

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

**Analyse der Interaktion humaner dendritischer Zellen  
und natürlicher Killerzellen mit dem Schimmelpilz  
*Aspergillus fumigatus* mittels Echtzeitmikroskopie**

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

vorgelegt von  
Carolin Halbing  
aus Lindau am Bodensee

Würzburg, November 2017





Referent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler  
Korreferent: Professor Dr. med. Oliver Kurzai  
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2018

Die Promovendin ist Zahnärztin.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das humane Immunsystem .....	1
1.1.1	Grundlagen .....	1
1.1.2	Dendritische Zellen .....	2
1.1.3	Natürliche Killerzellen.....	3
1.1.4	NK-Effektormoleküle .....	4
1.2	Der humanpathogene Schimmelpilz <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	6
1.2.1	Biologie und Lebenszyklus .....	7
1.2.2	Medizinische Relevanz .....	8
1.3	Die Immunabwehr in Bezug auf <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	9
1.4	Zielsetzung .....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	Material.....	13
2.1.1	Primäre Immunzellen .....	13
2.1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i> -Stämme.....	13
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.4	Geräte .....	17
2.1.5	Computersoftware .....	17
2.2	Methoden .....	18
2.2.1	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer .....	18
2.2.2	Gewinnung von Immuneffektorzellen.....	19
2.2.3	Herstellung von NK-Zellkulturüberständen.....	24
2.2.4	Kultivierung und Ernte der <i>Aspergillus fumigatus</i> -Stämme.....	25
2.2.5	Live-imaging Mikroskopie (Echtzeitmikroskopie) .....	26

2.2.6	Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie .....	27
2.2.7	Statistische Analysen .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Reinheitskontrolle der isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie .	29
3.1.1	Monozyten direkt nach Isolation.....	29
3.1.2	Generierung von moDCs aus Monozyten.....	30
3.1.3	Unstimulierte und voraktivierte natürliche Killerzellen .....	31
3.2	Konfrontationsuntersuchungen im Live-imaging .....	34
3.2.1	MoDCs kontaktieren und phagozytieren <i>A. fumigatus</i> -Morphologien ...	35
3.2.2	NK-Zellen kontaktieren <i>A. fumigatus</i> -Morphologien, phagozytieren diese jedoch nicht.....	39
3.2.3	NK-Überstände sind nicht für erniedrigte Kontakte zwischen moDCs und Konidien verantwortlich.....	42
3.2.4	MoDCs kontaktieren und phagozytieren <i>A. fumigatus</i> -Morphologien der Mutante $\Delta$ RodA in gleicher Weise wie diejenigen des Wildtyps.....	46
3.2.5	NK-Effektormoleküle steigern die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien .....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
4.1	Aktueller Stand der Forschung .....	58
4.2	Isolierung und durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen.....	59
4.3	Wechselwirkungen zwischen moDCs und <i>A. fumigatus</i> .....	60
4.4	Wechselwirkungen zwischen NK-Zellen und <i>A. fumigatus</i> .....	62
4.5	Interaktion von moDCs, NK-Zellen und <i>A. fumigatus</i> in Kokultur .....	63
4.6	Wirkung von NK-Überständen auf moDCs .....	67
4.7	Wirkung verschiedener NK-Effektoren auf moDCs .....	68
4.8	Ausblick .....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	72
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	78
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>81</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	81
7.2	Tabellenverzeichnis.....	83
7.3	CD mit exemplarischer Live-imaging Aufnahme .....	84



# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein Abwehrsystem, das dem Körper Schutz vor Krankheitserregern bietet und eingedrungene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze, sowie Parasiten bekämpft. Darüber hinaus ist es in der Lage, entartete, körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Es setzt sich aus Immunorganen, Immunzellen und spezialisierten Proteinen (z.B. Antikörper) zusammen, welche ein komplexes Netzwerk bilden.

### 1.1.1 Grundlagen

Das Immunsystem gliedert sich in zwei Komponenten, dem zellulären und dem humoralen Immunsystem. Zum zellulären Immunsystem zählen alle Immunzellen wie Monozyten, dendritische Zellen (DCs), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und Lymphozyten. Diese Immunzellen befinden sich entweder ortsfest oder frei beweglich in den verschiedenen Geweben. Das humorale Immunsystem setzt sich hingegen aus allen nicht zellulären Bestandteilen zusammen. Hierzu gehören spezialisierte Proteine, Komplementfaktoren und Zytokine.

Zusätzlich besteht eine Einteilung in das angeborene und das adaptive Immunsystem. Die angeborene Immunantwort umfasst die erregerspezifische Abwehr gegen körperfremde Zellen. Sie ist genetisch festgelegt und besteht neben den anatomischen und physiologischen Barrieren aus dem Komplementsystem und Immunzellen. Einen effektiveren Schutz erlangt der Körper durch die adaptive Immunabwehr. Diese ist spezifisch gegen Erreger gerichtet und demzufolge komplexer als die angeborene Immunabwehr. Wesentliche Bestandteile bilden antigenpräsentierende Zellen (APCs, *engl. antigen-presenting cells*), T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. APCs leiten die T- und B-Lymphozyten zur spezifischen Immunantwort an, welche die Erreger unmittelbar eliminieren oder alternativ Antikörper gegen diese sekretieren.

Durch diese hochdifferenzierte Feinregulation wird ein effektiver Schutz gegen Krankheitserreger gewährleistet. Nachfolgend werden die Zellen und Stoffe erläutert, die für das Verständnis dieser Arbeit relevant sind.

### **1.1.2 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen (DCs, *engl. dendritic cells*) entstammen den blutbildenden Zellen aus dem Knochenmark und können im gesamten Körper nachgewiesen werden (Wright-Browne et al., 1997). Überwiegend siedeln sie sich in Geweben wie Haut und Schleimhäuten an, die in direktem Kontakt zur Umwelt stehen (Hart, 1997). Sie gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen und ermöglichen die Anleitung und Stimulation verschiedener Immunreaktionen. Es bestehen unterschiedliche Subpopulationen, die sich entweder aus Monozyten oder aus Vorläufern von B- und T-Lymphozyten ableiten (Cella et al., 1997). Ihre Hauptfunktion liegt im Erkennen und Präsentieren von Antigenen. Über die Blutbahnen wandern sie als naive Zellen in die Gewebe ein, in denen sie kontinuierlich und unspezifisch durch Makropinozytose Substanzen aufnehmen. Ihre Aktivierung und Migration in Lymphknoten erfolgt unmittelbar nach der Erkennung von Erregern. In den Lymphknoten präsentieren DCs die Antigene über MHC-Moleküle an T- und B-Lymphozyten (Banchereau und Steinman, 1998). Durch die Ausbildung ihrer typischen Zellausläufer, den Dendriten, kontaktieren sie in kurzer Zeit eine Vielzahl an T- und B-Lymphozyten. Hieraus erfolgt eine effiziente Auswahl der antigenspezifischen Zellklone (Friedl und Gunzer, 2001). Die T- und B-Lymphozyten werden zur adaptiven Immunreaktion gegen den Erreger aktiviert. DCs verbinden dementsprechend das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem.

Die Freisetzung von bestimmten Zytokinen durch DCs stimuliert besonders die Proliferation von T-Lymphozyten (Guermontez et al., 2002), wodurch die DCs zum potentesten Aktivator für naive T-Lymphozyten werden (Schütt und Bröker, 2011). Zusätzlich interagieren DCs mit B-Lymphozyten und NK-Zellen (Lucas et al., 2007). Dies ermöglicht unter anderem die Anregung zur Zytokinproduktion und Proliferation, sowie eine Steigerung des zytotoxischen Potenzials der NK-Zellen über die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-15 und IL-18 (Walzer et al., 2005). Die DCs, welche in der

vorliegenden Forschungsarbeit experimentelle Anwendung fanden, werden als moDCs (von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen) bezeichnet. Aufgrund der begrenzt zur Verfügung stehenden DCs im human-peripheren Blut, wurden sie *in vitro* aus Monozyten generiert.

### **1.1.3 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen, *engl. natural killer cells*) sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems. Sie können infizierte Zellen, Tumorzellen und durch Antikörper markierte Zellen eliminieren, indem sie die Apoptose in der Zielzelle durch die Sekretion ihrer zytotoxischen Granula auslösen (Schütt und Bröker, 2011). Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten besitzen NK-Zellen keine spezifischen Antigen-Rezeptoren. Sie charakterisieren sich durch die Rezeptoren CD16 und CD56 auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich kennzeichnend ist die Abwesenheit des Proteins CD3. Hierdurch differenzieren sich NK-Zellen von NK-T-Zellen, einer Subpopulation der T-Lymphozyten mit NK-Zell-Eigenschaften. Zu ihren wichtigsten Rezeptoren zählen der aktivierende Rezeptor NKp46, sowie die inhibierenden Rezeptoren der KIR-Familie.

Die Proteinsynthese der Körperzellen wird in der Regel von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) überwacht. Dies erfolgt über die Präsentation von MHC-I-Molekülen an der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen, die dem spezifischen Immunsystem eine Kontrolle auf Befehl durch Viren oder Tumorproteine ermöglicht. Allerdings kann die MHC-I-Präsentation der Zellen beispielsweise durch ein Virus unterdrückt werden, sodass die entsprechenden Kontrollmechanismen der CTLs aussetzen. In diesem Zusammenhang nehmen NK-Zellen eine relevante Rolle in der Immunabwehr ein, da ihre Aktivität nicht wie üblich über MHC-I-Moleküle gehemmt wird (Rink et al., 2012). Die Zytotoxizität gegenüber krankhaft veränderten Zellen und die Produktion von Zytokinen zählen zu den wichtigsten Eigenschaften der NK-Zellen.

Zudem besitzen NK-Zellen die Fähigkeit, DCs zu aktivieren und deren Reifung zu antigen-präsentierenden Zellen zu induzieren. Dies erfolgt über direkte Kontaktaufnahme oder über die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF (Walzer et al., 2005, Mailliard et

al., 2003, Rink et al., 2012, Ferlazzo und Morandi, 2014, Gerosa et al., 2002). Umgekehrt können auch DCs ruhende NK-Zellen aktivieren, entweder über direkten Zellkontakt oder die Ausschüttung der Zytokine IL-2, IL-12, IL-15 und IL-18. In Folge dessen wird bei den NK-Zellen die Bildung von Perforin und IFN- $\gamma$  angeregt, sowie ihre zytotoxische Aktivität stimuliert (Rink et al., 2012). Daraufhin werden unreife DCs von den aktivierten NK-Zellen über den NKp30-Rezeptor erkannt. Im Anschluss können NK-Zellen diese autologen DCs trotz des exprimierten Moleküls MHC-I eliminieren (Ferlazzo et al., 2002). Auch reife DCs besitzen den NKp30-Rezeptor, entgehen allerdings dem durch NK-Zellen herbeigeführten Zelltod durch eine erhöhte Expression von MHC-I-Molekülen an ihrer Zelloberfläche. Aufgrund dieser Interaktionen können DCs die Entwicklung der NK-Zellen kontrollieren. Hingegen können NK-Zellen durch die Lyse von unreifen DCs die Zellzahl der DCs regulieren. Auf diese Weise können Immunantworten limitiert werden (Ferlazzo et al., 2002). Diese reziproken Interaktionen zwischen NK-Zellen und DCs resultieren demnach in zellulärer Aktivität, Zellreifung und gegebenenfalls im Zelltod (Cooper et al., 2004) und sind besonders relevant für die angeborene, antitumorale Immunantwort *in vivo* (Fernandez et al., 1999).

#### **1.1.4 NK-Effektormoleküle**

NK-Zellen sekretieren bei Aktivierung verschiedene Effektormoleküle. Zu ihren wichtigsten Granula-Proteinen zählen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Perforin und Granzyme, die bei den Zielzellen den programmierten Zelltod einleiten können. Die große Vielfalt an Effektoren führt dazu, dass die Zielzellen trotz Abwehr eines oder mehrerer Verteidigungsmechanismen den Zelltod nicht umgehen können (Rink et al., 2012).

Nachfolgend werden die drei NK-Effektoren beschrieben, welche in den Live-imaging Experimenten dieser Arbeit Anwendung fanden. In den experimentellen Versuchen wurden Granzym B, Perforin und IFN- $\gamma$  eingesetzt, da sie in der Abwehr von Pathogenen die bedeutendste Rolle spielen.

#### **1.1.4.1 Granzym B**

Granzym B gehört zur Gruppe der Granzyme, welche wiederum zu den Serinproteasen gezählt werden. Es handelt sich um Enzyme, die besonders in den intrazellulären Granula von Immunzellen wie NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8-positive T-Lymphozyten) nachweisbar sind (Adrain et al., 2005). Ihre Funktion besteht insbesondere in der Abwehr von virusinfizierten Zellen. Granzym B ist eines der aktuell fünf bekannten Granzyme, welches zusammen mit Perforinen inaktiv in den lytischen Granula von NK-Zellen gespeichert wird. Sobald es zum Kontakt zwischen einer NK-Zelle und einer virusinfizierten Zelle kommt, erfolgt die Ausschüttung der Granula und gleichzeitig die Aktivierung von Granzym B. Aktives Granzym B leitet in der Zielzelle die Apoptose ein (Heusel et al., 1994), indem es zunächst die Caspase CPP-32 spaltet (Darmon et al., 1995), welche anschließend das inhibitorische Protein ICAD zerlegt und so die caspaseaktivierte Desoxyribonuclease (CAD) aktiviert. Diese wiederum besitzt die Fähigkeit, die DNA der infizierten Zelle abzubauen (Schütt und Bröker, 2011).

#### **1.1.4.2 Perforin**

Das zytolytische Protein Perforin befindet sich wie Granzym B in den Granula von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen. Es unterstützt bei der Abwehr von infizierten Zellen die Wirkung von Granzym B, indem es in der Zellmembran der Zielzelle eine Pore formt und so das Eindringen der Granzyme B ermöglicht (Schütt und Bröker, 2011, Lowin et al., 1994, Kelly et al., 2004). Gebildet wird die Pore nach der Degranulation durch Andocken des Moleküls über seine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Domäne an die Plasmamembran der Zielzelle. Perforin ist ein Proteinkomplex aus mehreren einzelnen Domänen, welche dem Protein in Summe seine biologischen Eigenschaften verleihen. Essentielle funktionelle Domänen sind beispielsweise eine Aminosäuresequenz mit lytischen Fähigkeiten, sowie die MACPF-Proteindomäne (MAC, *engl. membrane attack complex*, PF = Perforin) (Voskoboinik und Trapani, 2006). Aufgrund seines strukturellen Aufbaus ähnelt Perforin dem Komplementfaktor C9, welcher das zentrale Element des Membranangriffskomplexes bildet (Schütt und Bröker, 2011, Waterhouse et al., 2004).

### 1.1.4.3 Interferon- $\gamma$

Interferone sind Glykoproteine aus der Gruppe der Zytokine. Sie werden überwiegend von Leukozyten gebildet und wirken immunstimulierend, insbesondere antiviral und antitumoral. Die wichtigsten Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Produzenten sind CD4-positive TH1-Zellen, die nach Kontakt mit Makrophagen oder anderen antigenpräsentierenden Zellen zur IFN- $\gamma$ -Bildung angeregt werden. Ebenso sind DCs und NK-Zellen in der Lage, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Die Hauptfunktion des proinflammatorischen IFN- $\gamma$  besteht in der aktivierenden Wirkung auf Makrophagen. IFN- $\gamma$  verstärkt die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen und somit den intrazellulären Abbau von phagozytierten Erregern. Zusätzlich trägt es zur Förderung von bakteriziden Stoffen wie Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffradikalen bei. Auf APCs induziert es die Bildung von MHC-II-Molekülen zur verbesserten Antigenpräsentation. Auch die zytotoxische Potenz von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten wird durch IFN- $\gamma$  gesteigert (Schütt und Bröker, 2011, Cowdery et al., 1996).

## 1.2 Der humanpathogene Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz aus der Gattung der Gießkannenschimmel (*lat. Aspergillus*). Er gehört zur Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) und zur Ordnung der Eurotiales. Der Name basiert auf der rauchgrünen Farbe (*fumus* = *lat. „der Rauch“*) des Pigments 1,8-Dihydroxynaphtalin-Melanin bei der Ablösung der Sporen von den Konidiophoren. Schimmelpilze sind eukaryontische Lebewesen, die durch das Vorhandensein eines Zellkerns gekennzeichnet sind. *A. fumigatus* zählt zu den meist verbreitetsten Spezies auf der Erde (Latge, 1999). Es handelt sich um einen saprophytisch lebenden Pilz, der weder Photo-, noch Chemosynthese betreibt und sich ausschließlich heterotroph von toten, organischen Stoffen ernährt. Seine natürliche ökologische Nische ist der Erdboden. Aufgrund seines resistenten Organismus wächst *A. fumigatus* auch bei Temperaturen bis zu 55°C und überlebt bei Temperaturen bis zu 70°C (Latge, 1999).

Bei immunsupprimierten Patienten kann *A. fumigatus* opportunistisch invasive und oftmals tödlich verlaufende Erkrankungen hervorrufen. Aus diesem Grund besteht in

der aktuellen Forschung hohes wissenschaftliches Interesse an diesem humanpathogenen Schimmelpilz.

### 1.2.1 Biologie und Lebenszyklus

Da lange Zeit nur eine asexuelle Fortpflanzung bekannt war (Latge, 1999), wird *A. fumigatus* aktuell zur Gruppe der Deuteromyceten (Fungi imperfecti) gezählt (Samson, 1999). Allerdings wurden bei der vollständigen Sequenzierung des Genoms die Gene mating-type-Locus (MAT) 1-1 und MAT 1-2 entdeckt, welche für eine sexuelle Fortpflanzung von *A. fumigatus* sprechen (Galagan et al., 2005, Varga, 2003, O’Gorman et al., 2009). Der typische Aufbau einer sporulierenden *A. fumigatus*-Konidiophore ist in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1: Aufbau einer sporulierenden Konidiophore von *Aspergillus fumigatus* in einer rasterelektronenmikroskopischen Darstellung. (©Lothar, AG Löffler, 2012)

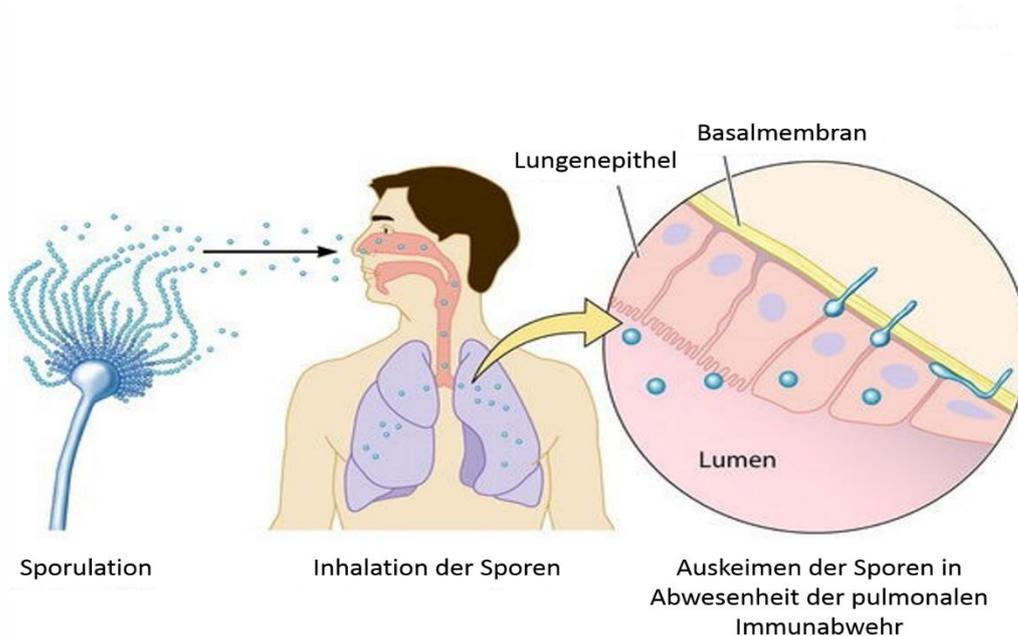
Der Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt mit der Auskeimung seiner Sporen, den sogenannten Konidien. Diese haben einen Durchmesser von nur 2-3  $\mu\text{m}$  und besitzen einen einzelnen haploiden Zellkern (Latge, 1999). Durch die hohe Thermotoleranz und Widerstandsfähigkeit des Schimmelpilzes gegenüber Austrocknung und Desinfektionsmitteln, ist auch eine Vermehrung bei schlechten Umweltbedingungen möglich. Bei Feuchtigkeit, Wärme und ausreichend Nährstoffen beginnen die Konidien zu schwellen und auszukeimen. Nach einiger Zeit bilden sich Keimschläuche (*engl. germ tubes*) mit

einem polarisierten Wachstum. Diese führen zunächst zur Hyphenbildung (fadenförmige Zellen des Pilzes) und letztendlich zur Verzweigung der Hyphen zu einem Geflecht, dem sogenannten Myzel. Die Myzelbildung dient der Nährstoffaufnahme und der Vermehrung des Pilzes. Einzelne Verzweigungen wachsen an der Oberfläche des Myzels zu einer Konidiophore heran, die schließlich die nächste Generation Konidien produziert. So entstehen etwa 10.000 neue Konidien, welche durch Luftverwirbelungen abgelöst, verteilt und über größere Distanzen verbreitet werden (Mullins et al., 1976). Aufgrund der besonders hohen Sporulationskapazität (Konzentration in der Luft bis zu  $100/m^3$ ) des Pilzes werden durch den Menschen täglich mehrere Hundert Konidien eingeatmet, welche jedoch bei einem intakten Immunsystems keine Infektionen auslösen (Latge, 1999).

### **1.2.2 Medizinische Relevanz**

*A. fumigatus* ist ein humanpathogener Pilz, der unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen kann. Bei immunkompetenten Menschen kann der Schimmelpilz zu Allergien wie Asthma oder der allergisch bronchopulmonalen Aspergillose führen. Bei immunsupprimierten Patienten kann er verschiedenste Infektionen hervorrufen. Neben dem Krankheitsbild des Aspergilloms ist *A. fumigatus* der häufigste Auslöser der invasiven Aspergillose (IA). Zwar können auch die Erreger *A. terreus*, *A. flavus* und *A. niger* eine IA verursachen, jedoch ist *A. fumigatus* in 90% der Fälle verantwortlich für die Infektion (Latge, 1999). Die IA ist die schwerste Form der Aspergillose bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem, da sie trotz Therapie mit einer extrem hohen Letalität von 50-95% behaftet ist (Balloy und Chignard, 2009, Latge, 1999). Sie gilt als die am weitesten verbreitete, invasive Schimmelpilzinfektion (Denning, 1998). Beim Einatmen führt die geringe Größe der Sporen zum Eindringen bis in die Lungenalveolen. Bei der überwiegenden Anzahl an Patienten ist demzufolge der Respirationstrakt der maßgebliche Zugang für die Sporen (Latge, 1999). Von dort aus kann der opportunistische Pilz nach seiner Keimung und Myzelbildung einen invasiven Verlauf nehmen, das Organewebe invadieren, anatomische Barrieren überwinden, intravasal penetrieren und durch hämatogene Streuung in weitere Organe wie das Gehirn

vordringen (Latgé, 2001). Die Invasion der Lunge von immunsupprimierten Patienten durch *A. fumigatus*, sowie seine Verbreitung zeigt Abbildung 2.



**Abbildung 2: Verbreitung und Wachstum von *Aspergillus fumigatus* in der menschlichen Lunge immunsupprimierter Patienten.** Abbildung bearbeitet nach Tekaia und Latgé, 2005.

Die Zahl der an IA erkrankten Patienten nimmt stetig zu. Diese Tatsache ist auf steigende Immundefizite (durch HIV oder Chemotherapien) oder Stammzell- und Organtransplantationen besonders bei hämatologischen Malignomen zurückzuführen (Denning, 1998, Latge, 1999, Asciglu et al., 2002). Frühe Diagnostik und Therapie sind maßgeblich für das Krankheitsbild der IA, da die Mortalitätsrate bei später Erkennung auf bis zu 80% ansteigt (Groll et al., 1996), wohingegen sie bei früher Behandlung auf 40% sinken kann (Denning, 2000).

### 1.3 Die Immunabwehr in Bezug auf *Aspergillus fumigatus*

Die Sporen des Pilzes *A. fumigatus* sind in der Atemluft vorhanden, sodass sie durchweg vom Menschen eingeatmet werden. Sie gelangen zunächst in die Lunge, wo die erste physiologische Abwehr erfolgt. Diese Abwehrbarriere besteht aus dem Alveolarepithel, welches die oberflächliche Alveolarwand bedeckt. Die Epithelien produzieren Schleim

und sind in der Lage, die im Mukus gebundenen Sporen mit Hilfe ihrer an der Oberfläche vorhandenen Zilien aktiv in Richtung Oropharynx zu transportieren. Hier werden sie verschluckt oder ausgehustet, wodurch der Großteil der Sporen eliminiert wird. Ein weiterer wichtiger Zelltyp im Alveolarepithel ist der Pneumozyt Typ II, welcher die oberflächenaktive, antimikrobielle Substanz Surfactant bildet und sezerniert. Das Surfactant setzt sich neben Lipiden und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus Proteinen zusammen, von denen die speziellen Surfactantproteine (SP) A und D (SP-A und SP-D) eine immunologische Funktion besitzen. Sie können Konidien, die bis in die Alveolen vordringen, binden und diese für Alveolarmakrophagen, welche im respiratorischen Epithel vorhanden sind, erkennbar machen. Die wesentliche Aufgabe von Alveolarmakrophagen ist die Phagozytose. Durch sie wird der Hauptteil der invadierten Sporen phagozytiert und eliminiert (Balloy und Chignard, 2009, Schaffner et al., 1983). Ebenso spielen weitere Immunzellen des angeborenen Immunsystems eine große Rolle in der Abwehr von *A. fumigatus*. Sie besitzen die Mustererkennungsrezeptoren PRRs (*engl. pattern-recognition-receptors*), die Pathogene an ihrem spezifischen pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs, *engl. pathogen-associated molecular patterns*) erkennen und eine inflammatorische Immunantwort einleiten können (Schütt und Bröker, 2011). Durch sie wird die angeborene Immunantwort verstärkt und die adaptive Immunantwort stimuliert.

Zu den drei wichtigsten Immunzellarten, die zur Abwehr gegen *A. fumigatus* beitragen, gehören neben Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen die polymorph-nukleären Neutrophile. Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können diese Zellen phagozytierte Konidien eliminieren. Sie sind demnach in der Lage, Sporen zu inaktivieren und ihre Auskeimung durch Phagozytose zu verhindern (Bonnett et al., 2006). Auch nicht-phagozytotische Mechanismen, wie die Sekretion von antimikrobiellen Substanzen in die unmittelbare Umgebung, werden von ihnen angewandt (Bonnett et al., 2006, Zarembler et al., 2007, Mircescu et al., 2009). Hierzu zählt beispielsweise die Freisetzung der Zytokine IL-10, IL-12 und IL-18 aus ihren Granula, die eine inflammatorische Immunantwort herbeiführen (Cunha et al., 2014). Ein weiteres

Beispiel stellt ein Netzwerk aus extrazellulären Fasern – den NETs – dar. Dieses hat die Aufgabe, Pathogene zu binden (Brinkmann et al., 2004).

Auch die dendritischen Zellen, die zu den Immunzellen des angeborenen Immunsystems zählen, tragen einen wesentlichen Teil zur Abwehr bei. Neben ihrer kontinuierlichen Präsentation von Antigenen, besteht ihre Hauptfunktion in der Aktivierung von T-Lymphozyten, welche wiederum die adaptive Immunabwehr gegen den Pilz bilden (Schütt und Bröker, 2011). Dendritische Zellen verantworten demnach die Verbindung des angeborenen mit dem erworbenen Immunsystem. Die in den Experimenten verwendeten, *in vitro* generierten moDCs, sowie die *ex vivo* aus peripherem Blut isolierten mDCs (myeloide DCs) erkennen und internalisieren den Pilz, senden proinflammatorische Signale aus und sind in der Lage, das Wachstum von phagozytierten *A. fumigatus*-Konidien zu inhibieren (Lothar et al., 2014, Mezger et al., 2008).

Ebenso zeigen NK-Zellen hinsichtlich *A. fumigatus* eine wichtige antifungale Aktivität. Nach direktem Kontakt einer NK-Zelle mit dem Pilz erfolgt eine zytotoxische Abwehr durch lösliche Moleküle wie IFN- $\gamma$ , das durch seine Freisetzung die Schädigung des Pilzes vermittelt. Die Stimulation der NK-Zellen durch *A. fumigatus* ist im Gegensatz zu ihrer antifungalen Aktivität kontaktabhängig (Bouzani et al., 2011).

#### **1.4 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die noch unbekannt Interaktion zwischen moDCs und NK-Zellen in Kokultur mit dem humanpathogenen Schimmelpilz *A. fumigatus* zu analysieren. Interaktionsanalysen einzelner Immunzelltypen mit *A. fumigatus* wurden bereits in aktuellen Forschungsarbeiten durchgeführt. So ist die Interaktion zwischen DC-Subtypen mit *A. fumigatus* und NK-Zellen mit *A. fumigatus*, sowie das reziproke Verhalten von DCs und NK-Zellen Bestandteil der aktuellen Forschung. Jedoch besteht die Immunantwort gegen den Schimmelpilz aus einem komplexen Netzwerk von Immunreaktionen unterschiedlicher Immunzelltypen, die zudem untereinander interagieren. Als Annäherung dessen soll diese Forschungsarbeit verstanden werden, die mit Hilfe eines modernen und temperierbaren Live-imaging Mikroskops die

Immunreaktion von moDCs und NK-Zellen gegen *A. fumigatus* einzeln und im Zusammenspiel untersucht.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden die Echtzeit-Filmaufnahmen hinsichtlich der Veränderung der Zellmorphologie, der Phagozytoseaktivität der Zellen und der Kontaktaufnahme zwischen Immunzellen und Pilz ausgewertet. Die Aktivität der moDCs mit jeweils koinkubierten Konidien oder Keimschläuchen wurde mit ihrer Aktivität in zusätzlicher Anwesenheit von NK-Zellen verglichen. Bei beiden Ansätzen wurden durchweg moDCs desselben Spenders verwendet. Analog wurde das Verhalten der NK-Zellen in An- und Abwesenheit von moDCs analysiert. Ebenso wurde im Anschluss die Auswirkung von NK-Überständen auf die moDC-*A. fumigatus*-Kokultur untersucht. Die beschriebenen Versuche wurden zusätzlich mit der Mutante  $\Delta$ RodA durchgeführt. Zudem wurden die Wirkungen der drei verschiedenen NK-Effektormoleküle IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin auf die Kokultur aus moDCs und *A. fumigatus*-Konidien untersucht. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unterschiedliche moDC-Spender gefilmt und ausgewertet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Primäre Immunzellen

Zur Gewinnung verschiedener Immuneffektorzellen wurden in der vorliegenden Arbeit Leukozytenkonzentrate nach Thrombozytenspende von freiwilligen, gesunden Spendern verwendet. Hierbei wurden durch eine Leukopherese Thrombozyten und Plasma vom peripheren Vollblut für den medizinischen Gebrauch selektiert, wobei ein Leukozytenkonzentrat zurückblieb. Die Vollblutkonzentrate wurden vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 *Aspergillus fumigatus*-Stämme

Für die Versuchsansätze wurden die *Aspergillus fumigatus*-Stämme ATCC-Tomato und  $\Delta$ RodA verwendet.

ATCC-Tomato (ATCC 46645 mit *dTomato* in pSK379) ist ein gentechnisch veränderter Stamm, in dessen Genom das Fluoreszenzgen *dTomato* [aus pCMV-tdTomato von Clontech] integriert ist. Dieses Gen exprimiert ein Protein, welches im Zytosol vorliegt und unter der Anregungswellenlänge von 551 nm rotes Licht der Wellenlänge 581 nm emittiert. Somit strahlt das Protein während der Beleuchtung mit einer Fluoreszenzlampe im Lichtmikroskop rot (Lothar et al., 2014). Dies ermöglicht eine deutliche Unterscheidung der *A. fumigatus*-Morphologien von den moDCs und den NK-Zellen in den Live-imaging Filmen.

Auch  $\Delta$ RodA ist ein gentechnisch veränderter Stamm mit einer Deletion des *rodA*-Gens. Er ist immunogener als der wildtypische *A. fumigatus*, da bei ihm keine maskierende Rodlet-Schicht der Pilzzellwand vorhanden ist (Paris et al., 2003).

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.3.1 Kits

*Tabelle 1: Verwendete Kits*

Kit	Hersteller
NK Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec
CD14 MicroBeads human	Miltenyi Biotec

#### 2.1.3.2 Reagenzien

*Tabelle 2: Verwendete Reagenzien*

Reagenz	Hersteller
EDTA	Sigma
Ethanol 70 %	Fischer
FCS (fetales Kälberserum)	Sigma
FICOLL (Bicoll Separating Solution)	Biochrom AG
Granzym B	abcam®
HBSS (Hanks' balanced salt solution)	Sigma
Perforin	abcam®
RPMI 1640 Medium (+GlutaMax)	GIBCO, Invitrogen Corp.
Trypanblau	Sigma

#### 2.1.3.3 Medien

*Tabelle 3: Verwendete Medien*

Medium	Einzelkomponenten
Bierwürzplatte (hergestellt vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg)	Bierwürze in 1l destilliertem Wasser

Minimal-Medium Platte	<p>1% Glucose</p> <p>2% Agar</p> <p>Destilliertes Wasser</p> <p>1 x AspA</p> <p>0,25 mM MgSO<sub>4</sub></p> <p>1 x Spurenelementlösung (25 mM EDTA pH8, 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)</p> <p>0,1 µg/ml Selektionsmarker PtrA</p>
RPMI-Medium	<p>RPMI 1640</p> <p>10% FCS</p>

#### 2.1.3.4 Zytokine

Tabelle 4: Verwendete Zytokine

Zytokin	Stammlösung	Hersteller
GM-CSF (Leukine)	250 µg/ml Hanks	Sanofi
Interferon-γ (IFN-γ)	0,2 mg/ml Hanks	R&D Systems
Interleukin 4 (IL-4)	10 µg/ml Hanks	R&D Systems
Proleukin (IL-2)	50 IU/µl Hanks	Novartis

#### 2.1.3.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

FACS Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
Anti-CD14 (BD Pharmingen™)	FITC	Maus	1 µl / 1x10 <sup>6</sup> moDCs
Anti-CD1a (Miltenyi Biotec)	APC	Maus	1 µl / 1x10 <sup>6</sup> moDCs

IgG <sub>1</sub> Isotypkontrolle (BD Pharmingen™)	PE	Maus	2,5 µl / 1x10 <sup>6</sup> PBMCs
NKp46 (CD335) (BD Pharmingen™)	PE	Maus	2,5 µl / 1x10 <sup>6</sup> PBMCs

### 2.1.3.6 Labormaterialien

Table 6: Verwendete Labormaterialien

Labormaterial	Kennzeichen	Hersteller
Deckglas	24 x 32 mm	Hartenstein
Einmalspritze	1,0 ml	Transcoject
FACS-Röhrchen	5 ml, 12 x 75 mm	Becton Dickinson
MACS-Trennsäulen	LS	Miltenyi Biotec
Zellkultur-Platten	6 / 24 / 48 / 96 Well	Hartenstein
Neubauer Zählkammer	Precicolor (0,0025 mm <sup>2</sup> )	HBG Germany
Objektträger	mit Mattschliff	Hartenstein
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt/StarLab
Plastik-Pasteur-Pipette	steril verpackt, 3,5 ml	Hartenstein
Reaktionsgefäße	1,5 ml / 2 ml Röhrchen 15 ml / 50 ml Falconröhrchen	Hartenstein
Serologische Pipetten	5 ml / 10 ml / 25 ml	Hartenstein
Silikon-Isolatoren	9 mm Durchmesser 0,5 mm Tiefe 8 Löcher	Invitrogen
Wattestäbchen	steril verpackt	Applimed SA
Zellschaber	Cell Scraper 23 cm	Sarstedt
Zellsieb	40 µm Cell Strainer, Nylon 0,45 µm, Minisart®	Life Sciences Sartorius stedim biotech

## 2.1.4 Geräte

*Tabelle 7: Verwendete Geräte*

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus HERA Cell 240	Thermo Scientific
FACS-Gerät	FACS Calibur	Becton Dickinson
Gefrier- und Kühlkombination	Premium No Frost 4°C / -20°C	Liebherr
Gefrierschränke	-20°C / -80°C	Liebherr/Heraeus
Lichtmikroskope	Eclipse 50i und TS100	Nikon
Live-imaging Mikroskop	Leica AF6000	Leica
MACS Magnete	Seperation Columns LS	Miltenyi Biotec
Pipetten	Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann
Schüttler	HT INFORS	INFORS AG
Sterilbank	Herasafe KS 18	Kendro
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D und 5415 R Multifuge 3 S-R	Eppendorf Thermo Scientific

## 2.1.5 Computersoftware

*Tabelle 8: Verwendete Computersoftware*

Computersoftware	Anbieter
Acrobat Reader XI (Version 11.0.10)	Adobe
CellQuest Pro	Becton Dickinson
EndNote X7	Thomson Reuters
ImageJ (Version 1.48v)	Wayne Rasband
Irfan View (Version 4.38)	Skiljan Irfan

LAS AF	Leica
LAS AF Lite	Leica
Office Excel 2013	Microsoft
Office Word 2013	Microsoft

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer besteht aus einem Deckgläschen, sowie einem speziellen Objektträger, auf dem neun Großquadrate von je 1 mm<sup>2</sup> eingraviert sind (Abbildung 3). Die vier Eckquadrate sind wiederum in sechzehn 0,25 x 0,25 mm große Quadrate unterteilt. Nach Auflegen des Deckgläschens können durch Kapillarkräfte 10 µl Zellsuspension in die Zählkammer gezogen und alle Zellen in den vier Eckquadraten gezählt werden. Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellzahl, der entsprechenden Verdünnung, dem Kammerfaktor, sowie dem vorhandenen Volumen. Da die Kammertiefe 0,1 mm beträgt und jedes Eckquadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> besitzt, ergibt sich ein Eckquadratvolumen von 0,1 µl. Hieraus resultiert die Formel für die Gesamtzellzahl:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert der Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times \text{Gesamtvolumen}$$

Es wurden immer mindestens drei Eckquadrate ausgezählt.

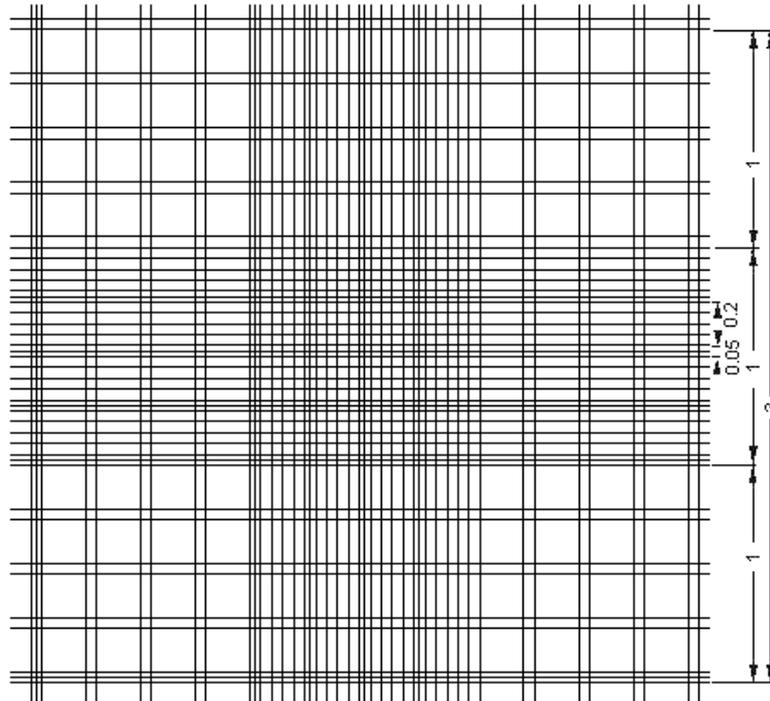


Abbildung 3: Aufbau des Zählfeldes der Neubauer-Zählkammer. Quelle: [www.lo-laboroptik.de](http://lo-laboroptik.de) (<http://lo-laboroptik.de/deutsch/info/neubauer.gif>)

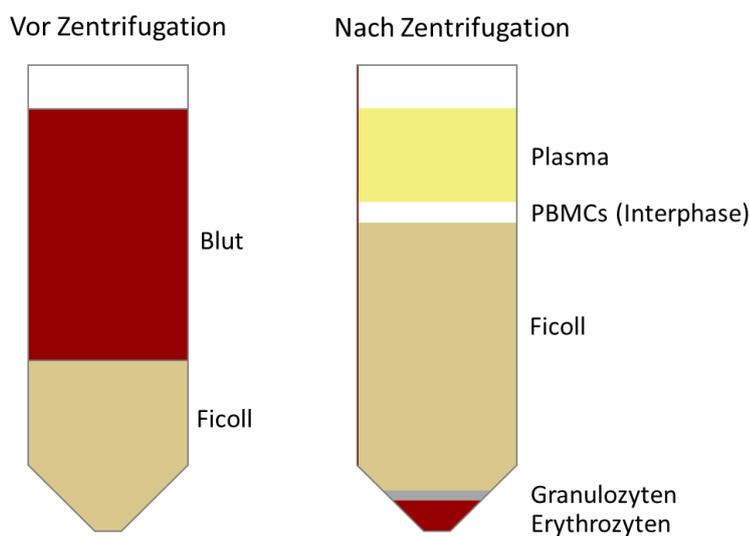
## 2.2.2 Gewinnung von Immuneffektorzellen

### 2.2.2.1 Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Leukozytenkonzentraten

PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, *engl. peripheral blood mononuclear cells*) können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe des Kohlenhydratpolymers Ficoll ( $\delta = 1,077 \text{ g/ml}$ ) [Bicoll] durch Dichtezentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und avitalen Zellen separiert werden. PBMCs bestehen aus Leukozyten, die sich aus Monozyten, Lymphozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen zusammensetzen.

Zur Gewinnung von humanen PBMCs wurde pro Leukozytenkonzentrat 15 ml der Lösung Ficoll in zwei 50 ml Falconröhrchen vorgelegt. Das Blut ließ man unmittelbar nach Eingang der Blutproben in ein weiteres 50 ml Röhrchen tropfen. Dieses Röhrchen wurde auf 50 ml mit Hanks-Puffer (HBSS, 5 mM EDTA) aufgefüllt und invertiert. Das Ficoll in

den ersten beiden Röhrchen wurde anschließend mit je 25 ml dieses verdünnten Leukozytenkonzentrates überschichtet. Entscheidend war in diesem Zusammenhang, eine Vermischung der beiden Phasen zu vermeiden. Nach einer Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 2000 rpm und Raumtemperatur enthielt das Röhrchen fünf verschiedene Phasen: ein Zellsediment aus Erythrozyten und avitalen Zellen, eine Phase mit Granulozyten, eine Ficollphase, eine Interphase mit allen PBMCs und eine abschließende Plasmaphase (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ficoll-Gradienten vor und nach Zentrifugation.**

Die dünnen Interphasen zwischen der Plasma- und der Ficoll-Phase wurden mit einer Plastik-Pasteur-Pipette in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit Hanks-Puffer auf ein Endvolumen von 50 ml ergänzt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 1050 rpm ohne Beschleunigung und Bremse. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, das Zellpellet aufgeschabt und in 50 ml Puffer invertiert. Zur Zellzahlbestimmung der PBMCs wurden der Suspension 10 µl entnommen, nachdem in ein Well einer 96-Well Platte 90 µl Hanks-Puffer und in ein weiteres Well 10 µl Trypan-Blau vorgelegt wurden. Das Aliquot der Zellsuspension wurde zunächst mit dem Hanks-Puffer vermischt und daraufhin 10 µl dieser Verdünnung in das Trypan-Blau überführt. Dies entspricht einer 20-fachen Verdünnung (1:10 Verdünnung mit Hanks-Puffer und 1:2

Verdünnung mit Trypan-Blau). Im Anschluss wurde die Suspension in die Kammer der vorbereiteten Neubauer-Zählkammer zur Zellzahlbestimmung gegeben. Trypan-Blau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der nur von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen wird und diese dunkelblau anfärbt. Vitale Zellen hingegen bleiben hell und ungefärbt. So lassen sich im Lichtmikroskop vitale Zellen von avitalen Zellen unterscheiden. Die restlichen PBMCs wurden einem letzten Waschschrift unterzogen und für 15 Minuten bei 1050 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in die gewünschte Menge Hanks-Puffer aufgenommen und unmittelbar weiterverwendet.

Formel zur Gesamtzellzahlbestimmung der PBMCs:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 \times 20 \times 50$$

#### **2.2.2.2 Monozyten-Isolation aus humanen PBMCs**

Monozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche den spezifischen Marker CD14. Mittels einer magnetischen Positiv-Selektion können Monozyten aus PBMCs isoliert werden. Dabei wird die PBMC-Zellsuspension mit monoklonalen anti-humanen CD14-Antikörpern inkubiert, an die Magnetpartikel – sogenannte MicroBeads – mit einer Größe von 50 nm gekoppelt sind. Dadurch können Zellen, die das Glykoprotein CD14 an ihrer Oberfläche tragen (CD14<sup>+</sup>), magnetisch markiert werden. Die zu isolierenden Zellen in der Zellsuspension werden anschließend in eine Säule überführt, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Beim Durchfluss durch diese Säule bleiben diejenigen Zellen, die über Antikörper mit MicroBeads markiert wurden, in der Säule haften. Alle anderen Zellen durchlaufen ungehindert die magnetische Säule und werden als negative Fraktion aufgefangen. Restliche, unmarkierte CD14-negative Zellen werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Handelt es sich, wie in diesem Fall, bei den markierten Zellen um die Zielzellen, wird das Verfahren als Positiv-Selektion bezeichnet. Zur Monozyten-Isolation wurden für die Versuche  $1 \times 10^8$  abzentrifugierte PBMCs in 340  $\mu$ l Hanks-Puffer aufgenommen, 60  $\mu$ l  $\alpha$ -CD14 MicroBeads hinzugefügt, die Zellsuspension gemischt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss folgte ein Waschschrift, bei dem der Suspension 10 ml Hanks-Puffer pro  $1 \times 10^8$  PBMCs hinzugefügt wurden und

diese für zehn Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert wurde, um überschüssige MicroBeads zu entfernen. Das Pellet wurde in 1 ml Hanks-Puffer resuspendiert und die Zellen mittels LS Säule separiert. Hierfür wurde zunächst die LS Säule in die Magnetvorrichtung eingebracht und mit 3 ml Hanks-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension (bis zu  $5 \times 10^8$  PBMCs in 2 ml Hanks-Puffer) wurde auf die Säule gegeben, die Säule dreimal mit je 3 ml Hanks-Puffer nachgespült, aus dem Magneten entnommen und in ein neues 15 ml Röhrchen gestellt. Daraufhin wurden 5 ml Hanks-Puffer auf die Säule gegeben und mit dem zugehörigen Stempel in das Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension enthielt nun die gewünschten CD14-positiven Monozyten, die etwa 20% der PBMCs ausmachen. In einer Neubauer-Zählkammer wurde nach einer 10-fachen Verdünnung (1:5 Verdünnung mit Hanks-Puffer und 1:2 Verdünnung mit Trypan-Blau) die Anzahl der Monozyten bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde für zehn Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und das Monozyten-Pellet in das gewünschte moDC-Mediumvolumen aufgenommen (moDC-Medium: RPMI + 10% FCS).

Formel zur Gesamtzellzahlbestimmung der Monozyten:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10 \times 10^4 \times 5$$

### 2.2.2.3 Generierung von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen

Aus den isolierten CD14<sup>+</sup>-Monozyten konnten anschließend *in vitro* durch Zugabe und mehrtägige Einwirkung der Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und GM-CSF (*engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) in RPMI-Zellkulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) moDCs generiert werden (Bender et al., 1996).

Pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden  $3 \times 10^5$  Monozyten in 3 ml moDC-Medium (RPMI + 10% FCS + 0,4 µl/ml GM-CSF [100 ng/ml = ca. 560 U/ml, Bayer] + 1 µl/ml IL-4 [10 ng/ml = ca. 580 U/ml, R&D]) pipettiert und anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für fünf Tage inkubiert. Die Fütterung der Zellen fand an Tag 2 und 4 statt, wobei ein Drittel des Mediums mit der dreifachen Menge an Zytokinen erneuert wurde. Dafür wurde aus jedem Well 1 ml des Mediums abgenommen und in einem Röhrchen gesammelt, welches dann zehn Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert wurde. Das moDC-Pellet wurde nach Dekantieren des Überstandes in dieselbe Menge frischen Mediums

mit 3-fach Zytokinen resuspendiert (RPMI + 10% FCS + 1,2 µl/ml GM-CSF + 3 µl/ml IL-4) und je 1 ml in jedes Well zurückgeführt. Danach wurden die Zellen erneut im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 5 konnten die Zellen für Versuchsansätze geerntet werden, da sie nun vollständig zu moDCs ausdifferenziert waren. Etwa ein Drittel der zuvor ausgesäten Monozyten wurde nach dem Generierungsprozess als lebende moDCs erhalten, die nun statt CD14 das Glykoprotein CD1a exprimierten. Dies wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse nachgewiesen. Nach einer lichtmikroskopischen Begutachtung wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatte gelöst und die Zellsuspension vollständig in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. 10 µl wurden zur Zellzählung entnommen, mit 10 µl Trypan-Blau gemischt (1:2 Verdünnung) und mittels der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde für zehn Minuten bei 1300 rpm und RT zentrifugiert und das moDC-Pellet in das gewünschte Mediumvolumen für die folgenden Experimente resuspendiert.

Formel zur Zellzahlbestimmung der moDCs pro ml:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 \times 2$$

#### **2.2.2.4 Isolation von humanen natürlichen Killerzellen**

Bei der NK-Zell-Isolation aus PBMCs handelt es sich um eine magnetische Negativ-Selektion. Das Verfahren entspricht dem der Positiv-Selektion, allerdings sind die Zielzellen nicht magnetisch markiert und werden im Durchfluss aufgefangen. Alle restlichen Zellen bleiben in der Säule haften und können so von den Zielzellen getrennt werden. Der Vorteil einer Negativ-Selektion besteht darin, dass die Zielzellen in ihrer Ursprungsform belassen werden und nicht etwa durch bindende Antikörper funktionell beeinflusst werden können.

Nach Bestimmung der Zellzahl der PBMCs wurde die Zellsuspension zunächst für zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Hanks-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl NK Cell Biotin-Antibody Cocktail pro 10<sup>8</sup> Zellen hinzugemischt und für fünf Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 300 µl Hanks-Puffer pro 10<sup>8</sup> Gesamtzellzahl und im Anschluss 200 µl

NK Cell MicroBead Cocktail pro  $10^8$  Zellen hinzugeführt. Die Suspension wurde leicht gevortext und erneut für zehn Minuten im Kühlschrank inkubiert. Es folgte ein Waschschrift und die Aufnahme des Pellets in ein Volumen von 1 ml Hanks-Puffer pro  $10^8$  Zellen. Das Verfahren wurde mit der magnetischen Zellseparation fortgesetzt, bei der zunächst die LS Säule in den MACS Separator eingebracht und die Säule durch Zugabe von 3 ml Hanks-Puffer äquilibriert wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend auf die Säule gegeben und die unmarkierten, durchfließenden Zellen, die den NK-Zellen entsprechen, in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde daraufhin mit dreimal 3 ml Hanks-Puffer gewaschen. Wichtig war hierbei, dass das Reservoir der Säule vor der Durchführung des nächsten Waschschriftes leer war. Die im Röhrchen aufgefangenen NK-Zellen wurden nach einer 1:2-Verdünnung (10  $\mu$ l der Zellsuspension in 10  $\mu$ l Trypan-Blau) in der Neubauer-Zählkammer gezählt und unmittelbar weiterverwendet.

Formel zur Zellzahlbestimmung der NK-Zellen pro ml:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 \times 2$$

### **2.2.3 Herstellung von NK-Zellkulturüberständen**

Für einige Versuchsansätze wurden NK-Zellkulturüberstände hergestellt. Diese Überstände bestanden aus dem Nährmedium der Zellen (RPMI + 10% FCS) und beinhalteten alle der von den Zellen in der Inkubationszeit sezernierten Stoffe. Die Zellen wurden dafür nach der sechsstündigen Inkubationszeit abfiltriert. Zur Herstellung wurden NK-Zellen verwendet, die über Nacht mit Proleukin voraktiviert wurden.

#### **2.2.3.1 Primen von NK-Zellen mit Proleukin**

Zur Voraktivierung der NK-Zellen wurden diese über Nacht im zellspezifischen Medium (RPMI + 10% FCS) mit Proleukin (IL-2) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Hierfür waren mindestens  $5 \times 10^5$  NK-Zellen nötig, wobei diese als  $10^6$ /ml mit 20  $\mu$ l/ml Proleukin geprimt wurden.

### **2.2.3.2 Zellkulturüberstände von gepimten NK-Zellen**

Um NK-Zellkulturüberstände zu erhalten, wurden am folgenden Tag die voraktivierten NK-Zellen nach einer 1:2-Verdünnung (10 µl Zellsuspension + 10 µl TB) mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und bei 300 x g und RT für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden sie in der gewünschten Menge Medium aufgenommen und erneut in einem Well einer 48-Well-Platte für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit einem Sieb der Porengröße 0,45 µm steril filtriert und in einem 2 ml Eppi aufgefangen. Die Aufbewahrungstemperatur der Überstände lag bei -20°C.

### **2.2.3.3 Zellkulturüberstände von gepimten NK-Zellen in Kultur mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen**

Die NK-Zellen wurden wie in 2.2.3.2 behandelt, jedoch wurden sie zusätzlich mit derselben Menge an Keimschläuchen (MOI=1) ausgesät. Auch diese Überstände wurden nach sechs Stunden im Brutschrank steril filtriert und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.4 Kultivierung und Ernte der *Aspergillus fumigatus*-Stämme**

200 µl (ca. 10<sup>7</sup> Konidien) einer bei 4°C aufbewahrten Konidiensuspension wurden zur Vermehrung des Pilzes auf einer Minimal-Medium Platte ausgestrichen. Die Kultivierungsplatte des ATCC-Tomato-Stammes enthielt unter anderem 0,1 µg/ml des Selektionsmarkers Pyriithiamin A (PtrA), um eine selektive Vermehrung des fluoreszenten Mutantenstammes zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Kultivierung der Minimal-Medium Platte mit dem Pilz kopfüber bei 35°C für drei bis fünf Tage. Für die Ernte wurden 10 ml Hanks-Puffer auf die Platte transferiert und die Konidien vorsichtig mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte gelöst. Diese Suspension wurde im Anschluss durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße gegeben, um eine reine Konidienlösung ohne Hyphenreste zu erhalten. Die Konidienkonzentration wurde nach einer 1:100 Verdünnung mit Hanks-Puffer (990 µl Puffer + 10 µl Konidiensuspension) mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und bei 4°C gelagert. Diese wurde jeweils innerhalb von maximal zwei Wochen für Versuchsansätze verwendet.

Formel zur Bestimmung der Konidienkonzentration:

$$\text{Konidienanzahl pro ml} = \text{Zellzahlmittelwert} \times 10^4 \times 100$$

Um Keimschläuche zu erhalten, wurden bis zu  $10^8$  Konidien in einem 50 ml Röhrchen mit 10 ml RPMI-Medium gemischt und im Schüttelinkubator für 4,5 bis 5 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Die Kontrolle des Auskeimens erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Die Keimschläuche wurden für Experimente verwendet, sobald sie mindestens dreimal so groß wie ruhende Konidien waren (ca.  $10\ \mu\text{m}$ ).

### **2.2.5 Live-imaging Mikroskopie (Echtzeitmikroskopie)**

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden mit dem Live-imaging Mikroskop Leica AF600 [Leica] und der zugehörigen Software LAS-AF [Leica] im Institut für molekulare Infektionsbiologie (IMIB) der Universität Würzburg durchgeführt. Sie dienten dazu, mittels Echtzeitaufnahmen statistische Analysen von verschiedenen Parametern wie Interaktionsaktivität, Phagozytoseverhalten, Wachstum oder gegenseitige Schädigung während der Interaktion von moDCs, NK-Zellen und *A. fumigatus*-Morphologien zu erhalten. Dafür wurden pro Versuch mindestens drei verschiedene Immunzell-Spender ausgewertet.

Für die Konfrontationsversuche wurden zuerst verschiedene Einstellungen mit der Software LAS-AF des Mikroskops vorgenommen: Auswahl des 40-fach Trockenobjektivs, Einstellung der Helligkeit im differentiellen Interferenzkontrast (DIC: exposure 100 ms, gain 5, intensity 5), Einstellung der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzkanals (FluoRed: exposure 400 ms, gain 5, intensity 5) bei Verwendung des Pilzes ATCC-Tomato und Auswahl der Autofokussierung ( $30\ \mu\text{m}$ , jeder zweite Zyklus) während des Films für jede Position in jedem Bildaufnahmezyklus.

Es wurde ein Streifen mit acht Silikon-Isolatoren auf einen Objektträger aufgebracht, die durchsichtige, adhäsive Folie entfernt und die vorbereiteten, verschiedenen Proben in die Vertiefungen auf den Objektträger pipettiert. Ansätze mit ausschließlich Immunzellen bestanden aus einem Pellet mit  $3,5 \times 10^4$  Zellen, die in  $35\ \mu\text{l}$  Zellmedium (RPMI +

10% FCS) resuspendiert wurden. Für Ansätze mit Immunzellen und Pilz (Konidien oder Keimschläuche) wurde das Immunzell-Pellet ( $3,5 \times 10^4$  Zellen) mit 35  $\mu$ l Konidien- oder Keimschlauch-Suspension ( $3,5 \times 10^5$  Zellen) resuspendiert. Ansätze mit ausschließlich Keimschläuchen oder Konidien enthielten 35  $\mu$ l Konidien- oder Keimschlauch-Suspension ( $3,5 \times 10^5$  Zellen). Nach dem Einbringen der Proben in die Imaging-Kammer wurde das Deckgläschen luftblasenfrei auf den Objektträger aufgelegt. Dieser wurde im Anschluss umgedreht und in das auf 37°C vorgewärmte Mikroskop eingelegt. Die Fokusebene wurde auf die am Deckgläschen abgesetzten Zellen eingestellt. Pro Versuchsansatz wurden durch Bewegen des Objektisches eine bis acht verschiedene Positionen festgelegt und diese über drei bis zwölf Stunden in einem Abstand von 30 Sekunden in den ersten drei Stunden und einem Abstand von zwei Minuten in den folgenden Stunden fotografiert. Aus der Bildabfolge entstand für jede ausgewählte Position ein Film. Zur Auswertung der Filme mussten diese mit Hilfe der Software LAS-AF Lite [Leica] als avi-Datei exportiert werden. Mit den Programmen Irfan View (Version 4.38) [Skiljan Irfan], ImageJ (Version 1.48v) [Wane Rasband] und Microsoft Office Excel 2013 [Microsoft Corporations] wurden die Filme anschließend analysiert.

### **2.2.6 Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie**

Die Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der Zellpopulationen automatisiert mit Hilfe eines Laserlichtes untersucht werden können. Auf diese Weise ist eine Analyse der Zellen möglich, beispielsweise in Hinsicht auf ihre Zellcharakterisierung, ihr Phagozytoseverhalten, ihre Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und diverse Funktionsanalysen. Synonym wird auch die Abkürzung FACS (*engl. fluorescence activated cell sorting*) verwendet. Im Idealfall werden 2 bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro FACS-Röhrchen gemessen, wobei das optimale Färbevolumen 100  $\mu$ l beträgt. Zur Durchführung einer FACS-Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen im Dunkeln mit dem entsprechenden FACS-Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch das Verdünnen mit Hanks-Puffer und das Abzentrifugieren (300 x g, 10 min, RT) des 5 ml FACS-Röhrchens entfernt und die Zellen in Hanks-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde aus

dem Röhrchen in das Durchflusszytometer eingesaugt. Hierbei wurden die Zellen einzeln nacheinander durch eine Mikrokanalküvette, bestehend aus Glas und Quarz, durch einen Laserstrahl geführt. Die unterschiedliche Morphologie der Zellen beeinflusst dabei die Streuung des Laserlichts, ihre Größe das Vorwärtsstreulicht (FSC, *engl. forward scattering*) und ihre Granularität das Seitwärtsstreulicht (SSC, *engl. side scattering*). So entstehen verschiedene optische Fluoreszenzsignale, die durch Photodetektoren in der Messkammer ausgewertet werden und Informationen über die vorhandenen Zellpopulationen preisgeben. Diese Informationen wurden in Form eines elektrischen Signals von einem Computer dargestellt und anschließend mit der Software CellQuest Pro [BD] ausgewertet. Damit unspezifische, falsch positive Antikörperbindungen nicht als Positiv-Signal gewertet wurden, wurde immer eine zweite Zellprobe mit einem Isotyp-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper besitzt keine spezifische Bindekapazität, enthält aber den gleichen Farbstoff und zählt zur selben Antikörperklasse. Somit konnte eine Hintergrundfluoreszenz festgelegt werden, die von der Fluoreszenz des eigentlichen Antikörpers subtrahiert wurde.

### **2.2.7 Statistische Analysen**

Für die statistischen Auswertungen wurden folgende Softwares verwendet: LAS-AF Lite, Irfan View [Skiljan Irfan], ImageJ [Wayne Rasband] und Microsoft Office Excel 2013 [Microsoft Corporations]. Die Durchführung der Experimente erfolgte jeweils mit mindestens drei unabhängigen Blutspendern. Es wurden die ersten drei Stunden der Live-imaging Filme ausgewertet, wobei Versuche mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant galten ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  und  $p < 0,001 = ***$ ).

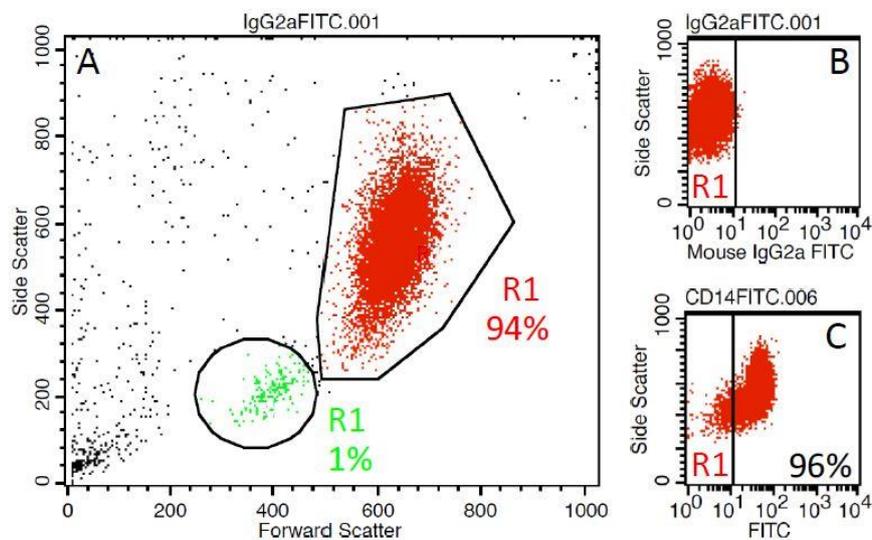
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reinheitskontrolle der isolierten Zellen mittels

##### Durchflusszytometrie

##### 3.1.1 Monozyten direkt nach Isolation

Monozyten exprimieren den spezifischen Oberflächenmarker CD14, welcher zusammen mit dem Toll-like Rezeptor TLR4 zur Bindung von Lipopolysacchariden dient (Wright et al., 1990). Über den Rezeptor CD14 wurden in den Experimenten dieser Arbeit Monozyten mittels CD14 MicroBeads aus PBMCs, die aus humanem, peripherem Blut gewonnen wurden, isoliert und anschließend im FACS analysiert. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Monozytenreinheit sind in Abbildung 5 dargestellt.

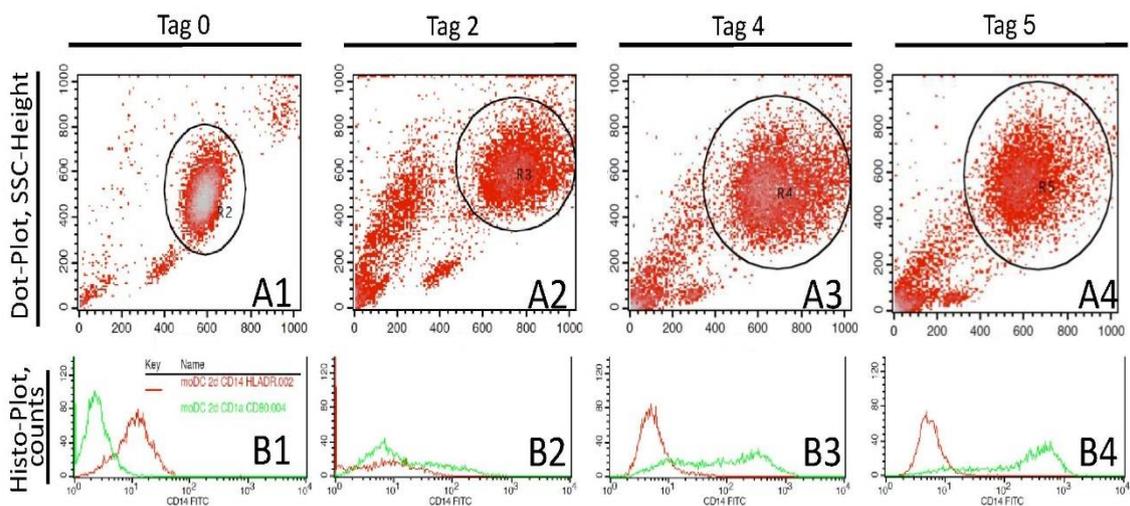


*Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von Monozyten direkt nach ihrer Isolation.* Im Punkt-Diagramm FSC-SSC (A) sind zwei Populationen erkennbar, wovon die kleinere (R1) 1% der vermessenen Zellen ausmacht und sich links unterhalb der Hauptpopulation (R1) befindet. Die in R1 (A) eingegrenzten Zellen exprimieren zu 96% den monozytären Marker CD14 (C). Die Hintergrundfluoreszenz ist mit einem unspezifischen Isotyp-Antikörper in Diagramm B dargestellt.

Im FSC-SSC-Diagramm von Abbildung 5A sind zwei voneinander abgrenzbare Populationen zu erkennen. Zum einen die Hauptpopulation mit 94% der vermessenen Zellen und zum anderen eine kleinere Population, welche 1% der vermessenen Zellen umfasst. Von den Zellen der Hauptpopulation exprimierten 96% den Oberflächenmarker CD14 (Abbildung 5C). Dieses Diagramm weist somit diejenigen Zellen auf, welche mit einem Fluorochrom FITC gekoppelten Antikörper ( $\alpha$ -CD14-FITC) gegen das Oberflächenmolekül CD14 markiert wurden. Die Hintergrundfluoreszenz (Abbildung 5B) wurde durch die Isotyp-Referenz mittels einer senkrechten Linie abgegrenzt.

### 3.1.2 Generierung von moDCs aus Monozyten

Um aus den isolierten Monozyten *in vitro* moDCs zu generieren, wurden diese fünf Tage lang nach Protokoll mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Während ihrer Differenzierung von Monozyten zu moDCs verloren diese den Oberflächenmarker CD14 und begannen CD1a zu exprimieren. Der Reifungsprozess von frisch isolierten Monozyten zu fertig entwickelten moDCs an Tag 5 im FACS ist in der folgenden Abbildung 6 dargestellt.



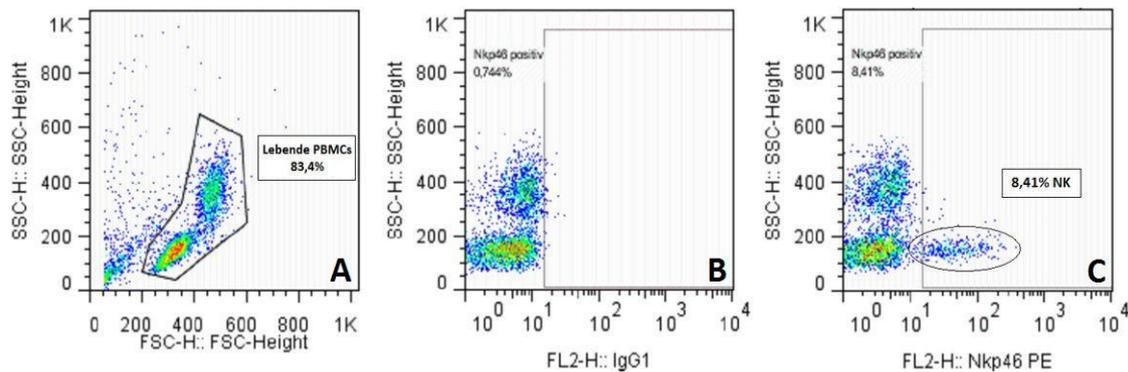
**Abbildung 6: Analyse der über fünf Tage generierten moDCs im FACS.** Die Monozyten verloren während ihrer Differenzierung zu moDCs das Oberflächenmolekül CD14 und exprimierten anschließend den Rezeptor CD1a. Die Diagramme A1, A2, A3 und A4 zeigen als Dichte-Diagramm die Streulichter (FSC und SSC) für A1 Tag 0, A2 Tag 2, A3 Tag 4 und A4 Tag 5 der moDC-Generierung. In den Diagrammen B1, B2, B3 und B4 ist die Anzahl der gemessenen Zellen (counts) gegen die logarithmische FITC-Fluoreszenz aufgetragen. Hierbei stellt der rote Graph die Fluoreszenz für CD14-FITC positive Zellen und der grüne Graph die Fluoreszenz für CD1a-FITC positive Zellen dar.

Im Histogramm zeigen die Messergebnisse deutlich die Expression von CD14 auf undifferenzierten moDCs und CD1a auf ausdifferenzierten moDCs. CD14 ist ein Glykoprotein, das als typischer Marker vor allem von Monozyten exprimiert wird. CD1a ist hingegen ein Molekül, das der MHC-Klasse I ähnelt und anderen Immunzellen Lipidantigene präsentieren kann. Die Unterscheidung von Monozyten und moDCs kann anhand der Expression dieser beiden beschriebenen Marker festgelegt werden. Bei der Messung der Monozyten am selben Tag ihrer Isolation exprimierten diese den Marker CD14, nicht aber CD1a. Am übernächsten Tag jedoch waren die differenzierenden Zellen CD14 negativ, während die Expression von CD1a zunahm. Ab dem vierten Tag exprimierten mehr als die Hälfte der Zellen CD1a, wohingegen CD14 nicht mehr auf den Zellen vorhanden war. Am Tag 5 war auf nahezu allen Zellen der Marker CD1a nachweisbar.

Die Messungen wurden alle mit den gleichen Einstellungen am selben Durchflusszytometer durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Monozyten mit zunehmender Ausdifferenzierung zu moDCs einen höheren SSC- und FSC-Wert aufwiesen. Nur ein geringer Zellanteil trennte sich in der Zeit des Differenzierungsvorgangs von der Hauptpopulation und besaß ein kleineres FSC und SSC. Mit diesen Messungen ließen sich die ausdifferenzierten Monozyten als moDCs definieren.

### **3.1.3 Unstimulierte und voraktivierte natürliche Killerzellen**

Vor der Isolation der NK-Zellen wurden die PBMCs im Durchflusszytometer analysiert, um den prozentualen Anteil der NK-Zellen zu ermitteln. Dieser Anteil kann mit Hilfe des Rezeptors Nkp46 untersucht werden und liegt in der Regel je nach Spender zwischen 4% und 10%. Nkp46 ist ein spezifisches Rezeptorprotein von natürlichen Killerzellen, welches die Funktion besitzt, verschiedene Zielzellen zu erkennen. Nach Bedarf werden durch den Rezeptor NK-Zellen aktiviert, die anschließend pathogene Zellen und Tumorzellen eliminieren können. Abbildung 7 zeigt die durchgeführte PBMC-Analyse mittels FACS.

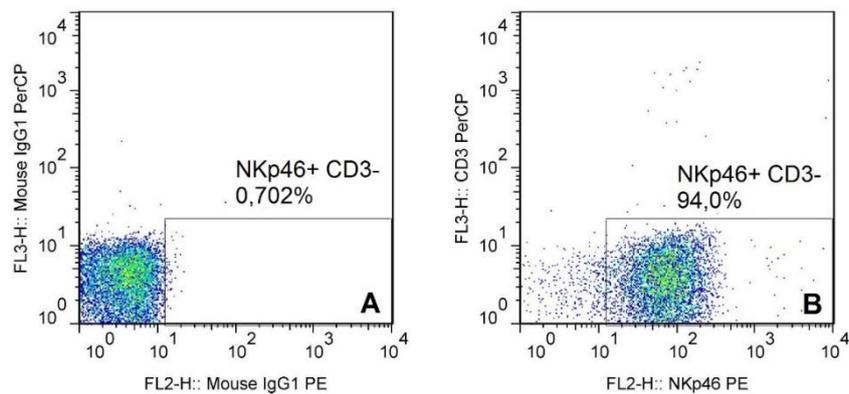


**Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs nach ihrer Isolation aus humanem, peripherem Blut.** In Diagramm A ist der Anteil der lebenden PBMCs aller Zellen, in Diagramm B die Hintergrundfluoreszenz durch den Isotyp IgG1 (Kontrollantikörper) und in Diagramm C der NK-Zell-Anteil aus allen lebenden PBMCs dargestellt. Bei dem beispielhaften Spender entsprach der NK-Zell-Anteil 8,4%.

In Abbildung 7A sind die lebenden PBMCs von den avitalen Zellen durch ein Gate abgegrenzt. Die vitalen Zellen betragen 83,4%. Die Hintergrundfluoreszenz, die als ISO-Kontrolle mit dem Antikörper IgG1 gemessen wurde, ist in Abbildung 7B dargestellt. Mit dem Farbstoff PE, der an den FACS-Antikörper gegen Nkp46 gekoppelt ist, wurden alle NK-Zellen markiert. Diese lassen sich in Abbildung 7C deutlich von allen anderen Nkp46 negativen PBMCs abgrenzen. Die eingegrenzte Population entspricht hierbei den NK-Zellen, die bei dem beispielhaften Spender einen Anteil von 8,4% aller vitalen PBMCs ausmachten.

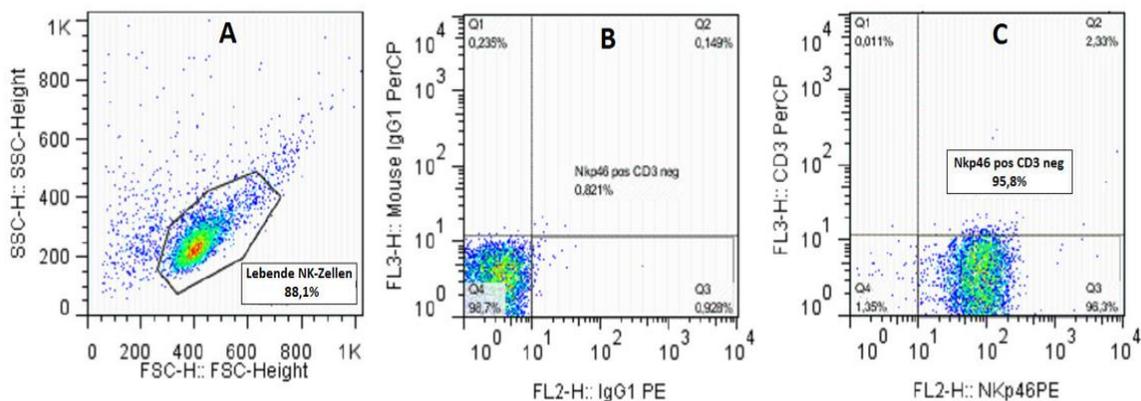
Nach der Isolation der NK-Zellen mit Hilfe einer magnetischen Negativ-Selektion, wurden diese im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit überprüft. In Abbildung 8 ist die Analyse der isolierten, naiven NK-Zellen dargelegt.

Die große Population in Abbildung 8B zeigt alle Zellen, die für Nkp46 positiv und für CD3 negativ waren. Die Reinheit der NK-Zellen lag bei 94,0%.



**Abbildung 8: Die Reinheit der naiven NK-Zellen in der Durchflusszytometer-Analyse.** Die Reinheit betrug 94,0%. Diagramm A zeigt die Hintergrundfluoreszenz durch den Isotyp IgG1 (Kontrollantikörper). In Diagramm B ist die Färbung der NK-Zellen abgebildet. Innerhalb der Zellpopulation der NK-Zellen waren 94,0% Nkp46 positiv und CD3 negativ.

In den Versuchen wurden auch NK-Zellen verwendet, die nach ihrer Isolation 24 Stunden mit Proleukin geprimt und somit voraktiviert wurden. Die 24-stündige Voraktivierung mit Proleukin hatte auf das Überleben und die Reinheit der NK-Zellen keinen Einfluss. Eine beispielhafte Messung in Abbildung 9 zeigt, dass 88,1% der vermessenen Zellen als vital eingestuft werden konnten. Von den vitalen Zellen waren 96,0% reine NK-Zellen, die positiv für NKp46 und negativ für CD3 waren.

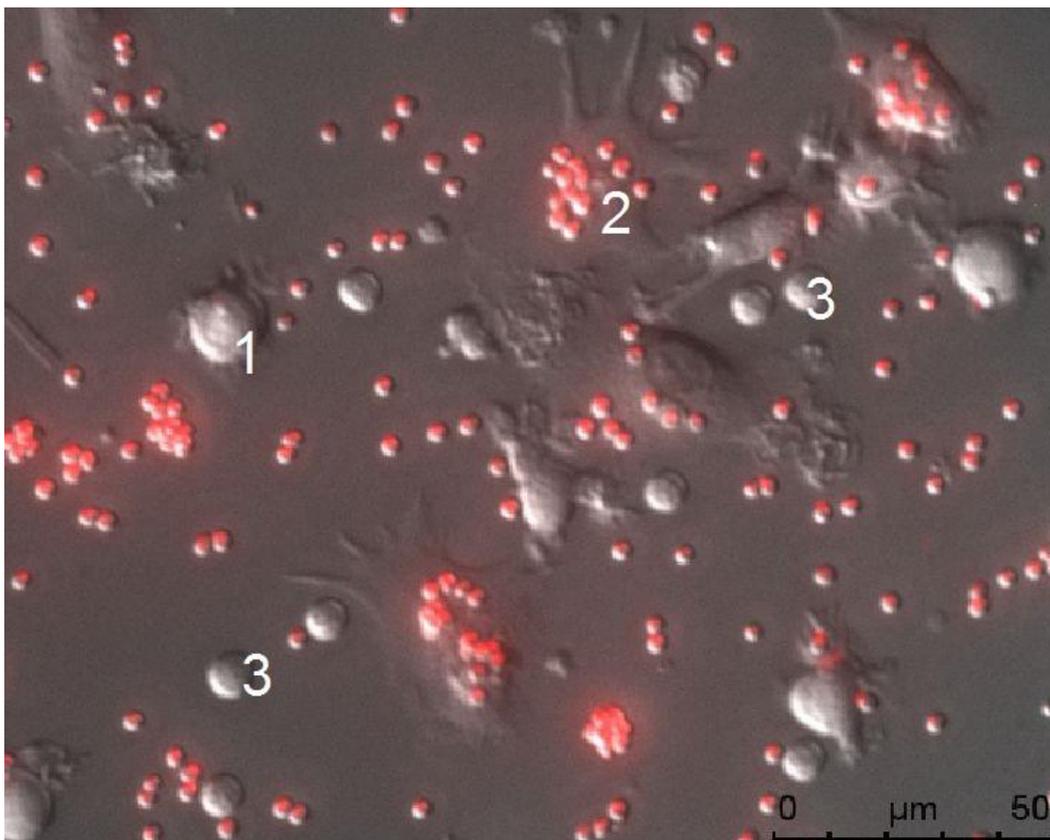


**Abbildung 9: Anteil der lebenden NK-Zellen nach 24h Voraktivierung mit Proleukin im FACS.** Diagramm A zeigt die eingegrenzten lebenden Zellen (88,1%) neben den avitalen Zellen, Diagramm B die Hintergrundfluoreszenz durch IgG1-PE zur Kontrolle und Diagramm C den Anteil an vitalen Zellen, die Nkp46 positiv und CD3 negativ waren (95,8%).

### 3.2 Konfrontationsuntersuchungen im Live-imaging

In den Experimenten wurden Pilzmorphologien von *A. fumigatus* mit moDCs koinkubiert und deren Interaktionen mit weiteren Versuchsansätzen, denen zusätzlich NK-Zellen hinzugefügt wurden, verglichen. Die Durchführung der Experimente erfolgte am Time-lapse Mikroskop Leica AF6000. Mit diesem Mikroskop ist es möglich, regelmäßig Fotografien desselben Bildausschnittes über mehrere Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37°C aufzunehmen. Die Fotografien wurden im Anschluss durch ihr Aneinanderreihen zu Filmausschnitten zusammengefügt.

Um eine Unterscheidung der einzelnen Zellen in den nachfolgenden Kapiteln gewährleisten zu können, sind in Abbildung 10 alle verschiedenen Zellarten aus den Versuchen lichtmikroskopisch dargestellt.



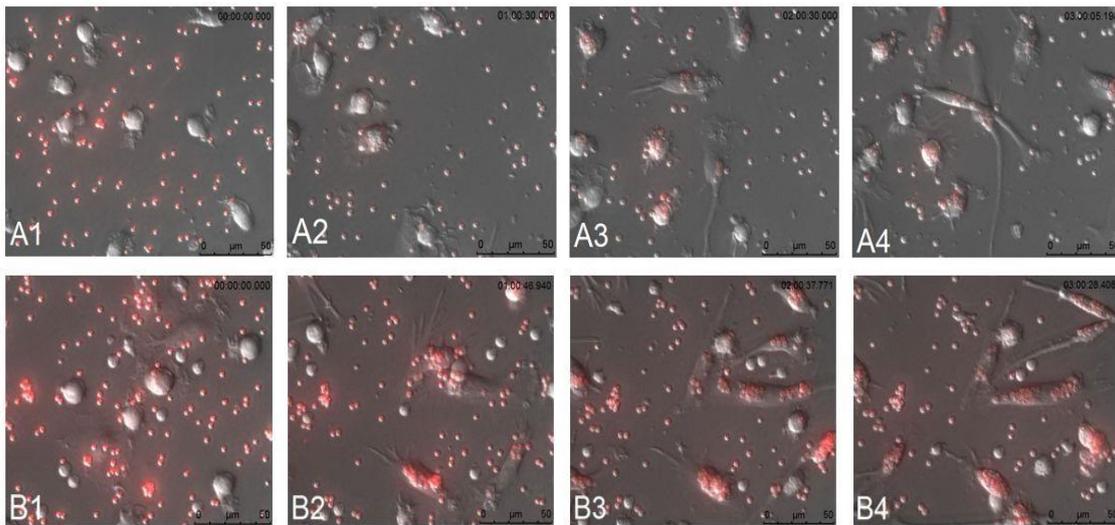
**Abbildung 10: Verschiedene Zellarten im Live-imaging Mikroskop.** Die kleinsten, rot leuchtenden Zellen sind *Aspergillus fumigatus*-Konidien. Zusätzlich zu sehen sind unreife moDCs (1), moDCs, die sich auf dem Objektträger adhärirt und schon Dendriten ausgebildet haben (2), sowie die etwas kleineren NK-Zellen (3).

Zum einen wird in Abbildung 10 eine von Monozyten abgeleitete dendritische Zelle dargestellt, die noch wenig verzweigt ist (1). Eine andere moDC ist hingegen schon auf dem Objektträger adhärirt und weist eine deutliche Ausbildung von Dendriten auf (2). Dadurch erscheint die Zelle im Bild flacher und größer. Die morphologisch etwas kleineren Zellen sind NK-Zellen (3). Durch die Größen und die typische Morphologie der moDCs lassen sich die Immunzellen gut voneinander abgrenzen. Die deutlich kleineren Konidien von *A. fumigatus* sind durch ihr rotes Leuchten eindeutig von den Immunzellen zu unterscheiden.

Für die statistischen Auswertungen wurden immer die ersten drei Stunden der Live-imaging Filme analysiert, da die Zellen ausschließlich von einer unter dem Deckgläschen eingeschlossenen Luftblase mit Luft versorgt wurden. Nach zehn Stunden wies das RPMI-Medium einen leicht sauren pH-Wert auf, der durch die Orangefärbung des Mediums erkennbar wurde. Bei allen Versuchen wurde jeweils ein Spender bis zu zehn Stunden gefilmt und begutachtet. In diesen Stunden nahm die Aktivität der Zellen stetig ab und stagnierte nach einer gewissen Zeit vollständig. Die Stagnation lässt sich auf den veränderten pH-Wert, den fehlenden Luftaustausch und die fehlende weitere Versorgung der Zellen zurückführen.

### **3.2.1 MoDCs kontaktieren und phagozytieren *A. fumigatus*-Morphologien**

Im ersten Versuchsansatz wurden moDCs mit *A. fumigatus*-Morphologien koinkubiert und deren Interaktionen über drei Stunden im Live-imaging beobachtet. Gleichzeitig wurden dieser Kokultur in einem weiteren Versuchsansatz NK-Zellen hinzugefügt und die Interaktionen der einzelnen Zellen mit denen des ersten Ansatzes verglichen. Abbildung 11 zeigt Echtzeitaufnahmen dieser beiden Versuchsansätze in einem Zeitabstand von jeweils einer Stunde.

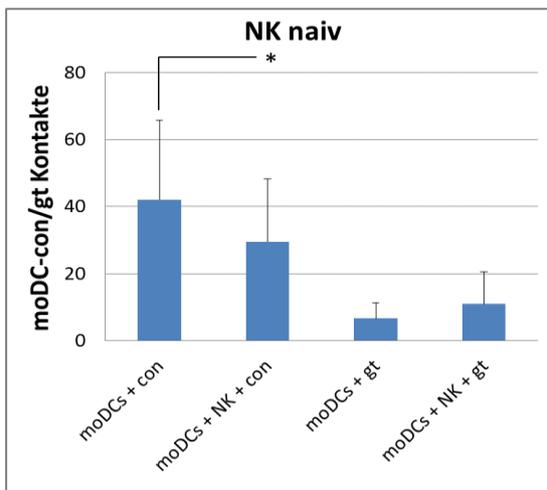


**Abbildung 11: Echtzeitaufnahmen der Interaktion zwischen *A. fumigatus*-Konidien (kleine, rote Zellen) und moDCs (große, graue Zellen) in Abwesenheit (A1-A4) und in Anwesenheit (B1-B4) von naiven NK-Zellen (mittelgroße, graue Zellen).** MoDCs kontaktierten und phagozytierten Konidien in beiden Ansätzen. Der Zeitpunkt der Aufnahmen erfolgte nach jeweils einer Stunde, wobei A1/B1 zum Zeitpunkt  $t=0$  zu Beginn der Mikroskopie als Ausgangsfotografie aufgenommen wurde. Für die folgenden Abbildungen gilt: A2/B2  $t=1h$ , A3/B3  $t=2h$  und A4/B4  $t=3h$ .

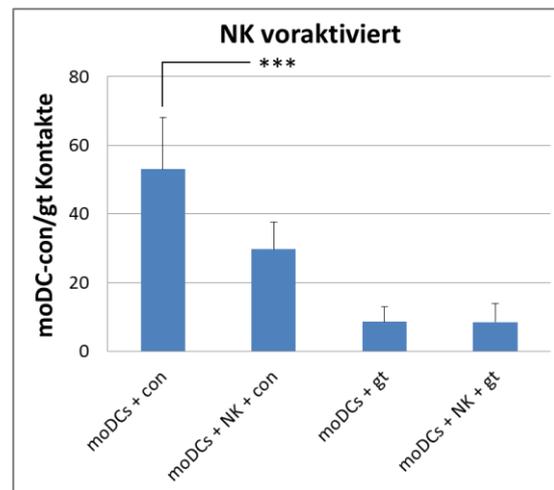
Die Bilder A1 bis A4 (Abbildung 11) zeigen stündliche Aufnahmen von moDCs in Kokultur mit ruhenden Konidien. Die Bilder B1 bis B4 (Abbildung 11) zeigen die gleiche Kokultur mit zusätzlicher Inkubation von NK-Zellen. Es ist deutlich erkennbar, dass sich in Position A1 und B1 der Großteil der Konidien extrazellulär befindet und noch nicht mit den anderen Zellen in Kontakt getreten ist. In der ersten Stunde war die Phagozytoserate von Konidien durch die moDCs am stärksten ausgeprägt (Abbildung 11 A2/B2). Nachdem die moDCs die Umgebung zunächst abtasteten, erfolgte im Anschluss die Kontaktaufnahme und Internalisierung der Konidien. Erkennbar ist außerdem, dass die moDCs zu Beginn des Versuches nicht oder nur leicht verzweigt sind, im Laufe der Koinkubation aber immer stärker Zellfortsätze ausbilden und sich weiter ausdehnen. Ihre Dendriten erlangten teilweise eine Länge von bis zu 60  $\mu\text{m}$ . Auch bei den Konidien ließen sich Veränderungen in ihrer Morphologie beobachten. Während extrazelluläre Konidien mit zunehmender Inkubationszeit zu schwellen anfangen und dadurch ihren Durchmesser vergrößerten, blieben internalisierte Konidien in ihrem Wachstum gehemmt. In Anwesenheit von NK-Zellen war in den Live-imaging Filmen sowohl bei den

moDCs als auch bei den *A. fumigatus*-Morphologien kein verändertes Verhalten erkennbar.

Zusätzlich wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Konidien durch Keimschläuche ausgetauscht. Es zeigte sich, dass moDCs kurze Keimschläuche ebenfalls internalisieren können. In Summe wurden dabei jedoch weniger Phagozytosen festgestellt als im Versuchsansatz mit Konidien. Auch der Austausch von naiven NK-Zellen durch voraktivierte NK-Zellen zeigte in den durchgeführten Versuchen keine erkennbaren Unterschiede des Phagozytoseverhaltens von moDCs. Die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien/Keimschläuchen wurde über einen Zeitraum von drei Stunden ausgewertet und ist in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.



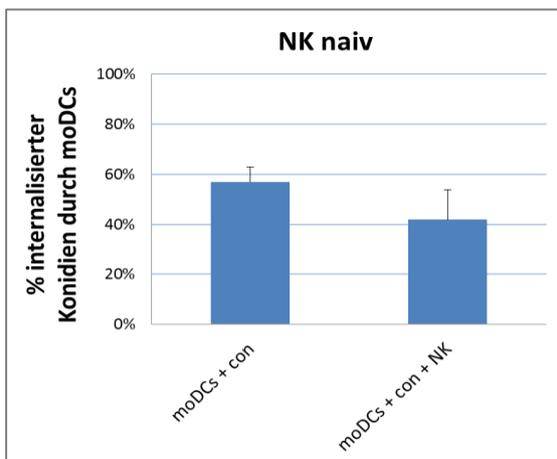
**Abbildung 12: Anzahl der Kontakte von moDCs mit *A. fumigatus*-Morphologien in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. Durch Zugabe von naiven NK-Zellen waren die moDC-con-Kontakte signifikant reduziert und die moDC-gt-Kontakte tendenziell erhöht. Ausgewertet wurden in den Versuchen moDC-con sechs Spender und in den moDC-gt-Versuchen drei Spender.



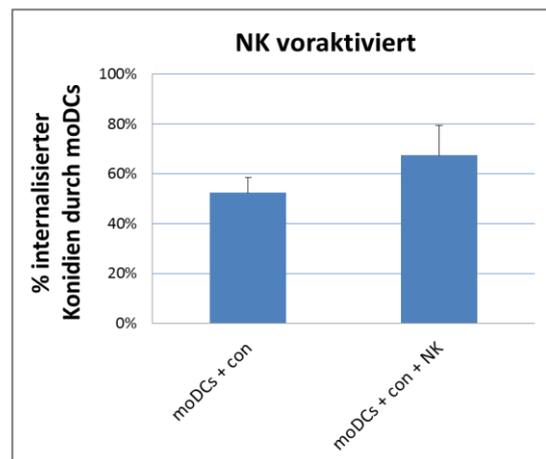
**Abbildung 13: Anzahl der Kontakte von moDCs mit *A. fumigatus*-Morphologien in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. Durch Zugabe von voraktivierten NK-Zellen waren die moDC-con-Kontakte signifikant reduziert und die moDC-gt-Kontakte nahezu gleich. Ausgewertet wurden in den Versuchen moDC-con vier Spender und in den moDC-gt-Versuchen drei Spender.

In den unterschiedlichen Filmen wurde die Anzahl der Kontakte von moDCs zu Konidien/Keimschläuchen mit und ohne NK-Zellen jeweils anhand von mindestens drei unterschiedlichen Spendern analysiert. Sowohl bei Anwesenheit von naiven als auch von mit Proleukin voraktivierten NK-Zellen sanken die Kontakte zwischen moDCs und Konidien signifikant. Während in Kokultur mit naiven NK-Zellen die Kontakte etwa um ein Drittel reduziert waren, zeigte sich in der Koinkubation mit aktivierten NK-Zellen eine Reduktion von fast 50%. Voraktivierte NK-Zellen senkten die moDC-Aktivität demnach deutlicher als naive NK-Zellen. Die Kontaktanzahl zwischen moDCs und Keimschläuchen zeigte in Anwesenheit von NK-Zellen hingegen keine signifikanten Veränderungen.

Ebenso wurde in den Auswertungen die Menge der extrazellulären, sowie der intrazellulären Konidien bestimmt und der prozentuale Anteil der phagozytierten Konidien zu der Gesamtmenge an Konidien berechnet. Dieser Sachverhalt wird in den Abbildungen 14 und 15 aufgezeigt.



**Abbildung 14: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien. Die Anzahl der prozentual phagozytierten Konidien sank tendenziell in Anwesenheit von naiven NK-Zellen.



**Abbildung 15: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien. Die Anzahl der prozentual phagozytierten Konidien stieg tendenziell in Anwesenheit von voraktivierten NK-Zellen.

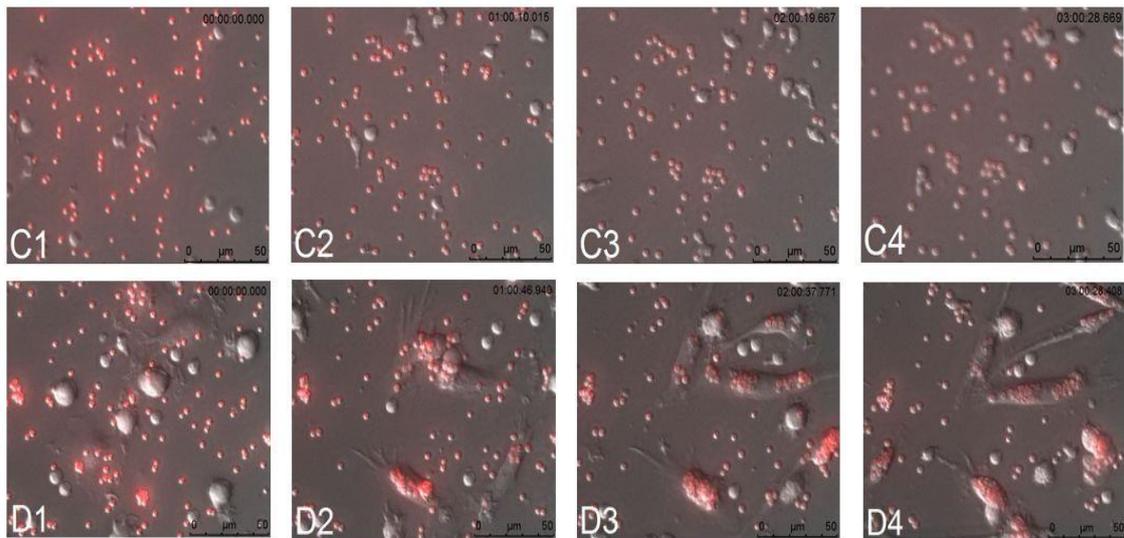
In den Abbildungen 14 und 15 ist die auf Basis von jeweils mindestens drei Spendern prozentual ermittelte Konidienmenge abgebildet, die von verschiedenen moDCs nach drei Stunden im Live-imaging phagozytiert wurde. Die Keimschläuche blieben aufgrund ihrer geringen Anzahl in diesen Diagrammen unberücksichtigt.

In den Versuchen mit naiven NK-Zellen sank der Anteil an durch moDCs phagozytierten Konidien von 57% ohne NK-Zellen auf 42% mit naiven NK-Zellen. Bei den Experimenten mit voraktivierten NK-Zellen stieg die prozentuale Menge der internalisierten Konidien hingegen von 52% auf 67% an.

Die statistischen Auswertungen ergaben, dass in Anwesenheit von NK-Zellen eine signifikante Abnahme der Kontakte zwischen moDCs und Konidien stattfand. Somit konnte eine Verringerung der moDC-Aktivität bei Anwesenheit von NK-Zellen nachgewiesen werden.

### **3.2.2 NK-Zellen kontaktieren *A. fumigatus*-Morphologien, phagozytieren diese jedoch nicht**

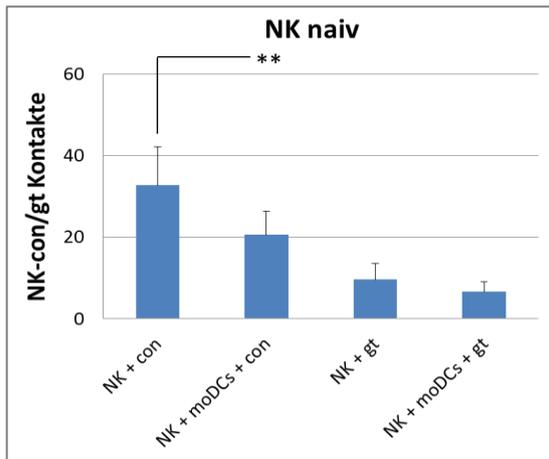
Analog zu der Auswertung von moDCs (Kapitel 3.2.1) wurden auch die NK-Zellen in den gleichen Versuchsansätzen analysiert. Die Beobachtung in den Live-imaging Filmen ergab, dass NK-Zellen weder einzeln mit Konidien noch in Kokultur mit Konidien und moDCs phagozytieren. Abbildung 16 zeigt Echtzeitaufnahmen zur Veranschaulichung dieses NK-Zell-Verhaltens.



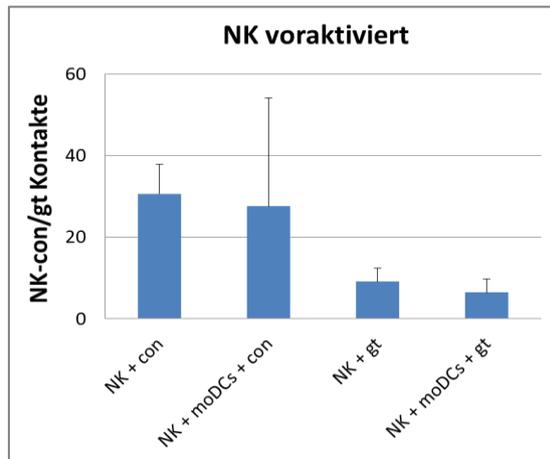
**Abbildung 16:** Echtzeitaufnahmen der Interaktion zwischen voraktivierten NK-Zellen (graue, größere Zellen) und Konidien (kleinere, rot leuchtende Zellen) (C) und zum Vergleich der Kokultivierung mit moDCs (D) im stündlichen Abstand. Es wurden in beiden Versuchsansätzen Kontakte zwischen NK-Zellen und Konidien, jedoch keine Zell-Internalisierungen durch NK-Zellen beobachtet. Das mikroskopisch beobachtete NK-Zell-Verhalten änderte sich bei Anwesenheit von moDCs nicht.

Die Aufnahmen C1 bis C4 (Abbildung 16) zeigen stündliche Echtzeitaufnahmen von NK-Zellen und Konidien in Kokultivierung in einem Zeitraum von drei Stunden. Im Vergleich dazu zeigen die Aufnahmen D1 bis D4 (Abbildung 16) die gleiche Kokultivierung mit zusätzlich inkubierten moDCs. Die moDCs sind in den Aufnahmen als große, graue Zellen, NK-Zellen als etwas kleinere, graue Zellen erkennbar. Hingegen kennzeichnen sich die *A. fumigatus*-Konidien durch ihre Rotfärbung. Morphologisch blieben einige NK-Zellen in ihrer kugeligen Form bestehen, andere wurden aktiv und tasteten Konidien und moDCs ab. Berührungen zwischen NK-Zellen und Konidien/moDCs waren deutlich auszumachen, jedoch führten diese in keinem der Fälle zur Phagozytose. In Kokultivierung mit allen drei verschiedenen Zelltypen waren bei NK-Zellen keine Verhaltensänderungen im Live-imaging festzustellen.

Die Anzahl der Kontakte zwischen NK-Zellen und Konidien wurde ebenso über drei Stunden ausgewertet. Dies ist in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.



**Abbildung 17: Anzahl der Kontakte von naiven NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Morphologien in An- und Abwesenheit von moDCs.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. In Anwesenheit von moDCs waren die Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und Konidien signifikant und zwischen naiven NK-Zellen und Keimschläuchen tendenziell verringert. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.



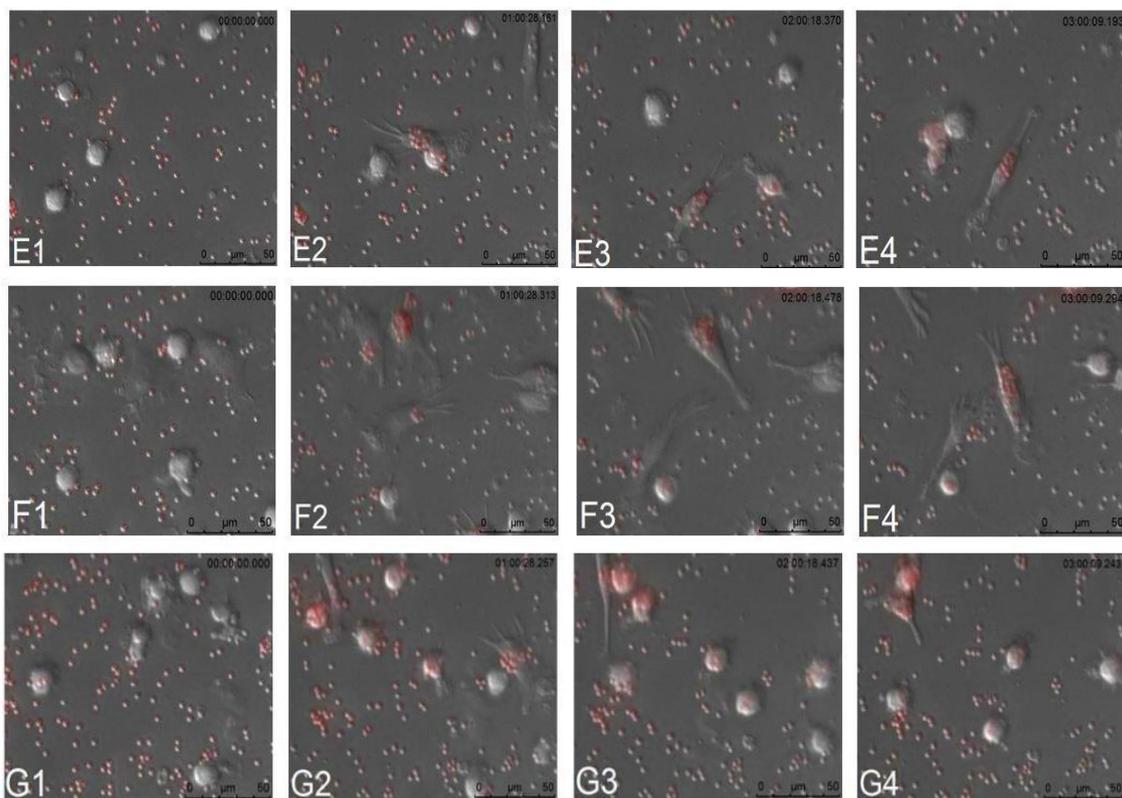
**Abbildung 18: Anzahl der Kontakte von voraktivierten NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Morphologien in An- und Abwesenheit von moDCs.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. In Anwesenheit von moDCs waren die Kontakte zwischen voraktivierten NK-Zellen und *A. fumigatus*-Morphologien tendenziell verringert. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.

Wie in den Abbildungen 17 und 18 veranschaulicht, war die Anzahl der Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und Konidien bei Hinzugabe von moDCs zur Kokultur signifikant geringer. Zwischen naiven NK-Zellen und Keimschläuchen war nur eine leichte Reduktion feststellbar. Im Vergleich dazu ergab sich bei voraktivierten NK-Zellen durch die Zugabe von moDCs sowohl für die Kontakte zu *A. fumigatus*-Konidien als auch zu Keimschläuchen keine signifikante, sondern nur eine geringfügige Reduktion.

### 3.2.3 NK-Überstände sind nicht für erniedrigte Kontakte zwischen moDCs und Konidien verantwortlich

In den folgenden Experimenten wurde die Interaktion von moDCs mit Konidien in Anwesenheit von NK-Überständen untersucht, da die Zugabe von NK-Zellen in den vorausgehenden Versuchen die Kontakte zwischen moDCs und Konidien verringerten. Das Ziel der Analyse bestand darin, herauszufinden, ob lösliche Faktoren der NK-Zellen für diese Tatsache verantwortlich sind.

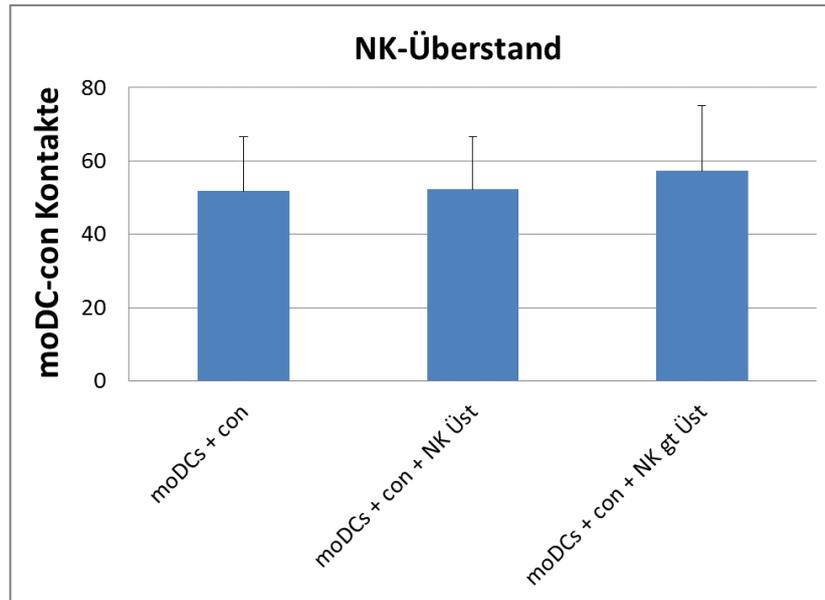
In Abbildung 19 sind stündliche Fotos von Echtzeitaufnahmen der verschiedenen Versuchsansätze dieser Experimente dargestellt.



*Abbildung 19: Live-imaging Aufnahmen von moDCs (große, graue Zellen) und Konidien (kleine, rote Zellen) in zellspezifischem Medium (E1-E4), sowie moDCs und Konidien mit NK-Überständen (F1-F4) und moDCs und Konidien mit NK-gt-Überständen (G1-G4). NK-Überstände stammen von voraktivierten NK-Zellen, die über sechs Stunden ohne Stimulus von Keimschläuchen kultiviert wurden. NK-gt-Überstände hingegen werden von NK-Zellen produziert, die über sechs Stunden mit der gleichen Menge an Keimschläuchen koinkubiert wurden und so einen pilzlichen Stimulus erhielten. Im Live-imaging waren nach Zugabe von NK-Überständen keine Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Zellen erkennbar.*

In Abbildung 19 sind jeweils zwei verschiedene Zelltypen erkennbar: große, graue moDCs, sowie kleine, rote *A. fumigatus*-Konidien. In Experiment E1 bis E4 wurden moDCs mit Konidien im zellspezifischen moDC-Medium ohne zusätzliche Überstände gefilmt. Dies diente als Vergleich zu den beiden anderen Versuchsansätzen F1 bis F4 und G1 bis G4. Versuchsansatz F1 bis F4 zeigt Live-imaging Aufnahmen von moDCs und Konidien, auf die kurz vor Beginn der Aufnahmen NK-Überstände gegeben wurden. Diese Überstände stammten von NK-Zellen, die über sechs Stunden ohne Stimulus von Keimschläuchen kultiviert wurden. Das Experiment G1 bis G4 fand unter Verwendung der gleichen Kokultur wie in den Versuchen E und F statt, allerdings mit NK-gt-Überständen anstelle von reinen NK-Überständen. Für die Herstellung dieser Überstände wurden NK-Zellen über sechs Stunden mit der gleichen Menge an Keimschläuchen (MOI=1) koinkubiert und somit durch die Anwesenheit des Pilzes stimuliert. Für den Fall, dass die verringerte Anzahl an Kontakten zwischen moDCs und Konidien in Kokultur mit NK-Zellen von löslichen Faktoren der NK-Zellen abhängt, sollte mit diesem Experiment aufgezeigt werden, ob die Faktoren von naiven oder von durch den Pilz stimulierten NK-Zellen stammen. Allerdings konnten bereits in den Filmen keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen festgestellt werden. Die moDC-Aktivität blieb durch die Zugabe der beiden Überstände annähernd gleich. MoDCs nahmen in allen drei Ansätzen Kontakt zu den Konidien auf und phagozytierten diese in gleichem Maße.

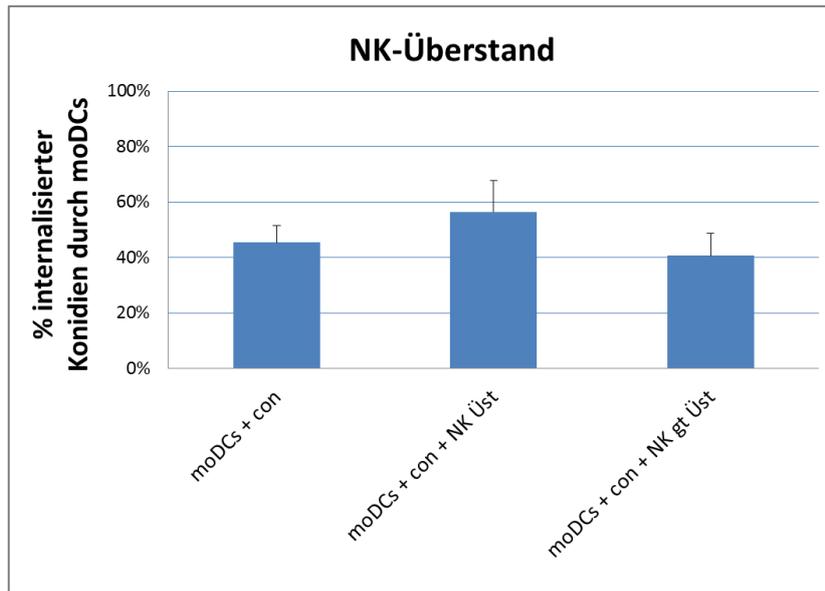
Dieselben statistischen Auswertungen wie in Kapitel 3.2.1 wurden auch für diese Versuchsansätze angewandt und sind in Abbildung 20 zusammengefasst.



**Abbildung 20: Anzahl der Kontakte von moDCs mit Konidien bei Zugabe unterschiedlicher NK-Überstände.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien, gt = Keimschläuche und Üst = Überstand. Säulen von links nach rechts: Unstimulierte moDCs in RPMI-Medium, sowie mit NK-Zell-Überstand stimulierte moDCs und mit NK-gt-Überstand stimulierte moDCs. Die Menge der Kontakte war bei allen Versuchsansätzen ähnlich und ergab keine signifikanten Unterschiede. Je Versuchsansatz wurden drei Spender ausgewertet.

Abbildung 20 zeigt, dass NK-Überstände und auch die Überstände von mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen inkubierten NK-Zellen keinen Einfluss auf die moDC-Aktivität hatten. Die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien war in Anwesenheit von beiden Überstandarten sehr ähnlich zu der Anzahl der Kontakte zwischen unstimulierten moDCs und Konidien. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dementsprechend ergab sich kein Hinweis darauf, dass die geringere Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Kokultur mit NK-Zellen (Kapitel 3.2.1) durch NK-Überstände ausgelöst wurde.

Die Aufnahmen der internalisierten Konidien wurden ebenfalls nach drei Stunden statistisch ausgewertet (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien mit unstimulierten moDCs, moDCs in NK-Überstand und moDCs in NK-gt-Überstand.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien, gt = Keimschläuche und Üst = Überstand. Die statistische Analyse zeigte in der Phagozytose sowohl bei durch NK-Üst als auch durch NK-gt-Üst stimulierten moDCs keinerlei signifikante Unterschiede. Es wurden drei verschiedene Spender ausgewertet.

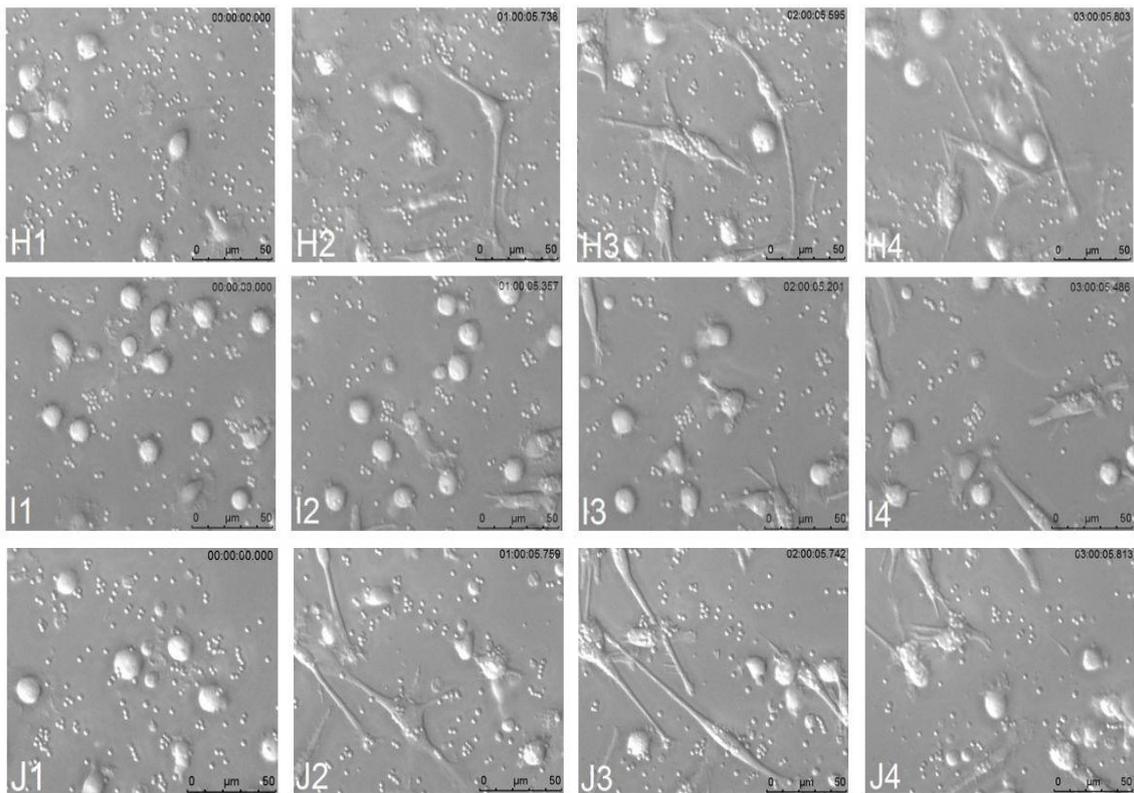
Der Prozentsatz der internalisierten Konidien lag bei den drei Versuchsansätzen zwischen 40% und 60%. Der Vergleich zwischen unstimulierten und mit Überständen stimulierten moDCs zeigte keine signifikante Abweichung. Die Phagozytoserate von moDCs mit NK-Überständen war leicht erhöht und die Phagozytoserate von moDCs mit NK-gt-Überständen minimal verringert. Im Unterschied zu den unstimulierten moDCs ergaben sich p-Werte von  $p = 0,76$  für moDCs mit NK-Überstand und  $p = 0,86$  für moDCs mit NK-gt-Überstand.

Die Experimente dieses Abschnittes führten zu dem Ergebnis, dass für die verringerten Kontakte in Kokultur von moDCs und Konidien in Anwesenheit von NK-Zellen keine löslichen Faktoren der NK-Zellen verantwortlich sein können. Demnach müssen direkte Zell-Zell-Kontakte vorliegen.

### **3.2.4 MoDCs kontaktieren und phagozytieren *A. fumigatus*-Morphologien der Mutante $\Delta$ RodA in gleicher Weise wie diejenigen des Wildtyps**

Mit der Mutante  $\Delta$ RodA wurden die gleichen Versuche wie in den vorherigen Kapiteln 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 durchgeführt. Bei der Mutante handelt es sich um einen gentechnisch veränderten Typ von *A. fumigatus*, bei dem das Gen für die Rodlet-Struktur des Pilzes entfernt wurde. Die sogenannte Rodlet-Struktur ist eine proteinreiche Schicht auf der Außenseite des Konidiums, welche nur bei ruhenden Sporen vorliegt. Diese Schicht schützt den Pilz gegen schädigende Umwelteinflüsse und Immunzellen. Sie ist stark hydrophob und besteht zum Großteil aus Hydrophobin A und Hydrophobin B (Paris et al., 2003). Im Zuge der Auskeimung der Konidien erfolgt eine Umstrukturierung der fungalen Zellwand, wodurch die Rodlet-Struktur verloren geht (Rohde et al., 2002). Dies führt zu einer verringerten Resistenz des Pilzes gegenüber dem Immunsystem. Die Mutante  $\Delta$ RodA ist demnach im Vergleich zum Wildtyp sensitiver gegenüber Immunzellen, welche den Pilz erkennen und gegen ihn reagieren (Paris et al., 2003).

In den Versuchen wurde getestet, ob sich dieser Pilztyp in der Interaktion mit moDCs im Phagozytoseverhalten und der Anzahl der Kontakte zwischen Pilz und Immunzellen zum Wildtyp differenziert. Im Live-imaging unterschied sich der Pilztyp rein optisch in der fehlenden rot leuchtenden Farbe seiner Konidien. Abbildung 22 zeigt die Interaktion der verschiedenen Zellarten mit Konidien der Mutante  $\Delta$ RodA.



**Abbildung 22: Live-imaging Aufnahmen der Interaktion von moDCs (große Zellen) und Konidien (kleine Zellen) der Mutante  $\Delta$ RodA mit und ohne naive oder voraktivierte NK-Zellen (mittelgroße Zellen).** H1-H4 zeigt die Kokultur moDC-Konidien ohne NK-Zellen, I1-I4 mit naiven NK-Zellen und J1-J4 mit voraktivierten NK-Zellen. Die *A. fumigatus*-Konidien dieses Pilztyps wurden vergleichbar wie beim Wildtyp kontaktiert und phagozytiert. Rein mikroskopisch war keine veränderte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erkennbar.

Wie auch beim Wildtyp kontaktierten und phagozytierten moDCs die Pilzmorphologien. Ein Unterschied in ihrer Aktivität war trotz des immunogeneren Pilztyps mikroskopisch nicht zu erkennen.

Die statistischen Auswertungen erbrachten bei der Anzahl der Kontakte und der Phagozytosen ähnliche Ergebnisse wie beim Wildtyp. Die Auswertungen der Kontaktanzahl sind in den Abbildungen 23 und 24, die Ergebnisse der Phagozytosen in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt.

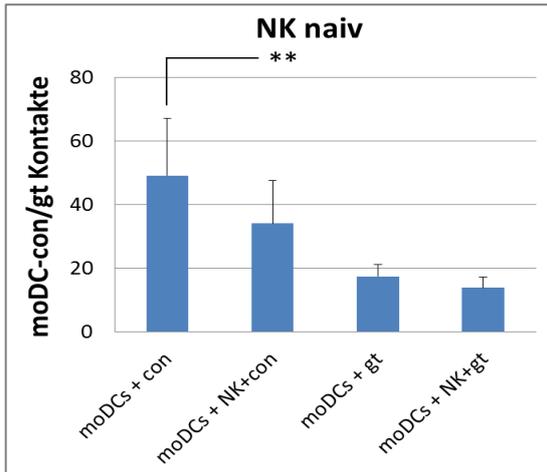


Abbildung 23: Anzahl der Kontakte von moDCs mit *A. fumigatus*-Morphologien der Mutante  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen. Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. Durch Zugabe von naiven NK-Zellen waren die moDC-con-Kontakte signifikant und die moDC-gt-Kontakte tendenziell reduziert. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.

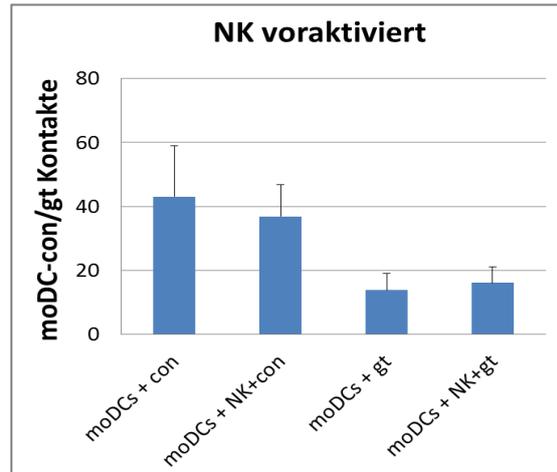
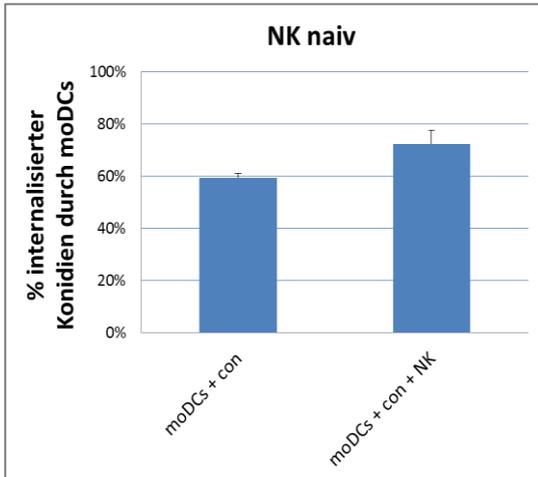


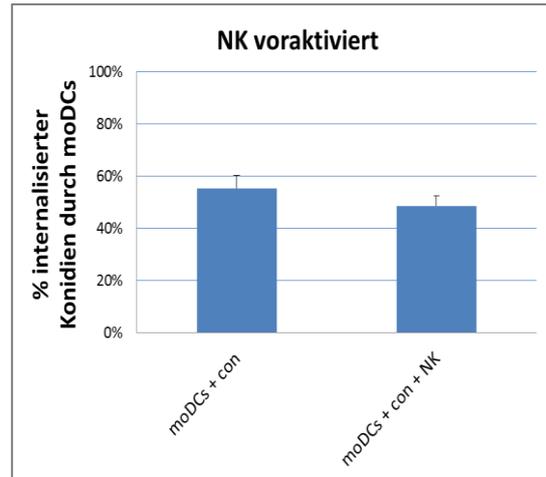
Abbildung 24: Anzahl der Kontakte von moDCs mit *A. fumigatus*-Morphologien der Mutante  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen. Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. Durch Zugabe von voraktivierten NK-Zellen waren die moDC-con-Kontakte tendenziell reduziert und die moDC-gt-Kontakte leicht erhöht. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.

In Anwesenheit von naiven NK-Zellen war die Anzahl der moDC-Konidien-Kontakte signifikant geringer. Im Vergleich dazu ergab sich bei dem Versuchsansatz mit voraktivierten NK-Zellen nur eine tendenzielle Reduktion. In den Versuchen mit Keimschläuchen war keine Tendenz feststellbar.

Die Phagozytosen blieben in Anwesenheit von NK-Zellen weitgehend unverändert. Wie beim Wildtyp waren die Unterschiede zwischen den Kokulturen nicht signifikant (Abbildung 25 und 26).



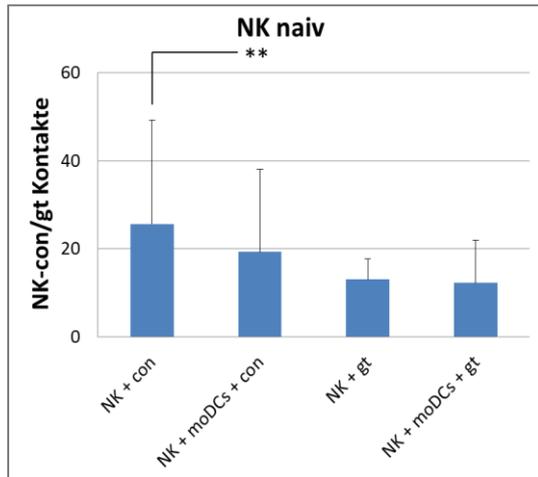
**Abbildung 25: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien der Mutante  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien. Die Anzahl der prozentual phagozytierten Konidien stieg tendenziell in Anwesenheit von naiven NK-Zellen an.



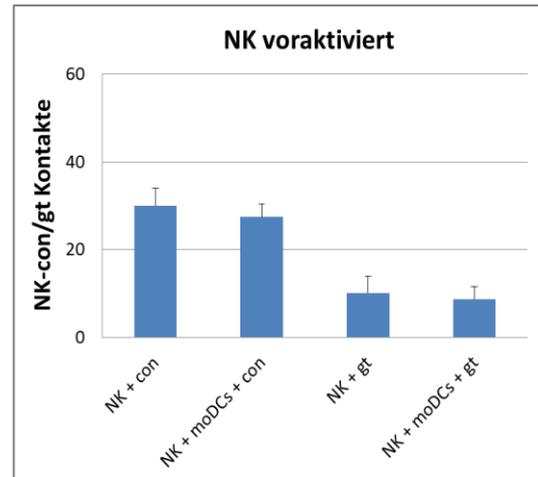
**Abbildung 26: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien der Mutante  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien. Die Anzahl der prozentual phagozytierten Konidien sank tendenziell in Anwesenheit von voraktivierten NK-Zellen.

In den Abbildungen 25 und 26 ist erkennbar, dass keine starken Abweichungen in den Phagozytoseauswertungen vorliegen. Während der prozentuale Anteil in den Experimenten mit naiven NK-Zellen von 59% auf 72% anstieg, fiel er in den Versuchen mit voraktivierten NK-Zellen von 55% auf 49%. In diesen Versuchen war keine Signifikanz festzustellen.

Die statistischen Auswertungen der Interaktion von naiven und voraktivierten NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Morphologien sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

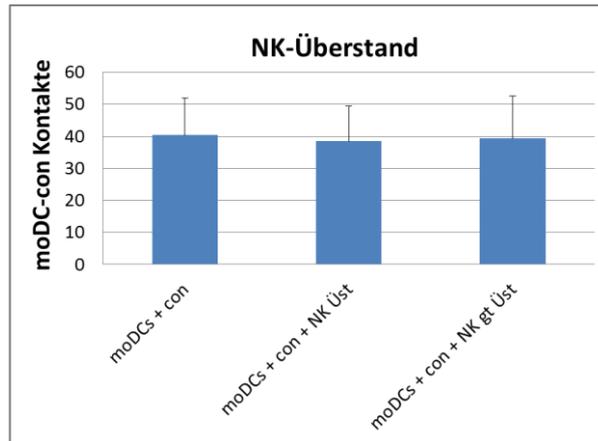


**Abbildung 27: Anzahl der Kontakte von naiven NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Morphologien des Pilztyps  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von moDCs.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. In Anwesenheit von moDCs waren die Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und Konidien signifikant verringert und zwischen naiven NK-Zellen und Keimschläuchen annähernd gleich. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.

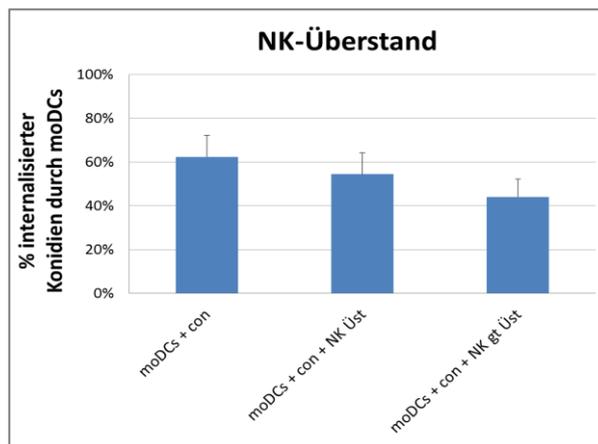


**Abbildung 28: Anzahl der Kontakte von voraktivierten NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Morphologien des Pilztyps  $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von moDCs.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien und gt = Keimschläuche. In Anwesenheit von moDCs waren die Kontakte zwischen voraktivierten NK-Zellen und *A. fumigatus*-Morphologien tendenziell verringert. Ausgewertet wurden in den Versuchen jeweils drei Spender.

Auch die Kontaktanzahl zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus*-Konidien war in Anwesenheit von moDCs geringer, wobei sie bei voraktivierten NK-Zellen nur tendenziell und bei naiven NK-Zellen signifikant gesenkt war. Die Anzahl der Kontakte mit Keimschläuchen war durchweg kleiner. Analog zu den Versuchen mit dem Wildtyp wurden auch mit dem Pilztyp  $\Delta$ RodA Experimente mit NK-Überständen durchgeführt. Der Versuchsaufbau, sowie die Durchführung war identisch zu denen in Kapitel 3.2.3. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 29 und 30 zusammengefasst.



**Abbildung 29: Anzahl der Kontakte von moDCs mit Konidien des Pilztyps  $\Delta$ RodA bei Einwirkung von NK-Überständen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien, gt = Keimschläuche und Üst = Überstand. Säulen von links nach rechts: unstimulierte moDCs in RPMI-Medium, sowie mit NK-Zell-Überstand stimulierte moDCs und mit NK-gt-Überstand stimulierte moDCs. Die Menge der Kontakte war bei allen Versuchsansätzen vergleichbar und ergab keine signifikanten Unterschiede. Je Versuchsansatz wurden drei Spender ausgewertet.



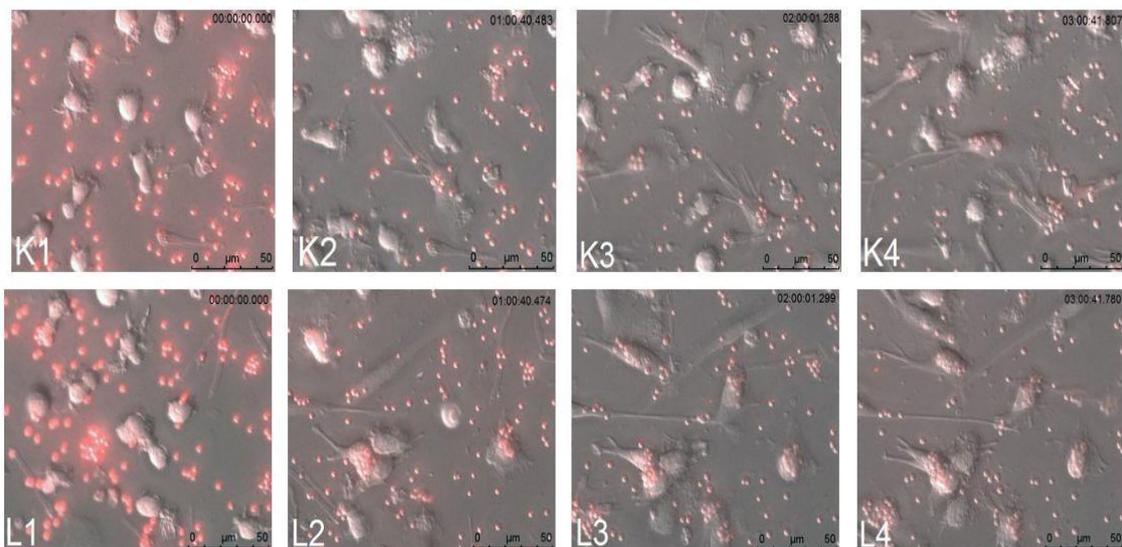
**Abbildung 30: Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien des Pilztyps  $\Delta$ RodA mit unstimulierten moDCs, moDCs in NK-Überstand und moDCs in NK-gt-Überstand.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen, NK = Natürliche Killerzellen, con = Konidien, gt = Keimschläuche und Üst = Überstand. Die statistische Analyse zeigte in der Phagozytoseaktivität sowohl bei durch NK-Üst als auch bei durch NK-gt-Üst stimulierten moDCs keine signifikanten Unterschiede. Es wurden drei verschiedene Spender ausgewertet.

Die moDC-con-Kontakte mit NK-Überständen, sowie die moDC-con-Kontakte mit NK-gt-

Überständen zeigten in ihrer Anzahl nur eine geringe Abweichung von denjenigen mit unstimulierten moDCs. Die Prozentzahl der internalisierten Konidien sank von 62% bei unstimulierten moDCs auf 54% bei moDCs in NK-Üst und auf 44% bei moDCs in NK-gt-Üst. Bei keiner der Abweichungen lag Signifikanz vor.

### 3.2.5 NK-Effektormoleküle steigern die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien

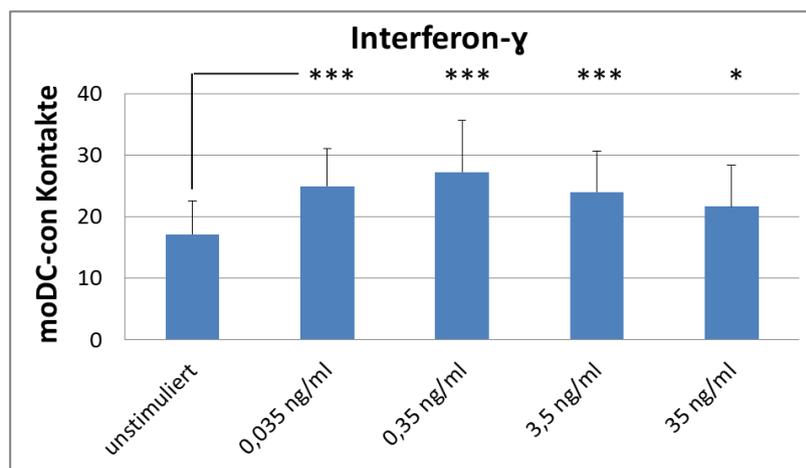
Zur Verifizierung, dass NK-Überstände keine Wirkung auf die moDC-*A. fumigatus*-Interaktion im Live-imaging haben, wurden die Kokulturansätze für eine Stunde mit drei verschiedenen NK-Haupteffektormolekülen stimuliert und gefilmt. Die in *in vitro* Versuchen freigesetzten Konzentrationen durch mit *A. fumigatus* stimulierten NK-Zellen wurden vorab in von dieser Arbeit unabhängigen Versuchen im gleichen Labor gemessen. Sie betragen 0,03 ng/ml für IFN- $\gamma$ , 0,6 ng/ml für Granzym B und 3,5 ng/ml für Perforin. Abbildung 31 zeigt beispielhaft für IFN- $\gamma$  stündliche Ausschnitte aus einer Filmsequenz innerhalb dieser Versuchsansätze.



**Abbildung 31:** Live-imaging Aufnahmen der Interaktion von mit IFN- $\gamma$  (Konzentration von 0,03 ng/ml) inkubierten moDCs und Konidien im einstündigen Abstand. L1 – L4 zeigt die Kokulturation von moDCs mit Konidien in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ . Im Vergleich dazu ist in K1 – K4 die Interaktion von unstimulierten moDCs mit Konidien desselben Spenders dargestellt. In den Live-imaging Aufnahmen konnten keine Verhaltensänderungen der Zellen festgestellt werden.

Die Aufnahmen K1 bis K4 (Abbildung 31) zeigen unstimulierte moDCs mit Konidien. Im Vergleich hierzu ist in den Aufnahmen L1 bis L4 (Abbildung 31) die Interaktion von mit 0,03 ng/ml IFN- $\gamma$  inkubierten moDCs mit Konidien dargestellt. In der Arbeit wurde außerdem der Frage nachgegangen, ob sich moDCs bei unterschiedlichen Konzentrationen der Effektoren in ihrem Verhalten beeinflussen lassen.

Abbildung 32 fasst die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit der verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zusammen.

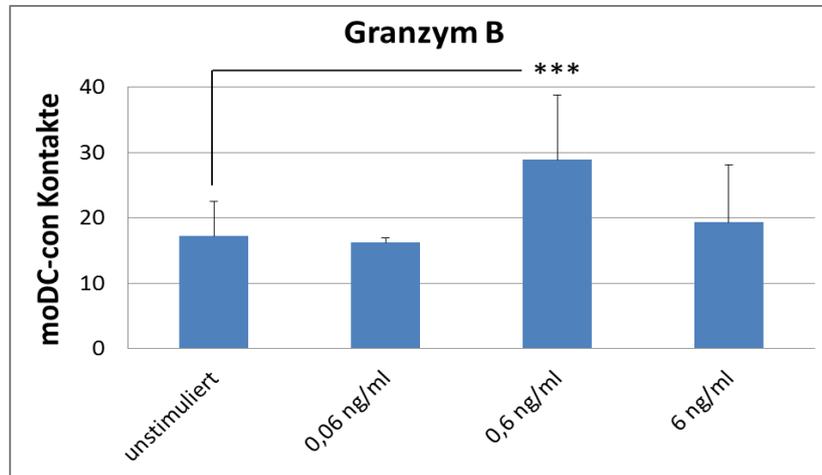


**Abbildung 32: Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener IFN- $\gamma$ -Konzentrationen.** Bedeutungen der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen und con = Konidien. Die Anzahl der Kontakte war bei Zugabe aller verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen signifikant erhöht. Dabei stellte sich eine Sättigungskurve ein. Ausgewertet wurden sechs verschiedene Spender.

Mit Einwirkung der verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen waren die Kontakte zwischen moDCs und Konidien bei Zugabe von IFN- $\gamma$  in allen hinzugefügten Konzentrationen (0,035 ng/ml, 0,35 ng/ml, 3,5 ng/ml und 35 ng/ml) signifikant erhöht. Die verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen ergaben dabei eine Sättigungskurve, deren Maximum bei einer Konzentration von 0,35 ng/ml lag.

Die Auswertung der Live-imaging Filme mit den NK-Effektoren Granzym B und Perforin ergab vergleichbare Ergebnisse. Bei allen Effektoren konnten gesteigerte Raten von

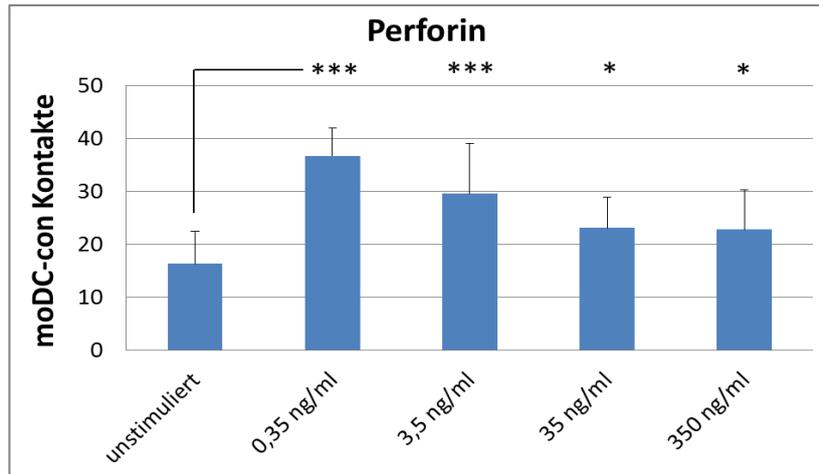
moDC-Konidien-Kontakten festgestellt werden. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Granzym B sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener Granzym B-Konzentrationen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen und con = Konidien. Die Anzahl der moDC-con-Kontakte war nur bei einer Konzentration von 0,6 ng/ml signifikant erhöht, bei den weiteren Konzentrationen war keine Tendenz feststellbar. Es wurden sechs verschiedene Spender ausgewertet.

Der Versuchsansatz mit Granzym B zeigte, dass dieser NK-Effektor die Kontakte zwischen moDCs und Konidien lediglich bei einer Konzentration von 0,6 ng/ml signifikant erhöhte. Bei den Konzentrationen 0,06 ng/ml und 6 ng/ml konnte hingegen keine Tendenz nachgewiesen werden (p-Wert bei einer Konzentration von 0,06 ng/ml betrug 0,69 und p-Wert bei einer Konzentration von 6 ng/ml betrug 0,40).

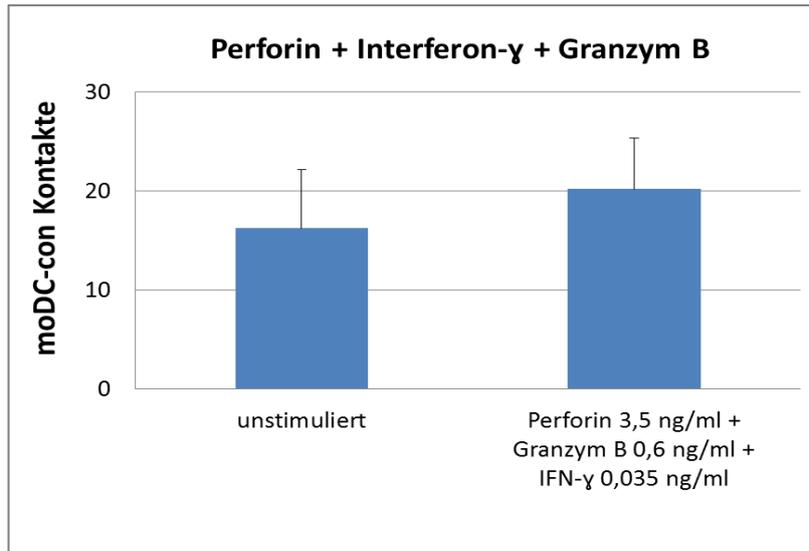
Die folgende Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse der analog aufgebauten Versuche mit dem NK-Effektormolekül Perforin.



**Abbildung 34: Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener Perforin-Konzentrationen.** Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen und con = Konidien. Bei allen Konzentrationen erhöhte sich die Anzahl der moDC-con-Kontakte signifikant. Es wurden drei verschiedene Spender ausgewertet.

Bei den Experimenten mit Perforin wiesen alle Konzentrationen (0,35 ng/ml, 3,5 ng/ml, 35 ng/ml und 350 ng/ml) eine signifikante Erhöhung der moDC-Konidien-Kontakte im Vergleich zu unstimulierten moDCs auf, wobei die Anzahl der Kontakte mit steigender Konzentration abfiel.

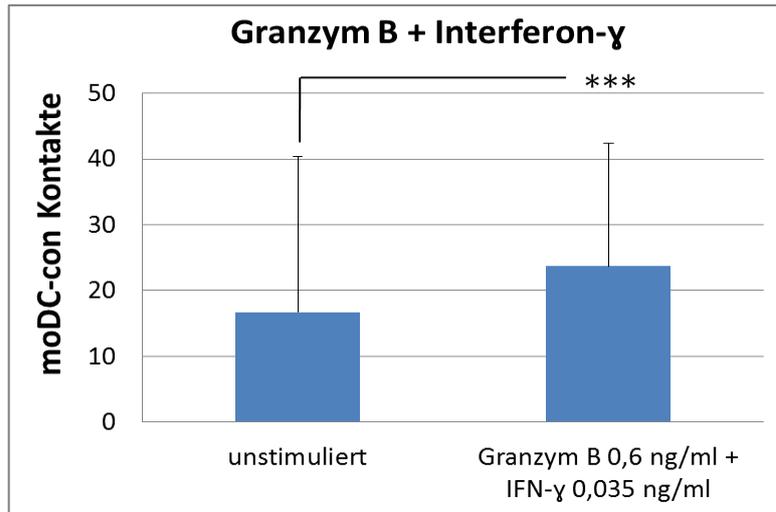
Die moDC-*Aspergillus*-Kokultur wurde zusätzlich mit der Kombination der drei NK-Effektoren IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin stimuliert und gefilmt. Die Auswertung ist in Abbildung 35 dargestellt.



*Abbildung 35: Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien nach Zugabe einer Kombination aus Perforin (3,5 ng/ml), Granzym B (0,6 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (0,03 ng/ml). Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen und con = Konidien. Die Kontakte zwischen moDCs und Konidien wiesen bei Zugabe der drei NK-Effektoren eine leicht steigende Tendenz auf. Es wurden drei verschiedene Spender ausgewertet.*

Bei dem Versuchsansatz mit moDCs, Konidien und der Kombination aller drei NK-Effektoren mit den Konzentrationen IFN- $\gamma$  0,03 ng/ml, Granzym B 0,6 ng/ml und Perforin 3,5 ng/ml, konnte keine signifikante Veränderung der Kontaktanzahl zwischen moDCs und Konidien nachgewiesen werden. Mit einem p-Wert von 0,09 war die Kontaktanzahl tendenziell erhöht.

Ein weiterer Versuch zeigt, dass sich nach Entfernung des NK-Effektors Perforin aus der vorherig getesteten Kombination eine signifikante Zunahme von Kontakten zwischen moDCs und Konidien im Vergleich zur Kokultur mit unstimulierten moDCs ergab (Abbildung 36).



*Abbildung 36: Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien nach Zugabe einer Kombination aus Granzym B (0,6 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (0,035 ng/ml). Bedeutung der Abkürzungen: moDCs = von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen und con = Konidien. Die Kontakte zwischen moDCs und Konidien stiegen bei Zugabe der beiden NK-Effektoren signifikant an. Es wurden drei verschiedene Spender ausgewertet.*

Die statistischen Untersuchungen der Live-imaging Filme erwiesen, dass alle NK-Effektoren einzeln die moDC-Aktivität erhöhten. Bei der Kombination aller drei NK-Effektoren zeigte sich keine signifikante Auswirkung. Hingegen ergab die Kombination aus Granzym B und IFN- $\gamma$  einen signifikanten Anstieg der moDC-Konidien-Kontakte. Die Phagozytoserate wies bei keinem der Versuchsansätze signifikante Unterschiede zum Versuchsansatz mit unstimulierten moDCs auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Aktueller Stand der Forschung

*Aspergillus fumigatus* ist über alle Klimazonen hinweg vorzufinden und eine der am weitest verbreiteten Pilzspezies. Täglich werden mehrere hundert *Aspergillus*-Sporen vom Menschen eingeatmet (Hospenthal et al., 1998). Für immunkompetente Personen ist der Pilz weitgehend harmlos, da ein intaktes Immunsystem die eingedrungenen Konidien innerhalb kurzer Zeit beseitigen kann. Bei immunsupprimierten Patienten kann dieser opportunistische Krankheitserreger jedoch schwere systemische Mykosen auslösen (Latge, 1999). Eine besonders hohe Mortalitätsrate weist die häufig bei immunsupprimierten Patienten auftretende invasive Aspergillose (IA) auf, da diese Infektionskrankheit wegen ihrer klinisch unspezifischen Symptome meist sehr spät diagnostiziert wird.

Aufgrund der zunehmenden Anzahl der an IA erkrankten Patienten ist die Forschung an neuen Therapiemöglichkeiten von essentieller Bedeutung. Ein besonderer Fokus liegt in diesem Zusammenhang auf den DCs (Perruccio et al., 2004), da diese Zellen Immunantworten induzieren können und als Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem fungieren. In vergangenen Forschungsvorhaben wurde im Rahmen der Entwicklung eines Impfstoffs gegen *A. fumigatus* unter anderem die Möglichkeit untersucht, naive DCs (iDCs) mit *Aspergillus*-Antigenen zu beladen (Bozza et al., 2004). Diese sind aufgrund der Fähigkeit, einen Teil des Immunsystems steuern zu können, von besonderem Interesse für die Forschung. Hierbei bedarf es jedoch weiterer Analysen zu dem Krankheitserreger *A. fumigatus* und seiner Interaktion mit den verschiedenen Immunzellen des Menschen. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die Interaktion zwischen *A. fumigatus* und moDCs in Kokultur mit NK-Zellen näher analysiert.

## 4.2 Isolierung und durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen

Für die Immunzellgewinnung wurden Leukozytenkonzentrate des Universitätsklinikums Würzburg verwendet, um eine kurze Zeitspanne zwischen der Blutentnahme beim Spender und der Weiterverarbeitung im Labor zu gewährleisten. Zur Generierung von moDCs aus Monozyten war eine Inkubation dieser Zellen mit GM-CSF und IL-4 über einen Zeitraum von fünf Tagen erforderlich. Dieses Vorgehen stellt eine gängige Methode für Experimente mit DCs dar (Schreurs et al., 1999). Für den Nachweis, dass es sich bei den gereiften Monozyten um moDCs handelte, wurde jeweils ein kleiner Teil der Immunzellen qualitativ im FACS begutachtet. Um eine Zuordnung der Reaktionen entsprechend der unterschiedlichen Zellarten sicherzustellen, ist eine möglichst hohe Reinheit der verwendeten Zellpopulationen für die Experimente von hoher Bedeutung.

Zur moDC-Generierung wurden zunächst Monozyten aus PBMCs isoliert, von denen bei jedem Spender über 90%  $\alpha$ -CD14-FITC positiv waren. CD14 ist ein spezifischer Oberflächenmarker für Monozyten (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). Auf dieser Basis konnten die gewonnenen Immunzellen als Monozyten definiert werden. Durch apoptotische Zellen entstanden teilweise Verunreinigungen der Population. Da diese Zellen eine geringe Größe und Granularität aufweisen, waren sie im Streulicht-Diagramm unten links detektierbar. Einen vernachlässigbaren Anteil (jeweils < 2%) machten Lymphozyten aus, die unter den isolierten Monozyten mit niedrigen Streulichtwerten nachweisbar waren. Da sie ein unterschiedliches Expressionsprofil aufweisen und im Gegensatz zu Monozyten nicht durch Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zu moDCs heranreifen können, war diese Verunreinigung nicht von Bedeutung.

Im Vergleich zum Generierungsprozess der moDCs konnten NK-Zellen direkt aus den Blutproben isoliert und anschließend sofort verwendet werden, wodurch sich eine Zeitersparnis von fünf Tagen bot. Aus diesem Grund war es erforderlich, die fünftägige moDC-Generierung zeitlich genau mit der NK-Isolation abzustimmen, damit beide Zellarten am Tag der Versuchsdurchführung in ausreichender Menge vorhanden waren. Um zu belegen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um NK-Zellen handelte, wurde auch mit einem kleinen Teil dieser Immunzellen eine durchflusszytometrische

Analyse durchgeführt. Aufgrund des spezifischen NK-Zell-Rezeptors Nkp46 konnte die Reinheit der NK-Zellen bestimmt werden. Diese lag bei allen Spendern über 90%.

### **4.3 Wechselwirkungen zwischen moDCs und *A. fumigatus***

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen konnten verschiedene Erkenntnisse der aktuellen Literatur bestätigt werden. In den Experimenten war beispielsweise deutlich zu erkennen, dass moDCs *A. fumigatus*-Konidien und Keimschläuche kontaktierten und internalisierten. Diese endozytischen Eigenschaften von DCs konnten bereits vor einigen Jahren nachgewiesen werden (Behnsen et al., 2007). *A. fumigatus* besitzt auf der Oberfläche seiner Zellen das Molekül Galaktomannan, welches auch im Blut von Patienten mit IA nachweisbar ist (Maertens et al., 2001, Mennink-Kersten et al., 2004, Pfeiffer et al., 2006). Über den Mannoserezeptor sind DCs in der Lage, an das Galaktomannan zu binden und eine Internalisierung des Pilzes auszulösen (Bozza et al., 2002). Im Gegensatz zu einer Studie von Cole et al., nach der Galaktomannan nicht auf der Konidienoberfläche vorhanden ist (Cole et al., 1979), wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Internalisierungen von Konidien möglich sind. Demnach muss dem Internalisierungsvorgang mindestens ein zusätzlicher Mechanismus zu Grunde liegen, welcher aktuell jedoch noch unerforscht ist. Zusätzlich werden internalisierte Konidien im Gegensatz zu extrazellulären Konidien in ihrem Wachstum gehemmt (Lothar et al., 2014). Diese Tatsachen geben Aufschluss darüber, dass moDCs mit *A. fumigatus* interagieren. Erkennbar war außerdem, dass moDCs, die in Konfrontation mit *A. fumigatus*-Morphologien standen, sich zunehmend gruppierten und größere Zellkomplexe bildeten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Zellen auf diese Weise einfacher und schneller über Zell-Zell-Kontakte kommunizieren können, um Abwehrmaßnahmen zu intensivieren. Während der ersten Stunde der Koinkubation wurde die größte Anzahl an Pilzzellen – sowohl an Konidien, als auch an Keimschläuchen – internalisiert. Nach 60 Minuten nahm die Phagozytoseaktivität deutlich ab. Dies ist möglicherweise auf die zunehmend knappe Versorgung der moDCs zurückzuführen, deren notwendiger Nährstoff- und Sauerstoffbedarf im Zeitverlauf limitiert war. Eine weitere Erkenntnis aus der Literatur besteht darin, dass die Fähigkeit, Antigene zu

internalisieren besonders unreifen DCs zugeordnet werden kann. Die Internalisierung eines Antigens führt zu einem anschließenden Reifungsprozess der DCs und zur Präsentation der Antigene an das adaptive Immunsystem. Die bei reifen DCs verminderte endozytische Kapazität zeigt sich in der herabgesetzten Aufnahme von Antigenen (Banchereau et al., 2000), welche mit den Ergebnissen der Live-imaging Aufnahmen dieser Versuche übereinstimmte. Innerhalb der ausgewerteten drei Stunden fanden durchschnittlich 49 Kontaktaufnahmen zwischen einer moDC und den vorhandenen Konidien statt. In den Versuchen mit Keimschläuchen neigten diese häufig zu Verklumpungen. MoDCs internalisierten Keimschläuche in diesem Fall weniger, adhärten jedoch gezielt an derartige Pilzansammlungen. Das große Volumen scheint eine Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit für die moDCs darzustellen. Die durchschnittliche Kontaktanzahl zwischen moDCs und Keimschläuchen lag mit weniger als zehn Kontakten deutlich unter der Anzahl in den Experimenten mit Konidien. Im Durchschnitt wurden 51% der Konidien internalisiert. In den Versuchsansätzen von moDCs mit *A. fumigatus* konnte eine Interaktion der moDCs mit Konidien und Keimschläuchen des Pilzes bestätigt werden. Diese Interaktion war auch bei der Mutante  $\Delta$ RodA nachzuweisen. Die Konidienoberfläche des Wildtyps besitzt eine Rodlet-Struktur, welche den Pilz vor äußeren Einflüssen wie Immunzellen schützt (Aimanianda et al., 2009). Bei  $\Delta$ RodA wurde das Gen für diese Schutzschicht entfernt, weshalb dieser Pilztyp eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber Immunzellen aufweist. Trotz dieses fehlenden Schutzes wurden Konidien und Keimschläuche von  $\Delta$ RodA in gleicher Art und Weise von moDCs kontaktiert und phagozytiert. Es fanden im Durchschnitt mit etwa 44 Kontaktaufnahmen zwischen moDCs und Konidien nur geringfügig weniger Kontakte statt. Keimschläuche wurden im Vergleich zum Wildtyp mit 15 Kontakten innerhalb drei Stunden etwas öfter kontaktiert. Die prozentuale Menge der phagozytierten Konidien lag mit durchschnittlich 59% etwas über der Prozentzahl der Versuche mit dem Wildtyp. Die erhöhte antifungale Aktivität der moDCs gegen  $\Delta$ RodA traf demnach nur bedingt zu.

#### 4.4 Wechselwirkungen zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus*

In Übereinstimmung mit Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur konnten in den Experimenten dieser Arbeit Interaktionen zwischen NK-Zellen und Pilzzellen festgestellt werden. In den Live-imaging Aufnahmen waren Zell-Zell-Kontakte zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus* deutlich zu erkennen. Anhand der angewandten Methodik war keine finale Klärung darüber möglich, ob es sich um zufällige oder um gezielte Kontaktaufnahmen zwischen den Zellarten handelte. Die Aufnahmen lassen allerdings vermuten, dass die NK-Zellen nach spontanen Kontakten zu Konidien oder Keimschläuchen aktiv weiteren Kontakt suchen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass NK-Zellen durch den primären Kontakt zum Pilz aktiviert werden und anschließend eine Aktivität gegen den Erreger ausgelöst wird. Bouzani et al. bewiesen 2011, dass NK-Zellen eine wichtige antifungale Aktivität gegen *A. fumigatus* zeigen, welche direkt durch die Freisetzung von IFN- $\gamma$  vermittelt wird (Bouzani et al., 2011). In ihren Studien wurde belegt, dass humane NK-Zellen während der Interaktion mit Keimschläuchen Zytokine sekretieren, die einen protektiven Effekt gegen eine IA bewirken. Die Hauptmediatoren dieser Immunantwort sind IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Dieser antifungale Effekt wurde nur bei NK-Zellen in Koinkubation mit Keimschläuchen oder Hyphen von *A. fumigatus*, jedoch nicht mit Konidien von *A. fumigatus* oder  $\Delta$ RodA beobachtet (Bouzani et al., 2011, Schmidt et al., 2011). Dies galt für unstimulierte sowie für mit IL-2 voraktivierte, primäre humane NK-Zellen (Schmidt et al., 2011). Zusätzlich wurde aufgezeigt, dass die NK-Zell-Stimulation durch *A. fumigatus* im Gegensatz zu ihrer antifungalen Aktivität kontaktabhängig ist. Dementsprechend ist ein direkter Kontakt zwischen *A. fumigatus* und einer NK-Zelle erforderlich, um die NK-Zelle zu stimulieren. Nach der Stimulierung setzen NK-Zellen lösliche Faktoren frei, die ihnen ihre Zytotoxizität verleihen und eine Schädigung des Pilzes bewirken. Diese Zytotoxizität der NK-Zellen gegen den Pilz ist unabhängig von der NK-Zell-Degranulation (Bouzani et al., 2011). In der Lunge sind NK-Zellen die Hauptquelle von IFN- $\gamma$ , was sie zu einem essentiellen Bestandteil in der Abwehr der frühen IA macht (Park et al., 2009). Die Annahme, dass NK-Zellen neben diesen zytokingesteuerten Abwehrmechanismen auch über die Fähigkeit verfügen Pilzzellen zu internalisieren, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In den Live-

imaging Filmen wurden ausschließlich Kontakte mit dem Pilz, jedoch keinerlei Phagozytosen beobachtet. Zur Analyse, ob sich das NK-Zell-Verhalten bei naiven NK-Zellen zu dem von mit Proleukin voraktivierten NK-Zellen ändert, wurden die Versuche jeweils mit beiden NK-Zell-Zuständen durchgeführt. Proleukin ist der Handelsname für das Peptidhormon IL-2, welches im Körper von aktivierten T-Lymphozyten ausgeschüttet wird. Seine stimulierende und wachstumsfördernde Wirkung umfasst neben der Anregung von B- und T-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung auch die Produktion weiterer Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktoren, sowie die Aktivierung von NK-Zellen und deren Proliferation (Henney et al., 1981). Das Interleukin Proleukin fungiert bei NK-Zellen somit als Wachstumsfaktor. Auf dieser Erkenntnis basierend sollte untersucht werden, ob voraktivierte NK-Zellen eine höhere Aktivität gegenüber dem Pathogen *A. fumigatus* aufweisen. Durchschnittlich wurden beim Wildtyp 33 Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und Konidien, sowie zehn Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und Keimschläuchen innerhalb von drei Stunden gezählt. Bei voraktivierten NK-Zellen fanden im Durchschnitt 31 Kontakte zu Konidien statt, wohingegen bei Keimschläuchen nur neun Kontakte feststellbar waren. Im Vergleich dazu kontaktierten naive NK-Zellen Konidien von  $\Delta$ RodA durchschnittlich 26 Mal und voraktivierte NK-Zellen 30 Mal. Keimschläuche der Mutante  $\Delta$ RodA wurden im Durchschnitt von naiven NK-Zellen 13 Mal und von voraktivierten NK-Zellen zehn Mal kontaktiert. Die Unterschiede in der Kontaktanzahl waren demnach nicht wesentlich. Weiterhin galt die Vermutung, dass voraktivierte NK-Zellen in einem größeren Maße mit *A. fumigatus* interagieren, da Proleukin die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen steigert (Henney et al., 1981) und NK-Zellen, die mit Proleukin voraktiviert wurden, immunstimulierendes IFN- $\gamma$  produzieren (Handa et al., 1983). Die These, dass mit Proleukin geprimte NK-Zellen eine gesteigerte Aktivität in Bezug auf *A. fumigatus* zeigen, konnte in diesen Versuchen jedoch nicht bestätigt werden.

#### **4.5 Interaktion von moDCs, NK-Zellen und *A. fumigatus* in Kokultur**

Neben den einzelnen Interaktionen der Immunzellen mit *A. fumigatus* ist auch ihr reziprokes Verhalten innerhalb einer Kokultur von hoher Relevanz für die Forschung.

Das Verhalten der drei Zellarten in Kombination wurde bisher noch nicht erforscht. Neben den Versuchsansätzen mit moDCs und *A. fumigatus* sowie NK-Zellen und *A. fumigatus* wurden deshalb zum Vergleich immer auch Versuchsansätze mit moDCs, NK-Zellen und *A. fumigatus* im Live-imaging untersucht und statistisch ausgewertet. Die Interaktionen wurden, wie in den vorherigen Versuchen, jeweils mit naiven und voraktivierten NK-Zellen getestet.

Zunächst wurde die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und *A. fumigatus*-Morphologien in Anwesenheit von NK-Zellen mit der ohne NK-Zellen verglichen, um einen möglichen Einfluss von NK-Zellen auf das Verhalten der moDCs analysieren zu können. Es zeigte sich, dass sich die Kontakte zwischen moDCs und Konidien bei Zugabe von naiven NK-Zellen signifikant verringerten und die Kontakte zwischen moDCs und Keimschläuchen tendenziell anstiegen. Die Versuche mit voraktivierten NK-Zellen anstelle naiver NK-Zellen ergaben, dass die Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien signifikant reduziert und diejenigen zwischen moDCs und Keimschläuchen nahezu unverändert waren. Demnach nahm die Kontaktanzahl zwischen moDCs und Konidien bei Zugabe von NK-Zellen in beiden Versuchsansätzen signifikant ab. Dabei verringerten mit Proleukin voraktivierte NK-Zellen die moDC-Konidien-Kontakte stärker als naive NK-Zellen. Diese Experimente belegen, dass NK-Zellen die moDC-Aktivität beeinflussten. Bereits in vergangenen Studien konnte aufgezeigt werden, dass NK-Zellen mit DCs interagieren. Hierbei wurde nachgewiesen, dass mit IL-2 oder durch ausgereifte DCs, voraktivierte NK-Zellen in gemischten NK-Zell- und DC-Kokulturen eine DC-Reifung hervorrufen. Dafür sind neben Zytokinen auch Zell-Zell-Kontakte verantwortlich (Gerosa et al., 2002). NK-Zellen können über die löslichen Stoffe TNF und IFN- $\gamma$  die Reifung der DCs beeinflussen und ihre Aktivierung initiieren (Ferlazzo und Morandi, 2014). Wider Erwarten, dass moDCs in Anwesenheit von NK-Zellen aktiviert werden und in Folge dessen ihre Aktivität gegenüber *A. fumigatus* erhöhen, nahmen die Kontakte zwischen moDCs und Pilzzellen in den Versuchen ab. Nicht nur die Aktivität der Kontaktaufnahmen der moDCs, sondern auch ihre Phagozytoseaktivität wurde untersucht. Der Prozentsatz der zu Beginn des Versuchs intrazellulär sowie extrazellulär vorhandenen Konidien wurde mit ihrer Anzahl nach drei Stunden in Koinkubation

verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden. Die Phagozytoserate reduzierte sich in Anwesenheit von naiven NK-Zellen um 15%. Die Vermutung für die verringerte Phagozytoseaktivität der moDCs liegt darin, dass diese in Anwesenheit von NK-Zellen schneller reifen und im Allgemeinen mit zunehmender Reifung weniger phagozytieren. Dieses Verhalten ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass unreife DCs Erreger aufnehmen und anschließend reifend zu den Lymphknoten wandern, um dort erregerspezifische Signale abzugeben. Dies erfolgt durch Präsentation, Kostimulation und verschiedene Zytokine. Für eine erregerspezifische Immunantwort ist jedoch wichtig, dass keine großen Mengen an verschiedenen Erregern phagozytiert werden. Aufgrund dessen wird bei der Reifung der DCs die Phagozytose eingestellt (Cella et al., 1997, Banchereau et al., 2000). Bei Zugabe von voraktivierten NK-Zellen stieg die Phagozytoserate der moDCs um 15%. Aus den Versuchen resultiert demnach die Annahme, dass das Phagozytoseverhalten der moDCs vom Aktivierungszustand der NK-Zellen abhängt. Diese Hypothese ist in der bestehenden Forschung jedoch noch nicht belegt und müsste entsprechend in weiterführenden Experimenten nachgewiesen werden.

Auch das NK-Zell-Verhalten wurde durch die Anwesenheit von moDCs beeinflusst. Die Kontakte zwischen naiven NK-Zellen und *A. fumigatus*-Konidien nahmen bei Zugabe von moDCs signifikant ab. In allen weiteren Ansätzen, in denen voraktivierte NK-Zellen anstelle naiver NK-Zellen und Keimschläuche anstelle von Konidien verwendet wurden, sanken die Kontakte tendenziell. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die NK-Zellen in der Kontaktaufnahme zum Pilz räumlich durch die größeren moDCs behindert wurden und deshalb weniger Kontakte zu *A. fumigatus* aufnehmen konnten. Zusätzlich waren durch die Phagozytosen der moDCs zunehmend weniger Konidien vorhanden. Dadurch wurde die Distanz der NK-Zellen zu den Konidien größer, sodass sich die Kontaktanzahl reduzierte. Aktuelle Studien belegen den Einfluss von DCs auf NK-Zellen in Kokulturen. Dabei wurde nachgewiesen, dass DCs die Ausschüttung von Zytokinen – besonders TNF und IFN- $\gamma$  – durch NK-Zellen begünstigen, die Proliferation der NK-Zellen steigern und deren zytolytische Aktivität erhöhen. Diese durch DCs vermittelte NK-Aktivierung erfolgt überwiegend durch lösliche Faktoren. Ebenso spielen Zell-Zell-Kontakte in diesem

Mechanismus eine wichtige Rolle (Ferlazzo und Morandi, 2014, Fernandez et al., 1999). Wie bei den moDCs wurde auch bei den NK-Zellen eine Steigerung in der Erregerabwehr durch die Anwesenheit der anderen Immunzellart erwartet. Auch in diesem Fall war jedoch keine Zunahme, sondern eine Reduktion der Kontaktanzahl zwischen NK-Zellen und Pilzzellen zu beobachten. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zur bestehenden Literatur, in welcher ein reziprokes Wirken zwischen NK-Zellen und DCs mit einer gegenseitigen Aktivierung beider Zellarten beschrieben wird. Demzufolge aktivieren DCs NK-Zellen und steigern ihre zytolytische Aktivität, sodass die DC-Reifung stark gefördert wird (Gerosa et al., 2002). Möglicherweise finden zwischen NK-Zellen und moDCs auch Interaktionen statt, die sich inhibierend auf die jeweiligen Zellarten auswirken. Dies würde die herabgesetzte Kontaktaktivität der Immunzellen gegenüber *A. fumigatus* erklären. Zwar belegen Studien, dass NK-Zell-DC-Interaktionen in Zellaktivierung und Zellreifung resultieren, allerdings gibt es auch Hinweise auf gegensätzliche Auswirkungen wie den Zelltod von DCs durch NK-Zellen. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass NK-Zellen *in vitro* in der Lage sind, autologe iDCs zu lysieren (Cooper et al., 2004). Unklar bleibt jedoch, ob und weshalb dies auch *in vivo* erfolgt. Eine mögliche Hypothese für die gegenseitige Hemmung der Zellen besteht beispielsweise darin, dass auf diese Weise überschießende Immunantworten mit konsekutiver Gewebsschädigung limitiert werden können.

Auch mit der Mutante  $\Delta$ RodA wurden die gleichen Versuchsansätze durchgeführt, welche die bisherigen Ergebnisse bestätigten. Entgegen der Erwartung, dass die Pilzmorphologien aufgrund der fehlenden Schutzschicht noch häufiger kontaktiert und phagozytiert werden, unterschieden sich die Ergebnisse kaum von denen des *A. fumigatus*-Wildtyps. Die moDC-Konidien-Kontakte sanken bei Zugabe von naiven NK-Zellen signifikant und bei Zugabe von voraktivierten NK-Zellen tendenziell. Die Versuche mit Keimschläuchen führten bei der Kontaktanzahl – wie beim Wildtyp – in Anwesenheit von NK-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung. Auch für die prozentualen Auswertungen der internalisierten Konidien von  $\Delta$ RodA durch moDCs in An- und Abwesenheit von NK-Zellen und für die Experimente mit NK-Überständen ergab sich

keine Signifikanz.  $\Delta$ RodA interagiert mit moDCs und NK-Zellen in gleicher Weise wie der Wildtyp.

Die Experimente führten in Summe zu dem Ergebnis, dass sich NK-Zellen und moDCs in Kokultur mit *A. fumigatus* wechselseitig beeinflussen. Beide Zellarten wurden von der anderen Zellart in ihrer Aktivität, Kontakt zum Pilz aufzunehmen, gehemmt. Die Fähigkeit der moDCs, Pilzmorphologien zu internalisieren, blieb jedoch durch NK-Zellen unbeeinflusst. Eine weitere mögliche Erklärung für die inhibierende Wirkung liegt darin, dass in den Experimenten NK-Zellen und moDCs von verschiedenen Spendern verwendet wurden. Denn, falls NK-Zellen wie T-Lymphozyten auf die MHC-Moleküle der moDCs und somit nur auf die desselben Spenders registriert sind, wären sie nicht in der Lage, die moDCs zu erkennen.

Im Anschluss an die Versuchsreihe ergab sich die Frage, inwiefern NK-Zellen die Aktivität der moDCs beeinflussen. Ein wesentlicher Ansatz bestand darin, dass NK-Zellen bestimmte Stoffe sekretieren könnten, welche die moDCs in ihrem Zellverhalten hemmen. Ein weiterer Ansatz ergab sich in der Annahme, dass NK-Zellen mit moDCs über Zell-Zell-Kontakte kommunizieren und diese hierdurch in ihrer Aktivität einschränken. Um diese Thematik diskutieren zu können, wurden die folgenden Experimente mit NK-Überständen und NK-Effektormolekülen durchgeführt.

#### **4.6 Wirkung von NK-Überständen auf moDCs**

Im Rahmen der Arbeit wurden weitere Versuchsansätze durchgeführt, um zu analysieren, ob Überstände von NK-Zellen für die Aktivitätsänderungen der moDCs verantwortlich sind. Die Anwendung von NK-Überständen anstelle von NK-Zellen gewährleistete, dass Zell-Zell-Kontakte zwischen NK-Zellen und moDCs ausgeschlossen werden konnten. Etwaige Veränderungen in der Aktivität von moDCs hätten somit ausschließlich auf lösliche Faktoren zurückgeführt werden können. Allerdings führten die Versuche zu keinen signifikanten Veränderungen der moDC-Aktivität. Die Anzahl der moDC-Konidien-Kontakte bei Zugabe von NK-Überstand zu moDCs und Konidien blieb unverändert. Die Zugabe von NK-gt-Überstand steigerte die Kontaktanzahl lediglich von

durchschnittlich 52 auf 57 Kontakte. Ebenso zeigte die Phagozytoserate keine signifikanten Unterschiede. Sie lag in allen drei Versuchsansätzen zwischen 41% und 57%. Mit den Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Veränderung in der Aktivität der moDCs nicht ausschließlich auf lösliche Substanzen der NK-Zellen zurückzuführen ist. Weder produzierten NK-Zellen in ihrer reinen Kultur, noch in Kokultur mit Pilzzellen lösliche Faktoren, welche moDCs in ihrer Kontakt- und Phagozytoseaktivität beeinflussten. Die Versuche wurden jeweils mit NK-Zellen und moDCs verschiedener Spender durchgeführt. Ein relevanter nächster Schritt in der Forschung bestünde in der Klärung, ob Überstände von NK-Zellen desselben Spenders eine veränderte Aktivität des moDC-Verhaltens bewirken würden.

#### **4.7 Wirkung verschiedener NK-Effektoren auf moDCs**

Die drei NK-Effektormoleküle IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin wurden zusätzlich einzeln hinsichtlich ihrer Wirkung auf die moDC-Aktivität untersucht. Entgegen der Erwartung zeigten sich durch die separate Zugabe signifikante Unterschiede im Verhalten der moDCs. Alle drei löslichen Substanzen beeinflussten die Kontaktaktivität. Das Phagozytoseverhalten der moDCs blieb unverändert.

IFN- $\gamma$  wies in allen getesteten Konzentrationen eine signifikant erhöhte Anzahl an moDC-Konidien-Kontakten auf. Die Aktivität der moDCs wurde in den Experimenten demnach direkt durch IFN- $\gamma$  gesteigert. Dies könnte gegebenenfalls darauf zurückzuführen sein, dass IFN- $\gamma$  die moDCs aktivierte und sie sensitiver gegenüber dem Erreger machte. IFN- $\gamma$  spielt neben der antiviralen Abwehr besonders in der Stimulation von Immunantworten eine große Rolle (Young und Hardy, 1995, Farrar und Schreiber, 1993). Laut Bouzani et. al wird die antifungale Aktivität von NK-Zellen gegen *A. fumigatus* nicht durch die Degranulation ihrer zytotoxischen Proteine Granzym B oder Perforin vermittelt, sondern durch einen alternativen Mechanismus, in den IFN- $\gamma$  verwickelt ist. In dieser Studie wurde eine antifungale Aktivität nachgewiesen, die direkt durch IFN- $\gamma$  ausgelöst wird (Bouzani et al., 2011). Zusätzlich steigert IFN- $\gamma$  die Reifung von DCs (Boehm et al., 1997, Romani, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die immunstimulierenden Eigenschaften von IFN- $\gamma$ .

Die untersuchten Konzentrationen von Granzym B führten nur bei einer Konzentration von 0,6 ng/ml zu einer signifikant erhöhten Kontaktanzahl zwischen moDCs und Konidien. Granzym B löste demzufolge nur bei einer bestimmten Konzentration eine veränderte Interaktion zwischen Pilz und moDCs aus. Diese Wirkung könnte indirekt über die Inaktivierung von *A. fumigatus* hervorgerufen werden. Möglicherweise profitieren moDCs von einer Hemmung des Pilzes durch Granzym B und können so effizienter gegen ihn interagieren. Dies würde die gesteigerte Kontaktaktivität der moDCs gegenüber den Konidien erklären. Die beschriebene Hypothese stellt jedoch lediglich einen Erklärungsversuch dar, welcher noch nicht in der Literatur beschrieben ist. Um die präzise molekulare Wirkung von Granzym B auf eine Kokultur von moDCs mit *A. fumigatus* beschreiben zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Auch die Versuchsansätze mit Perforin führten in den verschiedenen Konzentrationen zu einer signifikant gesteigerten Kontaktaktivität der moDCs zu Konidien von *A. fumigatus*. Auch in diesem Fall kann die Annahme getroffen werden, dass inhibierte Konidien einfacher und demzufolge öfter von moDCs kontaktiert werden können. Allerdings müssten wie bei Granzym B zusätzlich Experimente durchgeführt werden, da zum aktuellen Zeitpunkt keine fundierten Untersuchungen zu dieser Hypothese vorliegen. Nachgewiesen ist jedoch bereits, dass Perforin in den Zielzellen von *A. fumigatus* Poren formt. Dadurch kommt es in der Pilzzelle zu einem starken Einstrom von Wasser und zum Verlust der intrazellulären Zusammensetzung, was in Folge zur Lyse der Zielzelle führt. Perforin spielt daher eine wesentliche Rolle in der NK-Zell-vermittelten antifungalen Abwehr (Schmidt et al., 2013).

Während die Kombination von IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin nicht zu einer erhöhten Kontaktanzahl zwischen moDCs und Konidien führte, resultierte die Kombination nach dem Entfernen von Perforin in einem signifikanten Kontaktanstieg. Dies könnte damit erklärt werden, dass Perforin und Granzym B zusammen die Fähigkeit besitzen, eine Schädigung der Zielzelle auszulösen (Thiery et al., 2011). Somit wäre es möglich, dass durch ihr Zusammenspiel toxische Effekte ausgelöst und in Folge dessen auch die Funktion von moDCs gehemmt wird.

## 4.8 Ausblick

MoDCs besitzen die Fähigkeit, Pilzmorphologien von *A. fumigatus* zu erkennen und zu internalisieren, das Pilzwachstum zu hemmen und inflammatorische Signale auszusenden. Durch *A. fumigatus*-Antigene werden moDCs über die Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 aus der Gruppe der PRRs, sowie über den  $\beta$ -Glucan Rezeptor Dectin-1 aktiviert (Mezger et al., 2008, Braedel et al., 2004). Nach der erfolgten Aktivierung durch Antigen-Stimuli sind moDCs in der Lage, T-Lymphozyten antigenspezifisch zur Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen anzuregen. Neben der Aktivierung von T-Lymphozyten wird auch deren Immunantwort gezielt durch DCs beeinflusst und reguliert (Ahn et al., 2007). Darüber hinaus werden viele verschiedene Immunzellen – einschließlich NK-Zellen – von DCs angeleitet. Diese besonderen Eigenschaften führten dazu, dass DCs in den vergangenen Jahren stark in den Fokus der Wissenschaft gerückt sind und einen wesentlichen Bestandteil der Forschungen an Immuntherapien gegen das Pathogen *A. fumigatus* bilden. Im Gegensatz zu moDCs können alternative DC-Typen wie mDCs oder pDCs zwar direkt und ohne mehrtägige artifizielle Differenzierung aus Monozyten des humanen Blutes isoliert werden, sie reagieren jedoch nur in geringerem Maße oder überhaupt nicht gegen den Pilz (Lothar et al., 2014). Daher werden in der Forschung potenzielle, auf moDCs basierende Immuntherapien gegen *A. fumigatus* in Erwägung gezogen. Die vollständige Position von DCs im Immunsystem ist allerdings noch nicht ausreichend erforscht. Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel dieser Arbeit darin, ein besseres Verständnis des Verhaltens von moDCs in gemischter Kokultur mit NK-Zellen und *A. fumigatus* zu erlangen. Durch die hohe Komplexität im Zusammenspiel aller Immunzellen mit dem Pathogen werden weitere funktionelle Versuche im Rahmen der Forschung unerlässlich sein. Insbesondere muss geprüft werden, ob die Beobachtungen für Anwendungen *in vivo* in Betracht kommen, und ob daraus neuartige Strategien und Optimierungen in der Behandlung von durch *A. fumigatus* ausgelöste Krankheiten aufgestellt werden können.

## 5 Zusammenfassung

Der humanpathogene Schimmelpilz *A. fumigatus* ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der ein hohes Risiko eines letalen Krankheitsverlaufs durch das Auslösen einer invasiven Aspergillose (IA) birgt. Bei der IA handelt es sich um eine Infektion des Lungengewebes, welche hauptsächlich immunsupprimierte Menschen befällt. *A. fumigatus* stellt die Ursache für diese infektiöse Komplikation dar, welche von einem intakten Immunsystem in der Regel problemlos abgewehrt wird. Eine wichtige Abwehrbarriere gegen den Pilz setzt sich aus Zellen des angeborenen Immunsystems zusammen. In der vorliegenden Arbeit waren in diesem Zusammenhang natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (DCs) von besonderer Relevanz. NK-Zellen schütten lösliche Faktoren aus, welche als antifungale Mediatoren agieren. DCs besitzen hingegen die Fähigkeit, Pilzmorphologien zu phagozytieren. Im Anschluss an die Interaktion mit dem Pilz sekretieren beide Zelltypen Zytokine, welche wiederum weitere Immunzellen stimulieren. Besonders den DCs wird eine wichtige Funktion in der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* zugeschrieben, da ihre Fähigkeit, das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem zu verknüpfen, von großer Bedeutung ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen von primären Monozyten abgeleiteten DCs (moDCs) und NK-Zellen mit dem Pilz *A. fumigatus* *in vitro* zu charakterisieren. Hierfür wurden mit der Methode des Live-imaging verschiedene Experimente durchgeführt, um den reziproken Einfluss der zwei Immunzellarten in Anwesenheit von *A. fumigatus* zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl moDCs, als auch NK-Zellen mit dem Pilz interagieren. Neben NK-Zell-moDC-Interaktionen wurden auch Interaktionen mit den einzelnen Immunzelltypen und *A. fumigatus* beobachtet. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die NK-Effektormoleküle IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin stimulierend auf moDCs wirken, was in einer erhöhten Zellaktivierung und einer in der Folge gesteigerten Kontaktanzahl zum Pilz resultierte.

## 6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

### 6.1 Literaturverzeichnis

**Adrain, C.; B. M. Murphy & S. J. Martin, 2005:** Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 4663-4673 ff.

**Ahn, J. S.; D. K. Krishnadas & B. Agrawal, 2007:** Dendritic cells partially abrogate the regulatory activity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells present in the human peripheral blood. *International immunology*, 19, 227-237 ff.

**Aimanianda, V., et al., 2009:** Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460, 1117-1121 ff.

**Ascioglu, S., et al., 2002:** Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical infectious diseases*, 34, 7-14 ff.

**Balloy, V. & M. Chignard, 2009:** The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 11, 919-927 ff.

**Banchereau, J., et al., 2000:** Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18, 767-811 ff.

**Banchereau, J. & R. M. Steinman, 1998:** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252 ff.

**Behnsen, J., et al., 2007:** Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 3, e13 f.

**Bender, A.; M. Sapp; G. Schuler; R. M. Steinman & N. Bhardwaj, 1996:** Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods*, 196, 121-135 ff.

**Boehm, U.; T. Klamp; M. Groot & J. Howard, 1997:** Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annual review of immunology*, 15, 749-795 ff.

**Bonnett, C. R.; E. J. Cornish; A. G. Harmsen & J. B. Burritt, 2006:** Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*, 74, 6528-6539 ff.

- Bouzani, M., et al., 2011:** Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *J Immunol*, 187, 1369-1376 ff.
- Bozza, S., et al., 2002:** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol*, 168, 1362-1371 ff.
- Bozza, S., et al., 2004:** Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine*, 22, 857-864 ff.
- Braedel, S., et al., 2004:** *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*, 125, 392-399 ff.
- Brinkmann, V., et al., 2004:** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535 ff.
- Cella, M.; F. Sallusto & A. Lanzavecchia, 1997:** Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 9, 10-16 ff.
- Cole, G. T.; T. Sekiya; R. Kasai; T. Yokoyama & Y. Nozawa, 1979:** Surface ultrastructure and chemical composition of the cell walls of conidial fungi. *Experimental Mycology*, 3, 132-156 ff.
- Cooper, M. A.; T. A. Fehniger; A. Fuchs; M. Colonna & M. A. Caligiuri, 2004:** NK cell and DC interactions. *Trends in immunology*, 25, 47-52 ff.
- Cowdery, J. S.; J. H. Chace; A.-K. Yi & A. M. Krieg, 1996:** Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *The Journal of Immunology*, 156, 4570-4575 ff.
- Cunha, C., et al., 2014:** Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia*, 178, 387-393 ff.
- Darmon, A. J.; D. W. Nicholson & R. C. Bleackley, 1995:** Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377, 446-448 ff.
- Denning, D. W., 1998:** Invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases*, 781-803 ff.
- Denning, D. W., 2000:** Early diagnosis of invasive aspergillosis. *THE LANCET*, 355, 423 f.
- Farrar, M. A. & R. D. Schreiber, 1993:** The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology*, 11, 571-611 ff.

- Ferlazzo, G. & B. Morandi, 2014:** Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol*, 5, 159 f.
- Ferlazzo, G., et al., 2002:** Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, 195, 343-351 ff.
- Fernandez, N. C., et al., 1999:** Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, 5, 405-411 ff.
- Friedl, P. & M. Gunzer, 2001:** Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends in immunology*, 22, 187-191 ff.
- Galagan, J. E., et al., 2005:** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438, 1105-1115 ff.
- Gerosa, F., et al., 2002:** Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, 195, 327-333 ff.
- Groll, A., et al., 1996:** Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of infection*, 33, 23-32 ff.
- Guermontprez, P.; J. Valladeau; L. Zitvogel; C. Théry & S. Amigorena, 2002:** Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20, 621-667 ff.
- Handa, K.; R. Suzuki; H. Matsui; Y. Shimizu & K. Kumagai, 1983:** Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *The Journal of Immunology*, 130, 988-992 ff.
- Hart, D. N., 1997:** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90, 3245-3287 ff.
- Henney, C. S.; K. Kuribayashi; D. E. Kern & S. Gillis, 1981:** Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 291, 335-338 ff.
- Heusel, J. W.; R. L. Wesselschmidt; S. Shresta; J. H. Russell & T. J. Ley, 1994:** Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, 76, 977-987 ff.
- Hospenthal, D.; K. Kwon-Chung & J. Bennett, 1998:** Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Medical mycology*, 36, 165-168 ff.

- Kelly, J. M., et al., 2004:** Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22236-22242 ff.
- Latgé, J.-P., 2001:** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in microbiology*, 9, 382-389 ff.
- Latge, J. P., 1999:** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12, 310-350 ff.
- Lothar, J., et al., 2014:** Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 304, 1160-1168 ff.
- Lowin, B.; M. Hahne; C. Mattmann & J. Tschopp, 1994:** Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*, 370, 650-652 ff.
- Lucas, M.; W. Schachterle; K. Oberle; P. Aichele & A. Diefenbach, 2007:** Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 26, 503-517 ff.
- Maertens, J.; J. Verhaegen; K. Lagrou; J. Van Eldere & M. Boogaerts, 2001:** Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood*, 97, 1604-1610 ff.
- Mailliard, R. B., et al., 2003:** Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *The Journal of Immunology*, 171, 2366-2373 ff.
- Mennink-Kersten, M. A.; J. P. Donnelly & P. E. Verweij, 2004:** Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet infectious diseases*, 4, 349-357 ff.
- Mezger, M., et al., 2008:** Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis*, 197, 924-931 ff.
- Mircescu, M. M.; L. Lipuma; N. van Rooijen; E. G. Pamer & T. M. Hohl, 2009:** Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 200, 647-656 ff.
- Mullins, J.; R. Harvey & A. Seaton, 1976:** Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clinical & Experimental Allergy*, 6, 209-217 ff.

- O’Gorman, C. M.; H. T. Fuller & P. S. Dyer, 2009:** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457, 471-474 ff.
- Paris, S., et al., 2003:** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1581-1588 ff.
- Park, S. J.; M. A. Hughes; M. Burdick; R. M. Strieter & B. Mehrad, 2009:** Early NK cell-derived IFN- $\gamma$  is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *The Journal of Immunology*, 182, 4306-4312 ff.
- Perruccio, K., et al., 2004:** Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 33, 248-255 ff.
- Pfeiffer, C. D.; J. P. Fine & N. Safdar, 2006:** Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*, 42, 1417-1727 ff.
- Rink, L.; A. Kruse & H. Haase, 2012:** *Immunologie für Einsteiger*.
- Rohde, M.; M. Schwienbacher; T. Nikolaus; J. Heesemann & F. Ebel, 2002:** Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS microbiology letters*, 206, 99-105 ff.
- Romani, L., 2004:** Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4, 11-24 ff.
- Samson, R. A., 1999:** The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contributions to microbiology*, 2, 5-20 ff.
- Schaffner, A.; H. Douglas; A. Braude & C. Davis, 1983:** Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun*, 42, 1109-1115 ff.
- Schmidt, S., et al., 2011:** Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J Infect Dis*, 203, 430-435 ff.
- Schmidt, S.; S.-Y. Zimmermann; L. Tramsen; U. Koehl & T. Lehrnbecher, 2013:** Natural killer cells and antifungal host response. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20, 452-458 ff.
- Schreurs, M. W.; A. A. Eggert; A. J. de Boer; C. G. Figdor & G. J. Adema, 1999:** Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 29, 2835-2841 ff.

- Schütt, C. & B. Bröker, 2011:** *Grundwissen Immunologie*.
- Tekaia, F. & J.-P. Latgé, 2005:** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current opinion in microbiology*, 8, 385-392 ff.
- Thiery, J., et al., 2011:** Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature immunology*, 12, 770-777 ff.
- Torosantucci, A., et al., 2005:** A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med*, 202, 597-606 ff.
- Varga, J., 2003:** Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, 149, 816-819 ff.
- Voskoboinik, I. & J. A. Trapani, 2006:** Addressing the mysteries of perforin function. *Immunology and cell biology*, 84, 66-71 ff.
- Walzer, T.; M. Dalod; S. H. Robbins; L. Zitvogel & E. Vivier, 2005:** Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 106, 2252-2258 ff.
- Waterhouse, N. J.; C. J. Clarke; K. A. Sedelies; M. W. Teng & J. A. Trapani, 2004:** Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. *Biochem Pharmacol*, 68, 1033-1040 ff.
- Wright-Browne, V.; K. L. McClain; M. Talpaz; N. Ordonez & Z. Estrov, 1997:** Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Human pathology*, 28, 563-579 ff.
- Wright, S. D.; R. A. Ramos; P. S. Tobias; R. J. Ulevitch & J. C. Mathison, 1990:** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433 ff.
- Young, H. A. & K. J. Hardy, 1995:** Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *Journal of leukocyte biology*, 58, 373-381 ff.
- Zarembek, K. A.; J. A. Sugui; Y. C. Chang; K. J. Kwon-Chung & J. I. Gallin, 2007:** Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *The Journal of Immunology*, 178, 6367-6373 ff.
- Ziegler-Heitbrock, H. & R. Ulevitch, 1993:** CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*, 14, 121-125 ff.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau einer sporulierenden Konidiophore von <i>Aspergillus fumigatus</i> in einer rasterelektronenmikroskopischen Darstellung. (©Lother, AG Löffler, 2012) .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Verbreitung und Wachstum von <i>Aspergillus fumigatus</i> in der menschlichen Lunge immunsupprimierter Patienten. Abbildung bearbeitet nach Tekaia und Latgé, 2005. ....	9
<b>Abbildung 3:</b> Aufbau des Zählfeldes der Neubauer-Zählkammer. Quelle: www.lo-laboroptik.de ( <a href="http://lo-laboroptik.de/deutsch/info/neubauer.gif">http://lo-laboroptik.de/deutsch/info/neubauer.gif</a> ) .....	19
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Ficoll-Gradienten vor und nach Zentrifugation.....	20
<b>Abbildung 5:</b> Durchflusszytometrische Analyse von Monozyten direkt nach ihrer Isolation. ....	29
<b>Abbildung 6:</b> Analyse der über fünf Tage generierten moDCs im FACS. ....	30
<b>Abbildung 7:</b> Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs nach ihrer Isolation aus humanem, peripherem Blut. ....	32
<b>Abbildung 8:</b> Die Reinheit der naiven NK-Zellen in der Durchflusszytometer-Analyse... ..	33
<b>Abbildung 9:</b> Anteil der lebenden NK-Zellen nach 24h Voraktivierung mit Proleukin im FACS. ....	33
<b>Abbildung 10:</b> Verschiedene Zellarten im Live-imaging Mikroskop. ....	34
<b>Abbildung 11:</b> Echtzeitaufnahmen der Interaktion zwischen <i>A. fumigatus</i> -Konidien (kleine, rote Zellen) und moDCs (große, graue Zellen) in Abwesenheit (A1-A4) und in Anwesenheit (B1-B4) von naiven NK-Zellen (mittelgroße, graue Zellen). ....	36
<b>Abbildung 12:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen. ....	37
<b>Abbildung 13:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen. ....	37
<b>Abbildung 14:</b> Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten <i>A. fumigatus</i> -Konidien in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen.....	38
<b>Abbildung 15:</b> Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten <i>A. fumigatus</i> -Konidien in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen. ....	38

<b>Abbildung 16:</b> Echtzeitaufnahmen der Interaktion zwischen voraktivierten NK-Zellen (graue, größere Zellen) und Konidien (kleinere, rot leuchtende Zellen) (C) und zum Vergleich der Kokultur mit moDCs (D) im stündlichen Abstand. ....	40
<b>Abbildung 17:</b> Anzahl der Kontakte von naiven NK-Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien in An- und Abwesenheit von moDCs. ....	41
<b>Abbildung 18:</b> Anzahl der Kontakte von voraktivierten NK-Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien in An- und Abwesenheit von moDCs. ....	41
<b>Abbildung 19:</b> Live-imaging Aufnahmen von moDCs (große, graue Zellen) und Konidien (kleine, rote Zellen) in zellspezifischem Medium (E1-E4), sowie moDCs und Konidien mit NK-Überständen (F1-F4) und moDCs und Konidien mit NK-gt-Überständen (G1-G4). ....	42
<b>Abbildung 20:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit Konidien bei Zugabe unterschiedlicher NK-Überstände. ....	44
<b>Abbildung 21:</b> Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten <i>A. fumigatus</i> -Konidien mit unstimulierten moDCs, moDCs in NK-Überstand und moDCs in NK-gt-Überstand. ....	45
<b>Abbildung 22:</b> Live-imaging Aufnahmen der Interaktion von moDCs (große Zellen) und Konidien (kleine Zellen) der Mutante $\Delta$ RodA mit und ohne naive oder voraktivierte NK-Zellen (mittelgroße Zellen). ....	47
<b>Abbildung 23:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien der Mutante $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen. ....	48
<b>Abbildung 24:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien der Mutante $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen. ....	48
<b>Abbildung 25:</b> Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten <i>A. fumigatus</i> -Konidien der Mutante $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von naiven NK-Zellen. ....	49
<b>Abbildung 26:</b> Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten <i>A. fumigatus</i> -Konidien der Mutante $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von voraktivierten NK-Zellen..	49
<b>Abbildung 27:</b> Anzahl der Kontakte von naiven NK-Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien des Pilztyps $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von moDCs. ....	50
<b>Abbildung 28:</b> Anzahl der Kontakte von voraktivierten NK-Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Morphologien des Pilztyps $\Delta$ RodA in An- und Abwesenheit von moDCs. ....	50
<b>Abbildung 29:</b> Anzahl der Kontakte von moDCs mit Konidien des Pilztyps $\Delta$ RodA bei Einwirkung von NK-Überständen..	51

**Abbildung 30:** Prozentuale Menge an durch moDCs internalisierten *A. fumigatus*-Konidien des Pilztyps  $\Delta$ RodA mit unstimulierten moDCs, moDCs in NK-Überstand und moDCs in NK-gt-Überstand. .... 51

**Abbildung 31:** Live-imaging Aufnahmen der Interaktion von mit IFN- $\gamma$  (Konzentration von 0,03 ng/ml) inkubierten moDCs und Konidien im einstündigen Abstand..... 52

**Abbildung 32:** Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener IFN- $\gamma$ -Konzentrationen. .... 53

**Abbildung 33:** Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener Granzym B-Konzentrationen. .... 54

**Abbildung 34:** Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien in Abhängigkeit verschiedener Perforin-Konzentrationen..... 55

**Abbildung 35:** Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien nach Zugabe einer Kombination aus Perforin (3,5 ng/ml), Granzym B (0,6 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (0,03 ng/ml).. .... 56

**Abbildung 36:** Anzahl der Kontakte zwischen moDCs und Konidien nach Zugabe einer Kombination aus Granzym B (0,6 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (0,035 ng/ml)..... 57

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
con	Konidien
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxische T-Zelle
DC	<i>Dendritic cell</i> , dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz basierende Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
gt	<i>Germtubes</i> , Keimschläuche
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IA	Invasive Aspergillose
iDC	<i>Immature dendritic cell</i> , naive dendritische Zelle
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>mM</b>	Stoffmengenkonzentration (mmol/Liter)
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>moDC</b>	Monozyten abgeleitete dendritische Zelle
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of infection</i>
<b>NETs</b>	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NK-T-Zelle</b>	<i>Natural killer-T-cell</i> , natürliche Killer-T-Zelle
<b>NK-Zelle</b>	<i>Natural killer cell</i> , natürliche Killerzelle
<b>nm</b>	Nanometer
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PtrA</b>	Pyriithiamin A
<b>RBC</b>	<i>Red blood cells</i> , Erythrozyten
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>rpm</b>	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
<b>TB</b>	Trypan-Blau
<b>U</b>	<i>Units</i>
<b>Üst</b>	Überstand

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Kits.....	14
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Reagenzien .....	14
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Medien.....	14
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Zytokine .....	15
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Antikörper .....	15
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Labormaterialien .....	16
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Geräte.....	17
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Computersoftware.....	17

### **7.3 CD mit exemplarischer Live-imaging Aufnahme**

Video: Interaktion von moDCs und NK-Zellen in Kokultur mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien im Live-imaging

## Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Bei Professor Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Doktorarbeit anzufertigen
- Bei Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Überlassung des Themas, viele hilfreiche experimentelle Vorschläge, die hervorragende Unterstützung und Betreuung der Arbeit
- Bei Dr. Jasmin Lothar für die ausgezeichnete Betreuung, die zuverlässige Unterstützung von der Einarbeitung in die Methodik bis hin zur Korrektur aller Entwürfe und die lehrreiche Zeit im Labor
- Bei der gesamten AG Löffler für die geduldige Einweisung im Labor und die ständige Hilfsbereitschaft bei jederlei Fragen und Problemen
- Beim Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg für die Kooperation bei der Gewinnung der Leukozytenkonzentrate
- Beim Institut für molekulare Infektionsbiologie (IMIB) der Universität Würzburg für die Möglichkeit der Nutzung des Live-imaging Mikroskops
- Bei meiner Familie für die Unterstützung jeglicher Art während meines Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation
- Bei meinem Freund Manuel für die ständige Motivation und Unterstützung

