

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Expressionsanalyse von Genen des angeborenen  
Immunsystems bei Dendritischen Zellen / Monozyten  
nach Stimulation mit Lipopolysaccharid  
und *Aspergillus fumigatus*-Konidien  
mittels quantitativer RT-PCR**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christoph Michael Kaiser

aus Freiburg i. Br.

Tübingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

Erster Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Löffler

Zweiter Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern

**Inhaltsverzeichnis:**

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungen	6
<b>1. Einleitung:</b>	<b>10</b>
1.1 Das menschliche Immunsystem	10
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	11
1.2 Cytokine	12
1.3 Antigenpräsentierende Zellen	14
1.3.1 Monozyten	14
1.3.2 Dendritische Zellen	15
1.4 Toll-like-Rezeptoren	17
1.4.1 Liganden der Toll-like-Rezeptoren	19
1.4.2 Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung	21
1.4.3 Negative Regulation der TLR-Signaltransduktion	24
1.4.4 TLR-Expression	25
1.5 Bakterien	26
1.5.1 Lipopolysaccharid	26
1.6 Schimmelpilze	27
1.6.1 Aspergillus fumigatus	28
1.7 Zielsetzung der Arbeit	29
<b>2. Material</b>	<b>31</b>
2.1 Geräte	31
2.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.3 Reaktionskits	32
2.4 Reagenzien	33
<b>3. Methoden</b>	<b>34</b>
3.1 Zellkulturelle Methoden	34
3.1.1 Isolierung von PBMCs	34
3.1.2 Zellquantifizierung mittels Neubauerzählkammer	34
3.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	36

3.1.4	Zellseparation mittels MACS <sup>®</sup> -System	36
3.1.5	Generierung von Dendritischen Zellen	37
3.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1	Präparation von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	38
3.2.2	Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit Lipopolysaccharid	39
3.2.3	Stimulation von Monozyten mit Lipopolysaccharid	39
3.2.4	Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien	39
3.3	Molekularbiologische Methoden	40
3.3.1	Gelelektrophorese	40
3.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und cDNA	41
3.3.3	RNA-Extraktion	41
3.3.4	Reverse Transkription	42
3.3.5	Vervielfältigung von cDNA-Sequenzen zur Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen	43
3.3.6	Aufreinigen von PCR-Produkten	45
3.3.7	Quantitative Realtime-PCR mittels LightCycler <sup>™</sup>	45
3.3.7.1	Das Prinzip der qRT-PCR	45
3.3.7.2	Verwendete Detektionsmethode	46
3.3.7.3	Anwendung des LightCyclers <sup>™</sup>	47
3.3.7.4	LightCycler <sup>™</sup> -Ergebnis-Dokumentation und -Auswertung	50
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1	Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen	52
4.2	Quantifizierung der untersuchten Gene mittels LightCycler <sup>™</sup>	54
4.3	Untersuchte Spender	56
4.4	Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS	56
4.4.1	IL12p40-Expression	56
4.4.2	TLR4-Expression	57
4.5	Stimulation von Monozyten mit LPS	58

4.5.1	TNF $\alpha$ -Expression	58
4.5.2	TLR4-Expression	59
4.5.3	CD14-Expression	60
4.6	Stimulation Dendritischer Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien	61
4.6.1	TNF $\alpha$ - und IL12p40-Expression	61
4.6.2	MCP1-Expression	62
4.6.3	PTX3-Expression	63
4.6.4	Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren	64
4.6.5	NF $\kappa$ B-Expression	67
4.7	Ergänzende Experimente nach Studium der bisher ermittelten Daten	67
4.7.1	Stimulation Dendritischer Zellen von Spender 1 mit LPS	68
4.7.1.1	IL12p40-Expression	68
4.7.1.2	TLR4-Expression	69
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
5.1	Schutz vor überschießender Immunreaktion nach Stimulation mit LPS durch verminderte Rezeptor-Expression	70
5.2	Immunreaktionen gegenüber <i>Aspergillus fumigatus</i> unter Beteiligung verschiedener Toll-like Rezeptoren	72
5.3	Spender- und pilzstammabhängige Variationen bei den durchgeführten Experimenten	78
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>83</b>
	Danksagung	94
	Lebenslauf	95

**Abbildungen:**

- Abb. 1 Lichtmikroskopische Aufnahme Dendritischer Zellen
- Abb. 2 Vergleich Toll-like-Rezeptor/ IL1-Rezeptor
- Abb. 3 Familie der an den TLR-Signalkaskaden beteiligten Adapterproteine
- Abb. 4 Signalwege der Toll-like-Rezeptoren
- Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Aspergillus fumigatus*
- Abb. 6 Gitternetz einer Neubauer-Zählkammer
- Abb. 7 MACS<sup>®</sup>-System
- Abb. 8 Prinzip des FRET bei der Detektion von DNA mittels Hybridisierungssonden
- Abb. 9 LightCycler™ Probenkarussell
- Abb. 10 qRT-PCR-Auswertung: *crossing point* einer Probe
- Abb. 11 qRT-PCR-Auswertung: *crossing points* einer Standardreihe und sich daraus ergebende Eichgerade
- Abb. 12 Fotografie eines Gels mittels UV-Kamera
- Abb. 13 Kontrolle einer Standard-Verdünnungsreihe mittels LightCycler™
- Abb. 14 Auswertung eines qRT-PCR-Laufs
- Abb. 15 IL12p40-Expression nach Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS
- Abb. 16 TLR4-Expression nach Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS
- Abb. 17 TNF $\alpha$ -Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation
- Abb. 18 TLR4-Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation
- Abb. 19 CD14-Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation
- Abb. 20 IL12p40- und TNF $\alpha$ -Expression Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien
- Abb. 21 MCP1-Expression Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien

Abb. 22	PTX3-Expression Dendritischer Zellen nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien
Abb. 23	Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren von Dendritischen Zellen nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien
Abb. 24	NF $\kappa$ B-Expression Dendritischer Zellen nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien
Abb. 25	IL12p40-Expression Dendritischer Zellen von Spender 1 nach LPS-Stimulation
Abb. 26	TLR4-Expression Dendritischer Zellen von Spender 1 nach LPS-Stimulation

### **Tabellen**

Tab. 1	Liganden der bis heute identifizierten Toll-like Rezeptoren
Tab. 2	Zusammensetzung Mastermix für Reverse Transkription
Tab. 3	Zusammensetzung „PCR Master“ von <i>Roche</i>
Tab. 4	Zusammensetzung Mastermix für konventionelle PCR
Tab. 5	Basiseinstellungen PCR-Gerät
Tab. 6	Eingesetzte Sonden und ihre Basensequenzen
Tab. 7	Zusammensetzung Mastermix für qRT-PCR
Tab. 8	Eingesetzte Primer und ihre Basensequenzen
Tab. 9	Temperaturprofil der qRT-PCR im <i>LightCycler</i> <sup>TM</sup>



**Abkürzungen:**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i> / antigenpräsentierende Zelle
aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	<i>base pair</i> / Basenpaar
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i> / Differenzierungsfaktor
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i> / komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CpG-DNA	<i>cytosine-phosphate-guanosine-DNA</i>
CRP	C-reaktives Protein
DC	<i>dendritic cell</i> / Dendritische Zelle
DD	<i>death domaine</i> / Todesdomäne
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate

## Abkürzungen

---

dsDNA	<i>double stranded DNA / doppelsträngige DNA</i>
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum / fötales Kälberserum</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GMC-SF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
iDCs	<i>immature dendritic cells / unreife Dendritische Zellen</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-kinase-complex</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	<i>IL1-receptor associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LBP	LPS-bindendes Protein
LC	<i>LightCycler™</i>
LPS	Lipopolysaccharid

LRRs	<i>leucin rich repeats /</i> Leucin-reiche Wiederholungen
LTA	<i>lipoteichonic acid /</i> Lipoteichonsäure
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPKKK	<i>mitogene activating proteinkinase-kinase-kinase</i>
max	maximal
mDC	<i>mature dendritic cell /</i> reife Dendritische Zelle
MD-2	<i>myeloid differential protein-2</i>
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex /</i> Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid /</i> Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern /</i> Pathogen assoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction /</i> Polymerasekettenreaktion
PGN	Peptidoglykan

PRR	<i>pattern recognition receptor /</i> mustererkennender Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid /</i> Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute /</i> Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-</i> Medium
RT	Reverse Transkriptase
SARM	<i>sterile alpha and armadillo-motif-containing protein</i>
SIGIRR	<i>single immunoglobulin IL1-receptor related molecule</i>
sec	Sekunde
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA /</i> einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK	<i>transforming growth factor beta activated kinase</i>
Taq-DNA-Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase aus dem Organismus <i>Thermus aquaticus</i>
TIRAP	<i>TIR-associated protein</i>
TIR-Domäne	Toll / IL1 Rezeptor Domäne
TLR	<i>Toll-like-receptor /</i> Toll-like-Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
TRAM	<i>Toll-receptor associated molecule</i>
TRIF	<i>Toll-receptor associated activator of interferon</i>

## **1. Einleitung**

### 1.1 Das menschliche Immunsystem

Wie jeder andere Organismus ist der Mensch ununterbrochen einer Vielzahl von auf ihn pathogen wirkenden Mikroorganismen ausgesetzt. Mechanische sowie biochemische Schutzbarrieren hindern einen Großteil von ihnen am Eindringen in unseren Organismus. Hierzu zählen neben der Haut als größter mechanischer Schutzvorrichtung Schleim auf Schleimhäuten des Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstraktes, das Flimmerepithel der Luftwege, das saure Milieu des Magens und der Vagina sowie in Sekreten enthaltene Enzyme wie beispielsweise das Lysozym des Speichels<sup>40</sup>. Dennoch gelangen jeden Tag unzählige Mikroorganismen und andere Krankheitserreger wie z.B. Viren in den menschlichen Körper.

Diese Pathogene möglichst frühzeitig zu erkennen und zu eliminieren ist eine der Aufgaben unseres Immunsystems, das in ein angeborenes und ein erworbenes Abwehrsystem unterteilt wird. Um eine effektive Verteidigung gegenüber mikrobiellen Angriffen auf unsere Gesundheit zu gewährleisten bedarf es eines engen Zusammenwirkens dieser beiden Systeme.

Lange Zeit stand dabei das erworbene Immunsystem im Mittelpunkt des Interesses der immunologischen Forschung, doch in den letzten Jahren richtet sich der Blick immer mehr auf das zuvor als relativ unspezifisch angesehene und deshalb fast schon in den Hintergrund getretene angeborene Immunsystem<sup>2</sup>. Auch diese Arbeit beschäftigt sich mit Aspekten des entwicklungsgeschichtlich älteren Teils unseres Abwehrsystems<sup>124</sup>, der angeborenen Immunität. Auf die Funktion der adaptiven Immunität, die auf der spezifischen Erkennung von Antigenen durch auf der Zelloberfläche von Lymphozyten sitzende Rezeptoren beruht, soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Im zeitlichen Ablauf einer Infektion ist das System der angeborenen Immunität der als erstes in Kraft tretende Abwehrmechanismus des menschlichen Körpers<sup>26</sup>. Sind Pathogene in unseren Körper gelangt, so ist es an deren Erkennung ebenso maßgeblich beteiligt wie an der anschließenden Elimination der Krankheitserreger sowie ihrer Zuführung zur Bekämpfung durch das System der adaptiven Immunität<sup>104</sup>. Wie bereits erwähnt arbeitet die erworbene Immunität mit einem hochspezifischen, durch somatische Rekombination von Genen sowie klonale Selektion entstandenen Antigenrezeptoren-Repertoire<sup>46</sup>. Im Gegensatz dazu exprimieren Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Monozyten und Dendritische Zellen (DCs)) eine Vielzahl von keimbahncodierten Rezeptoren, die zur Erkennung unterschiedlichster konservierter pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*=PAMPs) befähigt sind. Bei diesen PAMPs handelt es sich um Strukturen, die von Mikroorganismen oder Viren, nicht aber von Säugetieren produziert werden und so dem Immunsystem auf einfache Art und Weise die Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen erlauben. Als Beispiele seien Peptidoglykane (PGN), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA, doppelsträngige RNA sowie Lipopolysaccharide (LPS) genannt<sup>1,47</sup>. Da es sich meist um für das Überleben des Mikroorganismus essentielle Substanzen handelt ist die Entwicklung von „*escape*-Mutanten“, die sich der Detektion unseres Immunsystems entziehen würden, erschwert<sup>45</sup>. Die sogenannten mustererkennenden Rezeptoren (*pattern recognition receptors*=PRRs), die diese PAMPs erkennen, werden von verschiedensten Zellen exprimiert. Da ein PAMP nicht das Erkennungsmuster eines einzelnen Krankheitserregers, sondern das einer ganzen Erregergruppe darstellt (Bsp.: LPS → gramnegative Bakterien)<sup>66</sup>, kommt das System der angeborenen Immunität mit einer weitaus geringeren Anzahl an Rezeptoren aus als das jedes Antigen spezifisch erkennende adaptive Immunsystem.

Anhand ihrer Funktion können die PRRs in drei Klassen eingeteilt werden<sup>47</sup>:

- sezernierte,
- endozytierende,
- signaltransferierende Rezeptoren.

Die von den Zellen des angeborenen Immunsystems sezernierten mustererkennenden Rezeptoren wirken opsonierend, d.h. sie markieren Pathogene so, dass diese vom Komplementsystem oder von Phagozyten erkannt werden können<sup>29</sup>. Ein Beispiel hierfür ist das in erster Linie von Dendritischen Zellen gebildete Pentraxin3 (PTX3). Es gehört wie das wesentlich bekanntere CRP (C-reaktives Protein) zur Gruppe der Pentraxine, die aus fünf identischen Protein-Untereinheiten aufgebaut sind<sup>23,48</sup>.

Auf der Oberfläche phagozytierender Zellen befinden sich die endozytierenden PRRs, die durch die Erkennung pathogener Strukturen bzw. Muster die Antigen-Aufnahme einleiten, wodurch die Prozessierung und Präsentation von Antigenen zusammen mit MHC-Molekülen erst ermöglicht wird<sup>97</sup>.

Bei der Gruppe der signaltransferierenden Rezeptoren handelt es sich um membranständige Makromoleküle bzw. Komplexe, die nach der Erkennung von PAMPs eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, die dann die veränderte Expression verschiedener Gene induziert. Dazu gehören Gene, die für PRRs und Bestandteile ihrer intrazellulären Signalwege selbst, für antimikrobiell wirksame Substanzen oder für pro-inflammatorische Cytokine codieren<sup>47,66</sup>.

Zur letzt genannten Gruppe zählen auch die in der immunologischen Forschung der letzten Jahre stark berücksichtigten Toll-like-Rezeptoren (TLRs).

## 1.2 Cytokine

Von Leukozyten und anderen Zellen werden Stoffe sezerniert, die eine autokrine, parakrine oder endokrine immunregulatorische Signalwirkung besitzen. Diese Proteine und Glykoproteine werden Cytokine genannt, je nach ihrem Produktionsort werden sie in Lymphokine, Monokine, Interleukine oder Interferone unterteilt. Trotz einer großen Heterogenität in ihrer Wirkungsweise besitzen alle Cytokine charakteristische Eigenschaften. Obwohl sie nur in sehr

geringer Menge produziert werden, besitzen sie eine große biologische Aktivität und Effektivität. Wichtige Aufgabe der Cytokine ist die Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität. Zielzellen erkennen über Oberflächenrezeptoren die von ihnen übermittelte Information.

Die Aufgaben eines Cytokins sind meist vielfältig und die Funktion kann vom Zusammenwirken mit anderen Cytokinen oder vom Aktivierungszustand der Zielzelle bestimmt werden. So sind die meisten Cytokine in der Lage die Produktion anderer Cytokine zu stimulieren oder zu inhibieren.

Grundsätzlich lässt sich zwischen pro-inflammatorischen (z.B. IL-12,  $\text{TNF}\alpha$ ) und anti-inflammatorischen Cytokinen (z.B. IL-4, IL-10) unterscheiden<sup>102</sup>.

IL-12 wirkt entscheidend mit an der T-Helferzellentwicklung zur inflammatorischen  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zelle, es steigert die cytolytische Aktivität natürlicher Killerzellen sowie cytotoxischer T-Zellen und es induziert eine verstärkte Proliferation hämatopoetischer Stammzellen<sup>103</sup>.

Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) ist neben der Abwehr mikrobieller Infektionen auch an der Verhinderung unkontrollierten Tumorwachstums beteiligt<sup>48</sup>. Er führt zur lokalen Blutgerinnung und verhindert damit, dass Erreger aus dem Infektionsgebiet in den systemischen Blutkreislauf eingeschwemmt werden. Durch gesteigerte Gefäßpermeabilität steht genügend extravasale Flüssigkeit für den Abtransport der Pathogene über das Lymphsystem zur Verfügung. Gelangen dennoch Keime in den Blutkreislauf, so ist  $\text{TNF}\alpha$  aufgrund der beschriebenen Effekte maßgeblich an der Auslösung eines septischen Schocks beteiligt<sup>46</sup>.

Ein weiteres wichtiges pro-inflammatorisches Cytokin ist MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*), das die Einwanderung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen fördert. Gebildet wird es überwiegend von eben diesen beiden Zelltypen sowie von Dendritischen Zellen<sup>48</sup>.

Anti-inflammatorische Cytokine führen dagegen durch Aktivierung von B-Zellen verstärkt zur Antikörperbildung.

Bei Cytokinen, die sowohl Aufgaben der einen, als auch der andere Gruppe übernehmen (z.B. IL-6) ist eine genaue Gruppen-Zuordnung nicht möglich.



## 1.3 Antigenpräsentierende Zellen

Das menschliche Immunsystem besitzt dreierlei Zelltypen, die zur Phagozytose befähigt sind<sup>46</sup>. Dies sind die Monozyten / Makrophagen, wobei die Makrophagen die ins Gewebe eingewanderte gereifte Form der Monozyten darstellen, die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie die Dendritischen Zellen. Abgesehen von den Granulozyten sind diese auch zur Antigenpräsentation befähigt, wobei es sich bei den Dendritischen Zellen, genauer bei den reifen DCs, um die effektivsten Vertreter der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen handelt<sup>46</sup>. Neueste Studien erwägen jedoch, sowohl den neutrophilen, als auch den eosinophilen Granulozyten ebenfalls antigenpräsentierende Potenz zuzusprechen<sup>92,119</sup>.

### 1.3.1 Monozyten

Monozyten zirkulieren nach ihrer Ausschwemmung aus dem blutbildenden Knochenmark für ca. zwei bis drei Tage im Blut<sup>55</sup>, bevor sie das Blutgefäß via Leukodiapedese verlassen und ins Gewebe einwandern. Dort differenzieren sie zu Gewebsmakrophagen und zu unreifen Dendritischen Zellen.

Gesteuert werden Monozyten sowohl bei ihrer Migration ins Gewebe als auch bei ihrer Differenzierung zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen durch Cytokine bzw. Chemokine. Zu den auf Monozyten chemotaktisch wirkenden Entzündungsmediatoren gehört beispielsweise der von mehreren Immunzellen freigesetzte  $TNF\alpha$ . Bei der Differenzierung spielt der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) eine wichtige Rolle, wobei das Vorhandensein von Interleukin 4, durch T-Helferzellen sezerniert, die Makrophagen-Aktivierung verhindert und so die Bildung von Dendritischen Zellen bewirkt<sup>48</sup>.

Obwohl es sich bei Monozyten um Vorläuferzellen der eigentlichen Effektorzelle Makrophage handelt, exprimieren sie neben den Cytokin-Rezeptoren noch eine

Vielzahl weiterer Oberflächenrezeptoren, wodurch sie selbst als agierende Immunzellen auftreten.

Dazu zählen endozytierende PRRs, die die Phagozytose von Pathogenen ermöglichen oder Scavenger-Rezeptoren, die anionische Polymere und acetylierte Lipoproteine erkennen<sup>46</sup>. Die Tatsache, dass Monozyten auch MHC-Moleküle der Klasse II besitzen, erlaubt ihnen neben der Aufnahme auch die Präsentation von Antigenen.

Signaltransferierende PRRs wie TLR4 erkennen zusammen mit Co-Rezeptoren im Blut zirkulierende Antigene, wodurch die Freisetzung von Cytokinen durch Monozyten induziert wird.

Wichtiger Vertreter dieser Co-Rezeptoren oder Rezeptorproteine ist der monozytenspezifische Oberflächenmarker CD14, der bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) bindet<sup>48</sup>.

Während der Differenzierung zu Dendritischen Zellen verändert sich das exprimierte Rezeptormuster auf der Zelloberfläche<sup>108</sup>.

### 1.3.2 Dendritische Zellen

Bereits 1868 beschrieb *Paul Langerhans* die später nach ihm benannten Langerhans-Zellen der Haut, die zu den Dendritischen Zellen gehören. Er ordnete sie allerdings noch dem Nervensystem zu. Erst 1973 wurden die Dendritischen Zellen (DCs) in ihrer Funktion von *Steinman* und *Cohn* entdeckt. Seither wurden immer mehr detaillierte Informationen über die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) unseres Immunsystems erforscht<sup>46</sup>. Neben der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen übernehmen sie durch die Sekretion von Cytokinen und die Stimulation oder Toleranz von B- und T-Lymphozyten wichtige kontrollierende Aufgaben im Ablauf der menschlichen Immunität<sup>6</sup>.

Unreife Dendritische Zellen (iDCs) befinden sich unterhalb der meisten Oberflächenepithelien sowie in den meisten massiven Organen wie Herz oder Niere. Sie sind in der Lage, Antigene zu erkennen und durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. IDCs

verfügen jedoch noch nicht über costimulierende Moleküle und besitzen nur wenige MHC-Moleküle, sodass sie zur Stimulation von Lymphozyten noch nicht befähigt sind<sup>48</sup>. Hierzu bedarf es zuerst der Reifung der iDCs, die durch den Antigenkontakt induziert und durch verschiedenste Faktoren beeinflusst wird.

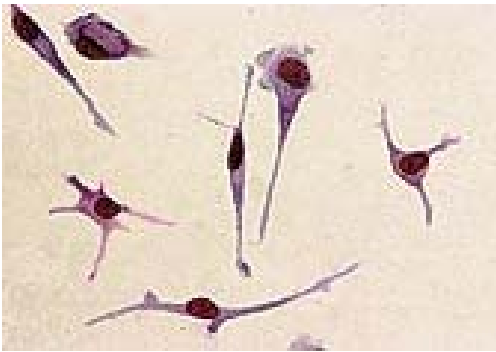
Während Bakterien oder bakterielle Muster wie LPS sowie pro-inflammatorische Cytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 und GM-CSF alle die DC-Reifung stimulieren, wirken anti-inflammatorische Cytokine wie IL-10 inhibitorisch<sup>17</sup>. Von Rezeptoren der iDCs erkannte Pathogene können eine Signalkaskade in der Zelle auslösen, an deren Ende die Sekretion von Cytokinen steht, die autokrin wirken und die Reifung zu reifen Dendritischen Zellen (mDCs) initiieren. Beispiel hierfür ist die Erkennung von LPS aus der Bakterienwand gramnegativer Bakterien durch TLR4, die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und letztlich die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$ <sup>48</sup>.

Nach ihrer Reifung und Wanderung in regionäre Lymphknoten verlieren die DCs ihre Fähigkeit der Antigen-Phagozytose und –Prozessierung. Stattdessen synthetisieren sie nun in großen Mengen langlebige MHC-Moleküle und können so dauerhaft Antigene präsentieren. Die MHC-Expression ist dabei zehn bis einhundert Mal höher als in anderen APCs wie z.B. Monozyten<sup>44</sup>. Des Weiteren werden Costimulations-Moleküle wie B7 und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder -2 exprimiert, die nun den mDCs die Interaktion mit Lymphozyten erlauben.

Hat sich ein Erreger im Laufe der Evolution so verändert, dass er von den mustererkennenden Rezeptoren der Phagozyten nicht mehr identifiziert werden kann, so ist es den Dendritischen Zellen vorbehalten, eine Immunreaktion gegen diesen Keim einzuleiten. Durch Makropinocytose wird der Erreger rezeptorunabhängig aufgenommen und intrazellulär abgebaut. Dabei werden Strukturen frei, die zur Aktivierung und Reifung der Dendritischen Zelle führen. Als Beispiel hierfür sei bakterielle unmethylierte CpG-DNA genannt, die erst nach der Verdauung des Bakteriums zugänglich wird und von intrazellulärem Toll-like-Rezeptor 9 erkannt wird. Es wird wiederum eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Sekretion von Interleukinen und Interferonen führt. Diese

bewirken die Expression costimulierender Moleküle und ermöglichen so die Stimulation der T-Zellantwort<sup>48</sup>.

Dendritische Zellen können somit als die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen bezeichnet werden. Sie bilden die entscheidendste Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität.



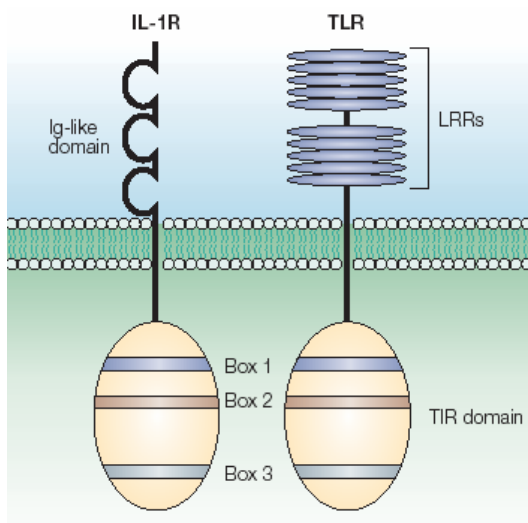
**Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme  
Dendritischer Zellen<sup>112</sup>**

## 1.4 Toll-like-Rezeptoren

Wie bereits unter 1.1.1 erwähnt besitzt das angeborene Immunsystem zur Erkennung von Pathogenen keimbahncodierte Rezeptoren. Toll-like-Rezeptoren bilden eine Familie, die zur Gruppe der signaltransferierenden *pattern recognition receptors* (PRRs) gehört.

Erstmals wurde der Toll-Rezeptor 1985 in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. *Anderson et. al.* zeigten, dass er während der Embryogenese bei der Festlegung der dorsoventralen Achse eine Rolle spielt<sup>4</sup>. Später wurde festgestellt, dass der Signalweg des Toll-Rezeptors bei *Drosophila* ebenso in der Aktivierung von NF $\kappa$ B mündet wie der IL1-Rezeptor-Signalweg bei Säugern<sup>10</sup>. Man vermutete daher, dass der Toll-Rezeptor-vermittelte Signalweg an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist. So zeigten beispielsweise *Lemaitre et al.* 1996, dass Toll-Rezeptor-defiziente Fliegen nicht in der Lage sind, eine effektive Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* einzuleiten<sup>58</sup>. Weitergehende Forschungen ergaben, dass die cytoplasmatische Domäne des *Drosophila* Toll-Rezeptors und die des IL1-

Rezeptors tatsächlich sehr stark konserviert sind. Man bezeichnet sie als Toll/IL1-Rezeptor Domäne (TIR-Domäne)<sup>95</sup>. Der extrazelluläre Anteil beider Rezeptoren unterscheidet sich dahingehend, dass er beim Toll-Rezeptor aus Leucin-reichen Wiederholungen (leucin rich repeats=LRRs) und beim IL1-Rezeptor aus drei immunglobulinähnlichen Domänen besteht. Die LRR-Domänen bestehen aus unterschiedlich vielen, jeweils 24-29 AS langen Wiederholungen und es wird angenommen, dass sie direkt an der Erkennung von Pathogenen beteiligt sind<sup>7,104</sup>.



**Abb. 2: Vergleich Toll-like-Rezeptor/IL1-Rezeptor<sup>2</sup>**

1997 waren es *Medzhitov et al.*, die als erste einen dem Toll-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* homologen Rezeptor beim Menschen entdeckten. Er wurde später als Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet<sup>65</sup>.

Nach und nach wurden weitere humane, der Familie der *Drosophila*-Toll- und der IL1-Rezeptoren homologe Toll-like Rezeptoren gefunden, die alle als transmembrane Proteine mit extrazellulärer leucinreicher Domäne imponieren<sup>18</sup>. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten beim Menschen elf verschiedene Toll-like-Rezeptoren beschrieben werden<sup>2</sup>. Einige wie z.B. TLR1, TLR6 und TLR10 sind auf der Zelloberfläche exprimiert, andere kommen endosomal vor. Zu Letzteren gehören die Toll-like-Rezeptoren 3, 7, 8 und 9, die an der Erkennung von

Nukleinsäuren nach Phagozytose und intrazellulärer Zerlegung von Krankheitserregern beteiligt sind<sup>22,34,64</sup>.

Die chromosomale Lage der Gene, die für die TLRs codieren, ist inzwischen bis auf die von TLR11 identifiziert. So befindet sich der genetische Locus von TLR 1, 6 und 10 auf Chromosom 4p14<sup>65,89</sup>. Auf 4q32 und 4q35 liegen die Gene für TLR2 und TLR3, auf 9q32-33 bzw. 1q33.3 die für TLR4 und TLR5. Die Gene für TLR7 und 8 wurden auf dem X-Chromosom an Position p22 lokalisiert, das für TLR9 konnte der Position p21.3 von Chromosom 3 zugeschrieben werden<sup>19,24</sup>.

Die Entdeckung von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren war auf dem Gebiet der erworbenen Immunität von bahnbrechender Bedeutung. Das neu gewonnene Verständnis über die Pathogenerkennung im Bereich des angeborenen Immunsystems durch Toll-like-Rezeptoren kann ebenso hoch eingestuft werden.

#### 1.4.1 Liganden der Toll-like-Rezeptoren

Bei der Vorstellung der PAMPs-erkennenden PRRs (siehe 1.1.1) geht man davon aus, dass bestimmte Molekülmuster von Krankheitserregern durch einen bestimmten keimbahncodierten Rezeptor erkannt werden. Diese These der molekularen Spezifität konnte für die Toll-like-Rezeptoren bestätigt werden<sup>67,81,99,105</sup>. Die natürlichen Liganden sind inzwischen für fast alle TLRs ermittelt worden.

Bei manchen TLRs ist für die Erkennung von PAMPs das Vorhandensein weiterer Co-Rezeptoren oder Bindungs-Moleküle erforderlich. Am besten erforscht ist dabei die Interaktion zwischen TLR4 und Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. LPS bindet an ein im Serum vorkommendes LPS-bindendes Protein (LBP), vom Komplex aus LPS und LBP wird LPS auf den

membranständigen Co-Rezeptor CD14 übertragen. Erst die Einheit aus CD14 und LPS aktiviert den Toll-like-Rezeptor 4<sup>48,50</sup>.

**Tab. 1: Liganden der bis heute identifizierten Toll-like Rezeptoren**  
(verändert nach Akira et. al.<sup>2</sup>)

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	lösliche Faktoren Triacyl-Lipopeptid	<i>Neisseria meningitidis</i> Bakterien und Mykobakterien
TLR2	Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoproteine/ Lipopeptide Glykolipide atypisches LPS  Zymosan	grampositive Bakterien grampositive Bakterien verschiedene Pathogene <i>Treponema maltophilum</i> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	LPS Fusionsproteine Taxole Hüllproteine	gramnegative Bakterien Respiratorisches Syncytialvirus (RSV) Pflanzen Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Lipoteichonsäure Diacyl-Lipopeptid Zymosan	grampositive Bakterien Mycoplasmen Pilze
TLR7	einzelsträngige RNA Imidazole Loxoribine	Viren synthetische Herkunft synthetische Herkunft
TLR8	einzelsträngige RNA Imidazole	Viren synthetische Herkunft
TLR9	CpG-DNA	Bakterien und Viren
TLR10	nicht bekannt	
TLR11	nicht bekannt	

### 1.4.2 Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung

Nachdem ein Ligand an einen Toll-like-Rezeptor gebunden hat, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und eine intrazelluläre Signalkaskade wird in Gang gesetzt<sup>2</sup>. MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) fungiert dabei als erstes Adaptermolekül. Es besitzt am C-terminalen Ende ebenfalls eine TIR-Domäne, über die es mit der cytoplasmatischen TIR-Domäne des TLRs interagiert<sup>2</sup>. Am N-terminalen Ende des MyD88-Moleküls befindet sich eine Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelnde Domäne, die Todesdomäne (*death domain*=DD) genannt wird, da sie zuerst bei an der Apoptose beteiligten Proteinen beschrieben wurde<sup>48</sup>.

Ist es zur Aktivierung von MyD88 durch die TIR-Domäne des TLRs gekommen, so interagiert es über seine Todesdomäne mit einer ebenfalls eine Todesdomäne tragenden Serin/Threonin-Kinase, genauer mit IRAK4 (*IL1-receptor associated kinase 4*). Die so induzierte Phosphorylierung von IRAK4 führt zur Stimulation und somit zur Autophosphorylierung von IRAK1, einem weiteren Mitglied der IRAK-Familie, zu der neben den bereits genannten noch IRAK2 und IRAK-M gehören<sup>49</sup>. Als Folge der Autophosphorylierung kann sich nun das Adaptermolekül TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) an IRAK1 anlagern.

Bei den sechs bekannten Vertretern der TRAF-Familie handelt es sich um konservierte Adaptermoleküle<sup>13</sup>, wobei TRAF6 als solches sowohl im Signalweg der TNF-Rezeptor-Superfamilie als auch in dem der TLR/IL1-Rezeptoren auftritt<sup>2</sup>.

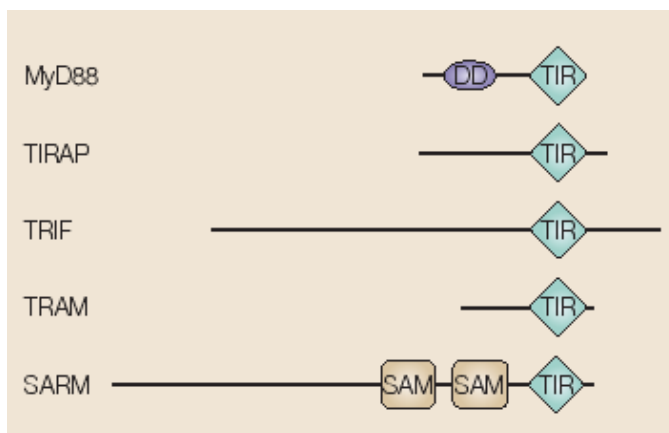
Die Einheit aus IRAK1 und TRAF6 dissoziiert nun vom cytoplasmatischen Teil des TLRs und interagiert mit dem an der Plasmamembran gelegenen Komplex aus TAK1 (*transforming growth factor beta activated kinase 1*) und TABs (*TAK1-binding proteins*). TAK1 gehört zu den mitogenen aktivierenden Proteinkinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK)<sup>120</sup> und ist von entscheidender Bedeutung bei der IL1/LPS- und TNF-induzierten Aktivierung von NFκB<sup>101</sup>. Bei TABs handelt es sich um Aktivierungs- bzw. Adapterproteine von TAK1<sup>94,100</sup>. Nach der Phosphorylierung von TAK1 löst sich dieses nun zusammen mit



TRAF6 endgültig von der Plasmamembran und verlagert sich ins Zytoplasma, um dort über IKKs (*IκB-kinase-complex*) den Abbau von IκB einzuleiten. Da es sich bei IκB um einen Inhibitor von NFκB handelt ist dieser Schritt gleichbedeutend mit der Aktivierung von NFκB<sup>2</sup>. Dieses dringt in den Zellkern ein und steuert dort als Transkriptionsfaktor die Expression von für an der Immunantwort beteiligte Stoffe codierenden Genen.

Soweit bisher bekannt erfolgt die Signalvermittlung bei den Toll-like-Rezeptoren 5, 7, 8 und 9 ausschließlich über den bis hier beschriebenen MyD88-abhängigen und zur Aktivierung von NFκB führenden Signalweg<sup>2</sup>.

Inzwischen wurden neben MyD88 noch weitere vier Adapterproteine entdeckt, die bei der Signalübermittlung mancher TLRs alternativ oder ergänzend zu MyD88 genutzt werden<sup>2</sup>: Dies sind TRIF (*Toll-receptor associated activator of interferon*), TIRAP (*TIR-associated protein*), TRAM (*Toll-receptor associated molecule*) und SARM (*sterile alpha and armadillo-motif-containing protein*)<sup>80</sup>, die alle eine TIR-Domäne tragen (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Familie der an den TLR-Signalkaskaden beteiligten Adapterproteine<sup>104</sup>**  
(DD=death domain,  
SAM=sterile α-motif)

So erfolgt die Signalübertragung bei TLR2 nach Bildung eines Heterodimers mit entweder TLR1 oder TLR6 über TIRAP<sup>41</sup>. TLR4 benötigt beim oben beschriebenen MyD88-abhängigen Pfad dieses TIRAP als zusätzliches zweites Adapterprotein<sup>41</sup>. Außerdem ist für TLR4 noch ein MyD88-unabhängiger, ebenfalls in der NFκB-Liberation resultierender Signalweg aufgedeckt worden, bei dem TRAM eine Rolle spielt<sup>28,121</sup>.

Des Weiteren kann die Erkennung von Pathogenen durch TLRs nicht nur in einer NF $\kappa$ B-Aktivierung resultieren, sondern auch zur Phosphorylierung von IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) und damit über den IRF3-Signalweg zur Freisetzung von Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  führen<sup>2</sup>. Dieser Weg der Signalübertragung ist bis jetzt für TLR3 sowie zusätzlich zu den oben bereits beschriebenen Wegen auch für TLR4 beschrieben worden<sup>39</sup>. Das dabei zum Einsatz kommende Adaptermolekül ist TRIF<sup>28</sup>.

SARM ist in Verbindung mit TLRs beschrieben worden, seine genaue Bedeutung und Funktion ist allerdings noch ungeklärt.

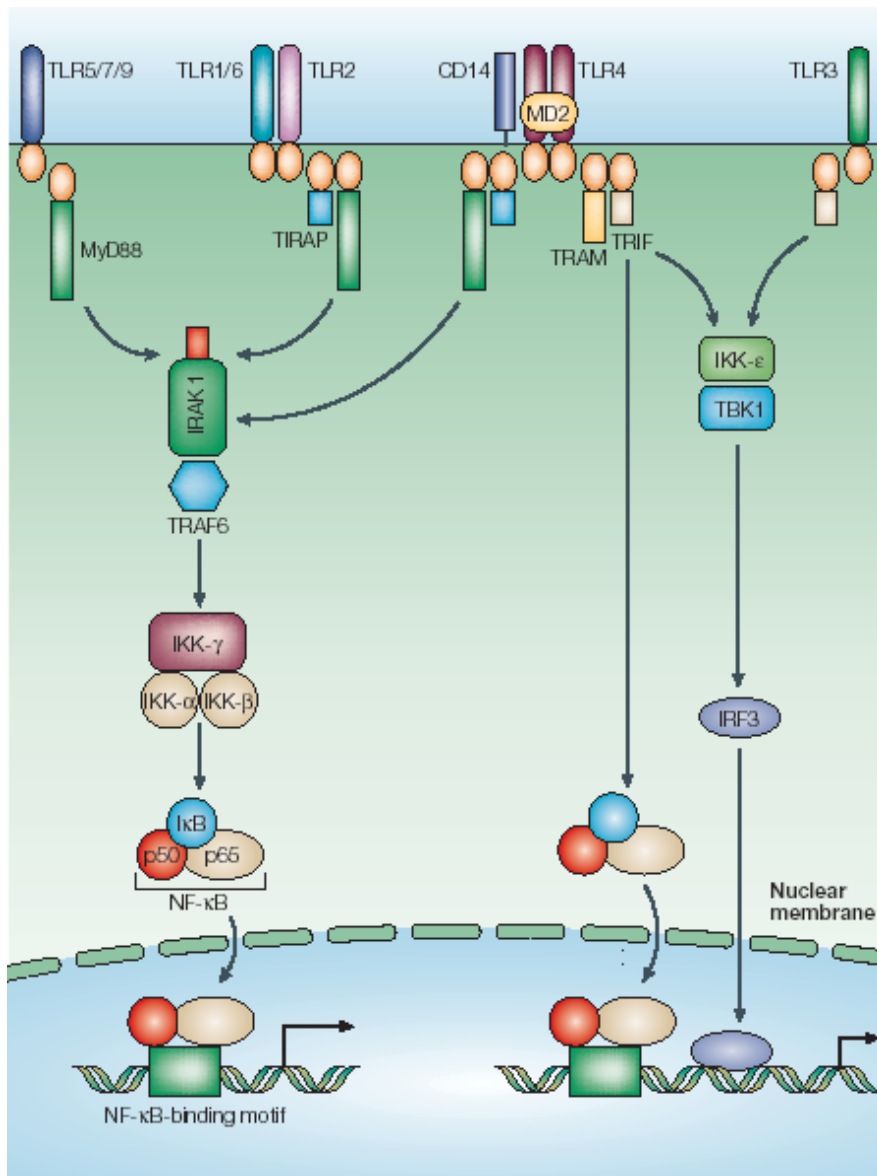


Abb. 4: Signalwege der Toll-like-Rezeptoren<sup>2</sup>

### 1.4.3 Negative Regulation der TLR-Signaltransduktion

Am Ende des TLR-Signalweges steht die Freisetzung von NF $\kappa$ B, das durch Hochregulation von Genen zur vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Cytokine führt. Werden diese in großen Mengen freigesetzt, so können sie ernsthafte systemische Funktionsstörungen, die mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden sind, auslösen. Der TLR4-Ligand LPS kann beispielsweise einen schweren endotoxischen Schock hervorrufen. Um das Risiko einer solchen überschießenden Reaktion zu minimieren, existieren die TLR-vermittelte Immunantwort regulierende Mechanismen.

Zu den negativ regulierenden Proteinen gehört IRAK-M, dessen Expression auf Makrophagen und Monozyten beschränkt ist. Biochemische Analysen haben ergeben, dass IRAK-M, das keine Kinase-Aktivität besitzt<sup>49</sup>, die Formierung des IRAK1-TRAF6-Komplexes verhindert<sup>52</sup>.

Ein weiteres solches Protein stellt SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) dar. Es gehört zur Familie der SOCS-Proteine, die durch Cytokine induziert werden und Cytokin-Signalwege negativ regulieren<sup>122</sup>. SOCS1 interagiert mit IRAK1, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch unklar<sup>76</sup>. Dass es sich mit Sicherheit um einen TLR-Signalmodulator handelt, konnte anhand von SOCS1-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden, die eine verstärkte Anfälligkeit bezüglich eines LPS-induzierten endotoxischen Schocks zeigten<sup>76</sup>.

Eine splice-Variante von MyD88, MyD88s genannt, ist ebenfalls an der negativen Signalregulation beteiligt. MyD88s ist nicht in der Lage, an IRAK4 zu binden, IRAK1 wird nicht phosphoryliert und somit bricht die Signalkaskade an dieser Stelle ab<sup>16</sup>.

Zusätzlich zu den genannten cytoplasmatischen Molekülen existieren noch membrangebundene, eine TIR-Domäne enthaltende Regulatoren wie SIGIRR (*single immunoglobulin IL1-receptor related molecule*) oder ST2. Die negativ regulierende Wirkung dieser beiden Proteine wurde erst vor Kurzem entdeckt und soll bei SIGIRR auf der kurzzeitigen Wechselwirkung mit IRAK1 und TRAF6 beruhen<sup>109</sup>. Für ST2 wird eine Interaktion mit MyD88 und TIRAP angenommen<sup>15</sup>.

#### 1.4.4 TLR-Expression

Nicht jeder Zelltyp exprimiert TLRs in gleichem Maße, oder anders gesagt, nicht jeder TLR kommt bei jeder Zelle vor<sup>123</sup>. So lassen sich die Toll-like-Rezeptoren grob in drei Gruppen einteilen: Die mehr oder minder ubiquitär, die eingeschränkt nur bei bestimmten Zelltypen und die ausschließlich auf ganz speziellen Zellen vorkommenden TLRs<sup>75</sup>. Besonders hoch ist die TLR-Vielfalt und -Expressionsdichte auf Zellen des mononukleären phagozytären Systems. Zu den bei fast jeder menschlichen Zelle nachzuweisenden TLRs gehört TLR1<sup>75</sup>. Zur zweiten Kategorie gehören TLR 2 und TLR 4-10, die besonders von Monozyten, DCs, T- und B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert werden<sup>51,74</sup>. Das Vorkommen von TLR3 ist auf DCs und Natürliche Killerzellen beschränkt. TLR3 ist somit der letzten Gruppe zuzuordnen<sup>42,74</sup>.

Während der Differenzierung einer Zelle kann das exprimierte TLR-Muster sich ebenso verändern wie nach der Reifung bzw. nach Antigenkontakt. Stimuli wie Cytokine nehmen darauf weiteren Einfluss.

TLR3 ist beispielsweise erst nach der Differenzierung zu DCs, nicht aber bei Vorläufer-Monozyten nachweisbar. Als eine typische Reaktion auf Antigenkontakt sei die durch LPS bewirkte Hochregulation der Anzahl an TLR2 genannt<sup>74</sup>. Neben LPS führen auch die Cytokine IL-2, IL-15 oder TNF $\alpha$  zur gesteigerten TLR2-Expression<sup>69</sup>.

Unabhängig von diesen Regulationsmechanismen nimmt die Zahl der TLRs mit dem Altern des Organismus generell ab. Hierin kann man eine Ursache für die gesteigerte Infektanfälligkeit älterer Menschen vermuten<sup>87</sup>.

## 1.5 Bakterien

Eine bakterielle Besiedlung stellt für den Menschen unter normalen Umständen keine Gefährdung dar, solange sie sich auf mit der Umwelt in Kontakt stehende Kompartimente begrenzt. Dringen allerdings Bakterien ins weitestgehend „sterile Innere“ unseres Körpers ein, dann verursachen sie ein weites Spektrum an Infektionskrankheiten<sup>107</sup>.

### 1.5.1 Lipopolysaccharid

Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält im Gegensatz zu der grampositiver eine aus Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaute Schicht. Solange diese Moleküle, von denen eine einzelne *E. coli*-Zelle ungefähr die Anzahl von  $3,5 \times 10^6$  enthält<sup>88</sup>, in der Zellwand eingebaut sind, sind sie für das Immunsystem noch nicht zugänglich. Erst bei der Vermehrung, beim Absterben oder bei der Lyse des Bakteriums wird LPS frei<sup>35</sup>. Verschiedene endogene Faktoren wie Komplement können den Aufschluss des Bakteriums und damit die LPS-Freisetzung ebenso verursachen wie einige antimikrobielle Therapeutika<sup>21</sup>. Dann stellt LPS das stärkste pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) gramnegativer Keime dar<sup>107</sup>. Es wirkt als extrem aktives exogenes Pyrogen und kann einen gefürchteten, lebensbedrohlichen endotoxischen Schock auslösen.

Das LPS-Molekül ist aus zwei Einheiten aufgebaut. Die erste und wichtigste ist Lipid A, das aus sechs oder mehr, an zwei phosphorylierte Glucosamine gebundenen Fettsäuren besteht. Experimente mit synthetischem Lipid A haben ergeben, dass dieser Teil des LPS-Moleküls den immunologisch relevanten darstellt<sup>53</sup>. Der zweite Teil ist eine Polysaccharid-Kette, die sich wiederum in einen Kernteil (*core*) und eine O-Antigen (Oligosaccharid-Antigen) genannte Oligosaccharid-Kette gliedert. Der Kernteil ist für ganze Gruppen von Bakterien spezifisch, während die O-Kette von Spezies zu Spezies und von Stamm zu Stamm stark variiert<sup>107</sup>.

## 1.6 Schimmelpilze

Im Bereich der Flora und Fauna nehmen Pilze eine Sonderstellung ein. Aufgrund fehlender Pigmente sind sie nicht zur Photosynthese befähigt und sind deshalb auf organisch gebundenen Kohlenstoff angewiesen. Zusammen mit Bakterien sind sie durch Spaltung niedermolekularer Verbindungen am Erhalt der Fruchtbarkeit des Bodens beteiligt. Wegen des Besitzes eines echten Zellkerns werden Pilze den Eukaryonten zugeschrieben.

Bei den Pilzen wird generell zwischen einzelligen Hefepilzen und vielzelligen Faden- oder Schimmelpilzen unterschieden.

In der Wachstumsphase eines Schimmelpilzes keimen zunächst avitale Sporen zu Hyphen aus, das sind farblose, fadenförmige Zellen, die lediglich 2-10  $\mu\text{m}$  messen. Durch Septen können die Hyphen in einzelne Zellen gegliedert sein, sie können jedoch auch unseptiert vorkommen. Anschließend wachsen und verzweigen sich die Hyphen und es entsteht ein Geflecht aus Pilzfäden, das sogenannte Mycel.

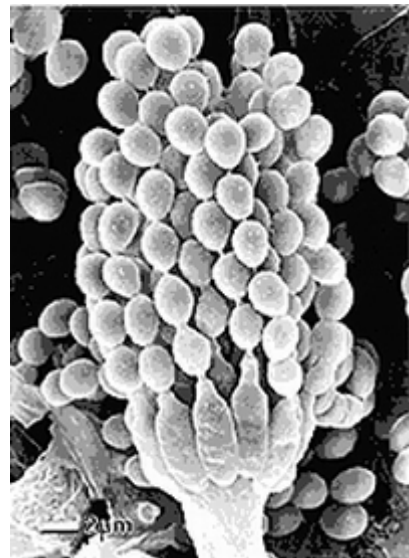
Die Bildung der nicht vegetativen Zellen, der Sporen, kann sowohl auf sexuellem (z.B. Ascosporen) als auch auf asexuellem Weg (z.B. Konidiosporen) erfolgen. Für die Verbreitung der Schimmelpilze sind allerdings größtenteils die asexuellen Konidiosporen, die durch Abschnürung aus konidiogenen Zellen (Phialiden) am Ende einer Hyphe entstehen, verantwortlich. Sporen sind extrem widerstandsfähig und keimen erst unter für sie günstigen Umgebungsbedingungen aus. Da Schimmelpilze aber eher anspruchslos sind, umfassen diese günstigen Bedingungen eine große Spannbreite. Dies gilt sowohl für den Temperaturbereich und den pH-Wert als auch für die Quelle der Kohlenstoffverbindungen. Aus diesem Grund sind Schimmelpilze ubiquitär verbreitet<sup>85</sup>.

Als opportunistische Erreger, Mykotoxinbildner und Allergene erlangen sie humanpathogene Relevanz<sup>40</sup>.

### 1.6.1 *Aspergillus fumigatus*

Die Gattung der Aspergillen umfasst mehr als 200 Arten<sup>40</sup>, von denen aber nur wenige humanmedizinisch relevant sind. *Aspergillus fumigatus* ist dabei für ca. 90% der menschlichen Aspergillosen verantwortlich<sup>56</sup>.

Es handelt sich um einen außerordentlich verbreitet vorkommenden thermotoleranten Pilz mit einem Wachstumsoptimum bei 37 - 43°C. Meist wächst er saprophytisch dort, wo Biomasse zersetzt wird. So kann die Schimmelpilzflora in Bioabfällen bis zu 80% aus *A. fumigatus* bestehen. In Blumenerde von Zimmerpflanzen konnte der Pilz in zwei von drei Fällen nachgewiesen werden<sup>85</sup>. Dies ist der Grund, weshalb Topfpflanzen in vielen Krankenhäusern, vor allem aber in Zimmern immungeschwächter Patienten, verboten sind<sup>20</sup>.



**Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Aspergillus fumigatus*<sup>112</sup>**

Seine Fortpflanzung erfolgt asexuell durch Konidiosporen, die mit ihrer Größe von ca. 2 – 3 µm verhältnismäßig klein ausfallen. Darin kann neben der Bildung von Endotoxinen der Grund für die im Vergleich zu anderen Aspergillus-Arten gesteigerte Humanpathogenität liegen<sup>27</sup>.

Durch das ubiquitäre Vorkommen ist der Mensch ständig im Kontakt mit *A. fumigatus*-Konidiosporen. Bei unbeeinträchtigter Abwehrlage werden eingeatmete oder über kleine Haut-/ Schleimhautdefekte internalisierte Sporen durch das angeborene Immunsystem zuverlässig eliminiert. Bei Immunsupprimierten (z.B. Leukämie-Patienten in der Aplasie, Knochenmarkstransplantierte) oder bei Patienten mit vorgeschädigten Atemorganen (z.B. Tuberkulose, chronische Bronchitis) kommt es dagegen häufig zum Aspergillus-Befall der Lunge. Aufgrund ihrer geringen Größe

dringen die Sporen bis in die Alveolen vor und keimen dort zu einem Mycel aus. Das so entstehende, mehrere cm groß werdende Aspergillom bleibt oft lange Zeit asymptomatisch und imponiert als Zufallsbefund in der Röntgen-Thorax-Aufnahme. Es kann sich auch, besonders bei bestehender Granulozytopenie, eine *Aspergillus*-Pneumonie, also ein diffuser Lungenbefall ausbilden<sup>20</sup>.

Lebensgefährlich wird eine *Aspergillus*-Infektion dann, wenn es zur invasiven Aspergillose, also einer systemischen Ausbreitung kommt<sup>57</sup>. Meist von pulmonalen Herden ausgehend erfolgt die Streuung in andere Organsysteme, wobei der Befall des zentralen Nervensystems die gefürchtetste Variante darstellt<sup>82</sup>. Die Häufigkeit der invasiven Aspergillose hat in den letzten Jahren stetig zugenommen<sup>56,62</sup>, doch sind die Behandlungsmethoden nach wie vor beschränkt. Die Erforschung des genauen Ablaufs der Interaktion von *Aspergillus fumigatus* und dem Immunsystem könnte die Grundlage der Entwicklung zukünftiger Behandlungsmethoden darstellen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Auch heute noch stellen Infektionskrankheiten für den Menschen die größte gesundheitliche Gefahr dar. Weltweit ist jeder dritte Todesfall darauf zurückzuführen<sup>96</sup>. In den westlichen Industrieländern ist zwar die Zahl der an klassischen Infektionskrankheiten verstorbenen Menschen in den letzten 100 bis 200 Jahren deutlich zurückgegangen<sup>118</sup>, jedoch stellen Pilze als Erreger von meist opportunistischen Infektionen insbesondere bei immunsupprimierten Patienten ein steigendes Risiko dar<sup>91</sup>.

So ist es nach wie vor von eminenter Wichtigkeit, durch anhaltende Forschung detailliertere Informationen über den Ablauf einer Immunantwort zu gewinnen.

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, vom angeborenen Immunsystem über Toll-like-Rezeptor 4 in Zusammenspiel mit Co-Rezeptoren erkannt wird<sup>43,70</sup>. Im ersten Teil der Arbeit sollte deshalb die Regulation der Expression dieser LPS-bindenden Rezeptoren nach Stimulation mit LPS auf mRNA-Ebene analysiert



werden. Es interessiert, ob sich dabei Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen aufzeigen lassen.

Nachdem so Erkenntnisse über die TLR-Regulation bei Dendritischen Zellen gewonnen werden konnten, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Interaktion von *Aspergillus fumigatus*-Konidien mit DCs betrachtet. Obwohl in den letzten Jahren über die Beteiligung von TLR2 und TLR4 an der Erkennung dieser Pathogene berichtet wurde<sup>14,77,78</sup>, sind in diesem Zusammenhang noch keine Informationen über die Expressionsregulation der Toll-like-Rezeptoren in der Literatur verfügbar. Neben der Expressionsanalyse der für TLRs codierenden Gene wurde zusätzlich die Expression pro-inflammatorischer Substanzen untersucht. Durch Vergleich mit den Ergebnissen der LPS-Stimulation sollten Rückschlüsse auf die Beteiligung verschiedener TLRs an der Konidien-Bindung gezogen werden können.

## **2. Materialien**

### 2.1 Geräte

	<i>Modellbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Kendro Lab. Products
Gel-Kammer	HORIZON 11 14	BRL, Life Technology
Gel-Scanner	ImageMaster	Pharmacia Biotech
Heizblock	Thermomixer 5437	Eppendorf
Kamera (Gelfotografie)	Axiocam	Zeiss
Magnetic cell seperators	MiniMACS	Miltenyi Biotec
	MidiMACS	Miltenyi Biotec
Mikroskope	Laborlux S	Leitz
	Diavert	Leitz
PCR-Gerät	„GeneAmp“ PCR System 2400	Perkin Elmer
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf
Pipetten (10µl, 100 µl, 1000 µl)	Preference	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann	Neolab
Realtime-PCR-Gerät	LightCycler™ Instrument	Roche GmbH
Sterilbänke	Hera safe	Kendro, Lab. Products
	Lamin Air HBB 2448	Kendro, Lab. Products
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA Works Inc.
Wasserbad	Memmert WB7	Memmert GmbH
Zentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Biofuge 13	Kendro, Lab. Products
	Multifuge 3 S-R	Kendro, Lab. Products
	Cytospin 3	Shandon
	LC Carousel Centrifuge	Roche GmbH

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

	<i>Bezeichnung/Größe</i>	<i>Hersteller</i>
Küvetten	UVette 10/2 mm	Eppendorf
Kryo-Tubes	1,5ml	GreinerMACS MS <sup>+</sup> Biotec
LightCycler-Kapillaren	20µl	Roche GmbH
Separation Columns		Miltenyi Biotec
Pipetten	5ml/ 10ml/ 25ml	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	10µl/ 100µl/ 1000µl	Biozym, Diagnostic GmbH
Plates	24 well/ 96 well	Greiner
	6 well	BD/ Falcon
Reaktionsgefäße	0,5ml/ 1,5 ml/ 2ml Tubes	Eppendorf
	15ml/ 50 ml Tubes	Falcon, Becton Dickinson
Zellkulturbeutel	Vuelife™-Culture-Bags	Cell Genix
	2ml	
Zellkulturflaschen	175ml	Corning Incorporated

## 2.3 Reaktionskits

	<i>Hersteller</i>
AMV1st strand cDNA Synthesis Kit	Roche GmbH
LightCycler Kit (LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes)	Roche GmbH
MinElute PCR-Purification Kit	QIAGEN
PCR Master Mix	Roche GmbH
QIAshredder	QIAGEN
Rneasy Mini Kit	QIAGEN

## 2.4 Reagenzien

	<i>Hersteller</i>
Agarose	SIGMA
Ampuwa – steriles Wasser	Fresenius
CD14-Microbeads	Miltenyi Biotec
DNA-Ladder	Invitrogen GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5%	SIGMA
EDTA 0,5 M (pH 8)	Bio Whittaker
Ethanol 100%	Merck
FCS	SIGMA Cell Culture
FICOLL	Biochrom KG
Gel loading buffer	Invitrogen GmbH
Gelstar	Biozym Diagnostik GmbH
Gentamicinsulfat (Refobacin® 80 mg)	Merck
GM-CSF	Novartis
HBSS Hanks` Balanced Salt (1x)	GIBCO, Invitrogen Corp.
Interleukin 4	R&D Systems
LightCycler™ Primer	Tib Molbiol
LightCycler™ Sonden	Tib Molbiol
LPS	SIGMA
β-Mercaptoethanol	SIGMA
RPMI 1640 Medium (+ Glutamaxx)	GIBCO, Invitrogen Corp.
TAE-Puffer (10x)	Life Technologies
Trypanblau 0,4%	GIBCO, Invitrogen Corp.

### **3. Methoden**

#### 3.1 Zellkulturelle Methoden

##### 3.1.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)

Zur Gewinnung menschlicher peripherer mononukleärer Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells=PBMCs*) wurden sogenannte „buffy coats“ von der transfusionsmedizinischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen herangezogen. Hierbei handelt es sich quasi um ein Abfallprodukt, das bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und Plasmapräparaten aus Vollblutspenden durch Abzentrifugieren der Leukozyten entsteht. Aus diesem Gemisch von PBMCs, Granulozyten, verbliebenen Erythrozyten, Thrombozyten und toten Zellen werden dann mittels Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs isoliert.

Dazu wird der Inhalt eines buffy coats 1:2 verdünnt und vorsichtig über FICOLL<sup>®</sup> geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse haben sich die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen FICOLL<sup>®</sup> und Hanks-Medium / Plasma angesammelt, während Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen zu Boden gewandert sind. Die weniger dichten Thrombozyten sind im Plasma verblieben. Diese Interphase wird vorsichtig abpipettiert und anschließend zweimal gewaschen (nach Zugabe von Hanks-Medium und Zentrifugation bei 1300 rpm für 10 min bleibt das gereinigte Zellpellet zurück). Die so erhaltenen PBMCs werden in Medium (Hanks mit 2mM EDTA und 1% FCS, im folgenden „Waschpuffer“ genannt) aufgenommen und können nun mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert werden.

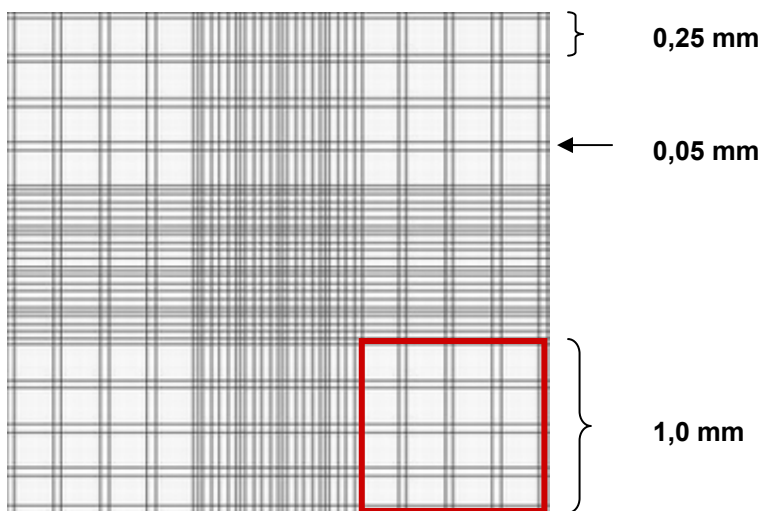
##### 3.1.2 Zellquantifizierung mittels Neubauer-Zählkammer

Bei der Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, auf dessen Oberfläche neun jeweils 1 mm<sup>2</sup> große Quadrate eingraviert sind. Die

vier Eckquadrate sind wiederum in je 16 Kleinquadrate unterteilt. Das angefeuchtete Deckglas wird so aufgelegt, dass „Newtonringe“ zu sehen sind. Erscheint dieses Zeichen der Anziehung zwischen Objektträger und Deckglas, so ist die Tiefe der Zählkammer korrekt auf 0,1mm eingestellt. Das Volumen eines jeden der vier Eckquadrate beträgt nun  $1/10^4$  ml.

Es werden 20  $\mu$ l der Zellsuspension mit Hanks-Puffer 1:10 verdünnt, zusätzlich erfolgt eine 1:2-Verdünnung durch Zugabe von Trypanblau. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen und wird hier zu Vitalitätsprüfung eingesetzt, denn nicht vitale Zellen nehmen im Gegensatz zu vitalen diesen Farbstoff auf. Somit werden angefärbte Zellen bei der Zählung ausgeschlossen.

Von der verdünnten und angefärbten Zellsuspension wird nun ein Tropfen an den Rand des Deckglases gegeben, Kapillarkräfte saugen die Flüssigkeit in die Kammer.



**Abb. 6: Gitternetz einer Neubauer-Zählkammer**

Ausgezählt werden zwei der vier großen Eckquadrate, also jeweils 16 Kleinquadrate (rot markierter Bereich in Abb.6), aus beiden Zählungen wird der Durchschnitt gebildet. Die so erhaltene Zellzahl multipliziert mit  $10^4$  (es wurde ein Volumen von  $1/10^4$  ml ausgezählt) sowie multipliziert mit 20 (Berücksichtigung der beiden Verdünnungen von 1:10 und 1:2) ergibt die Zellzahl pro ml.

### 3.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Die isolierten PBMCs können bei sehr tiefen Temperaturen über einen langen Zeitraum aufbewahrt werden. Bis zu einer Lagerungszeit von zwei Jahren ist eine Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  ausreichend, sollen die Zellen länger gelagert werden, so ist es empfehlenswert, flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) zu verwenden<sup>84,106</sup>. Hierfür werden die gewonnenen Zellen durch Zentrifugation bei 1300 rpm von ihrem Medium getrennt und in gekühltem fetalem Kälberserum (FCS) aufgenommen (0,5 ml pro  $1 \times 10^7$  Zellen). Dieser Zellsuspension wird nun das gleiche Volumen einer RPMI / 20% DMSO-Lösung zugegeben. DMSO als Lösungsmittel soll die Zerstörung der Zellmembran durch Eiskristalle verhindern. Nach Aliquotierung in Kryotubes und kurzem Abkühlen auf Eis können die Zellen nun im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung eingelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wird die Zellsuspension im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad erwärmt und zweimal mit RPMI gewaschen.

### 3.1.4 Zellseparation mittels MACS<sup>®</sup>-System

Die Vielzahl verschiedener Zelltypen der Leukozyten können anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenantigene, den sogenannten CD-Oberflächenmarkern (*cluster of differentiation*), unterschieden werden.

Im Falle der hier zu isolierenden Monozyten macht man sich zu Nutze, dass diese im Gegensatz zu den anderen PBMCs CD14-positiv sind, das heißt CD14-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Gibt man also mit magnetischen Partikeln bestückte, gegen CD14 gerichtete monoklonale Antikörper (CD14-Microbeads) zu einer PBMC-Zellsuspension und bringt diese Lösung in das magnetische Feld einer Trennsäule, so können  $\text{CD14}^+$ -Zellen von  $\text{CD14}^-$ -Zellen getrennt werden. Die nicht gewünschten Zellen durchlaufen die Trennsäule, die

Positivfraktion kann nach Entnahme aus dem Magnetfeld von der Säule eluiert werden.

Hierzu wird die PBMC-Zellsuspension in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 10 min bei 1300 rpm pelletiert, der Überstand danach komplett abgenommen. Das Pellet wird in 80 µl Waschpuffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen gelöst. Für die selbe Zellzahl werden nun 20 µl CD14-Microbeads zugegeben, es folgt eine 15-minütige Inkubation bei 8°C, während der die Antikörper an die CD14-positiven Zellen binden. Anschließend werden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen.

In der Zwischenzeit wurde das aus Ständer, Magnet und MACS-MS<sup>+</sup>-Trennsäule bestehende MACS<sup>®</sup>-System gerichtet (Abb. 7), die Säule mit 3ml kaltem Waschpuffer vorgespült.

Das gereinigte Zellpellet wird in 0,5ml Waschpuffer aufgenommen und das gesamte Volumen auf einmal auf die vorbereitete Säule gegeben. Dabei sollte die Gesamtzellzahl pro Säule  $2 \times 10^8$  nicht überschreiten<sup>114</sup>.

Nach dreimaligem Spülen mit jeweils 3 ml Waschpuffer befinden sich nur noch die magnetisch gebundenen Monozyten in der Trennsäule. Nach Entnahme aus dem Magnetfeld und Zugabe von 2 ml Waschpuffer können die positiv selektierten Zellen mit einem Stempel aus der Säule gedrückt werden. Ein Aliquot wird mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt (3.1.2).



Abb. 7: MACS<sup>®</sup>-System

### 3.1.5 Generierung von Dendritischen Zellen

Bei den aus dem buffy coat separierten CD14<sup>+</sup>-Monozyten handelt es sich um die im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen ortsständiger Dendritischer Zellen.



Auch in vitro lassen sich Dendritische Zellen aus Monozyten generieren. Dazu werden in 6-Well-Mikrotiterplatten pro Well  $3 \times 10^6$  Zellen in 3 ml RPMI / 10% FCS ausgesät. Zur Verhinderung bakterieller Kontamination ist dieses Medium mit Gentamicin, einem Aminoglykosid-Antibiotikum mit breitem Wirkspektrum, versetzt (120 mg/l). Nach Zugabe von GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (1000 ng/ml) erfolgt die Inkubation bei 37°C und fünfprozentiger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank für sieben Tage.

Alle 48 Stunden wird ein Mediumswechsel durchgeführt. Jedem Well wird hierzu 1 ml entnommen, die mitentfernten Zellen durch zehnmünütige Zentrifugation bei 1300 rpm pelletiert und im gleichen Volumen RPMI / 10% FCS wieder aufgenommen. Bevor diese Zellsuspension wieder zurück zur Kultur gegeben wird, müssen noch die Cytokine GM-CSF und IL-4 in gleicher Menge wie zuvor zugefügt werden.

Nach einer Woche können die unreifen Dendritischen Zellen geerntet werden. Um die adhärennten Zellen möglichst vollzählig von der Mikrotiterplatte zu lösen, werden die Platten für zehn Minuten auf Eis gestellt und mehrfach mit RPMI gespült. Die gewonnenen Zellen werden gezählt (3.1.2), überschüssige können eingefroren werden (3.1.3).

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Präparation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Die Präparation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. I. B. Autenrieth) in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. Ulrike Schumacher von Herrn Dipl. Biochem. Ziad Haddad durchgeführt.

Ca. 20 µl einer *A. fumigatus* Stammsuspension werden auf eine Sabouraud-2%-Glucose-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C für vier bis fünf Tage inkubiert. Nach Ausbildung dichter, dunkelgrüner Kolonien müssen die Konidien von der Oberfläche abgelöst werden, was durch Besprühen mit PBS / 0,01%

Tween erreicht wird. Die gelösten Konidien werden von der Agar-Platte in ein Eppendorfcup überführt, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (3.1.2) quantifiziert und durch fünfminütige Zentrifugation bei 9000 rpm pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes können die Konidien in RPMI-Medium gelöst werden.

### 3.2.2 Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit Lipopolysaccharid

In 6-Well-Mikrotiterplatten werden pro Well  $1,5 \times 10^6$  unreife Dendritische Zellen (iDCs / *immature dendritic cells*) in 2 ml Medium (RPMI / 10% FCS), das wie unter 3.1.5 beschrieben mit Gentamicin versetzt ist, aufgenommen. Die Stimulation erfolgt durch Impfen dieser Lösung mit 2  $\mu\text{g}$  LPS pro Well, woraus sich eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ergibt. Die Inkubation findet bei 37°C und fünfprozentiger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt, danach folgt die RNA-Extraktion (3.3.3).

### 3.2.3 Stimulation von Monozyten mit Lipopolysaccharid

Die Stimulation von Monozyten erfolgt nicht in 6-Well-Mikrotiterplatten, sondern in Vuelife™-Culture-Bags (2 ml). Dies erleichtert das Auswaschen der Zellen, die im Vergleich zu DCs eine stärkere Adhärenz zum Kulturgefäß aufweisen. Zellzahl, Volumina und Konzentrationen entsprechen denen der DC-Stimulation mit LPS.

### 3.2.4 Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit *A. fumigatus*-Konidien

Jeweils  $1 \times 10^6$  iDCs werden zusammen mit  $2 \times 10^6$  *A. fumigatus*-Konidien, also bei einem Konidien-Zellen-Verhältnis von 2:1, in 2 ml Medium (RPMI / 10% FCS plus Gentamicin) im Well einer 6-Well-Platte bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> für 1 bis 9 Stunden inkubiert. Danach folgt wiederum die RNA-Extraktion (3.3.3).

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Sequenzen verschiedenster Längen, d.h. mit unterschiedlicher Anzahl an Basenpaaren (*basepairs* / *bp*), können mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Außerdem kann man mit dieser Methode die Länge einer bestimmten Sequenz unter Verwendung eines bp-DNA-Markers abschätzen und so Amplifikate unspezifisch nachweisen.

Hierzu werden 2 %ige Agarosegele verwendet: 2 g Agarose werden zusammen mit 100 ml 1x TAE-Puffer erhitzt (Zusammensetzung TAE-Puffer: Essigsäure 0,1 M; Tris (pH 7,5) 2 M; EDTA 2 M). Nach Zugabe von 10 µl Gelstar wird das flüssige Gel in die Elektrophoresekammer gegossen und für ca. 20 min bis zum vollständigen Auspolymerisieren abgekühlt. Gelstar hat zum einen DNA-interkalierende Eigenschaften, zum anderen lässt es sich durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz anregen.

Von der aufzutrennenden Probe werden 10 µl mit 2 µl *loading buffer* gemischt und in eine der Taschen des Agarosegels überführt (Zusammensetzung *loading buffer*: Tris (pH 7,5) 50 mM; EDTA 50 mM; Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,5%; Bromphenolblau 0,1%). In einer zusätzlichen Spur läuft ein 100bp-DNA-Marker mit.

Nach Anlegen einer Spannung (80 bis 100V) wandern die beim basischen pH-Wert des Laufpuffers negativ geladenen Nukleinsäuren nun je nach Größe unterschiedlich schnell durch das Molekularsieb des Agarosegels zum Pluspol, der Anode des elektrischen Feldes<sup>11</sup>. Anschließend wird das Gel im Gel-Scanner bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 320 nm fotografiert und kann ausgewertet werden.

### 3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und cDNA

Die Konzentration von Nucleinsäuren in einer Probe kann photometrisch bestimmt werden. Polymere Nucleinsäuren absorbieren das Licht maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm, der Grad der Absorption  $A$  wird vom Photometer gemessen. Unter der Berücksichtigung, dass für  $A_{(260\text{nm})}=1,0$  die Konzentration der dsDNA 50  $\mu\text{g/ml}$ , der ssDNA 37  $\mu\text{g/ml}$  und die der RNA 40  $\mu\text{g/ml}$  beträgt<sup>111</sup>, lässt sich daraus die Nucleinsäurekonzentration der Probe errechnen. (Beispiel: Bei der Konzentrationsbestimmung von dsDNA ergibt sich aus  $A_{(260\text{nm})}=0,15$  eine Konzentration von  $0,15 \times 50\mu\text{g/ml} = 7,5 \mu\text{g/ml}$ ). Des Weiteren kann mit Hilfe der photometrischen Messung ein Rückschluss auf den Reinheitsgrad der untersuchten Probe gezogen werden. Hierfür bildet man den Quotienten aus  $A_{(260\text{nm})}$  und  $A_{(280\text{nm})}$ , der bei reiner DNA 1,8 und bei reiner RNA 2,0 beträgt<sup>111</sup>.

Für die Messung der einzelnen Proben wird jeweils ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  eingesetzt, das sich aus 1  $\mu\text{l}$  Probe und 99  $\mu\text{l}$  aqua dest. zusammensetzt. Sowohl die Umrechnung von Absorption in Konzentration als auch die Berücksichtigung der Verdünnung wird vom verwendeten Photometer automatisch vorgenommen.

### 3.3.3 RNA-Extraktion

Zur Extraktion von RNA aus Dendritischen Zellen wird der RNeasy-Mini-Kit der Firma *Qiagen* eingesetzt.

Hierzu werden die Zellen eines Ansatzes durch fünfminütige Zentrifugation bei 5400 rpm pelletiert. Durch Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (mit 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol pro 1 ml) und Zentrifugation in einer QIAshredder-Säule für 2 min bei 13000 rpm wird das Zellmaterial lysiert und homogenisiert. Dieser RLT-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat und bewirkt neben der Lysierung auch noch die Inaktivierung von Rnasen<sup>116</sup>.

Zur Herstellung optimaler Bindungsbedingungen werden dem Lysat 350  $\mu$ l 70%iges Ethanol beigemischt, bevor es auf die RNeasy-Spinsäule überführt wird. Während einer 15-sekündigen Zentrifugation bei 10000 rpm bindet die enthaltene RNA an eine sich in der Säule befindende Silicagel-Membran, dem eigentlichen Herzstück dieses Verfahrens. Es folgen drei Waschschriffe, ein erster mit 700  $\mu$ l RW1-Waschpuffer 15 sec lang bei 10000 rpm, dann zwei weitere mit jeweils 500  $\mu$ l RPE-Waschpuffer für 15 bzw. 120 sec. Mit 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser wird die gebundene RNA durch einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm aus der Säule eluiert. Die gewonnene RNA-Lösung wird bis zur weiteren Verarbeitung im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Tiefkühlschrank eingelagert.

### 3.3.4 Reverse Transkription

Für die quantitative qRT-PCR wird als Template einzelsträngige DNA benötigt. Deshalb wird die aus Dendritischen Zellen extrahierte RNA mit Hilfe des „AMV 1st strand cDNA synthesis Kit“ der Fa. *Roche Diagnostics* in cDNA umgeschrieben.

Dafür werden 8  $\mu$ l RNA-Lösung (3.3.3) mit 2,2  $\mu$ l Oligo-p(dT)-Primer (0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gemischt und für 10 min im auf  $65^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Thermoblock inkubiert. Dabei wird die RNA denaturiert und die Primer können an den einzelnen Strängen binden. Eine anschließende fünfminütige Kühlung auf Eis soll das Divergieren von RNA-Einzelstrang und Primer verhindern. Danach wird jeder Ansatz mit 9,8  $\mu$ l Mastermix (Zusammensetzung siehe Tab. 2) versetzt und im  $42^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad inkubiert. Die im Mastermix enthaltene Reverse Transkriptase bildet nun aus den Desoxynukleotiden die zum RNA-Einzelstrang komplementäre cDNA. Nach 60 min wird die Reverse Transkription durch fünfminütige Inkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$  gestoppt, die Proben werden auf Eis abgekühlt.

Die gewonnene einzelsträngige cDNA ist sehr empfindlich und bedarf deshalb ständiger Kühlung - während der Vorbereitung der RT-PCR durch Lagerung auf Eis, ansonsten durch Einfrieren im Tiefkühlschrank bei -20°C.

**Tabelle 2: Zusammensetzung Mastermix für Reverse Transkription**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration (in 20 µl)
MgCl <sub>2</sub>	4,0 µl	5 mM
10 X Reaction Buffer	2,0 µl	1 X
dNTPs (10 mM)	2,0 µl	1 mM
RNase-Inhibitor (50 Units/µl)	1,0 µl	50 Units
AMV-RT (≥ 20 Units/µl)	0,8 µl	20 Units

### 3.3.5 Vervielfältigung von cDNA-Sequenzen zur Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen

Zur Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen, die bei der qRT-PCR zur Konzentrationsbestimmung notwendig sind, müssen cDNA-Sequenzen des zu untersuchenden Gens mittels konventioneller PCR vervielfältigt werden. Hierfür werden die selben Primer wie bei der qRT-PCR sowie als Reaktionsreagenz „PCR-Master“ der Fa. *Roche Diagnostics* (siehe Tab. 3) verwendet. Als DNA-Template dienen cDNA-Proben, von denen aus Vorversuchen bekannt ist, dass sie die entsprechende Sequenz tragen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung „PCR-Master“ von Roche<sup>117</sup>:**

Inhaltsstoff	Konzentration
Taq DNA-Polymerase	50 Units/ml
Tris-HCl	20 mM
KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
dNTPs	0,4 mM (für jedes der 4 Nukleotide)

In 0,5 ml-Eppendorfcups werden zu 3  $\mu$ l sequenztragender cDNA 47  $\mu$ l Mastermix (Zusammensetzung siehe Tab. 4) gegeben. Die gut verschlossenen Cups werden in den Thermocycler gestellt, nach Einstellung von Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte sowie Wahl der Zyklenzahl kann der Lauf gestartet werden.

**Tabelle 4: Zusammensetzung Mastermix für konventionelle PCR**

Reagenz	Volumen
„PCR Master“	25 $\mu$ l
Aqua steril	20 $\mu$ l
Primer 1	1 $\mu$ l
Primer 2	1 $\mu$ l

Tabelle 5 zeigt die Basiseinstellungen, die jeweils für den ersten Lauf gewählt wurden. Nach abgeschlossener Amplifikation wird das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese analysiert. Der Lauf war dann erfolgreich, wenn bei der UV-Detektion lediglich eine Bande sichtbar wird, das heißt die Zielsequenz spezifisch vervielfältigt wurde. Andernfalls müssen die Einstellungen so lange variiert werden, bis die Elektrophorese eine solitäre Bande zeigt. Bei falsch gewählter Annealing-Temperatur beispielsweise binden die Primer nicht mehr hochspezifisch, was zur Synthese variabler Sequenzen führt.

**Tabelle 5: Basiseinstellungen PCR-Gerät**

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	4 min	
Amplifikation:			
Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	54°C	60 sec	
Elongation	72°C	120 sec	
Extension	72°C	5 min	
Cooling	4°C	$\infty$	

### 3.3.6 Aufreinigen von PCR-Produkten

Nach konventioneller PCR und erfolgreicher elektrophoretischer Kontrolle muss das Amplifikat aufgereinigt werden, das heißt Bestandteile des Mastermixes, die bei der Reaktion nicht verbraucht wurden und sich deshalb noch in der Probe befinden, müssen entfernt werden. Hierfür wird das MinElute PCR-Purification Kit der Firma *Qiagen* verwendet.

40 µl des Amplifikats werden mit 200 µl PB-Puffer gemischt, auf eine MinElute-Spinsäule gegeben und für 60 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Die PB-Pufferlösung enthält Ethanol sowie eine hohe Salzkonzentration und schafft damit optimale Konditionen für die Bindung der DNA an die sich in der Säule befindliche Silicagel-Membran. Zum Auswaschen der zu entfernenden Substanzen wird PE-Waschpuffer (750 µl) zugegeben und zweimal für je 60 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gebundene DNA wird anschließend mit 10 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) durch einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm aus der Säule eluiert. Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt.

### 3.3.7 Quantitative RT-PCR mittels LightCycler™

#### 3.3.7.1 Das Prinzip der qRT-PCR

Das von *K. B. Mullis* entwickelte Prinzip der konventionellen PCR bildet die Grundlage dieses Verfahrens<sup>72,73</sup>. Können dabei DNA-Produkte jedoch lediglich qualitativ nachgewiesen werden<sup>25,31</sup>, so erlaubt die quantitative Realtime-PCR zusätzlich Aussagen über die Ausgangsmenge des amplifizierten DNA-Abschnitts. *Higuchi et al.* legten 1992 den Grundstein für diese Methode, die heute als grundlegendes Werkzeug der modernen Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken ist. Sie mischten dem Reaktionsansatz Ethidiumbromid bei, das, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und mit UV-Licht angeregt wird, fluoresziert. So ist der Grad der gemessenen Fluoreszenz ein Maß für die Menge an sich im Ansatz befindlicher DNA<sup>37,38</sup>. Dieses Prinzip, lediglich mit

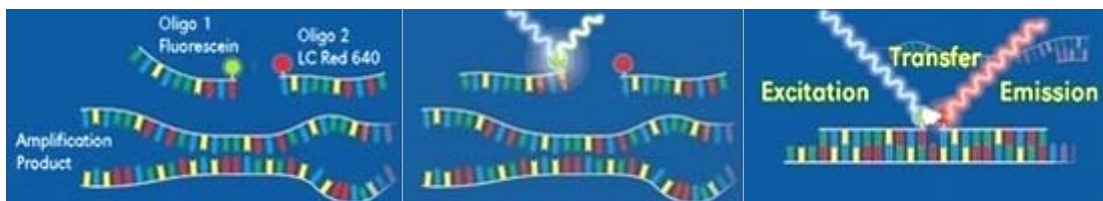


anderen fluoreszierenden Farbstoffen, liegt auch der heutigen modernen qRT-PCR mit Systemen wie dem LightCycler™ der Fa. *Roche Diagnostics* zu Grunde.

### 3.3.7.2 Verwendete Detektionsmethode

Zur Detektion der vervielfältigten Sequenzen werden Hybridisierungs-Sonden eingesetzt, was die hochspezifische Quantifizierung von PCR-Produkten bei gleichzeitiger kontinuierlicher Beobachtung der PCR-Reaktion erlaubt.

Primerdimere und unspezifische Produkte werden dabei im Gegensatz zu anderen Detektionsmethoden nicht miterfasst. Zwei für den zu untersuchenden DNA-Abschnitt spezifische und mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen (Fluorescein, LC Red 640) markierte Sonden werden in ihrer Sequenz so gewählt, dass sie im Abstand von nur 1 bis 5 Basenpaaren voneinander an das Amplifikat binden können<sup>117</sup>. Kommt es zur Anregung des ersten Farbstoffes (Fluorescein), so erfolgt nur dann eine Detektion, wenn die zweite Sonde in unmittelbarer räumlicher Nähe (Abstand von max. 5 bp) zur ersten gebunden hat, denn nur dann findet ein *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) vom ersten auf den zweiten Farbstoff statt. Das durch den Energie-Transfer angeregte LC Red 640 emittiert rotes Licht, das vom System einmal pro Zyklus nach dem Annealing der Primer (zu diesem Zeitpunkt haben die Sonden an die Ziel-DNA gebunden) detektiert wird. Ungebundene Sonden emittieren auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe und des damit fehlenden Energie-Transfers kein Licht und lösen somit auch kein Signal aus.



**Abb. 8: Prinzip des FRET bei der Detektion von DNA mittels Hybridisierungssonden<sup>113</sup>: Das vom System detektierte rote Licht wird erst nach Bindung beider Sonden in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander emittiert**

In Tabelle 6 sind die in der qRT-PCR mit dem LightCycler™ eingesetzten Hybridisierungs sonden sowie ihre jeweiligen Basensequenzen aufgelistet.

**Tabelle 6: Eingesetzte Sonden und ihre Basensequenzen**

Sonde	Basensequenz
CD14 FL	5'- GAAATCTTCATCGTCCAGCTCACAAGG - Fluorescein
CD14 LC	5'- Red640 - TCTGGCGTGGTTCGCAGAGACG
IL12p40 FL	5'- GGTCCCTCACCTGTGACACCCCTGA - Fluorescein
IL12p40 LC	5'- Red640 - AAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACC
MCP1 FL	5'- CCACAACCCAAGAATCTGCAGCTAAC - Fluorescein
MCP1 LC	5'- Red640 - TTTTCCCCTAGCTTTCCCCAGACAC
NFκB FL	5'- TCTGGGGATACTTAATAATGCCTTCCG - Fluorescein
NFκB LC	5'- Red640 - CTGAGTCCTGCTCCTTCCAAAACACTT
PTX3 FL	5'- CTCTCTCATCTGCGAGTTCTCCAGCATGATG - Fluorescein
PTX3 LC	5'- Red640 - AGAGCTTGTCCCATTCCGAGTGCTCCT
TLR2 FL	5'- CTACAGAGGTGTGTGAACCTCCAGGC - Fluorescein
TLR2 LC	5'- Red640 - CTGGTGCTGACATCCAATGGAATTAAC
TLR4 FL	5'- CCCTTCACCCCGATTCCATTGCT - Fluorescein
TLR4 LC	5'- Red640 - CTTGCTAAATGCTGCCGTTTTATCACG
TLR8 FL	5'- ATGACTCAGTTATTGCAGAGTGCAGCA - Fluorescein
TLR8 LC	5'- Red640 - TCGTCGACTACAGGAAGTTCCCCA
TNFα FL	5'- AACCCCGTCCCCATGCCCC - Fluorescein
TNFα LC	5'- Red640 - CAAAACCTATTGCCTCCATTTCTTTTGGGGAC

### 3.3.7.3 Anwendung des LightCyclers™

In vorgekühlte 20 µl - LightCycler™-Glaskapillaren werden jeweils 4 µg der zu untersuchenden cDNA-Proben (3.3.4) gegeben, danach wird mit sterilem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Von den jeweiligen Standards wurden zuvor Verdünnungsreihen angefertigt, die so eingestellt sind, dass das eingesetzte

Volumen von 10 µl genau eine bekannte, ganzzahlige Zehnerpotenz an Kopien enthält. Anschließend werden 10µl Mastermix (Zusammensetzung siehe Tab. 7) zu jedem Reaktionsansatz pipettiert, die Glaskapillaren verschlossen und ins LightCycler™-Probenkarussell eingesetzt. Mit der LightCycler™ *Carousel Centrifuge* werden die Reaktions-Mischungen auf den Boden der Kapillaren zentrifugiert und Luftblasen beseitigt.



Abb. 9: LightCycler™-Probenkarussell<sup>113</sup>

Tabelle 7: Zusammensetzung Mastermix für qRT-PCR

Reagenz	Volumen	Endkonzentration (in 20µl)
H <sub>2</sub> O (PCR-grade)	2,6 µl	-
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4 µl	3 mM
Forward-Primer (5 µM)	0,5 µl	0,125 µM
Reverse-Primer (5 µM)	0,5 µl	0,125 µM
FL-Sonde (0,3 µM)	1,0 µl	0,015 µM
LC-Sonde (0,3 µM)	1,0 µl	0,015 µM
Taq-Polymerase (10 X)	2,0 µl	1 X

Die bei der quantitativen RT-PCR und bei der konventionellen PCR eingesetzten Primer sowie ihre Basensequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Eingesetzte Primer und ihre Basensequenzen

Primer	Basensequenz
CD14 F	5´- GGAAGACTTATCGACCATGGAG
CD14 R	5´- CCTTGACCGTGTCAGCATAC
IL12p40 F	5´- CTCGTGGCCATATGGGAAC
IL12p40 R	5´- TGGCCAGCATCTCCAAACT

MCP1 F	5'- GCTCGCTCAGCCAGATG
MCP1 R	5'- GCAATTTCCCAAGTCTCTGTA
NF $\kappa$ B F	5'- GCCACCAGCTGGCAGGTA
NF $\kappa$ B R	5'- CTGTACCCCAAGACCTCATAG
PTX3 F	5'- CATCCCCTGAGGACCCCA
PTX3 R	5'- GCCTGCAGCAGCTCGT
TLR2 F	5'- TGTCTTGTGACCGCAATGGTA
TLR2 R	5'- GCTTGAACCAGGAAGACGAT
TLR4 F	5'- GGAGCCCTGCGTGGAGA
TLR4 R	5'- TATGCCCTACTTCAATTGTC
TLR8 F	5'- CAGCCTGGGAAAGGAGACTAA
TLR8 R	5'- TGATTCATTCGTATGTGTGTGATG
TNF $\alpha$ F	5'- CCTGCATCCTGTCTGGAAGTTA
TNF $\alpha$ R	5'- CTGCACCTTCTGTCTCGGTTT

Nach Einsetzen des Karussells in den LightCycler™ wird der Lauf mit dem in Tabelle 9 aufgeführten Temperaturprofil gestartet.

**Tabelle 9: Temperaturprofil der qRT-PCR im LightCycler™**

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	9 min	
Amplifikation:			
Denaturierung	95°C	3 sec	} 45 Zyklen
Annealing	54°C	15 sec	
Elongation	72°C	25 sec	
Melting	95°C	20 sec	
	50°C	20 sec	
	95°C	kontinuierliches Aufheizen (0,2°C/sec) auf 95°C	
Cooling	40°C	30 sec	

### 3.3.7.4 LightCycler™ Ergebnis-Dokumentation und -Auswertung

Die von den fluoreszierenden Farbstoffen emittierten optischen Signale werden von Photohybriden in elektrische Signale umgewandelt<sup>115</sup>, die vom LightCycler™-System direkt an einen angeschlossenen PC, auf dem die LightCycler™-Software installiert ist, übertragen werden. Anhand einer Grafik, in der die während der Annealing-Phase eines jeden Zyklus gemessenen Fluoreszenz-Signale logarithmisch gegen die Zyklanzahl aufgetragen sind, lässt sich der Ablauf der Amplifikation am Bildschirm verfolgen. Erst wenn das Fluoreszenzsignal ausreichend hoch ist und detektiert werden kann, das heißt wenn das PCR-Produkt ausreichend oft amplifiziert wurde, beginnt der Graph der jeweiligen Probe in der Grafik anzusteigen. Je früher dies der Fall ist, desto größer war die Ausgangskonzentration der Target-Sequenz. Durch Anlegen einer Geraden wird der linear ansteigende Teil der logarithmischen Signalkurve bis zum Schnittpunkt mit der Zeit- bzw. Zyklenachse verlängert (Abb. 10).

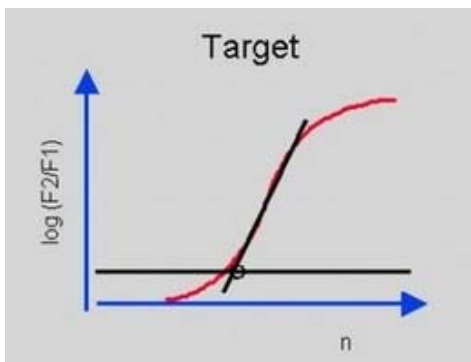


Abb. 10: qRT-PCR-Auswertung<sup>115</sup>: *crossing point* einer Probe

Diese so erhaltenen *crossing points* werden zum Vergleich von Proben mit den Standardreihen und somit zur genauen Quantifizierung der Zielsequenzkonzentration herangezogen. Hierfür erstellt die Software anhand der *crossing points* der eingesetzten Standards mit bekannter Konzentration eine Eichgerade (Abb. 11), die es ermöglicht, jeder Probe durch ihren *crossing point* eine Ausgangskopienzahl zuzuordnen.

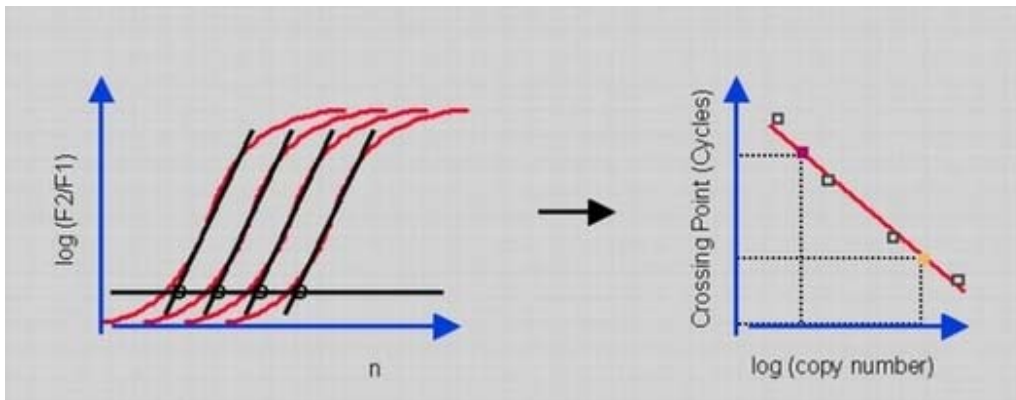
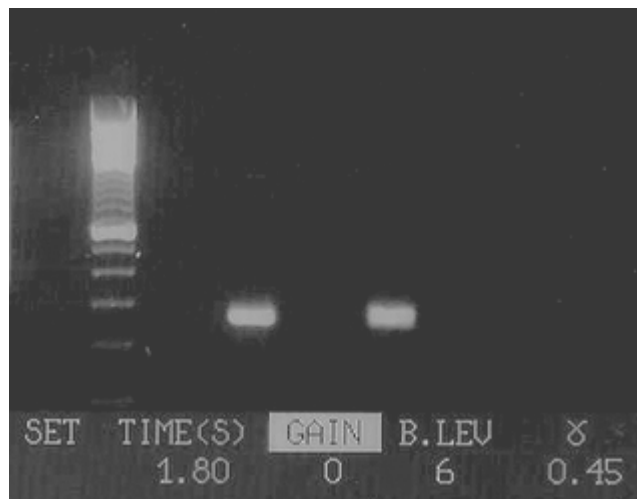


Abb. 11: qRT-PCR-Auswertung<sup>15</sup>: *crossing points* einer Standardreihe und sich daraus ergebende Eichgerade

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Herstellung von Standardverdünnungsreihen

Zur Herstellung der für die Quantifizierung in der Realtime-PCR notwendigen Standardverdünnungsreihen wurden die jeweiligen Sequenzen mittels konventioneller PCR vervielfältigt. Durch die anschließende Gelelektrophorese wurde kontrolliert, ob die Zielsequenz spezifisch amplifiziert wurde. Eine solitäre Bande in der Fotografie des Gels zeigt dies. Als Beispiel ist in Abb. 12 die Gel-Aufnahme abgebildet, die bei der Herstellung des CD14-Standards angefertigt wurde.



**Abb. 12: Fotografie eines Gels mittels UV-Kamera: In der ersten Spur ist der aufgetrennte 100bp-DNA-Marker zu sehen. In Spur 2 und 3 ist jeweils eine Bande bei ca. 280 bp ersichtlich. Bei den am unteren Bildrand eingeblendeten Daten handelt es sich um Belichtungs-Einstellungen der Kamera.**

Die Länge des Amplifikats kann mit Hilfe der NCBI-Datenbank ermittelt werden. Die anhand der Lage der solitären Bande abgeschätzte Länge muss im selben Größenbereich liegen. Im Falle des für CD14 codierenden Abschnittes betrug die anhand der Datenbank ermittelte Länge 277 bp, die in Abb. 12 sichtbaren Banden konnten auf eine Länge von 280 bp geschätzt werden.

Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration der aufgereinigten Probe konnte die Zahl K der sich darin befindlichen Sequenz-Kopien mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden:

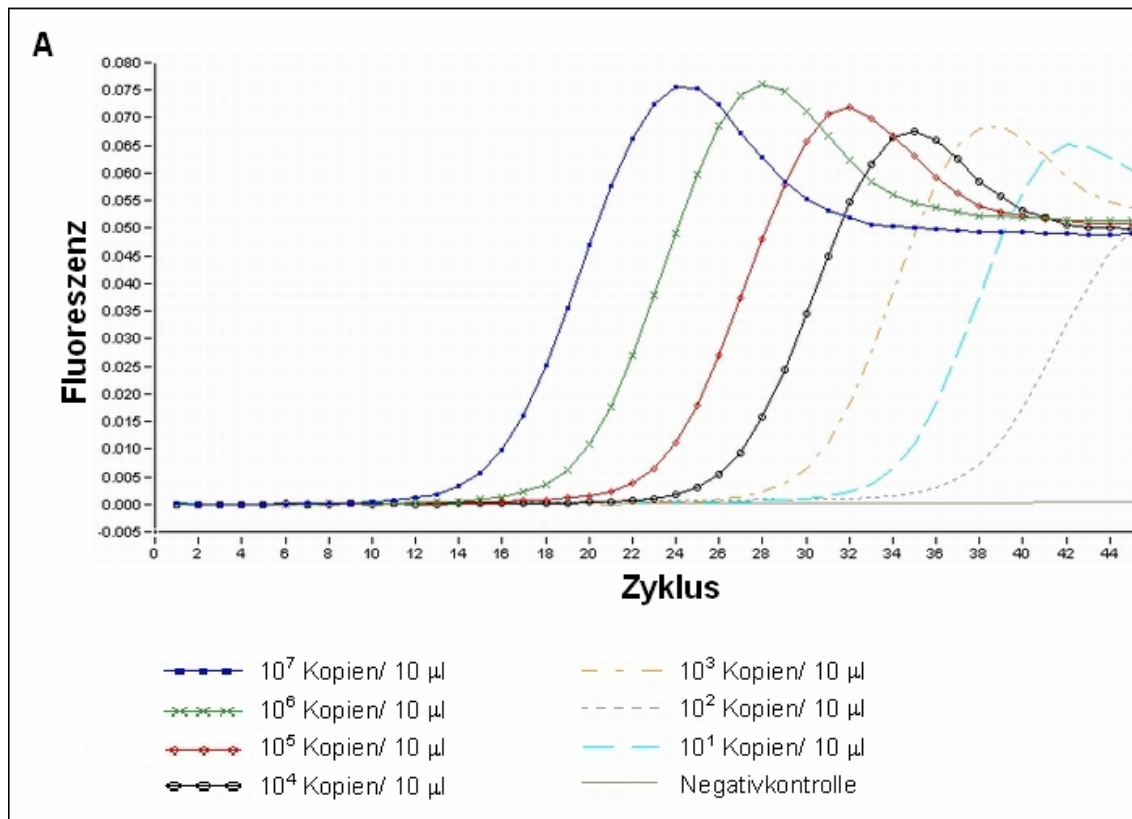
$$K = c \times 9,1 \times 10^{14} \text{ Kopien}/\mu\text{g} \times 1/\text{BP}$$

mit  $c$  = DNA-Konzentration der Probe in  $\text{ng}/\mu\text{l}$

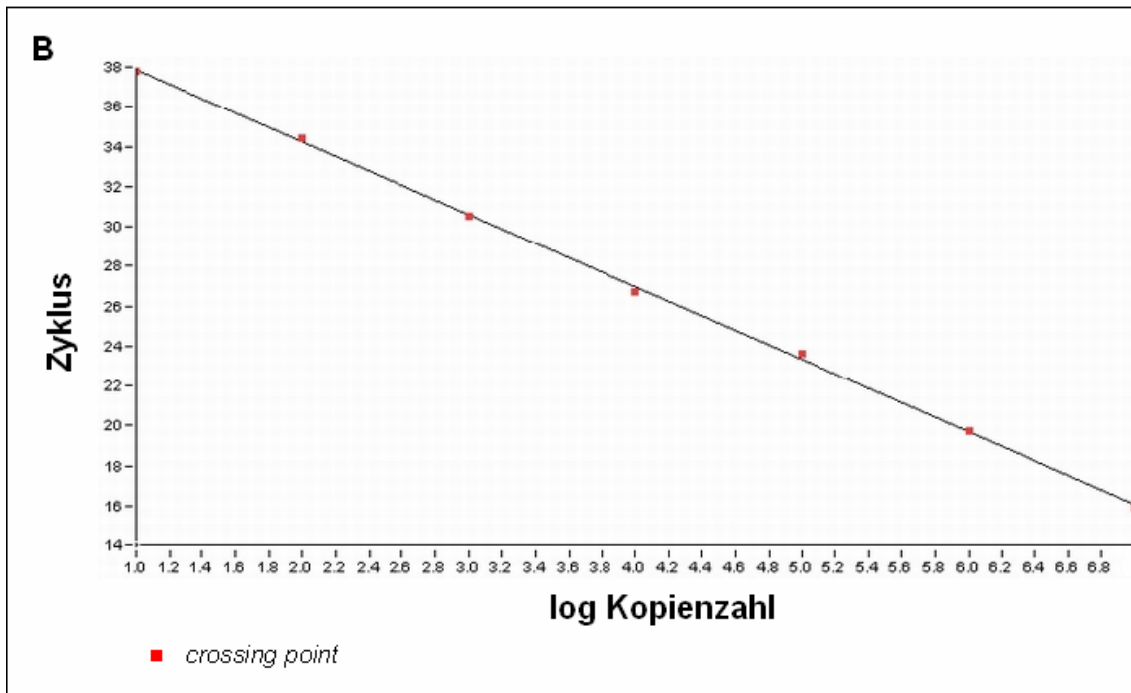
und BP = Anzahl bp pro Sequenz

Die in dieser Formel enthaltene Konstante beruht auf der durchschnittlichen Masse eines Basenpaares.

Von dieser Ausgangsprobe ausgehend wurde durch Verdünnung die Standard-Reihe hergestellt. Anschließend wurde in einem qRT-PCR-Testlauf die Genauigkeit überprüft. Abb. 13 zeigt die Computer-Auswertung des Testlaufs für die CD14-Verdünnungsreihe.







**Abb. 13: Kontrolle einer Standard-Verdünnungsreihe mittels LightCycler™: A: Die einzelnen Kurven stellen den Fluoreszenz-Verlauf jeweils eines Standards mit bestimmter Kopienzahl dar. Je größer die Zahl der Kopien, desto früher beginnt der Graph anzusteigen. B: Alle *crossing-points* liegen auf der Eichgeraden, es kommen keine Ausreißer vor. Somit kann diese Verdünnungsreihe bei zukünftigen Experimenten eingesetzt werden.**

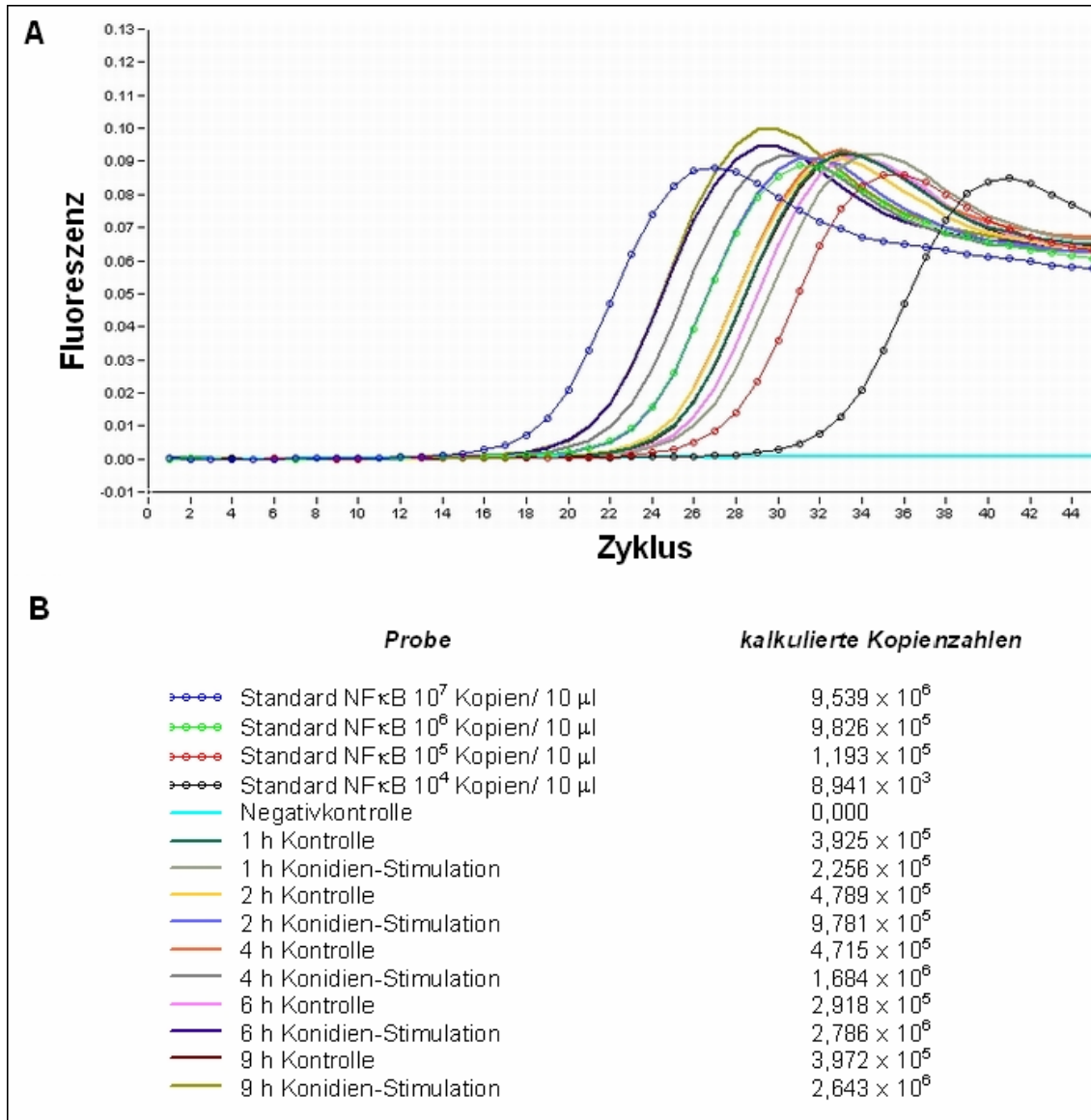
## 4.2 Quantifizierung der untersuchten Gene mittels LightCycler™

Die Expression der untersuchten Gene wurde mittels LightCycler™ unter Mitführung eines externen Standards ermittelt. Die Primer-Sequenzen wurden dabei so gewählt, dass der vervielfältigte cDNA-Abschnitt im Bereich von Spleißstellen liegt. Dadurch kann die Amplifikation von möglicherweise vorhandener Genom-DNA verhindert werden.

Für jeden Zeitpunkt wurde neben der stimulierten Probe eine vom selben Spender stammende und den selben Bedingungen ausgesetzte nichtstimulierte Kontrollprobe untersucht.

In Abb. 14 sind die vom Computer mit Hilfe der LightCycler™-Software errechneten Daten eines qRT-PCR-Laufes zu sehen (als Beispiel wird hier der

Lauf zur Bestimmung der NFκB-Expression bei Proben von Spender 1 dargestellt). Die gemessenen Kopienzahlen können daraus abgelesen werden.



**Abb. 14: Auswertung eines qRT-PCR-Laufs: A: Die sich ändernde Fluoreszenz der einzelnen Proben während der Amplifizierung ist graphisch aufgetragen, die Kurven der Standards sind mit Punkten versehen. B: Zu jeder Probe ist die anhand der Standard-Eichgeraden ermittelte Ausgangs-Kopienzahl angegeben; links ist die Farbe angezeigt, die der Probe in Teil A des Schaubildes zugeordnet ist.**

Die Expression eines Gens zu einem Zeitpunkt wurde relativiert, indem die Kopienzahl der Probe durch die Kopienzahl der jeweiligen Kontrollprobe

dividiert wurde. Somit entsprechen Werte der relativen Expression größer 1 einer Hoch-Regulation, Werte kleiner 1 einer Herunter-Regulation der Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Probe. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel<sup>®</sup> wurden die so gewonnenen Daten in Schaubildern dargestellt.

Auf diese Weise wurden die LightCycler<sup>™</sup>-Analysen sämtlicher Versuche ausgewertet.

### 4.3 Untersuchte Spender

Die bei den Stimulation-Versuchen eingesetzten Zellen stammen alle von Blutspendern des Transfusionszentrums der Tübinger Universitätsklinik und wurden im Zeitraum Dezember 2003 bis Januar 2005 untersucht. Bei den durchgeführten Experimenten wurden Zellen von acht verschiedenen Spendern verwendet, die im Weiteren einheitlich nach folgendem Schema benannt werden:

- LPS-Stimulation von DCs : Spender A, B
- LPS-Stimulation von Monozyten: Spender I, II
- Aspergillus-Stimulation von DCs: Spender 1, 2, 3, 4

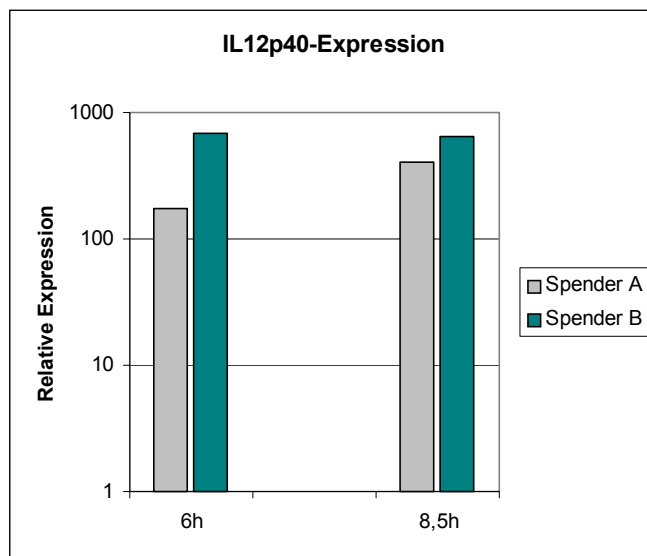
### 4.4 Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS

Jeweils  $1,5 \times 10^6$  in vitro generierte Dendritische Zellen wurden mit 2  $\mu\text{g}$  LPS stimuliert und für sechs bzw. achteinhalb Stunden inkubiert.

#### 4.4.1 IL12p40-Expression

Die Erkennung von LPS durch das angeborene Immunsystem erfolgt über TLR4. Es wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung von NF $\kappa$ B und damit zur Transkriptionsaktivierung pro-inflammatorischer Cytokine

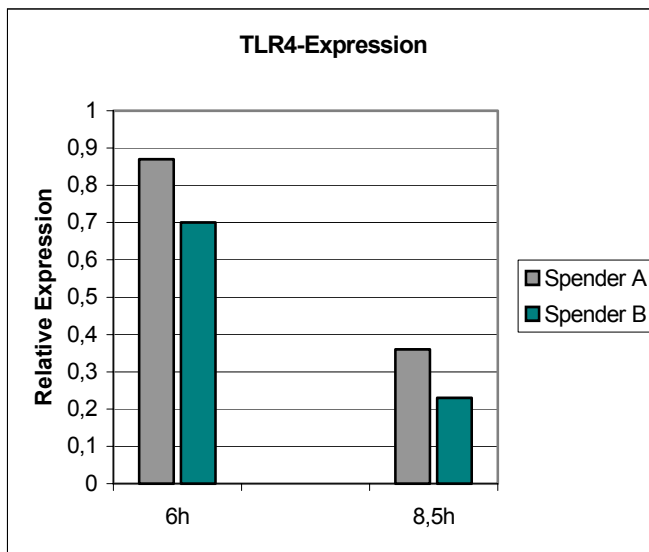
wie IL12p40 oder TNF $\alpha$  führt. Um nachzuweisen, dass die LPS-Stimulation erfolgreich war und bei den Dendritischen Zellen eine Immunantwort initiiert wurde, wurde die mRNA-Expression von IL12p40 bestimmt (Abb. 15). Beide Spender (A, B) reagierten mit einer um zwei bis drei Zehnerpotenzen gesteigerten IL12-Expression, die nach 8,5 h im Vergleich zur 6 h-Messung noch etwas weiter angestiegen war.



**Abb. 15: IL12p40-Expression nach Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS. Die nicht-stimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

#### 4.4.2 TLR4-Expression

Da es sich bei dem aus der Zellwand gramnegativer Bakterien stammenden Lipopolysaccharid nachweislich um einen Liganden des Toll-like-Rezeptors 4 handelt, wurde dessen Expression ermittelt (Abb. 16). Beide Spender reagierten weitestgehend gleich auf die LPS-Stimulation, wobei sich nach 6 Stunden eine um etwa 20% verringerte und nach 8,5 Stunden bereits eine um etwa 70% abgefallene TLR4-Expression zeigte.



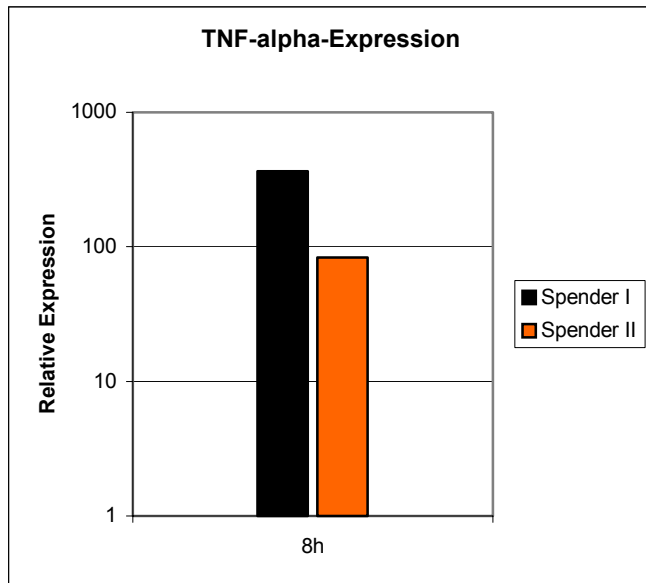
**Abb. 16: TLR4-Expression nach Stimulation Dendritischer Zellen mit LPS. Die nicht-stimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

#### 4.5 Stimulation von Monozyten mit LPS

$1,5 \times 10^6$  Monozyten wurden mit  $2 \mu\text{g}$  LPS stimuliert und anschließend für acht Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Spender dieser Zellen waren dabei nicht identisch mit denen der zuvor untersuchten Dendritischen Zellen.

##### 4.5.1 $\text{TNF}\alpha$ -Expression

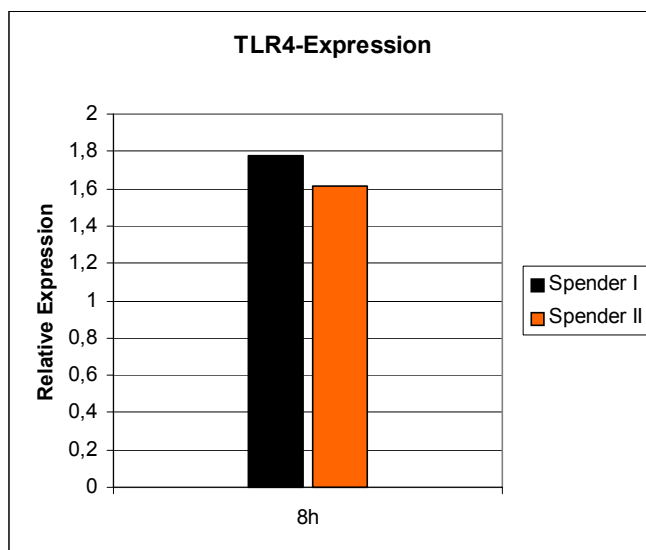
Wie auch bei den LPS-Stimulations-Experimenten von Dendritischen Zellen wurde zuerst durch mRNA-Expressionsmessung eines pro-inflammatorischen Cytokins (in diesem Fall  $\text{TNF}\alpha$ ) nachgewiesen, dass es zu einer simulierten Entzündungsreaktion als Antwort auf den LPS-Kontakt gekommen ist (Abb. 17). Sowohl bei Spender I, als auch bei Spender II war eine deutlich gesteigerte  $\text{TNF}\alpha$ -Expression ersichtlich.



**Abb.17: TNF $\alpha$ -Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation. Die nicht-stimulierte Kontrollprobe wurde einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

#### 4.5.2 TLR4-Expression

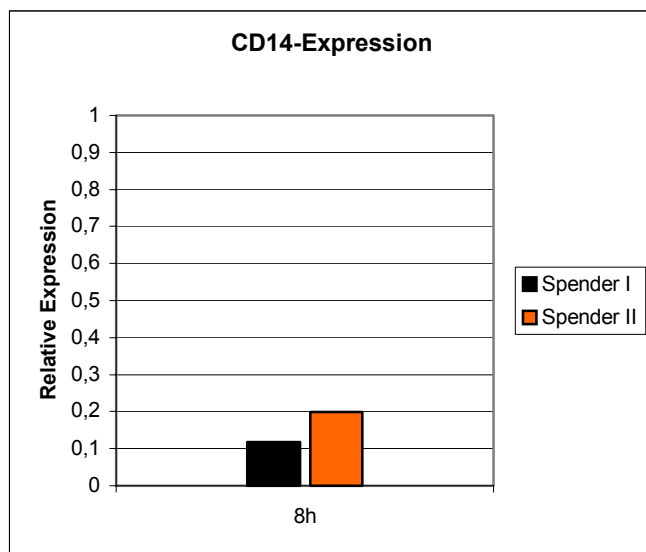
Entsprechend den zuvor beschriebenen Experimenten mit Dendritischen Zellen wurde die TLR4-Expression auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 18). Es interessierte, ob sich Monozyten und DCs in ihrer Reaktion auf bakterielles LPS unterscheiden. Dabei stellte sich heraus, dass Monozyten im Gegensatz zu DCs nicht mit einer reduzierten, sondern mit einer leicht verstärkten Expression von TLR4 auf den Stimulus Lipopolysaccharid reagierten.



**Abb. 18: TLR4-Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation. Die nicht-stimulierte Kontrollprobe wurde einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

### 4.5.3 CD14-Expression

Toll-like-Rezeptor 4 ist nicht alleinig an der Erkennung von LPS beteiligt. Neben dem im Plasma vorkommenden LBP (LPS-bindendes Protein) spielt als membranständiger Co-Rezeptor der für Monozyten charakteristische Oberflächenmarker CD14 eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde neben der Expression von TLR4 auch die von CD14 bestimmt (Abb. 19).



**Abb. 19: CD14-Expression von Monozyten nach LPS-Stimulation. Die nicht-stimulierte Kontrollprobe wurde einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

Interessanterweise wurde bei beiden Spendern (I, II) eine um 80-90% verminderte CD14-Expression auf mRNA-Ebene und damit im Vergleich mit TLR4 eine gegensätzliche Regulation beobachtet.

Auf die Untersuchung des Einflusses von LPS auf die Expression von CD14 bei Dendritischen Zellen wurde verzichtet, da dieser Oberflächenmarker bei der Differenzierung von Monozyten zu DCs fast gänzlich verschwindet und auf DCs nur noch marginal exprimiert wird<sup>108</sup>.

## 4.6 Stimulation Dendritischer Zellen mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien

In den letzten Jahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Interaktion zwischen *Aspergillus fumigatus* und dem angeborenen Immunsystem über Mitglieder der Familie der Toll-like-Rezeptoren beschrieben. Dabei wurde insbesondere den TLRs 2 und 4 ein *A. fumigatus* erkennendes Potential zugesprochen<sup>14,59,78</sup>.

Um dieses Zusammenspiel von *Aspergillus fumigatus* und dem menschlichen Immunsystem zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit jeweils  $1,0 \times 10^6$  aus humanen Monozyten in vitro generierte Dendritische Zellen mit Konidiosporen dieses Pilzes stimuliert. Das Zellen-Konidien-Verhältnis betrug dabei 1:2. Um gerade die beginnende Immunreaktion besser beurteilen zu können, boten sich kurze Inkubationszeiten zwischen einer und neun Stunden an.

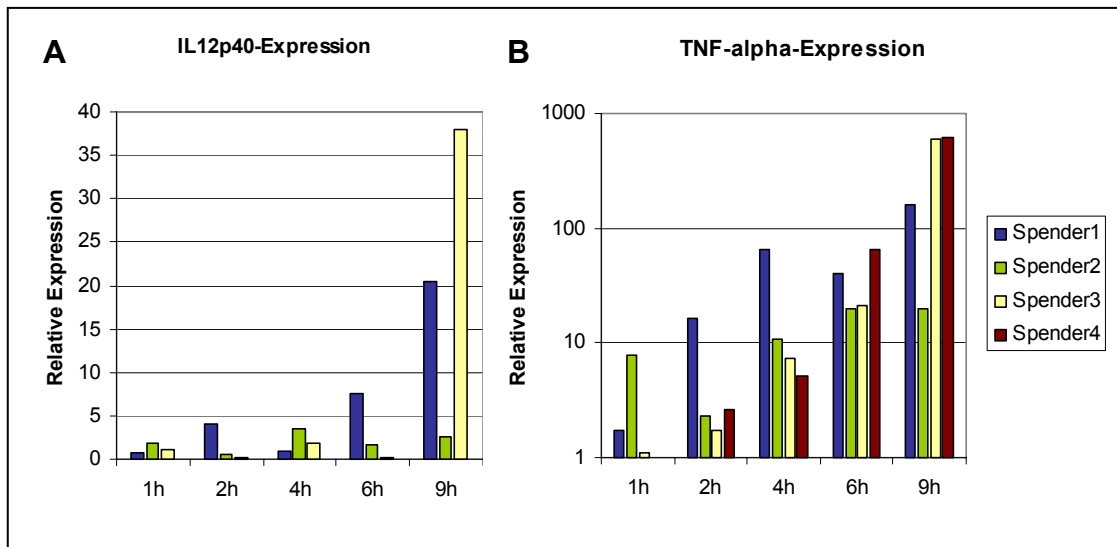
### 4.6.1 TNF $\alpha$ - und IL12p40-Expression

Diente die Bestimmung der TNF $\alpha$ - und IL12p40-Expression bei den vorangegangenen Versuchen in erster Linie dem Nachweis einer stattfindenden Immunreaktion, so sollte hier bei einem Versuchsaufbau mit kleinen Intervallen zwischen den einzelnen Inkubationszeiten zusätzlich der Zeitpunkt der einsetzenden gesteigerten Cytokin-Expression auf mRNA-Ebene erfasst werden (Abb. 20).

Obwohl es unter den vier auf TNF $\alpha$  untersuchten Spendern (1-4) Unterschiede zu verzeichnen gibt, sowohl was den Zeitpunkt des Beginns als auch das Ausmaß der Expressionssteigerung betrifft, können gemeinsam gültige Aussagen getroffen werden. Spätestens nach zwei Stunden hatten die Zellen aller vier Spender eine Reaktion auf die Stimulation mit den Konidiosporen gezeigt, der Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression scheint zum Zeitpunkt von neun Stunden noch nicht abgeschlossen zu sein.



Bei der ergänzend durchgeführten Analyse der IL12p40-Expression zeigte sich eine weitaus geringere und später einsetzende Transkriptions-Aktivierung als bei  $TNF\alpha$ . Ähnlich wie bei  $TNF\alpha$  wies Spender 2 das geringste Ausmaß der Cytokin-Antwort auf. Eine signifikante Hochregulation der Gene für IL12p40 zeigte sich bei Spender 1 und 3 nach sechs bzw. neun Stunden. Spender 4 wurde auf die Expression dieses Gens hin nicht untersucht.



**Abb. 20: IL12p40- und  $TNF\alpha$ -Expression Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien. Die nichtstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

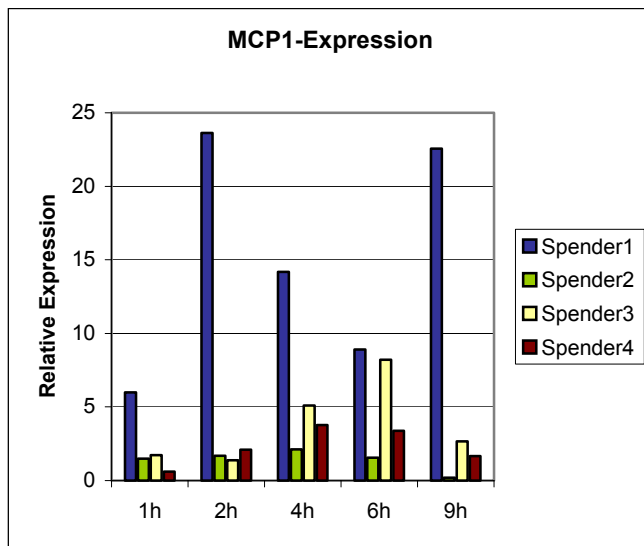
#### 4.6.2 MCP1-Expression

MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) veranlasst Monozyten dazu, die Blutgefäße zu verlassen und in benachbarte infizierte Gewebe einzuwandern<sup>48</sup>. Außerdem ist es an der Stimulierung der  $T_H2$ -abhängigen Abwehr, also an der Bildung spezifischer Antikörper, beteiligt<sup>48,54</sup>.

Ob Dendritische Zellen auf Kontakt mit *A. fumigatus* mit einer verstärkten MCP1-Expression antworten, sollte hier untersucht werden (Abb. 21).

Die ermittelten Daten variieren zwischen den Spendern 1-4, es lässt sich aber trotzdem klar feststellen, dass es bei allen vier zu einer Hoch-Regulation von

MCP1 auf der Ebene der m-RNA gekommen ist. Ein Maximum lässt sich für Spender 2, 3 und 4 nach einer Inkubationszeit von ungefähr sechs Stunden vermuten und die relative Expression liegt dabei in der selben Größenordnung. Spender 1 scheint dagegen früher und in stärkerem Ausmaß auf den Stimulus reagiert zu haben.



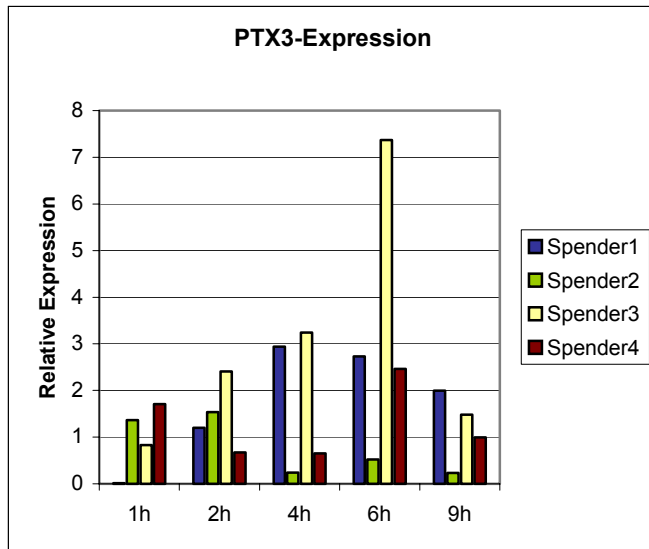
**Abb. 21: MCP1-Expression**  
Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien. Die nichtstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.

#### 4.6.3 PTX3-Expression

Bei dem zur Gruppe der langen Pentraxine gehörenden PTX3 (Pentraxin3) handelt es sich um einen sezernierten mustererkennenden Rezeptor (PRR). PTX3 wirkt opsonierend und erleichtert damit die Erkennung von Pathogenen durch Phagozyten. Des Weiteren führt die Opsonierung zur Aktivierung des Komplementsystems. Neuste Studien schreiben PTX3 eine entscheidende Beteiligung an der Abwehr von Aspergillosen zu<sup>32</sup>. Somit war es naheliegend, auf die Bestimmung der PTX3-Expression in dieser Versuchsreihe nicht zu verzichten (Abb. 22).

Die dargestellten Ergebnisse sind aufgrund der beachtlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern nur sehr schwer einheitlich zu beschreiben. Während die Antwort auf die Konidien-Stimulation von Spender 2 in einer Herunter-Regulation zu liegen scheint, kann für die Spender 1 und 3

und eventuell auch für Spender 4 eine Hoch-Regulation der Expression vom für PTX3 codierenden Gen festgestellt werden.

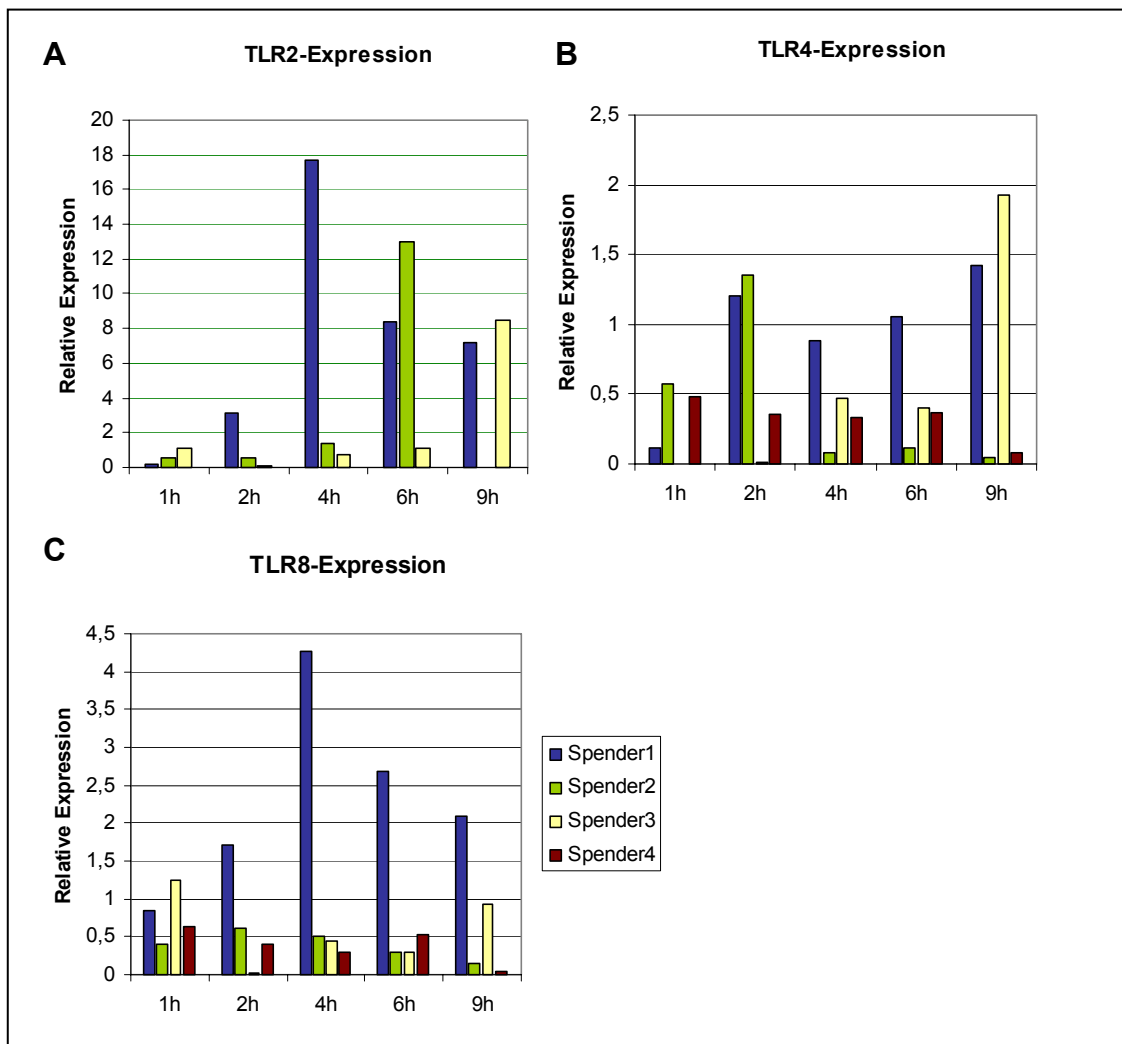


**Abb. 22: PTX3-Expression**  
Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien. Die nichtstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.

#### 4.6.4 Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren

Bis zu diesem Punkt der Arbeit hat sich gezeigt, dass durch die Stimulation Dendritischer Zellen mit Konidiosporen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* in vitro eine Immunreaktion ausgelöst wird. Kommt es zu einer Reaktion, so müssen zuvor die Konidien von den DCs erkannt worden sein. Naheliegender ist dabei die Vermutung, dass daran Toll-like-Rezeptoren beteiligt sind. Verschiedene bisher erschienene Veröffentlichungen sprechen sogar ganz bestimmten Vertretern der TLR-Familie diese Aufgabe zu<sup>14,59,90</sup>.

Die unter den Punkten 4.4 und 4.5 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es bei TLRs nach Kontakt mit einem an sie bindenden Liganden zur Veränderung ihrer Expression kommt. Deshalb sollte hier der Einfluss von *A. fumigatus*-Konidien auf die Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren untersucht werden (Abb. 23).



**Abb. 23: Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren von Dendritischen Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien. Die nichtstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.**

TLR2 ist für das Erkennen verschiedener PAMPs verantwortlich. Dazu zählen neben den von grampositiven Bakterien ausgehenden Peptidoglykanen und Lipoteichonsäuren das von Hefepilzen stammende Zymosan<sup>2</sup>. Für die Erkennung von *A. fumigatus* wird ebenfalls eine Beteiligung dieses Rezeptors angenommen<sup>14,59,90</sup>.

Abb. 23-A zeigt die relative Expression von TLR2, die nach der durchgeführten Stimulation gemessen wurde. Trotz erneut unterschiedlicher und damit schwer zu beurteilender Ergebnisse kann man einen verstärkenden Einfluss der

Konidien-Stimulation auf die TLR2-Expression vermuten. Während bei Spender 1 schon frühzeitig eine gesteigerte Expression ersichtlich ist, ist eine eindeutige Expressions-Veränderung bei Spender 2 und 3 erst nach sechs bzw. neun Stunden nachvollziehbar.

Der aus der Toll-like-Rezeptor-Gruppe 1997 als erstes entdeckte und seither im Zusammenhang mit der LPS-Erkennung sehr weitreichend erforschte TLR4 wird auch als Bindungsstelle von *A. fumigatus* diskutiert<sup>14,59,90</sup>. Da im ersten Teil der Arbeit bereits die Regulation von TLR4 nach Kontakt mit LPS getestet wurde, bot sich die Überprüfung der TLR4-Expression hier besonders an (Abb. 23-B), um anschließend Vergleiche ziehen zu können.

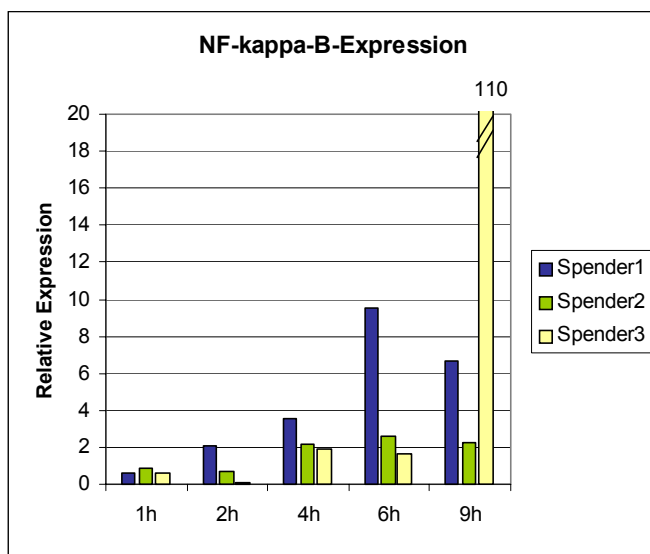
Die von Spender 1 stammenden Zellen scheinen auf den Stimulus nur geringfügig bis gar nicht mit einer veränderten TLR4-Expression geantwortet zu haben. Die relative Expression liegt zu fast jedem Zeitpunkt um 1,0. Abgesehen vom 9-Stunden-Wert bei Spender 3 lassen die Daten auf eine herunter-regulierte Expression bei Spender 2, 3 und 4 schließen.

Es gibt bis heute erst vage Anhaltspunkte dafür, dass TLR8 bei der Interaktion mit *A. fumigatus* eine Rolle spielt<sup>8</sup>. Untersucht und bestätigt ist bisher nur die Bindung von einsträngiger Virus-RNA sowie von synthetischen Imidazolen an diesen Rezeptor<sup>2</sup>. Trotzdem wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe auch die TLR8-Expression betrachtet (Abb. 23-C).

Die gemessenen und im Schaubild dargestellten Werte lassen für die stimulierten Zellen von Spender 2, 3 und 4 eine im Vergleich zu den nichtstimulierten Zellen verringerte Expression von TLR8 erkennen. Im Gegensatz dazu ist die für TLR8 codierende Sequenz bei der untersuchten mRNA von Spender 1 verstärkt exprimiert. Das Maximum dieser Hoch-Regulation liegt dabei 4h nach der Stimulation.

#### 4.6.5 NF $\kappa$ B-Expression

Sollte die Detektion von *Aspergillus fumigatus* tatsächlich über Mitglieder der TLR-Familie ablaufen, so müssten die unter den vorangegangenen Punkten gezeigten veränderten Genexpressionen mit einer ebenfalls veränderten Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B einhergehen. Aus diesem Grund wurden die inkubierten Zellen auf ihre NF $\kappa$ B-Expression getestet (Abb. 24).



**Abb. 24: NF $\kappa$ B-Expression**  
Dendritischer Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien. Die nichtstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Spender wurden zu jedem Zeitpunkt einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.

Die drei untersuchten Spender zeigen alle nach spätestens vier Stunden eine Reaktion im Sinne einer Hoch-Regulation der Expression von NF $\kappa$ B auf mRNA-Ebene. Ein besonders hoher Wert fällt dabei für Spender 3 zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt auf.

#### 4.7 Ergänzende Experimente nach Auswertung der bisher ermittelten Daten

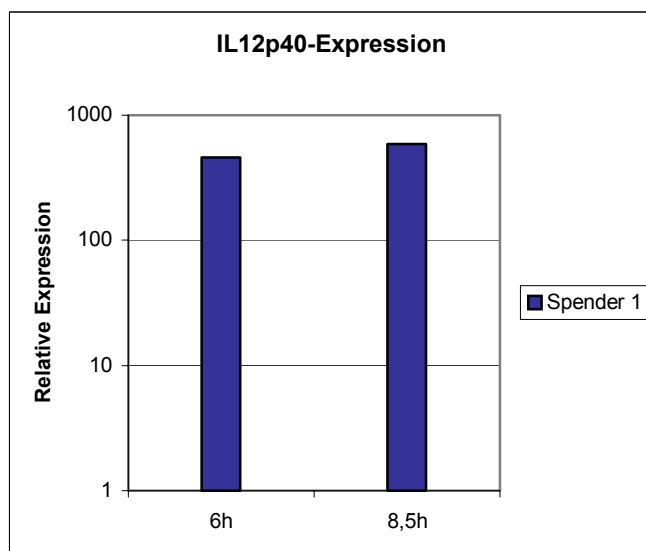
Nachdem die bis zu diesem Punkt der Arbeit gesammelten Ergebnisse betrachtet wurden, folgten einige Versuche, die die Interpretation der erhobenen Daten erleichtern sollen.

#### 4.7.1 Stimulation Dendritischer Zellen von Spender 1 mit LPS

Spender 1 hatte nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien eine weitgehend unveränderte TLR4-Expression gezeigt. Deshalb wurden zuvor kryokonservierte Dendritische Zellen dieses Spenders rekultiviert und analog der Angaben unter 4.4 mit LPS stimuliert.

##### 4.7.1.1 IL12p40-Expression

Die gemessene IL12p40-Expression diente wie bereits unter 4.4.1 beschrieben dem Nachweis einer Immunreaktion (Abb. 25).



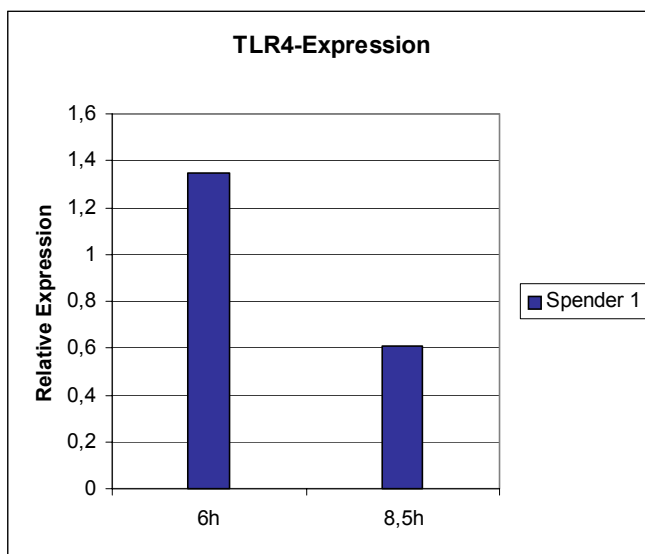
**Abb. 25: IL12p40-Expression**  
Dendritischer Zellen von Spender 1 nach LPS-Stimulation. Die nicht-stimulierte Kontrollprobe wurde einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.

Spender 1 reagierte auf die LPS-Stimulation mit einer etwa 500-fach gesteigerten Expression dieses Interleukins. Dies entspricht in etwa den unter 4.4.1 gemessenen Werten.

#### 4.7.1.2 TLR4-Expression

Es interessierte, ob Spender 1 ähnlich wie zuvor bei der *Aspergillus*-Stimulation auch nach LPS-Reiz eine von der Reaktion anderer Spender abweichende TLR4-Expression zeigt (Abb. 26).

Nach achteinhalb Stunden ist die zu erwartende Herunter-Regulation der TLR4-Expression als Antwort auf den LPS-Kontakt nachvollziehbar. Nach sechs Stunden dagegen ist noch ein leichter Anstieg zu verzeichnen.



**Abb. 26: TLR4-Expression**  
Dendritischer Zellen von Spender 1 nach LPS-Stimulation. Die nicht-stimulierte Kontrollprobe wurde einer relativen Expression von 1 gleichgesetzt.



## **5. Diskussion**

### 5.1 Schutz vor überschießender Immunreaktion nach Stimulation mit LPS durch verminderte Rezeptor-Expression

Wie anhand der Ergebnisse der dargestellten Experimente zu erkennen ist, unterscheiden sich Monozyten und DCs in ihrer Reaktion auf Stimulation mit LPS.

Bei Dendritischen Zellen führt diese Stimulation zur verminderten Expression von TLR4. Die hier gewonnenen Daten stimmen überein mit denen anderer Arbeitsgruppen, die sich mit dieser Thematik auseinandergesetzt haben. Visintin et al. zeigten<sup>108</sup>, dass TLR4 von DCs in den ersten 3 h nach LPS-Kontakt leicht verstärkt, danach aber drastisch reduziert exprimiert wird. Da LPS bekannter Weise über gerade diesen TLR vom Immunsystem erkannt wird<sup>3</sup>, kann man vermuten, dass der beobachtete Effekt als Schutzmechanismus des Organismus zu werten ist. Eine starke Aktivierung des aufgrund der Erkennung von LPS in Gang gesetzten Signalwegs würde durch exzessive Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine letztlich zur Auslösung eines lebensbedrohlichen endotoxischen Schocks führen. Sind DCs nun einer gesteigerten LPS-Konzentration ausgesetzt und wird dies über TLR4 erkannt, so scheint es nach kurzer Zeit zur verringerten TLR4-Expression und folglich auch zu einer reduzierten Anzahl an TLR4 auf der Zelloberfläche zu kommen. Dadurch würden weniger Signale ins Innere der Zelle übermittelt und die Menge ausgeschütteter Cytokine geringer ausfallen, als dies bei gleichbleibender Rezeptorenzahl der Fall wäre. Das Risiko einer ungewollt überschießenden Reaktion, wie sie der endotoxische Schock darstellt, wäre auf diese Art und Weise gesenkt worden.

Von Hoshino et al. wurde gezeigt<sup>43</sup>, dass TLR4-defiziente Mäuse gegen einen durch LPS induzierten septischen Schock resistent sind. In Maus-Makrophagen konnte von Nomura et al.<sup>79</sup> eine Korrelation zwischen der Toleranz gegenüber

einem endotoxischen Schock und der Herunter-Regulation der TLR4-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies unterstützt die These, dass Dendritische Zellen durch Herunter-Regulation ihrer TLR4-Expression das Risiko des Organismus, einen endotoxischen Schock zu erleiden, zu senken versuchen.

Überraschend erscheint daher auf den ersten Blick die Tatsache, dass die bei den Monozyten-Stimulationsversuchen mit LPS erhobenen Daten eine Regulation der TLR4-Expression in die entgegengesetzte Richtung erkennen lassen. Visintin et al. berichten ebenfalls, dass bei der Stimulation von Monozyten mit LPS nach 24 Stunden keine Herunter-Regulierung, im Verlauf der ersten 24 Stunden sogar eine Hoch-Regulierung von TLR4 auf mRNA-Ebene beobachtet wurde. Diesen Sachverhalt solitär betrachtend könnte man zum Schluss kommen, dass beim Einwirken von Lipopolysaccharid auf Monozyten Mechanismen bestehen, die das Entstehen eines endotoxischen Schocks begünstigen.

Deshalb muss man sich nochmals vergegenwärtigen, dass TLR4 an der Erkennung von LPS nicht alleinig beteiligt ist. LPS bindet an das im Serum vorkommende LBP (LPS-bindendes Protein). Der Komplex aus LPS und LBP interagiert mit dem als Oberflächenmarker bekannten Co-Rezeptor CD14 und überträgt das gebundene LPS auf diesen. Erst das an CD14 gebundene LPS kann dann den Toll-like-Rezeptor 4 aktivieren und so die Signalkaskade, die zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führt, ins Rollen bringen<sup>48,50</sup>.

Die unter 4.5.3 präsentierten Ergebnisse lassen erkennen, dass Monozyten auf LPS-Kontakt mit einer Senkung der Expression von CD14 antworten. Lin et al. untersuchten die CD14-Expression in Alveolarmakrophagen nach *Escherichia coli*-Kontakt in vivo und LPS-Stimulation in vitro<sup>60</sup> und stellten fest, dass in beiden Fällen CD14 vermindert exprimiert wurde. Deshalb erscheint es wahrscheinlich, dass bei Zellen, die CD14 Co-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen, die Immunantwort auf einen LPS-Reiz über Regulation eben dieser CD14-Rezeptoren gesteuert wird. Durch Verminderung der Zahl dieser Rezeptoren wird dem drohenden endotoxischen Schock durch überschießende

Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine entgegengewirkt. Monozyten, die kaum CD14 exprimieren, sind bei der Erkennung von LPS auf lösliches CD14 angewiesen. Entzieht man ihnen auch dieses lösliche CD14, so kann LPS nicht mehr mit TLR4 interagieren<sup>70</sup>. Verringert sich also die Zahl der zellgebundenen CD14-Moleküle, so bewirkt dies bei nicht im Überschuss vorhandenem löslichem CD14 eine verminderte Bindung von LPS an TLR4, unabhängig von der Zahl der Toll-like-Rezeptoren.

Es stellt sich nun die Frage, warum Dendritische Zellen den Oberflächenmarker CD14 nur marginal exprimieren und trotzdem adäquat auf eine LPS-Exposition reagieren, beziehungsweise mit der Herunter-Regulation von TLR4 sogar einen Schutzmechanismus gegen eine übermäßige Reaktion benötigen. Die Antwort liegt wohl in der Existenz eines weiteren an der TLR4-Aktivierung durch LPS beteiligten Co-Rezeptors – MD-2.

Die Expression von MD-2 steigt während der Differenzierung von Monozyten zu DCs stetig an<sup>108</sup>. Es wird vermutet, dass MD-2 die verminderte bis fehlende CD14-Expression auf DCs kompensiert.

Die gesehenen Unterschiede in der Reaktion von Dendritischen Zellen und Monozyten auf LPS bezüglich der TLR4-Expression sind somit auf voneinander abweichende Regulationsmechanismen zurückzuführen. Gemeinsam ist jedoch beiden Zelltypen, dass eine Senkung von Rezeptoren einer Überstimulation durch den entsprechenden Liganden entgegengewirkt.

## 5.2 Immunreaktionen gegenüber *Aspergillus fumigatus* unter Beteiligung verschiedener Toll-like-Rezeptoren

Bereits ein bis zwei Stunden nach Beginn der Stimulation Dendritischer Zellen mit Konidien des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* konnte eine immunologische Antwort in Form einer verstärkten Expression des pro-inflammatorischen Cytokins TNF $\alpha$  verzeichnet werden. Kurz darauf beginnt auch der Anstieg der IL12p40-Expression. Pylkkanen et al. konnten in Maus-Makrophagen die maximale Expression pro-inflammatorischer Cytokine auf

mRNA-Ebene sechs Stunden nach Inkubationsbeginn mit nicht hitzegetöteten *A. fumigatus*-Sporen messen<sup>83</sup>. Bei den hier dargestellten Experimenten ist dagegen der Anstieg der Expression nach neun Stunden noch nicht abgeschlossen, es konnte jedoch zweifelsfrei eine durch *A. fumigatus*-Konidiosporen in vitro auslösbare Immunreaktion bei Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Diese Tatsache stimmt mit Ergebnissen von Warris et al. überein, die im ex vivo Experiment mit menschlichem Vollblut konidieninduzierte Cytokin-Anstiege festgestellt hatten<sup>110</sup>.

Neben den bereits erwähnten Cytokinen wurde auch Augenmerk auf MCP1 gelegt. Es sollte untersucht werden, ob die Konidien-Stimulation zur verstärkten MCP1-Expression führt. Bei Makrophagen der Maus wurde dies von Pylkkanen et al. beschrieben. Außerdem wurde bei Mäusen nach intratrachealer Gabe von *A. fumigatus*-Konidien eine erhöhte MCP1-Konzentration in der Lunge gemessen<sup>12</sup>. Wie Abb. 21 zeigt konnte in dieser Arbeit für humane Dendritische Zellen nach Konidien-Kontakt eine Hoch-Regulation der Expression von MCP1 auf der Ebene der mRNA gezeigt werden. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass die Ausschüttung von MCP1 für die Abwehr einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* von entscheidender Bedeutung ist. Von Morrison et al. veröffentlichte Daten lassen den gleichen Schluss zu. Sie beschreiben, dass durch in vivo Neutralisierung von MCP1 mittels Antikörpern bei Mäusen, die an einer invasiven Aspergillose erkrankt waren, eine Verdopplung der Mortalität ausgelöst werden konnte<sup>71</sup>. Auf den Menschen übertragen bedeutet dies, dass der unterschiedlich schwere Verlauf einer invasiven Aspergillose bei verschiedenen Patienten eventuell auf ein unterschiedliches MCP1-Expressionsmuster zurückzuführen ist. Möglicherweise verbirgt sich hinter diesen Erkenntnissen sogar eine zukünftige Behandlungsmöglichkeit einer *Aspergillus fumigatus*-Infektion. Gentechnisch hergestelltes MCP1 könnte den an einer schweren Aspergillose erkrankten Patienten verabreicht und somit das körpereigene Abwehrsystem stimuliert werden.

Des Weiteren wurde als Antwort der DCs auf die Konidien-Interaktion bei drei von vier Spendern eine Hoch-Regulation der Gene für Pentraxin 3 registriert.

PTX3 kann als mustererkennender Rezeptor Konidien binden und wirkt somit opsonierend. Der beobachtete Anstieg der PTX3-Expression lässt auf eine nicht unwichtige Rolle dieses langen Pentraxins bei der Abwehr von Aspergillose schließen. Garlanda et al. wiesen nach, dass PTX3-knockout-Mäuse gegenüber einer invasiven Aspergillose anfälliger sind als Wildtyp-Mäuse<sup>30</sup>. Erst Ende 2004 wurde von Gaziano et al. eine Arbeit publiziert, die erste Ansätze eines potentiellen therapeutischen Einsatzes von PTX3 beinhaltet<sup>32</sup>. Die intranasale oder parenterale Gabe von PTX3 hatte bei Mäusen einen gleichen oder stärkeren prophylaktischen und therapeutischen Effekt bezüglich einer Lungen-Aspergillose wie das als Standard-Therapeutikum bekannte und eingesetzte Amphotericin B<sup>32</sup>. Ähnlich den bezüglich MCP1 getroffenen Überlegungen kann auch für PTX3 ein beim Menschen anwendbarer therapeutischer Ansatz in Erwägung gezogen werden, wobei im Gegensatz zu MCP1 hier bereits wie beschrieben erste Erfolge im Tierversuch nachzuweisen sind.

Den bis hierher gezeigten, durch die Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien ausgelösten Immunreaktionen muss die Erkennung des Pathogens durch die Dendritischen Zellen vorausgegangen sein. Seit geraumer Zeit werden in diesem Zusammenhang Toll-like-Rezeptoren als diejenigen Rezeptoren diskutiert, die Pilzpathogene wie *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* oder *Pneumocystis carinii* erkennen<sup>78,90</sup>. Erste Hinweise in diese Richtung ergaben sich bereits bei der Entdeckung der Toll-Rezeptoren bei *Drosophila melanogaster* Mitte des letzten Jahrzehnts, als bei Toll-Rezeptor-defizienten Fliegen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber einer Aspergillose festgestellt wurde<sup>58</sup>.

Mit Ausnahme von TLR3 kommt es in Folge einer TLR-Aktivierung zur Freisetzung von NF $\kappa$ B<sup>2</sup>. In Abb. 24 ist die veränderte NF $\kappa$ B-Expression dreier Spender nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien dargestellt. Es zeigt sich dabei eine Hoch-Regulation auf mRNA-Ebene. Da es sich bei NF $\kappa$ B um einen Transkriptionsfaktor handelt und da die gesteigerte Expression von TNF $\alpha$ , IL12p40, MCP1 und PTX3 nachgewiesen wurde, überrascht es nicht, dass NF $\kappa$ B verstärkt exprimiert wird. Unter Betrachtung der Signaltransduktionswege

der TLRs (Abb. 4) erhärtet sich außerdem der Verdacht, dass TLRs an der Erkennung von *A. fumigatus*-Konidien beteiligt sind.

LPS, bei dem es sich nachweislich um einen TLR4-Liganden handelt, hatte bei der Stimulation von DCs zu einer verminderten Expression von TLR4 geführt (siehe 4.4.2). Sollten *Aspergillus*-Konidien ebenfalls von TLR4 erkannt werden, so könnte es zu einem vergleichbaren Schutzmechanismus kommen, also ebenfalls zu einer herunterregulierten TLR4-Expression. Genau das konnte bei den unter 4.6.5 beschriebenen Experimenten bei drei von vier Spendern auch beobachtet werden. Somit scheinen sich in dieser Arbeit die Überlegungen mehrerer Arbeitsgruppen zu bestätigen, die *A. fumigatus*-Konidien als TLR4-Ligand sehen<sup>67,77</sup>. Netea et al. fanden heraus, dass Makrophagen von TLR4-knockout-Mäusen auf die Stimulation mit *Aspergillus*-Konidien mit einer geringeren Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine reagierten als die von Wildtyp-Mäusen. Bei der Stimulation mit *Aspergillus*-Hyphen wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Dies lässt vermuten, dass Hyphen im Gegensatz zu Konidien nicht über TLR4 erkannt werden. Netea et al. sehen darin einen möglichen Mechanismus, durch den sich *A. fumigatus* nach der Ausreifung der Sporen der Erkennung durch das Wirts-Immunsystem entzieht<sup>77</sup>.

Neben TLR4 wird in der Literatur von verschiedenen Autoren TLR2 als *A. fumigatus*-Konidien erkennender Rezeptor ins Gespräch gebracht<sup>14,61,77</sup>.

Sowohl Mambula et al., als auch Netea et al. konnten bei Makrophagen von TLR2-knockout-Mäusen nach Stimulation mit *Aspergillus*-Präparationen eine im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Mäusen verminderte Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine messen. Im Gegensatz zu TLR4 wurden hierbei von beiden Arbeitsgruppen keine gravierenden Unterschiede zwischen der Stimulation mit *A. fumigatus*-Hyphen und -Konidien erkannt<sup>61,77</sup>. Man kann deshalb davon ausgehen, dass es sich bei TLR2 um einen *A. fumigatus* erkennenden Rezeptor handelt, unabhängig davon, ob der Pilz in Form avitaler Sporen oder vitaler Hyphen vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von TLR2 auf mRNA-Ebene nach Inkubation Dendritischer Zellen mit *A. fumigatus*-Konidien gemessen (4.6.5). Wie in Abb. 23-A zu sehen ist, wird TLR2 nach einigen Stunden

verstärkt exprimiert. Geht man davon aus, dass wie oben beschrieben TLR2 und TLR4 an der Bindung von *A. fumigatus*-Konidien beteiligt sind, so stellt sich die Frage, warum es bei den beiden Rezeptoren zu unterschiedlichen Regulationsmechanismen kommt: Während die Expression von TLR2 nach Konidien-Kontakt verstärkt ist, ist die von TLR4 vermindert. Zweierlei Überlegungen sind dafür als mögliche Erklärung in Betracht zu ziehen. Zum einen könnte die Signalweiterleitung nach Bindung eines Liganden an TLR4 effektiver sein, als es bei manch anderen Toll-like-Rezeptoren der Fall ist. Visintin et al. untersuchten die Expression verschiedener TLRs im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu unreifen DCs. Dabei fiel der Expressionsrückgang von TLR4 deutlich stärker aus als der von TLR2<sup>108</sup>. Da die starke Reaktion Dendritischer Zellen auf LPS-Stimulation hinlänglich bekannt ist, muss von einer hohen Effektivität der wenigen vorhandenen TLR4-Moleküle ausgegangen werden. Zum Schutz vor einer überschießenden Reaktion bedarf es sogar einer Herunter-Regulation der Anzahl an Rezeptoren. Beim möglicherweise weniger effektiven TLR2-Signalweg könnte dagegen eine Rezeptor-Hoch-Regulation notwendig sein, um eine ausreichende Antwort zu gewährleisten. Als andere mögliche Erklärung für den beobachteten Unterschied wären Angaben von Netea et al. zu nennen, wonach TLR2 in erster Linie die Induktion anti-inflammatorischer Cytokine steuert<sup>78</sup>. Somit könnte die verstärkte TLR2-Expression ebenfalls als Schutzmechanismus gewertet werden, denn die verstärkte Freisetzung anti-inflammatorischer Cytokine würde einer zu starken inflammatorischen Antwort entgegenwirken. Diese These wird unterstützt durch eine Arbeit von Hermoso et al., in der eine gesteigerte TLR2-Expression auf mRNA-Ebene bei Alveolarepithelzellen nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Cytokin  $TNF\alpha$  sowie nach Kontakt mit Glukokortikoiden beschrieben wird<sup>36</sup>. Im Fall der  $TNF\alpha$ -Stimulation könnte es sich um den beschriebenen Mechanismus zum Schutz vor einer überschießenden Entzündungsreaktion handeln. Der auf Glukokortikoid-Kontakt ebenfalls beobachtete Effekt ist möglicherweise als Teil der Wirkung der anti-inflammatorischen Potenz dieser Arzneimittelgruppe zu werten.

Wie unter 4.6.5 dargestellt, wurde zusätzlich die Expression von TLR8 untersucht. Obwohl bisher, wenn überhaupt, nur vage Anhaltspunkte für eine TLR8-Beteiligung in der Literatur zu finden sind, könnten die beobachteten Expressions-Veränderungen als Indiz für eine Bindung von *A. fumigatus*-Konidien an TLR8 angesehen werden. Ähnlich wie bei TLR4 kam es bei drei von vier Spendern durch die *Aspergillus*-Stimulation zu einer reduzierten Expression von TLR8. Da die Beteiligung von TLR4 an der Konidien-Erkennung als relativ gesichert angenommen werden kann<sup>14,77</sup> und es in diesem Zusammenhang zur TLR4-Minderexpression kommt, liegt der Rückschluss von der ebenfalls verminderten TLR8-Expression zur TLR8-*Aspergillus*-Interaktion nicht fern.

Während drei von vier Spendern nach diesem Muster reagierten, zeigten die Zellen eines Spenders dagegen eine deutlich verstärkte TLR8-Expression (siehe Abb. 23-C). Interessanterweise handelt es sich dabei um den selben Spender, der auf die Konidien-Stimulation mit einer weitestgehend unveränderten TLR4-Expression geantwortet hatte. Da dies auf eine defiziente Funktion des TLR4 bei den DCs von Spender 1 schließen lässt, wurden Zellen dieses Spenders nachträglich mit LPS inkubiert (4.7.1). Doch sowohl das sich dabei zeigende IL12p40- als auch das TLR4-Expressionsmuster wiesen auf eine normale TLR4-Funktion bezüglich der LPS-Erkennung hin.

Als Erklärung für die gefundenen Unterschiede bei Spender 1 können deshalb nur ungewisse Hypothesen in Erwägung gezogen werden. So könnte die Erkennung von *A. fumigatus*-Konidien durch TLR4 gestört sein, obwohl eine normale LPS-Bindung stattfindet. Dies würde die unter 4.6.5 dargestellte nicht veränderte TLR4-Expression begründen. Sollte es sich bei TLR8 tatsächlich um einen Rezeptor für *Aspergillus*-Konidien handeln, so wäre es möglich, dass es, um die fehlende TLR4-Signalübermittlung zu kompensieren, zur gesteigerten und nicht wie sonst beobachtet zur reduzierten TLR8-Expression kommt.

Es ist allerdings ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass die hier bezüglich TLR8 getroffenen Aussagen relativ spekulative Ansätze darstellen, die es in zukünftigen Arbeiten zu erhärten oder zu widerlegen gilt.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation mit Konidiosporen von *Aspergillus fumigatus* bei humanen Dendritischen Zellen zu einer veränderten Expression aller drei untersuchten Toll-like-Rezeptoren geführt hat. Die dabei die TLR4-Expression betreffend gemachten Beobachtungen lassen nach Vergleich mit Ergebnissen der LPS-Stimulation am eindeutigsten auf eine Beteiligung dieses Rezeptors an der *Aspergillus*-Erkennung schließen. Bezüglich der zu TLR8 getroffenen hypothetischen Aussagen wird es interessant sein, ob zukünftige Forschungsergebnisse ähnliche Anhaltspunkte beinhalten werden.

### 5.3 Spender- und pilzstammabhängige Variationen bei den durchgeführten Experimenten

Während bei der Stimulation von Dendritischen Zellen und Monozyten mit Lipopolysaccharid die Variation der Ergebnisse zwischen den untersuchten Spendern sehr gering war, ergaben sich bei den *Aspergillus fumigatus*-Stimulations-Versuchen größere Schwankungen. Meist war das Vorzeichen der dabei beobachteten Expressionsveränderungen zwar gleich, das heißt es kam einheitlich unter alle Spendern zur Hoch- oder Herunter-Regulation eines Gens, allerdings konnten erhebliche Unterschiede festgestellt werden bezüglich des zeitlichen Beginns und des Ausmaßes der Regulation von Cytokinen und Rezeptoren auf mRNA-Ebene. Es stellt sich also die Frage, warum die Ergebnisse bei der Konidien-Stimulation stärker variieren, als dies bei der LPS-Stimulation der Fall ist.

Bei LPS handelt es sich um ein PAMP mit sehr starker immunstimulierender Potenz<sup>68</sup>, während die der *A. fumigatus*-Konidien deutlich geringer zu sein scheint. Denn vergleicht man die Kontrolle der IL12p40-Expression nach LPS- und Konidien-Kontakt, so fällt auf, dass die Zellen auf den LPS-Reiz mit einem weitaus stärkeren Anstieg der Expression reagierten (Abb. 15 und Abb. 20). Je schwächer allerdings die ausgelöste Immunantwort ausfällt, desto stärker fallen vermutlich individuelle Besonderheiten der Spender ins Gewicht. Dabei können sowohl konstante Faktoren wie beispielsweise genetische Polymorphismen<sup>98</sup>,

als auch situative Einflüsse wie z. B. psychologischer Stress<sup>63</sup> Einfluss auf die Regulation der Immunantwort nehmen.

Ebenso wie die interindividuellen Unterschiede der Spender wirken sich bei geringerer Stimulations-Effizienz auch minimale Verschiedenheiten zwischen den zur Stimulation verwendeten Präparationen gravierender aus. So kann die Pathogenität zwischen verschiedenen Pilzstämmen oder sogar schon zwischen unterschiedlichen Kolonien schwanken, obwohl es sich jeweils um die selbe Pilz-Spezies handelt<sup>86,93</sup>. Weil die eingesetzten *Aspergillus fumigatus*-Konidien nicht nachweislich vom selben Stamm gewonnen wurden, muss dies als einer der möglichen Faktoren angesehen werden, der die Spannbreite der gemessenen Werte mitzuverantworten hat. Außerdem ist ein Einfluss des Alters der Konidiosporen auf ihre Virulenz nicht auszuschließen. Araujo et al. zeigten, dass die Keimungsrate von *Aspergillus*-Sporen mit zunehmendem Alter abnimmt<sup>5</sup>. Da bei den durchgeführten Stimulations-Versuchen jedoch kein einheitliches Konidien-Alter festgelegt wurde, muss auch hierin eine mögliche Ursache für die variierenden Ergebnisse vermutet werden.

Somit lässt sich abschließend feststellen, dass bei der Zell-Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien zukünftig auf noch stärker standardisierte Versuchsbedingungen zu achten ist. So sollten jeweils gleichaltrige Konidien eines festgelegten Stammes eingesetzt werden. Um zusätzlich eine spätere Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus zu gewährleisten, würden sich beispielsweise Pilzstämmen aus den Stammsammlungen der ATCC (*American Type Culture Collection*) oder der DSMZ (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) anbieten. Außerdem könnte an die Auswahl nicht anonymer Blutspender gedacht werden, sodass ein Versuch bei von der Norm abweichenden Ergebnissen zu einem späteren Zeitpunkt mit Zellen desselben Spenders wiederholbar wäre. Situative, störende Faktoren wären somit eventuell zu rarefizieren. Um sowohl situative als auch interindividuelle Variationen zwischen den Einzelexperimenten ausschließen zu können, müssten im Verlauf einer kompletten Versuchsreihe nur Zellen verwendet

werden, die zu einem Zeitpunkt einem einzigen Spender entnommen wurden. Möglich wäre dies durch den Einsatz der Leukapherese, wodurch große Mengen an PBMCs eines Spenders isoliert und anschließend kryokonserviert werden könnten.

## **6. Zusammenfassung**

Toll-like-Rezeptoren gehören zu den signaltransferierenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Über sie werden Pathogen-assoziierte Muster erkannt und es kommt zur inflammatorischen Immunreaktion, mit dem Ziel, die eingedrungenen Pathogene zu eliminieren. In Dendritischen Zellen werden über TLRs außerdem das adaptive Immunsystem aktivierende Signale gesteuert.

Im Rahmen der durchgeführten Genexpressions-Analysen wurde im ersten Teil der Arbeit beim Vergleich von Monozyten mit Dendritischen Zellen eine entgegengesetzte Regulation des TLR4 nach Stimulation mit Lipopolysaccharid entdeckt. Während es bei Monozyten zu einer gesteigerten Expression nach LPS-Kontakt kam, wurde TLR4, der LPS im Zusammenspiel mit Co-Rezeptoren wie CD14 oder MD-2 bindet, bei DCs reduziert exprimiert. Daneben konnte festgestellt werden, dass es bei Monozyten im Gegenzug zur vermehrten TLR4-Expression zu einer Verminderung der CD14-Expression kam. Somit kann schlussgefolgert werden, dass beide Zelltypen durch Herunter-Regulation der Expression eines Rezeptors oder Co-Rezeptors einer LPS-Überstimulation und folglich der Entstehung eines lebensbedrohlichen endotoxischen Schocks entgegenzuwirken scheinen.

Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der Interaktion von Dendritischen Zellen mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien. *A. fumigatus* ist als Auslöser einer oft tödlich verlaufenden invasiven Aspergillose insbesondere bei immunsupprimierten Patienten sehr gefürchtet.

Durch Vergleich der ermittelten TLR4-Expressionsveränderungen mit denen nach LPS-Stimulation durfte auf eine Beteiligung von TLR4 an der Bindung von *A. fumigatus*-Konidien geschlossen werden, da es ebenfalls zu einer Herunter-Regulation der TLR4-Gene auf mRNA-Ebene gekommen war. Ähnliche Beobachtungen bei TLR8 lassen eine Interaktion zwischen diesem Rezeptor und den *Aspergillus*-Konidien in Betracht ziehen. Da bisher keinerlei Anhaltspunkte für diese Theorie in der Literatur zu finden sind, müssen diesbezügliche Hypothesen bis zur Klärung durch weitergehende Untersuchungen mit Vorsicht betrachtet werden.

Die bei der Untersuchung der Genexpression von MCP1 festgestellte Verstärkung dieser nach Kontakt mit *A. fumigatus*-Konidien weist auf die Beteiligung dieses Cytokins an der Immunantwort gegen *Aspergillus*-Konidien hin.

Zusätzlich zu den bis hier getroffenen Aussagen muss festgehalten werden, dass bei der Stimulation humaner DCs mit *A. fumigatus*-Konidien im Gegensatz zur LPS-Stimulation teilweise eine erhebliche Variation der Ergebnisse zwischen den einzelnen Experimenten aufgetreten war. Die geringere immunstimulierende Potenz der Konidien im Vergleich zu LPS und damit der stärkere Einfluss spender- und pilzstammspezifischer Faktoren muss hierfür als Ursache angenommen werden.

## **7. Referenzen**

1. Aderem, A., Ulevitch, R. J.. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*; 406: 782-787 (2000)
2. Akira, S., Takeda, K.. Toll-Like Receptor Signalling. *Nat Rev Immunol*; 4: 499-511 (2004)
3. Alexander, C., Rietschel, E. T.. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*; 7: 167-202 (2001)
4. Anderson, K. V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C.. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*; 42: 791-798 (1985)
5. Araujo, R., Rodrigues, A. G.. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol*; 42: 4335-4337 (2004)
6. Banchereau, J., Steinman R. M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 392 (6673): 245-252 (1998)
7. Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., Segal, D. M.. Leucine rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*; 24: 528-533 (2003)
8. Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Fallarino, F., Bozza, S., Montagnoli, C., Mosci, P., Lipford, G. B., Pitzurra, L., Romani, L.. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol*; 173: 7406-7415 (2004)
10. Belvin, M. P., Anderson, K. V.. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 12: 393-416 (1996)
11. Biedermann, B. C., Die rekombinante DNA-Technologie 3. *Schweiz Med Forum*; 4: 1037 (2004)
12. Blease, K., Mehrad, B., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Hogaboam, C. M.. Antifungal and airway remodeling roles for murine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 during pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol*; 166: 1832-1842 (2001)
13. Bradley, J. R., Pober, J. S.. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*; 20: 6482-6491 (2001)

14. Braedel, S., Radsak, M., Einsele, H., Latge, J. P., Michan, A., Loeffler, J., Haddad, Z., Grigoleit, U., Schild, H., Hebart, H.. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*; 125: 392-399 (2004)
15. Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A. N., O'Neill, L. A., Liew, F. Y.. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*; 5: 373-379 (2004)
16. Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., Tschopp, J.. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med*; 197: 263-268 (2003)
17. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J.. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*; 360: 258-261 (1992)
18. Chaudhary, P. M., Ferguson, C., Nguyen, V., Nguyen, O., Massa, H. F., Eby, M., Jasmin, A., Trask, B. J., Hood, L., Nelson, P. S.. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1-receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood*; 91: 4020-4027 (1998)
19. Chuang, T. H., Ulevitch, R. J.. Cloning and characterization of a subfamily of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*; 11: 372-378 (2000)
20. Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. *Innere Medizin*. 3. Auflage. Urban und Schwarzenberg (1994)
21. Crosby, H. A., Bion, J. F., Penn, C. W., Elliott, T. S.. Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J Med Microbiol*; 40: 23-30 (1994)
22. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C.. Innate antiviral response by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*; 303: 1529-1531 (2004)
23. Doni, A., Peri, G., Chieppa, M., Allavena, P., Pasqualini, F., Vago, L., Romani, L., Garlanda, C., Mantovani, A.. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol*; 33 : 2886-2893 (2003)
24. Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., Beutler, B.. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution. *Eur Cytokine Netw*; 11: 362-371 (2000)

25. Eisenstein, B. I.. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*; 322(3): 178-183 (1990)
26. Fearon, D. T., Locksley, R. M.. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*; 272: 50-53 (1996)
27. Fischer, G., Muller, T., Ostrowski, R., Dott, W.. Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. *Chemosphere*; 38: 1745-1755 (1999)
28. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., Golenbock, D. T.. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*; 198: 1043-1055 (2003)
29. Fraser, I. P., Koziel, H., Ezekowitz, R. A.. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol*; 10: 363-372 (1998)
30. Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., Doni, A., Vago, L., Botto, M., De Santis, R., Carminati, P., Siracusa, G., Altruda, F., Vecchi, A., Romani, L., Mantovani, A.. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*; 420: 182-186 (2002)
31. Gassen, H. P., Minol, K..Gentechnik. Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin; 4.Auflage (1996)
32. Gaziano, R., Bozza, S., Bellocchio, S., Perruccio, K., Montagnoli, C., Pitzurra, L., Salvatori, G., De Santis, R., Carminati, P., Mantovani, A., Romani, L.. Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 4414-4421 (2004)
33. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby Immunology, 4th edition, Freeman and Company: 303-327 (2000)
34. Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., Bauer, S.. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*; 33: 2987-2997 (2003)



35. Hellman, J., Loisel, P. M., Tehan, M. M., Allaire, J. E., Boyle, L. A., Kurnick, J. T., Andrews, D. M., Sik, K. K., Warren, H. S.. Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. *Infect Immun*; 68: 2566-2572 (2000)
36. Hermoso, M. A., Matsuguchi, T., Smoak, K., Cidlowski, J. A.. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol*; 24: 4743-4756 (2004)
37. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R.. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*; 10: 413-417 (1992)
38. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*; 11: 1026-1030 (1993)
39. Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., Beutler, B.. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*; 424: 743-748 (2003)
40. Hof, H., Dörries, R., *Medizinische Mikrobiologie*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (2002)
41. Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., Medzhitov, R.. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*; 420: 329-333 (2002)
42. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G.. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*; 168: 4531-4537 (2002)
43. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S.. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*; 162: 3749-3752 (1999)
44. Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F. and Steinman, R. M. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*; 186: 665-672 (1997)
45. Janeway, C. A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 54 Pt1: 1-13 (1989)

46. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.. Immunologie, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (2002)
47. Janeway, C. A. Jr, Medzhitov, R.. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*; 20: 197-216 (2002)
48. Janeway, C. A. Jr, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.. Immunobiology- the immune system in health and disease, 6th edition, Garland Science Publishing (2005)
49. Janssens, S., Beyaert, R.. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell*; 11: 293-302 (2003)
50. Jiang, Q., Akashi, S., Miyake, K., Petty, H. R.. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4(TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol*; 165: 3541-3544 (2000)
51. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., Liu, Y. J.. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*; 194: 863-869 (2001)
52. Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A. Jr, Medzhitov, R., Flavell, R. A.. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*; 110: 191-202 (2002)
53. Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimauchi, H., Kasai, N., Mashimo, J.. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an Escherichia coli re-mutant. *Infect Immun*; 49: 225-237 (1985)
54. Koth, L. L., Rodriguez, M. W., Bernstein, X. L., Chan, S., Huang, X., Charo, I. F., Rollins, B. J., Erle, D. J.. Aspergillus antigen induces robust Th2 cytokine production, inflammation, airway hyperreactivity and fibrosis in the absence of MCP-1 or CCR2. *Respir Res*; 5: 12 (2004)
55. Lang, F.. Basiswissen Physiologie, 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin: 138-148 (2000)
56. Latgé, J. P.. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*; 12: 310-350 (1999)
57. Latgé, J.P. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends Microbiol*; 9: 382-389 (2001)

58. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A.. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*; 86: 973-983 (1996)
59. Levitz, S. M.. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect*; 6: 1351-1355 (2004)
60. Lin, S. M., Frevert, C. W., Kajikawa, O., Wurfel, M. M., Ballman, K., Mongovin, S., Wong, V. A., Selk, A., Martin, T. R.. Differential regulation of membrane CD14 expression and endotoxin-tolerance in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 31: 162-170 (2004)
61. Mambula, S. S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D. T., Levitz, S. M.. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*; 277: 39320-39326 (2002)
62. Manuel, R. J., Kibbler, C. C.. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect*; 39: 95-109 (1998)
63. Marsland, A. L., Bachen, E. A., Cohen, S., Rabin, B., Manuck, S. B.. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiol Behav*; 77:711-716 (2002)
64. Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T.. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*; 171: 3154-3162 (2003)
65. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*; 388: 394-397 (1997)
66. Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*; 173: 89-97 (2000)
67. Meier, A., Kirschning, C. J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F.. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*; 5: 561-570 (2003)
68. Miyake, K.. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*; 12: 186-192 (2004)
69. Mokuno, Y., Matsuguchi, T., Takano, M., Nishimura, H., Washizu, J., Ogawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., Nimura, Y., Yoshikai, Y.. Expression of toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by *Escherichia coli* infection in mice. *J Immunol*; 165: 931-940 (2000)

70. Moreno, C., Merino, J., Ramirez, N., Echeverria, A., Pastor, F., Sanchez-Ibarrola, A.. Lipopolysaccharide needs soluble CD14 to interact with TLR4 in human monocytes depleted of membrane CD14. *Microbes Infect*; 6: 990-995 (2004)
71. Morrison, B. E., Park, S. J., Mooney, J. M., Mehrad, B.. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest*; 112: 1862-1870 (2003)
72. Mullis, K. B., Faloona, F.. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*; 55: 335-350 (1987)
73. Mullis, K. B.. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*; April: 56-65 (1990)
74. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., Mantovani, A.. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*; 164: 5998-6004 (2000)
75. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P., Mantovani, A.. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans*; 28: 563-566 (2000)
76. Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Yamanishi, K., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto, T.. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*; 17: 677-687 (2002)
77. Netea, M. G., Warris, A., Van der Meer, J. W., Fenton, M. J., Verver-Janssen, T. J., Jacobs, L. E., Andresen, T., Verweij, P. E., Kullberg, B. J.. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*; 188: 320-326 (2003)
78. Netea, M. G., Van der Graaf, C., Van der Meer, J. W., Kullberg, B. J.. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23: 672-676 (2004)
79. Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., Akira, S.. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*; 164: 3476-3479 (2000)

80. O'Neil, L. A., Fitzgerald, K. A., Bowie, A. G.. The Toll-IL1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*; 24: 286-290 (2003)
81. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. J., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B.. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science*; 282: 2085-2088 (1998)
82. Pongbhaesaj, P., Dejthevaporn, C., Tunlayadechanont, S., Witoonpanich, R., Sungkanuparph, S., Vibhagool, A.. Aspergillosis of the central nervous system: a catastrophic opportunistic infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 35: 119-125 (2004)
83. Pylkkanen L., Gullsten, H., Majuri, M. L., Andersson, U., Vanhala, E., Maatta, J., Meklin, T., Hirvonen, M. R., Alenius, H., Savolainen, K.. Exposure to *Aspergillus fumigatus* spores induces chemokine expression in mouse macrophages. *Toxicology*; 200: 255-263 (2004)
84. Ratajczak, M. Z., Kuczynski, W. I., Ratajczak, J.. Influence of different temperature of cytopreservation on the proliferative potential of human bone marrow progenitor cells. *Tranplantological implications. Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* ; 42 : 217-221 (1994).
85. Reiß, J.. *Schimmelpilze*, Springer Verlag (1997)
86. Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Ponton, J., Garaizar, J.. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*; 22: 1-23 (2005)
87. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., Sambhara, S.. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol*; 169: 4697-4701 (2002)
88. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F.. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*; 8:217-225 (1994)
89. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., Bazan, J. F.. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 588-593 (1998)
90. Roeder, A., Kirschning, C. J., Rupec, R. A., Schaller, M., Weindl, G., Korting, H. C.. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*; 42: 485-498 (2004)

91. Rolston, K.. Overview of systemic fungal infections. *Oncology*; 15: 11-14 (2001)
92. Sandilands, G. P., Ahmed, Z., Perry, N., Davison, M., Lupton, A., Young, B.. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*; 114(3): 354-368 (2005)
93. Sarfati, J., Diaquin, M., Debeaupuis, J. P., Schmidt, A., Lecaque, D., Beauvais, A., Latge, J. P.. A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced virulence. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*; 43: 203-213 (2002)
94. Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., Matsumoto, K.. TAB1 : an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- $\beta$  signal transduction. *Science*; 272: 1179-1182 (1996)
95. Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., Dower, S. K.. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signalling pathways. *J Biol Chem*; 275: 4670-4678 (2000)
96. Solberg, C.O.. Microorganisms strike back-infectious diseases during the last 50 years. *Tidsskr Nor Laegeforen*; 121: 3538-43 (2001)
97. Stahl, P. D., Ezekowitz, R. A.. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*; 10: 50-55 (1998)
98. Stuber, F.. Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy? *J Am Soc Nephrol*; 17: 60-64 (2001)
99. Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Beutler, B.. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 3516-3521 (2004)
100. Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell*; 5: 649-658 (2000)
101. Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K.J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Gaynor, R. B.. TAK1 is critical for I $\kappa$ B kinase-mediated activation of the NF $\kappa$ B pathway. *J Mol Biol*; 326: 105-115 (2003)

102. Thomson, A.. The Cytokine Handbook, Academic Press (1998)
103. Trinchieri, G.. Interleukin 12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 3: 133-146 (2003)
104. Ulevitch, R. J.. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol*; 4: 512-520 (2004)
105. Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., Aderem, A.. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*; 401: 811-815 (1999)
106. Valeri, C.R., Ragno, G., Pivacek, L. E., Cassidy, G. P., Srey, R., Hansson-Wicher, M., Leavy, M. E.. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80 degrees C for up to 37 years. *Vox Sang*; 79: 168-174 (2000).
107. Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J., Kuiper, J.. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin Microbiol Rev*; 16: 379-414 (2003)
108. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K., Segal, D. M.. Regulation of Toll-Like Receptors in Human Monocytes and Dendritic Cells. *J Immunol*; 166: 249-255 (2001)
109. Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., Li, X.. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*; 4: 920-927 (2003)
110. Warris, A., Netea, M. G., Wang, J. E., Gaustad, P., Kullberg, B. J., Verweij, P. E., Abrahamsen, T. G.. Cytokine release in healthy donors and patients with chronic granulomatous disease upon stimulation with *Aspergillus fumigatus*. *Scand J Infect Dis*; 35: 482-487 (2003)
111. [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)
112. [www.item.fraunhofer.de](http://www.item.fraunhofer.de)
113. [www.lightcycler-online.com](http://www.lightcycler-online.com)
114. [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)
115. [www.pcr.at](http://www.pcr.at)
116. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
117. [www.roche.com](http://www.roche.com)

118. [www.who.int](http://www.who.int)
119. Xie, Z. F., Shi, H. Z., Qin, X. J., Kang, L. F., Huang, C. P., Chen, Y. Q.. Effects of antigen presentation of eosinophils on lung Th1/Th2 imbalance. *Chin Med J. (Engl.)*; 118(1): 6-11
120. Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K.. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- $\beta$  signal transduction. *Science*; 270: 2008-2011 (1995)
121. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S.. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*; 4: 1144-1150 (2003)
122. Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A.. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*; 18: 143-164 (2000)
123. Zarembek, K. A., Godowski, P. J.. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*; 168: 554-561 (2002)
124. Zarkadis, I. K., Mastellos, D., Lambris, J. D.. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev. Comp. Immunol*; 25: 745-762 (2001)



## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die zur Erstellung dieser Arbeit mit Rat und Tat beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Bereitstellung des Themas dieser Promotionsarbeit, für die gute und freundliche Betreuung sowie die permanente Hilfsbereitschaft bei allen aufkommenden Fragen und Problemen. Lieber Jürgen, vielen Dank.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Einsele für die Bereitstellung der Mittel für diese Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe des Labors, sowohl für die Hilfe bezüglich dieser Arbeit, als auch für die stets herrschende freundliche und sympathische Atmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. U. Schumacher des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und besonders bei Herrn Dipl. Biochem. Ziad Haddad für die Präparation der *A. fumigatus*-Konidien.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Vielen Dank.

## **Lebenslauf**

**Christoph Michael Kaiser**

geboren am 30.06.1980 in Freiburg i. Br.

---

### **Schulbildung**

- 1986 - 1989 Besuch der Halden-Grundschule in Kernen im Remstal  
1989 - 1990 Besuch der Schiller-Grundschule in Göppingen-Faurndau  
1990 - 1999 Besuch des Freihof-Gymnasiums in Göppingen  
Juni 1999 Abitur
- 1999 – 2000 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Göppingen  
Während dieser Zeit Ausbildung zum Rettungsanitäter

### **Hochschulbildung**

- 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Eberhard Karls Universität Tübingen
- 2002 Ärztliche Vorprüfung
- 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2003-2005 Promotion in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie und  
Immunologie der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
- 2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2006-2007 Praktisches Jahr am Universitätsspital Zürich und am  
Diakonieklinikum Stuttgart
- 04.05.2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung