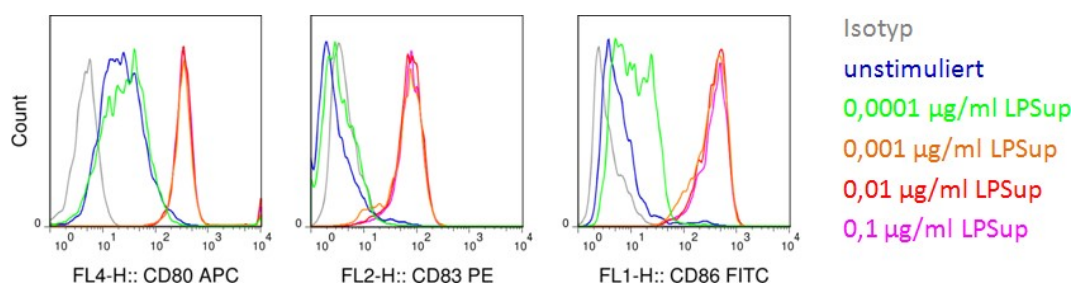
Pam3CSK4 ist ein Ligand für TLR1 und TLR2, wobei TLR2 ein Rezeptor für *A. fumigatus* ist [Braedel et al. (2004)]. Für 18 h mit Pam3CSK4 stimulierte moDCs induzierten bei 0,001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CD86 leicht. Die nächsthöhere Konzentration mit 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pam3CSK4

induzierte die Expression von CD80, CD83 und CD86, wobei 0,1 µg/ml die moDCs noch deutlicher reifte. Adjuvante Effekte von Pam3CSK4 würden mit 0,01 und 0,001 µg/ml erwartet werden (Abbildung 5.39).



**Abbildung 5.39:** Mit 0,01 und 0,001 µg/ml konzentriertes Pam3CSK4 ließ moDCs leicht maturieren.

LPS ultrapur stimuliert ausschließlich TLR4, welches als Rezeptor für *A. fumigatus* fungiert [Braedel et al. (2004)]. Dieses Stimulus musste sehr stark verdünnt werden, um eine leichte moDC-Maturierung hervorzurufen. Erst mit einer Konzentration von 0,0001 µg/ml, wurden CD80 und CD83 nicht mehr induziert und CD86 moderat. Alle höheren Konzentrationen führten zu einer sehr starken Expression der Maturierungsmarker und damit zu reifen moDCs (Abbildung 5.40).

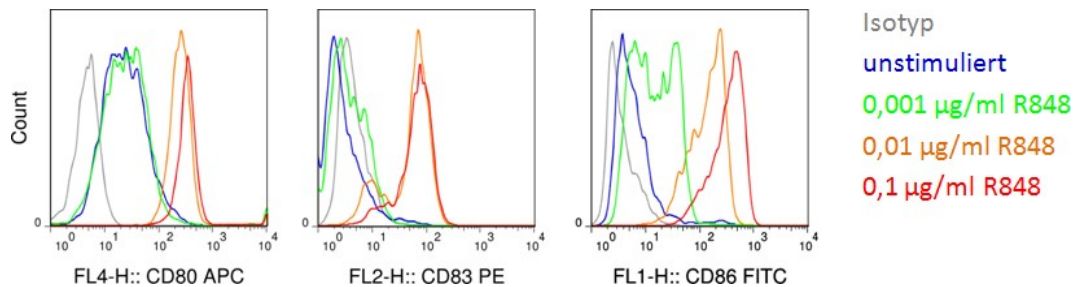


**Abbildung 5.40:** Eine leichte Maturierung von moDCs wurde mit 0,0001 µg/ml LPS ultrapur bewirkt.

R848, auch Imiquimod genannt, kann die intrazellulär vorkommenden TLR7 und TLR8 binden [Jurk et al. (2002)]. Die Stimulation von TLR7/8 kann moDCs zur Aktivierung naiver CD4 T-Zellen veranlassen [Lombardi et al. (2009)], was von einem Adjuvant erwünscht



wird. Eine leichte, für einen adjuvanten Effekt vorteilhafte Maturierung konnte durch die Stimulation der moDCs mit 0,001 µg/ml R848 erzielt werden. Höher konzentriertes R848 führte zu einer starken moDC-Reifung (Abbildung 5.41).



**Abbildung 5.41: R848 induzierte mit einer Konzentration von 0,001 µg/ml eine leichte Reifung der moDCs.**

Die Stimations-Experimente von moDCs mit verschiedenen Rezeptor-Agonisten zeigen, dass Zymosan, Pam3CSK3, LPS ultrapur und R848 als Adjuvantien in Frage kommen könnten. Alle vier getesteten Stimuli konnten bis auf einen Konzentration titriert werden, die bei moDCs eine leichte Maturierung hervorrief.

#### 5.4.4 CryoStor als geeignetes GMP konformes Einfriermedium

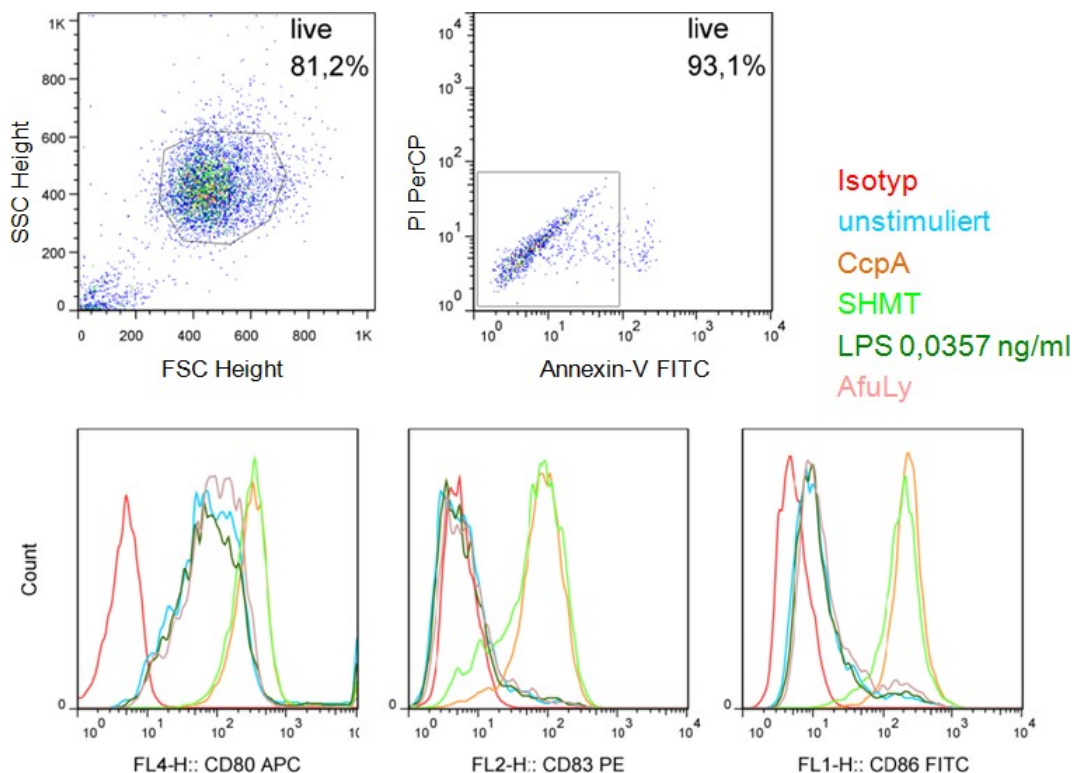
Für eine DC-Immuntherapie sind herkömmliche Einfriermedien mit Fremdproteinen wie aus FCS aufgrund der GMP Richtlinien ungeeignet. Anstatt FCS könnte humanes AB-Serum eingesetzt werden, das zwar GMP konform ist, jedoch nicht autolog. CryoStor ist ein Einfriermedium, das keiner zusätzlichen Proteine bedarf.

Die in CryoStor bei -80°C für 5 Tage gelagerten, aufgetauten und für 18 h kultivierten moDCs bildeten in der durchflusszytometrischen Analyse eine kompakte Population, der 81,2% der vermessenen Zellen angehörten. Von dieser Population waren 93,1% vital, indem sie negativ für die lebend-tot-Farbstoffe PI<sup>8</sup> und Annexin-V waren.

Die Antigen-bedingte Maturierung der moDCs wurde durch die Lagerung in CryoStor nicht verändert. CcpA und SHMT induzierten eine höhere Expression der Maturierungsmarker CD80, CD83 und CD86, die nach dem Auftauen und der 18-stündigen Inkubation immer noch vorhanden war. Aspergillus Lysat und die LPS-Kontrolle mit 0,0357 ng/ml

<sup>8</sup>Propidium

zeigten vor und nach der Lagerung dieselbe Markerexpression wie unstimulierte moDCs (Abbildung 5.42).



**Abbildung 5.42: Mit CryoStor gelagerte und wieder aufgetaute moDCs sind vital und Antigen-gereift.** Für 5 Tage mit CryoStor bei -80°C gelagerte, aufgetaute und für 18 h kultivierte moDCs zeigten im FCS-SSC-Diagramm eine vitale Population, von welchen 93,1% Annexin-V und PI negativ waren. Die vor der Lagerung induzierte Maturierung durch verschiedene Antigene veränderte sich im Vergleich zu frisch stimulierten moDCs nicht (Abbildung 5.3).

Die gute Vitalität und unveränderte Maturierung der moDCs nach einer Lagerung bei -80°C unterstützten die Verwendung von CryoStor als geeignetes Einfriermedium. In Hinblick auf die Etablierung einer Immuntherapie sind eine hohe Vitalität und die antigenspezifische Expression der Maturierungsmarker von großer Bedeutung.

## 6 Diskussion

Die Immunfunktionen von dendritischen Zellen sind für eine erfolgreiche Beseitigung von Erregern essentiell. Sie phagozytieren in den Körper eindringende Pathogenen, präsentieren die prozessierten Pathogen-Antigene und stimulieren auf eine pathogenabhängige Art und Weise die Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Zur Erforschung von DCs werden hauptsächlich von Monozyten differenzierte DCs verwendet, da Monozyten mit einer deutlich höheren Frequenz als *in vivo* DCs im peripheren Blut vorkommen. Zudem lassen sich die Monozyten unter Zytokin-Einfluss relativ einfach zu moDCs ausdifferenzieren. In einer zunehmenden Anzahl von Studien zeigt die Analyse von mDCs und pDCs, dass diese *ex vivo* DCs sich voneinander und auch von den artifiziellen, *in vitro* generierten moDCs in vielen Punkten unterscheiden.

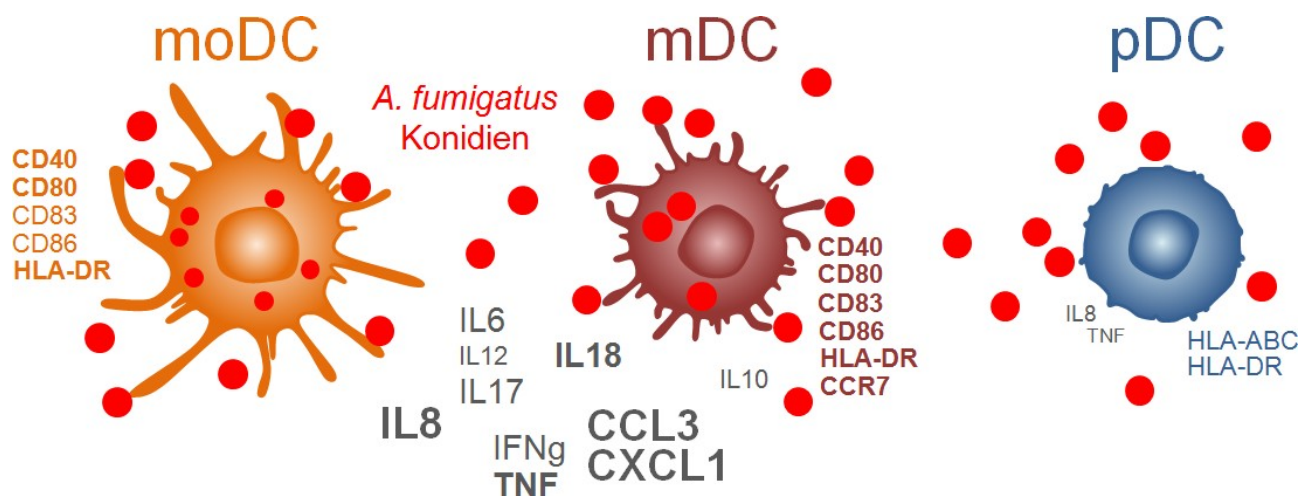
Durch die vorliegende Arbeit konnten Unterschiede zwischen den DC Subpopulationen und ihrer Interaktion mit dem humanpathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* festgestellt werden. Diese Unterschiede gaben Aufschluss darüber, welche DC Subpopulationen für die vorklinische Etablierung einer anti-*Aspergillus* Immuntherapie hilfreich sein könnten. Die Stimulation von moDCs und mDCs mit verschiedenen *Aspergillus*-Antigenen lieferte zwei rekombinant hergestellte Proteine, die für einen DC-Vakzine-Cocktail genutzt werden könnten. Weiterführend konnten Optimierungsmöglichkeiten in der Lagerung der DCs und einer optionalen DC-Funktionsverstärkung etabliert werden.

### 6.1 Humane DCs interagieren auf verschiedene Weise mit

#### *A. fumigatus*

In den Interaktions-Studien mit DC Subpopulationen und *A. fumigatus* wurde beobachtet, dass moDCs und mDCs relativ ähnlich auf die Pilzzellen reagierten, während pDCs nahezu keine Immunreaktion induzierten. Abbildung 6.1 zeigt eine schematische Zusam-

menfassung aller Ergebnisse, die zum Teil auch mit der vorangegangenen Masterarbeit [Kungl (2012)] und der vorliegenden Doktorarbeit erzielt wurden.



**Abbildung 6.1: Schematische Zusammenfassung der DC-Aspergillus Interaktion.** moDCs und mDCs reagierten relativ ähnlich auf *A. fumigatus*. Sie phagozytierten die Pilzmorphologien, maturierten in direktem Kontakt zu Aspergillus, sekretierten ein immunomodulatorisches Zytokinprofil und exprimierten Aspergillus-Rezeptoren. Ausschließlich moDCs konnte das Wachstum von phagozytierten Konidien hemmen. pDCs unterschieden sich in ihrer Reaktion auf *A. fumigatus* deutlich von moDCs und mDCs. Keine der Pilzmorphologien wurde durch pDCs phagozytiert, pDCs maturierten nicht durch Aspergillus, sekretierten nahezu keine Zytokine und exprimierten bis auf einen sehr geringen Anteil keine Aspergillus-Rezeptoren.

### 6.1.1 Das unterschiedliche Maturierungs-Verhalten der DC Subtypen

moDCs und mDCs maturierten in direktem Kontakt zu Keimschläuchen. Dass moDCs bei Kontakt zu *A. fumigatus* ihre Maturierungsmarker erhöhen, wurde zuvor bereits von mehreren Studien beschrieben. [Braedel et al. (2004)] stimulierte moDCs mit inaktivierten Aspergillus Hyphen über Nacht und beobachtete am nächsten Tag die Expressionserhöhung von CD80, CD83, CD86, CD40 und HLA-DR. Die Expressionsintensität der gemessenen Marker war in dieser Studie und der vorliegenden Arbeit vergleichbar hoch. Vergleichbare Werte wurden auch in einer weiteren Studie beschrieben, mit welcher gezeigt wurde, dass die Maturierung der moDCs auf Konidien durch die Immunsuppressiva Amphotericin B und Voriconazol nicht beeinträchtigt wurde [Gafa et al. (2006)]. Im Vergleich dazu konnte [Bauer et al. (2012)] zeigen, dass das Immunsuppressivum 40-O-[2-Hydroxyethyl]rapamycin (RAD) die Aspergillus bedingte Maturierung von moDCs durch eine geringere Expression von CD40, CD80, CD83 und CD86 beeinträchtigte.

Die Maturierung der mDCs durch Keimschläuche wurde bislang in der Fachliteratur nicht beschrieben und durch dieses Projekt erstmalig gezeigt [Lothar et al. (2014)]. mDCs erhöhten im Vergleich zu moDCs die Expression von MHC Klasse II Molekülen, was eine bessere Antigenpräsentation zulassen könnte. Durch die erhöhte Expression von MHC Molekülen auf DCs, verglichen mit Monozyten und moDCs, konnte [Thomas et al. (1993)] eine höhere T-Zell-Proliferation von allogenen CD3-selektierten T-Zellen nachgewiesen werden. Dass mit Tetanus Toxoid beladene CD11c-positive *ex vivo* mDCs die allogene T-Zell-Proliferation besser induzieren als moDCs, wurde von [Osugi et al. (2002)] gezeigt. Die durch mDCs erhöhte Expression von MHC Klasse II Molekülen, nicht aber von MHC Klasse I Molekülen, könnte auf eine Präsentation von Aspergillus-Antigenen zu CD4 T-Zellen hinweisen. Damit wäre eine T-Helfer-Zell vermittelte Immunantwort gegen *A. fumigatus* möglich. Humane Leukozyten und moDCs gesunder Spender zeigen bei Stimulation mit *A. fumigatus* eine Th1 Antwort mit hoher IFN $\gamma$  Sekretion der CD4-positiven Zellen [Hebart et al. (2002); Gafa et al. (2006)]. *A. fumigatus* zählt als Pilz zu den extrazellulären Pathogenen, die über Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden müssen und in den Phago lysosomen als prozessierte Peptide an MHC Klasse II Moleküle gebunden werden [Abbas et al. (2014)]. Da nur MHC Klasse II Moleküle erhöht wurden, werden vermutlich keine Aspergillus-Antigene über MHC Klasse I Moleküle zu CD8 T-Zellen kreuz-präsentiert. Die Grundexpression der MHC Moleküle auf unstimulierten mDCs und pDCs war deutlich höher, als auf moDCs. Ein Grund hierfür könnte die periphere Toleranzvermittlung sein, für die DCs körpereigene Antigene präsentieren [Abbas et al. (2014)]. Monozyten, aus denen moDCs differenziert werden, sind nicht für die Toleranz des eigenen Körpers zuständig und regulieren ihre MHC Moleküle erst bei Pathogen-Kontakt hoch.

Studien zur Interaktion von pDCs und *A. fumigatus* beschreiben vor allem deren Zytokinsekretion und nicht das Maturierungs-Verhalten. Unter Verwendung von Antigenen anderer Pathogene, wie viraler Nukleinsäuren, konnten pDCs gereift werden, was sich in der erhöhten Expression von Maturierungsmarkern zeigte [Kadowaki et al. (2001); Colonna et al. (2004)]. Durch die gleichzeitige Stimulation mit mikrobiellen Stimuli und IL3, beschrieb [Soumelis and Liu (2006)] die Ausbildung einer deutlichen dendritischen Zellmorphologie der pDCs und eine sehr hohe MHC Klasse II Expression. Eine hohe Expression aller Maturierungsmarker konnte durch die Stimulation von pDCs mit dem TLR7 Ligand Imiquimod (R848) erzielt werden [Gibsona et al. (2002)]. Deshalb wurde R848 in dieser

Studie als Positiv-Kontrolle während der Maturierungsanalysen mitgeführt. R848 induzierte auf pDCs erwartungsgemäß alle Maturierungsmarker, währenddessen durch die vorliegende Arbeit erstmalig gezeigt wurde, dass mit *A. fumigatus* Keimschläuchen stimulierte pDCs nicht reiften und dasselbe Maturierungsprofil wie unstimulierte pDCs exprimierten.

### 6.1.2 DC Subtypen sekretieren unterschiedliche Zytokin-Profile

moDCs und mDCs sekretierten bei Stimulation mit *A. fumigatus* ein ähnliches Zytokinprofil. Besonders hoch wurden durch Aspergillus die pro-inflammatorischen Zytokine IL8 und TNF $\alpha$  induziert. Die hohe Induktion von TNF $\alpha$  und IL8 über einen Zeitraum von einer Stunde bis sechs Stunden durch Aspergillus stimulierte moDCs wurde auch in einer Publikation auf Ebene der Genexpression beschrieben [Mezger et al. (2008)]. In dieser Studie war die mRNA Expression des einzigen anti-inflammatorischen Zytokins IL10 durch Aspergillus stimulierte moDCs eher schwach, was auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Eine weitere Studie, die eigentlich die Wirkung verschiedener Immunsuppressiva auf moDCs beschreibt, wies auch die erhöhte Genexpression und Sekretion von TNF $\alpha$  der moDCs bei Stimulation mit *A. fumigatus* nach [Gafa et al. (2006)]. Zur Zytokinsekretion von mit *A. fumigatus* stimulierten mDCs sind bislang keine Studien veröffentlicht. In einigen Studien, die von der Zytokinsekretion myeloider dendritischer Zellen handeln, wurden CD11c-positive mDCs verwendet. CD11c wird allerdings auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert, wodurch diese Studien im Rahmen der mDC-Funktion schwierig zu beurteilen sind. Ein großes Repertoire an durch Aspergillus stimulierte mDCs freigesetzten Zytokinen wurde durch die vorliegende Interaktions-Studie analysiert und publiziert [Lothar et al. (2014)].

Konidien induzierten in Aspergillus stimulierten moDCs und mDCs eine geringere Zytokinsekretion als Keimschläuche. Dieser Unterschied kann durch die hydrophobe Rodlet-Schicht auf immunologisch eher inerten Konidien erklärt werden. Beim Keimprozess verändert sich die Pilzzellwand, die maskierende Rodlet-Schicht verschwindet und der Pilz besitzt dadurch eine höhere Immunogenität [Aimanianda et al. (2009)]. Durch das Entfernen der Rodlet-Schicht mittels Flusssäure wies diese Forschergruppe nach, dass Konidien ohne Rodlet-Schicht genauso immunogen sind wie Keimschläuche.

Des Weiteren war IL17 induziert, welches die Inflammation gegen extrazelluläre Pathogene, zu welchen auch *A. fumigatus* gehört, anfeuert. Mäuse, welche den Rezeptor für IL17

nicht mehr exprimieren, waren sehr anfällig für Infektionen mit extrazellulären Pathogenen wie *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter rodentium* [Curtis and Way (2008)]. Dass DCs durch fungale Komponenten wie  $\beta$ -Glucan von *C. albicans* und *A. fumigatus* IL17 sekretieren und damit die Differenzierung von naiven T-Zellen polarisieren, wurde durch [Khader et al. (2009)] publiziert.

Das Th1 induzierende Zytokin IL12 [Macatonia et al. (1995)] war durch Konidien tendenziell und durch Keimschläuche signifikant induziert. [Gafa et al. (2007)] beschrieb, dass *Aspergillus* stimulierte moDCs ein Th1 Zytokinprofil freisetzen, was auch durch die vorliegende Studie bestätigt werden kann. Eine Th1 Antwort mit IFN $\gamma$  sekretierenden T-Zellen ist wünschenswert, da diese gegenüber einer Th2 Antwort als protektiv vor IA gilt [Romani (2011)]. Eine murine Studie beschrieb, dass Mäuse, welche eine IA überlebten, ein Th1-Zytokinprofil im Serum mit viel IFN $\gamma$  und wenig IL10 aufwiesen [Stevens (2006)].

IL18 wurde von mDCs stärker induziert als von moDCs, womit die IFN $\gamma$  Produktion in T- und NK-Zellen besser induziert werden könnte. Die Rolle von IL18 als IFN $\gamma$  Induktor, wurde im Mausmodell mittels IL18-spezifischen Antikörpern entdeckt. War IL18 durch den neutralisierenden Antikörper blockiert, produzierten die Mäuse bei Stimulation mit LPS kein IFN $\gamma$  [Dinarello et al. (1998)].

Die Induktion der verschiedenen Zytokine durch *A. fumigatus* versetzt moDCs und mDCs nicht nur in die Lage naive T-Zellen zu differenzieren, sie können auch als inflammatorische DCs andere Immunzellen zum Ort der Entzündung locken und aktivieren.

pDCs induzierten bis auf leichte Tendenzen an IL8, CCL4 und GM-CSF, keine Zytokine. Das pDC typische Typ I Interferon IFN $\alpha$  wurde durch *A. fumigatus* nicht induziert. Für *Aspergillus* DNA ist beschrieben, dass sie über das intrazelluläre TLR9 eine proinflammatorische Antwort mit den Zytokinen IL12, TNF $\alpha$  und IFN $\alpha$ , in pDCs hervorrufen kann [Ramirez-Ortiz et al. (2008, 2011)]. Für diese Publikationen wurde eine positive Selektion zur pDC Isolation aus human-peripherem Blut verwendet, die in unserem Labor bei verschiedenen Experimentatoren eine nicht zufriedenstellende Zellreinheit erzielte. Dies veranlasste uns die pDCs mithilfe einer negativen Selektion zu isolieren, wobei verlässlich hohe Reinheiten über 96,5% erbracht wurden. Interessanterweise isolierte die Forschergruppe in einer aktuellen Publikation für einen Teil der Experimente, die hoch reine pDCs benötigten, diese mittels negativer Selektion [Loures et al. (2015)].

### 6.1.3 Aspergillus-Rezeptoren werden nicht von allen DC Subtypen exprimiert

Für moDCs wurde nachgewiesen, dass sie über die Rezeptoren TLR2 und TLR4 [Braedel et al. (2004)], sowie über Dectin-1 [Mezger et al. (2008)] Morphologien von *A. fumigatus* erkennen können. Die Expression dieser Rezeptoren konnte mit dieser Arbeit für moDCs bestätigt werden. mDC exprimierten die drei Aspergillus-Rezeptoren auch, wohingegen sie von pDCs nicht exprimiert waren. Sehr wenige pDCs waren positiv für Dectin-1, was die leichte Zytokinausschüttung bedingt haben könnte. Eine Phagozytose der Pilzzellen über Dectin-1 kann aber ausgeschlossen werden, da die pDCs nicht maturierten und live-imaging Experimente keine Phagozytosen von Konidien und Keimschläuche durch pDCs zeigten [Lothar et al. (2014)]. Die Publikation, die eine Aktivierung von pDCs mittels Zytokinsekretion durch Aspergillus DNA beschrieb, wies per Fluoreszenzmikroskopie intrazelluläre Konidien in pDCs nach [Ramirez-Ortiz et al. (2011)]. Jedoch wurde zur pDC Identifikation der Marker CD123 genutzt, der auch von Monozyten und mDCs exprimiert wird [Cella et al. (1999); Dzionek et al. (2001); Röck et al. (2007)]. Kürzlich wurde publiziert, dass pDCs über Dectin-2 Hyphen von *A. fumigatus* erkennen können und daraufhin extrazelluläre Traps (freigesetzte Fangnetze aus DNA und Histonproteinen) ausbilden [Loures et al. (2015)]. Die Erkennung von *A. fumigatus* über Dectin-2 ist war zu erwarten, da bereits eine Interaktion mit *C. albicans* über Mannose reiche Karbohydrate publiziert ist [Sato et al. (2006)]. Solche Karbohydrate sind Hauptbestandteile der Zellwand vieler Pilze. In der vorliegenden Studie wurde Dectin-2 nicht untersucht, da zu Studienbeginn dieser Rezeptor noch nicht als Aspergillus-Rezeptor bekannt war.

Obwohl die Familie der dendritischen Zellen phänotypische und funktionelle Eigenschaften teilt, weisen sie in vielen Punkten prägnante Unterschiede auf. Sie stammen von unterschiedlichen Vorläuferzellen ab [Steinman (1991)], exprimieren unterschiedliche Oberflächenmarker [Moser and Murphy (2000); Dzionek et al. (2000)] und TLRs [Kadowaki et al. (2001); Jarrossay et al. (2001); Hémond et al. (2013)], und reagieren auf dieselben Stimuli unterschiedlich [Kadowaki et al. (2001); Medzhitov (2004)]. Dies konnte auch mithilfe der Interaktions-Studien der vorliegenden Arbeit belegt werden, die sich mit der Interaktion zwischen verschiedenen DCs und *A. fumigatus* auseinandersetzt. [Lothar et al. (2014)]. moDCs und mDCs reagierten relativ ähnlich auf *A. fumigatus*, währenddessen pDCs na-



hezu keine Reaktion zeigten. Dadurch lassen sich für mDCs und pDCs während einer Aspergillus-Infektion unterschiedliche Rollen vermuten. Für eine anti-Aspergillus Immuntherapie sollten moDCs und mDCs gegenüber pDCs bevorzugt werden.

## **6.2 Aspergillus Proteine konnten GMP-konform aufgereinigt werden**

Einige der von Kooperationspartnern rekombinant hergestellten Proteine enthielten für eine Immunzell-Stimulation zu viel Endotoxin. Das Endotoxin-Limit liegt laut FDA seit 2012 bei 0,05 ng/ml und 200 ng/Applikation. Für die vorliegende Arbeit wurde durch umfassende Literaturrecherche und eigene Stimulations- Experimente (Anhang A.2) eine Endotoxin-Obergrenze von 0,01 ng/ml in der Zellkultur festgelegt [Batchu et al. (2005); Fuller et al. (2013); Yuan et al. (2014); Brimnes et al. (2003); Hartmann et al. (1999); Snijders et al. (1998); Kim and Joo (2008)]. Einige Studien zu immunogenen Proteinen geben die Endotoxin-Kontamination der verwendeten Proteine nicht an. Da schon sehr niedrige Endotoxin-Konzentrationen biologisch wirksam sein können, ist bei solchen Studien hinsichtlich falsch positiver Stimulationseffekte Vorsicht geboten.

Bis auf das Endotoxin-Limit der für eine Immuntherapie verwendeten Proteine, gibt es nur wenig Literatur über nötige Proteineigenschaften. Durch die Kommunikation mit verschiedenen Kooperationspartnern, darunter auch mittelständische Firmen, wurden die nötigen Kriterien festgelegt. Für eine DC-Stimulation geeignete Proteine sollen eine definierte Proteinbande im Coomassie-Gel aufweisen, die dieselbe Konzentration wie die NanoDrop Messung aufweist. Eine niedrigere Konzentration im Coomassie-Gel als im NanoDrop, wird oft durch eine Degradierung des Proteins bedingt. Degradierete Proteine enthalten nur noch wenige antigene Epitope, was zu einer geringeren Stimulation von DCs führen kann. Aus diesem Grund ist die Proteinkonzentrations-Bestimmung am NanoDrop nicht ausreichend und muss durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung ergänzt werden.

Des Weiteren darf die Proteinkonzentration nicht zu gering sein, da sonst das Medium der Zellkultur durch Zugabe eines großen Proteinvolumens zu starke Verdünnungseffekte erfährt. Durch die Verdünnung wird die Konzentration der Nährstoffe und Puffer-substanzen erniedrigt, wodurch Nährstoffe eventuell zu schnell verbraucht sind und die Pufferung des neutralen Milieus von pH 6,9 bis 7,2 nicht erhalten werden kann. Protein-

Aufreinigungen bedingen oft eine Verdünnung des Proteins, sodass teilweise Kompromisse zwischen Proteinkonzentration und Reinheitsgrad eingegangen werden müssen. Die Aufreinigung des SHMT Proteins war mit 0,0357 ng/ml Endotoxin-Verunreinigung oberhalb des Grenzwertes. Da die beiden Aufreinigungsschritte eine deutlich Verdünnung des Proteins herbeiführten, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet und stattdessen eine Endotoxin-Kontrolle mitgeführt.

### 6.3 CcpA und SHMT eignen sich als DC-Antigene

#### 6.3.1 moDCs und mDCs maturierten durch CcpA und SHMT

Von den vier zur DC-Stimulation verwendeten Aspergillus-Proteinen induzierte CcpA bei moDCs die deutlichste Maturierung. Mit CcpA stimulierte in RPMI10%FCS kultivierte moDCs induzierten vor allem MHC Klasse II Moleküle, aber auch MHC Klasse I Moleküle. Da CcpA als extrazelluläres Antigen endozytiert werden muss und über MHC Klasse II präsentiert würde, lässt die MHC Klasse I Induktion die Vermutung einer Kreuz-Präsentation zu. Dabei gelangen endozytierte Antigene aus den Vesikeln ins Zytoplasma der DCs und werden dann an MHC Klasse I Moleküle gebunden [Ackerman et al. (2005); Burgdorf et al. (2007); Amigorena and Savina (2010)]. Die Kreuz-Präsentation ermöglicht DCs endozytierte Antigene über MHC Klasse I und II Moleküle zu präsentieren und damit CD4- und CD8-positiven T-Zellen zu aktivieren [Abbas et al. (2014)].

SHMT induzierte eine leichte Maturierung von moDCs, indem vor allem die kostimulatorischen Moleküle höher exprimiert wurden.

CpcB, fg-gap und Aspergillus Lysat riefen keine Maturierung der moDCs hervor.

In CellGro kultivierte moDCs zeigten ein ähnliches Maturierungsprofil, wie die in RPMI10%FCS gehaltenen moDCs. Sie wurden durch CcpA am Besten stimuliert, gefolgt von SHMT. CpcB, fg-gap und Aspergillus Lysat maturierten in CellGro kultivierte moDCs nicht. Die Intensität der Reifung von in Serum-freiem CellGro Medium kultivierten moDCs war jedoch deutlich geringer als die der mit 10% FCS in RPMI gehaltenen DCs. Dass moDCs vom Serum abhängig auf den Stimulus TNF $\alpha$  maturieren, wurde schon zuvor beschrieben [Royer et al. (2006)], wobei moDCs in Medium mit FCS besser maturierten als moDCs in serumfreiem Medium.

mDCs maturierten durch CcpA besser als moDCs und induzierten zudem CCR7, wel-

ches, wie in der Einleitung beschrieben, zur Migration zu lymphatischen Geweben nötig ist. Vermutlich sind CCR7 exprimierende CcpA-mDCs in der Lage *in vivo* zu Lymphknoten zu migrieren, um dort professionell Antigene zu T-Zellen zu präsentieren. Weil mDCs durch CcpA MHC Klasse II Moleküle induzierten, kann eine mögliche Präsentation von prozessierten CcpA-Peptiden zu CD4-positiven T-Zellen erwartet werden. Die Maturierung von mDCs wurde durch SHMT in geringerem Maße induziert als durch CcpA. SHMT scheint auch über MHC Klasse II Moleküle präsentiert zu werden, da die Expression von HLA-DR induziert war und die von HLA-ABC nicht. CCR7 wurde durch SHMT auf mDCs leicht, aber signifikant hoch reguliert, was den Zellen die Migration zu peripheren Lymphknoten ermöglichen kann. Genau wie moDCs, wurden mDCs durch CpcB, fg-gap und Aspergillus Lysat nicht maturiert.

### **6.3.2 DCs sekretieren Zytokine und aktivieren T-Zellen durch CcpA und SHMT**

Das Zytokinprofil von CcpA stimulierten moDCs und mDCs war durch einer hohe Sekretion von pro-inflammatorischem IL6 geprägt. Gleichzeitig sekretierten moDCs und mDCs IL12p70, das für seine Th1 induzierende Eigenschaft bekannt ist. IL12 wurde als Th1 induzierendes Zytokin nachgewiesen, indem aus human-peripherem Blut CD3-positive T-Zellen isoliert, mit IL12 stimuliert und die erhöhte Sekretion von IFN $\gamma$  der CD4-positiven Zellen im Durchflusszytometer detektiert wurde [Athie-Morales et al. (2004)]. Mit CcpA stimulierte mDCs induzierten mehr Zytokine als moDCs, was zu einer besseren Immunzell-Aktivierung führen könnte. Jedoch induzierten CcpA-mDCs gleichzeitig mehr anti-inflammatorisches IL10, was eine geringere Th1 Antwort vermuten lässt. Die IFN $\gamma$  Sekretion von mit CcpA-mDCs stimulierten T-Zellen war im Vergleich zu CcpA-moDCs tatsächlich geringer. CcpA-moDCs induzierten in T-Zellen neben der höheren IFN $\gamma$  Sekretion auch eine höhere T-Zell-Proliferation, wobei vorwiegend CD4-positive T-Zellen proliferierten. Ein geringer Teil an proliferierten CD8-positiven T-Zellen lässt erneut die Vermutung einer Kreuz-Präsentation des CcpA Proteins zu.

Das Profil der durch SHMT sekretierten Zytokine ähnelte dem der CcpA stimulierten DCs. Auffällig war, dass in CellGro kultivierte moDCs durch SHMT eine höhere Zytokinantwort zeigten als solche, die mit CcpA stimuliert wurden. Möglicherweise konnten die in CellGro kultivierten und durch SHMT stimulierten moDCs mithilfe der guten Zytokin-

sekretion die geringere Maturierung ausgleichen. Im IFN $\gamma$  ELISpot wurden nämlich ähnlich viele T-Zellen durch CellGro SHMT-moDCs aktiviert, wie durch SHMT-mDCs. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch SHMT-DCs geringer induziert als durch CcpA-DCs. Durch SHMT beladene mDCs proliferierte ein geringer Teil an CD8-positiven T-Zellen, was auf eine Kreuz-Präsentation von SHMT hindeuten könnte.

Obwohl *Aspergillus* Lysat keine Maturierung der DCs induzierte und nur tendenziell die Sekretion von IL6 und IP-10 förderte, konnten mit *Aspergillus* Lysat beladene DCs die IFN $\gamma$  Sekretion von autologen T-Zellen auslösen. Zudem konnten mit *Aspergillus* Lysat beladene moDCs die Proliferation von CD4-positiven T-Zellen anregen. Da CD8-positiv T-Zellen nicht proliferierten, kann eine Kreuz-Präsentation vermutlich ausgeschlossen werden.

Die Detektion *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen mithilfe des CD154 Markers untermauerte die Protein-Stimulationsdaten. Wie zuvor schon durch [Bacher et al. (2014b)] beschrieben, induzierten mit SHMT (auch Shm2 genannt) stimulierte PBMCs CD154-positive Zellen, währenddessen CpcB und fg-gap keine *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen induzierten. Für CcpA konnte durch die vorliegende Arbeit eine Induktion von CD154-positiven Zellen festgestellt werden. Die meisten CD154-positiven Zellen wurden durch *Aspergillus* Lysat induziert.

Dass *Aspergillus* Lysat trotz der tendenziell geringen Zytokinsekretion von unreifen DCs dennoch eine deutliche Reaktion von T-Zellen im IFN $\gamma$  ELISpot, in der T-Zell-Proliferation und in der CD154 Analyse hervorrief, kann mit der speziellen Beschaffenheit des Lysats zusammenhängen. Das Lysat wurde speziell zur Stimulation von *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen in PBMCs entwickelt [Bacher et al. (2013)]. Die genaue Zusammensetzung ist jedoch nicht bekannt. Wenn das Lysat zum Großteil Peptide enthalten würde, könnten diese ohne eine Internalisierung und damit verbundene Maturierung von DCs an ihre bereits auf der Zelloberfläche befindlichen MHC Moleküle binden.

## **6.4 Vorteilhafte Faktoren für die DC-Maturierung und Lagerung**

Hyaluronsäure ist an der Gewebe-Hydratisierung, der Gelenkschmierung, der Wundheilung und an Immunreaktionen beteiligt [reviewed in Stern et al. (2006); Jiang et al. (2011)].

Die aktivierenden Eigenschaften von 6-mer Hyaluronsäure auf humane moDCs [Termeer et al. (2000, 2002)] konnte durch die vorliegende Arbeit nicht beobachtet werden. Die Differenzierung von moDCs erfolgt in beiden Arbeiten weitgehend ähnlich, die verwendete Hyaluronsäure kann jedoch Unterschiede ausweisen. Die genannte Gruppe stellte ihre 6-mer Hyaluronsäure durch den partiellen Verdau von Hyaluronsäure mit einer Hyaluronidase her, während diese für die vorliegende Arbeit kommerzielle erworben wurde. Wie die 6-mer Hyaluronsäure produziert wurde, konnte aufgrund des Firmengeheimnisses nicht in Erfahrung gebracht werden.

Eine gute Reifung von DCs ist für eine effektive Immuntherapie essentiell [Zhou and Tedder (1996); Dhodapkar et al. (2001); McIlroy and Gregoire (2003); Figdor et al. (2004)] und kann durch Rezeptor-Agonisten unterstützt werden [Kaisho and Akira (2003); Pashine et al. (2005)]. Um die Immunfunktionen der DCs nach einer durch *A. fumigatus* induzierten Immunantwort auszurichten, wurden Agonisten für bekannte Aspergillus-Rezeptoren eingesetzt. Die Liganden Zymosan (Dectin-1/TLR2), Pam3CSK4 (TLR1/2), LPS ultrapur (TLR4) und R848 (TLR7/8) veranlassten alle eine Reifung von moDCs, die mit geringen Liganden-Konzentrationen auf schwach stimulierende, adjuvante Effekte gebracht werden konnte. Für den TLR7/8 Liganden R848 wurde bereits ein besseres kostimulatorisches Profil von DCs beschrieben [Beck et al. (2011)]. Zudem erhöhten aus dem murinen Knochenmark differenzierte DCs (BMDCs) die Expression der IL12p40 mRNA als sie mit R848, Pam3CSK4 oder LPS stimuliert wurden [Hou et al. (2008)]. Pam3CSK und LPS induzierten auch in einer weiteren Studie die Expression der Reifemarker und förderten zudem die Differenzierung von IFN $\gamma$  sekretierenden T-Zellen [Deifl et al. (2014)]. Eine Th1 Antwort mit IFN $\gamma$  sekretierenden T-Zellen ist wünschenswert, da diese gegenüber einer Th2 Antwort als protektiv vor IA gilt [Stevens (2006); Romani (2011)]. Zymosan wird als Stimulus zur Reifung antigenpräsentierender Zellen beschrieben [Dillon et al. (2006)], ist jedoch auch mit der Induktion anti-inflammatorischer Immunreaktionen verbunden [Mazzoni and Segal (2004)]. Wie sich die Rezeptor-Agonisten zusammen mit einem Protein-Cocktail auf die Immunantwort auswirken würde, kann durch weiterführende Experimente nach der Fertigstellung des Protein-Cocktails analysiert werden.

Das GMP konforme Einfriermedium CryoStor wurde bereits erfolgreich für die tiefgekühlte Lagerung von DCs in einer klinische Phase I/II Studie verwendet [Podrazil et al. (2015)]. Die vorliegende Arbeit bestätigt die einwandfreie Lagerung der DCs mit Cryo-

Stor, da die DCs nach dem Auftauen und einem Tag in Kultur eine hohe Vitalität und dasselbe Maturierungsprofil zeigten, wie vor dem Einfrieren. Die Lagerung ermöglicht eine Restimulation mit dem DC-Vakzin, welche zur Verstärkung der DC-Immuntherapie oft Anwendung findet [Wierecky et al. (2006); Aarntzen et al. (2008); Palucka and Banchereau (2012)].

## 6.5 Schlussfolgerungen für eine anti-Aspergillus

### DC-Immuntherapie

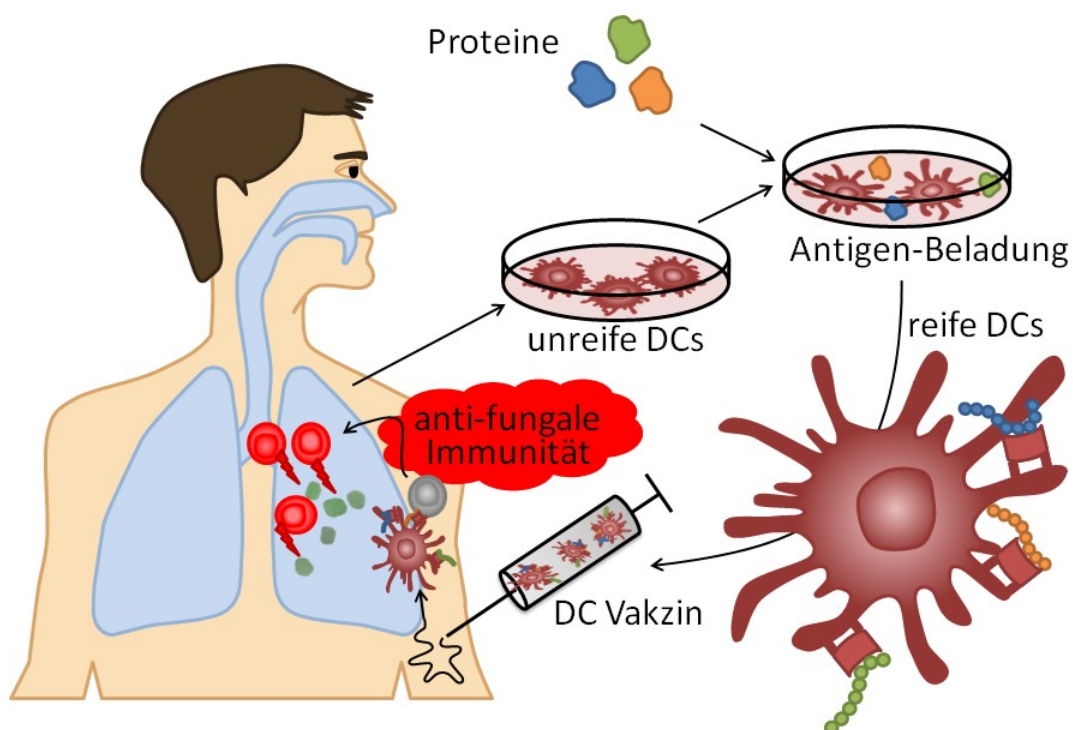
Als potentielle Immuntherapien bei Patienten mit hämatologischer Stammzelltransplantation werden der Transfer von anti-fungalen T-Zellen des Spenders und die Administration von Granulozyten angesehen, da Neutropenie ein großer Risikofaktor bei invasiven Pilzinfektionen darstellt [Lehrnbecher et al. (2013)]. Diese Therapieformen sind auf einzelne Immunzelltypen beschränkt und lösen keine umfassende Immunreaktion aus. Durch die Rekrutierung und die Aktivierung anderer Immunzellen sowie die professionelle, antigenspezifische Aktivierung des adaptiven Immunsystems, nehmen DCs in eine Schlüsselrolle für Immuntherapien ein.

Gründe für die Bevorzugung einer Immuntherapie gegen *A. fumigatus* sind die hohen Nebenwirkungen und der hohe finanzielle Aufwand herkömmlicher Antimykotika [Ullmann et al. (2002); Cornely et al. (2007b,a); Ullmann et al. (2007); Einsele et al. (2015)], das zunehmende Auftreten von Azol-Resistenzen [Denning et al. (1997); Verweij et al. (2007); Snelders et al. (2008)] und die Vorteile einer höheren Spezifität einer DC-Immuntherapie [Abbas et al. (2014)]. Neben den vielen Vorteilen einer personalisierten Immuntherapie ist allerdings auch ein hoher Arbeits- und Finanzaufwand zu leisten, um die GMP-Regeln des Paul Ehrlich Institutes einzuhalten.

Eine DC-Immuntherapie kann durch zwei Verfahren angewandt werden: *ex vivo* generierte DC Vakzine und DC targeting [Tacken et al. (2007)]. Für das DC targeting müssen Fusionsproteine erzeugt werden, die aus einem antigenen Teil und einem DC-spezifischen Teil bestehen. Durch den DC-spezifischen Teil binden die intra dermal verabreichten Fusionsproteine an im umliegenden Gewebe lokalisierten DCs. Die folgende Internalisierung und die Prozessierung des antigenen Teils, soll die antigenspezifische Immunreaktion auslösen. Aufgrund des komplexen Herstellungsprozesses solcher Fusionsproteine und der kli-

nischen Erfahrungen mit *ex vivo* generierten DC Vakzinen, wurde das letztere Verfahren bevorzugt.

Für *ex vivo* generierte DC Vakzine werden DCs mit immunogenen Antigenen beladen, durch den Antigen-Kontakt reifen die DCs und werden dem Spender als autologes DC-Vakzin intra dermal verabreicht. Von der Haut aus migrieren die DCs chemotaktisch durch CCR7-CCL19/CCL21 zu peripheren Lymphknoten, in welchen die professionelle Antigenpräsentation zu T-Zellen stattfindet. Antigen-spezifische T-Zellen werden aktiviert, sie beginnen zu proliferieren und migrieren zum Ort der Inflammation. Dort richten sie ihre Immunfunktionen gegen das Pathogen, was zu dessen Abwehr führt (Abbildung 6.2).



**Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der anti-Aspergillus Immuntherapie durch dendritische Zellen.** Die dendritische Zellen werden entnommen, mit Aspergillus-Proteinen beladen und als reife antigenpräsentierende Zellen zur Immuntherapie genutzt. *In vivo* sollen sie zu Lymphknoten migrieren, um eine Aspergillus-spezifische T-Zell Antwort zu initiieren. Außerdem sollen sie am Infektionsort andere Immunzellen anlocken und gegen Aspergillus aktivieren.

Murine und humane Studien legen die Wichtigkeit einer vor IA protektiven Th1 Immunantwort nahe [Stevens (2006); Romani (2011); Stuehler et al. (2011)]. Eine Th1 Antwort

kann *in vivo* durch mit *A. fumigatus*-Allergenen stimulierten moDCs ausgelöst werden [Hebart et al. (2002)]. Die vorliegende Studie konnte eine Th1 Antwort durch die IL12p70 Sekretion von Aspergillus stimulierten moDCs bestätigen. mDCs sekretierten ein ähnlich Zytokinprofil wie moDCs, was auch das Th1 induzierende Zytokin IL12p70 einschließt. pDCs induzierten keine deutliche Immunantwort und werden deshalb für eine anti-Aspergillus Immuntherapie nicht empfohlen.

### 6.5.1 Die Wahl des DC Subtyps

Zu Beginn des Projekts wurden verschiedene DCs (moDCs, mDCs und pDCs) mit *A. fumigatus* konfrontiert und durch Interaktionsanalysen geklärt, welche DC Subpopulation gegen den Schimmelpilz reagiert. Eine eigenständige Immunreaktion auf das Pathogen wurde dabei als Grundvoraussetzung für eine mögliche DC-Immuntherapie angesehen. moDCs und mDCs lieferten eine ausgeprägte und leicht unterschiedliche Immunreaktion auf den Pilz, wohingegen pDCs schwach bis überhaupt nicht reagierten. Für die folgenden Antigen-Stimulationsexperimente wurden pDCs aus diesem Grund ausgeschlossen und mit moDCs und mDCs weiter gearbeitet.

Obwohl mDCs in geringerer Anzahl als moDCs aus peripherem Blut isoliert werden können, sollten sie für eine Immuntherapie bedacht werden. mDCs zeigten gegenüber moDCs nicht nur in dieser Studie Vorteile hinsichtlich einer DC-Immuntherapie. Die Stimulation mit *A. fumigatus* veranlasste mDCs zu einer höheren Expression an MHC Klasse II Molekülen und sie sekretierten deutlich mehr IL18 als moDCs. Das pro-inflammatorische Zytokin IL18 induziert in T- und NK-Zellen IFN $\gamma$  [Dinarello et al. (1998)], welches einer gewünschten Th1 Antwort förderlich ist [Stuehler et al. (2011)]. Eine höhere MHC Expression verstärkt die Proliferation von autologen T-Zellen [Thomas et al. (1993)] und CD11c-positive mDCs induzierten eine höhere T-Zell-Proliferation als moDCs [Osugi et al. (2002)]. Zudem sollte die in der Regel fünftägige Generierungszeit von moDCs berücksichtigt werden. Gerade bei immunsupprimierten Patienten stellt die Zeitdauer von der Infektion bis zur Diagnose und den darauffolgenden Therapiemaßnahmen einen entscheidenden Faktor dar [Denning (2000)]. Die kürzeste Generierung konnte mit 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL4 für zwei Tage, mit anschließender Gabe von 1000 U/ml TNF $\alpha$  für einen weiteren Tag erzielt werden [Dauer et al. (2003)]. Die Generierung der moDCs unterscheidet sich zwischen den Laboren, was keiner standardisierten Therapie entspricht. mDCs hingegen



müssen nicht mit Zytokinen differenziert werden, sondern können direkt aus dem peripheren Blut unter GMP Bedingungen isoliert und mit Antigenen beladen werden. Dies lässt auch eine einfache Standardisierung in getrennten Laboren und Kliniken zu.

In klinischen moDC-Immuntherapien konnte ein sehr geringes Auftreten von Nebenwirkungen und eine nur leichte klinische Effizienz beobachtet werden. Wahrscheinlich sind moDCs aufgrund ihrer Herkunft nicht optimal an die Aufgaben *in vivo* angepasst [Aarntzen et al. (2008)], was die zu physiologischen mDCs vergleichsweise geringere T-Zell-Proliferation erklären könnte. Ein weiterer Grund könnte auch die geringe Sekretion an IL12 von moDCs sein, die in dem GMP konformen Medium CellGro kultiviert werden [Zobywalski et al. (2007)]. Das von DCs sekretierte IL12 ist für eine effektive Th1 Immunantwort notwendig [Macatonia et al. (1995)] und wird als bedeutender Faktor einer erfolgreichen DC-Immuntherapie angesehen [Eyrich et al. (2013)]. Die fehlende IL12 Produktion versucht man derzeit mit verschiedenen Zytokinen und Stimuli in einem Maturierungs-Cocktail zu induzieren [Eyrich et al. (2013)]. Die IL12 Sekretion von moDCs scheint mit der Expression des moDC-Markers CD1a zu korrelieren; CD1a-negative moDCs sekretierten kein IL12 [Cernadas et al. (2009)]. Und die CD1a Expression hängt wiederum von dem verwendeten Kulturmedium ab [Royer et al. (2006); Tan et al. (2013)]. Wie in den genannten Studien konnte auch mit der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass in serumfreiem CellGro Medium kultivierte moDCs nahezu kein CD1a exprimieren. Zudem sekretierten in CellGro kultivierte moDCs weniger IL12 bei der Stimulation mit den Aspergillus-Proteinen CcpA und SHMT als in RPMI10%FCS gehaltene moDCs und mDCs. Demzufolge könnte die Expression des CD1a-Markers auf der Zelloberfläche von moDCs für eine effektive DC-Immuntherapie entscheidend sein.

### 6.5.2 Potentielle Protein-Antigene und Adjuvantien

Wie durch die vorliegende Arbeit beschrieben, könnten CcpA und SHMT zwei potentielle Kandidaten eines Vakzinierungs-Cocktails für eine DC-Immuntherapie sein. SHMT wurde in einer weiteren Studie als Stimulus für die Aktivierung von Aspergillus-spezifischen T-Zellen beschrieben [Bacher et al. (2014b)]. CpcB und fg-gap induzierten weder eine Maturation der DCs noch deren Zytokinsekretion und sind deshalb für eine DC-Immuntherapie gegen *A. fumigatus* nicht empfehlenswert. Ein Vakzinierungs-Cocktail sollte aus mehreren Proteinen und Adjuvantien bestehen, um eine möglichst gute Immunantwort zur Abwehr

des Pathogens oder auch von entarteten Zellen zu gewährleisten [Palucka et al. (2010); Ueno et al. (2011); Palucka and Banchereau (2012)]. Die aktuelle Fachliteratur verweist auf weitere Proteine und Antigen-Kandidaten:

- Asp f3 konnte als Protein-Vakzin mit der Bildung von anti-Asp f 3 IgG2a Antikörper Mäuse vor einer IA beschützen [Ito et al. (2006)]. Humane Leukozyten reagierten auf eine Asp f3-Stimulation mit einer Th1 Antwort [Chaudhary et al. (2010)].
- Weitere Aspergillus Allergen-Proteine, die als Th1-Antwort eine IFN $\gamma$  Sekretion von CD4-Zellen in humanen Leukozyten auslösten, sind Asp f6, Asp f 9/16, Asp f 11, Asp f 12 und Asp f 22 [Chaudhary et al. (2010)].
- Das rekombinante Cat1 Protein (Catalase) induzierte in humanen Leukozyten eine Th1 Antwort [Jolink et al. (2013)].
- Aspergillus Lysat aktivierte in humanen PBMCs Aspergillus-spezifische CD154-positive T-Zellen [Bacher et al. (2013); Bacher and Scheffold (2013)]. Dies konnte auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden, jedoch verblieben mit Aspergillus Lysat stimulierte moDCs und mDCs unreif.

Für adjuvante Effekte im Vakzinierungs-Cocktail könnten Zymosan, Pam3CSK4, LPS ultrapur und R848 infrage kommen. Diese Moleküle trugen in dieser Studie zur Reifung von moDCs bei und könnten als belegte Liganden von Aspergillus-Rezeptoren die Immunfunktionen der DCs einer anti-fungalen Immunreaktion annähern.

Ein weiterer Aspekt liegt in der Kombination mehrerer Immuntherapien. Gleichzeitig zur anti-fungalen DC-Immuntherapie werden auch T-Zell-Immuntherapien etabliert [Hebart et al. (2002); Khanna et al. (2011); Einsele et al. (2015)]. Eine Kombinationstherapie aus Aspergillus-spezifischen T-Zellen, Aspergillus-Antigen beladenen DCs und Substanzen zur Reduktion regulatorischer T-Zellen könnte sehr effektiv sein.

# Literaturverzeichnis

- Aarntzen, E. H. J. G., Figdor, C. G., Adema, G. J., Punt, C. J. A., and de Vries, I. J. M. (2008). Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother*, 57(10):1559–1568.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2010). *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Elsevier, 6 updated edition.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., and Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology, 8th edition*. Saunders.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., and Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol*, 6(1):107–113.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Knemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S. R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A. A., Kaveri, S. V., Romani, L., and Latgé, J.-P. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460:1117–1121.
- Akira, S. and Sato, S. (2003). Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*, 35(9):555–562.
- Amigorena, S. and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 22(1):109–117.
- Amitani, R., Taylor, G., Elezis, E. N., Llewellyn-Jones, C., Mitchell, J., Kuze, F., Cole, P. J., and Wilson, R. (1995). Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 63(9):3266–3271.
- Athie-Morales, V., Smits, H. H., Cantrell, D. A., and Hilkens, C. M. U. (2004). Sustained il-12 signaling is required for th1 development. *J Immunol*, 172:61–69.
- Austyn, J. M. (1996). New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 4:1287–1292.
- Bacher, P., Knemeyer, O., Schönbrunn, A., Sawitzki, B., Assenmacher, M., Rietschel, E., Steinbach, A., Cornely, O. A., Brakhage, A. A., Thiel, A., and Scheffold, A. (2014a). Antigen-specific expansion of human regulatory t cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi. *Mucosal Immunol*, 7(4):916–928.
- Bacher, P., Knemeyer, O., Teutschbein, J., Thön, M., Vödisch, M., Wartenberg, D., Scharf, D. H., Koester-Eiserfunke, N., Schütte, M., Dübel, S., Assenmacher, M., Brakhage, A. A., and Scheffold, A. (2014b). Identification of immunogenic antigens from *Aspergillus fumigatus* by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory cd4+ t cells. *J Immunol*, 193(7):3332–3343.

- Bacher, P. and Scheffold, A. (2013). Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific t cells. *Cytometry A*, 83(8):692–701.
- Bacher, P., Schink, C., Teutschbein, J., Kniemeyer, O., Assenmacher, M., Brakhage, A. A., and Scheffold, A. (2013). Antigen-reactive t cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory th cell repertoire. *J Immunol*, 190(8):3967–3976.
- Balloy, V. and Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 11(12):919–927.
- Banchereau, J. and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, 5:296–306.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998a). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:245–252.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998b). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673):245–252.
- Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunology*, 17(4):253–261.
- Barnes, P. D. and Marr, K. A. (2007). Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*, 139(4):519–531.
- Batchu, R. B., Moreno, A. M., Szmania, S. M., Bennett, G., Spagnoli, G. C., Ponnazhagan, S., Barlogie, B., Tricot, G., and van Rhee, F. (2005). Protein transduction of dendritic cells for ny-eso-1-based immunotherapy of myeloma. *Cancer Research*, 65:10041–10050.
- Bauer, R., Mezger, M., Blockhaus, C., Schmitt, A.-L., Kurzai, O., Einsele, H., and Loeffler, J. (2012). 40-o-[2-hydroxyethyl]rapamycin modulates human dendritic cell function during exposure to *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology*, 52:269–276.
- Beck, B., Dörfel, D., Lichtenegger, F. S., Geiger, C., Lindner, L., Merk, M., Schendel, D. J., and Subklewe, M. (2011). Effects of tlr agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from aml patients in complete remission. *J Transl Med*, 9:1–14.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., and Kontoyiannis, D. P. (2010). Enemy of the (immuno-suppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British Journal of Haematology*, 150(4):406–417.
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *Journal of Immunological Methods*, 196:121–135.
- Bouzani, M., Ok, M., McCormick, A., Ebel, F., Kurzai, O., Morton, C. O., Einsele, H., and Loeffler, J. (2011). Human nk cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by ifn-g release. *Journal of Immunology*, 187:1369–1376.

- Bozza, S., Gaziano, R., Lipford, G. B., Montagnoli, C., Bacci, A., Di Francesco, P., Kurup, V. P., Wagner, H., and Romani, L. (2002a). Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant aspergillus proteins and cpg oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect*, 4(13):1281–1290.
- Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., and Romani, L. (2002b). Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate responses to the fungus. *The Journal of Immunology*, 168(3):1362–1371.
- Bozza, S., Perruccio, K., Montagnoli, C., Gaziano, R., Bellocchio, S., Burchielli, E., Nkwanyuo, G., Pitzurra, L., Velardi, A., and Romani, L. (2003). A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood*, 102(10):3807–3814.
- Braedel, S., Radsak, M., Einsele, H., Latgé, J.-P., Michan, A., Loeffler, J., Haddad, Z., Grigoleit, U., Schild, H., and Hebart, H. (2004). *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *British Journal of Haematology*, 125(3):392–399.
- Brimnes, M. K., Bonifaz, L., Steinman, R. M., and Moran, T. M. (2003). Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong t cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *Journal of Experimental Medicine*, 198:133–144.
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(3):407–412.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in cd4 and cd8 t cell activation. *Science*, 316(5824):612–616.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009). The miqe guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. *Clin Chem*, 55(4):611–622.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, I. J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G., Netea, M., Kullberg, B.-J., Romani, L., and Figdor, C. (2003). The c-type lectin dc-sign (cd209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 33:523–538.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of mhc class ii complexes on dendritic cells. *Nature*, 388:782–787.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type i interferon. *Nature Medicine*, 5:919–923.

- Cernadas, M., Lu, J., Watts, G., and Brenner, M. B. (2009). Cd1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 155:523–533.
- Chaudhary, N., Staab, J. F., and Marr, K. A. (2010). Healthy human t-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PLoS One*, 5(2):e9036.
- Chignard, M., Balloy, V., Sallenave, J.-M., and Si-Tahar, M. (2007). Role of toll-like receptors in lung innate defense against invasive aspergillosis. distinct impact in immunocompetent and immunocompromized hosts. *Clinical Immunology*, 124(3):238–243.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, 5:1219–1226.
- Cornely, O. A., Maertens, J., Bresnik, M., Ebrahimi, R., Ullmann, A. J., Bouza, E., Heusel, C. P., Lortholary, O., Rieger, C., Boehme, A., Aoun, M., Horst, H.-A., Thiebaut, A., Ruhnke, M., Reichert, D., Vianelli, N., Krause, S. W., Olavarria, E., Herbrecht, R., and A. T. S. G. (2007a). Liposomal amphotericin b as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (ambload trial). *Clin Infect Dis*, 44(10):1289–1297.
- Cornely, O. A., Maertens, J., Winston, D. J., Perfect, J., Ullmann, A. J., Walsh, T. J., Helfgott, D., Holowiecki, J., Stockelberg, D., Goh, Y.-T., Petrini, M., Hardalo, C., Suresh, R., and Angulo-Gonzalez, D. (2007b). Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med*, 356(4):348–359.
- Cunha, C., Aversa, F., Lacerda, J. F., Busca, A., Kurzai, O., Grube, M., Löffler, J., Maertens, J. A., Bell, A. S., Inforzato, A., Barbati, E., Almeida, B., Santos e Sousa, P., Barbui, A., Potenza, L., Caira, M., Rodrigues, F., Salvatori, G., Pagano, L., Luppi, M., Mantovani, A., Velardi, A., Romani, L., and Carvalho, A. (2014a). Genetic ptx3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 370(5):421–432.
- Cunha, C., Kurzai, O., Loeffler, J., Aversa, F., Romani, L., and Carvalho, A. (2014b). Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia*, 178:387–393.
- Curtis, M. M. and Way, S. S. (2008). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126:177–185.
- Dagenais, T. R. T. and Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:447–465.
- Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *The Journal of Immunology*, 170(8):4069–4076.
- Deiff, S., Kitzmüller, C., Steinberger, P., Himly, M., Jahn-Schmid, B., Fischer, G., Zlabinger, G., and Bohle, B. (2014). Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naïve cd4+ t cells from allergic patients. *Allergy*, 69:1602–1609.

- Delamarre, L. and Mellman, I. (2011). Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Semin Immunol*, 23(1):2–11.
- Denning, D. (1998). Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 26(4):781–803.
- Denning, D. W. (2000). Early diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet*, 355:423–424.
- Denning, D. W., Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J., Manning, N. J., Stevens, D. A., Warnock, D. W., and Kelly, S. L. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(6):1364–1368.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector t cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, 193(2):233–238.
- Dietz, A. B. (2006). A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion*, 46:2083–2089.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., and Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for tlr2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*, 116(4):916–928.
- Dinarello, C. A., Novick, D., Puren, A. J., Fantuzzi, G., Shapiro, L., Mühl, H., Yoon, D. Y., Reznikow, L. L., Kim, S. H., and Rubinstein, M. (1998). Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol*, 63:658–664.
- Do, Y., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2004). Role of cd44 and hyaluronic acid (ha) in activation of alloreactive and antigen-specific t cells by bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of Immunotherapy*, 27:1–12.
- Doni, A., Peri, G., Chieppa, M., Allavena, P., Pasqualini, F., Vago, L., Romani, L., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2003). Production of the soluble pattern recognition receptor ptx3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol*, 33(10):2886–2893.
- Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C. G., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 315(5808):107–111.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). Bdca-2, bdca-3, and bdca-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 165(11):6037–6046.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2001). Bdca-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type ii c-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon  $\alpha/\beta$  induction. *Journal of Experimental Medicine*, 194:1823–1834.

- Einsele, H., Löffler, J., Kapp, M., Rasche, L., Mielke, S., and Grigoleit, U. G. (2015). Strategies to enhance immune reconstitution: Adoptive transfer of antigen specific t cells. *Bone Marrow Transplantation*, 50:51–54.
- Eyrich, M., Wöfl, M., Rachor, J., Schreiber, S. C., and Schlegel, P. G. (2013). Dendritic cell vaccination in pediatric gliomas: lessons learnt and future perspectives. *Frontiers in Pediatrics*, 1(12):1–5.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. M. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*, 10:475–480.
- Foot, N. C. (1959). Vital staining. *Annals New York Academy of Sciences*, pages 259–267.
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A. C., and Rot, A. (2008). Ccr7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8:362–371.
- Fuller, M. J., Callendre, B., Zhu, B., Freeman, G. J., Hasselschwert, D. L., Satter, W., Sharpe, A. H., Dustin, L. B., Rice, C. M., Grakoui, A., Ahmed, and Walker, C. M. (2013). Immunotherapy of chronic hepatitis c virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (pd-1). *PNAS*, 110:15001–15006.
- Gafa, V., Lande, R., Gagliardi, M. C., Severa, M., Giacomini, E., Remoli, M. E., Nisini, R., Ramoni, C., Di Francesco, P., Aldebert, D., Grillot, R., and Coccia, E. M. (2006). Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the ccr7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (il-12), il-23, and il-27 cytokines, which lead to a th1 response. *Infect Immun*, 74(3):1480–1489.
- Gafa, V., Remoli, M. E., Giacomini, E., Gagliardi, M. C., Lande, R., Severa, M., Grillot, R., and Coccia, E. M. (2007). In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect*, 9(8):971–980.
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., Acetis, M. D., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., Doni, A., Vago, L., Botto, M., Santis, R. D., Carminati, P., Siracusa, G., Altruda, F., Vecchi, A., Romani, L., and Mantovan, A. (2002). Non-redundant role of the long pentraxin ptx3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 420:182–186.
- Gaundar, S. S., Clancy, L., Blyth, E., Meyer, W., and Gottlieb, D. J. (2012). Robust polyfunctional t-helper 1 responses to multiple fungal antigens from a cell population generated using an environmental strain of *Aspergillus fumigatus*. *Cytotherapy*, 14(9):1119–1130.
- Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., and Marr, K. A. (2006). Dectin-1 and tlrs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176(6):3717–3724.
- Gibsona, S. J., Lindha, J. M., Ritera, T. R., Gleasona, R. M., Rogersa, L. M., Fullera, A. E., Oestericha, J. L., Gordena, K. B., Qiua, X., McKaneb, S. W., Noellec, R. J., Millera, R. L., Kedla, R. M., Fitzgerald-Bocarslyd, P., Tomaia, M. A., and Vasilakos, J. P. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the tlr7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Science*, 218:74–86.



- Grigoleit, U., Riegler, S., Einsele, H., Sampaio, K. L., Jahn, G., Hebart, H., Brossart, P., Frank, F., and Sinzger, C. (2002). Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *British Journal of Haematology*, 119:189–198.
- Groll, A. H. (1999). Five-year-survey of invasive aspergillosis in a paediatric cancer centre. epidemiology, management and long-term survival. *Mycoses*, 42:431–442.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells. *Annual Reviews of Immunology*, 20:621–667.
- Hartmann, G., Weiner, G. J., and Krieg, A. M. (1999). CpG dna: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16):9305–9310.
- Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latgé, J.-P., and Einsele, H. (2002). Analysis of t-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*, 100(13):4521–4528.
- Herbrecht, R., Maertens, J., Baila, L., Aoun, M., Heinz, W., Martino, R., Schwartz, S., Ullmann, A. J., Meert, L., Paesmans, M., Marchetti, O., Akan, H., Ameye, L., Shivaprakash, M., and Viscoli, C. (2010). Caspofungin first-line therapy for invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients: an european organisation for research and treatment of cancer study. *Bone Marrow Transplant*, 45(7):1227–1233.
- Herbrecht, R., Moghaddam, A., Mahmal, L., Natarajan-Ame, S., Fornecker, L., and Letscher-Bru, V. (2005). Invasive aspergillosis in the hematologic and immunologic patient: new findings and key questions in leukemia. *Med Mycol*, 43:239–242.
- Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood mdc subsets exhibit distinct tlr repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol*, 93(4):599–609.
- Hope, W. W., Walsh, T. J., and Denning, D. W. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Diseases*, 10:609–622.
- Hou, B., Reizis, B., and DeFranco, A. L. (2008). Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity*, 29:272–282.
- Humrich, J. Y., Humrich, J. H., Averbeck, M., Thumann, P., Termeer, C., Kämpgen, E., Schuler, G., and Jenne, L. (2006). Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to ccl19 than to cxcl12: consequences for directional migration. *Immunology*, 117(2):238–247.
- Israel, H. L., M.D., Maj, Ostrow, A., and M.C. (1969). Sarcoidosis and aspergilloma. *American Journal of Medicine*, 47:243–250.

- Ito, J. I., Lyons, J. M., Hong, T. B., Tamae, D., Liu, Y.-K., Wilczynski, S. P., and Kalkum, M. (2006). Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. *Infection and Immunity*, 74:5075–5084.
- Janeway, C. A., Jr, Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2007). *Immunobiology*. Garland Science, 7 edition.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 31(11):3388–3393.
- Jiang, D., Liang, J., and Noble, P. W. (2011). Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*, 91:221–264.
- Jolink, H., Meijssen, I. C., Hagedoorn, R. S., Arentshorst, M., Drijfhout, J. W., Mulder, A., Claas, F. H. J., van Dissel, J. T., Falkenburg, J. H. F., and Heemskerk, M. H. M. (2013). Characterization of the t-cell-mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins crf1 and catalase 1 in healthy individuals. *J Infect Dis*, 208(5):847–856.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 27(12):3135–3142.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human tlr7 or tlr8 independently confer responsiveness to the antiviral compound r-848. *Nature Immunology*, 3:499–499.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y.-J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6):863–870.
- Kaisho, T. and Akira, S. (2003). Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Current Molecular Medicine*, 3:759–771.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven t-cell polarization. *Nature*, 3:984–993.
- Khader, S. A., Gaffen, S. L., and Kolls, J. K. (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*, 2:403–411.
- Khanna, N., Stuehler, C., Conrad, B., Lurati, S., Krappmann, S., Einsele, H., Berges, C., and Topp, M. S. (2011). Generation of a multipathogen-specific t-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of cd154. *Blood*, 118(4):1121–1131.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495–497.

- Kim, M.-H. and Joo, H.-G. (2008). Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology Letters*, 115(2):138–143.
- Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Park, B. J., Alexander, B. D., Anaissie, E. J., Walsh, T. J., Ito, J., Andes, D. R., Baddley, J. W., Brown, J. M., Brumble, L. M., Freifeld, A. G., Hadley, S., Herwaldt, L. A., Kauffman, C. A., Knapp, K., Lyon, G. M., Morrison, V. A., Papanicolaou, G., Patterson, T. F., Perl, T. M., Schuster, M. G., Walker, R., Wannemuehler, K. A., Wingard, J. R., Chiller, T. M., and Pappas, P. G. (2010). Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: Overview of the transplant-associated infection surveillance network (transnet) database. *Clinical Infectious Diseases*, 50(8):1091–1100.
- Kungl, J. (2012). Echtzeitfilmaufnahme der interaktion humaner dendritischer zellen mit dem pilzerreger *Aspergillus fumigatus*. Master's thesis, Julius-Maximilians Universität Würzburg, Medizinische Klinik II Universitätsklinik Würzburg.
- Kupiec-Weglinski, J. W., Austyn, J. M., and Moris, P. J. (1988). Migration patterns of dendritic cells in the mouse. traffic from the blood, and t cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine*, 167:632–645.
- Lass-Flörl, C., Roilides, E., Löffler, J., Wilflingseder, D., and Romani, L. (2013). Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses*, 56(4):403–413.
- Latgé, J.-P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2):310–350.
- Latgé, J.-P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*, 9:382–389.
- Lehrnbecher, T., Schmidt, S., Tramsen, L., and Klingebiel, T. (2013). Immunotherapy of invasive fungal infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Front Oncol*, 3:17.
- Liu, Y.-J. (2005). Ipc: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual Review of Immunology*, 23:275–306.
- Loeffler, J., Haddad, Z., Bonin, M., Romeike, N., Mezger, M., Schumacher, U., Kapp, M., Gebhardt, F., Grigoleit, G.-U., Stevanovic, S., Einsele, H., and Hebart, H. (2009). Interaction analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 58(1):49–58.
- Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., and Moingeon, P. (2009). Human dendritic cells stimulated via tlr7 and/or tlr8 induce the sequential production of il-10, ifn-gamma, and il-17a by naive cd4+ t cells. *J Immunol*, 182(6):3372–3379.
- Lothar, J., Breitschopf, T., Krappmann, S., Morton, C. O., Bouzani, M., Kurzai, O., Gunzer, M., Hasenberg, M., Einsele, H., and Loeffler, J. (2014). Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 340:1160–1168.

- Loures, F. V., Röhm, M., Lee, C. K., Santos, E., Wang, J. P., Specht, C. A., Calich, V. L., Urban, C. F., and Levitz, S. M. (2015). Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. *PLOS Pathogens*, pages 1–23.
- Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A. A., Heesemann, J., and Ebel, F. (2007). Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and toll-like receptor 2. *Cellular Microbiology*, 9(2):368–381.
- Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*, 23(9):445–449.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O’Garra, A. (1995). Dendritic cells produce il-12 and direct the development of th1 cells from naive cd4+ t cells. *J Immunol*, 154(10):5071–5079.
- Mackensen, A., Dräger, R., Schlesier, M., Mertelsmann, R., and Lindemann, A. (2000). Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 49:152–156.
- Madan, T., Kishore, U., Singh, M., Strong, P., Hussain, E. M., Reid, K. B. M., and Sarma, P. U. (2001). Protective role of lung surfactant protein d in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and Immunity*, 69(4):2728–2731.
- Marr, K. A., Patterson, T., and Denning, D. (2002). Aspergillosis. pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am*, 16(4):875–94.
- Mazzoni, A. and Segal, D. M. (2004). Controlling the toll road to dendritic cell polarization. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(5):721–730.
- McIlroy, D. and Gregoire, M. (2003). Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52(10):583–591.
- Medzhitov, A. I. . R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5:987–995.
- Medzhitov, R. and Janeway, Jr, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 173:89–97.
- Mezger, M., Kneitz, S., Wozniok, I., Kurzai, O., Einsele, H., and Loeffler, J. (2008). Pro-inflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *Journal of Infectious Diseases*, 197(6):924–931.
- Morton, C. O., Varga, J. J., Hornbach, A., Mezger, M., Sennefelder, H., Kneitz, S., Kurzai, O., Krappmann, S., Einsele, H., Nierman, W. C., Rogers, T. R., and Loeffler, J. (2011). The temporal dynamics of differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* interacting with human immature dendritic cells *In Vitro*. *PLoS Pathogens*, 6(1):1–22.

- Moser, M. and Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of th1-th2 development. *Nature Immunology*, 1:199–205.
- Mullins, J., Harvey, R., and Seaton, A. (1976). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (fres). *Clinical Allergy*, 6:209–217.
- Naik, S. H. (2008). Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunology and Cell Biology*, 86:439–452.
- Netea, M. G., Van der Meer, J. W. M., and Kullberg, B.-J. (2006). Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence.
- O’Gorman, C. M., Fuller, H. T., and Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457:471–476.
- O’Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L., and Shortman, K. (2003). Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-dc2 and cd11c+ dc1 precursors. *Blood*, 101:1453–1460.
- Osugi, Y., Vuckovic, S., and Hart, D. N. J. (2002). Myeloid blood cd11c+ dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate t lymphocytes. *Blood*, 100(8):2858–2866.
- Palucka, K. and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*, 12(4):265–277.
- Palucka, K., Banchereau, J., and Mellman, I. (2010). Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity*, 33(4):464–478.
- Park, S. J. and Mehrad, B. (2009). Innate immunity to aspergillus species. *Clin Microbiol Rev*, 22(4):535–551.
- Pashine, A., Valiante, N. M., and Ulmer, J. B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*, 11:63–68.
- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prevost, M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., Perez, M. S., der Meeren, A. V., and Latgé, J. P. (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and Immunity*, 71(6):3034–3042.
- Pähtz, V., Hermann, S., Hortschansky, P., Heinekamp, T., Strassburger, M., Naumann, K., Bacher, P., Scheffold, A., Lothar, J., Löffler, J., Krappmann, S., Nietzsche, S., Jacobsen, I. D., Einsele, H., Kniemeyer, O., Reichard, U., and Brakhage, A. A. (2015). Surface proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* resting conidia reveals the highly abundant, fungus-specific immunomodulating protein afccpa essential for virulence. *In preparation*.
- Podrazil, M., Horvath, R., Becht, E., Rozkova, D., Bilkova, P., Hromadkova, H., Kayserova, J., Vavrova, K., Lastovicka, J., Vrabцова, P., Kubackova, K., Gasova, Z., Jarolim, L., Babjuk, M., Spisek, R., Bartunkova, J., and Fucikova, J. (2015). Phase i/ii clinical

- trial of dendritic-cell based immunotherapy (dcvac/pca) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 5:1949–1953.
- Prechtel, A. T., Turza, N. M., Theodoridis, A. A., and Steinkasserer, A. (2007). Cd83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering rna leads to a diminished t cell stimulation. *The Journal of Immunology*, 178(9):5454–5464.
- Pucchio, T. D., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., and Y Xue, M. M., Mellman, I., Banachereau, J., and Connolly, J. E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class i. *Nat Immunol*, 9:551–557.
- Ramirez-Ortiz, Z. G., Lee, C. K., Wang, J. P., Boon, L., Specht, C. A., and Levitz, S. M. (2011). A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Cell Host and Microbe*, 9:415–424.
- Ramirez-Ortiz, Z. G., Specht, C. A., Wang, J. P., Lee, C. K., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., and Levitz, S. M. (2008). Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated cpg motifs in *Aspergillus fumigatus* dna. *Infection and Immunity*, 76:2123–2129.
- Röck, J., Schneider, E., Grün, J. R., Grützkau, A., Küppers, R., Schmitz, J., and Winkels, G. (2007). Cd303 (bdca-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a bcr-like signalosome involving syk, slp65 and plc2. *European Journal of Immunology*, 37(12):3564–3575.
- Robinson, S. P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S. C., and Reid, C. D. L. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 29(9):2769–2778.
- Rogers, T. R., Morton, C. O., Springer, J., Conneally, E., Heinz, W., Kenny, C., Frost, S., Einsele, H., and Loeffler, J. (2013). Combined real-time pcr and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 161(4):517–524.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4:11–24.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 11(4):275–288.
- Royer, P.-J., Tan-Royer, S. S., Ebstein, F., Sapede, C., Simon, T., Barbieux, I., Oger, R., and Gregoire, M. (2006). Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Immunological Methods*, 63:401–409.
- Ruhnke, M. (2007). *Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten*. UNI-MED Verlag AG, 2 edition.
- Sales-Campos, H., Tonani, L., Cardoso, C. R. B., and Kress, M. R. V. Z. (2013). The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *BioMed Research International*, pages 1–14.

- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 179:1109–1118.
- Sarfati, J., Monod, M., Recco, P., Sulahian, A., Pinel, C., Candolfi, E., Fontaine, T., Debeaupuis, J.-P., Tabouret, M., and Latgé, J.-P. (2006). Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 55(4):279–291.
- Sato, K., Yang, X., and Yudate, T. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*, 281:338–354.
- Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A. I., and Davis, C. E. (1983). Killing of aspergillus spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infection and Immunity*, 42(3):1109–1115.
- Schmidt, S., Tramsen, L., Hanisch, M., Latge, J.-P., Huenecke, S., Koehl, U., and Lehrnbecher, T. (2011). Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *The Journal of Infectious Diseases*, 203:430–435.
- Schütt, C. and Bröker, B. (2009). *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Schuster, S., Hurrell, B., and Tacchini-Cottier, F. (2013). Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol*, 94:671–675.
- Scotter, J., Campbell, P., Anderson, T., Murdoch, D., Chambers, S., and Patton, W. (2005). Comparison of PCR-ELISA and galactomannan detection for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Pathology*, 37:246–253.
- Selvaggi, T. A., Walker, R. E., and Fleisher, T. A. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89(3):776–779.
- Serrano-Gómez, D., Domínguez-Soto, A., Ancochea, J., Jimenez-Heffernan, J. A., Leal, J. A., and Corbí, A. L. (2004). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(9):5635–5643.
- Snelders, E., van der Lee, H. A. L., Kuijpers, J., Rijs, A. J. M. M., Varga, J., Samson, R. A., Mellado, E., Donders, A. R. T., Melchers, W. J. G., and Verweij, P. E. (2008). Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*, 5(11):e219.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998). High-level il-12 production by human dendritic cells requires two signals. *International Immunology*, 10(11):1593–1598.

- Soumelis, V. and Liu, Y.-J. (2006). From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *European Journal of Immunology*, 36:2286–2292.
- Springer, J., Morton, C. O., Perry, M., Heinz, W. J., Paholcsek, M., Alzheimer, M., Rogers, T. R., Barnes, R. A., Einsele, H., Loeffler, J., and White, P. L. (2013). Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of aspergillus dna in high-risk hematological patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5):1445–1450.
- Steele, C., Rapaka, R. R., Metz, A., Pop, S. M., Williams, D. L., Gordon, S., Kolls, J. K., and Brown, G. D. (2005). The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 1(4):323–334.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review in Immunology*, 9:271–296.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice i: Morphology, characterisation, distribution. *The Journal of Experimental Medicine*, 137:1142–1163.
- Stern, R., Asari, A. A., and Sugahara, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8):699–715.
- Stevens, D. A. (2006). Th1/th2 in aspergillosis. *Medical Mycology*, 44:229–235.
- Stuehler, C., Khanna, N., Bozza, S., Zelante, T., Moretti, S., Kruhm, M., Lurati, S., Conrad, B., Worschech, E., Stevanovi, S., Krappmann, S., Einsele, H., Latgé, J.-P., Loeffler, J., Romani, L., and S.Topp, M. (2011). Cross-protective th1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and candida albicans. *Blood*, 117(22):5881–5891.
- Tacken, P. J., de Vries, J. M., Torensma, R., and Figdor, C. G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology*, 7:790–802.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of {TLR2} and {TLR4} in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4):443–451.
- Tan, S. M., Kapp, M., Flechsig, C., Kapp, K., Rachor, J. E., Eyrich, M., Loeffler, J., Einsele, H., and Grigoleit, G. U. (2013). Stimulating surface molecules, th1-polarizing cytokines, proven trafficking-a new protocol for the generation of clinical-grade dendritic cells. *Cytotherapy*, 15(4):492–506.
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S. Y. C. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, 169(7):3876–3882.
- Taylor, P. R., Tsoni, S. V., Willment, J. A., Dennehy, K. M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., and Brown, G. D. (2006). Dectin-1 is required for bold beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology*, 8:31–38.



- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1):99–111.
- Termeer, C. C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., M. Weiss, J., Prehm, P., and Simon, J. C. (2000). Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 165(4):1863–1870.
- Teutschbein, J., Simon, S., Springer, J., Morton, J. L. C. O., Löffler, J., Einsele, H., Rogers, T. R., Brakhage, A. A., and Kniemeyer, O. (2015). Proteomic profiling of serological responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in patients with invasive aspergillosis. *In preperation*.
- Thomas, R., Davis, L. S., and Lipsky, P. E. (1993). Comparative access cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes. *Journal of Immunology*, 151:6840–6852.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., Ni, L., Flamar, A.-L., Zurawski, S., Zurawski, G., Palucka, K., Banchereau, J., and Oh, S. (2011). Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Semin Immunol*, 23(1):21–27.
- Ullmann, A. J., Heussel, C. P., and Cornely, O. A. (2002). Voriconazole versus liposomal amphotericin b for empirical antifungal therapy. *N Engl J Med*, 346(22):1745–1747.
- Ullmann, A. J., Lipton, J. H., Vesole, D. H., Chandrasekar, P., Langston, A., Tarantolo, S. R., Greinix, H., Morais de Azevedo, W., Reddy, V., Boparai, N., Pedicone, L., Patino, H., and Durrant, S. (2007). Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 356(4):335–347.
- Varga, J. (2003). Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, 149(4):816–819.
- Verweij, P. E., Mellado, E., and Melchers, W. J. G. (2007). Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med*, 356(14):1481–1483.
- Verweij, P. E., Snelders, E., Kema, G. H., Mellado, E., and Melchers, W. J. (2009). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infectious Diseases*, 9:789–795.
- Watts, C., West, M. A., and Zaru, R. (2010). TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 22(1):124–130.
- Watts, C., Zaru, R., Prescott, A. R., Wallin, R. P., and West, M. A. (2007). Proximal effects of toll-like receptor activation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 19(1):73–78.
- Wehner, R., Dietze, K., Bachmann, M., and Schmitz, M. (2011). The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun*, 3(3):258–263.

- Wierecky, J., Müller, M. R., Withs, S., Halder-Oehler, A., Dorfel, D., Schmidt, S. M., Häntschel, M., Brugger, W., Schröder, S., Horger, M. S., Kanz, L., and Brossart, P. (2006). Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res*, 66:5910–5918.
- Wykes, M. and Macpherson, G. (2000). Dendritic cell-b-cell interaction: dendritic cells provide b cells with cd40-independent proliferation signals and cd40-dependent survival signals. *Immunology*, 100:1–3.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998). Ebi1/ccr7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol*, 161(6):3096–3102.
- Yang L, C. D. (2004). Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res*, 92:13–27.
- Yuan, J., Kashiwagi, S., Reeves, P., Nezivar, J., Yang, Y., Arrifin, N. H., Nguyen, M., Jean-Mary, G., Tong, X., Uppal, P., Korochkina, S., Forbes, B., and Elda Righi, T. C., Bronson, R., Chen, H., Orsulic, S., Brauns, T., Leblanc, P., Scholler, N., Dranoff, G., Gelfand, J., and Poznansky, M. C. (2014). A novel mycobacterial hsp70-containing fusion protein targeting mesothelin augments antitumor immunity and prolongs survival in murine models of ovarian cancer and mesothelioma. *Journal of Hematology & Oncology*, 15:1–14.
- Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1996). Cd14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature cd83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6):2588–2592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberic, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., and Lutz., M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, pages 1–20.
- Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I., and Schendel, D. J. (2007). Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active il-12p70. *Journal of Translational Medicine*, 5:18–29.



## A Anhang

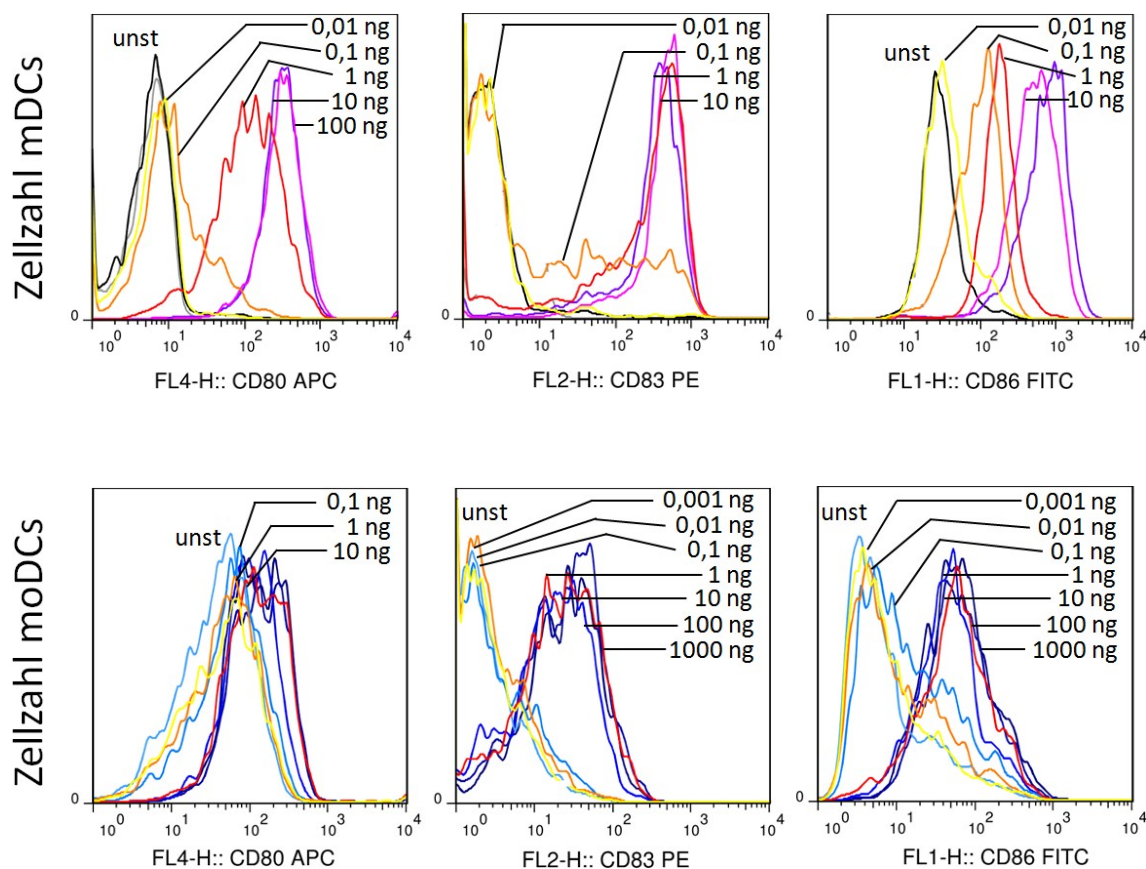
### A.1 Multiplex-ELISA Ergebnisse von mit Aspergillus konfrontierten moDCs, mDCs und pDCs

**Tabelle A.1: Die Aspergillus-Konfrontation veranlasste moDCs und mDCs zur Zytokinsekretion, pDCs induzierten nahezu keine Zytokine.** Konidien (con) induzierten bei moDCs und mDCs weniger Zytokine als Keimschläuche (gt). moDCs induzierten IL8 sehr stark, wobei die Endkonzentration der von mDCs ähnelte. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL6, IL17, IL18, IFN $\gamma$ , CXCL1 und TNF $\alpha$  wurden von moDCs und mDCs relativ ähnlich induziert. Auch induzierten sie das Th1 induzierende IL12p70 und das chemotaktische Zytokin CCL3. Tendenziell induzierten Aspergillus konfrontierte pDCs pro-inflammatorisches IL8, GM-CSF, und CCL4. Jedoch war deren Konzentration geringer, als bei moDCs und mDCs. Das für pDCs typische Zytokin IFN $\alpha$  wurde durch Aspergillus nicht induziert.

Zytokine [pg/ml]	moDCs			mDCs			pDCs		
	unst	con	gt	unst	con	gt	unst	con	gt
IL1B (IL1 $\beta$ )	2,24 $\pm$ 2,34	<b>9,93*</b> $\pm$ <b>3,91</b>	193,19 $\pm$ 153	3,78 $\pm$ 4,87	68,61 $\pm$ 46	1763 $\pm$ 1247	< 0,44	0,46 $\pm$ 0,03	2,12 $\pm$ 1,24
IL1RA (IL1ra)	281,57 $\pm$ 303	444,85 $\pm$ 203	<b>1287*</b> $\pm$ <b>488</b>	47,26 $\pm$ 27	156,93 $\pm$ 70	<b>404**</b> $\pm$ <b>126</b>	<18,18	< 18,18	< 18,18
IL4	5,76 $\pm$ 0,02	6,15 $\pm$ 0,65	<b>7,81*</b> $\pm$ <b>1,19</b>	0,73 $\pm$ 0,13	1,22 $\pm$ 0,30	<b>2,15**</b> $\pm$ <b>0,33</b>	0,27 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,10	< 0,19
IL6	9,30 $\pm$ 7,49	<b>62*</b> $\pm$ <b>29</b>	281,81 $\pm$ 183	30,59 $\pm$ 24	91,24 $\pm$ 54	<b>494**</b> $\pm$ <b>97</b>	< 1,21	1,22 $\pm$ 0,01	2,43 $\pm$ 0,83
IL8	293,33 $\pm$ 344	<b>2532*</b> $\pm$ <b>1212</b>	> <b>19323,2</b>	1738 $\pm$ 1468	<b>&gt;23164</b> <b>**</b>	<b>&gt;26254</b> <b>***</b>	6,06 $\pm$ 0,30	19,82 $\pm$ 11	74,38 $\pm$ 44
IL10	1,18 $\pm$ 0,20	3,73 $\pm$ 1,58	77,39 $\pm$ 62	1,11 $\pm$ 0,71	7,07 $\pm$ 5,71	<b>23,44***</b> $\pm$ <b>3</b>	< 0,38	< 0,38	< 0,38
IL12B (IL12p40)	< 15,05	< 40,97	< 168,78	52,68 $\pm$ 2	61,27 $\pm$ 26	77,06* $\pm$ 8	24,50 $\pm$ 12	37,30 $\pm$ 29	12,28 $\pm$ 2
IL12AB (IL12p70)	2,89 $\pm$ 0,92	6,28 $\pm$ 3,35	<b>15,77*</b> $\pm$ <b>5</b>	3,95 $\pm$ 1,18	8,25 $\pm$ 3,59	<b>8,25**</b> $\pm$ <b>0,64</b>	< 0,56	< 0,56	0,77 $\pm$ 0,00
IL15	< 0,39	1,13 $\pm$ 0,55	1,63 $\pm$ 1,00	< 0,39	<b>0,81*</b> $\pm$ <b>0,43</b>	<b>1,11***</b> $\pm$ <b>0,1</b>	< 0,39	< 0,39	< 0,39
IL17	9,10 $\pm$ 5,38	19,69 $\pm$ 4,60	<b>34,43**</b> $\pm$ <b>7</b>	6,61 $\pm$ 1,07	<b>17,85***</b> $\pm$ <b>1</b>	<b>23,35**</b> $\pm$ <b>4</b>	< 5,99	< 5,99	< 5,99
IL18	0,85 $\pm$ 0,59	2,05 $\pm$ 1,30	12,94 $\pm$ 8	2,12 $\pm$ 0,64	12,29 $\pm$ 6	<b>103*</b> $\pm$ <b>46</b>	1,32 $\pm$ 0,12	1,66 $\pm$ 0,08	1,51 $\pm$ 0,21
CSF3 (G-CSF)	26,33 $\pm$ 21	60,92 $\pm$ 2	78,04 $\pm$ 24	21,42 $\pm$ 4	<b>50,85*</b> $\pm$ <b>15</b>	<b>77,23**</b> $\pm$ <b>18</b>	< 4,38	< 4,38	< 4,38
CSF1 (M-CSF)	12,22 $\pm$ 16	42,05 $\pm$ 12	<b>184,3*</b> $\pm$ <b>103</b>	1,54 $\pm$ 0,08	3,21 $\pm$ 1,06	<b>12,15*</b> $\pm$ <b>4</b>	1,25 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,28	1,66 $\pm$ 0,37
CSF2 (GM-CSF)	4,43 $\pm$ 1,74	13,58 $\pm$ 5	130,89 $\pm$ 122	3,64 $\pm$ 0,14	<b>7,65**</b> $\pm$ <b>1,02</b>	<b>41,82***</b> $\pm$ <b>7</b>	1,08 $\pm$ 0,41	3,48 $\pm$ 0,00	3,59 $\pm$ 1,24

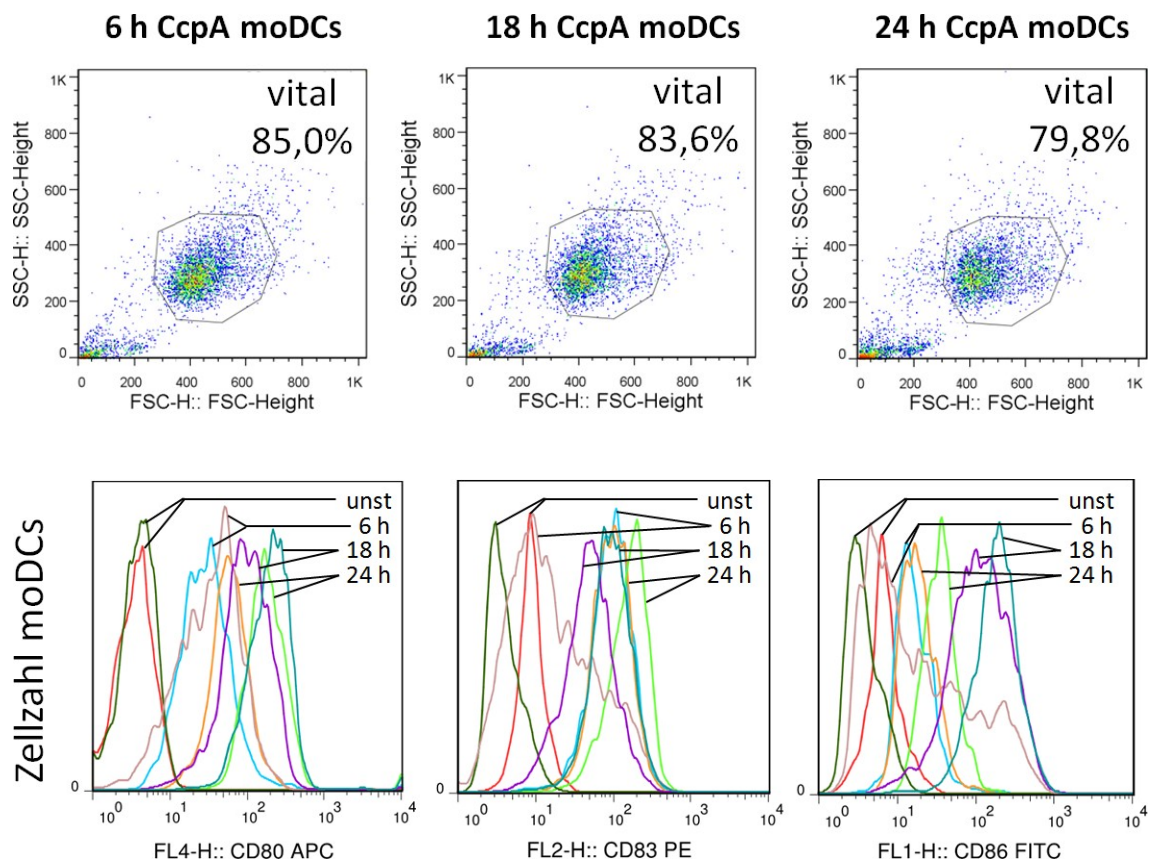
Zytokine [pg/ml]	moDCs			mDCs			pDCs		
	unst	con	gt	unst	con	gt	unst	con	gt
CCL7 (MCP3)	< 4,99	< 5,42	< 6,71	< 1,04	2,56 ± 1,30	< 2,14	< 1,04	< 1,04	< 1,04
CCL3 (MIP1 $\alpha$ )	153,96 ± 252	<b>797*</b> ± 199	> <b>1262,00*</b>	8,32 ± 13,47	384 ± 358	<b>&gt;1337</b> ***	< 1,28	< 1,36	2,46 ± 1,53
CCL4 (MIP1 $\beta$ )	> 1234	> 3200	> 3200	657,94 ± 693	<b>&gt;2687 *</b>	<b>&gt;3200 **</b>	3,67 ± 1,20	10,37 ± 6,08	32,93 ± 22
CCL5 (RANTES)	6,92 ± 4,40	12,88 ± 2,14	<b>41,00*</b> ± 20	4,98 ± 19	55,85 ± 25	84,41 ± 31	3,59 ± 0,00	2,81 ± 0,39	<b>4,16* ±</b> <b>0,16</b>
TNF (TNF- $\alpha$ )	26,68 ± 32	<b>528*</b> ± 278	13268 ± 10113	7,20 ± 6,05	<b>204***</b> ± 30	<b>3137 **</b>	< 2,14	2,61 ± 1,69	9,3 ± 8,43
VEGFA (VEGF)	8,89 ± 1,99	25,89 ± 14	<b>72,16*</b> ± 36	35,09 ± 17	77,10 ± 29	<b>89,85* ±</b> <b>20</b>	< 1,78	< 1,78	< 1,78
CXCL1 (GRO $\alpha$ )	7,50 ± 0,00	40,64 ± 29	397,24 ± 344	9,36 ± 3,23	158 ± 124	<b>359**</b> ± 97	< 7,50	< 7,50	< 7,50
IFNA2 (INF $\alpha$ )	17,47 ± 10	25,16 ± 6,73	<b>40,1*</b> ± 5,05	8,16 ± 1,05	7,83 ± 0,64	8,33 ± 2,57	5,57 ± 0,37	7,65 ± 0,78	6,75 ± 2,05

## A.2 LPS Stimulationen



**Abbildung A.1: Stimulationsexperimente mit LPS zur Festlegung der Obergrenze einer Endotoxin-Verunreinigung.** moDCs und mDCs wurden für 18 h in CellGro Medium mit den angegebenen Konzentrationen an LPS stimuliert. Die Analyse der Maturierungsmarker CD80, CD83 und CD86 erfolgte am Durchflusszytometer. Sobald eine erhöhte Expression der Marker messbar war, wurde diese LPS-Konzentration als zu hoch für die Stimulationsexperimente mit Aspergillus-Antigenen angesehen. Bereits 0,1 ng/ml LPS induzierte bei mDCs CD83 und CD86. moDCs induzierten mit 0,1 ng/ml LPS CD86. Da mit 0,01 ng/ml LPS stimulierte mDCs und moDCs keine der Maturierungsmarker induzierten, wurde die LPS-Konzentration als Obergrenze für alle Antigenstimulationen festgelegt.

### A.3 Zeitverlauf-Experimente für Antigen-Stimulation der DCs



**Tabelle A.2: Eine Stimulation der moDCs mit CcpA erbrachte nach 18 h die beste Maturierung und Vitalität.** moDCs wurden in RPMI Medium mit 10% FCS für 6 h, 18 h und 24 h mit 5 µg/ml CcpA Protein stimuliert. Danach wurden sie im Durchflussszytometer hinsichtlich ihrer Vitalität und Maturierung analysiert. Zellen, die sich im FSC-SSC-Punktendiagramm als einheitliche Zellpopulation anordneten, wurden als vitale Zellen angesehen. Die Punktendiagramme zeigen einen repräsentativen Spender von 3 Spendern. Die Vitalität der moDCs nahm mit steigender Inkubationsdauer ab. Die Maturierung wurde mithilfe der Maturierungsmarker CD80, CD83 und CD86 bestimmt. Gezeigt sind die Histogramme von 2 repräsentativen Spendern. Die Marker wurden von unstimulierten moDCs nahezu nicht exprimiert. Die Stimulation mit CcpA für 6 h induzierte die Expression aller Marker, die nach 18 h und 24 h noch weiter erhöht wurde. CD86 war nach 18 h am höchsten exprimiert und nach 24 h bereits reduziert. Dies kann auf eine Rückkehr der DCs in den homöostatischen Zustand hinweisen. Aufgrund der guten Vitalität und Maturierung der moDCs nach einer 18 h Stimulation wurden alle folgenden Stimulationen für 18 h inkubiert.

## A.4 Lebenslauf und Veröffentlichungen

– CURRICULUM VITAE –  
Jasmin Lothar

<p><b>Name</b> Jasmin Lothar</p> <p><b>Address</b> Grombühlstraße 41 97080 Würzburg</p> <p><b>Email</b> jasmin.lothar@gmx.de</p> <p><b>Phone</b> 0049 17621306957</p>	
---	--

### SINCE 05/2012

PhD Student

Graduate School of Life Sciences (GSLS) and Medical Clinic and Policlinic II of University Clinic Würzburg, Germany

Topic: Interaction of different dendritic cell subtypes with the pathogenic mould fungus *Aspergillus fumigatus*

- Graduate Program Immunomodulation 2012 - 2015
- Mentoring Program Life Sciences 2012 – 2013
- Participated courses: writing project proposals and publications, scientific poster presentation, good scientific practice, copyright, conflict management
- Supervision of three medical PhD-students

### 2007-2012

Master of Science

Medical Clinic and Policlinic II of University Clinic Würzburg

Topic: Real time imaging of the interaction of human dendritic cells with the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*

Academic Studies  
in Biology

Julius-Maximilians-University of Würzburg

- Supervision of the microbiological practical course „The prokaryotic cell“ for Biology Bachelor students
- Lecturer of the course „Cancer – from origin to therapy“ for 20 students of Biology

### 2004-2007

Apprenticeship  
Biological Laboratory Technician

German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

- Tumor-virus-specific strategies for vaccination
- Toxicology and Cancer risk factors
- Tumor virology (virus production)
- Cell biology

### 2004

Abitur

Christiane-Herzog-Schule, Heilbronn, Germany

- Advanced courses Biology and Chemistry
- Voluntary course Biotechnology



## – CIRRICULUM VITAE –

Jasmin Lothar

## KONFERENZBEITRÄGE

- 2012** DGHM Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Poster  
EPOS - Everything is Part Of Science, Symposium der GSLS Würzburg, Poster  
DGHO Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Poster
- 2013** Translational Immunology - Symposium des Else Kröner-Forschungskollegs Würzburg, Poster  
ICI - Internationale Konferenz für Immunologie, Poster  
DGfI Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, GSLS-Stipendium + Poster  
EMDS Jahrestreffen der Europäischen Gesellschaft für Makrophagen und Dendritische Zellen, Poster
- 2014** Winterschule für Translationale Immunologie, COST Stipendium + Poster  
EMDS Jahrestreffen der Europäischen Gesellschaft für Makrophagen und Dendritische Zellen, GSLS-Stipendium + Poster  
HGG Jahrestreffen „Hoch-gradiges Glioblastom“, Vortrag

## STIPENDIEN

- 2013** GSLS-Reisestipendium für das Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Immunologie
- 2014** COST Stipendium für die Winterschule für Translationale Immunologie  
GSLS-Reisestipendium für die Winterschule für Translationale Immunologie  
GSLS-Reisestipendium für das Jahrestreffen der Europäischen Gesellschaft für Makrophagen und Dendritische Zellen

## PUBLIKATIONEN

- 2014** **Jasmin Lothar**, Tanja Breitschopf, Sven Krappmann, C. Oliver Morton, Maria Bouzani, Oliver Kurzai, Matthias Gunzer, Mike Hasenberg, Hermann Einsele, Juergen Loeffler. **Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus***. Int J Med Microbiol. 2014 Nov; 304(8): 1160-8. Doi: 10.1016/j.ijmm2014.08.009
- 2015** Janka Teutschbein, Svenja Simon, **Jasmin Lothar**, Jan Springer, Peter Hortschansky, C. Oliver Morton, Jürgen Löffler, Hermann Einsele, Eibhlin Conneally, Tom R. Rogers, Axel A. Brakhage, Olaf Kniemeyer. **Proteomic profiling of serological responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in patients with invasive aspergillosis**. Eingereicht beim J. of Proteome Research
- Vera Pähtz, Sahra Hermann, Peter Hortschansky, Thorsten Heinekamp, Maria Strassburger, Kai Naumann, Petra Bacher, Alexander Scheffold, **Jasmin Lothar**, Jürgen Löffler, Sven Krappmann, Sandor Nietzsche, Ilse D. Jacobsen, Hermann Einsele, Olaf Kniemeyer, Utz Reichard, Axel A. Brakhage. **Surface proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* resting conidia reveals the highly abundant, fungus-specific immune-modulating protein AfCcpA essential for virulence**. Manuskript in Vorbereitung
- Jasmin Lothar**, Olaf Kniemeyer, Hermann Einsele, Juergen Loeffler. **Shm2 and CcpA, two *Aspergillus* proteins useful for the establishment of anti-fungal dendritic cell immunotherapy**. Manuskript in Vorbereitung

## A.5 Danksagung

Im Anschluss möchte ich all denen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Jürgen Löffler für die Themenstellung, die Betreuung und Finanzierung meiner Arbeit
- Meinem Promotionskomitee Prof. Dr. Jürgen Löffler, Prof. Dr. Thomas Hünig und Prof. Dr. Sven Krappmann für die vielen fachlichen und hilfreichen Ratschläge zu meinem Projekt
- Meinen Kollegen Anna-Lena Schmitt, Maria Bouzani, Sabrina Brüggemann, Kristin Czakai, Mirjam Fließer, Denise Michel, Ruth Bauer, Tanja Breitschopf, Oana Butto, Hannes Schlossnagel und Jan Springer danke ich für ihre unermüdliche Hilfe, hilfreiche Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima
- Maike Hefter, Carolin Halbing und Anna Hellmann für die nette Zusammenarbeit während ihrer medizinischer Doktorarbeiten
- Sebastian Wurster für die Hilfe bei der CD154-Expressionsanalyse, Julia Wegner für die Einführung und Hilfe bei den ELISpot Analysen und Prof. Dr. Frank Ebel für die Ratschläge in Proteinfragen
- allen Arbeitsgruppen in C11 für die allgemein große Hilfsbereitschaft und ein sehr angenehmes Arbeitsklima
- für das sowohl fachliche als auch sprachliche Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Sylvia Kungl, Sonja Boyer, Anne Kartäusch, Steffen Lothar, Maike Hefter, Carolin Halbing, Christina Popp und Amy-Jayne Hutchings
- meinen Freunden danke ich für ihre offenen Ohren und hilfreiche Ratschläge
- meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung in meinem Leben und das große Interesse an meiner Arbeit
- mein größter Dank geht an meinen Schatz Steffen, für sein Verständnis, Psycho-Pinnball und die tolle Unterstützung vor, während und bestimmt auch nach der Dissertation

## A.6 Eidesstattliche Erklärung

### Eidesstattlich Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Interaktion dendritischer Zell-Subtypen mit dem human pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Interaction of dendritic cell subtypes with the human pathogenic mould fungus *Aspergillus fumigatus*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature