

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Untersuchungen zur Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der
immunologischen Erkennung von *Aspergillus***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angela Meier
aus Freiburg
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. F. Ebel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schliwa

Mitberichterstatter: PD Dr. A. Brehm, PhD
Mitberichterstatter: PD Dr. H. Ostermann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

Meinem Vater, meiner Mutter und meinem Bruder

1. EINLEITUNG	7
1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	7
1.2. Vorstellung der <i>A. fumigatus</i> bedingten Krankheiten.....	9
1.3. Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus.....	10
1.4. Erkennung von Mikroorganismen durch die Zellen der natürlichen Immunität.....	13
1.5. Toll-like Rezeptoren	14
1.5.1. TLR4	15
1.5.2. TLR2	16
1.5.3. TLR1	16
1.5.4. TLR6	16
1.5.5. TLR 3	16
1.5.6. TLR 5	17
1.5.7. TLR 9	17
1.5.8. TLR7, TLR8, TLR10	17
1.5.9. TLR11	18
1.5. Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch TLRs.....	18
1.6.1. NF- κ B.....	19
1.7. Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2. MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1. Pilzstämme	23
2.1.2. GFP	23
2.1.3. Zelllinien	23
2.1.4. Plasmide	24
2.1.5. Mausstämme	25
2.2. Methoden	27
2.2.2. Verifizierung der Genotypen der Mäuse mittels Polymerasekettenreaktion	28
2.2.3. Gewinnung der murinen Primärmakrophagen mittels Peritoneallavage	33
2.2.4. Aussäen der Makrophagen	34
2.2.5. Gewinnung des <i>Aspergillus</i> -Myzels	34
2.2.6. Abtöten des <i>Aspergillus</i> -Myzels.....	35
2.2.7. Abtöten der <i>Aspergillus</i> Konidien	35
2.2.8. Propidium-Jodid(PI)-Färbung der Konidien	35
2.2.9. Limulus Assay	36
2.2.10. Immunfluoreszenz.....	37
2.2.11. Zytokinassays und NO-Messung	38
2.2.12. Untersuchung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.....	41
3. ERGEBNISSE	44
3.1. Aktivierung von mit verschiedenen humanen TLRs transfizierten HEK293 Zellen durch <i>A. fumigatus</i>	44
3.2. Stimulation verschiedener Zelltypen durch lebende Konidien von <i>A. fumigatus</i>..	46
3.2.1. Testung des zur Stimulation eingesetzten Materials auf Reinheit von LPS mit dem LIMULUS- Test	46
3.2.2. Stimulation Makrophagen-ähnlicher Zelllinien.....	47
3.2.2.1. RAW 264.7	47
3.2.2.2. P-388D1	48
3.2.2.3. J774	50
3.2.3. Stimulation primärer muriner Peritonealmakrophagen.....	50

3.3. Die Abhängigkeit der NF-κB Translokation von Toll-like Rezeptoren im Zuge der Infektion mit lebenden <i>A. fumigatus</i> Konidien.....	52
3.3.1. Verifizierung der angegebenen Genotypen der Mäuse mittels PCR	53
3.3.2. Stimulation der verschiedenen Genotypen mit <i>A. fumigatus</i> Konidien	54
3.3.2.1. C3H/HeN	54
3.3.2.2. C3H/HeJ/TLR2-/-	55
3.3.2.3. C3H/HeJ	57
3.3.2.4. C3H/HeN/TLR2-/-	58
3.3.3. Zusammenfassung der NF- κ B Translokationsexperimente	60
3.3.4. Stimulation von Wildtyp-Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Materialien von <i>A. fumigatus</i>	60
3.3.4.1. Stimulation muriner Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Konidien von <i>A. fumigatus</i>	60
3.3.4.2. Stimulation muriner Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Hyphen von <i>A. fumigatus</i>	62
3.4. Zyto- und Chemokinproduktion, Produktion von NO.....	63
3.4.1. TNF- α Produktion	64
3.4.2. MIP-2 Produktion	66
3.4.3. NO-Produktion	67
3.4.4. Zusammenfassung der Zytokin- und NOproduktions-Experimente.....	69
3.5. Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.....	70
3.5.1 Stimulation mit Hyphenmaterial	71
3.5.2. Stimulation mit Konidien	78
3.5.2.1. Stimulation mit UV-abgetöteten Konidien.....	79
3.5.2.2. Stimulation mit EtOH abgetöteten Konidien.....	80
3.5.3. Zusammenfassung der Rekrutierungsexperimente.....	82
3.6. TLR 2 und TLR4 : Lokalisation und Rekrutierung.....	83
3.6.1. Lokalisation von hTLR4 in transfizierten A549 Zellen (FLAG-tagged AK)	83
3.6.2. Lokalisation von TLR4 im Zytoplasma von Makrophagen, vor und nach der Stimulation mit vitalen <i>A. fumigatus</i> Konidien.....	84
3.6.3. TLR2 Lokalisation und Rekrutierung	85
3.6.4. Zusammenfassung der TLR-Lokalisations- und Rekrutierungsexperimente.....	87
4. DISKUSSION	88
5. ZUSAMMENFASSUNG	99
6. LITERATURVERZEICHNIS	101
7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME.....	111
8. DANKSAGUNG.....	115
9. VERÖFFENTLICHUNGEN	116
10. LEBENS LAUF	117

1. EINLEITUNG

1.1. *Aspergillus fumigatus*

Der Deuteromycet *Aspergillus fumigatus* ist ein saprophytärer Schimmelpilz, der weltweit ubiquitär verbreitet ist. Sowohl bei der Zersetzung von zerfallender organischer Materie als auch bei der Wiederverwertung von Kohlenstoff und Stickstoff spielt dieser Pilz eine entscheidende Rolle (Mullins et al., 1976; Debeaupuis et al., 1997).

A. fumigatus Konidien (Sporen) haben eine grau-grünliche Farbe (fumus lat.: Der Rauch) und einen Durchmesser von nur 2,5-3,0 µm, welches ihnen erlaubt, bis in kleine Hohlräume wie z.B. die menschlichen Lungenalveoli vorzudringen (Pitt, 1994; Samson, 1999). Die Konidien dieses Pilzes besitzen einen einzigen haploiden Kern und sind von einer wasserabweisenden Schicht, der sog. Hydrophobin-Schicht, umgeben. Sexuelle Fortpflanzungsstadien dieses Pilzes sind, im Gegensatz zum eng verwandten *A. nidulans* nicht bekannt (Latge, 1999). Aus den Konidien von *A. fumigatus* wächst in Gegenwart einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle und Spurenelementen ein verzweigtes septiertes Myzel. Kommt dieses Myzel in Kontakt mit der Luft so bilden sich an spezialisierten Verzweigungen Flaschenzellen (Phialiden), von welchen sich die Konidien abschnüren. *A. fumigatus* besitzt keinen eigenen Mechanismus, der zur Verstreuung seiner Konidien in die Luft führt. Er ist also auf starke Windstöße oder mechanische Manipulation angewiesen (Latge, 1999).

1. Einleitung

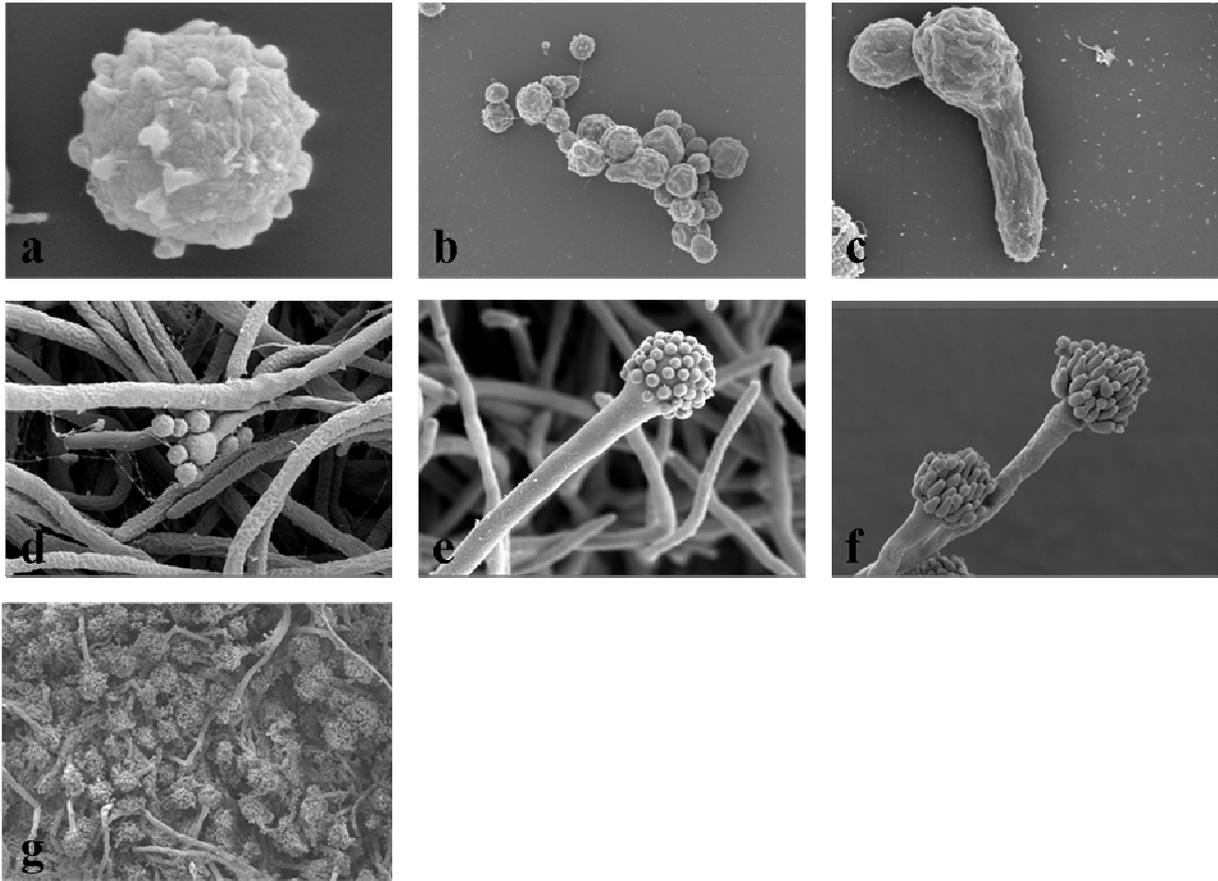


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung der verschiedenen Wachstumsstadien von *Aspergillus fumigatus*: a Konidie; b Konidien verschiedener Größen: vor der Auskeimung schwellen die Konidien an; c auskeimende Konidie; e Myzel; f Myzel mit Konidiophor; g Konidiophor; f Myzelteppich mit Konidiophoren. Quelle: M. Rohde, F.Ebel).

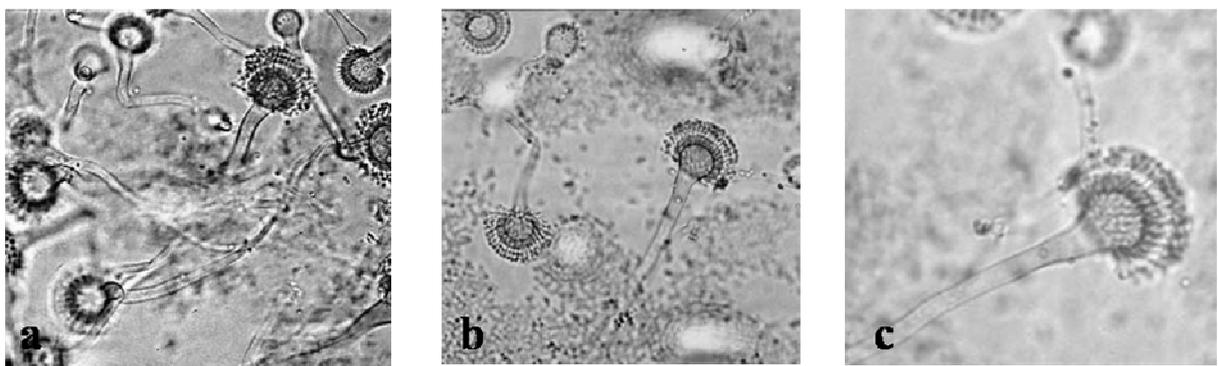


Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Aspergillus fumigatus* Myzel und Konidiophoren (Quelle: <http://www.dehs.umn.edu/iaq/fungus/aspergillus/fumigatus.html>).

1.2. Vorstellung der *A. fumigatus* bedingten Krankheiten

Aufgrund der bereits erwähnten ubiquitären Verbreitung ist jeder von uns täglich mit den Konidien von *A. fumigatus* konfrontiert. Jeder Mensch atmet pro Tag mindestens einige hundert dieser Konidien ein (Goodley et al., 1994; Girardin et al., 1993; Girardin et al., 1993; Chazalet et al., 1998). Das gesunde Immunsystem besitzt jedoch effektive Mechanismen, diese effizient zu eliminieren. Aufgrund dieser Tatsache wurde *A. fumigatus* in der Vergangenheit als ein harmloser ubiquitärer Organismus betrachtet. Diese Ansicht hat sich unerfreulicherweise in den letzten Jahren drastisch geändert. Bedingt durch den immer häufiger werdenden Einsatz immunsuppressiver Medikamente, v.a. in der Transplantationsmedizin, ist es in den letzten Jahrzehnten zu einer starken Zunahme sog. opportunistischer Pilzinfektionen gekommen. *A. fumigatus* ist daher heute der weitverbreitetste Erreger aerogener Mykosen. Seine Sporen machen mit 0,3% nur einen kleinen Teil aller sich in der Luft befindlichen Sporen aus, in der sich u.a. auch Sporen anderer *Aspergillus*-Arten, wie zum Beispiel *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans*, befinden. Trotzdem verursacht er 90% aller systemischen *Aspergillus*-Infektionen (Schmitt et al., 1990). Diese Tatsache legt den Schluß nahe, dass *A. fumigatus* im Gegensatz zu anderen *Aspergillus*-Arten, bestimmte Faktoren besitzt, welche ihm die Möglichkeit geben, zu einem opportunistischen Krankheitserreger zu werden.

Es gibt drei Krankheitsbilder, welche durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen werden:

- 1) ABPA (Allergische Bronchopulmonale Aspergillose)
- 2) Aspergillom (Pilzball)
- 3) Invasive Aspergillose

Die invasive Aspergillose (IA) ist, nicht zuletzt aufgrund ihrer hohen Letalität trotz antimykotischer Therapie von etwa 60-80 %, eine der meistgefürchtetsten Komplikationen chemo- oder strahlentherapeutisch behandelter Leukämie-Patienten sowie der Patienten, an denen eine Organtransplantation, besonders eine Knochenmarkstransplantation, durchgeführt wurde (Latge and Calderone, 2002). Infektionen, die mit einer Immunmodulation einhergehen, wie z.B. die HIV-Infektion, sind hingegen häufiger mit anderen Pilzarten, wie z.B. *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* oder *Cryptococcus neoformans* assoziiert (Hoover et al., 1993). In fortgeschrittenen Stadien der HIV Erkrankung, insbesondere bei Patienten mit Neutropenie und hochdosierter Glukokortikoidtherapie, spielt die invasive Aspergillose allerdings auch bei AIDS Patienten eine zunehmende Rolle (Hage et al., 2002).

1. Einleitung

Die Diagnose einer invasiven Aspergillose gestaltet sich sehr schwierig. Ihr klinisches Bild ist sehr unspezifisch und die diagnostischen Möglichkeiten sind begrenzt. Über 30% der Diagnosen „invasive Aspergillose“ werden daher auch heute noch post mortem im Rahmen histologischer Befunde gestellt (Denning, 2000). Frühe Symptome der IA sind Husten, Fieber ohne erkennbare andere Ursachen, Atemnot und ein positiver radiologischer Befund. Da bei immunsupprimierten Patienten eine serologische Diagnostik aufgrund der fehlenden Antikörperproduktion häufig zu keinem Ergebnis führt, stützen sich die diagnostischen Bemühungen auf einen Antigennachweis im Serum, aber auch im Harn, in BAL Flüssigkeit oder in Liquor. Die momentan sensitivste Methode zum Nachweis einer Aspergillus-Infektion ist ein sog. „Sandwich“-ELISA, der Galaktomannan, einen Bestandteil der Zellwand von Hyphenmaterial und von Konidien, detektiert (Stynen et al., 1995). Mit diesem Test war es in einigen Fällen möglich, Galaktomannan im Serum bereits vor dem Auftreten klinischer und radiologischer Zeichen einer invasiven Aspergillose nachzuweisen (Maertens et al., 1999). Die Therapie der Wahl war lange Zeit AmphotericinB, trotz der schweren Nebenwirkungen, die mit einer solchen Behandlung einhergehen (Latge, 1999). Voriconazol steht seit kurzem als eine vielversprechende Alternative zur Verfügung (Herbrecht et al., 2002) und zeigte sich bereits überlegen (Schwartz et al., 2005).

A. fumigatus ist auch bei intaktem Immunsystem unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage, einige, jedoch weitaus weniger schwerwiegende, Krankheitsbilder zu verursachen. So setzt die Bildung eines Aspergilloms eine präformierte Höhle in der Lunge, verursacht z.B. durch eine abgelaufene Tuberkulose, voraus.

Eine ABPA manifestiert sich hingegen häufig bei Patienten mit zystischer Fibrose oder atopischen Asthma (Tillie-Leblond and Tonnel, 2005).

1.3. Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus

Das gesunde Immunsystem ist ausgezeichnet in der Lage, den ihm so häufig begegnenden *A. fumigatus* effektiv zu bekämpfen. Die Eintrittspforte dieses opportunistischen Pathogens sind, bedingt durch seine aerogene Verteilung, die oberen Atemwege. Die eindringenden Konidien gelangen also in der Lunge mit dem Immunsystem in ersten Kontakt. Dort treffen sie auf das dort ansässige Epithel, die Alveolar-TypII Zellen, sowie auf Alveolar-Makrophagen und pulmonale dendritische Zellen. Die Konidien sind in der Lage, an bestimmte Proteine, die in der Lunge vorkommen, zu binden. Dies konnte bereits für Laminin von Basalmembranen (Tronchin et al., 1993), extraelluläre Matrixproteine (Gil et al., 1996; Wasylanka and Moore, 2000) und Fibronectin (Penalver et al., 1996) gezeigt werden. Auch die pulmonalen

1. Einleitung

Surfactantproteine SP-A und SP-D spielen bei der Bindung von *A. fumigatus* Konidien eine entscheidenden Rolle, da sie in der Lage sind, nach Kalzium abhängiger Bindung an die Konidien wiederum deren Bindung an Makrophagen und neutrophile Granulozyten signifikant zu erhöhen (Madan et al., 1997). Auch konnte die Bindung von Konidien an bestimmte Zelltypen gezeigt werden (Paris et al., 1997; DeHart et al., 1997; Ibrahim-Granet et al., 2003). In vitro konnte eine Phagozytose und teilweise Abtötung von Konidien durch die Zellen der murinen Makrophagen Zelllinie J774 (Wasylnka and Moore, 2002) gezeigt werden. Auch aus einer BAL gewonnene humane Alveolar-Makrophagen waren zu einer solchen Phagozytose und Eliminierung fähig, wobei sich aber auch hier einzelne Konidien wieder aus den Lysosomen befreien und auskeimen konnten (Ibrahim-Granet et al., 2003). Interessanterweise sind jedoch auch Zellen der humanen Alveolar-TypII-Epithelzelllinie A549 dazu in der Lage, Konidien zu phagozytieren, und deren Auskeimung, verglichen mit extrazellulär verbliebenen Konidien, zu verzögern (Wasylnka and Moore, 2002). Dieses Eindringen und Überleben in Zellen könnte in vivo einen Mechanismus darstellen, durch welchen der Pilz den Attacken der angeborenen Immunität entrinnt, und durch den er in seinen Wirtsorganismus einzudringen vermag. Die die Konidien dieses Pilzes umgebende Hydrophobinschicht scheint einen weiteren Schutz des Pilzes nicht nur gegen ihn schädigende Umwelteinflüsse, sondern auch gegen die Zellen des Immunsystems darzustellen. Diese baumrindenähnlich strukturierte Hüllschicht wird auch als „rodlet“ Struktur bezeichnet und wird wahrscheinlich im Zuge des Auskeimungsprozesses dieses Pilzes abgeworfen (Rohde et al., 2002). Mutante Konidien mit einer Deletion des rodA-Gens, das eine essentielle Komponente der „rodlet“-Schicht kodiert, erwiesen sich als weniger resistent gegenüber Alveolarmakrophagen (Paris et al., 2003).

Als Infektionsquelle spielen Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle: Anders als Pilze der Gattung *Candida* ist *A. fumigatus* kein Bestandteil der physiologischen Körperflora. Daher ist eine Reexposition immunsupprimierter Patienten ein entscheidender Faktor für die Entwicklung einer IA, wie zahlreiche Studien, die auf eine signifikant höhere Inzidenz von IA während Bauarbeiten im betreffenden Krankenhaus hinweisen, belegen (Arnou et al., 1978). Ob es daneben auch zu einer Persistenz von Konidien in Alveolarepithelzellen Immungesunder kommen kann und ob dies möglicherweise einen weiteren Mechanismus für die Entwicklung einer IA darstellt, konnte bis heute nicht geklärt werden. Bekannt ist jedoch, daß sowohl A549 Zellen als auch murine und humane Primärmakrophagen dazu in der Lage sind, unspezifisch Partikel zu phagozytieren. Für A549 Zellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Bindung von Latex-Beads nicht zu einer Internalisierung führte, wohingegen

1. Einleitung

gebundene *A. fumigatus* Konidien mit einer signifikanten Rate internalisiert wurden (Wasylnka and Moore, 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Phagozytose der Konidien mit einer immunologischen Erkennung einhergeht und setzt eine Unterscheidung zwischen Latex-Beads und Pathogen, also eine Erkennung des Pilzes durch die Zellen des Immunsystems, voraus.

Wie kann der Wirtsorganismus jedoch zwischen einem Pathogen und körpereigenen Molekülen im Zuge des ersten Kontaktes unterscheiden?

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, eindringende Mikroorganismen durch die Unterscheidung zwischen Eigen und Nicht-Eigen zu detektieren und zu eliminieren. Dies geschieht mit Hilfe der „angeborenen“ und der „erworbenen Immunität“.

Die *erworbene* Immunität detektiert nicht-Eigenes durch die Erkennung von Peptid-Antigenen, welches ihnen durch Antigen-präsentierende Zellen, den Makrophagen und den dendritischen Zellen, auf MHC II Rezeptoren präsentiert wird. Die so präsentierten Antigene werden wiederum von Antigenrezeptoren auf der Oberfläche von B- und T- Zellen erkannt. Um auf eine weite Variationsbreite an potentiellen Antigenen reagieren zu können rearrangieren die B- und T- Zellen ihre Immunglobulin und ihre T-Zell-Rezeptor (TCR)-Gene, um so über 10^{11} verschiedene Spezies von Antigenrezeptoren zu schaffen. Bindet nun ein passendes Antigen an einen solchen Rezeptor, wird dadurch eine klonale Expansion dieses Lymphozyten ausgelöst und z.B. die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper induziert. Diese Erkennungsschritte benötigen jedoch 4-7 Tage bevor sie zu einer Wirts-Verteidigung beitragen können. Für die Eliminierung von sich schnell replizierenden Mikroorganismen ist dies entschieden zu langsam. Auch ist die erworbene Immunität nicht in der Lage, die Herkunft und den biologischen Kontext der Infektion zu eruieren (Medzhitov, 2001).

Dies alles ist Aufgabe der evolutionär älteren, *angeborenen* Immunität. Diese wurde bereits vor einem Jahrhundert von Elie Metchnikoff beschrieben, trat jedoch aufgrund der rasant fortschreitenden Erkenntnisse, die in Bezug auf die erworbene Immunität gewonnen wurden, zunächst wieder in den Hintergrund. Während den Lymphozyten eine sehr umschriebene Aufgabe, die Erkennung eines einzigen Antigens, zukommt, stehen die Zellen der angeborenen Immunität vor der schwierigen Aufgabe, eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Mikroorganismen erkennen zu müssen. Dabei ist es möglich, dass der eine eindringende Mikroorganismus dem anderen in keinsten Weise gleicht.

Zudem ist es die Aufgabe der Makrophagen, Überreste von verletztem Wirtsgewebe zu beseitigen ohne dabei gesunden Zellen zu schaden. Sind die zu eliminierenden Partikel zu

groß, um phagozytiert zu werden, wie z.B. das Myzel von *A. fumigatus*, können neutrophile Granulozyten angelockt werden. Neutrophile Granulozyten, auch Mikrophagen genannt, bekämpfen invadierende Mikroorganismen, indem sie im Zuge eines sogenannten „oxidative burst“ den Inhalt ihrer Granula, u.a. freie Sauerstoffradikale, wie O_2^- bzw. Hypochlorsäure, entleeren, um die von ihnen attackierten Organismen abzutöten. Mäuse, welche einen Defekt in der Produktion dieser Radikale besitzen, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* oder *C. albicans* (Aratani et al., 2002). Neutrophile Granulozyten können chemotaktisch zum Ort des Geschehens gelockt werden. Sie wandern zum Ort der höchsten Konzentration des sie anlockenden Chemokins. Diese Chemokine werden z.B. von Makrophagen ausgesandt, was wiederum eine bereits erfolgte Erkennung eines invadierenden Mikroorganismus durch den Makrophagen voraussetzt. Doch wie erfolgt diese schnelle Erkennung?

Was nun ist das Geheimnis der angeborenen Immunität?

1.4. Erkennung von Mikroorganismen durch die Zellen der natürlichen Immunität

Die Strategie der Erkennung durch das angeborene Immunsystem basiert auf der Detektierung von hochkonservierten, konstitutiv exprimierten Produkten des mikrobiellen Organismus, sogenannter „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP's) (Medzhitov and Janeway, 1998).

PAMP's besitzen drei allgemeine Merkmale, die sie zu idealen Kandidaten für eine solche Erkennung machen: Erstens, PAMP's werden nur von Mikroben und nicht vom Wirtsorganismus produziert. Hierdurch kann der Wirtsorganismus diese als „Nicht-Eigen“ erkennen. Zweitens, PAMP's variieren nicht zwischen Mikroorganismen einer bestimmten Klasse, so dass z.B. das hochkonservierte Lipid-A Muster von LPS es einem einzigen PAMP Rezeptor ermöglicht, die Gegenwart fast aller Gram-negativen Bakterien zu erkennen. Drittens, PAMP's sind für das Überleben von Mikroorganismen essentiell. Mutation oder Verlust sind entweder für den Mikroorganismus lethal oder gehen mit einer stark reduzierten Anpassungsfähigkeit einher. Daher bilden sich keine sogenannten „escape mutants“ (Medzhitov, 2001). Im Gegensatz zu induzierbaren Virulenzfaktoren werden PAMP's also konstitutiv exprimiert. Ebenfalls im Gegensatz zu Virulenzfaktoren werden sie jedoch auch von apathogenen Mikroorganismen exprimiert, so dass im Zuge der PAMP-Erkennung nur zwischen „Eigen“ und „Nicht-Eigen“ jedoch nicht zwischen „Pathogen“ und „Nicht-Pathogen“ unterschieden werden kann. Die genauen Mechanismen, durch welche diese

wichtige Unterscheidung ermöglicht wird, sind bislang größtenteils unbekannt. Da wir in konstantem Kontakt mit Kommensalen leben, würde eine kontinuierliche Aktivierung und die daraus resultierende Entzündungsreaktion zu schwerwiegenden, stark gesundheitsbeeinträchtigenden Folgen führen. Es wird diskutiert, dass durch Kompartimentierung (die intestinale Flora befindet sich z.B. nur an der luminalen Seite des Epithels), sowie durch anti-inflammatorische Zytokine, wie dem „transforming growth factor β “ (TGF- β) und Interleukin (IL)-10, eine Immunantwort gegen diese Kommensalen unterbunden wird (Medzhitov, 2001). So erkennen die TLRs nur diejenigen Mikroorganismen, welche in sonst „sterile“ Bereiche des Körpers eindringen.

Mit welchen Rezeptoren jedoch werden diese verschiedenen PAMP's durch den Wirtsorganismus erkannt?

1.5. Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind einfach-transmembrane Rezeptoren, die durch eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne sowie extrazelluläre leuzinreiche „Repeats“ (LRR) charakterisiert sind. Die TIR-Domäne gleicht dem zytoplasmatischen Anteil von Mitgliedern der IL-1 Rezeptorfamilie (Takeda and Akira, 2005).

Toll wurde in *Drosophila* als ein für die dorsoventrale Achsenentwicklung während der Embryogenese der Fruchtfliegen verantwortliches Protein entdeckt (Hashimoto et al., 1988). Durch die Entdeckung von Homologien zwischen dem *Drosophila*-Toll Signalweg und dem IL-1 Signalweg in Säugetieren konnte der Zusammenhang zwischen Toll und dem Immunsystem dieser Fliegen hergestellt werden. Dies konnte bald darauf mit einer Toll-mutanten Fruchtfliege bewiesen werden: Diese Fliege starb schnell an einer Infektion mit *A. fumigatus*, da sie nicht mehr in der Lage war, das fungizide Peptid „Drosomycin“ zu induzieren (Lemaitre et al., 1996). Interessanterweise wies diese Fliege eine normale Resistenz gegen Gram-negative Keime auf (Lemaitre et al., 1996). Diese Beobachtung führte zu der Entdeckung eines Gens, das für ein Protein kodiert, welches ein wichtiger Bestandteil eines Toll-unabhängigen Signalweges in *Drosophila* ist. Defekte in diesem „immune deficient“ (*imd*)-Gen gehen mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Gram-negativen Bakterien einher, da das antibakterielle Peptid „Diptericin“ nicht mehr induziert werden kann. Die Resistenz gegen Pilze und Grampositive Bakterien ist durch diese Mutation jedoch nicht beeinträchtigt (Lemaitre et al., 1996). Durch diese Entdeckung konnte der Beweis für eine Unterscheidung des Immunsystems der Fliege zwischen verschiedenen Pathogenen erbracht werden. Durch die Suche nach homologen Proteinen im Vertebraten-System sind heute für

1. Einleitung

Säugetiere 11 verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt und, für die meisten von ihnen, spezifische Liganden beschrieben (Takeda and Akira, 2002). Auch konnte die Relevanz der Toll-like Rezeptoren für die Bekämpfung von Pilzinfektionen durch zahlreiche Studien belegt werden (Roeder et al., 2004).

1.5.1. TLR4

Toll-like Rezeptor 4 war der erste charakterisierte Toll-like Rezeptor (Medzhitov et al., 1997). Dieser Rezeptor leitet das Erkennungs-Signal Gram-negativer Keime ins Zellinnere. Mäuse mit Mutationen in diesem Rezeptor, z.B. C3H/HeJ Mäuse, sind unempfindlich gegenüber bakteriellem Endotoxin (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998). Weitere bislang bekannte Liganden für TLR4 sind Lipoteichonsäuren (Takeuchi et al., 1999a), ein hitzelabiler, zell-assoziiertes Faktor von *Mycobacterium tuberculosis* (Means et al., 1999) und das Hitzeschockprotein Hsp60 (Ohashi et al., 2000), sowie Mannan von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* (Tada et al., 2002). Ausserdem erkennt TLR4 Taxol, Hyalouronsäure, Heparansulfat und Fibrinogen. Endogene Liganden benötigen jedoch sehr hohe Konzentrationen, um TLR4 zu aktivieren (Takeda and Akira, 2005).

TLR4 befindet sich im Säugetier vor allem auf Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie auf anderen Zellen des Immunsystems, z.B. B- und T-Zellen (Medzhitov et al., 1997). Die Verteilung dieses Rezeptors innerhalb der Zelle ist bisher nur für intestinale Epithelzellen, die Makrophagenzelllinie RAW264.7, Knochenmarkmakrophagen und Peritonealmakrophagen beschrieben worden (Hornef et al., 2002). Während in dieser Arbeit für die Makrophagen eine „eher diffuse“ zytoplasmatische Verteilung nachgewiesen wird, konnte in der Epithelzelllinie m-IC_{c12} eine Co-Lokalisation von TLR4 mit dem Golgi Apparat gezeigt werden. An der Erkennung von Lipopolysachhariden (LPS) durch Toll-like Rezeptor 4 ist nicht nur der Rezeptor allein beteiligt. Vielmehr erfolgt die Erkennung durch einen Molekülkomplex. Dieser beinhaltet ein „LPS Binding Protein“ (LBP), CD14, welches sich entweder löslich im Serum oder an einem Glykophosphoinositolanker an der Oberfläche von Makrophagen findet, sowie ein kleines Protein. Dieses kleine Protein, MD-2 genannt, besitzt keine Transmembranregion und wird an der Zelloberfläche assoziiert mit TLR4 gefunden. Seine genaue Funktion ist bislang unbekannt, es ist jedoch für die Erkennung von LPS durch TLR4 notwendig (Schroamm et al., 2001).

1.5.2. TLR2

Für TLR2 konnte eine Beteiligung an der Erkennung von Peptidoglycan von Gram-positiven Bakterien (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999b), Lipoarabinomannan der mykobakteriellen Zellwand (Takeuchi et al., 1999b; Means et al., 1999), Glykosylphosphatidylinositol-Lipid von *Trypanosoma cruzi* (Campos et al., 2001) und Zymosan des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* (Underhill et al., 1999), gezeigt werden. In der Arbeit von Underhill et. al. wird weiterhin eine spezifische Rekrutierung von TLR2 zu Zymosan-haltigen Phagosomennachgewiesen, sowie die durch eine Punktmutation im TLR2-Gen aufgehobene Entzündungsantwort auf Zymosan. Für TLR2 ist weithin bekannt, dass dieser im Zuge der Erkennung von Mikroorganismen Heterodimere mit TLR1 und TLR6 auszubilden vermag (Ozinsky et al., 2000). Ob diese Heterodimerisierung nach oder vor der Bindung an den Mikroorganismus erfolgt ist bislang nicht bekannt. Die Lokalisation von TLR2 scheint sich auf antigenpräsentierende Zellen und auf Endothelzellen zu beschränken (Muzio et al., 2000). Neuere Daten lassen den Schluß zu, dass TLR2 in nicht-stimulierten Makrophagen vor allem intrazellulär zu finden ist (Meng et al., 2004).

1.5.3. TLR1

TLR1 erkennt das native mykobakterielle 19-kDa Lipoprotein, sowie ein synthetisches tri-azyliertes Lipopeptid durch Bildung von Heterodimeren mit TLR2 (Takeuchi et al., 2002). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass TLR1 an der Erkennung des Oberflächenlipoproteins von *Borrelia burgdorferi* beteiligt ist (Alexopoulou et al., 2002).

1.5.4. TLR6

TLR6 erkennt das di-azylierte mykoplasmale Makrophagen-aktivierende Peptid MALP-2, in dem dieser ein Heterodimer mit TLR2 ausbildet (Takeuchi et al., 2001). Die konstitutive Expression von TLR1 und TLR6 erstreckt sich auf sehr viele verschiedene Zelltypen (Medzhitov, 2001).

1.5.5. TLR 3

TLR3 Erkennt Doppelstrang- (ds) RNA (Muzio et al., 2000), ein bekanntes virales Motiv. DsRNA wird von den meisten Viren im Laufe ihres Vermehrungszyklus gebildet und eignet sich daher als virales PAMP. TLR3 findet sich vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich, auf dendritischen Zellen (Muzio et al., 2000).

1.5.6. TLR 5

TLR5 erkennt bakterielles Flagellin (Hayashi et al., 2001). TLR5 wird an der basolateralen, nicht jedoch der apikalen Seite von intestinalen Epithelzellen exprimiert, wo er das Flagellin pathogener Bakterien, z.B. das von *Salmonella*, detektieren kann (Gewirtz et al., 2001). Ausserdem aktiviert Flagellin Lungenepithelzellen (Hawn et al., 2003), was bedeuten könnte, dass TLR5 ein wichtiges Werkzeug zu Erkennung von Mikroorganismen an Schleimhautoberflächen darstellt (Takeda and Akira, 2005).

Die polarisierte Expression könnte einen Mechanismus zur Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien darstellen, da sich die Bakterien der physiologischen Darmflora im gesunden Menschen nur intraluminal befinden und daher nicht mit diesem Rezeptor in Kontakt kommen. Denn im Unterschied zu pathogenen Bakterien sind die physiologischerweise vorkommenden Bakterien nicht in der Lage, die epitheliale Barriere zu durchbrechen und mit TLR5 in Kontakt zu treten. Diese Art polarisierte Expression wird auch für andere TLRs vermutet.

1.5.7. TLR 9

TLR9 erkennt die für Bakterien typische unmethylierte DNA bzw. unmethylierte CpG-Motive (Hemmi et al., 2002). Da der größte Teil der Säuger-DNA methyliert ist, kann so zwischen „Fremd“ und „Eigen“ unterschieden werden. Dass dies nicht immer einwandfrei funktioniert und TLR9 an der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen beteiligt sein kann, konnte Leandbetter et al. kürzlich nachgewiesen werden (Leandbetter et al., 2002). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass TLR9 neben bakterieller CpG-DNA virale CpG-DNA zu erkennen vermag (Lund et al., 2003; Krug et al., 2004). Die Erkennung setzt eine Internalisierung des zu detektierenden Agens in das späte lysosomale oder endosomale Kompartiment voraus (Hacker et al., 1998). Die genaue subzelluläre Lokalisation von TLR9 ist jedoch bis heute nicht bekannt.

1.5.8. TLR7, TLR8, TLR10

Das antivirale Medikament, R-848, ein Ubiquimod-Analogon, stimuliert im humanen System über die TLR7 und TLR8 (Jurk et al., 2002), während sein Signal im Maussystem nur über TLR7 und nicht über TLR8 weitergeleitet wird (Hemmi et al., 2002).

Ausserdem konnte für TLR7 ein weiterer synthetischer Ligand identifiziert werden: Loxoribine, welches antivirale Eigenschaften besitzt (Heil et al., 2003; Lee et al., 2003). Abgesehen von diesen synthetischen Liganden konnte kürzlich gezeigt werden, dass TLR7

und humaner TLR8 Guanosin- oder Uridin-reiche ssRNA von Viren wie dem HI Virus und dem Influenza Virus erkennt (Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004).

Wirtseigene ssRNA wird nicht durch diese Rezeptoren wahrgenommen, wahrscheinlich, da dass TLR7 und TLR8 im Endosom exprimiert werden und wirtseigene ssRNA nicht dorthin gelangt.

Für TLR10 wurden bisher gar keine Liganden beschrieben (Medzhitov, 2001), ausserdem wird vermutet, dass im Maussystem kein funktioneller TLR10 existiert, da das C-terminale Ende durch eine nichtverwandte, unproduktive Sequenz ersetzt wurde (Takeda and Akira, 2005).

TLR7 wird von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs), sowie von myeloiden dendritischen Zellen (MDCs), exprimiert während sich TLR8 in Monozyten findet (Kadowaki et al., 2001).

1.5.9. TLR11

Für den erst kürzlich identifizierten TLR11 konnte gezeigt werden, dass dieser in Blasenepithelzellen exprimiert wird und in Mäusen Resistenz gegen eine Infektion mit uropathogenen Bakterien vermittelt (Zhang et al., 2004). Ein Ligand konnte bis heute noch nicht identifiziert werden, es liegt jedoch der Schluß nahe, dass TLR11 an der Erkennung uropathogener Bakterien beteiligt ist. Beim Menschen existiert kein funktioneller TLR11, da durch ein Stopcodon in seiner Gensequenz dieser nicht „hergestellt“ werden kann (Zhang et al., 2004).

1.5. Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch TLRs

Die Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch TLRs führt zu einer Induktion verschiedenster an der Immunantwort beteiligter Gene, wobei unterschiedliche Genmuster exprimiert werden können, je nachdem, welcher dieser Rezeptoren aktiviert wird (Toshchakov et al., 2002). Diese Gene unterliegen der Kontrolle bestimmter Transkriptionsfaktoren, welche durch die Aktivierung via Toll-like Rezeptoren von ihrem Inhibitor befreit werden und in den Kern translozieren können. Ein solcher Transkriptionsfaktor ist der nukleare Faktor kappa B (NF- κ B).

1. Einleitung

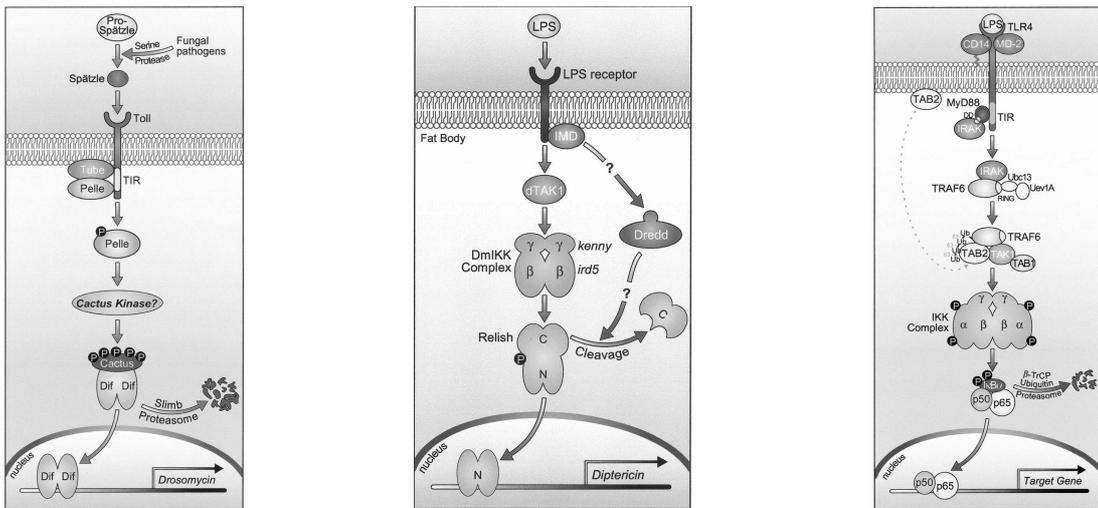


Abb. 3: Schematische, vereinfachte Darstellung der Signalwege in Drosophila und im humanen System, die zu NF- κ B Translokation und konsekutiver Transkription der abhängigen Gene führen.

1.6.1. NF- κ B

NF- κ B ist ein hochkonservierter Transkriptionsfaktor, der aus zwei Untereinheiten besteht, welche homo- oder heterodimerisieren können. Die häufigste Form besteht aus den Untereinheiten RelA (p60) und p58. In der ruhenden Zelle sind diese beiden Untereinheiten an den Inhibitor of KappaB (I- κ B) gebunden. Durch ein Aktivierungssignal, z.B. via Toll-like Rezeptoren, TNF- α Rezeptoren oder Interleukinrezeptoren wird dieser Inhibitor I- κ B durch eine Kinase N-terminal phosphoryliert und später im Proteasom abgebaut. Die durch die Phosphorylierung von I- κ B frei gewordenen Untereinheiten RelA und p58 können nun in den Kern translozieren, wo sie in Promotorregionen bestimmter Gene an die DNA binden, um die Transkription dieser Gene zu aktivieren. (Silverman and Maniatis, 2001).

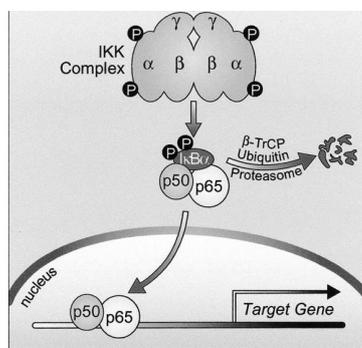


Abb. 4: Schematische Darstellung der I- κ B Phosphorylierung und anschließender Degradation sowie der Translokation beider Untereinheiten von NF- κ B in den Zellkern.

NF- κ B wird auch als der „zentrale Mediator der Immunantwort“ bezeichnet (Pahl, 1999). Unter den über 150 von NF- κ B kontrollierten Genen findet sich eine Großzahl von Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind. An der Pathogenerkennung beteiligte Proteine, wie MHC-Moleküle, sowie Antigen-präsentierende Proteine und Rezeptoren, die für die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an die Gefäßwand, sowie deren Migration durch dieselbe verantwortlich sind, besitzen in ihrer Promotor/ Enhancerregion eine sogenannte „ κ B Site“, eine Bindungsstelle für NF- κ B. Dies gilt auch für 27 verschiedene Zytokine und Chemokine ebenfalls, darunter TNF- α , IL-6 und das murine IL-8 Analogon MIP-2, sowie NO (Pahl, 1999). Wie kann jedoch ein einziger Transkriptionsfaktor eine solche Fülle von Genen kontrollieren und trotzdem eine relativ spezifische Immunantwort garantieren? Verschiedene Mechanismen sind für die Selektivität von NF- κ B verantwortlich:

1. häufig enthält die Promotor/Enhancer Region bestimmter Gene verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, so dass für eine effektive Transkription des betreffenden Gens die Bindung von mehr als einem Transkriptionsfaktor notwendig ist und
2. weiterhin können unterschiedliche NF- κ B Proteine spezifisch aktiviert werden, sowie unterschiedliche Homo- oder Heterodimere gebildet werden.

Wie kann jedoch die erfolgte Aktivierung wieder herunterreguliert werden? Die Aktivierung von NF- κ B unterliegt einem selbstlimitierenden Mechanismus: neu Synthetisiertes I- κ B ist in der Lage, in den Kern einzudringen und dort die Bindung von NF- κ B an die DNA zu unterbinden (Zabel and Baeuerle, 1990; Zabel et al., 1993).

1.7. Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die natürliche Immunität spielt bei der Erkennung und Eliminierung von *A. fumigatus* eine entscheidende Rolle. Dieser Prozeß findet ständig in uns statt, und funktioniert so gut, dass jeder gesunde Mensch eine invasive Aspergillose nicht zu fürchten braucht.

Mit welchen Werkzeugen und Mechanismen unser Immunsystem den Schimmelpilz *A. fumigatus* wahrzunehmen und zu eliminieren vermag, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Auch konnte bisher nicht geklärt werden, warum ausgerechnet *A. fumigatus* invasive Aspergillose verursacht, obwohl seine Sporen nur einen kleinen Prozentsatz der in der Luft vorhandenen *Aspergillus* Sporen ausmachen. Bisher konnten keine Virulenzfaktoren identifiziert werden, deren Abwesenheit die Invasivität und Tödlichkeit dieses Pilzes vollständig supprimiert (Latge, 2001; Stynen et al., 1995; Rementeria et al., 2005). Ob ein

1. Einleitung

Unterschied in der immunologischen Antwort zwischen pathogenen und apathogenen Pilzen der Gattung *Aspergillus* besteht ist ebenfalls bis heute nicht bekannt.

Um betroffenen Patienten in Zukunft besser helfen und um Risikopatienten besser schützen zu können, ist es unerlässlich, den Prozeß der Eliminierung durch das Immunsystem besser zu verstehen. Dies war das Ziel dieser Arbeit

Toll-like Rezeptoren sind wichtige Werkzeuge der natürlichen Immunität. Ob sie bei der Erkennung von *A. fumigatus* eine Bedeutung haben und ob der Verlust bestimmter Toll-like Rezeptoren zu einem Ausbleiben der Immunantwort im Maussystem, oder zu einer Veränderung derselben führt, sollte mit dieser Arbeit untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit gab es dazu bereits erste Hinweise: Wang et al. beschreiben 2001 die Notwendigkeit der Anwesenheit eines funktionellen TLR4 für die adäquate Zytokinproduktion von humanen Blut-Monozyten als Antwort auf die Stimulation mit Hyphenmaterial von *A. fumigatus* in vitro (Wang et al., 2001). Jedoch konnten bis zu diesem Zeitpunkt die Beteiligung anderer TLRs nicht getestet werden und daher war nicht bekannt, ob nicht auch andere TLRs an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt sind.

Durch Transfektion von humanen HEK293 Zellen wurden mit dieser Arbeit diejenigen TLRs identifiziert, die das Erkennungs-Signal von *A. fumigatus* in das Zellinnere weiterleiten. Die so für das humane System identifizierten Rezeptoren wurden mit Hilfe von Knock-out-Mäusen genauer auf ihrer Bedeutung für die Antwort auf *A. fumigatus* im Mausmodell untersucht. Ob eine Rekrutierung von TLRs, wie sie bereits von Underhill et al. für Zymosan von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden konnte, auch im Zuge der Erkennung von *A. fumigatus* stattfindet, sollte ebenfalls beschrieben werden. Ob diese Effekte ausschließlich für die Situation in vitro eine Bedeutung haben oder ob sich die Ergebnisse auch auf die Situation in vivo übertragen lassen, wurde schließlich mit Hilfe eines Infektions-Modells in der Maus untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

LPS von *Escherichia coli* O127:B7 : SIGMA (Taufkirchen, Deutschland)

LPS hochaufgereinigt, von *Salmonella minnesota* R595(Re): List Biological Laboratories (Campbell, CA, USA)

Synthetisches Triamytol-Cysteinyl-Seryl-(Lysyl)³-Lysin (P₃CSK): EMC Microcollections (Tübingen, Deutschland)

Das Oligonukleotid ODN 1668 (TCCATGACGTTTCCTGATGCT) wurde von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) kommerziell in einer Phosphothioate-geschützten Form synthetisiert.

Murines IFN- γ : Prepotech (London, U.K.)

TNF- α : R&D Systems (Minneapolis, USA)

Bakteroides: Carsten Kirschning, TU München

Die Zellkulturmaterialien wurden alle (falls nicht anders angegeben) von Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland) hergestellt.

Fetales Kälberserum: Roche (Mannheim, Deutschland)

Normales Ziegenserum: Jackson Immuno Research (Dianova, Hamburg)

Amphotericin B: SIGMA (Deisenhofen)

Agarose: SIGMA (Deisenhofen)

Polymyxin B: SIGMA (Deisenhofen)

PCR Materialien: Invitrogen (Karlsruhe)

Taq Polymerase Gold: Perkin-Elmer (Weiterstadt)

Gries-Reagenzien: SIGMA (Deisenhofen)

DNA-Aufreinigungskit: Qiagen (Hilden)

MvA1 (schneidet punktmutiertes TLR4-Gen): Fermentas, St. Leon-Rot

Limulus-Materialien: LAL Kinetic QCL der Firma MWG Biotech (Ebersberg), Software:

λ QCG, Glukanblock: BIOZYM (Hess Olendorf)

Antikörper (α -p65, α - ConA, α - TLR2, α -FLAG,

Ziege anti-Kaninchen Cy3 und Cy5) Dianova (Hamburg)

Kaninchen anti-TLR4: Hornef Karolinske Institute (Stockholm)

Kaninchen anti-TLR2: Carsten Kirschning (TU München)

2. Material und Methoden

2.1.1. Pilzstämme

Der *Aspergillus fumigatus*-Stamm NCTC2109 (ATCC 46645) wurde aus einem Patienten mit Invasiver Aspergillose isoliert (Hearn and Mackenzie, 1980).

Der „green fluorescent protein“(GFP^{*})-exprimierende *A. fumigatus*-Stamm wurde durch Klonierung eines GFP^{*}-Gens unter Kontrolle eines Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-Promotors in den Stamm NCTC 2109 hergestellt.

Der *Aspergillus niger*-Stamm DSM737 (ATCC 32656) ist ein nicht-pathogenes Umwelt-Isolat.

2.1.2. GFP

Hierbei handelt es sich um ein sehr stabiles Protein. Es stammt aus der grün leuchtenden Qualle *Aequoera victoria*. Es besteht aus 238 Aminosäuren und emittiert Licht einer Wellenlänge von 509nm, wenn es mit einer Wellenlänge von 400 nm angeregt wird.

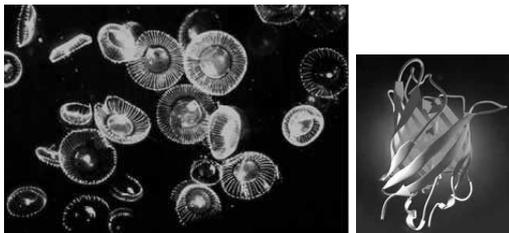


Abb. 5: Darstellung der Qualle *Aequoera victoria* sowie der dreidimensionalen Proteinstruktur von GFP. Quelle: www.plantsci.cam.ac.uk/Haselhoff/GFP/GFPbackgrnd.html

2.1.3. Zelllinien

HEK293

„Human Embryonic Kidney“ (HEK) 293 (ATCC CRL-1573) ist eine humane Nierenzelllinie. Um diese Zelllinie herzustellen, wurden primären Nierenzellen mit gescherter Adenovirus 5 DNA transformiert (Graham et al., 1977).

HEK 293 Zellen wurden in DMEM, welches mit 5% FCS und 1:100 Verdünnungen von Penicillin- (10.000 U/ml) und Streptomycin-Stammlösungen (10.000µg/ml) (Pen/Strept) versetzt wurde, gehalten.

A549

Die Zelllinie A549 (ATCC CCL-185) wurde 1972 aus einem Lungentumor eines 58 jährigen Mannes gewonnen (Giard et al., 1973).

A549 Zellen wurden in RPMI 1640, welches mit 2% FCS und 1% Pen/ Strept versetzt wurde, kultiviert.

J774

Die Zellen der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774A.1 (ATCC TIB-67) wurden ursprünglich aus einem Sarkom des retikulären Gewebes einer BALB/c Maus isoliert (Ralph and Nakoinz, 1977; Ralph et al., 1976). Die Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J774A.1 wurden in RPMI 1640-Medium mit in 5% FCS, 1% Glutamin und Pen/Strept (s.O.) angezogen.

P-388D1

Die Makrophagen-ähnliche Zelllinie P-388D1 wurde ursprünglich aus dem Aszites einer an Leukämie erkrankten DBA/2 Maus isoliert. Die Leukämie dieser Maus wurde durch Methylchloanthren induziert. Von den so gewonnenen Zellen wurden diejenigen isoliert, welche IL-1 zu produzieren vermochten und in der Lage waren, Latex- und Zymosanpartikel zu phagozytieren (Koren et al., 1975).

Die Zellen der murinen Monozyten-Makrophagenzelllinie P388D1 (ATCC288) wurden in RPMI 1640- Medium mit 5% FCS, 1% Glutamin und 1% Pen/ Strept gezogen.

RAW 264.7

Die Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW 264.7 (ATCC TIB-71) wurde aus einem Tumor einer BALB/c Maus isoliert, der durch das Abelson-Maus-Leukämie-Virus hervorgerufen wurde (Ralph and Nakoinz, 1977).

Die Zellen der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurden ebenfalls in 5% FCS und 1% Pen/Strept gezogen

2.1.4. Plasmide

Folgende Plasmide wurden für die Transfektionsexperimente eingesetzt und uns bis auf die genannten Ausnahmen von Dr. Carsten Kirschning von der TU München zur Verfügung gestellt.

- ein NF- κ B abhängiges ELAM1-Promotor-Konstrukt (Schindler and Baichwal, 1994)
- ein RSV-Promotor β -Galaktosidase Reporterplasmid
- ein MD2-Expressionsplasmid (dieses wurde uns freundlicherweise von Dr. Myake zur Verfügung gestellt (Akashi et al., 2001).

2. Material und Methoden

- verschiedene CMV-Promotor regulierte Expressionsplasmide verschiedener humaner Toll-like Rezeptoren.

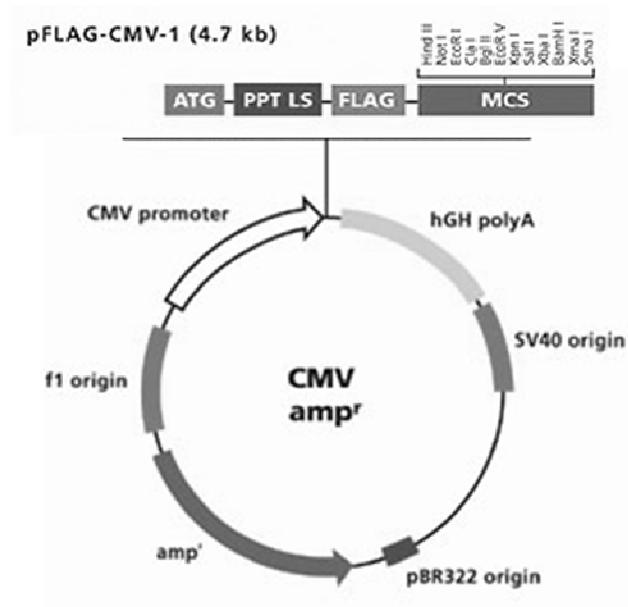


Abb. 6: Darstellung des pFLAG-CMV Promotors Quelle: www.sigma-aldrich.com

Die Expressionsplasmide mit dem hTLR2- und hTLR4-Gen wurden uns freundlicherweise von Tularik Inc. (South San Francisco, USA, (Hirschfeld et al., 1999) zur Verfügung gestellt.

2.1.5. Mausstämme

Bezeichnung	Alter	Herkunft
C3H/HeN	6-10 Wochen	CharlesRiver (Sulzfeld, Deutschland)
C3H/HeJ	6-10 Wochen	Charles River
C3H/HeN/TLR2 ^{-/-}	6-10 Wochen	Tularik (South Francisco, USA)
C3H/HeJ/TLR2 ^{-/-}	6-10 Wochen	
C57BL	6-10 Wochen	Charles River
C57BL/CD14 ^{-/-}	6-10 Wochen	Dr. A. Sing

Beschreibung der Mutationen

C3H/HeJ

Bereits seit über 30 Jahren war eine Variante des Mausstammes C3H/HeN bekannt, die keine Antwort auf bakterielles Lipopolysaccharid zeigt, eine sogenannte „LPS non-responder“-Maus (Sultzer, 1968b; Sultzer, 1968a). Die molekulare Grundlage dieses Defekts wurde erst 1998 aufgeklärt, als eine Punktmutation im Toll-like Rezeptor (TLR)4 der C3H/HeJ-Maus identifiziert werden konnte, bei der ein Cytosin an Position 2342 durch ein Adenin ersetzt wurde. Dies führt zu einem Austausch eines Prolins durch ein Histidin an Position 712 der Polypeptidkette, woraus wiederum ein nicht mehr funktionelles, jedoch stabiles TLR4-Molekül resultiert (Poltorak et al., 1998).

C3H/HeN/TLR2-/-

Bei dieser Maus wurde das TLR2-Gen gezielt durch Insertion einer Neomycin-Kassette durch homologe Rekombination inaktiviert (Werts et al., 2001). Dieser Mausstamm wurde uns freundlicherweise von Tularik (South Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Hergestellt wurde sie von Deltagen (Menlo Park, USA) im Auftrag von Tularik.

C3H/HeJ/T2-/-

Original Sv129*B57BL/6/TLR2-/- Mäuse wurden fünffach mit dem genetischen C3H Hintergrund (TLR2-/-TLR4+/+) Stamm rückgekreuzt. Durch die Kreuzung mit dem TLR2+/-TLR4d/d-Stamm doppeldefiziente (C3H/HeJ/TLR2-/-) Mäuse (TLR2-/-TLR4d/d) hergestellt (Vabulas et al., 2002a). Passende Mäuse von homozygoten Brutpaaren der vier Genotypen wurden in unseren Experimenten eingesetzt.

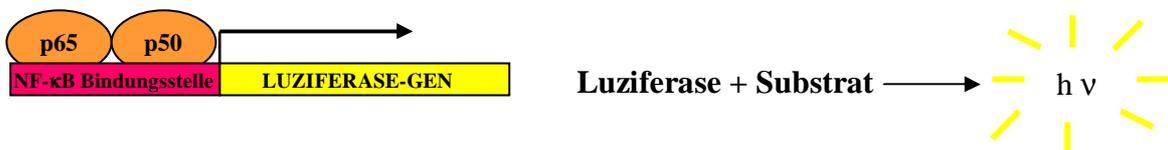
2.2. Methoden

2.2.1. Transiente Transfektion von HEK293 Zellen mit humanen TLRs 1-10

Die Zellen der humanen Zelllinie HEK 293 sind unempfindlich gegen unterschiedliche PAMP-Stimuli, da sie keine entsprechenden Rezeptoren besitzen. Sie sind jedoch sensitiv gegenüber TNF- α und dem Interleukin (IL)-1 β (Graham et al., 1977).

Jeweils 10^5 Zellen wurden in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät und parallel mit 4 Plasmiden transfiziert:

- 1.) Mit einem Plasmid mit einem NF- κ B abhängigen Luziferase-Reportergenkonstrukt mit Elementen des ELAM-1 Promotors (Schindler and Baichwal, 1994)



- 2.) Mit einem Plasmid, das für ein Rous Sarcoma Virus (RSV) β -Galaktosidase Genkonstrukt kodierte, durch welches die Transfektionseffizienz überprüft werden konnte.
- 3.) Mit einem Plasmid, das für für das Adaptorprotein MD-2 kodiert.
- 4.) mit einem Plasmid, unter dem jeweils einer der 10 bekannten humanen TLRs konstitutiv unter einem CMV-Promotor exprimiert wird.



Um dies zu bewerkstelligen, wurde die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode angewendet (Regnier et al., 1997b).

Lösungen

Lösung 1

- 2,0 M steril filtriertes CaCl₂,

Lösung 2: 2fach HBS

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 4,3 mM Na₂HPO₄
- 1,47 mM KH₂PO₄
- pH 7,1

2. Material und Methoden

- steril filtriert

Procedere:

10⁵ HEK293 Zellen wurden in jeweils ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte Platte (TPP, Schweiz) ausgesät und nach der Kalziumphosphatmethode (Regnier et al., 1997a) mit den oben angegebenen Plasmiden transfiziert.

Transiente Transfektion von A549 Zellen mit FLAG-markiertem humanem TLR4

Um die Lokalisation von hTLR4 in denjenigen Zellen zu bestimmen, die die erste Barriere für das Eindringen von *Aspergillus* in den menschlichen Körper darstellen, wurden Zellen der alveolaren Epithelzelllinie A549 mit dem oben beschriebenen FLAG-markierten hTLR4 mit dem Effectene Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben transfiziert.

Procedere

Jeweils 1,5* 10⁵ Zellen wurden in einer 24 Well Platte (TPP, Schweiz) auf sterile Deckgläschen ausgesät und nach 12h nach Herstellerangaben mit dem Effectene Kit (Qiagene) transfiziert.

2.2.2. Verifizierung der Genotypen der Mäuse mittels Polymerasekettenreaktion

Um zu beweisen, daß der angegebene Genotyp der Mäuse den Tatsachen entsprach, wurde eine Analyse der angeblich veränderten Genabschnitte der Mäuse vorgenommen.

Methodik der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur gezielten Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, welcher von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt wird. Durch Erhitzen werden DNA-Doppelstränge voneinander getrennt (denaturiert), anschließend wird die Reaktion wieder abgekühlt, so daß sich sogenannte Oligonukleotidprimer, welche aus kurzen, einzelsträngigen DNA-Molekülen bestehen, die komplementär zu den Enden der definierten Sequenz der DNA-Matritze („Template“) sind, anlagern können (Hybridisierung). Die 3' Enden der dadurch entstandenen Doppelstrangstücke bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche die zugefügten dNTP's zu einem Strang verlängert (Extension). Auf diese Art und Weise wird der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt.

Zusammensetzung eines PCR- Reaktionsansatzes (allg.)

2. Material und Methoden

- Primer A
- Primer B
- 10fach PCR-Puffer
- dNTP's
- Taq Polymerase
- H₂O
- Template
- evtl. BSA

Allgemeiner Ablauf eines PCR Programmes

Reaktionsschritt	Temperaturbeispiel	Zeitbeispiel
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	50°C	30 s
Extension	72°C	3 min

Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Zusammensetzung der Primer:

C≡G: 4°C

A=T: 2°C

Gewinnung muriner DNA Materials durch Lyse von Schwanzspitzen

PBND (PCR-Buffer With Non-Ionic Detergents) - Puffer:

für 500ml:

50 mM KCl

10 mM Tris pH 8,3

2,5 mM MgCl₂

0,1 mg/ml Gelatine

0,45% NP40

0,45% Tween 20

ad 500 ml H₂O, autoklavieren, Lagerung bei -20°C

Übernachtverdau der Schwanzspitzen:

2. Material und Methoden

- 2mm Mausschwanz
- 200µl PBND-Puffer
- 1µl ProteinaseK 10mg/ml

Übernachtverdau bei 55°C

Am nächsten Morgen wurde das Lysat 2min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Verdau 15min bei 95°C gekocht, um die ProteinaseK zu inaktivieren.

Das so gewonnene DNA Material wurde 1:10 in PCR Wasser verdünnt.

Oligonukleotide

Name	5´-3´Nukleotidsequenz
3195	GGG CCA GCT CAT TCC CAC TCA T
3518	CTT CCT GAA TTT GTC CAG TAC AGG G
3519	TCG ACC TCG ATC AAC AGG AGA AGG G
F6mt4	T GTC AGT GGT CAG TGT GAT TG
R1mt4	TCA GGT CCA AGT TGC CGT TTC
oIMR1314CD14wt	CAA AGT TTT AGC GCT GCG TAA C
oIMR1315CD14wt	GCC AGC CAA GGA TAC ATA GCC

PCR Ansätze

Reagenz	TLR2	TLR4	CD14wt	NEOCD14
Primer A	2µl	5µl	2µl	2µl
Primer B	2µl	5µl	2µl	2µl
Primer C	2µl	-	-	-
PCR Wasser	11µl	26,5µl	11,3µl	11,3µl
Taq Polymerase	0,5µl	0,5µl	0,7µl	0,7µl
10fach Puffer	2,5µl	5µl	2µl	2µl
dNTP´s	2µl	5µl	2µl	2µl
1%BSA in PBND	1µl	2µl	-	-
Template	2µl	2µl	0,5µl	0,5µl
Gesamtvolumen	25µl	50µl	20µl	20µl

PCR Programm zur Amplifikation der TLR2- und TLR4-Gene

2. Material und Methoden

	Temperatur	Dauer	Steigung	Bemerkung
Schritt 1	94°C	5 min	2°C/s	
Schritt 2	94°C	1 min	2°C/s	Schleifenbeginn
Schritt 3	59°C	30 s	2°C/s	
Schritt 4	70°C	1 min	2°C/s	Schleifenende
Schritt 5	72°C	2 min	2°C/s	
Schritt 6	4°C	∞	2°C/s	
Heizdeckel Temp.	105°C			

Schleife: Schritt 2-4 30 mal;

PCR Programm zur Amplifikation des CD14-wt-Gens

	Temperatur	Dauer	Steigung	Bemerkung
Schritt 1	94°C	3 min	2°C/s	
Schritt 2	94°C	30 s	2°C/s	Schleifenbeginn
Schritt 3	54°C	30 s	2°C/s	
Schritt 4	72°C	30 s	2°C/s	Schleifenende
Schritt 5	72°C	2 min	2°C/s	
Schritt 6	4°C	∞	2°C/s	
HD Temp.	104°C			

Schleife: Schritt 2-4 35 mal;

PCR Programm zur Amplifikation des Neo-CD14-Gens

	Temperatur	Dauer	Steigung	Bemerkung
Schritt 1	94°C	3 min	2°C	
Schritt 2	94°C	20 s	2°C	Schleifenbeginn 1
Schritt 3	64°C	30 s	2°C	
Schritt 4	72°C	35 s	2°C	Schleifenende1
Schritt 5	94°C	20 s	2°C	Schleifenbeginn 2

2. Material und Methoden

Schritt 6	58°C	30 s	2°C	
Schritt 7	72°C	35 s	2°C	Schleifenende 2
Schritt 8	72°C	2 min	2°C	
Schritt 9	4°C	∞	2°C	
HD Temp.	104°C			

Schleife 1: Schritt 2-4 12 mal; Schleife 2: Schritt 5-7 25 mal;

Aufreinigung der PCR Produkte mit dem “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen)

Der “QIAquick PCR Purifikation Kit” dient der Aufreinigung von PCR Produkten. Die DNA bindet während des Vorgangs in Anwesenheit hoher Konzentrationen von chaotropem Salz an eine Silicia-Matrix, während Kontaminationen durch die Säulchen laufen. Die so gereinigte DNA wurde mit Wasser eluiert.

Verdau der PCR-Produkte

Durch die oben beschriebene Mutation der C3H/HeJ-Maus entsteht eine Schnittstelle für das Enzym MvaI, welche bei der C3H/HeN Maus nicht vorkommt. Diese neue Schnittstelle läßt sich durch Verdau der TLR4-PCR-Produkte nachweisen, da in der anschließenden Gelelektrophorese statt 2 (C3H/HeN), sondern 3 (C3H/HeJ) Fragmente sichtbar werden.

Zu der in Wasser eluierten, aufgereinigten DNA wurde 1µl MvaI (Enzym) (Fermentas) sowie die dem Volumen entsprechende Menge an 10fach R⁺ Puffer zugefügt und der Ansatz bei 37°C 3h verdaut.

Agarose Gelelektrophorese

TEA Puffer:

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0

Für die Gelelektrophorese der gereinigten und verdauten DNA-Fragmente des TLR4-Gens wurde ein 4% iges Gel gegossen: Hierzu wurden 4 g Agarose in 100 ml TEA-Puffer gelöst und auf 100 °C erhitzt

Für die Gelelektrophorese der DNA-Fragmente der restlichen Gene wurde ein 1% iges Gel gegossen: hierzu wurde 1 g Agarose in 100ml TEA-Puffer gelöst und auf 100 °C erhitzt

Nach Erhärten des Gels wurden die Proben in 6-fach Puffer aufgenommen (fünf Teile Probe, ein Teil Puffer) und in die Taschen des Gels aufgetragen.

2. Material und Methoden

Anschließend wurde das Gel 10 min in ein Ethidium-Bromid-Bad 1 µg/ml eingetaucht und unter UV-Licht ausgewertet

Erwartete PCR Ergebnisse

Mausstamm	gesuchter Rezeptor	Erwartete Anzahl der Fragmente	Erwartete Größe der Fragmente
C3H/HeN	TLR4	Doppelbande	300 und 350 kb
C3H/HeJ	TLR4	2	300 kb und 400 kb
C3H/HeN/TLR2-/-	TLR4	Doppelbande	300 und 350 kb
C3H/HeJ/TLR2-/-	TLR4	2	300 kb und 400 kb
C3H/HeN	TLR2	1	499 kb
C3H/HeJ	TLR2	1	499 kb
C3H/HeN/TLR2-/-	TLR2	1	334 kb
C3H/HeJ/TLR2-/-	TLR2	1	334 kb
CD14-/-	neo CD14	2	334 kb und < 134
C3H/HeN	CD14wt	2	499 kb und < 134

2.2.3. Gewinnung der murinen Primärmakrophagen mittels Peritoneallavage

6 bis 10 Wochen alten Mäusen wurde jeweils 1ml Proteose-Pepton steril injiziert. Nach 3 Tagen wurden diese durch CO₂-Begasung getötet, auf einer Styroporplatte fixiert und das Fell des Bauchraums vorsichtig abpräpariert. Mit einer Kanüle wurden 5 ml eiskaltes, steriles PBS (Gibco) injiziert und anschließend durch einen feinen Schnitt in der Bauchdecke hindurch mit einer Pasteur-Pipette aspiriert. In dieser aspirierten Flüssigkeit befanden sich die Makrophagen, welche dann gezählt, abzentrifugiert (5 min 300 x g) und in RPMI- Medium, angereichert mit 5% FCS, 100U/l Penicillin, 100mg/l Streptomycin (alles Gibco), überführt wurden.

2.2.4. Aussäen der Makrophagen

Aussäen für die Immunfluoreszenz

Jeweils $3,5 \cdot 10^5$ Makrophagen /Well wurden in einer 24-Well-Platte, in welcher in jedes Well zuvor ein steriles Deckgläschen aus Glas gelegt worden war, ausgesät. Ausgesuchte Wells wurden mit 10 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Volumen pro Well: 1 ml.

Aussäen für den TNF- α ELISA, den MIP-2 ELISA und den NO-Assay

Jeweils $1,5 \cdot 10^5$ Makrophagen/Well wurden in einer 96-Well-Platte (TPP, Zellkultur-Testplatte) ausgesät. Ausgesuchte Wells wurden mit 10 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Volumen pro Well: 200 μ l.

Alle Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am nächsten Morgen durch Auf- und Abpipettieren des Mediums gewaschen, um die nicht-adherenten Zellen zu entfernen. Das gesamte Medium wurde anschließend erneuert, das eventuelle IFN- γ (je nach Ansatz) erneut zugegeben.

2.2.5. Gewinnung des *Aspergillus* -Myzels

In einem zuvor 2 h bei 250°C sterilisierten 500 ml Glaskolben wurden $6 \cdot 10^8$ Wildtyp-Sporen in 100ml dialysiertem (Cutt off: 6-8 kD) YG-Medium mit 1% Pen/Strept eingimpft und bei 37°C und 100 U/min 22h lang geschüttelt (Schüttler: Braun, Melsungen).

In der anschließenden Mikroskopie zeigten sich keine Bakterien, aber quantitativ aus den Sporen ausgekeimte Hyphen mit einer Länge von ca 80-100 μ m.

Das Hyphenmaterial wurde 10 min bei 2500*g abzentrifugiert. Das Feuchtgewicht wurde durch Absaugen auf einen Zellulosefilter (Schleicher&Schuell), Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und anschließendes Wiegen auf einer Feinwaage (Mettler AE50) bestimmt (6 g).

Durch Auf- und Abpipettieren in verschiedenen Kanülen (Braun)

- 10 mal mit einer Kanüle des Durchmessers 1,2
- 10 mal mit einer Kanüle des Durchmessers 0,8
- 6mal mit einer Kanüle des Durchmessers 0,55*25 mm

wurde das Myzel geschert und auf eine Konzentration von 50 mg/ml in sterilem, endotoxinfreien PBS verdünnt.

2.2.6. Abtöten des *Aspergillus*-Myzels

Abtöten des Myzels mittels Ethanol

Das Myzel wurde in 70%igem Ethanol aufgenommen und 1 h inkubiert. Anschließend wurde es abzentrifugiert, in sterilem PBS aufgenommen und auf diese Weise 3mal gewaschen.

Abtöten des Myzels mittels Amphotericin-B

A. fumigatus Hyphenfragmente wurden 12 h mit 10 mg/ml Amphotericin-B behandelt und anschließend 3 mal mit sterilem PBS gewaschen.

2.2.7. Abtöten der *Aspergillus* Konidien

Abtöten der Konidien mittels Ethanol

Etwa $6 \cdot 10^8$ Sporen in 1 ml PBS wurden 5 min bei 10.000*g abzentrifugiert und in 70%igem Ethanol aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation wurden sie erneut abzentrifugiert, in sterilem PBS aufgenommen und auf diese Weise 3 mal gewaschen, danach erneut in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und gezählt.

Abtöten der Konidien mittels UV- Bestrahlung

In zuvor 2h bei 250°C sterilisierten Petrischalen aus Glas wurden jeweils $6 \cdot 10^8$ Sporen in 1 ml PBS hineinpipettiert und angetrocknet. Anschließend wurden die so am Boden der Petrischale angetrockneten Sporen 1h lang mit einer UV-Lampe direkt bei geöffnetem Deckel bestrahlt.

Danach wurden die Sporen wieder in steriles PBS aufgenommen und gezählt.

2.2.8. Propidium-Jodid(PI)-Färbung der Konidien

Um festzustellen, ob die auf verschiedene Weise abgetöteten Konidien wirklich tot waren, wurden diese mit Propidium-Jodid (PI) inkubiert. Auf diese Weise können lebende von toten Konidien unterschieden werden, da der Farbstoff erst nach Schädigung der Plasmamembran, wie dies z.B. bei Nekrose stattfindet, an die DNA anlagern kann. Nekrotische Zellen färben sich rot, während lebende Zellen farblos bleiben.

Propidium-Jodid-Färbeprotokoll

Etwa 10^6 Konidien wurden 10 min bei 10.000 g abzentrifugiert und in 300 µl einer PI-Lösung der Konzentration 50 µg/ml aufgenommen. Nach 20 minütiger Inkubation bei

2. Material und Methoden

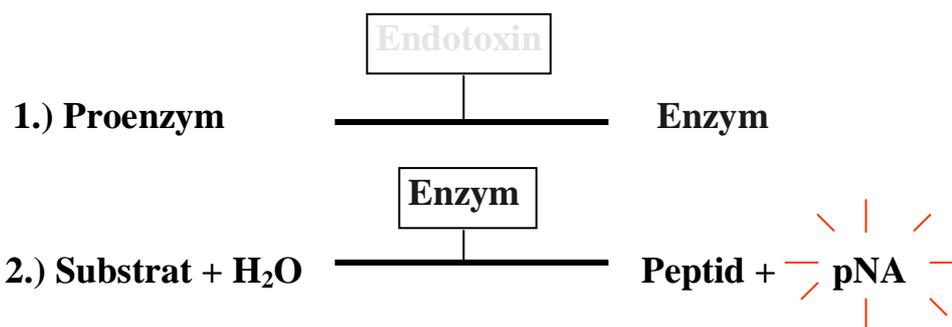
Raumtemperatur wurden die Konidien erneut abzentrifugiert und auf diese Weise 3mal mit PBS gewaschen.

Auswertung

Die so gefärbten Konidien wurden auf einen Objektträger aufgebracht und im Immunfluoreszenz-Mikroskop (Leica) ausgewertet.

2.2.9. Limulus Assay

Um zu testen, ob die zur Stimulaton eingesetzten Materialien frei von LPS waren, wurde u.a. der LIMULUS-Test der Firma Biotech eingesetzt. Beim diesem Test wird ein Protein aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* eingesetzt, um bakterielles Endotoxin zu detektieren. Das Prinzip dieses hochsensitiven LIMULUS-Tests beruht auf folgenden Reaktionen.



p-Nitroanillin (pNA) kann photometrisch bestimmt werden. Die Konzentration von Endotoxin kann anhand der Reaktionszeit berechnet werden. Verglichen wird hierbei mit einer Standardreihe bekannter Endotoxinkonzentrationen. Die Zuverlässigkeit der Messung wird als sogenannte „Recovery“ angegeben. Diese in Prozent angegebene Menge bezeichnet die nach Zugabe einer bestimmten Endotoxinmenge zu den zu testenden Proben wiedergefundene Endotoxinmenge. Von einer Zuerlässigkeit des Testes kann bei Recovery-Werten von 50% bis 100% ausgegangen werden. Da das in der Membran von *Aspergillus* enthaltene β -Glukan ebenfalls zu einer positiven Reaktion führt wurde ein β -Glukanblocker in diesen Experimenten eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.2.10. Immunfluoreszenz

Zellstimulation

Stimulus	Konzentration
LPS „ultra pure“	100 ng/ml
GFP-Konidien, <i>A. fumigatus</i>	6×10^6 /ml
Myzel, <i>A. fumigatus</i>	5 μ l einer 50mg/ml Lösung, geschert
CpG-DNA	0,4 μ m/ml
Konidien, <i>A. fumigatus</i> , tot	6×10^6 /ml
PAM 3 Cys	100ng/ml
Bacteroides	100ng/ml

NF- κ B Translokation

Jeweils $3,5 \times 10^5$ Makrophagen /Well wurden in einer 24Well Platte, in welcher in jedes Well zuvor ein steriles Deckgläschen aus Glas gelegt worden war, ausgesät. Ausgesuchte Wells wurden mit 10 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Volumen pro Well: 1ml.

Nach 3 stündiger Stimulation (Stimulantien: siehe Tabelle) wurden die Deckgläschen 8 min mit -20°C Methanol fixiert und anschließend 2 mal jeweils 5 min mit PBS (Gibco) gewaschen. Die Absättigung der Zellen erfolgte mit 2% Ziegen Serum (Dianova) in PBS (Gibco) 20 min bei 37°C . Anschließend wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer gelegt und mit 15 μ l einer 1:100 verdünnten Lösung des Primärantikörpers in 2% Ziegen Serum/ PBS benetzt und bei Raumtemperatur 1h inkubiert. Primärantikörper: Kaninchen Anti-Maus p60 (RelA), (Santa Cruz) Nach 3maligem Waschen in PBS wurden auf die Deckgläschen 15 μ l des 1:100 verdünnten Sekundär-Antikörpers (Ziege Anti-Kaninchen, Cy3, Dianova, Hamburg) aufpipettiert und alle bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie 3mal gewaschen und mit einem Tropfen „FluoroGuard Antifade Reagent“ (Bio-Rad) auf einen Objektträger gebracht und mit Nagellack versiegelt.

TLR-Lokalisation

TLR4-Lokalisation in transient transfizierten A549 Zellen

Nach transienter Transfektion (s.O.) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit -20°C kaltem Aceton 1 min fixiert und 2 mal jeweils 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2% Ziegen Serum in PBS bei 37°C geblockt. Nach dem Herstellen einer feuchten Kammer wurden

2. Material und Methoden

die Deckgläschen in diese übertragen und mit 15 µl einer anti-FLAG-Antikörper Lösung (1:100) eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde der Überschuss des Antikörpers durch 3maliges Waschen in PBS entfernt (Eintauchen der Deckgläschen (DG's) in PBS und anschließendes abtrocknen auf saugfähigem Filterpapier) entfernt. Anschließende Inkubation mit Ziege-anti-Kaninchen-AK (1:50) für 30 min. Erneutes 3maliges Waschen in PBS (s.O.). Danach Aufbringen der DGs auf Objektträger, die zuvor mit einer „Anti-Fade“-Lösung (BioRad) beschichtet wurden. Fixieren der DGs auf die Objektträger mit farblosem Nagellack.

TLR-Lokalisation in murinen Makrophagen

Nach 0, 5, 10, und 15 min Stimulation mit 3×10^6 WT Konidien von *A. fumigatus* wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen jeweils 5 min mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und anschließend mit 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert, 3 mal mit PBS gewaschen, abgesättigt (s.O.) und in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper 1h inkubiert.

Verwendete Primärantikörper:

Kaninchen-Anti-TLR2-Antikörper (Carsten Kirschning, TU München) 1: 100 in PBS
Kaninchen-Anti-TLR4 Antikörper (Mathias Hornef, Mikrobiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden), 1:100 in PBS.

Auswertung

Die Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leika, Software: TCS-NT) aufgenommen und anschließend mit ADOBE-Photoshop 5.0 bearbeitet.

2.2.11. Zytokinassays und NO-Messung

Jeweils 2×10^5 Zellen wurden in ein Well einer 96-Well -Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu den entsprechenden Ansätzen wurde IFN-γ zupipettiert (jeweils 10 U/ml). Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch 5maliges Auf- und Abpipettieren des Mediums gewaschen, um nicht- adhärenente Zellen zu entfernen. Das Medium, sowie eventuell das IFN-γ, wurde erneuert.

Zellstimulation

Stimulus	Konzentration
LPS „ultra pure“	100 ng/ml
GFP-Konidien, <i>A. fumigatus</i>	12×10^5

2. Material und Methoden

Konidien <i>A. niger</i>	12x 10⁵
Myzel <i>A. fumigatus</i>	1,25 mg(Feuchtgewicht) /ml
Myzel <i>A. niger</i>	1,25 mg (Feuchtgewicht) /ml
PAM 3Cys	100 ng/ml
CpG DNA	2 nmol/ml
Nystatin	50 µg/ml

Die Dauer der Vorstimulation mit IFN- γ betrug 18 h.

Die Dauer der Stimulation mit den entsprechenden oben erwähnten Reagenzien betrug 24 h.

ELISA

Für den ELISA wurden „Maxisorp“-Mikrotiterplatten (Nunc) sowie Kits der Firma R&D Biosystems zur Bestimmung von TNF- α und MIP-2 verwendet. Grundsätzlich wurden Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,4

0,2 µm filtriert. Filter: Sartorius Minisart steril 0,2µm

Waschpuffer

0,05% Tween[®] 20 in PBS

pH 7,4

Blockierungs Puffer

1% BSA

5% Sucrose in PBS

“Reagent Diluent”

1% BSA in PBS

pH 7,4.

2. Material und Methoden

0,2µm filtriert.

Entwicklungslösung

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) SIGMA

Stopplösung

1N Schwefelsäure

MIP-2

Beschichten der 96-Well-Platten

Der „Capture“-Antikörper wurde über Nacht in einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS bei Raumtemperatur mit 100ml/Well inkubiert

Blockieren der 96-Well-Platten

Am nächsten Morgen wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mindestens 1 h mit dem Blockierungspuffer mit 300µl/Well bei RT inkubiert.

Procedere

Nach erneutem 3 maligen Waschen der beschichteten Platte wurden die Überstände der (wie in 2.2.10.1. angegeben) stimulierten Zellen 1:20 in „Reagent Diluent“ verdünnt und jeweils 100 µl/Well aufgetragen. Eine MIP-2 Standardreihe (höchste Konzentration: 1000 pg/ml, geringste Konzentration: 15,625 pg/ml) wurde ebenfalls aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde die Platte erneut 3mal gewaschen und jeweils 100 µl des „Detection“-Antikörper in einer Konzentration von 50 ng/ml in „Reagent Diluent“ aufpipettiert. Nach 2h wurde die Platte erneut 3mal gewaschen und jeweils 100µl der Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP) 1:200 in „Reagent Diluent“ verdünnt, zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT unter Lichtausschluß wurde die Platte wieder gewaschen und anschließend 100µl der Entwicklungslösung zugegeben. Nach 20 min wurde die Stopplösung dazupipettiert und die Farbentwicklung im „ELISA-Reader“ (TECAN Sunrise, Software: Magellan) quantitativ ausgewertet.

TNF-α

Procedere s.O.

„Capture“ Antikörper: 0,8µg/ml

2. Material und Methoden

TNF- α Standard: höchste Konzentration 2000 pg/ml, geringste Konzentration 31,25 pg/ml

“Detection”-Antikörper: 300ng/ml

Streptavidin-HRP: 1:200

Die Zellkulturüberstände wurden 1:5 in „Reagent Diluent“ verdünnt aufgetragen

NO Messung mit dem Gries-Reagenz

Verwendete Lösungen

Lösung A

- 0,2% N-(1-Naphtyl) Ethylen-Diamin-Dihydrochlorid (SIGMA)
- 200 ml Aqua dest.

Lösung B

- 2% Sulfanilamide (SIGMA)
- 5% H₃PO₄
- 200ml Aqua dest.

Standard: NaNO₂. Höchste Konzentration :100 μ M geringste Konz: 12,5 μ M

Procedere

In einer 96 Well Platte wurden jeweils 100 μ l der Standards sowie 100 μ l der unverdünnten Zellkulturüberstände pipettiert. Die Lösung A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Von dieser Mischung (GRIES-Reagenz) (Green et al., 1982) wurden jeweils 100 μ l zu den verschiedenen Ansätzen pipettiert. Nach 10 min wurde die Farbentwicklung im „ELISA-Reader“ (TECAN Sunrise, Software Magellan) bei 540 nm quantifiziert.

2.2.12. Untersuchung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Um die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Bauchhöhle von Mäusen zu untersuchen, wurden den verschiedenen unter 2.1.5. beschriebenen Mausstämmen

- 100 μ l einer Myzelsuspension mit 50 mg/ml Feuchtgewicht, also 5 mg pro Maus
- 100 μ l einer Myzelsuspension mit 25 mg/ml Feuchtgewicht, also 2,5 mg pro Maus
- 100 μ l einer Myzelsuspension mit 5 mg/ml Feuchtgewicht, also 0,5 mg pro Maus
- 100 μ l einer mit Ethanol abgetöteten Konidiensuspension (10^7 Konidien pro Maus)
- 500 μ l einer durch 1h UV-Bestrahlung abgetöteten *A. fumigatus* Konidien Suspension (3x 10^7 Konidien pro Maus)

als Negativkontrolle

- 100 μ l PBS

2. Material und Methoden

als Positivkontrolle

- 1ml Thioglycollat

intraperitoneal injiziert.

Nach verschiedenen Zeitpunkten (2h, 4h, 6h) wurden Peritoneallavagen durchgeführt, die so gewonnenen Zellen wurden gezählt und jeweils 100.000 in 300 µl PBS (Gibco) aufgenommen.

Zeitpunkte

Stimulans/Menge	Peritoneallavage nach
Et OH-Myzel 5mg	2h
EtOH-Myzel 2,5mg	2h
UV abgetötete Konidien 10^7	4,5h
EtOH-abgetötete Konidien 10^7	2h

Für die Stimulation mit UV-abgetöteten Konidien wurde eine längere Zeit gewählt, da nach 2 h Stimulation mit diesen Konidien zu keiner beurteilbaren Rekrutierung führte.

Stimulans/Menge	Peritoneallavage nach
EtOH-Myzel 2,5mg	2h
EtOH-Myzel 2,5mg	4h
EtOH-Myzel 2,5mg	6h

Herstellen der Zytospin-Präparate

Jeweils 100.000 der aus der Peritoneallavage gewonnenen Zellen wurden in 300 µl PBS (Gibco) aufgenommen und in einem Zytospin (Shandon Elliot) 10 min bei 1000 U7min zentrifugiert. Präparate wurden anschließend ca. 5 min luftgetrocknet.

Histologische Färbung nach Pappenheim

Die angetrockneten Präparate wurden 5 min in unverdünnte May-Grünwald-Färbelösung (Merck) eingetaucht. In einem Wasserbad wurden die Präparate kurz abgewaschen, danach für 15 min in eine Giemsa-Färbelösung (Merck) getaucht. Verdünnung der Giemsa-Lösung: 1:10 in Aqua dest..

Auswertung

Gezählt wurden jeweils 1000 Pappenheim gefärbte Zellen, der prozentuale Anteil an Neutrophilen (und Mastzellen) wurde bestimmt.

Standardfehlerberechnung:

Die Bilder wurden mit einer Ricoh Kamera an einem Zeiss Axiovert 25 Mikroskop (Objektiv: 32x 0,4 Ph1) auf einen Diafilm (Kodak 100, 24 Bilder) aufgenommen (Belichtungszeit 0,7 Vergrößerung: 100fach) und nach der Entwicklung mit einem Microtek Artrixscan 4000t eingescant (Software: Mikrotek Scan Wizard Pro TX) und im Adobe Photoshop Version 5.0 bearbeitet oder direkt mit einem Leitz RBE Fluoreszenzmikroskop (Software: MetaMorph, Visitron) digital aufgenommen. Nur eines dieser Bilder wurde aufgrund von Helligkeitsunterschieden im Adobe Photoshop Version 6.0 nachbearbeitet).

3. ERGEBNISSE

3.1. Aktivierung von mit verschiedenen humanen TLRs transfizierten HEK293 Zellen durch *A. fumigatus*

Um erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von TLRs bei der Detektion von *A. fumigatus* durch humane Zellen zu erhalten, wurde die Aktivierung von transfizierten HEK293-Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus* gemessen. Diese Zellen sind inert gegenüber vielzähligen PAMPs, reagieren jedoch auf Stimulation mit IL-1 β und TNF- α . Die Zellen wurden mit jeweils einem Gen der 10 bekannten humanen TLRs transfiziert und nach Stimulation die Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe eines Luziferase-Reporterkonstruktes gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen parallel mit 4 Plasmiden transfiziert: eines enthielt ein NF- κ B abhängiges Luziferase-Reportergenkonstrukt mit Elementen des ELAM-1 Promotors (Schindler and Baichwal, 1994).



Das zweite Plasmid kodierte für ein Rous Sarcoma Virus (RSV) β -Galaktosidase Genkonstrukt, durch welches die Transfektionseffizienz überprüft werden konnte, das dritte Plasmid codierte für das Adaptorprotein MD-2. Mit Hilfe des vierten Plasmids wurde jeweils einer der 10 bekannten humanen TLRs konstitutiv unter einem CMV-Promotor exprimiert.



Die Expression der TLRs wurde durch Nachweis des FLAG-Epitops mittels Immunblot (Daten nicht gezeigt) und/oder funktionell mittels Stimulation mit bekannten Agonisten der jeweiligen TLRs (siehe Tab. 1) überprüft. In den Stimulationsexperimenten zeigte sich, dass sowohl *A. fumigatus* Myzel als auch *A. fumigatus* Konidien nur in den TLR2- oder TLR4-transfizierten Zellen eine Aktivierung hervorzurufen vermochte, von den übrigen TLR's jedoch nicht erkannt wurde (siehe Abb.1). Die in Abb.1 dargestellte geringe Aktivierung von TLR1-transfizierten HEK293 Zellen durch *A. fumigatus* Konidien konnte in Wiederholungsexperimenten nicht, wie alle anderen Beobachtungen, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

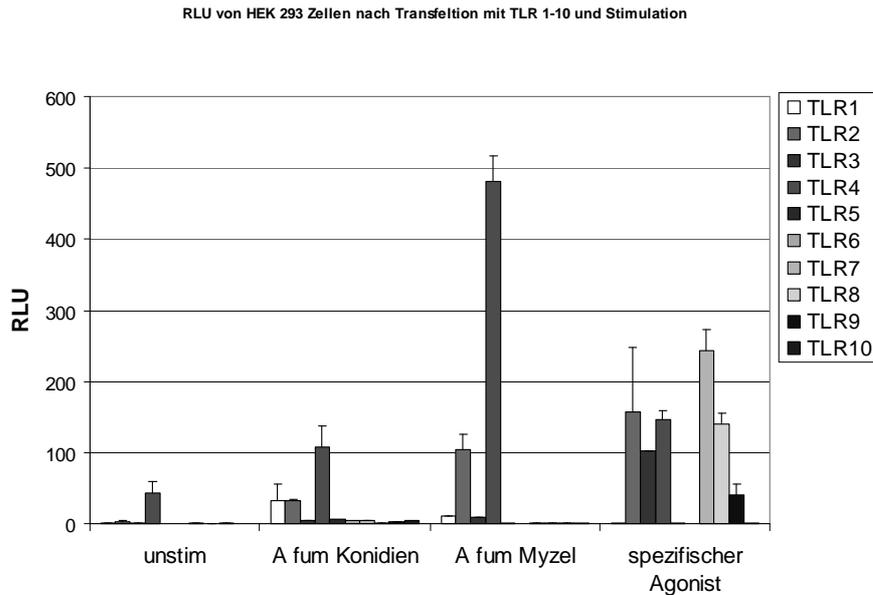


Abb. 7: Auswertung der relativen Luziferase-Aktivität (RLU) in den Überständen der mit verschiedenen TLRs (TLR1-10) sowie Adaptormolekülen transfizierten HEK293 Zellen.

Parallele Messungen des sekretierten IL-8 bestätigten die Bedeutung von TLR2 und TLR4 bei der Erkennung von *A. fumigatus* (Meier et al., 2003).

Da sich durch die Ergebnisse mit den transfizierten HEK293 Zellen eine TLR2- und TLR4-vermittelte Aktivierung der untersuchten Zellen durch abgetötete Konidien ergab, galt es, dies weiter zu untersuchen und in einem für die Immunantwort relevanten Zelltyp zu verifizieren. Da das Transfektionssystem der HEK293 Zellen nur ein künstlich geschaffenes System darstellt, sollte im nächsten Schritt ein System etabliert werden, welches der in vivo Situation eher entspricht. Da die HEK293 Zellen normalerweise keine TLRs besitzen, wurden im nächsten Schritt Zellen untersucht, die natürlicherweise alle bekannten TLRs exprimieren. Hierdurch war es möglich, die Interaktion von *A. fumigatus* und TLRs in ihrem natürlichen Zusammenhang zu untersuchen. Verwendet wurden hierzu zunächst Makrophagen-ähnliche Zelllinien und später murine Peritonealmakrophagen. Um die Aktivierung dieser Zellen darzustellen, wurde zunächst ein System gewählt, welches die Aktivierung von Zellen in der Immunfluoreszenz darzustellen vermag: die Detektion von NF- κ B mittels spezifischer Antikörper.

Als Aktivierungsmerkmal wurde die Translokation des nuklearen Faktors kappa B aus dem Zytoplasma der ruhenden Zelle in den Zellkern der aktivierten Zelle (siehe Einleitung), dargestellt in der Immunfluoreszenz, gewählt. Angefärbt wurde hierbei die Untereinheit p65,

3. Ergebnisse

ein Teil des sowohl Homo- als auch Heterodimere bildenden NF- κ B (Pahl, 1999). Das Beispiel in der Abb. 3a zeigt ruhende Makrophagen mit Rot-markiertem p65 im Zytoplasma. Die Kerne sind schwach angefärbt als Zeichen geringer Transkriptionsaktivität der NF- κ B abhängigen Gene. Nach Aktivierung der Makrophagen durch LPS (Abb. 3b) ist eine deutliche Verschiebung des Faktors vom Zytoplasma in den Kern zu erkennen, in diesem Zustand werden NF- κ B abhängige Gene transkribiert, die Zellen sind aktiviert.

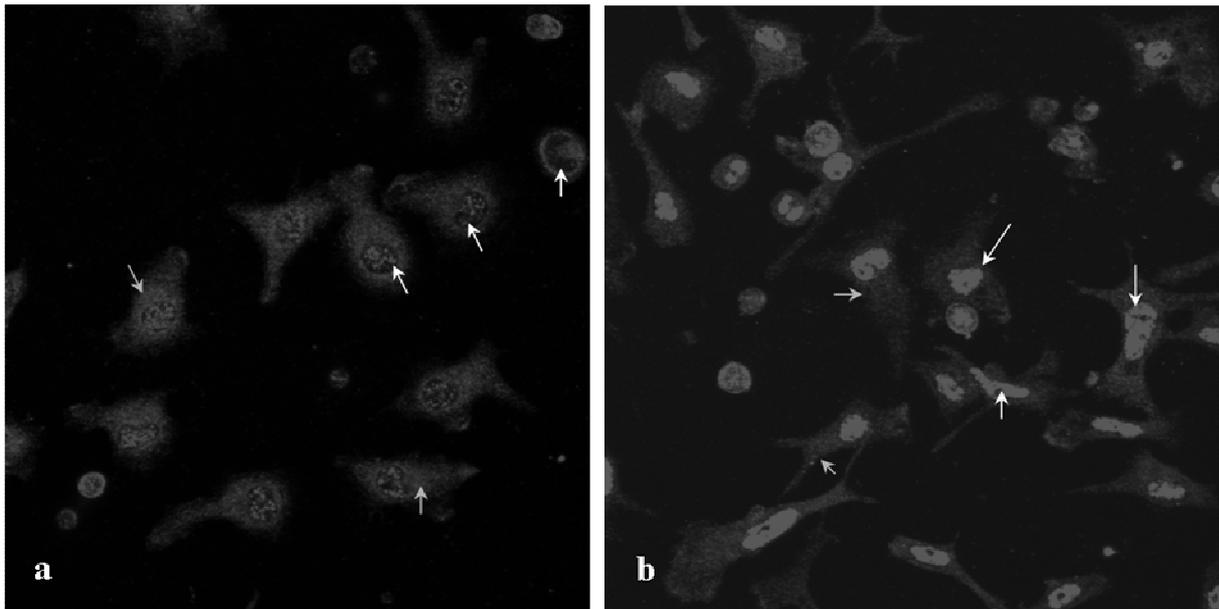


Abb. 8: Darstellung der Untereinheit p65 des NF- κ B in verschiedenen Aktivitätszuständen von Peritonealmakrophagen. Die Zellen wurden mit -20°C kaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde mit einem Antikörper gegen p65 sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gefärbt. Abb. 3a zeigt ruhende Zellen mit wenig NF- κ B im Kern (weiße Pfeile markieren die Zellkerne, blaue Pfeile markieren das Zytoplasma). Abb. 3b zeigt Zellen nach Stimulation mit LPS: die Kerne sind deutlich angefärbt, hier wurde als Zeichen einer Aktivierung p65 in den Kern transloziert.

3.2. Stimulation verschiedener Zelltypen durch lebende Konidien von *A. fumigatus*

3.2.1. Testung des zur Stimulation eingesetzten Materials auf Reinheit von LPS mit dem LIMULUS- Test

Bakterielles LPS stellt, wie im Beispiel in Abb. 8 gezeigt, einen sehr starken Stimulus für Zellen dar. LPS kommt ubiquitär vor und kann somit z.B. über die Raumluft leicht in Proben gelangen. Um sicherzustellen, dass die Stimulation der Zellen durch die von uns eingesetzten Pilzmaterialien, und nicht durch eine Kontamination mit LPS zustande kam, wurden alle von

3. Ergebnisse

uns zur Stimulation verwendeten Materialien auf ihren Gehalt an LPS hin getestet. Zu diesem Zweck wurde der LIMULUS-Test eingesetzt. Beim diesem Test wird ein Protein aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebses, *Limulus polyphemus*, eingesetzt, um bakterielles Endotoxin zu detektieren. Das Prinzip dieses hoch sensitiven LIMULUS-Tests ist in Mat u. Meth unter 2.2.9. beschrieben. Bei der Messung des LPS-Gehaltes in Proben mit Pilzmaterial ergibt sich eine Besonderheit: da das in der Zellwand von *A. fumigatus* vorkommende β -Glukan ebenfalls mit dem Substrat reagiert (Takaki et al., 2002) und die Messung somit falsch positive Ergebnisse liefert, mußte vor der Messung ein β -Glukanblocker zugegeben werden. In keiner der von uns hergestellten und für spätere Versuche eingesetzten Proben befanden sich nennenswerte, d.h. für eine Stimulation von Zellen relevante Mengen an LPS. Alle „Recovery“ Werte befanden sich zwischen 55 und 100%.

3.2.2. Stimulation Makrophagen-ähnlicher Zelllinien

Um zu untersuchen, ob lebende *A. fumigatus* Konidien überhaupt in der Lage sind, bestimmte Zellen zu aktivieren, wurden zunächst verschiedene Makrophagen-ähnliche Zelllinien getestet. Die Verwendung von Zelllinien bietet viele Vorteile gegenüber der Verwendung von primären Zellen. Sie sind sehr leicht zu kultivieren, außerdem müssen für ihre Verwendung keine Mäuse getötet werden. Daher sollten, Makrophagen-ähnliche Zelllinien auf ihre Verwendbarkeit für dieses System hin zu untersuchen.

3.2.2.1. RAW 264.7

Etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 3h mit lebenden, konstitutiv GFP-exprimierenden Konidien von *A. fumigatus* infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und die NF- κ B Untereinheit p65 mit einem spezifischen Antikörper sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 9). In Abb. 9 ist eine Zunahme der Makophagen-assoziierten Konidien mit der Zeit zu erkennen: bereits nach $\frac{1}{2}$ h haben Konidien an die Zellen gebunden und sind zum Teil sogar bereits intrazellulär zu finden, was durch den konfokalen Schnitt in Abb. 9 zu erkennen ist. Nach 3h scheinen die Konidien fast vollständig von den Makrophagen phagozytiert zu sein, was auf eine sehr effiziente Aufnahme der Konidien durch die RAW264.7 Zellen schließen lässt.

Die Aktivierung dieser RAW 264.7 Zellen, in Abb. 9 in Rot anhand der Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern dargestellt, wird nach einer Stunde sichtbar: 1h nach Infektion mit den Konidien sind die Zellkerne deutlich rot angefärbt (weiße Pfeile). Dieser Zustand der Aktivierung bleibt jedoch nur über einen gewissen Zeitraum erhalten: bereits

3. Ergebnisse

nach 3h zeigt sich eine deutliche Rückverschiebung von p65 vom Zellkern zurück in das Zytoplasma. Wie in den uninfizierten Zellen (Negativkontrolle) sind hier die Zellkerne weitgehend ausgespart, die Zellen befinden sich in einem inaktiven Zustand.

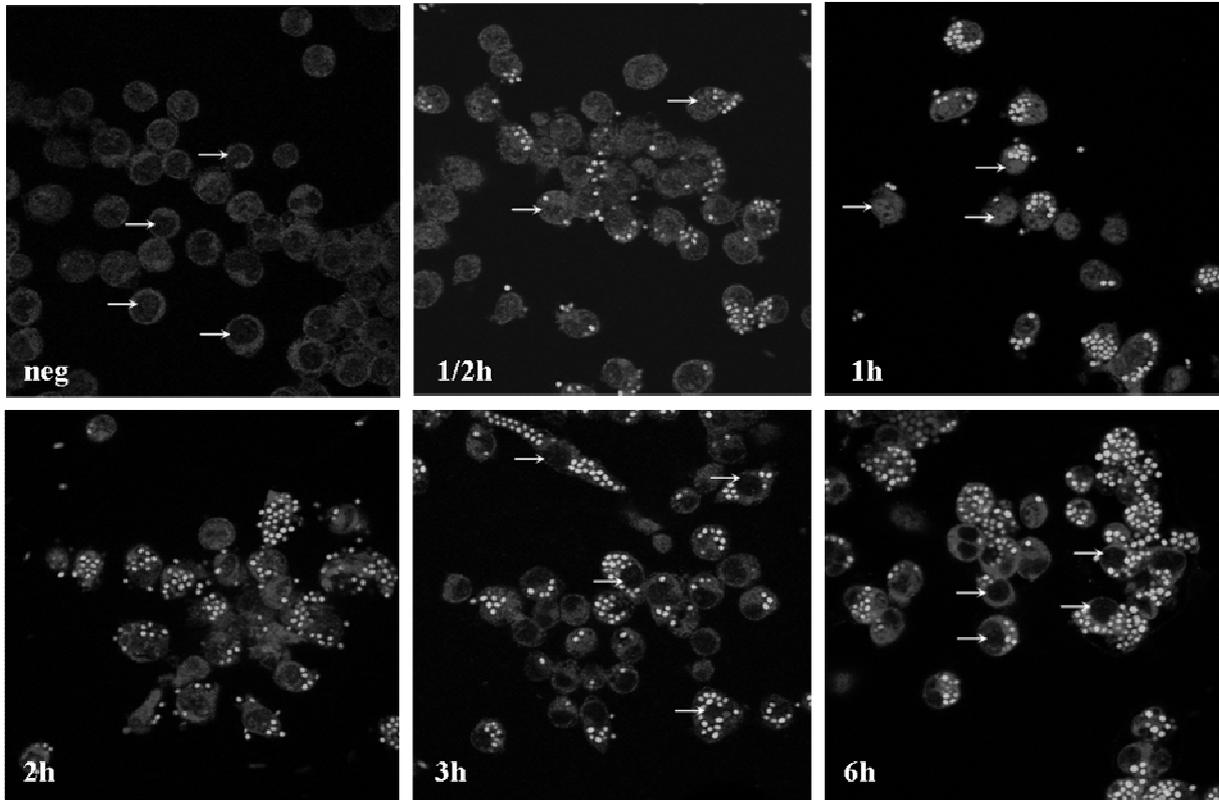


Abb. 9: RAW Makrophagen in Ruhe und zu verschiedenen Infektionszeitpunkten. Die Zellen wurden mit konstitutiv GFP exprimierenden *A. fumigatus* Konidien infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit -20°C Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde die p65 Untereinheit von NF- κB mit einem spezifischen Antikörper sowie einem Cy3-markierten, gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper angefärbt. Fixierung in Ruhe (a) nach 1/2h (b) nach 1h (c) nach 2h (d) nach 3h (e) und nach 6h (f).

3.2.2.2. P-388D1

Für unsere Versuchen wurden, wie oben für die RAW 264.7 Zellen beschrieben, ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, mit vitalen konstitutiv GFP-exprimierenden Konidien von *A. fumigatus* infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Analog zu den RAW 264.7 wurde auch hier p65 rot angefärbt (Abb. 10).

Auch bei diesen Zellen nimmt die Zahl der zellassoziierten Konidien mit der Zeit zu. Da die Zellen auch in Abb. 10 mit einem konfokalen Schnitt dargestellt sind, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die Konidien sich intrazellulär befinden, d.h. bereits vollständig von den Makrophagen aufgenommen wurden.

3. Ergebnisse

Bezüglich der Phagozytoseeffizienz von *A. fumigatus* Konidien konnte zwischen den RAW264.7 Zellen und den P388 Zellen kein Unterschied festgestellt werden.

Deutliche Unterschiede zeigten sich bei der Aktivierung der Zellen durch *A. fumigatus*: die Zellen der Zelllinie P388 phagozytierten zwar die Konidien, eine Translokation des rot markierten NF- κ B konnte im Zuge dieser Infektion in der Immunfluoreszenz jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 10).

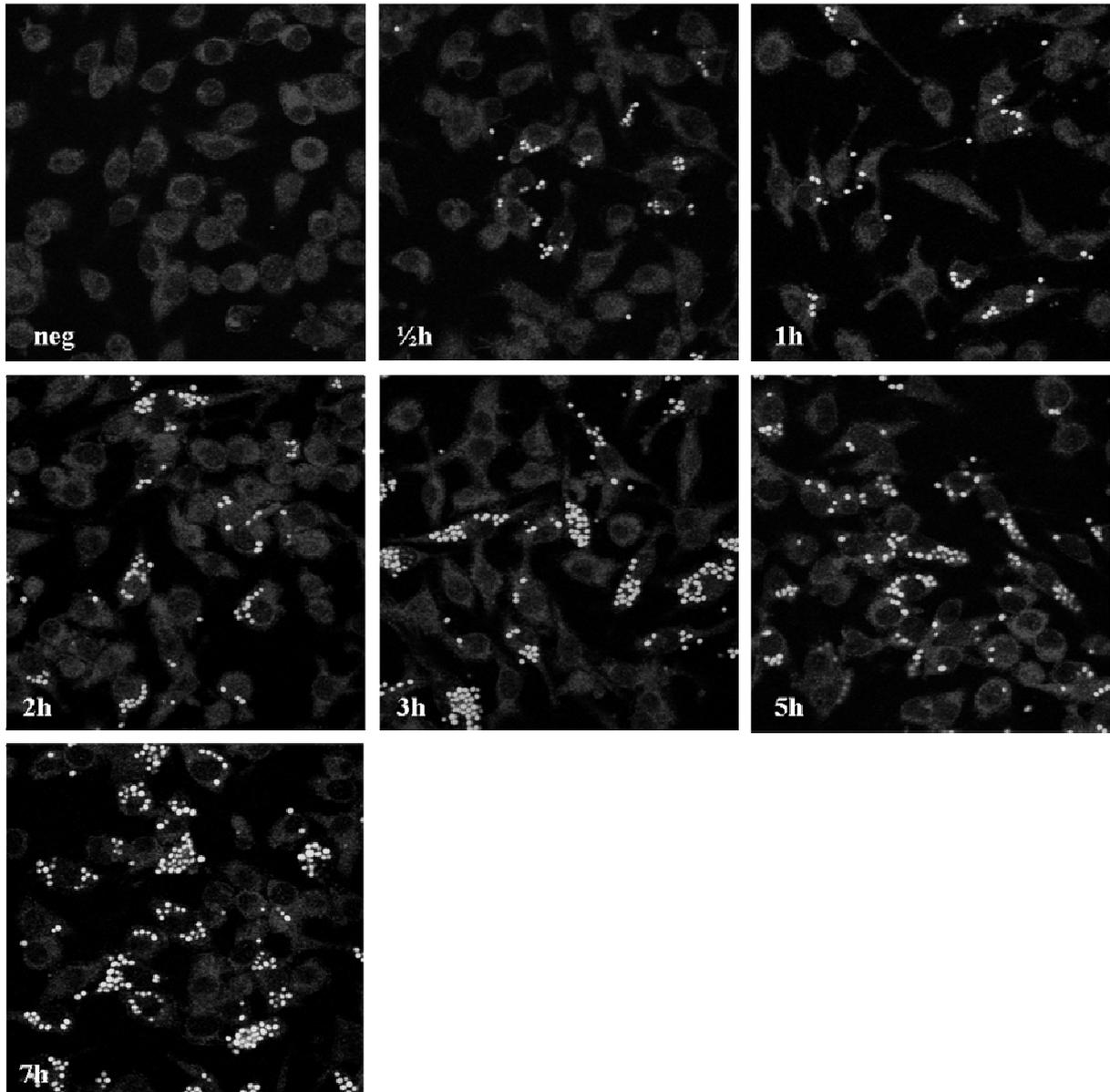


Abb. 10: P388 Makrophagen in Ruhe und zu verschiedenen Infektionszeitpunkten mit grün leuchtenden, konstitutiv GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien. P388 Zellen wurde ausgesät und mit *A. fumigatus* Konidien (grün) infiziert. Anschließend wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen p65 sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt (rot).

3.2.2.3. J774

Die Zellen wurden analog zu den oben beschriebenen RAW 264.7 und P388 Zellen ausgesät, mit *A. fumigatus* Konidien infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Ebenfalls analog zu den RAW 264.7 und den P-388D1 Makrophagen wurden die J774 Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen p65 und einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Bezüglich der Phagozytoseeffizienz zeigte sich kein Unterschied zu den oben beschriebenen Zelllinien, auch die J774 Zellen phagozytierten die Konidien in einem mit den RAW264.7 und den P388 vergleichbarem Maße. Eine Translokation von p65 konnte im Rahmen der Infektion mit Konidien in J774 Zelle zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. Stimulation primärer muriner Peritonealmakrophagen

Um zu untersuchen, ob primäre murine Makrophagen durch lebende *A. fumigatus* Konidien aktiviert werden, wurden diese mittels Peritoneallavage aus der Bauchhöhle von Mäusen des Stammes C3H/HeN gewonnen und ebenfalls auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden nach der Stimulation mit lebenden *A. fumigatus* Konidien nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert und, wie oben für die Zelllinien beschrieben, mit einem Antikörper gegen p65 sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper rot angefärbt (Abb. 11).

Es zeigte sich, dass diese Primärmakrophagen mit einer hohen Effizienz die Konidien zu phagozytieren vermochten. Bereits nach 3 h befanden sich fast alle Konidien intrazellulär, wie im konfokalen Schnitt (Abb. 11) gezeigt werden kann.

Eine deutliche Translokation des NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern konnte bereits nach 1h beobachtet werden. 3h nach Infektion erschien diese sogar noch deutlicher, und auch nach 5h konnte, anders als bei den Zellen der Zelllinie RAW 264.7, kein Abklingen der Aktivierung beobachtet werden (Abb. 11).

3. Ergebnisse

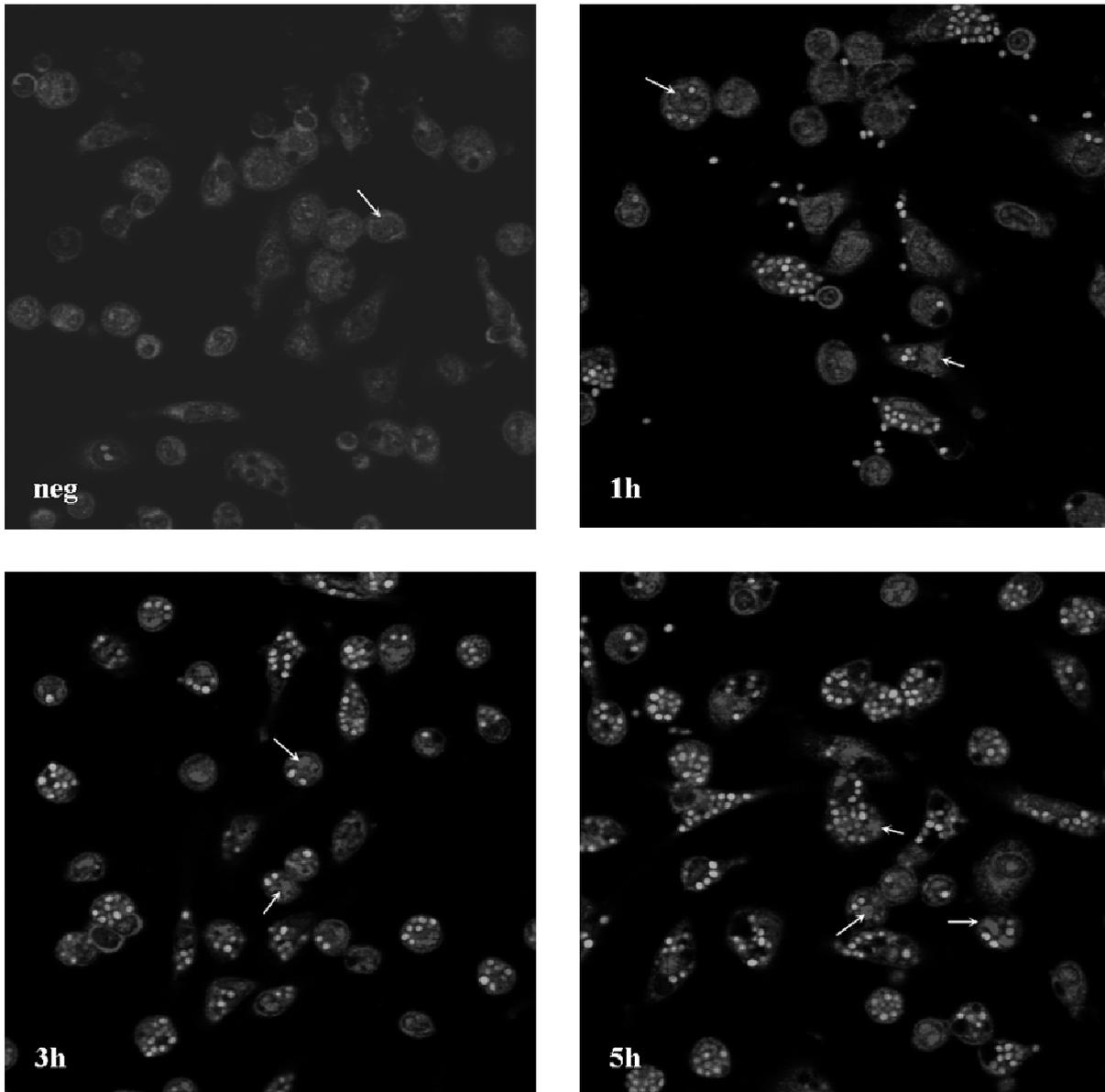


Abb. 11: C3H/HeN in Ruhe und zu verschiedenen Infektionszeitpunkten. Die Zellen wurden in Ruhe (a), 1h (b), nach 3h (c) und nach 5h (d) nach Beginn der Infektion mit -20°C Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde p53 mit einem spezifischen Antikörper sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper gefärbt (rot).

3.3. Die Abhängigkeit der NF- κ B Translokation von Toll-like Rezeptoren im Zuge der Infektion mit lebenden *A. fumigatus* Konidien

Bisher konnte anhand unserer Versuche u.a. folgendes gezeigt werden:

1. im HEK293-Transfektionssystem ist die Anwesenheit von humanem TLR2 und TLR4 notwendig, um auf die Infektion mit *A. fumigatus* mit einer Aktivierung zu reagieren
2. murine Peritonealmakrophagen werden durch die Infektion mit vitalen *A. fumigatus* Konidien aktiviert und dies kann in der Immunfluoreszenz anhand der NF- κ B Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern dargestellt werden.

Nun galt es die Rolle der TLRs in ihrem natürlichen Zusammenhang weiter zu untersuchen. Hierbei sollte u.a. geklärt werden, ob auch im murinen System TLR2 und TLR4 für die Aktivierung von Zellen durch *A. fumigatus* essentiell sind. Falls sich dies bestätigte, sollte weiter geklärt werden, ob bereits der Verlust einer dieser beiden TLR's zu einem Nichtansprechen der Zellen auf *A. fumigatus* führt. Desweiteren sollte auch in diesem System die Rolle anderer TLRs bei der Erkennung von *A. fumigatus* untersucht werden.

Um dies zu bewerkstelligen wurden primäre Peritonealmakrophagen verschiedener Mausstämme verwendet:

C3H/HeN: der sogenannte Wildtyp-Stamm

C3H/HeJ: Die bereits seit über 30 Jahren als sog. „LPS non-responder Maus“ bekannte Variante des Mausstammes C3H/HeN, (siehe Mat u. Meth.). Dieser Stamm besitzt eine Punktmutation im TLR4-Gen. Hierdurch ergibt sich ein nicht mehr funktioneller, jedoch stabiler TLR4 (Poltorak et al., 1998).

C3H/HeN/TLR2^{-/-}: In einem weiteren Mausstamm, C57/BL, wurde das TLR2 Gen gezielt durch Insertion einer Neomycin-Kassette durch homologe Rekombination inaktiviert (Werts et al., 2001). Dieser Mausstamm wurde uns freundlicherweise von Tularik (South Francisco, USA) zur Verfügung gestellt und von Carsten Kirschning in C3H/HeN Mäuse eingekreuzt.

C3H/HeJ/TLR2^{-/-}: Der vierte verwendete Mausstamm wurde von Carsten Kirschning, TU München hergestellt (Vabulas et al., 2002b): Die Mäuse dieses Stammes besitzen gar keinen TLR2 sowie keinen funktionellen TLR4.

3. Ergebnisse

3.3.1. Verifizierung der angegebenen Genotypen der Mäuse mittels PCR

Um festzustellen, ob der angegebene Genotyp der Mäuse dem tatsächlichen Genotyp entsprach, wurde eine Analyse der veränderten Genabschnitte der jeweiligen Stämme vorgenommen. Hierbei wurden die interessanten Genabschnitte mittels PCR (siehe Mat u Meth. unter 2.2.2.) amplifiziert und die erhaltenen DNA-Fragmente entweder zunächst enzymatisch verdaut (TLR4) oder sofort auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Größe der erhaltenen PCR Fragmente wurde mittels eines Vergleichsmarkers (siehe Abb. 7) der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde, ermittelt.

ERWARTETE PCR-ERGEBNISSE

	gesuchter Rezeptor	Erwartete Anzahl der Fragmente	Erwartete Größe der Fragmente
C3H/HeN	TLR4	Doppelbande	300 und 350 kb
C3H/HeJ	TLR4	2	300 kb und 400 kb
C3H/HeN/TLR2 ^{-/-}	TLR4	Doppelbande	300 und 350 kb
C3H/HeJ/TLR2 ^{-/-}	TLR4	2	300 kb und 400 kb
C3H/HeN	TLR2	1	499 kb
C3H/HeJ	TLR2	1	499 kb
C3H/HeN/TLR2 ^{-/-}	TLR2	1	334 kb
C3H/HeJ/TLR2 ^{-/-}	TLR2	1	334 kb

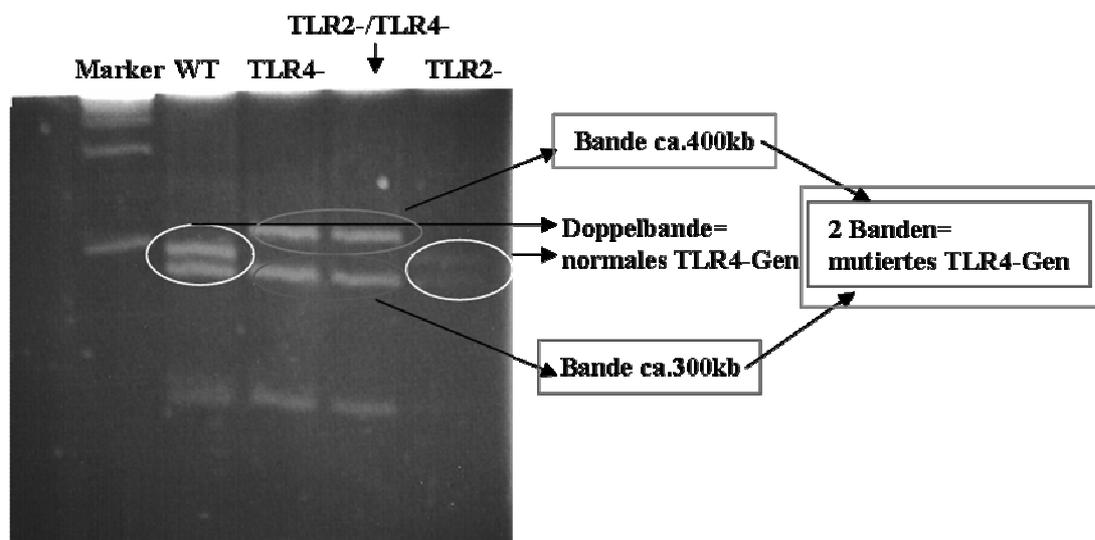


Abb. 12: Abbildung der Gelelektrophorese der PCR für das TLR4-Gen nach enzymatischem Verdau mit MvaI. Wie erwartet findet sich im WT eine Doppelbande der Größe 300 und 350 kb, im C3H/HeJ Typ finden sich 2 Bänder der Größen 300 kb und 400 kb, da aufgrund der Mutation im TLR4Gen eine neue Schnittstelle für das verdauende Enzym entstanden war. Ebenso im doppeldefizienten Stamm. Im C3H/HeN/TLR2^{-/-} findet sich, wie im WT eine Doppelbande der Größe 300 und 350 kb.

3.3.2. Stimulation der verschiedenen Genotypen mit *A. fumigatus* Konidien

Die Peritonealmakrophagen wurden mittels Lavage aus dem Peritoneum der Mäuse gewonnen und, wie unter 2.2.3. beschrieben, auf Deckgläschen ausgesät.

Die Zellen wurden entweder gar nicht (Negativkontrolle), mit einem für die Stimulation geeigneten Stimulus (Positivkontrolle, siehe unten) oder mit lebenden *A. fumigatus* Konidien stimuliert. Die Zellen wurden nach 3h fixiert. Anschließend wurde die NF- κ B-Untereinheit p65 mit einem spezifischen Antikörper sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper rot markiert.

3.3.2.1. C3H/HeN

In Abb.13 sind konfokale Schnitte der Immunfluoreszenz von Zellen des Wildtypstammes C3H/HeN abgebildet.

In der Negativkontrolle (uninfizierte Zellen) ist die rot markierte NF- κ B-Untereinheit vorwiegend im Zytoplasma zu erkennen, die Kerne sind jedoch weitgehend ausgespart. In diesem Zustand werden fast keine NF- κ B-abhängigen Gene transkribiert, die Zelle ruht weitgehend. Dies ändert sich drastisch 3h nach Infektion mit lebenden, konstitutiv GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (grün). Hier erkennt man eine starke Anfärbung der Zellkerne: das rot markierte p65 wurde vom Zytoplasma (ruhende Zellen) in den Kern transloziert, die Zellen sind nun aktiviert. Ebenfalls aktivierte Zellen sind 3h nach Infektion mit LPS zu erkennen (Positivkontrolle).

3. Ergebnisse

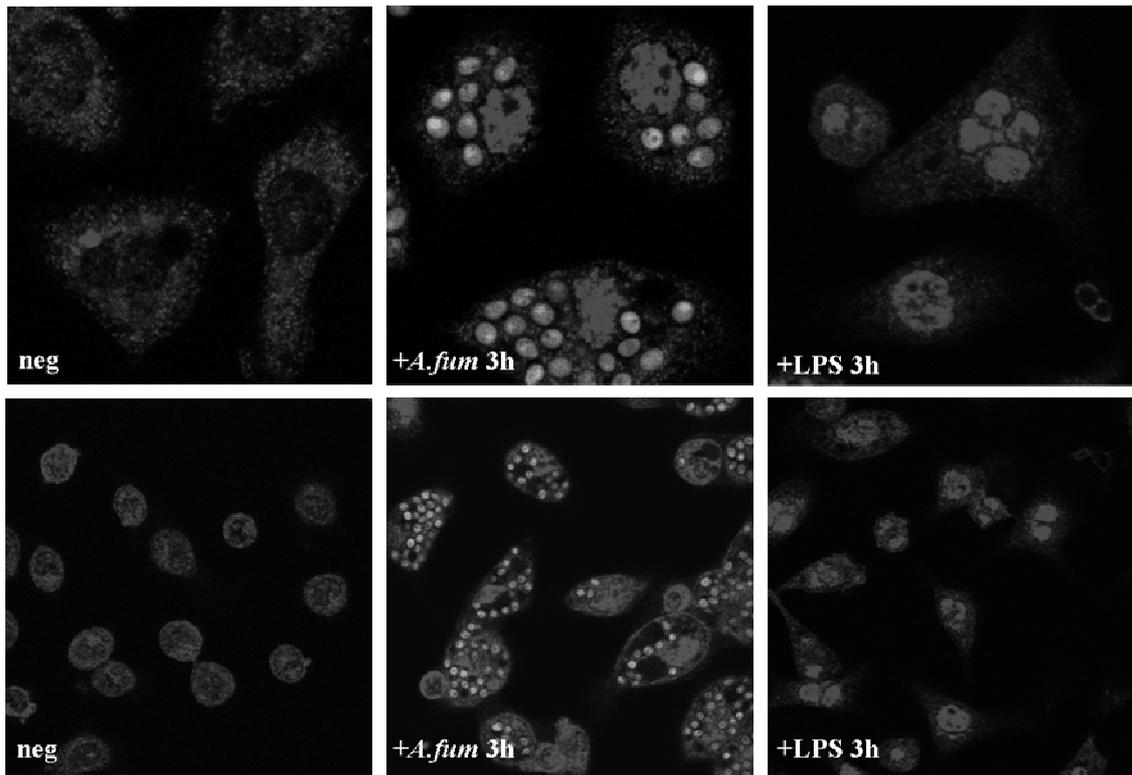


Abb. 13: C3H/HeN Peritonealmakrophagen in Ruhe, nach Infektion konstitutiv GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien (grün) und nach Infektion mit LPS 10µg/ml. Die Zellen wurden mit -20°C kaltem Methanol fixiert und permeabilisiert, anschließend mit einem p53 spezifischen Primär- sowie einem Cy3-markierten Sekundär-Antikörper angefärbt.

3.3.2.2. C3H/HeJ/TLR2^{-/-}

In Abb. 14 werden konfokale Schnitte durch Zellen des Mausstammes C3H/HeJ/TLR2^{-/-} gezeigt. Dieser Mausstamm besitzt, wie oben beschrieben, keinen TLR2 und keinen funktionellen TLR4. In der Negativkontrolle (uninfizierte, ruhende Zellen) ist die rot markierte NF-κB Untereinheit wiederum vorwiegend im Zytoplasma zu erkennen, die Kerne sind weitgehend ausgespart. In diesem Zustand werden fast keine NF-κB abhängigen Gene transkribiert, die Zellen ruhen weitgehend. 3h nach Infektion mit konstitutiv GFP-exprimierenden, lebenden *A. fumigatus* Konidien ändert sich dieser Zustand nicht: die grünen Konidien werden phagozytiert, eine Translokation von p53 in den Zellkern ist, ganz anders als bei den Zellen des Wildtyp- Stammes, nicht zu erkennen. Die Zellen dieses Mausstammes konnten durch eine Infektion mit *A. fumigatus* also nicht aktiviert werden. Um auszuschließen, dass der Verlust von TLRs prinzipiell dazu führt, dass, unabhängig vom eingesetzten Stimulus, NF-κB nicht mehr transloziert werden kann, wurde eine Positivkontrolle durchgeführt: nach 3-stündiger Stimulation mit Bakteroideslysat konnte auch in diesem Mausstamm eine deutliche Verschiebung des NF-κB vom Zytoplasma der Zellen in den Zellkern beobachtet werden (Abb. 14). Somit konnte gezeigt werden, dass der Verlust

3. Ergebnisse

von TLR2 und TLR4 dazu führt, dass *A. fumigatus* nicht mehr von den Zellen erkannt werden kann, andere Stimuli jedoch auch weiterhin erkannt werden und zur Aktivierung führen.

In diesem Versuch sollte weiterhin untersucht werden, ob weiteren TLRs bei der Erkennung dieses Pilzes eine Rolle zukommt. Alle übrigen bekannten TLRs werden ebenfalls auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert. Der Verlust von TLR2 und TLR4 führte in unserem Experiment jedoch zu einem Nichtansprechen der Zellen auf *A. fumigatus*. Hieraus ergibt sich keine entscheidende Rolle für die übrigen TLR bei der Detektion des Schimmelpilzes *A. fumigatus*.

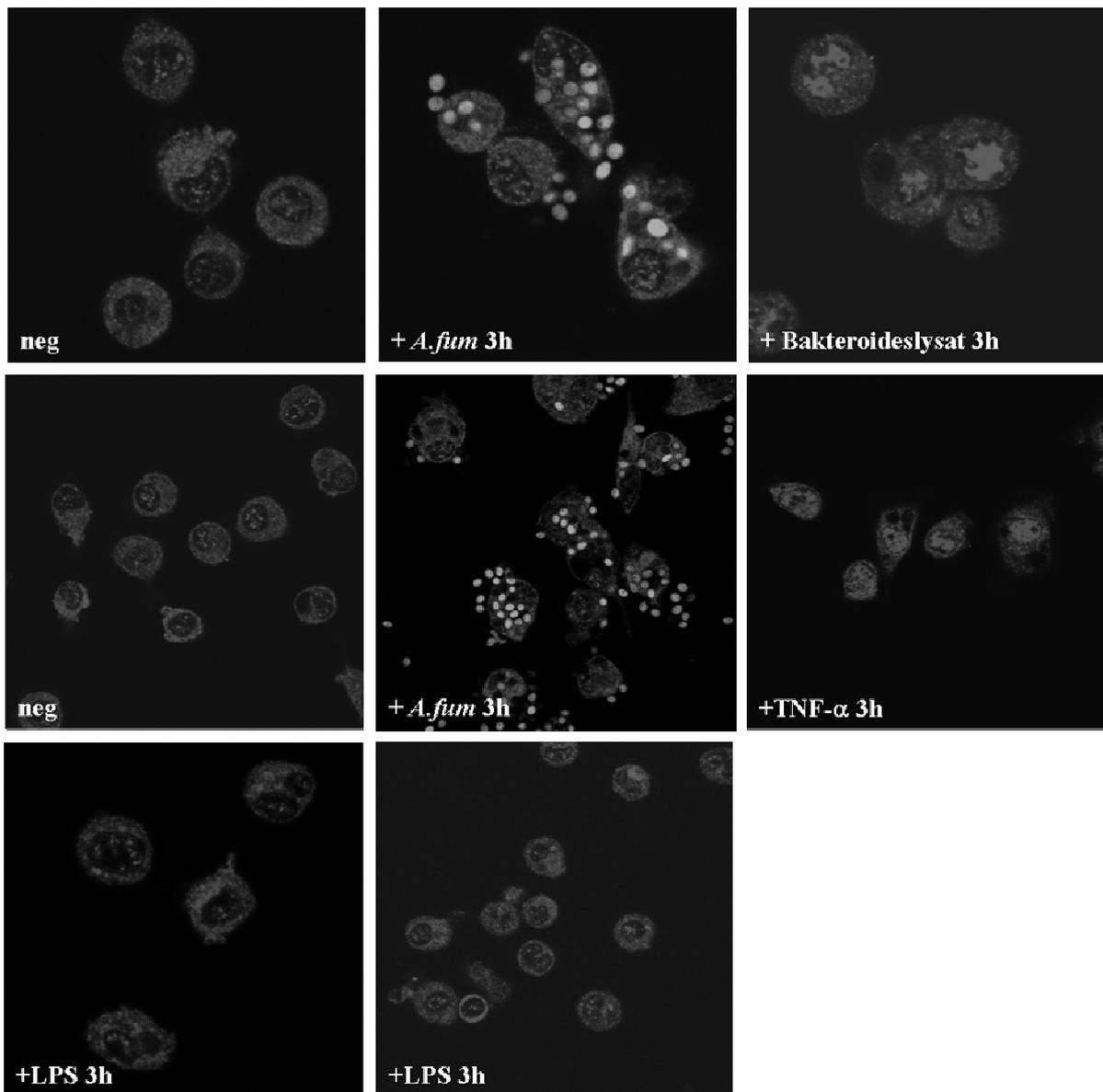


Abb. 14: Murine C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Peritonealmakrophagen in Ruhe, 3h nach Infektion mit grün leuchtenden *A. fumigatus* Konidien sowie nach 3-stündiger Inkubation mit Bakteroideslysat oder LPS (Positivkontrollen).

3.3.2.3. C3H/HeJ

Um zu klären, ob bereits der Verlust eines funktionellen TLR4 zu einem Nichtansprechen der Zellen auf *A. fumigatus* führt, wurden Zellen des C3H/HeJ Stammes verwendet. Wie oben beschrieben besitzen Zellen dieses Mausstammes aufgrund einer Punktmutation im TLR4 Gen keinen funktionellen TLR4.

In der Abb. 15 werden konfokale Schnitte durch Zellen dieses Mausstammes C3H/HeJ gezeigt. In der Negativkontrolle (uninfizierte, ruhende Zellen) zeigt sich die rot markierte NF- κ B Untereinheit p65 vorwiegend im Zytoplasma der Zellen. Dieser Ruhezustand bleibt auch 3h nach Infektion mit lebenden *A. fumigatus* Konidien erhalten: Die grünen Konidien binden an die Zellen und werden in hohem Maße phagozytiert, wie die konfokalen Schnitte in Abb. 15 zeigen. Eine Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern ist jedoch nicht zu erkennen. Die Zellen ohne funktionellen TLR4 sind nicht mehr in der Lage, auf eine 3-stündige Infektion mit *A. fumigatus* mit einer Aktivierung zu reagieren.

Drei Stunden nach Infektion mit dem TLR2-Stimulus Lipoteichonsäure ist jedoch eine deutliche Translokation des rot markierten p65 vom Zytoplasma (ruhende Zellen) in den Zellkern zu erkennen (Abb. 15). Diese Positivkontrolle zeigt an, dass der Verlust eines funktionellen TLR4 nicht zu einem Verlust der Fähigkeit führt, NF- κ B zu translozieren.

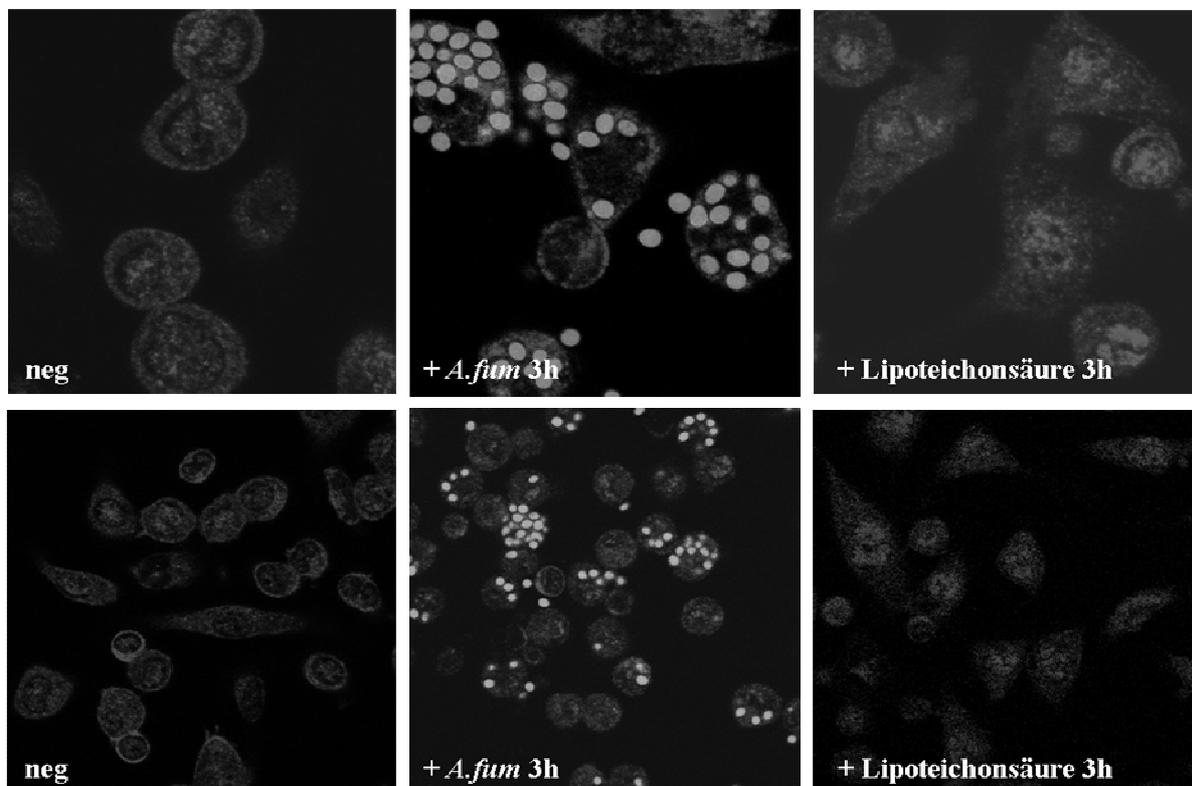


Abb. 15: Murine C3H/HeJ Makrophagen in Ruhe, 3h nach Infektion mit grün leuchtenden *A. fumigatus* GFP – Konidien sowie nach 3-stündiger Stimulation mit Lipoteichonsäuren (Positivkontrolle).

3. Ergebnisse

Da es sich bei der Translokation von NF- κ B um ein transientes Geschehen handelt, sollte geklärt werden, ob der Verlust des funktionellen TLR4 lediglich eine Verzögerung der Translokation als Reaktion auf eine Infektion mit *A. fumigatus* Konidien zur Folge hat. Um dies auszuschließen, wurde der Infektionsverlauf mit Hilfe einer Zeitreihe beobachtet (Abb. 16)

In Abb. 16 werden konfokale Schnitte durch Zellen des Mausstammes C3H/HeJ gezeigt. Auch in diesen Zellen ist eine Zunahme der zellassoziierten und phagozytierten Konidien (grün) mit der Zeit zu beobachten. Auch nach 7-stündiger Infektion ist in den Zellen dieses Mausstammes keine Verschiebung von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern zu beobachten. Zu keinem Zeitpunkt sind *A. fumigatus* Konidien in der Lage, diese Zellen sichtbar zu aktivieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nicht um eine verzögerte, sondern um keine Antwort dieser Zellen auf *A. fumigatus* handelt.

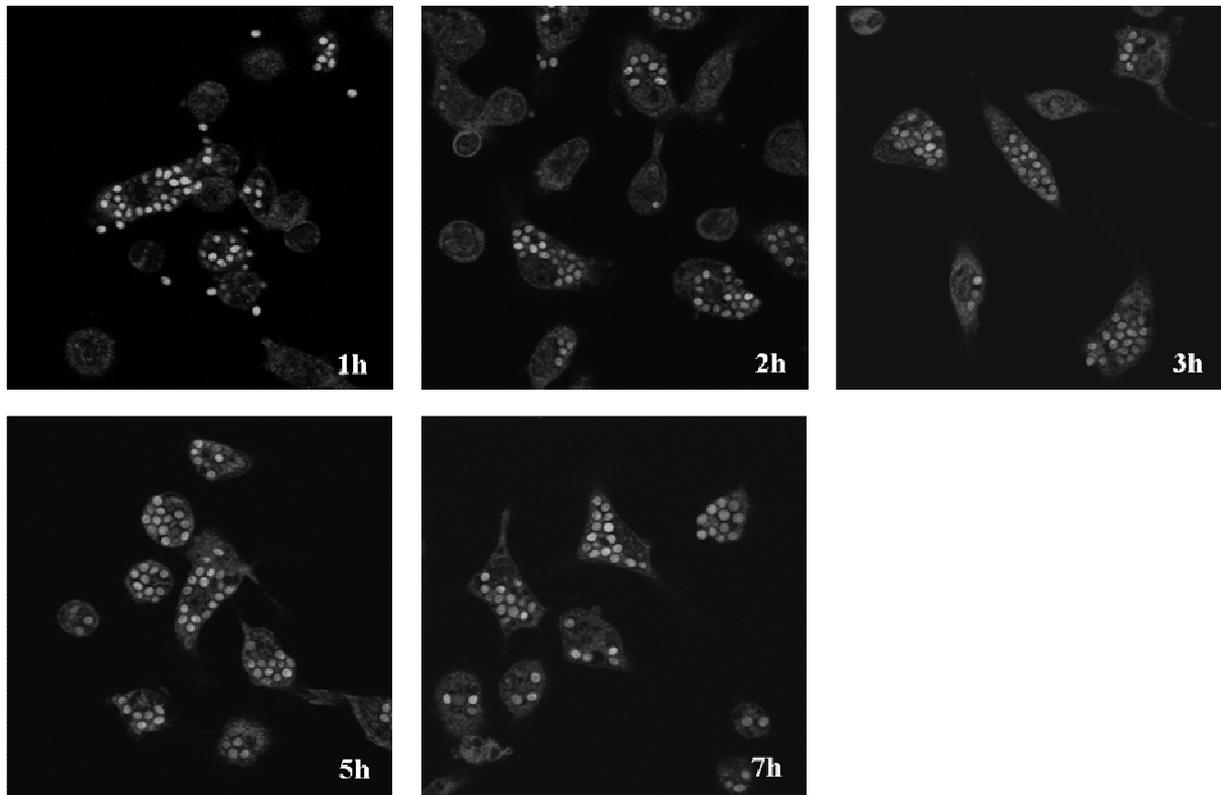


Abb. 16: Murine C3H/HeJ Makrophagen nach 1-stündiger (a) 2-stündiger (b) , 3-stündiger (c), nach 5- stündiger (d) und nach 7-stündiger (e) Stimulation mit GFP-exprimierenden grünen *A. fumigatus* Konidien.

3.3.2.4. C3H/HeN/TLR2^{-/-}

Weiterhin sollte untersucht werden, ob auch der alleinige Verlust von TLR2 zu einem Nicht-Ansprechen der Makrophagen auf *A. fumigatus* führt. Zu diesem Zweck wurden Peritonealmakrophagen des Mausstammes C3H/HeN/TLR2^{-/-} verwendet. Wie oben

3. Ergebnisse

beschrieben besitzt dieser Mausstamm, durch gezielte Insertion einer Neo-Kassette an entsprechender Stelle im Genom, keinen TLR2.

In Abb. 17 werden konfokale Schnitte durch diese Zellen gezeigt. In der Negativkontrolle erkennt man das rot markierte p65 vorwiegend im Zytoplasma (siehe neg). Drei Stunden nach Infektion mit lebenden *A. fumigatus* Konidien (grün) ist eine sehr deutliche Verschiebung von p65 in den Zellkern zu erkennen. Diese Verschiebung von NF- κ B zeigt sich ebenfalls 3h nach Stimulation mit LPS: auch hier sind die Kerne deutlich angefärbt, in diesem Zustand werden NF- κ B abhängige Gene transkribiert, die Zellen befinden sich in einem aktivierten Zustand (s. Abb. 17).

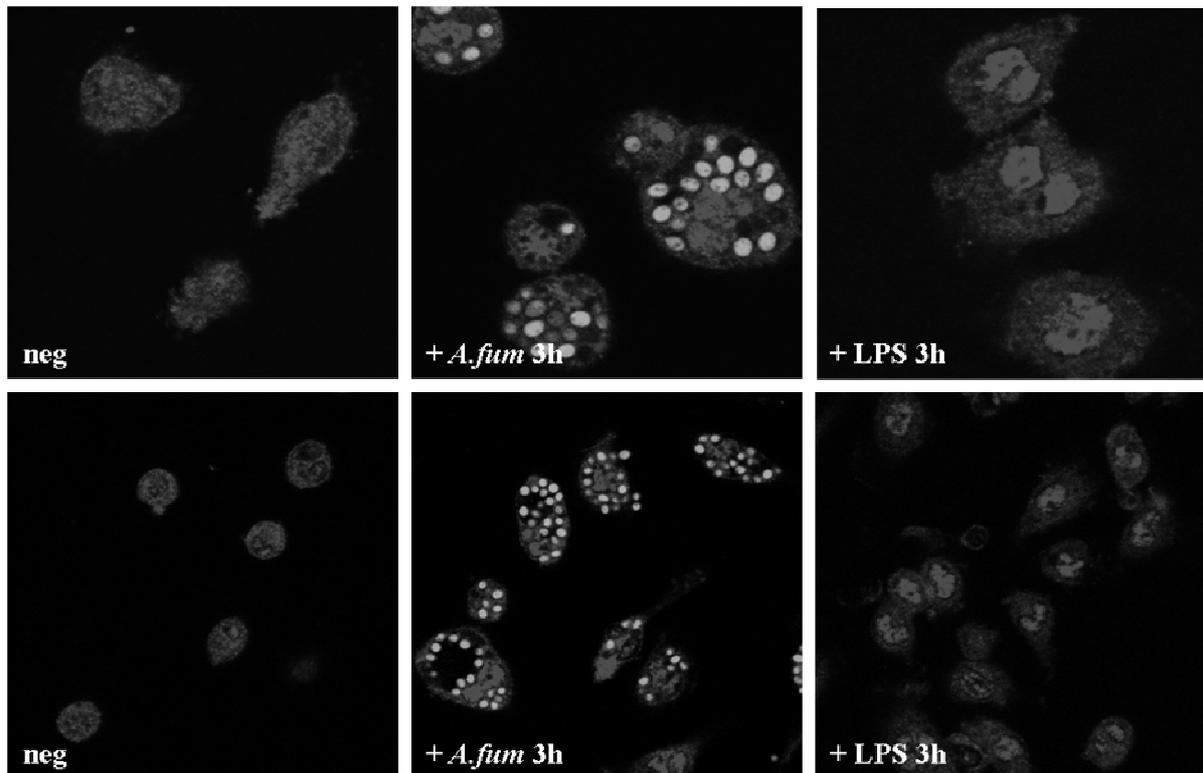


Abb. 17: C3H/HeN/TLR2^{-/-} Peritonealmakrophagen in Ruhe, nach 3 stündiger Infektion mit grün leuchtenden, konstitutiv GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Konidien und nach 3-stündiger Inkubation mit LPS. (Positivkontrolle).

Anhand dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass der Verlust von TLR2 nicht zu dem Verlust der Fähigkeit führt, auf eine Infektion mit *A. fumigatus* hin mit einer Aktivierung zu reagieren.

3.3.3. Zusammenfassung der NF- κ B Translokationsexperimente

Zusammenfassend konnte aufgrund der bisherigen Ergebnisse der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass

- 1.) Der Verlust eines funktionellen TLR4 bei Peritonealmakrophagen zu einem Nichterkennen von lebenden Konidien von *A. fumigatus* führt, ein funktioneller TLR4 also essentiell für eine dem Wildtyp entsprechende Translokation von NF- κ B ist.
- 2.) Ein Verlust von TLR2 führt jedoch nicht zu einem Ausbleiben der Erkennung von *A. fumigatus*, nach Infektion der Zellen wurde in der Immunfluoreszenz auch in den TLR2-defizienten Mäusen NF- κ B dem Wildtyp entsprechend transloziert.
- 3.) Diese in der Immunfluoreszenz beobachtete Abhängigkeit der Erkennung von *A. fumigatus* Konidien durch peritoneale Makrophagen von TLR4 das Ergebnis der HEK293-Experiment in Bezug auf TLR4, nicht jedoch in Bezug auf TLR2 bestätigen konnte.

3.3.4. Stimulation von Wildtyp-Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Materialien von *A. fumigatus*

Für einige Experimente ist es notwendig, die Konidien oder das Myzel von *A. fumigatus* in einem gleichbleibenden Stadium zu erhalten, d.h. eine Auskeimung zu verhindern. Dies ist z.B. für Versuche sinnvoll, bei denen Konidien oder Myzel für viele Stunden als solche einwirken müssen ohne in ein anderes Stadium überzugehen z.B. bei Zytokin-Assays. Um zu untersuchen, ob diese abgetöteten Pilzmaterialien ebenfalls in der Lage sind, NF- κ B Translokation, ähnlich ihrer lebenden Äquivalente, in peritonealen Makrophagen hervorzurufen, oder ob durch die Abtötung die Oberfläche so verändert wurde, dass diese Translokation nicht mehr stattfindet, wurden NF- κ B Translokationsassays mit den abgetöteten Pilzmaterialien durchgeführt.

3.3.4.1. Stimulation muriner Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Konidien von *A. fumigatus*

In Abb. 18 werden konfokale Schnitte von Peritonealmakrophagen des Wildtyp-Mausstammes C3H/HeN vor und nach Stimulation mit abgetöteten Konidien gezeigt. Wiederum wurde die NF- κ B Untereinheit p65 rot markiert. Da die abgetöteten Konidien farblos und somit in der Immunfluoreszenz nicht sichtbar sind, wurde die Infektion auch lichtmikroskopisch verfolgt. Nach bereits 1h waren in der lichtmikroskopischen Kontrolle

3. Ergebnisse

intrazelluläre Konidien zu erkennen (Daten nicht gezeigt). In der Immunfluoreszenz sind die phagozytierten Konidien nur silhouettenartig als Aussparung der roten Färbung zu erkennen (blaue Pfeile). Ebenfalls bereits 1h nach Infektion ist eine Verschiebung der rot markierten NF- κ B Untereinheit p65 vom Zytoplasma (siehe Abb. 14, neg) in den Zellkern zu erkennen (siehe Abb.14, 1h weiße Pfeile). Diese Verschiebung von NF- κ B in den Kern beginnt nach einer Stunde, zeigt sich nach 2h besonders intensiv und ist nach 5h wieder rückläufig.

Abgetötete Konidien von *A. fumigatus* sind also in der Lage, C3H/HeN Zellen zu aktivieren. Die Aktivierung durch tote Konidien kann jedoch nicht so lange wie die Aktivierung durch lebende Konidien aufrechterhalten werden.

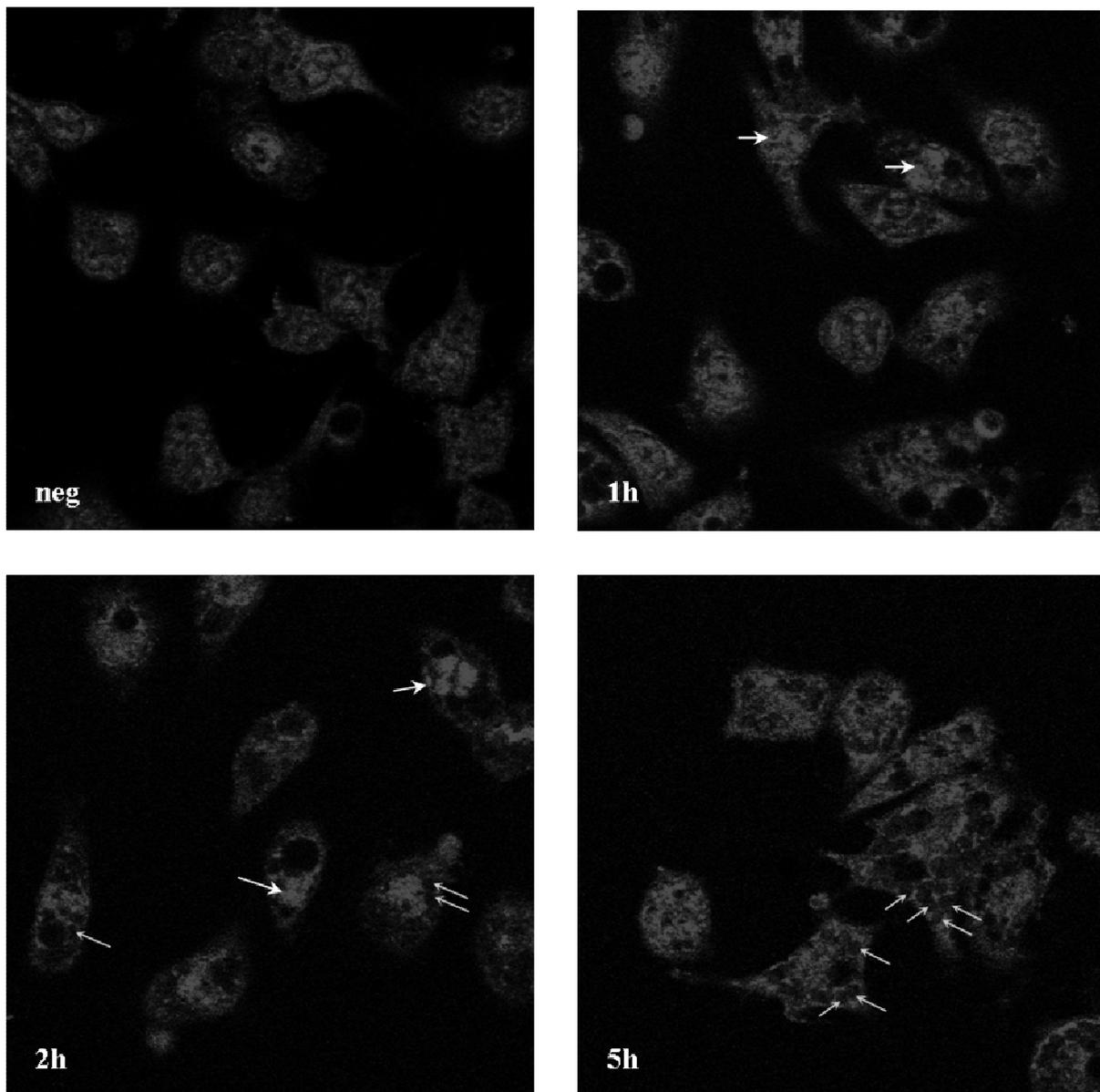


Abb. 18: Murine C3H/HeN Peritonealmakrophagen in Ruhe, nach 1-stündiger, nach 2-stündiger und nach 5-stündiger Stimulation mit EtOH-abgetöteten Konidien von *A. fumigatus*.

3.3.4.2. Stimulation muriner Peritonealmakrophagen mit abgetöteten Hyphen von *A. fumigatus*

Die Abb. 19 zeigt konfokale Schnitte durch Zellen des Wildtyp- Mausstammes C3H/HeN vor und nach Stimulation mit abgetötetem *A. fumigatus* Myzel. Die NF- κ B Untereinheit p65 ist rot markiert.

Nach einer Stunde haben die Makrophagen das farblose Myzel bereits verschlungen. Da viele der Fäden zu lang sind, um von einem einzigen Makrophagen phagozytiert zu werden scheinen die Zellen sich diese Aufgabe zu teilen: Durch die Aneinanderreihung von mehreren Makrophagen sind einzelne Myzelfäden als Aussparungen in den Zellkörpern der sie phagozytierenden Zellen zu erkennen (Abb. 19 1h und 3h, blaue Pfeile).

Ebenfalls bereits nach 1h ist eine deutliche Verschiebung von NF- κ B vom Zytoplasma (Abb. 19, neg) in den Kern (Abb. 19 1h, weiße Pfeile) zu erkennen. Diese so sichtbar gemachte Aktivierung war auch 5h nach Infektion noch gut zu erkennen.

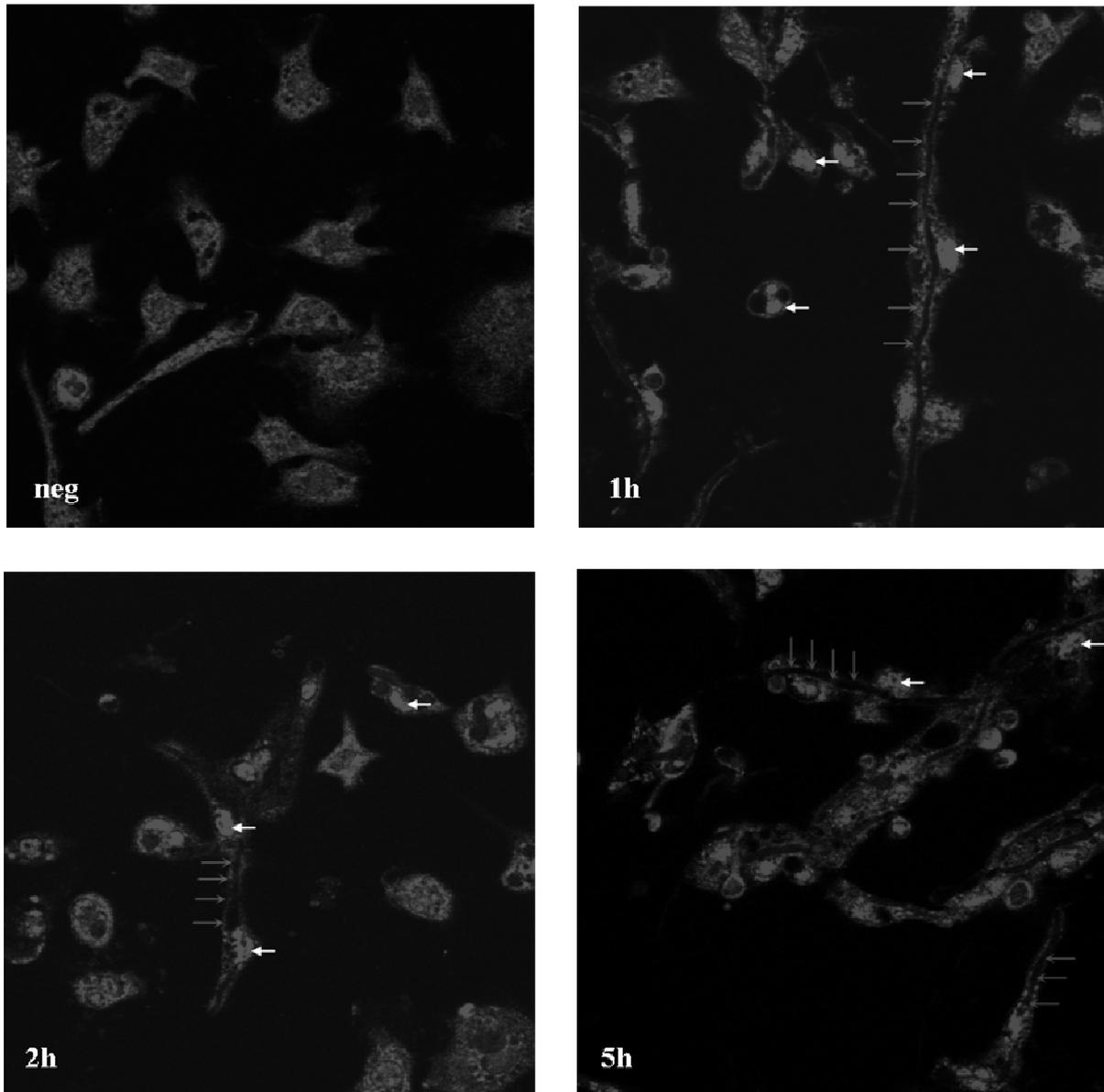


Abb. 19: Peritonealmakrophagen von C3H/HeN Mäusen in Ruhe (neg), 1h, 2h und 5h nach Infektion mit abgetöteten Hyphenmaterial von *A. fumigatus*.

3.4. Zyto- und Chemokinproduktion, Produktion von NO

Da die Methodik der Immunfluoreszenz nur eine qualitative Beurteilung auf Einzelzellebene erlaubt, war die Notwendigkeit der Etablierung einer Methode gegeben, die eine Quantifizierung der Aktivierung einzelner Zellpopulationen zulässt. Desweiteren sollte die Abhängigkeit der Erkennung von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen von TLR4 und TLR2 mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Um dies zu bewerkstelligen, wurden die Zellen mit verschiedenen Stimuli inkubiert und anschließend ihre Zytokin- und NO-Produktion mit Hilfe eines ELISAs bzw. des GRIES Reagenz gemessen.

3. Ergebnisse

Jeweils $1,5 \times 10^5$ peritoneale Makrophagen der verschiedenen, oben beschriebenen Genotypen wurden in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die entsprechenden Ansätze wurden mit IFN- γ vorstimuliert.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen gewaschen, das Medium und gegebenenfalls Das IFN- γ erneuert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Stimulantien stimuliert und nach 16h wurden die produzierten Zyto- und Chemokine sowie die Konzentration von NO im Überstand der Zellen bestimmt. Für die Messung von TNF- α und MIP-2 wurde ein vorgefertigtes Kit verwendet.

3.4.1. TNF- α Produktion

In den Messungen der Produktion von TNF- α zeigte sich in den Ansätzen ohne IFN- γ für das *A. fumigatus* Myzel eine TLR4- und, weniger stark, eine TLR2-Abhängigkeit (s. Abb. 20, blaue (C3H/HeJ, TLR4 defizient) und graublau (C3H/HeN/TLR2-/-) Säule im Vergleich mit der hellblauen Säule (C3H/HeN) die dem Wildtyp entspricht), im doppeldefizienten (C3H/HeJ/TLR2-/-) Genotyp konnte weder nach Stimulation mit Hyphenmaterial noch nach Stimulation mit Konidien eine Produktion von TNF- α gemessen werden (s. Abb. 20, graue Säule, nur in der CpG Kontrolle durch die Stimulation von TLR9 positiv).

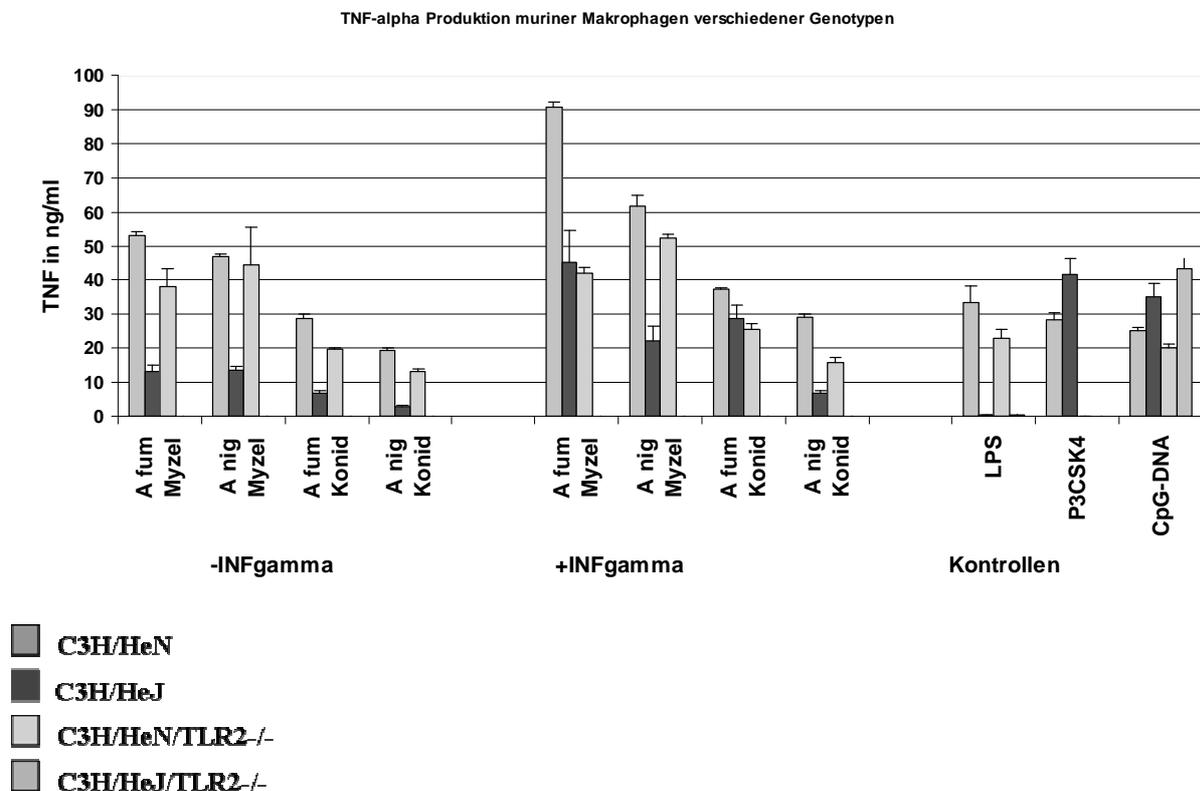


Abb. 20: Quantitative Auswertung der TNF- α Produktion von aus der Bauchhöhle von Mäusen verschiedener Genotypen gewonnener Makrophagen: In den Positivkontrollen reagieren die Genotypen wie erwartet, in den

3. Ergebnisse

Ansätzen ohne IFN- γ zeigt sich eine vorwiegende TLR4 Abhängigkeit, in den Ansätzen mit IFN- γ gewinnt der TLR2 an Bedeutung (siehe Text).

In den Ansätzen, die mit IFN- γ vorstimuliert wurden, zeigte sich ein interessantes Phänomen: hier war nach Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel die Produktion von TNF- α stärker TLR2 abhängig als in den Ansätzen ohne Vorstimulation (siehe Abb. 20 hellblaue Säule (C3H/HeN, Wildtyp) im Vergleich zur graublauen Säule (C3H/HeN/TLR2-/-, TLR2 defizient).

Der TLR4 defiziente Mausstamm (C3H/HeJ, blaue Säule) zeigte in den Ansätzen mit IFN- γ Vorstimulation eine deutlich stärkere TNF- α Produktion als in den Ansätzen ohne diese Vorstimulation (siehe Abb. 20, vergleiche blaue Säulen nach Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel, mit und ohne IFN- γ). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Signal über TLR2 an Bedeutung gewinnt, bzw. TLR2 durch Vorstimulation mit IFN- γ hochreguliert wird.

Ein ähnliches Muster zeigt sich nach Stimulation der verschiedenen Zellen mit *A. fumigatus* Konidien (Abb. 20): insgesamt stimulierte in allen Ansätzen die adäquat zum Myzel eingesetzte Menge an Konidien die Zellen nicht so stark wie das Hyphenmaterial, die Abhängigkeit von der Anwesenheit der Rezeptoren TLR2 und TLR4 zeigte sich jedoch auch hier: im Ansatz ohne IFN- γ konnte eine starke Abhängigkeit von TLR4 und weniger von TLR2 beobachtet werden. Nach der Vorstimulation mit IFN- γ gewann der TLR2 auch hier an Bedeutung: Die Zellen des Mausstammes C3H/HeJ (TLR4 defizient, blaue Säule) produzierten, nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, sogar deutlich mehr TNF- α als in den Ansätzen ohne diese Vorstimulation. Dieses sowohl nach Stimulation mit dem Hyphenmaterial als auch nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien beobachtete Phänomen könnte, wie bereits erwähnt, auf eine Hochregulation von TLR2 durch IFN- γ hindeuten.

Diejenigen Zellen, die weder einen TLR2 noch einen funktionellen TLR4 besaßen (graue Säule), produzierten nur in der Positivkontrolle, durch Stimulation von TLR9 mit CpG-DNA, TNF- α .

Um festzustellen, ob es einen Unterschied in der Reaktion auf pathogene zu der Reaktion auf apathogene *Aspergilli* gibt, d.h. um zu untersuchen, ob das angeborene Immunsystem bereits nach erstem Kontakt zwischen pathogen und nicht-pathogen zu unterscheiden vermag, wurde die TNF- α Produktion nach Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel oder Konidien mit der TNF- α Produktion nach Stimulation mit dem apathogenen *A. niger* verglichen.

Es zeigte sich KEIN signifikanter Unterschied zwischen den Reaktionen im Wildtyp auf Pathogen und Nicht-pathogen (Abb. 20 hellblaue Säulen (C3H/HeN, Wildtyp)). Es konnte in den Ansätzen ohne IFN eine starke TLR4-Abhängigkeit gezeigt werden. Die nach IFN- γ

3. Ergebnisse

Stimulation im *A. fumigatus* Ansatz beobachtete stärkere Gewichtung der Bedeutung von TLR2 verglichen mit dem Ansatz ohne IFN Vorstimulation konnte als Reaktion auf *A. niger* jedoch NICHT beobachtet werden: Hier zeigte sich eine starke Abhängigkeit von TLR4, jedoch fast keine Abhängigkeit von TLR2. Als Reaktion auf *A. niger* konnte, anders als im *A. fumigatus* Ansatz beobachtet, kein Unterschied in der Abhängigkeit von TLRs durch Vorstimulation mit IFN- γ festgestellt werden. Hier schien die im *A. fumigatus* Ansatz vermutete Hochregulation von TLR2 nicht stattzufinden oder zumindest keine Bedeutung zu haben.

In den Positivkontrollen konnten die Richtigkeit der Genotypen ein weiteres mal kontrolliert werden: Nach Stimulation mit LPS reagierten nur die Zellen der wildtypischen Mäuse (Abb. 20 C3H/HeN, hellblaue Säule) und der TLR2-defiziente Makrophagen (C3H/HeN/TLR2^{-/-}, blaugraue Säule). Diese beiden Genotypen besitzen eine funktionelle TLR4, dieser ist zur Erkennung von LPS notwendig (Poltorak et al., 1998).

Auf die Stimulation mit dem TLR2-Agens P3CSK4 (PAM 3 Cys) reagierten nur die Genotypen mit einem TLR2: C3H/HeN (hellblaue Säule) und C3H/HeJ (blaue Säule).

Alle Genotypen spachen auf den TLR9 Stimulus CpG-DNA an. Dies zeigte, dass die Defizienz eines TLR2 nicht prinzipiell zu dem Verlust führt, TNF- α zu produzieren, sondern dass die beobachtete verminderte Produktion mit dem Verlust der Fähigkeit zusammenhängt, *Aspergillus* zu erkennen.

3.4.2. MIP-2 Produktion

In der Produktion des Chemokins MIP-2 als Reaktion auf *A. fumigatus* Myzel zeigte sich ein etwas anderes Bild (s. Abb. 21): Hier schien die Erkennung des Myzels des Pilzes am stärksten von TLR2 abhängig zu sein (hellblaue Säule, entspricht dem Wildtyp C3H/HeN im Vergleich zur blaugrauen Säule), jedoch auch von TLR4 (hellblaue Säule im Vergleich zu blauen Säule. Der doppeldefiziente Mausstamm, C3H/HeJ/TLR2^{-/-}, graue Säule) reagierte auf die Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel wie der TLR2 defiziente Stamm (blaugraue Säule).

Die Kontrollen reagierten hier ebenfalls wie erwartet: alle Genotypen reagierten in gleichem Maße auf den TLR9-Stimulus CpG-DNA. Auf LPS reagierten nur die Genotypen C3H/HeN (hellblaue Säule) und C3H/HeN/TLR2^{-/-} (blaugraue Säule), da diese den zur LPS Erkennung notwendigen TLR4 besitzen, nicht jedoch die Genotypen ohne funktionellen TLR4. Auf den TLR2-Stimulus P3CSK4 reagierten nur die Zellen derjenigen Genotypen, die einen TLR2 besitzen: C3H/HeN (hellblaue Säule) und C3H/HeJ (blaue Säule). Die Zellen der Genotypen

3. Ergebnisse

ohne TLR2 waren wie erwartet nicht in der Lage, auf diesen Stimulus hin MIP-2 zu produzieren, da sie ihn nicht wahrzunehmen vermochten.

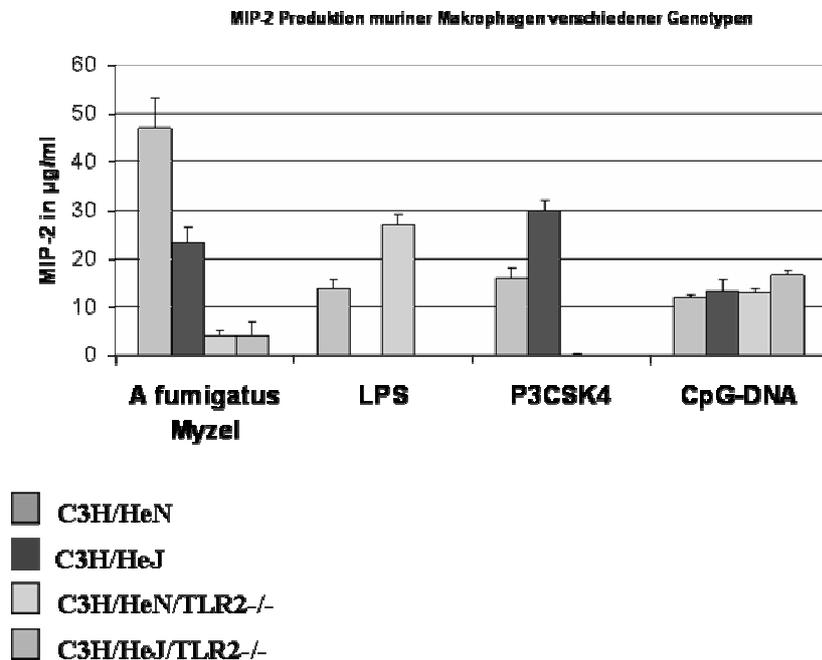


Abb. 21: Quantitative Auswertung der MIP-2 Produktion der aus der Bauchhöhle von Mäusen verschiedener Genotypen (siehe Farbkodierung) gewonnenen Makrophagen nach Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel. Jeder dieser Genotypen reagiert in etwa gleichem Maße auf den in der Positivkontrolle verwendeten Stimulus CpG-DNA. Die anderen Kontrollen reagierten wie erwartet. Die Stimulation durch *A. fumigatus* Myzel zeigte sich vorwiegend TLR2 aber auch TLR4 abhängig (siehe Text).

3.4.3. NO-Produktion

In den Messungen der Produktion von NO nach Stimulation der Makrophagen mit *Aspergillus* zeigte sich auch hier eine deutliche Abhängigkeit der Erkennung der Infektion von TLR2 und TLR4.

3. Ergebnisse

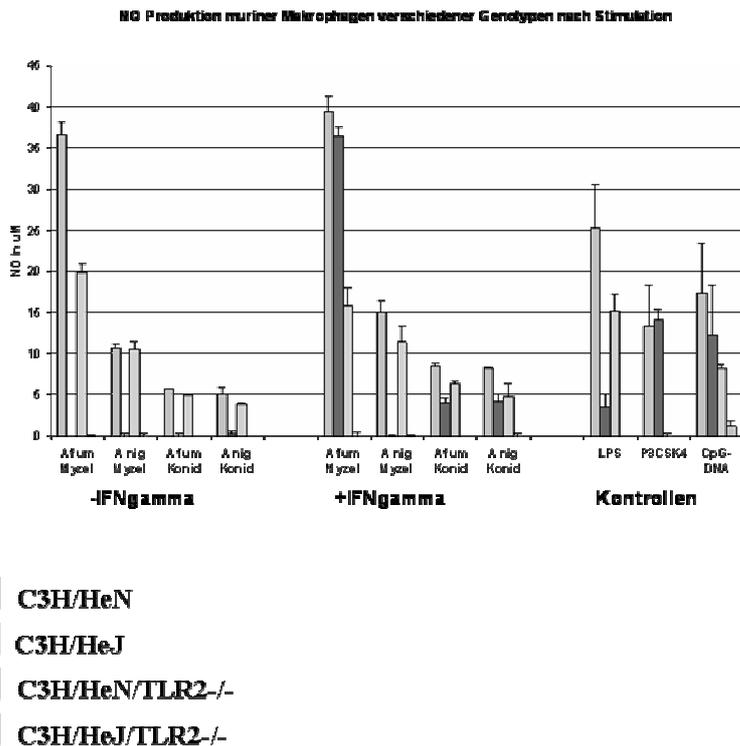


Abb. 22: Quantitative Auswertung der NO-Produktion von aus der Bauchhöhle von Mäusen verschiedener Genotypen gewonnener Makrophagen: In der Positivkontrolle reagieren die Genotypen wie erwartet, in den Ansätzen ohne IFN- γ zeigt sich eine vorwiegende TLR4 Abhängigkeit, in den Ansätzen mit IFN- γ gewinnt der TLR2 an Bedeutung, Ausnahme: *A. niger* Myzel (siehe Text).

Hier war ebenfalls, wie in den Messungen von TNF- α , ein deutlicher Unterschied in den Ansätzen ohne und mit IFN- γ zu erkennen: Diejenigen Zellen, die nicht mit IFN- γ vorstimuliert worden waren, zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Erkennung von *A. fumigatus* von TLR4, weniger ausgeprägt auch eine Abhängigkeit von TLR2 (Abb. 19, hellblaue Säule (C3H/HeN, Wildtyp) im Vergleich zur blauen Säule (C3H/HeJ, TLR4 defizient) und blaugrauer Säule (C3H/HeN/TLR2-/-, TLR2 defizient)).

Die Erkennung der Konidien von *A. niger* schien ohne IFN- γ Vorstimulation ausschließlich von TLR4 abhängig zu sein (Abb. 19 hellblaue Säule) im Vergleich zur blaugrauen Säule). Nach IFN- γ -Vorstimulation zeigte die Aktivierung durch die Konidien von *A. niger* (im Gegensatz zu dessen Myzel) eine stärkere Abhängigkeit von TLR2.

Nach der Vorstimulation mit IFN- γ schien der TLR2 für die Detektion von *A. fumigatus* an Bedeutung zu gewinnen: die TLR4-defizienten Zellen reagierten ebenso stark wie der Wildtyp auf das Myzel von *A. fumigatus* (Abb. 19, hellblaue Säule im Vergleich zur blauen Säule), die TLR2-defizienten Zellen zeigten sich in ihrer Produktion von NO hingegen stark eingeschränkt (Abb. 19, hellblaue Säule im Vergleich mit der graublauen Säule). Dieses

3. Ergebnisse

Phänomen war auch hier, wie in den Messungen der Produktion von TNF- α , nur als Reaktion auf das Myzel von *A. fumigatus* und nicht als Reaktion auf das Myzel von *A. niger* zu erkennen.

Die Zellen des doppeldefizienten Stammes, C3H/HeJ/TLR2^{-/-}, zeigten weder auf Myzel noch auf Konidien der Pilze eine Reaktion. Die Positivkontrolle mit CpG-DNA konnte jedoch zeigen, dass diese Zellen in der Lage waren, NO zu produzieren und diese Fähigkeit nicht durch die Mutation von TLR4 und TLR2 verloren hatten. Hiermit konnte gezeigt werden, dass keiner der anderen bekannten TLR's bei der Erkennung dieser Pilze eine Rolle spielt.

Insgesamt schien das Myzel von *A. fumigatus* die Zellen stärker als das Myzel von dem apathogenen Pilz *A. niger* zur Produktion von NO anzuregen. Zwischen den insgesamt schwächer stimulierenden Konidien zeigte sich, hinsichtlich der Stimulationsintensität, kein Unterschied zwischen *A. fumigatus* und *A. niger*.

3.4.4. Zusammenfassung der Zytokin- und NOproduktions-Experimente

Zusammenfassend kann also gesagt werden:

- Ohne IFN- γ Vorstimulation ist die Produktion von TNF- α und die Produktion von NO als Reaktion auf Myzel oder Konidien von sowohl *A. fumigatus* als auch *A. niger* abhängig von TLR4 und - in geringerem Maße - von TLR2.
- Nach der Vorstimulation mit IFN- γ gewinnt das *A. fumigatus* Signal über TLR2 an Bedeutung.
- Dieses Phänomen ist nach Stimulation mit *A. niger* nicht zu beobachten. Die Produktion von TNF- α als Reaktion auf Myzel oder Konidien von *A. niger* ist, sowohl ohne als auch mit Vorstimulation von IFN- γ , abhängig von TLR4 und, dies jedoch nur in geringem Maße, abhängig von TLR2. Eine Ausnahme bildet die Produktion von NO als Reaktion auf Konidien, nicht jedoch auf Myzel von *A. niger*: hier scheint nach Vorstimulation mit IFN- γ die NO Produktion stärker TLR2 abhängig.
- Die Produktion des Chemokins MIP-2 als Reaktion auf *A. fumigatus* Myzel ist stark abhängig von TLR2 und, in geringerem Maße, abhängig von TLR4.
- Die für die Detektion von *Aspergillus* verantwortlichen TLR's sind also TLR4 und TLR2.
- Alle anderen TLR's spielen bei der Erkennung von sowohl Myzel als auch Konidien von *A. fumigatus* und *A. niger* keine entscheidende Rolle.
- Ohne Vorstimulation mit IFN- γ besteht kein signifikanter Unterschied in der TLR-Abhängigkeit der Erkennung zwischen pathogenen und apathogenen *Aspergilli*.

3.5. Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Um die bisher in vitro erzielten Ergebnisse auf ein in vivo System übertragen zu können wurde ein bereits beschriebenes Maus-Modell etabliert, das die Neutrophilenrecrutierung als wichtiges Element einer erfolgreichen Immunabwehr analysierbar macht (Netea et al., 2002). Bei diesen Versuchen wurde den Mäusen abgetötetes Pilzmaterial in die Bauchhöhle injiziert. Dadurch wurde eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, die zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten führt. Neutrophile Granulozyten werden chemotaktisch zum Ort der Entzündung gelockt. Dies setzt jedoch voraus, dass „fremd“ zuvor als solches erkannt wird. Dies wird von im der Bauchhöhle ansässigen Makrophagen bewerkstelligt, den Peritonealmakrophagen. Diese phagozytieren eindringende Pathogene und entsenden entsprechende Chemokine, die zur Anlockung von Neutrophilen führen.

Prinzip:

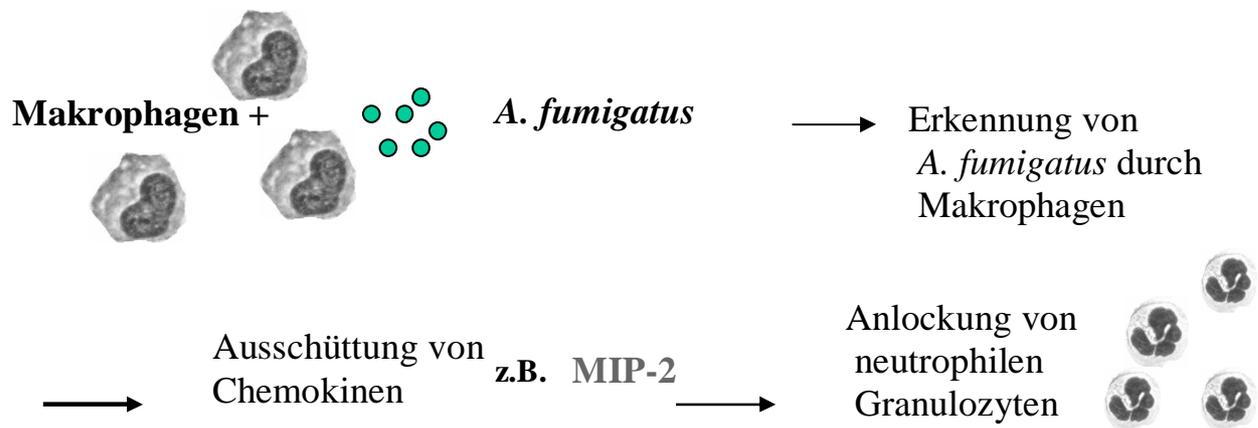


Abb. 23: Schematische Darstellung des Prinzips der Anlockung von neutrophilen Granulozyten

Die Erkennung durch die Peritonealmakrophagen ist also eine wichtige Voraussetzung für eine adäquate Entzündungsantwort. Diese Entzündungsantwort wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion ausgewertet: durch eine Peritoneallavage wurde der Inhalt der Bauchhöhle gewonnen und die sich darin befindlichen Zellen nach Zentrifugation auf einen Objektträger mittels Zytospin, nach Pappenheim angefärbt. Hierdurch war es möglich, neutrophile Granulozyten zu identifizieren und ihren prozentualen Anteil an der Gesamtzellzahl der sich in der Lavage befindlichen Zellen zu bestimmen.

3. Ergebnisse

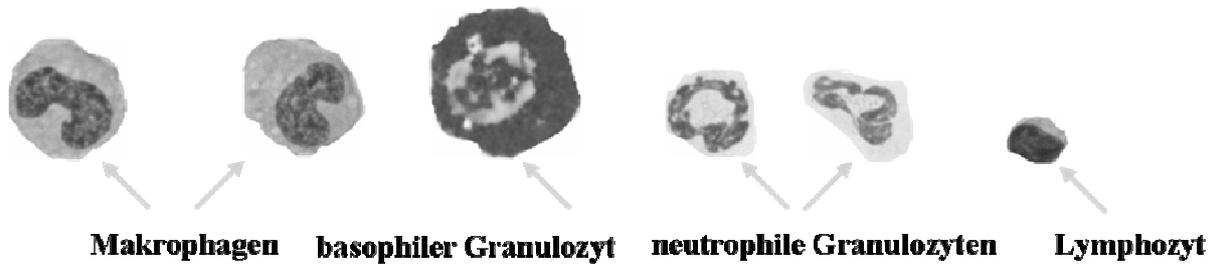


Abb. 24: Darstellung der verschiedenen in die Bauchhöhle der Mäuse eingewanderten Zelltypen nach Pappenheim-Färbung.

3.5.1 Stimulation mit Hyphenmaterial

Zunächst wurde der optimale Zeitpunkt zum Ablesen der Entzündungsantwort im Wildtyp, C3H/HeN, bestimmt. In der Analyse der Lavage von uninfizierten Tieren zeigten sich, wie erwartet, ausschließlich Makrophagen. Im Zuge dieses Versuches wurde, nach Injektion von EtOH-abgetötetem Hyphenmaterial von *A. fumigatus*, zu verschiedenen Zeitpunkten der prozentuale Anteil an eingewanderten neutrophilen Granulozyten an den sich in der Peritoneallavage befindlichen Zellen bestimmt.

Bereits 2h nach i.p. Injektion von EtOH-abgetöteten Hyphenmaterial zeigte sich eine signifikante Veränderung des Lavageinhaltes (Abb. 25):

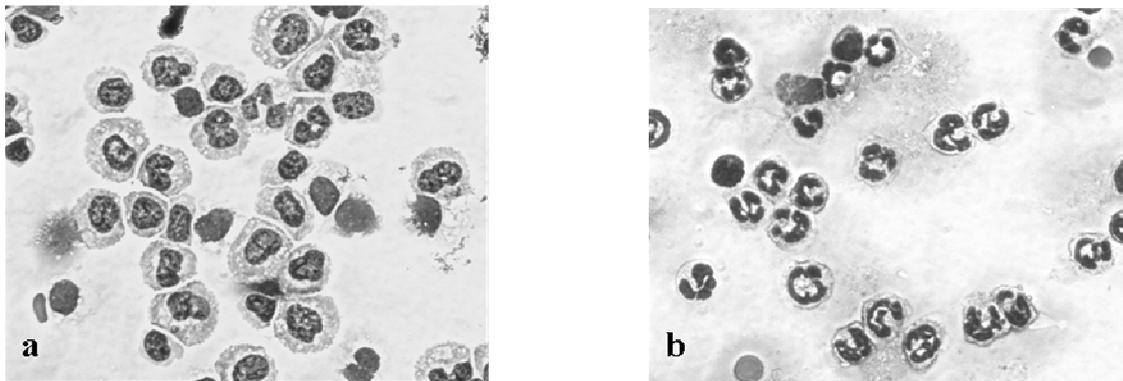


Abb. 25: Inhalt der Peritoneallavage von C3H/HeN Mäusen a 2h nach Injektion von PBS (Negativkontrolle), b 2h nach Injektion von EtOH-abgetöteten *A. fumigatus* Myzel. Die durch Peritoneallavagegewonnenen Zellen wurden mittels auf Objektträger aufgebracht und anschließend nach Pappenheim gefärbt.

Die Lavagen der uninfizierten Tiere enthielten noch fast ausschließlich Peritonealmakrophagen, die der infizierten Tiere jedoch bereits über 60% neutrophile Granulozyten (Abb. 25b und Abb. 26 lila Säulen), ebenso nach 4h und nach 6h (Abb. 26). Um auszuschließen, dass der Injektionsreiz allein zu einer Entzündungsantwort führt, wurde 2 Mäusen lediglich PBS in die Bauchhöhle injiziert. Zu keinem Zeitpunkt zeigten sich neutrophile Granulozyten in der Lavage dieser mit PBS „infizierten“ Mäuse (Abb. 26 und Abb. 27, weiße Säulen).

3. Ergebnisse

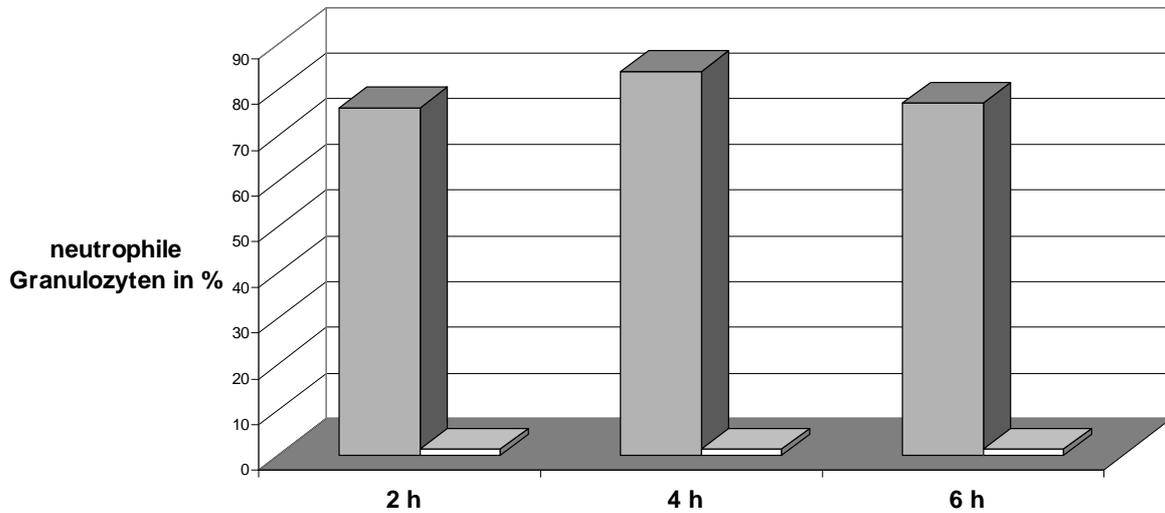


Abb. 26: Quantitative Auswertung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten nach Injektion von EtOH-abgetöteten *A. fumigatus* Myzel. Bei jeweils 3 Mäusen wurde 2h, 4h und 6h nach der Infektion eine Peritoneallavage durchgeführt, deren Inhalt wurde mittels Zytospin auf Objektträger gebracht und anschließend nach Pappenheim gefärbt. Pro Maus wurden 900 Zellen gezählt und der prozentuale Anteil von Neutrophilen an der Gesamtzellzahl bestimmt (lila Säule). Weiße Säule: Prozentualer Anteil der nach Injektion von PBS eingewanderten Neutrophilen an der Gesamtzellzahl.

Um die für die Anlockung neutrophiler Granulozyten effektivste Konzentration an Hyphenmaterial in 100ml Injektionslösung zu ermitteln wurde den Wildtyp-Mäusen Lösungen mit jeweils unterschiedlichem Myzelgehalt injiziert. Hierbei zeigte sich die effektivste Rekrutierung neutrophilen Granulozyten nach 2h und 50%igem Myzelgehalt (Abb. 27).

3. Ergebnisse

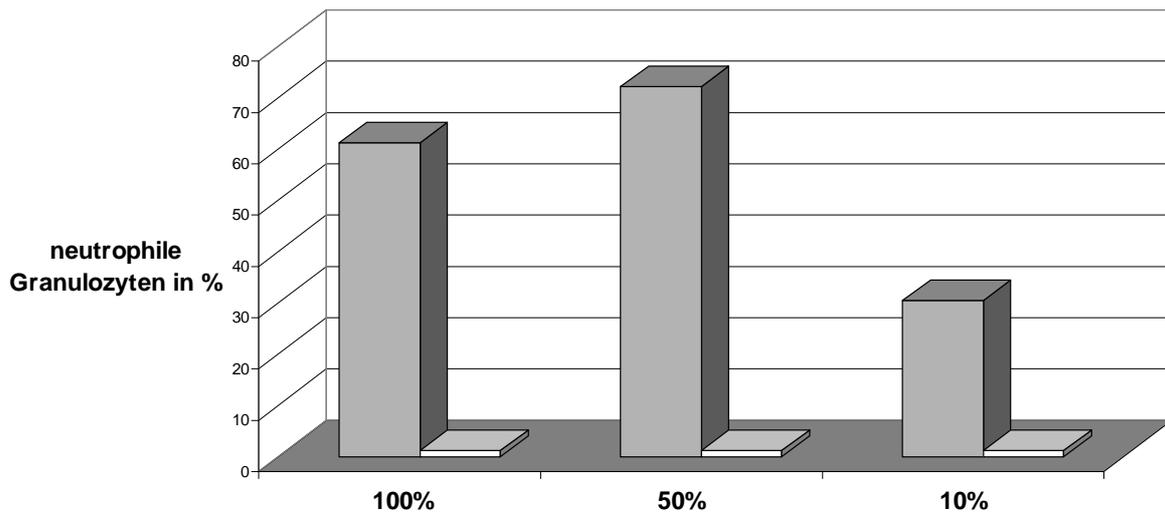


Abb. 27: Quantitative Auswertung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten nach Injektion von EtOH-abgetötetem *A. fumigatus* Myzel unterschiedlicher Konzentrationen: 2h nach der Infektion wurde eine Peritoneallavage durchgeführt, deren Inhalt mittels Zytospin auf Objektträger gebracht und anschließend nach Pappenheim gefärbt. Pro Konzentration wurden 3 Mäuse eingesetzt und pro Maus wurden 900 Zellen gezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von Neutrophilen an der Gesamtzellzahl bestimmt (lila Säule). Weiße Säule: Prozentualer Anteil der nach Injektion von PBS eingewanderten Neutrophilen an der Gesamtzellzahl. Bei einem Myzelgehalt von 50% zeigte sich die effektivste Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.

Da die bisher von uns in vitro erzielten Ergebnisse eine Abhängigkeit der Erkennung von *A. fumigatus* durch Peritonealmakrophagen implizieren, wurden Rekrutierungsexperimente an den oben beschriebenen Mausstämmen C3H/HeN (Wildtyp), C3H/HeJ (TLR4-defizient), C3H/HeN/TLR2^{-/-} (TLR2-defizient) und C3H/HeJ/TLR2^{-/-} (TLR2- und TLR4-defizient) durchgeführt (Abb. 28, Abb. 29 und Abb. 30).

Um zu zeigen, dass die TLR-defizienten Mäuse die Eigenschaft, neutrophile Granulozyten anzulocken nicht prinzipiell schon durch ihre Mutation im TLR-Gen verloren hatten, wurde jeweils zwei Mäusen jedes Genotyps Thioglycollat als Positivkontrolle injiziert und die Anlockung der Neutrophilen ausgewertet. Durch diese Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass alle Genotypen auf den Entzündungsreiz „Thioglycollat“ mit der Anlockung vergleichbarer Prozentzahlen neutrophiler Granulozyten reagierten (Abb. 29 und Abb. 30, blaue Säulen). Als Negativkontrolle diente wiederum der Inhalt der Bauchhöhle lediglich mit PBS injizierter Tiere (Abb. 29 und Abb. 30, weiße Säulen).

In Abb. 19 werden repräsentative Ausschnitte von Pappenheim gefärbten Cytospin-Präparaten des Inhalts der Mäuse-Bauchhöhlen nach Injektion von totem Myzel gezeigt: in der Bauchhöhle von Mäusen finden sich nach PBS-Injektion (Negativkontrolle) lediglich Makrophagen (Abb. 28a). Nach Injektion von abgetötetem Pilzmaterial wandern im Wildtyp

3. Ergebnisse

(C3H/HeN) als Zeichen einer Entzündungsreaktion viele neutrophile Granulozyten ein (Abb. 28b). In der Bauchhöhle des Mausstammes ohne funktionellen TLR4 bleibt dies weitgehend aus: deutlich weniger neutrophile Granulozyten sind eingewandert (Abb. 28c). Etwas mehr neutrophile als im TLR4-defizienten wanderten in die Bauchhöhle der TLR2-defizienten Mäuse ein (Abb. 28d). Am wenigsten Neutrophile wanderten in die Bauchhöhle der TLR2- und TLR4-defizienten Mäuse, hier fand sich jedoch erstaunlicherweise besonders ausgeprägtes Infiltrat an Basophilen (Abb. 19e und Abb. 32)

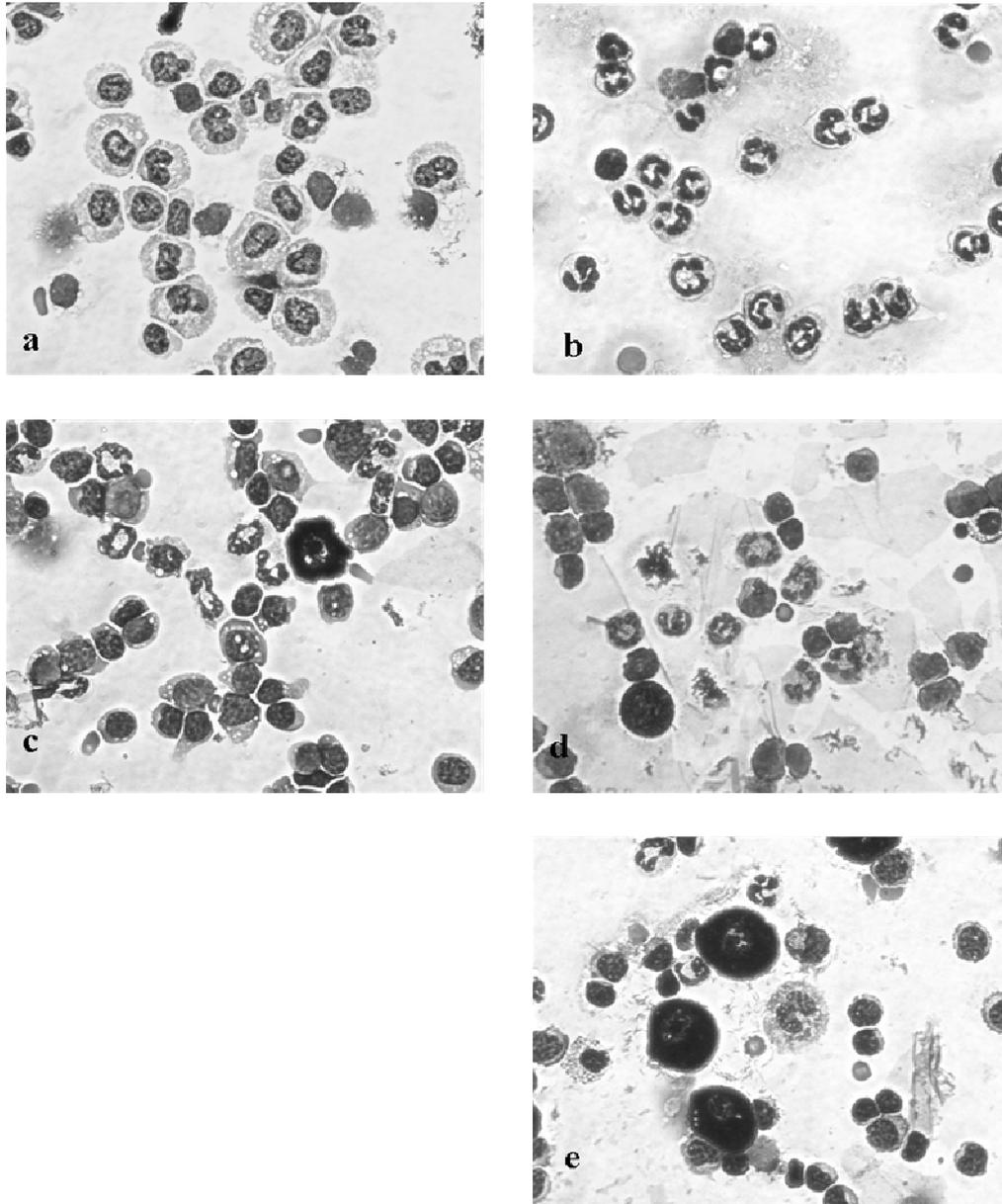


Abb. 28: Darstellung der nach Pilzinjektion in die Bauchhöhle der verschiedenen Genotypen eingewanderten Zellen. 2h nach Injektion des Materials in die Bauchhöhle der Mäuse wurde eine Peritoneallavage durchgeführt, die Zellen mittels Zytospin auf einen Objektträger gebracht und anschließend nach Papanheim angefärbt.

3. Ergebnisse

Für die quantitative Auswertung der Pappenheim gefärbten Präparate wurden pro Maus 1000 Zellen gezählt, und ihre Idenzität lichtmikroskopisch bestimmt. Es ergab eine klare Abhängigkeit der *A. fumigatus* Myzel Detektion von TLR2 und TLR4:

Im Wildtyp befanden sich in der Lavage bereits 2h nach Injektion des Myzels über 60% neutrophile Granulozyten (Abb. 29 und Abb. 30, lila Säulen).

Im TLR4-defizienten Stamm zeigte sich die Rekrutierung der Neutrophilen stark reduziert: 2h nach Injektion fanden sich weit weniger als 20% Neutrophile in dem Inhalt der Lavage (Abb. 29 und Abb. 30, lila Säulen).

Ebenfalls stark eingeschränkt zeigte sich die Rekrutierung im TLR2 defizienten Mausstamm: in der Lavage dieser Mäuse fanden sich weniger als 30% Neutrophile (Abb. 29 und Abb. 30, lila Säule C3H/HeN/TLR2-/-).

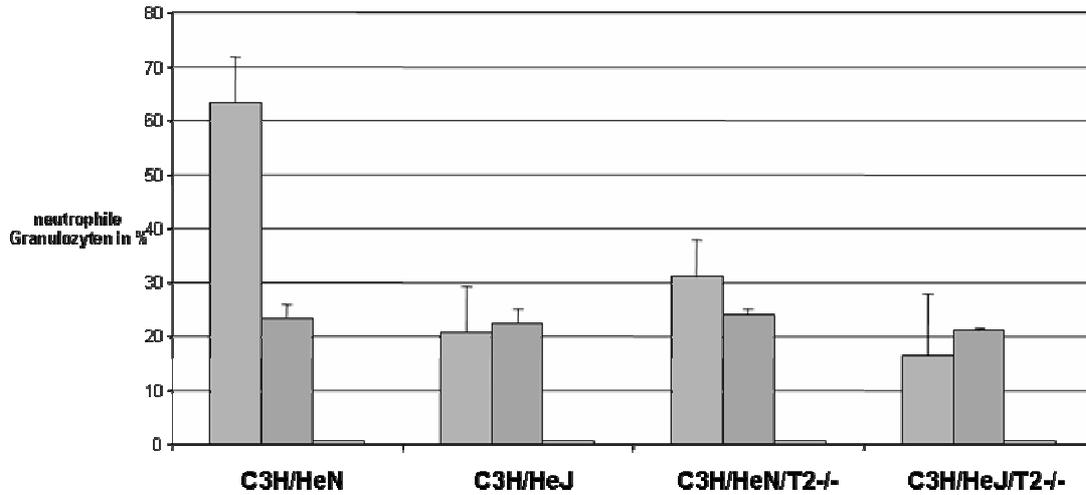
Am stärksten eingeschränkt war die Rekrutierung in der Lavage der Mäuse des TLR2-und TLR4-defizienten Mausstammes. Diese Mäuse vermochten nur maximal 18% Neutrophile zu rekrutieren (Abb. 29 und Abb. 30, lila Säulen).

Die an den Mäusen aller Genotypen durchgeführte Positivkontrolle zeigt eine gleichmäßige Rekrutierung von Neutrophilen nach Injektion von Thioglycollat in allen Genotypen (Abb. 29 und Abb. 30 blaue Säulen). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Rekrutierung von Neutrophilen zwischen den verschiedenen Genotypen nicht prinzipiell für alle Stimuli gelten.

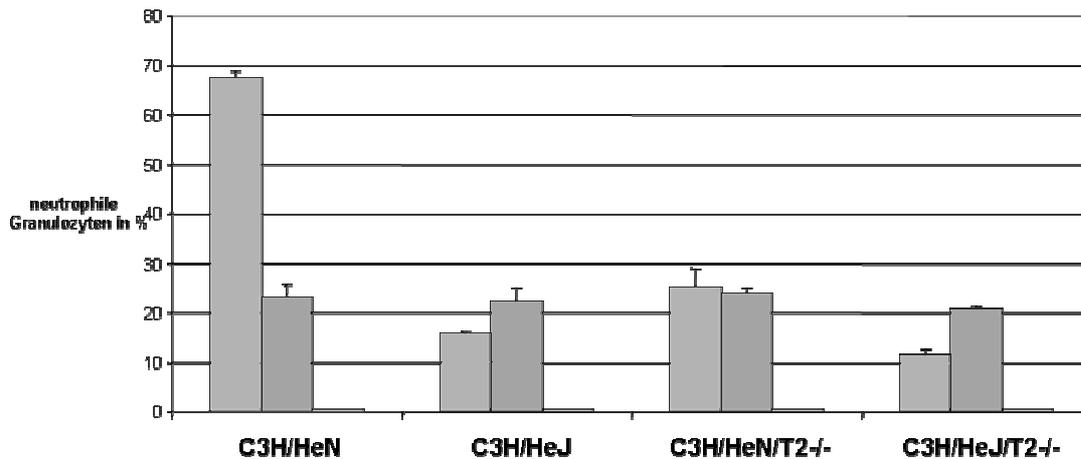
Um eine signifikante Veränderung der Hyphen-Oberfläche durch die Abtötungsmethode auszuschließen, wurde auf verschiedene Art und Weisen abgetötetes Material eingesetzt. (Abb. 29 und Abb. 30)

3. Ergebnisse

Rekrutment neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Genotypen Stimulans: EtOH abgetötetes Myzel



Rekrutment neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Genotypen Stimulans: AmphotericinB abgetötetes Myzel



- A. fumigatus Myzel
- Thioglycollat
- PBS

Abb. 29 und Abb. 30: Quantitative Auswertung der Peritoneallavage nach Injektion von mit EtOH-abgetöteten und mit Amphotericin B-abgetöteten *A. fumigatus* Myzel. Der Inhalt der Lavage wurde mittels Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und anschließend nach Pappenheim angefärbt. Gezählt wurden pro Genotyp jeweils 900 Zellen und der Anteil der sich in der Lavage befindlichen neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl wurde bestimmt.

In den Pappenheim-gefärbten Zytospin-Präparaten der eingewanderten Zellen ließ sich außerdem erkennen, dass sich nicht nur die Zusammensetzung der Zellen der Bauchhöhle mit dem Genotyp der Mäuse änderte, sondern dass auch das injizierte Myzel je nach Genotyp der

3. Ergebnisse

Mäuse sichtlich von unterschiedlichen Zellen angegriffen wurde. Im Wildtyp-Stamm waren an den Myzelfäden des Pilzes fast ausschließlich neutrophile Granulozyten zu identifizieren (Abb. 31a), während sich im C3H/HeJ Stamm eher Makrophagen um das Myzel sammelten (Abb. 31b). Das Bild der Zellen am Myzel im C3H/HeN/TLR2^{-/-} Stamm glich dem des C3H/HeJ Stammes. Hier waren am injizierten Myzel ebenfalls fast ausschließlich Makrophagen zu erkennen (Abb 31c). Im C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Stamm zeigte sich eine Besonderheit: hier schienen besonders viele Mastzellen angelockt worden zu sein (Abb. 31, d1 und d2 und Abb. 32)

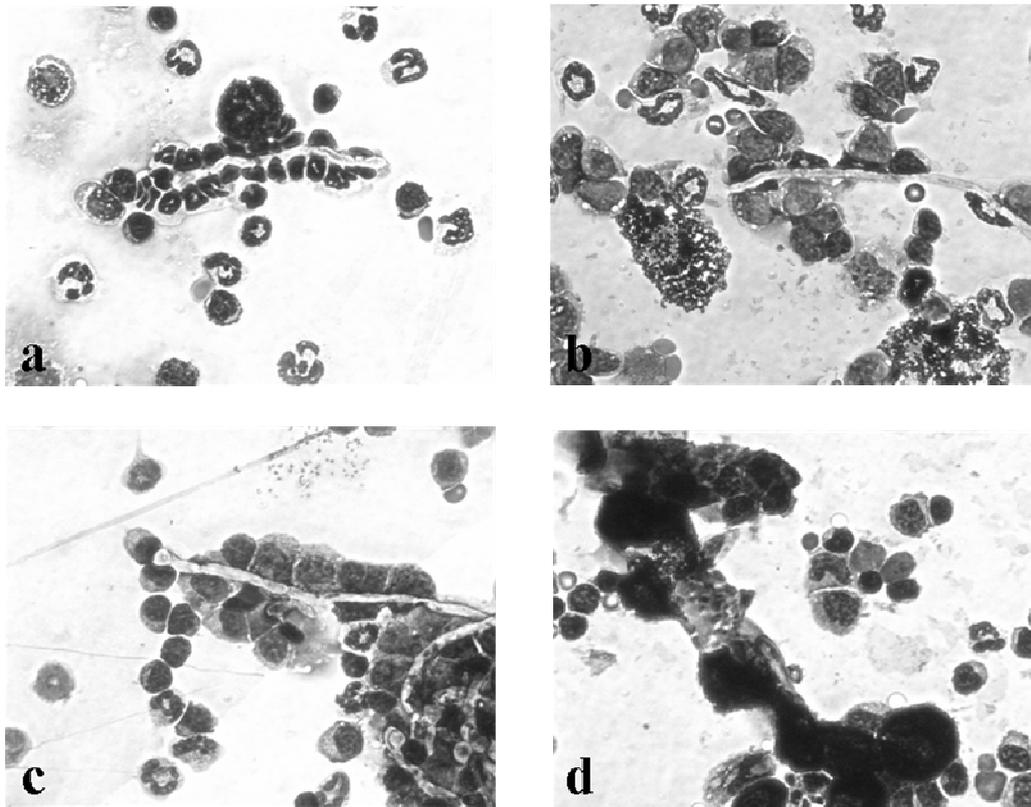


Abb. 31: Darstellung der *in vivo* Bekämpfung von in die Bauchhöhle von Mäusen injizierten Pilzfäden (Myzel): 2h nach Injektion des Pilzmaterials in die Bauchhöhle der Mäuse verschiedener Genotypen wurde eine Lavage durchgeführt, die Zellen mittels Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und anschließend nach Pappenheim angefärbt.

3. Ergebnisse

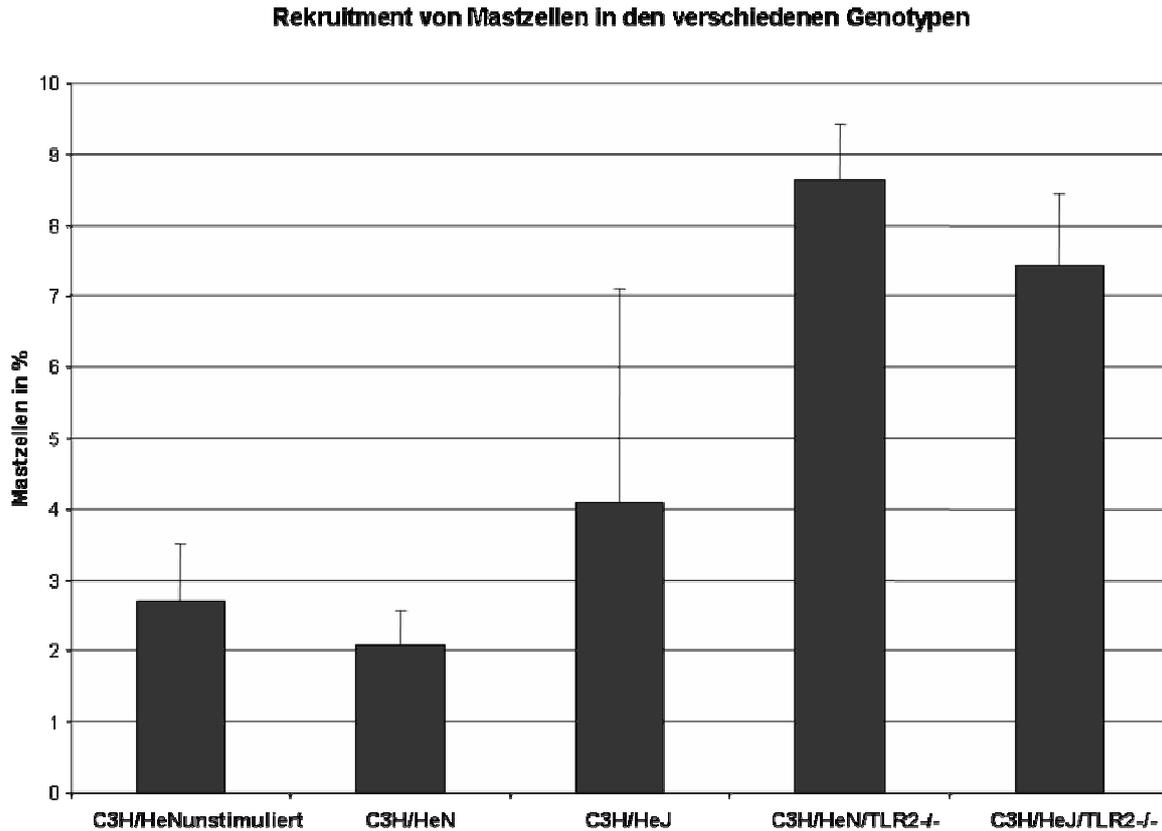


Abb. 32: Quantitative Auswertung der Peritoneallavage nach Injektion von mit EtOH-abgetötetem *A. fumigatus* Myzel. Der Inhalt der Lavage wurde mittels Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und anschließend nach Pappenheim angefärbt. Gezählt wurden pro Genotyp jeweils 900 Zellen und der Anteil der sich in der Lavage befindlichen basophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl wurde bestimmt.

3.5.2. Stimulation mit Konidien

Um zu untersuchen, ob sich ein ähnliches Bild auch nach Injektion von Konidien zeigte, wurden *A. fumigatus* Konidien auf verschiedene Art und Weisen abgetötet und unterschiedliche Mengen in die Bauchhöhle von Mäusen der verschiedenen Genotypen injiziert. Da die Abtötung mittels UV- Bestrahlung neu etabliert wurde, und daher keine Standardmethode zur Abtötung eines solchen Materials darstellt, wurde ihr Erfolg mittels Propidium-Jodid-Färbung überprüft. Bei dieser Färbung leuchten nekrotische Zellen im TRITC- Kanal der Immunfluoreszenz rot auf, während lebendige Zellen farblos bleiben (Abb. 33).

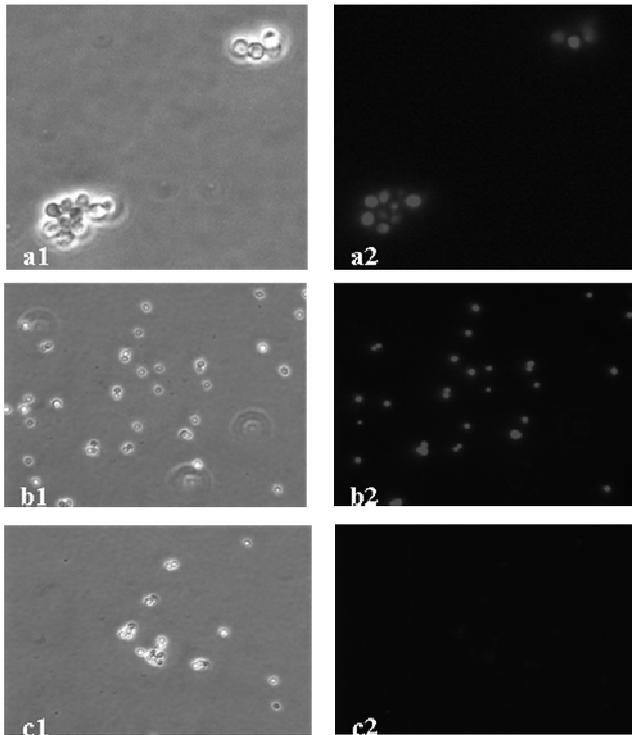


Abb. 33: Propidium-Jodid-gefärbte Konidien: Methode zu Überprüfung der Effektivität der abtötenden Methode. Hier beispielhaft dargestellt sind UV-abgetötete-Konidien. Tote Konidien leuchten rot, lebende Konidien bleiben farblos. Lichtmikroskopischer Vergleich. A1,b1:tote Konidien PI gefärbt, a2,b2 lichtmikroskopischer Vergleich. C1:PI-Färbung neg Kontrolle mit lebenden Konidien c2 lichtmikroskopischer Vergleich.

3.5.2.1. Stimulation mit UV-abgetöteten Konidien

Nach Injektion von UV-abgetöteten Konidien zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zwischen den Mäusen unterschiedlicher Genotypen. Im Durchschnitt wurden circa 3-4% neutrophile Granulozyten rekrutiert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Rekrutierung von Mastzellen: Zur Bekämpfung von Konidien wurden im Wildtyp Mastzellen angelockt, welche im Doppeldefizienten Mausstamm in deutlich geringerem Maße rekrutiert wurden (Abb. 34):

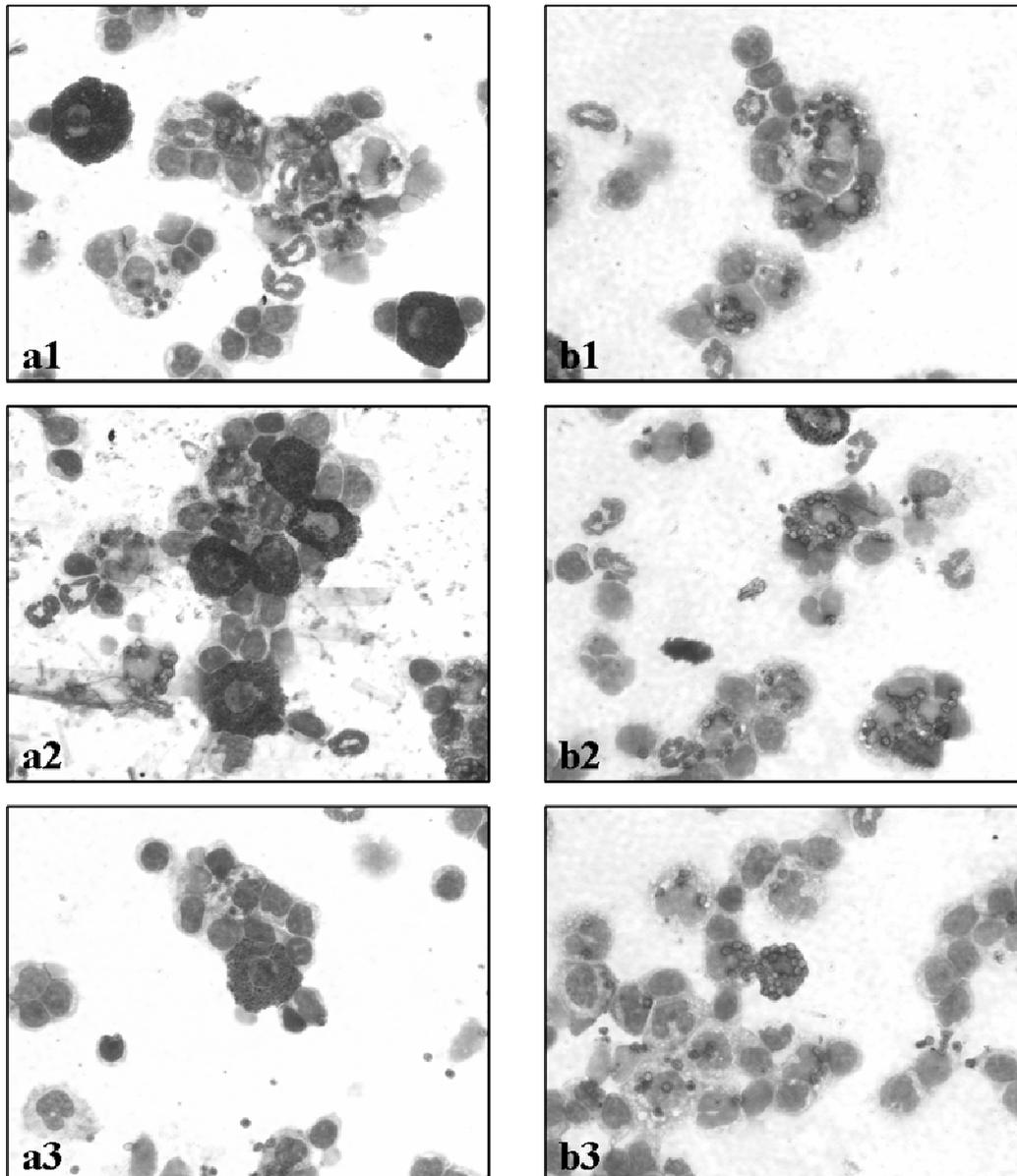


Abb. 34: Darstellung der Peritoneallavage nach Injektion von UV-abgetöteten Konidien in die Bauchhöhle von C3H/HeN und C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen.

3.5.2.2. Stimulation mit EtOH abgetöteten Konidien

Nach Injektion von EtOH-abgetöteten Konidien zeichnete sich ein geringfügiger Unterschied zwischen der Rekrutierung im Wildtyp und dem der doppeldefizienten Maus: ca 4% Rekrutierung bei den Mäusen des Genotyps C3H/HeN, 1% bei C3H/HeJ/ TLR2^{-/-}. Auch hier zeigte sich, dass Mastzellen vor allem im Wildtyp zur Bekämpfung von Konidien angelockt wurden, was sich durch das Nichtvorhandensein von TLR2 und TLR4 drastisch veränderte (Abb. 35).

3. Ergebnisse

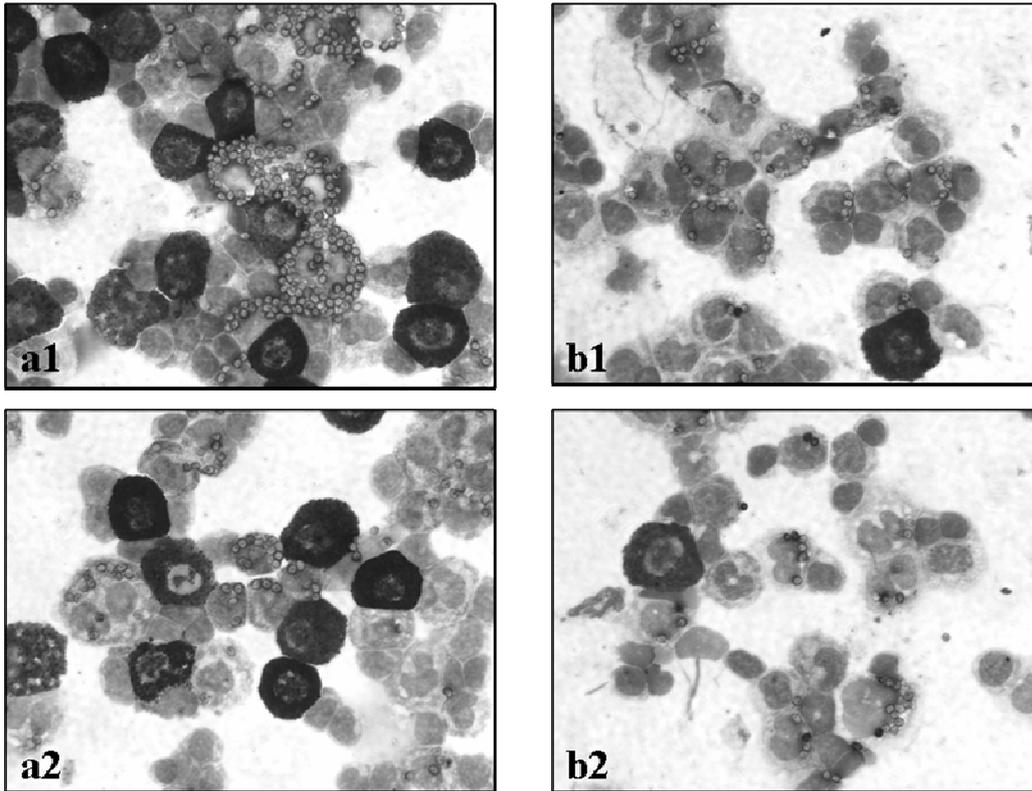


Abb. 35: Darstellung der Peritoneallavage nach Injektion von EtOH-abgetöteten Konidien in die Bauchhöhle von C3H/HeN und C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen

3.5.3. Zusammenfassung der Rekrutierungsexperimente

Zusammenfassend kann also gesagt werden:

- In der Peritoneallavage der uninfizierten Mäuse aller von uns verwendeten Genotypen befinden sich nahezu ausschließlich mononukleäre Makrophagen, während nach Injektion von abgetöteten *Aspergillus* Hyphen in die Bauchhöhle von WT Mäusen als Ausdruck einer Immunantwort neutrophile Granulozyten einwandern während als Antwort auf Konidien u.a. Mastzellen einwandern.
- Ein geeigneter Zeitpunkt für die Auswertung dieser Immunantwort war 2h nach Injektion.
- Durch Verlust eines funktionellen TLR4 wird die Entzündungsantwort, die im Wildtyp nach Injektion von abgetötetem Hyphenmaterial oder Konidien beobachtet werden, kann stark beeinträchtigt.
- Der Verlust von TLR2 bewirkt nach Injektion von Hyphenmaterial ebenfalls eine starke Beeinträchtigung dieser Antwort, jedoch weniger ausgeprägt als durch den Verlust eines funktionellen TLR4
- Der Verlust von TLR2 und funktionellem TLR4 bewirkt die stärkste Alteration der Entzündungsantwort.
- Zur Erkennung von *Aspergillus* im lebenden Maussystem sind also sowohl TLR4 als auch, in geringerem Maße, TLR2 verantwortlich.

3.6. TLR 2 und TLR4 : Lokalisation und Rekrutierung

Für TLR2 konnte bereits von Underhill et al. eine Rekrutierung zum Ort des von einer Makrophagenzelllinie internalisierten Zymosan von *Saccharomyces cerevisiae* veranschaulicht werden. Für TLR4 wurde durch Hornef et al. eine Kolokalisation mit LPS im Zytoplasma der Epithelzelllinie m-IC_{c12} beschrieben.

Da diese beiden Rezeptoren, nach unseren Ergebnissen, entscheidend an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt sind, wurde untersucht, ob eine solche Rekrutierung auch im Zuge der Internalisierung der Konidien dieses Pilzes stattfindet.

3.6.1. Lokalisation von hTLR4 in transfizierten A549 Zellen (FLAG-tagged AK)

Da es zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Hinweise zur Lokalisation von TLR 4 in Zellen gab sollte untersucht werden, ob sich TLR4, ähnlich wie für TLR2 beschrieben (Underhill et al. 1999), an der Oberfläche von Zellen befindet. Da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper gegen das native TLR4 Protein zu erhalten war, wurden humane A549 Zellen mit einem FLAG-markiertem TLR4 transfiziert, fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-FLAG Antikörper sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine diffuse zytoplasmatische Verteilung. In der Negativkontrolle der anti-FLAG Färbung untransfizierter A549 Zellen, konnte nur eine sehr schwache Hintergrundanfärbung beobachtet werden, die den untransfizierten Zellen der Transfektionsansätze entsprach (Abb. 36). Somit konnte eine zytoplasmatische Verteilung von transfiziertem, FLAG-markiertem TLR4 im Zytoplasma dieser Zelllinie festgestellt werden. Ob und wie weit eine Überexpression hierbei eine Rolle spielte, kann mit dieser Methode nicht beurteilt werden.

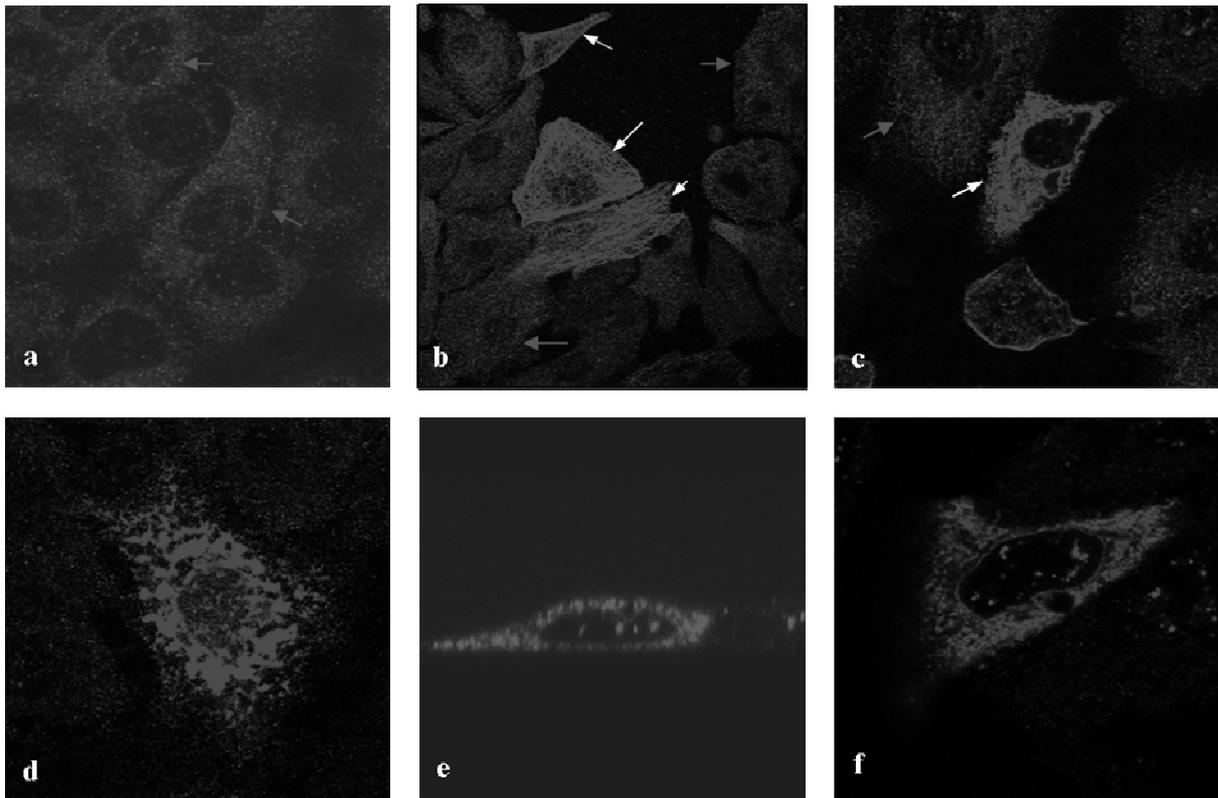


Abb. 36: Zytoplasmatische Lokalisation von TLR4: A549 Zellen wurden fixiert, und mit FLAG-markiertem TLR4 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und mit einem anti-FLAG Antikörper sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Weiße Pfeile markieren die transfizierten Zellen, rosafarbene Pfeile untransfizierte Zellen.

3.6.2. Lokalisation von TLR4 im Zytoplasma von Makrophagen, vor und nach der Stimulation mit vitalen *A. fumigatus* Konidien

Im Laufe dieser Arbeit erschien eine Publikation von Hornef et al., in der eine Lokalisation von TLR4 im Golgi-Apparat der Epithelzelllinie m-IC_{c12} gezeigt, so wie eine „diffuse zytoplasmatische Verteilung“ von TLR4 im Zytoplasma von RAW264.7 Makrophagen beschrieben werden konnte (Hornef et al., 2002). Weiter konnte eine Kolo-kalisation von TLR4 mit aufgenommenem LPS in dieser Epithelzelllinie beobachtet werden. Freundlicherweise wurden uns die in dieser Veröffentlichung verwendeten Antikörper gegen natives TLR4 Protein von Hornef et al. zu Verfügung gestellt. Hierdurch war es uns möglich, nun auch murine Peritonealmakrophagen auf die Verteilung von TLR4 hin zu testen.

Nach dem Fixieren und Anfärben der Peritonealmakrophagen mit diesem Antikörper konnte eine zytoplasmatische Lokalisation dieses Proteins bestätigt werden, welche sich jedoch nicht, wie bisher für Makrophagen beschrieben, „diffus zytoplasmatisch“ (Hornef et al., 2002), sondern eine als eine distinkte Verteilung zeigte (Siehe Abb. 37). Auch nach Stimulation mit

3. Ergebnisse

A. fumigatus Konidien zeigte sich keinerlei Veränderung in diesem Verteilungsmuster. Eine etwaige Rekrutierung zu dem Ort der phagozytierten oder gebundenen Konidien konnte nicht beobachtet werden.

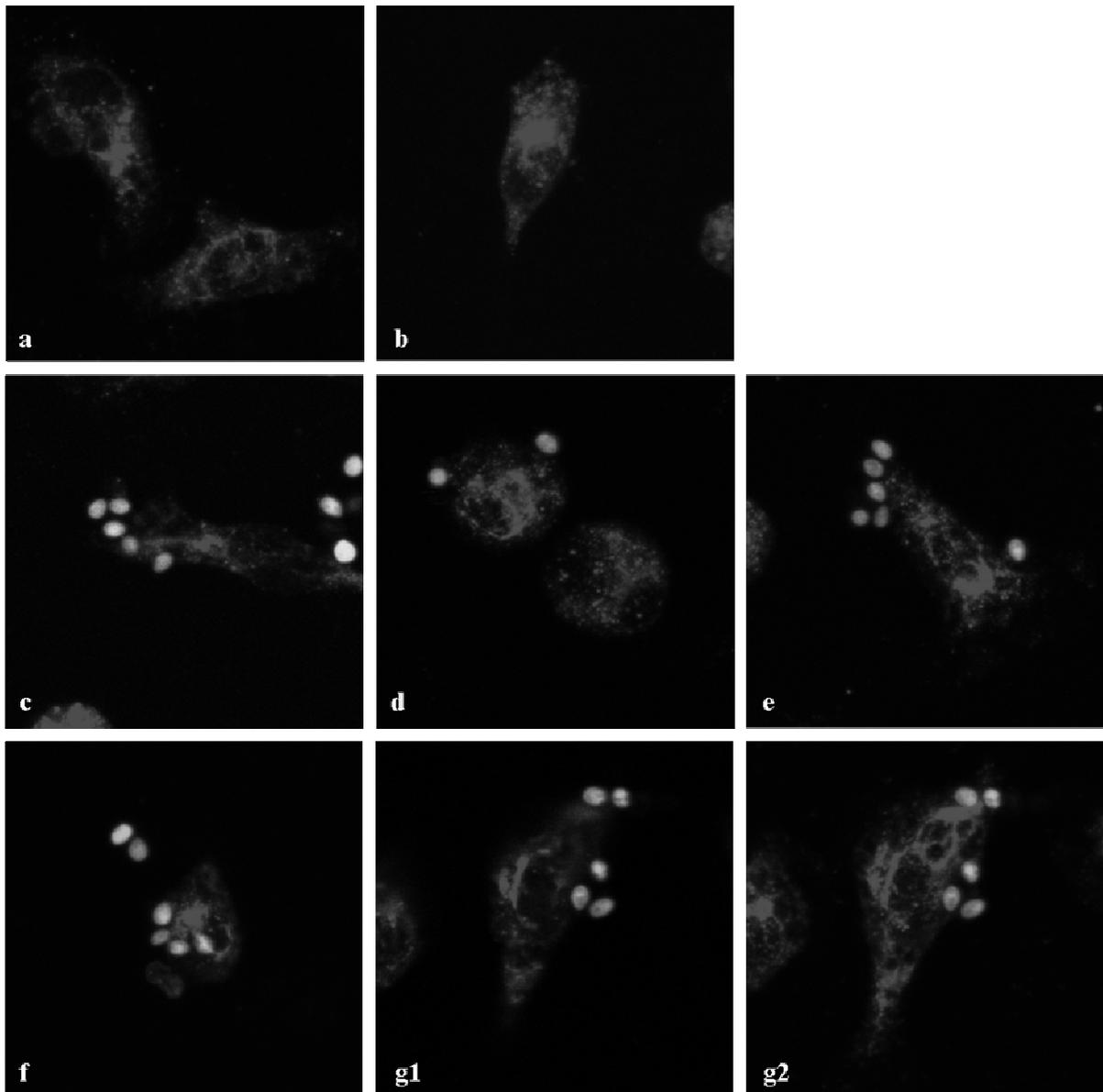


Abb. 37: Fixierte und permeabilisierte murine C3H/HeN Makrophagen. Alle Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen murines TLR4 sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Abb. 37a zeigt die Verteilung des TLR4- Proteins in murinen Makrophagen. Abb. 37 c-g2 zeigen die Lokalisation von TLR4 nach Infektion mit grün leuchtenden, konstitutiv GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Konidien.

3.6.3. TLR2 Lokalisation und Rekrutierung

Um dieser Fragestellung auch für den murinen TLR2 nachzugehen, wurden konstitutiv GFP-exprimierende Konidien von *A. fumigatus* zu murinen Peritonealmakrophagen pipettiert und das Präparat, nach deren Aufnahme durch die Makrophagen, fixiert, permeabilisiert und anschließend mit einem Antikörper gegen das murine TLR2-Protein sowie einem Cy3-

3. Ergebnisse

markierten Sekundärantikörper gefärbt (rote Strukturen). Bereits nach 5 min waren um die internalisierten Konidien vereinzelt deutlich gefärbte Ringstrukturen zu erkennen, die stets mit Konidien in Zusammenhang gebracht werden konnten. Abb. 38. Die Ausbildung dieser Strukturen erfolgte unabhängig von einer vorherigen Vorstimulation mit IFN- γ . Durch die Negativkontrolle konnte die Spezifität der Färbung gezeigt werden.

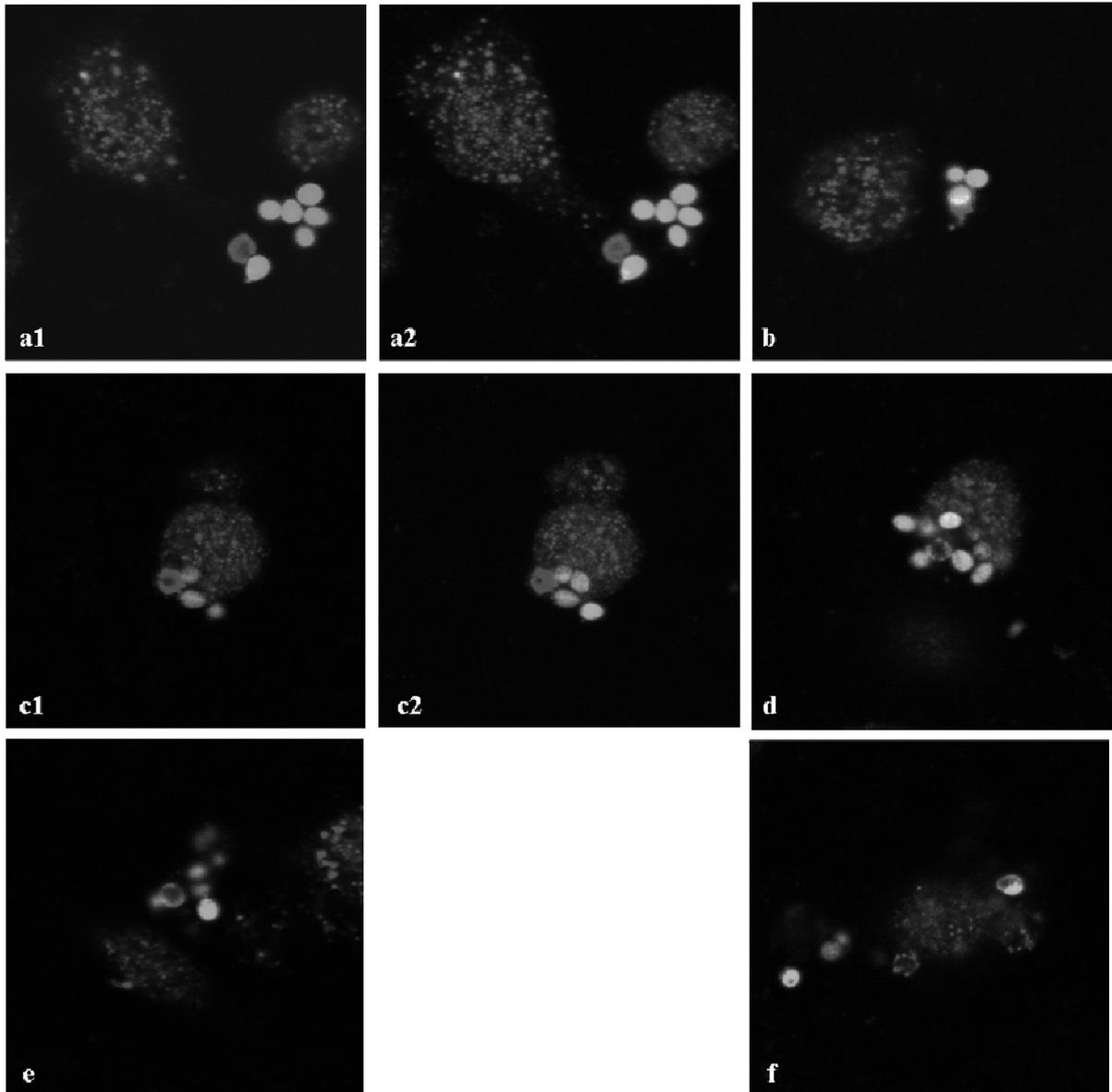


Abb. 38: Murine Makrophagen rekrutieren das TLR2-Protein zu aufgenommenen oder gebundenen Konidien von *A. fumigatus* unabhängig von einer Vorstimulation der Zellen mit IFN- γ . Peritoneale Makrophagen des C3H/HeN Mausstammes wurden isoliert, teilweise mit IFN- γ vorstimuliert und nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Konidien fixiert, permeabilisiert und anschließend wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen das TLR2-Protein sowie einem Cy3-markierten Sekundärantikörper angefärbt (rote Strukturen).

Abb. 38 a1 zeigt IFN- γ vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien im Einzelschnitt

Abb. 38 a2 zeigt IFN- γ vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien in Projektion

Abb. 38 b zeigt IFN- γ vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien in Projektion

Abb. 38 c1 zeigt nicht-vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien im Einzelschnitt

3. Ergebnisse

Abb. 38 zeigt nicht-vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien in Projektion

Abb. 38 d zeigt nicht-vorstimulierte Zellen nach 10 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien im Einzelschnitt

Abb. 38 e zeigt IFN- γ vorstimulierte Zellen nach 5 min Exposition mit *A. fumigatus* GFP-Konidien im Einzelschnitt

Abb. 38 f zeigt eine Kontrolle: Doppeldefiziente Makrophagen wurden mit anti-TLR2 AK angefärbt

3.6.4. Zusammenfassung der TLR-Lokalisations- und Rekrutierungsexperimente

Zusammenfassend kann also gesagt werden:

- In den mit dem entsprechenden Plasmid transfizierten humanen A549 Zellen zeigte sich eine diffus zytoplasmatische Verteilung von TLR4.
- In murinen Peritonealmakrophagen zeigte sich keine diffuse zytoplasmatische Verteilung wie bei den mit dem identischen Antikörper von Hornef et al. durchgeführten Experimenten, der zytoplasmatisch lokalisierte TLR4 zeigte in murinen Peritonealmakrophagen distinkte subzelluläre Strukturen.
- Nach Stimulation mit *Aspergillus* Konidien zeigte sich keine Veränderung dieses Verteilungsmusters, eine Kolo-kalisation oder eine Rekrutierung konnte für TLR4 nicht beobachtet werden
- Die Lokalisation von TLR2 in murinen Peritonealmakrophagen zeigt nach Stimulation mit GFP-exprimierenden Konidien von *Aspergillus fumigatus* eine Veränderung in der Lokalisation: um die internalisierten Konidien zeigten sich in der Immunfluoreszenz verstärkt TLR2 Rezeptoren, analog zu den mit Zymosan von *Saccharomyces cerevisiae* beobachteten Ergebnissen von Underhill (Underhill et al., 1999).

4. DISKUSSION

Unser Immunsystem stellt sich permanent der Herausforderung, eingedrungene Organismen als „fremd“ zu erkennen und diese zu eliminieren. Die Effektivität dieses Systems wird besonders eindrücklich, wenn aufgrund von Krankheit oder iatrogener Immunsuppression Teile dieses Systems ausfallen oder ineffizient arbeiten. So laufen Patienten, welche ein fremdes Organ erhalten und daher immunsuppressiv behandelt werden, Patienten, die sich im fortgeschrittenen Stadium einer immunmodulatorischen Krankheit befinden, oder Patienten mit bestimmten genetischen Defekten, permanent Gefahr, einer Infektionskrankheit zu erliegen.

Als opportunistische Krankheitserreger werden Organismen bezeichnet, welche dem durch ein gesundes Immunsystem unbemerkt eliminiert werden und erst in einer für sie günstigen Situation, einer Immunsuppression oder Immunmodulation ihres Wirts, ihr pathogenes Potential zu entfalten vermögen. Ein solcher Organismus ist der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*, nicht jedoch der ihm eng verwandte *Aspergillus niger*.

Die ständige Auseinandersetzung mit dem ubiquitären Pilz *A. fumigatus* bleibt für uns unbemerkt, obwohl wir täglich mehrere Hundert seiner Konidien einatmen (Latge, 1999). Für immunsupprimierte, insbesondere neutropenische Patienten stellt die durch *A. fumigatus* verursachte invasive Aspergillose ein großes Problem dar, da die Diagnostik sehr schwierig ist, den therapeutischen Möglichkeiten, aufgrund der hohen Toxizität der Antimykotika, enge Grenzen gesetzt sind und die Mortalitätsraten über 80% betragen.

Aufzuklären, mit welchen Mechanismen unser Immunsystem diesen Pilz erkennt und ob er bereits im Zuge des ersten Kontaktes zwischen pathogenem und apathogenen *Aspergillus* zu unterscheiden vermag, war das Ziel dieser Arbeit.

Nach Inhalation der Konidien von *Aspergillus* gelangen diese zunächst in Kontakt mit Alveolarzellen sowie den dort residenten Makrophagen. Diese Zellen stellen eine wichtige Barriere für das Eindringen dieses Pilzes dar. Für eine effektive Bekämpfung dieses Pilzes ist eine schnelle Erkennung und, wenn nötig, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sehr wichtig.

Aspergillus fumigatus kommt in zwei verschiedenen Infektionsstadien vor. Zum einen in Form von Konidien und zum anderen in Form von Hyphen. Diese beiden Infektionsformen besitzen unterschiedliche Oberflächen, was eine weitere Herausforderung an das Immunsystem stellt.

4. Diskussion

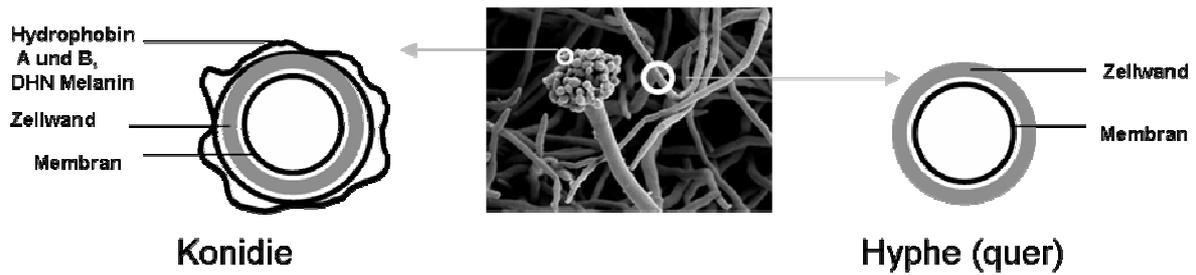


Abb. 39: Schematisierte Darstellung der unterschiedlichen Oberflächen von Konidien und Myzel (Hyphen) von *A. fumigatus*. Konidien besitzen Aussen eine Hydrophobinschicht, während bei dem Myzel die Zellwand direkt der Umgebung exponiert ist

Es stellte sich daher die Frage, ob die Zellen der schnellen, natürlichen Immunität bereits in der Lage sind, Konidien und/oder Hyphenmaterial dieses Pilzes wahrzunehmen.

Wichtiger Bestandteil der natürlichen Immunität ist eine Gruppe von sogenannten „Pattern Recognition“-Rezeptoren, welche bestimmte, meist hochkonservierte PAMPs („Pathogen Associated Molecular Pattern“) erkennen und entsprechenden Signale in das Zellinnere leiten. Die wichtigste Familie dieser „Pattern Recognition“ Rezeptoren ist die Gruppe der Toll-like Rezeptoren, deren Rolle bei der Erkennung von *Aspergillus* in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Zu Beginn dieser Arbeit waren 10 der heute 11 bekannten TLRs identifiziert worden, wobei der erst kürzlich entdeckte TLR11 im humanen System aufgrund eines Stopcodons in seiner Gensequenz nicht exprimiert wird (Zhang et al., 2004). Um einzugrenzen, welche dieser TLRs zur Erkennung von *Aspergillus* in Frage kommen, wurde ein artifizielles System gewählt, welches eine Untersuchung der einzelnen TLRs gestattet. Hierzu wurden HEK293 Zellen, welche natürlicherweise keine dieser Rezeptoren exprimieren, mit humanen TLR-Genen transfiziert. Die humanen TLRs1-10 sowie die entsprechenden Adaptermoleküle wurden in entsprechende Zellen (HEK293 Zellen) transfiziert. Diese wurden anschließend mit *Aspergillus* Hyphen oder Konidien infiziert. Nur diejenigen Zellen, die TLR4 oder TLR2 exprimierten, waren in der Lage, auf die Infektion mit einer NF- κ B Reporterogenaktivierung zu reagieren. Alle anderen reagierten nur auf ihre bis dahin bekannten natürlichen Liganden in der Positivkontrolle. Da solche Liganden nicht in allen Fällen bekannt oder verfügbar waren, wurden die exprimierten TLRs mittels Immun-Blot-Verfahren auf ihr Vorhandensein in den entsprechenden Ansätzen getestet.

Trotz der Verschiedenheit der Oberflächen dieser Pilzbestandteile (siehe Abbildung) konnte ein Unterschied zwischen Konidien und Hyphen von *Aspergillus* in der

4. Diskussion

Reporteraktivierung und deren TLR4 und TLR2 Abhängigkeit nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung fand sich auch im Zuge anderer Experimente und wird dort diskutiert werden.

Da in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass hTLR2 mit hTLR1 und hTLR6 unter bestimmten Umständen Heterodimere bildet (Ozinsky et al., 2000; Hajjar et al., 2001), wurden hTLR2 exprimierende Plasmide mit hTLR1 Plasmiden und hTLR6 Plasmiden kotransfiziert und entsprechend untersucht. Ein synergistischer Effekt konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass es sich bei dieser TLR2- und TLR4-abhängigen Aktivierung durch *Aspergillus* um einen Artefakt durch Überexpression der Rezeptoren in diesem künstlich geschaffenen System handelte, wurden weiterhin Makrophagen als immunologisch relevante Zellen untersucht, die TLR2 und TLR4 sowie vermutlich alle TLRs natürlicherweise exprimieren. Um die Aktivierung dieser Zellen zu untersuchen wurden zunächst orientierende Versuche mit verschiedenen Makrophagenzelllinien durchgeführt.

Hierzu wurde ein qualitativer Ansatz gewählt, die Untersuchung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern nach Stimulation mit GFP-exprimierenden, lebenden Konidien. Durch das grün leuchtende GFP konnten die Konidien in der Immunfluoreszenz problemlos identifiziert werden. Die Konidien von *Aspergillus* waren in der Lage, in einigen der getesteten Zelllinien eine NF- κ B-Translokation hervorzurufen: bei den Zellen der RAW Zelllinie zeigte sich eine deutliche Translokation nach einer Stunde, welche nach 3h bereits jedoch nicht mehr zu sehen war, während sich bei den Zellen der P388- und der J774-Zelllinie zu keinem Zeitpunkt eine Translokation zeigte. Hinsichtlich der Phagozytoseeffizienz waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien feststellbar.

Da es sich bei Zelllinien um Zellen handelt, die durch verschiedene Mutationen „unsterblich“ sind und sich bereits viele Male unter *in vitro* Bedingungen geteilt haben, könnte dieser Effekt der fehlenden Translokation von NF- κ B bzw. der im Vergleich zu Primärzellen viel kürzer andauernden Translokation von NF- κ B auf den Stimulus *Aspergillus*, durch einen Verlust verschiedener Oberflächenrezeptoren (z.B. TLRs) oder durch den Verlust bestimmter Signalwege beruhen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte von anderen Arbeitsgruppen in RAW-Zellen ebenfalls eine TLR4-abhängige NF- κ B Translokation nach Stimulation mit dem Pilz *Cryptococcus neoformans* beobachtet werden (Shoham et al., 2001). Allerdings wurde auch für J774-Zellen eine NF- κ B Translokation nach Stimulation mit Phospholipomannan von *Candida albicans* beschrieben (Jouault et al., 2003). Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse mit J774-Zellen bleiben unklar.

4. Diskussion

Ausserdem sollte ein System getestet werden, welches die Untersuchung der Auswirkung des Fehlens von TLR2 bzw. TLR4 gestattet. Ein hierfür ideales System ist das Maussystem, da Mausstämme mit entsprechender Deletion existieren. Hierbei wurden TLRs entweder durch natürliche Mutation nicht funktionell (TLR4) oder durch genetische Deletion nicht vorhanden (TLR2) eliminiert. Im Folgenden werden diese Mausstämme bzw. deren Makrophagen als TLR2 und oder TLR4 defizient bezeichnet.

Um dieses System zu testem, wurden jedoch zunächst Makrophagen eines Wildtyp-Stammes untersucht. Diese wurden mittels Peritoneallavage aus der Bauchhöhle der Mäuse gewonnen. Die murinen Peritonealmakrophagen zeigten im Gegensatz zu den untersuchten Zelllinien bereits nach einer Stunde eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern, welche auch nach über 5h noch zu beobachten war.

Weiterhin wurde untersucht, ob Hyphenmaterial und abgetötete Konidien ebenfalls imstande sind, eine solche NF- κ B Translokation hervorzurufen. Zwischen lebenden bzw. abgetöteten Konidien und Hyphen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung in der Immunfluoreszenz.

Erstaunlich hierbei ist jedoch, dass sich, wie bereits erwähnt, die Oberfläche von ruhenden Konidien signifikant von der Oberfläche von Hyphen unterscheidet, da die Konidien, nicht aber das Hyphenmaterial, von einer Hydrophobinschicht umgeben sind. (Tronchin et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrophobinschicht die Resistenz des Pilzes gegen Oxidationsstress erhöht und daher zum Überleben der Konidien in Makrophagen beiträgt (Jahn et al., 2000). Während der Auskeimung ist der vollständige Verlust dieser Schicht ein Frühereignis der stattfindenden morphologischen Transformation (Rohde et al 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass selbst in Populationen ruhender Konidien einige Sporen bereits ihre Hydrophobinschicht abgestreift haben (M. Rohde, F. Ebel, unveröffentlichte Beobachtung). Daher ist es möglich, dass die beobachtete Stimulation durch Teilexposition mit der Zellwand hervorgerufen wird. Die Bedeutung der Hydrophobinschicht für die Erkennung durch das angeborene Immunsystem erfordert daher noch weitere Untersuchungen.

Um die Zellaktivierungen, die durch die Ligation mit verschiedenen TLRs hervorgerufen werden, zu unterscheiden, wurde die NF- κ B Translokation in TLR defizienten Makrophagen untersucht. Hierdurch war es möglich, die Bedeutung von TLR2 und TLR4, sowie deren Einfluss auf die Zellaktivierung durch *Aspergillus*, genauer zu untersuchen. Anhand von Immunfluoreszenzbildern konnte eine starke Abhängigkeit der Aktivierung durch *A. fumigatus* von TLR4 gezeigt werden, jedoch wurde nur eine geringe Einschränkung in der

4. Diskussion

Aktivierung bei TLR2-defizienten Makrophagen gefunden. Murine Makrophagen, die weder TLR2 noch einen funktionellen TLR4 besitzen, zeigten keine Anzeichen einer NF- κ B Aktivierung, was die zentrale Rolle dieser beiden Rezeptoren bei der Erkennung von *Aspergillus* untermauert und nahe legt, dass andere „Pattern Recognition“ Rezeptoren in diesem Kontext ohne größere Bedeutung sind.

Hinsichtlich der Phagozytoseeffizienz konnten im Rahmen dieser Untersuchung keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden, allerdings wurden keine quantitativen Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt. Dies war erst durch die Etablierung eines Assays zu Quantifizierung der Phagozytose möglich. Neuere, mit dieser Methode erhobenen Daten zeigen, dass bei einer TLR 2-Deletion die Phagozytoseeffizienz um mehr als 60% senkt (Kathrin Luther, unveröffentlichte Beobachtung). Ausserdem wurde von anderen Arbeitsgruppen ein Einfluss von TLRs auf die Reifung von Phagosomen und oder die Phagozytose selbst beschrieben (Blander and Medzhitov, 2004; Doyle et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass den TLR's 2 und 4 unterschiedliche Aufgaben in Bezug auf die immunologische Erkennung und effektive Eliminierung von *Aspergillus* zukommen.

Unsere Transfektionsexperimente konnten in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen in der Immunfluoreszenz zeigen, dass die TLR2- und TLR4-abhängige Aktivierung von Zellen durch die Stimulation mit Hyphen und Konidien gleichermassen ausgelöst werden konnte. Interessanterweise waren *A. fumigatus* und der apathogene Pilz *Aspergillus niger* gleichermassen in der Lage, diesen Effekt zu bewirken. Dies legt nahe, dass das spezifische pathogene Potential von *Aspergillus* nicht darin verborgen liegt, der Erkennung durch das angeborene Immunsystem zu entrinnen.

Um neben der Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die Signaltransduktion zu klären, wo diese TLRs ihr spezifisches PAMP erkennen, ob dies durch Kontakt an der Zelloberfläche oder erst nach Phagozytose geschieht d.h. ob TLRs etwa zum „Ort des Geschehens“ rekrutiert werden, wurden die von uns verwendeten Zellen mit entsprechenden Antikörpern angefärbt: Zur Etablierung der Technik wurden hier zunächst mit dem TLR4-Gen transfizierte A549-Zellen verwendet: In diesen transfizierten A549-Zellen zeigte sich eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von TLR4. Da dieses System jedoch ein künstlich geschaffenes System mit Überexpression der transfizierten Rezeptoren darstellt, wurde die Lokalisation dieser Rezeptoren sowie eine eventuelle Rekrutierung zum Ort des stimulierenden Agens untersucht. Für Zymosan, ein Bestandteil der Zellwand des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, konnten Underhill et al. bereits 1999 zeigen, dass in transient transfizierten Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 eine Rekrutierung zum Ort der Exposition des Zymosans innerhalb der

4. Diskussion

Zellen stattfindet. Ausserdem konnte eine Akkumulierung von TLR2 um die phagozytierten Partikel gezeigt werden (Underhill et al., 1999). In unseren Experimenten konnte keinerlei Veränderung der Lokalisation von TLR4 nach Exposition von peritonealen Makrophagen mit *A. fumigatus* Konidien festgestellt werden. Die Verteilung des TLR4 zeigte sich strukturiert, im Gegensatz zu den Beobachtungen mit der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 von Hornef et al. Ob diese distinkte Lokalisation ein bestimmtes Kompartiment in der Zelle widerspiegelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch konnte von Hornef et al. bereits eine Co-Lokalisation von TLR4 mit dem Golgi-Apparat in intestinalen Epithelzellen beobachtet werden. Ausserdem berichtet diese Arbeitsgruppe von einer Co-Lokalisation von TLR4 mit von den Epithelzellen internalisiertem LPS (Hornef et al., 2002). Ein solches Phänomen konnte in unseren Untersuchungen mit peritonealen Primärmakrophagen nicht beobachtet werden.

Anders jedoch verhielt sich dies bei TLR2. Zeigte dieser vor der Stimulation der Makrophagen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung, so war nach Exposition mit *A. fumigatus* an einigen Konidien eine deutliche Akkumulierung zu beobachten. Die Tatsache, dass eine solche Akkumulierung nicht an allen Konidien und nicht in allen Zellen gesehen werden konnte, könnte auf ein transientes Geschehen hindeuten, bei dem TLR2 zu phagozytären Vesikeln rekrutiert wird, deren Inhalt nach entsprechenden PAMPs abtastet und sich dann wieder aus dem Vesikel entfernt, so dass die beobachteten Zellen nicht alle zum gleichen Zeitpunkt ihren TLR2 zu den mit Ihnen in Kontakt gekommenen Konidien rekrutieren. Durch diese mit den Ergebnissen von Underhill übereinstimmende Beobachtung wird die Bedeutung von TLR2 bei der Erkennung von *Aspergillus* veranschaulicht.

Die NF- κ B Translokation bzw. die NF- κ B-abhängige Reporterogenaktivierung spiegelt zwar eine Aktivierung der Zelle wieder, die jedoch nur qualitativ und nicht quantitativ zu bewerten ist. Ausserdem führt die NF- κ B Aktivierung nicht immer zu dem gleichen Expressionsmuster proinflammatorischer Gene (Shoham et al., 2001). Aus diesen Gründen wurde weiterhin die Konzentration verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit *Aspergillus* mittels ELISA analysiert.

In unseren Versuchsansätzen wurde die Reaktion der Makrophagen vor und nach Stimulation mit dem Chemokin IFN- γ untersucht, da durch diese Vorstimulierung zum einen eine Verstärkung der Reaktion der Zellen erwartet wurde und zum anderen IFN- γ auch im physiologischen Entzündungsgeschehen vorhanden ist und der Einfluss dieses Chemokins auf die Reaktionsfähigkeit der Zellen untersucht werden sollte. In in diesen Versuchen konnte

4. Diskussion

nur abgetötetes Material verwendet werden, da durch die vorgegebene Dauer der Versuche lebende Konidien ausgekeimt bzw. lebendes Myzel die Ansätze überwuchert hätte.

Diese Analyse dieser verschiedenen proinflammatorischen Zytokine, die nach Exposition sekretiert werden, zeigte, dass TNF- α und IL-6 (Meier et al., 2003) und ausserdem ein weiterer wichtiger Mediator im Entzündungsgeschehen, NO, ohne Vorstimulation mit IFN- γ in einer vorwiegend TLR4-abhängigen Weise sekretiert werden, was die Immunfluoreszenz-Daten untermauert. Die TLR4-unabhängige Erkennung von *Aspergillus* durch Makrophagen zeigte sich im Vergleich von TLR4-defizienten und TLR2 und TLR4-defizienten Makrophagen, da die TLR4 defizienten Zellen noch auf *A. fumigatus* reagieren, die doppeldefizienten Zellen diese Fähigkeit jedoch verloren haben. Eine Bedeutung von TLR2 wird weiterhin durch die Beobachtung bestätigt, dass C3H/HeJ Makrophagen nach IFN- γ Stimulation verstärkt die TLR4-Defizienz auszugleichen vermögen. Eine mögliche Erklärung hierfür wird an späterer Stelle diskutiert werden.

Dass sowohl TLR2 als auch TLR4 in der Lage sind, trotz unterschiedlicher extrazellulärer Domänen, *Aspergillus* zu erkennen wird durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt, die u.a. zeigen konnten, dass es neben Gram-negativen Bakterien viele weitere Beispiele für komplexe oder definierte mikrobiologische Strukturen gibt, die durch sowohl TLR2 als auch TLR4 wahrgenommen werden (Asea et al., 2002; Flo et al., 2002; Netea et al., 2002; Vabulas et al., 2002a).

Einige Unterschiede in den Signalkaskaden, die durch TLR2 und TLR4 ausgelöst werden, können zu synergistischen Effekten führen, wenn beide Rezeptoren aktiviert werden (Carl et al., 2002; Jones et al., 2001). Eine immunologische Erkennung durch zwei TLRs könnte vorteilhaft sein, da zum einen eine verstärkte Antwort gegenüber anderen Organismen hervorgerufen werden kann, die nur durch einen der TLR's detektiert werden und so bereits in einem frühen Stadium über das Ausmaß der Immunantwort zu bestimmen kann und zum anderen kann durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden eine dem eingedrungenen Mikroorganismus individuell zugeschnittene Abwehrreaktion generiert werden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind die genauen PAMPs, welche für die *Aspergillus*-induzierte Zellaktivierung via TLR2 und TLR4 verantwortlich sind, nicht bekannt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass TLR4 aus Pilzen gewonnenes Mannan erkennt (Tada et al., 2002). Mannan ist auch in der Zellwand von *Aspergillus* vorhanden (Bernard and Latge, 2001). Weitere Studien werden jedoch in Zukunft für die Aufklärung der Zellwandstruktur

4. Diskussion

von *Aspergillus*, sowie der Unterschiede dieser Strukturen zwischen pathogenen und apathogenen *Aspergilli* benötigt.

Der von uns beobachtete verstärkte Ausgleich der TLR4-Defizienz nach IFN- γ Vorstimulation kann durch eine verstärkte Expression von TLR2 nach IFN- γ Stimulation erklärt werden, insbesondere, da diese Zytokin-induzierte verstärkte Expression (Hochregulation) von TLR2 schon für neutrophile Granulozyten und Epithelzellen gezeigt werden konnte. (Kurt-Jones et al., 2002; Wolfs et al., 2002). Dieses Phänomen zeigte sich jedoch nur nach Stimulation mit dem Hyphenmaterial oder Konidien von *A. fumigatus* und nicht nach Stimulation mit *A. niger*, dessen Erkennung auch nach Vorstimulation mit IFN- γ eindeutig TLR4-abhängig war. Eine Ausnahme hierzu bildete allerdings die NO-Produktion als Reaktion auf die Konidien von *A. niger*. Hier führte die IFN- γ -Vorstimulation zu einer verstärkten Antwort. Ein Muster, das der Reaktion auf die Konidien des pathogenen Pilzes *A. fumigatus* gleicht.

Dieser von uns beobachtete Unterschied in der Reaktion der mit IFN- γ vorstimulierten Makrophagen als Antwort auf den pathogenen Pilz *A. fumigatus* bzw. den apathogenen *A. niger* könnte einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche immunologische Wahrnehmung dieser verwandten Schimmelpilze geben. Der im Gegensatz zu *A. niger* auch invasive, schwerwiegende Krankheiten verursachende *A. fumigatus* kommt aufgrund dieser Invasivität in vivo eher in Kontakt mit dem u.a. von T-Lymphozyten gebildeten γ -Interferon, welches im Zuge einer Entzündungsreaktion freigesetzt wird. Dieser Kontakt der Immunzellen mit Interferon und die damit verbundene Hochregulierung des TLR2 könnte nach unseren Beobachtungen einen zusätzlich protektiven Mechanismus darstellen, um den eingedrungenen Pilz *A. fumigatus* besser zu erkennen und effektiver zu bekämpfen. *A. niger* hingegen ist nicht in der Lage ähnlich invasive Infektionen hervorzurufen. Möglicherweise liegt in den unterschiedlichen pathogenen Potentialen beider Pilze eine Begründung dafür, dass die postulierte Hochregulierung von TLR2 durch IFN- γ -Vorbehandlung nur bei *A. fumigatus*, aber nicht bei *A. niger* zu einer stärkeren Kompensation des TLR4 Defektes führte.

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Bekämpfung einer *Aspergillus*-Infektion wird durch die Tatsache hervorgehoben, dass neutropenische Patienten besonders anfällig für diese Art von Infektionen sind (Latge, 1999). Die Rekrutierung von Neutrophilen in das Infektionsgebiet ist abhängig von der Ausschüttung von Zytokinen (z.B. TNF- α), und von Chemokinen (z.B. IL-8) am Ort des Geschehens (Wagner and Roth, 2000). Im Maussystem gelten die Chemokine KC und das MIP-2 („Macrophage Inflammatory Protein“) als murine

4. Diskussion

IL-8 Analoga (Wang and Thorlacius, 2005). MIP-2 spielt bei der Anlockung der neutrophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle (Cacalano et al., 1994). Makrophagen sind hierbei die Hauptproduzenten dieser Zytokine aber auch Mastzellen sind im Stande, auf TLR2 und TLR4 Stimuli mit einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu reagieren und neutrophile Granulozyten anzulocken (Wang and Thorlacius, 2005; Varadaradjalou et al., 2003). Wir stellten daher die These auf, dass ein verschlechtertes Erkennen von *Aspergillus* durch Makrophagen und/oder Mastzellen zu einer verminderten Rekrutierung von Neutrophilen führt.

Um dies zu überprüfen, wurden Versuche in einem Lebend- Mausmodell durchgeführt. Nach Etablierung dieses Modells durch Versuche mit Mäusen eines C3H/HeN-Wildtyp-Stammes konnten wir feststellen, dass sich dieses Modell sehr gut zur Überprüfung der Neutrophilenrekrutierung eignet. Nach Injektion der abgetöteten Hyphen in die Bauchhöhle dieser Mäuse wurden bereits nach 2h über 60% neutrophile Granulozyten gefunden. In den TLR2- und/oder der TLR4-defizienten Mäuse konnten wir beobachten, dass das Fehlen von entweder TLR2 oder funktionellem TLR4 jeweils zu einer Reduktion der infiltrierenden neutrophilen Granulozyten von bis zu 66% führte. Doppeldefiziente Mäuse, waren noch weniger (Reduktion um über 70%) in der Lage, Neutrophile zu rekrutieren. Die TLR-Spezifität dieser Effekte konnte dadurch gezeigt werden, dass die Kontrollinjektionen mit sterilem PBS zu keinerlei Rekrutierung inflammatorischer Zellen führten während Thioglycollat als unspezifisches Stimulans in allen getesteten Genotypen gleichermaßen zu einer peritonealen Entzündungsreaktion führte. Da Makrophagen die Granulozytenmigration kontrollieren, wurde von uns außerdem untersucht, ob TLR-defiziente Mäuse weniger MIP-2 nach Stimulation mit *A. fumigatus* ausschütten. Ein Vergleich der entsprechenden MIP-2 Konzentrationen konnte zeigen, dass der Verlust eines funktionellen TLR4 zu einer Reduktion der MIP-2 Konzentration von bis zu ca 50% führt. Der Verlust von entweder nur TLR2 oder der Verlust von beiden Rezeptoren, TLR2 und TLR4, hatte eine noch stärkere Verminderung der MIP-2-Produktion zur Folge (Reduktion der MIP-2-Konzentration um ca. 91 %), was nahe legt, dass in diesem Zusammenhang TLR2 die entscheidendere Rolle spielt. Eine stark verminderte MIP-2-Freisetzung konnte in TLR4-defizienten Makrophagen auch nach Stimulation mit *Candida albicans* beobachtet werden (Netea et al., 2002), wobei in dieser Studie eine mögliche Bedeutung von TLR2 nicht untersucht wurde.

In der Peritoneallavage von mit Hyphen stimulierten TLR2/TLR4-doppeldefizienten Mausstämmen fand sich eine weitere, für uns unerwartete Besonderheit: hier zeigte sich nach

4. Diskussion

Stimulation mit *A. fumigatus* Myzel ein ganz anderes Zellbild als in der wildtypischen Kontrollmaus. Auffällig war, dass sich hier kaum neutrophile Granulozyten fanden. Jedoch, im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle, in deren Lavage sich nahezu ausschließlich Makrophagen befanden, ließen sich hier besonders viele Mastzellen und Lymphozyten nachweisen. Dies impliziert, dass die Infektion detektiert wurde, es jedoch zu einer vom Wildtyp abweichenden, abnormalen Infektionsantwort kam. Erst kürzlich konnte in Studien gezeigt werden, dass Mastzellen eine intermediäre Rolle in der Chemokin-induzierten Anlockung von Neutrophilen spielen. Wang et al konnten zeigen, dass MIP-2 induzierte neutrophile Rekrutierung durch von Mastzellen produziertes TNF- α hervorgerufen werden konnte (Wang and Thorlacius, 2005).

Weitere Studien zeigten, dass Mastzellen TLRs exprimieren. Jedoch wurden in unseren Experimenten nur in denjenigen Mäusen viele Mastzellen beobachtet, die TLR2 und TLR4 defizient waren. Mastzellen exprimieren MIP-2-bindende CXCR2 Rezeptoren (Lippert et al., 1998). Dies kann den beobachteten Effekt aber nicht erklären, da in unseren Versuchsansätzen *in vitro* die MIP-2-Produktion der TLR2/4-doppeldefizienten Makrophagen jedoch erheblich reduziert war. Dies könnte darauf hinweisen, dass *in vivo* weitere, uns unbekannte Mechanismen in diese Prozesse eingreifen und dass Mastzellen eventuell durch andere, von der Erkennung von *Aspergillus* durch TLRs der peritonealen Makrophagen unabhängig produzierten Chemokine angelockt werden. Das weitere, TLR2- und 4-unabhängige Rezeptoren zu Erkennung von *Aspergillus* eine wichtige Rolle spielen ist wahrscheinlich, da im natürlichen Kontext einer solchen Infektion mannigfache Wechselwirkungen stattfinden wie zum Beispiel mit Epithelzellen oder durch die Beladung der Konidien mit Surfactantproteinen (Madan et al., 1997).

Die TLR2 und TLR4 unabhängige Rekrutierung von Neutrophilen in die Bauchhöhle der doppeldefizienten Mäuse könnte so erklärt werden, dass *Aspergillus* unabhängig von diesen TLRs z.B. durch Mastzellen detektiert wurde, welche den geringen Prozentsatz an vorhandenen Neutrophilen angelockt haben könnten. Da in unseren Experimenten jedoch nur prozentuale Werte ermittelt und keine absoluten Zahlen erhoben wurden, kann bisher keine Aussage über die Absolute Zahl z.B. der Mastzellen in den verschiedenen Ansätzen gemacht werden. Daher bedarf die Aufklärung dieses oben beschriebenen Phänomens weiterer Versuche.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Experimente der mit den mit den verschiedenen humanen TLR-Expressionsplasmiden transfizierten HEK293 Zellen und den TLR-defizienten Mausmakrophagen und Mäusen demonstrieren, dass den Rezeptoren TLR2 und TLR4 eine

4. Diskussion

zentrale, jedoch eventuell unterschiedliche Rolle bei der Wirtserkennung von *Aspergillus* und der Einleitung einer adäquaten Immunantwort auf diesen Stimulus, zukommt.

Kein weiterer der bekannten TLRs führte in den durchgeführten Versuchen durch Erkennung von *Aspergillus* zu Zellaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die durch *Aspergillus* ausgelöste Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, in murinen Makrophagen TLR2/TLR4-abhängig ist. Die beobachtete TLR2/TLR4-abhängige Ausschüttung von MIP-2 ist eine mögliche Begründung für die in TLR2/4-defizienten Mäusen verminderte Fähigkeit, als Antwort auf eine lokale *Aspergillus*-Infektion neutrophile Granulozyten zu rekrutieren. Die Effekte dieser TLR-Defizienzen auf experimentell induzierte Aspergillosen im Mausmodell bedürfen weiterer Untersuchungen. Der Schluss liegt nahe, dass eine Verschlechterung der Erkennung von *Aspergillus* zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber entsprechenden Infektionen führt. Unsere Beobachtung, dass das unterschiedliche Pathogenitätspotential der verschiedenen Mitglieder der Gattung *Aspergillus* nicht auf die verminderte Fähigkeit von Makrophagen zurückgeführt werden kann, pathogene Aspergillen wie *A. fumigatus* zu erkennen legt den Schluss nahe, dass das TLR2/TLR4-defiziente Maussystem als ein wertvolles Modellsystem zur Identifizierung der Eigenschaften dienen könnte, die *Aspergillus fumigatus* zu einem erfolgreichen opportunistischen Krankheitserreger haben werden lassen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär verbreiteter, opportunistischer Schimmelpilz, der in den letzten Jahrzehnten zu einem gefährlichen Pathogen für immunsupprimierte Patienten geworden ist. Da jeder von uns mehrere Hundert Konidien dieses Pilzes pro Tag einatmet, war das Ziel dieser Arbeit, Mechanismen aufzuklären, mit denen unser Immunsystem diesen Pilz detektiert und effektiv eliminiert. Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits erste Hinweise auf die Beteiligung bestimmter „Pattern Recognition“ Rezeptoren (PRR) aus der Familie der sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR) bei der Erkennung von *Aspergillus*. Um dies genauer zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst HEK293 Zellen, welche natürlicherweise keinen dieser Rezeptoren exprimieren, mit allen bis dahin bekannten humanen TLR's (hTLR) transfiziert und mit *A. fumigatus* stimuliert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass für die Erkennung von *A. fumigatus* nur hTLR2 und hTLR4 in Frage kommen. Da dieses System jedoch ein künstlich geschaffenes System darstellte, wurden weiterhin Makrophagen von Mäusen untersucht, die entweder keinen funktionellen TLR4, keinen TLR2 oder weder TLR2 noch TLR4 exprimierten. Hierbei stellte sich, nach Untersuchungen der NF- κ B-Translokation mit Hilfe von Immunfluoreszenz sowie Messungen der Zytokin-Sekretion jeweils nach Stimulation mit *A. fumigatus* heraus, dass sowohl TLR2 als auch TLR4 an der Erkennung dieses opportunistischen Schimmelpilzes beteiligt sind. Da die Sporen von *A. fumigatus* jedoch nur einen kleinen Teil der sich in der Luft befindlichen Sporen, in der u.a. auch Sporen von *A. niger* weit verbreitet sind, ausmachen, *A. fumigatus* jedoch für den Großteil der invasiven, tödlichen Aspergillosen verantwortlich ist, sollte mit dieser Arbeit weiterhin geklärt werden, ob unser Immunsystem bereits im Zuge der ersten Erkennung imstande ist, pathogenen von apathogenem Pilz zu unterscheiden. Experimente mit transfizierten HEK 293 Zellen und mit oben beschriebenen Primärmakrophagen aus entsprechenden Mäusen konnten in verschiedenen, qualitativen und quantitativen Versuchsansätzen zeigen, dass hinsichtlich der Zellaktivierung kein bedeutender Unterschied zwischen dem pathogenen *A. fumigatus* und dem apathogenen *A.niger* festgestellt werden konnte und dass das pathogene Potential von *A. fumigatus* nicht darin liegt, der Erkennung durch das Immunsystem zu entrinnen.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte ausserdem gezeigt werden, dass TLR2, nicht jedoch TLR4 im Zuge der Infektion mit *A. fumigatus* zu „Ort des Geschehens“ rekrutiert wird.

Da neben residenten Makrophagen ausserdem die Anlockung von neutrophilen Granulozyten, besonders zur Bekämpfung bereits ausgekeimter Sporen und Hyphen von *A. fumigatus*, von großer Bedeutung ist, wurde die Rolle von TLR2 und TLR4 bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach intraperitonealer Injektion von *A. fumigatus* Hyphen in die Bauchhöhle von Mäusen in einem Lebend-Mausmodell untersucht.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sowohl TLR2 als auch TLR4 für die Rekrutierung von Neutrophilen von essentieller Bedeutung sind, da durch das Fehlen von TLR2 und/oder TLR4 nach Injektion des Pilzmaterials deutlich weniger neutrophile Granulozyten angelockt wurden, was die Bedeutung dieser Rezeptoren bei der Auseinandersetzung unseres Immunsystems mit *A. fumigatus* weiter untermauern konnte.

Interessanterweise kam es nicht nur zu einer Verminderung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, vielmehr veränderte sich das Zellbild der angelockten Zellen: so kam es durch das Fehlen von TLR2 und/oder TLR4 zu einer veränderten Immunantwort, diese blieb jedoch nicht vollständig aus. Diese veränderte Immunantwort zeigte sich bei der Auswertung der verschiedenen, nach Injektion von abgetötetem Hyphenmaterial in die Bauchhöhle der Mäuse rekrutierten Zelltypen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch diese Arbeit gezeigt werden konnte, dass TLR2 und TLR4 für die Erkennung und effektive Eliminierung von *A. fumigatus* von entscheidender Bedeutung sind, und dass durch das Fehlen eines oder beider dieser Rezeptoren die Immunantwort in der Maus nach Stimulation mit *A. fumigatus* stark verändert war.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Reference List

Akashi,S., Nagai,Y., Ogata,H., Oikawa,M., Fukase,K., Kusumoto,S., Kawasaki,K., Nishijima,M., Hayashi,S., Kimoto,M., and Miyake,K. (2001). Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* *13*, 1595-1599.

Alexopoulou,L., Thomas,V., Schnare,M., Lobet,Y., Anguita,J., Schoen,R.T., Medzhitov,R., Fikrig,E., and Flavell,R.A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat. Med.* *8*, 878-884.

Aratani,Y., Kura,F., Watanabe,H., Akagawa,H., Takano,Y., Suzuki,K., Dinauer,M.C., Maeda,N., and Koyama,H. (2002). Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* *40*, 557-63.

Arnou,P.M., Andersen,R.L., Mainous,P.D., and Smith,E.J. (1978). Pulmonary aspergillosis during hospital renovation. *Am Rev Respir Dis* *118*, 49-53.

Asea,A., Rehli,M., Kabingu,E., Boch,J.A., Bare,O., Auron,P.E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* *277*, 15028-15034.

Bernard,M. and Latge,J.P. (2001). *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* *39 Suppl 1*, 9-17.

Blander,J.M. and Medzhitov,R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* *304*, 1014-1018.

Cacalano,G., Lee,J., Kikly,K., Ryan,A.M., Pitts-Meek,S., Hultgren,B., Wood,W.I., and Moore,M.W. (1994). Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* *265*, 682-684.

Campos,M.A., Almeida,I.C., Takeuchi,O., Akira,S., Valente,E.P., Procopio,D.O., Travassos,L.R., Smith,J.A., Golenbock,D.T., and Gazzinelli,R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* *167*, 416-23.

Carl,V.S., Brown-Steinke,K., Nicklin,M.J., and Smith,M.F., Jr. (2002). Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2 and TLR4) agonists differentially regulate secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* *277*, 17448-17456.

Chazalet,V., Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Lortholary,J., Ribaud,P., Shah,P., Cornet,M., Vu Thien,H., Gluckman,E., Brucker,G., and Latge,J.P. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* *36*, 1494-500.

Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Chazalet,V., and Latge,J.P. (1997). Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* *65*, 3080-5.

- DeHart,D.J., Agwu,D.E., Julian,N.C., and Washburn,R.G. (1997). Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes. *J Infect Dis* 175, 146-50.
- Denning,D.W. (2000). Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 355, 423-4.
- Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Doyle,S.E., O'Connell,R.M., Miranda,G.A., Vaidya,S.A., Chow,E.K., Liu,P.T., Suzuki,S., Suzuki,N., Modlin,R.L., Yeh,W.C., Lane,T.F., and Cheng,G. (2004). Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med.* 199, 81-90.
- Flo,T.H., Ryan,L., Latz,E., Takeuchi,O., Monks,B.G., Lien,E., Halaas,O., Akira,S., Skjak-Braek,G., Golenbock,D.T., and Espevik,T. (2002). Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J. Biol. Chem.* 277, 35489-35495.
- Gewirtz,A.T., Simon,P.O., Schmitt,C.K., Taylor,L.J., Hagedorn,C.H., O'Brien,A.D., Neish,A.S., and Madara,J.L. (2001). *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 107, 99-109.
- Giard,D.J., Aaronson,S.A., Todaro,G.J., Arnstein,P., Kersey,J.H., Dosik,H., and Parks,W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- Gil,M.L., Penalver,M.C., Lopez-Ribot,J.L., O'Connor,J.E., and Martinez,J.P. (1996). Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 64, 5239-47.
- Girardin,H., Latge,J.P., Srikantha,T., Morrow,B., and Soll,D.R. (1993). Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 31, 1547-54.
- Goodley,J.M., Clayton,Y.M., and Hay,R.J. (1994). Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *J Hosp Infect* 26, 27-35.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Green,L.C., Wagner,D.A., Glogowski,J., Skipper,P.L., Wishnok,J.S., and Tannenbaum,S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- Hacker,H., Mischak,H., Miethke,T., Liptay,S., Schmid,R., Sparwasser,T., Heeg,K., Lipford,G.B., and Wagner,H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17, 6230-40.
- Hage,C.A., Goldman,M., and Wheat,L.J. (2002). Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. *Eur. J. Med. Res.* 7, 236-241.

- Hajjar,A.M., O'Mahony,D.S., Ozinsky,A., Underhill,D.M., Aderem,A., Klebanoff,S.J., and Wilson,C.B. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* *166*, 15-19.
- Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-79.
- Hawn,T.R., Verbon,A., Lettinga,K.D., Zhao,L.P., Li,S.S., Laws,R.J., Skerrett,S.J., Beutler,B., Schroeder,L., Nachman,A., Ozinsky,A., Smith,K.D., and Aderem,A. (2003). A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J. Exp. Med.* *198*, 1563-1572.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll- like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-103.
- Hearn,V.M. and Mackenzie,D.W. (1980). Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen* *23*, 549-562.
- Heil,F., Ahmad-Nejad,P., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Gellert,T., Dietrich,H., Lipford,G., Takeda,K., Akira,S., Wagner,H., and Bauer,S. (2003). 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.
- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. *Nat Immunol* *3*, 196-200.
- Herbrecht,R., Denning,D.W., Patterson,T.F., Bennett,J.E., Greene,R.E., Oestmann,J.W., Kern,W.V., Marr,K.A., Ribaud,P., Lortholary,O., Sylvester,R., Rubin,R.H., Wingard,J.R., Stark,P., Durand,C., Caillot,D., Thiel,E., Chandrasekar,P.H., Hodges,M.R., Schlamm,H.T., Troke,P.F., and de Pauw,B. (2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* *347*, 408-15.
- Hirschfeld,M., Kirschning,C.J., Schwandner,R., Wesche,H., Weis,J.H., Wooten,R.M., and Weis,J.J. (1999). Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* *163*, 2382-2386.
- Hoover,D.R., Saah,A.J., Bacellar,H., Phair,J., Detels,R., Anderson,R., and Kaslow,R.A. (1993). Clinical manifestations of AIDS in the era of pneumocystis prophylaxis. Multicenter AIDS Cohort Study. *N Engl J Med* *329*, 1922-6.
- Hornef,M.W., Frisan,T., Vandewalle,A., Normark,S., and Richter-Dahlfors,A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* *195*, 559-70.

- Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* *162*, 3749-52.
- Ibrahim-Granet,O., Philippe,B., Boleti,H., Boisvieux-Ulrich,E., Grenet,D., Stern,M., and Latge,J.P. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* *71*, 891-903.
- Jahn,B., Boukhallouk,F., Lotz,J., Langfelder,K., Wanner,G., and Brakhage,A.A. (2000). Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect. Immun.* *68*, 3736-3739.
- Jones,B.W., Heldwein,K.A., Means,T.K., Saukkonen,J.J., and Fenton,M.J. (2001). Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* *60 Suppl 3*, iii6-12.
- Jouault,T., Iyata-Ombetta,S., Takeuchi,O., Trinel,P.A., Sacchetti,P., Lefebvre,P., Akira,S., and Poulain,D. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* *188*, 165-172.
- Jurk,M., Heil,F., Vollmer,J., Schetter,C., Krieg,A.M., Wagner,H., Lipford,G., and Bauer,S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* *3*, 499.
- Kadowaki,N., Ho,S., Antonenko,S., Malefyt,R.W., Kastelein,R.A., Bazan,F., and Liu,Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* *194*, 863-9.
- Koren,H.S., Handwerger,B.S., and Wunderlich,J.R. (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J. Immunol.* *114*, 894-897.
- Krug,A., Luker,G.D., Barchet,W., Leib,D.A., Akira,S., and Colonna,M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* *103*, 1433-1437.
- Kurt-Jones,E.A., Mandell,L., Whitney,C., Padgett,A., Gosselin,K., Newburger,P.E., and Finberg,R.W. (2002). Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* *100*, 1860-1868.
- Latge,J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* *12*, 310-50.
- Latge,J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* *9*, 382-389.
- Latge,J.P. and Calderone,R. (2002). Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. *Curr Opin Microbiol* *5*, 355-8.

- Leadbetter,E.A., Rifkin,I.R., Hohlbaum,A.M., Beaudette,B.C., Shlomchik,M.J., and Marshak-Rothstein,A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* *416*, 603-607.
- Lee,J., Chuang,T.H., Redecke,V., She,L., Pitha,P.M., Carson,D.A., Raz,E., and Cottam,H.B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 6646-6651.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-83.
- Lippert,U., Artuc,M., Grutzkau,A., Moller,A., Kenderessy-Szabo,A., Schadendorf,D., Norgauer,J., Hartmann,K., Schweitzer-Stenner,R., Zuberbier,T., Henz,B.M., and Kruger-Krasagakes,S. (1998). Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J. Immunol.* *161*, 2600-2608.
- Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R., and Iwasaki,A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 513-520.
- Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., and Flavell,R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 5598-5603.
- Madan,T., Eggleton,P., Kishore,U., Strong,P., Aggrawal,S.S., Sarma,P.U., and Reid,K.B. (1997). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun* *65*, 3171-9.
- Maertens,J., Verhaegen,J., Demuynck,H., Brock,P., Verhoef,G., Vandenberghe,P., Van Eldere,J., Verbist,L., and Boogaerts,M. (1999). Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol* *37*, 3223-8.
- Means,T.K., Wang,S., Lien,E., Yoshimura,A., Golenbock,D.T., and Fenton,M.J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* *163*, 3920-7.
- Medzhitov,R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* *1*, 135-45.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* *10*, 351-3.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-7.
- Meier,A., Kirschning,C.J., Nikolaus,T., Wagner,H., Heesemann,J., and Ebel,F. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* *5*, 561-570.

- Meng,G., Rutz,M., Schiemann,M., Metzger,J., Grabiec,A., Schwandner,R., Lupp,P.B., Ebel,F., Busch,D.H., Bauer,S., Wagner,H., and Kirschning,C.J. (2004). Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J. Clin. Invest* *113*, 1473-1481.
- Mullins,J., Harvey,R., and Seaton,A. (1976). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy* *6*, 209-17.
- 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., and Mantovani,A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* *164*, 5998-6004.
- Netea,M.G., Van Der Graaf,C.A., Vonk,A.G., Verschueren,I., Van Der Meer,J.W., and Kullberg,B.J. (2002). The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* *185*, 1483-9.
- Ohashi,K., Burkart,V., Flohe,S., and Kolb,H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* *164*, 558-61.
- Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13766-13771.
- Pahl,H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853-66.
- Paris,S., Boisvieux-Ulrich,E., Crestani,B., Houcine,O., Taramelli,D., Lombardi,L., and Latge,J.P. (1997). Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* *65*, 1510-4.
- Paris,S., Debeaupuis,J.P., Cramer,R., Carey,M., Charles,F., Prevost,M.C., Schmitt,C., Philippe,B., and Latge,J.P. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* *69*, 1581-8.
- Penalver,M.C., O'Connor,J.E., Martinez,J.P., and Gil,M.L. (1996). Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* *64*, 1146-53.
- Pitt,J.I. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J Med Vet Mycol* *32 Suppl 1*, 17-32.
- Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., and Beutler,B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* *282*, 2085-8.
- Ralph,P., Moore,M.A., and Nilsson,K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.* *143*, 1528-1533.

- Ralph,P. and Nakoinz,I. (1977). Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol. 119*, 950-954.
- Regnier,C.H., Song,H.Y., Gao,X., Goeddel,D.V., Cao,Z., and Rothe,M. (1997b). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell 90*, 373-383.
- Regnier,C.H., Song,H.Y., Gao,X., Goeddel,D.V., Cao,Z., and Rothe,M. (1997a). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell 90*, 373-383.
- Rementeria,A., Lopez-Molina,N., Ludwig,A., Vivanco,A.B., Bikandi,J., Ponton,J., and Garaizar,J. (2005). Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol. 22*, 1-23.
- Roeder,A., Kirschning,C.J., Rupec,R.A., Schaller,M., and Korting,H.C. (2004). Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol. 12*, 44-49.
- Rohde,M., Schwienbacher,M., Nikolaus,T., Heesemann,J., and Ebel,F. (2002). Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol. Lett. 206*, 99-105.
- Samson,R.A. (1999). The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib Microbiol 2*, 5-20.
- Schindler,U. and Baichwal,V.R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell Biol. 14*, 5820-5831.
- Schmitt,H.J., Blevins,A., Sobeck,K., and Armstrong,D. (1990). *Aspergillus* species from hospital air and from patients. *Mycoses 33*, 539-41.
- Schromm,A.B., Lien,E., Henneke,P., Chow,J.C., Yoshimura,A., Heine,H., Latz,E., Monks,B.G., Schwartz,D.A., Miyake,K., and Golenbock,D.T. (2001). Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med 194*, 79-88.
- Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M., and Kirschning,C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem 274*, 17406-9.
- Schwartz,S., Ruhnke,M., Ribaud,P., Corey,L., Driscoll,T., Cornely,O.A., Schuler,U., Lutsar,I., Troke,P., and Thiel,E. (2005). Improved outcome in central nervous system aspergillosis with voriconazole treatment. *Blood*.
- Shoham,S., Huang,C., Chen,J.M., Golenbock,D.T., and Levitz,S.M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J. Immunol. 166*, 4620-4626.
- Silverman,N. and Maniatis,T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev 15*, 2321-42.

- Stynen,D., Goris,A., Sarfati,J., and Latge,J.P. (1995). A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 33, 497-500.
- Sultzer,B.M. (1968a). Endotoxin-induced resistance to a staphylococcal infection: cellular and humoral responses compared in two mouse strains. *J. Infect. Dis.* 118, 340-348.
- Sultzer,B.M. (1968b). Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. *Nature* 219, 1253-1254.
- Tada,H., Nemoto,E., Shimauchi,H., Watanabe,T., Mikami,T., Matsumoto,T., Ohno,N., Tamura,H., Shibata,K., Akashi,S., Miyake,K., Sugawara,S., and Takada,H. (2002). Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 46, 503-12.
- Takaki,Y., Seki,N., Kawabata Si,S., Iwanaga,S., and Muta,T. (2002). Duplicated binding sites for (1->3)-beta-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G: implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity. *J Biol Chem* 277, 14281-7.
- Takeda,K. and Akira,S. (2002). [Role of toll-like receptor in innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 47, 2097-102.
- Takeda,K. and Akira,S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
- Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999b). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-51.
- Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999a). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-51.
- Takeuchi,O., Kawai,T., Muhlradt,P.F., Morr,M., Radolf,J.D., Zychlinsky,A., Takeda,K., and Akira,S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13, 933-40.
- Takeuchi,O., Sato,S., Horiuchi,T., Hoshino,K., Takeda,K., Dong,Z., Modlin,R.L., and Akira,S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10-14.
- Tillie-Leblond,I. and Tonnel,A.B. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 60, 1004-1013.
- Toshchakov,V., Jones,B.W., Perera,P.Y., Thomas,K., Cody,M.J., Zhang,S., Williams,B.R., Major,J., Hamilton,T.A., Fenton,M.J., and Vogel,S.N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3, 392-8.

- Tronchin,G., Bouchara,J.P., Ferron,M., Larcher,G., and Chabasse,D. (1995). Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Can. J. Microbiol.* *41*, 714-721.
- Tronchin,G., Bouchara,J.P., Larcher,G., Lissitzky,J.C., and Chabasse,D. (1993). Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. *Biol Cell* *77*, 201-8.
- Underhill,D.M., Ozinsky,A., Hajjar,A.M., Stevens,A., Wilson,C.B., Bassetti,M., and Aderem,A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* *401*, 811-5.
- Vabulas,R.M., Braedel,S., Hilf,N., Singh-Jasuja,H., Herter,S., Ahmad-Nejad,P., Kirschning,C.J., Da Costa,C., Rammensee,H.G., Wagner,H., and Schild,H. (2002b). The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 20847-20853.
- Vabulas,R.M., Braedel,S., Hilf,N., Singh-Jasuja,H., Herter,S., Ahmad-Nejad,P., Kirschning,C.J., Da Costa,C., Rammensee,H.G., Wagner,H., and Schild,H. (2002a). The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 20847-20853.
- Varadaradjalou,S., Feger,F., Thieblemont,N., Hamouda,N.B., Pleau,J.M., Dy,M., and Arock,M. (2003). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur. J. Immunol.* *33*, 899-906.
- Wagner,J.G. and Roth,R.A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* *52*, 349-374.
- Wang,J.E., Warris,A., Ellingsen,E.A., Jorgensen,P.F., Flo,T.H., Espevik,T., Solberg,R., Verweij,P.E., and Aasen,A.O. (2001). Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* *69*, 2402-6.
- Wang,Y. and Thorlacius,H. (2005). Mast cell-derived tumour necrosis factor-alpha mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. *Br. J. Pharmacol.*
- Wasylnka,J.A. and Moore,M.M. (2000). Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect Immun* *68*, 3377-84.
- Wasylnka,J.A. and Moore,M.M. (2002). Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun* *70*, 3156-63.
- Werts,C., Tapping,R.I., Mathison,J.C., Chuang,T.H., Kravchenko,V., Saint,G., I, Haake,D.A., Godowski,P.J., Hayashi,F., Ozinsky,A., Underhill,D.M., Kirschning,C.J., Wagner,H., Aderem,A., Tobias,P.S., and Ulevitch,R.J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* *2*, 346-352.

6. Literaturverzeichnis

Wolfs, T.G., Buurman, W.A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M.A., Hiemstra, P.S., and van 't, V (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol.* *168*, 1286-1293.

Zabel, U. and Baeuerle, P.A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF- kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* *61*, 255-65.

Zabel, U., Henkel, T., Silva, M.S., and Baeuerle, P.A. (1993). Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *EMBO J* *12*, 201-11.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* *303*, 1522-1526.

7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME

ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
A. flavus	Aspergillus flavus
A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
A. nidulans	Aspergillus nidulans
A. niger	Aspergillus niger
A. terreus	Aspergillus terreus
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum-Albumin
C. albicans	Candida albicans
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CMV	Cytomegalie Virus
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CXCR	Chemokin-Rezeptor
DG	Deckgläschen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELAM	endothelial leukocyte adhesion molecule
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK 1/ 2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/ 2</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSA	Humanes Serum-Albumin
IA	invasive Aspergillose
I κ B	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMD	<i>immuno-deficiency</i>
IRAK 1/ 4	IL-1R-assozierte Kinase 1/ 4
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KB	Kilo Basen
KIR	<i>Killer-inhibitory receptor</i>
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine Rich Repeats</i>
MALP	<i>Macrophage Activating Lipopeptide</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDC	Myeloide Dendritische Zellen
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
dNTP	desoxyribonukleotid Triphosphat
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NM	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
dNTP	desoxyribonukleotidtriphosphat
ODN	Oligodesoxynukleotid

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBND	<i>PCR-buffer for non-ionic detergents</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide Dendritische Zellen
Pen	Penicillin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang RNA
ssRNA	<i>single strand RNA</i>
RPM	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
SP-A	<i>Surfactant Protein-A</i>
Strept	Streptomycin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH	T-Helfer
TIR	Toll/ IL-1R-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
hTLR	humaner Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF 6	TNFR-assoziierter Faktor 6
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i>
TU	Technische Universität
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

8. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut, Lehrstuhl Bakteriologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt PD Dr. Frank Ebel, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die bestmögliche Betreuung, die ein Doktorand sich wünschen kann. Für seine Geduld und seinen Beistand mit Rat und Tat bei Experimenten, Diskussionen und Karriereplanung.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann möchte ich für die außergewöhnliche Unterstützung, die sich neben der finanziellen Zuwendung auch auf Karriereberatung, Planung und beratende Hilfe bei der Erstellung eines Stipendienantrages erstreckte, besonders herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Carsten Kirschning von der TU München, für die Durchführung der Transfektionsexperimente, der Bereitstellung von Reagenzien und Mäusen und für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Für die Finanzielle Unterstützung während eines Teils der Arbeit möchte ich mich herzlich bei dem Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ der DFG bedanken.

Für die beratende Hilfe zur Durchführung der Pappenheim-Färbungen und für die Bereitstellung des Zytopins möchte ich mich herzlich bei der Abteilung für hämatologische Diagnostik der von Haunerschen Kinderklinik bedanken.

Für die Durchführung des Limulus-Tests möchte ich mich herzlich bei dem Institut für Umweltmedizin der LMU München bedanken.

Für die ausdauernde praktische und seelische Unterstützung im Labor und vor allem am Computer möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Monika Schwienbacher und bei Dr. Katrin van Erp bedanken.

Ausserdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Eike Speck bedanken, ohne deren unermüdliche Unterstützung bei größeren und kleinen Problemen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Meier,A., Kirschning, C., Heesemann, J., Ebel, F.

“Recognition of *Aspergillus* by macrophages through Toll-like receptors (TLR)2 and TLR4” (Cell. Microbiol. 2003 Aug;5(8):561-70. PMID: 12864815 [PubMed - indexed for MEDLINE].)

Meier,A., Kirschning, C., Heesemann, J.,Ebel, F.

Aspergillus signalling through Toll-like receptors in vitro and in vivo. (Infection, Suppl. 1, Vol3, S. 79, 2003)

Congress for infectious diseases and tropical medicine (K.I.T.), Berlin, Germany
(Nomination for the best abstract)

Angela Meier, Carsten Kirschning, Juergen Heesemann and Frank Ebel

„Recognition of *Aspergillus* by macrophages is mediated by Toll-like receptors (TLR) 2 and TLR4“

Annual meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology, Dresden, Germany

10. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Angela Meier
Geburtsdatum	11.08.1978
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Ausbildung	
06/1998	Abitur, Kepler-Gymnasium, Freiburg, Note: 1,3
10/1998	Beginn des Medizinstudiums an der Albert Ludwigs Universität (ALU) Freiburg
08/2000	Physikum, ALU Freiburg, Note „gut“
08/2001	Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung, ALU Freiburg, Note „gut“
10/2001	Wechsel an die Ludwig-Maximilians Universität München (LMU)
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München, Note: „gut“
04/2004-03/2005	Praktisches Jahr, siehe „praktische Tätigkeiten“
06/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München, Note: „sehr gut“
Dissertation	
02/2002-02/2004	Forschungsarbeit für die Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zu Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der immunologischen Erkennung von <i>Aspergillus</i> “ am Max von Pettenkofer Institut (MvP), LMU München
Publikationen	
	Siehe: „Veröffentlichungen“
Praktische Tätigkeiten	
1999-2001	Monatliche Nachtwachen, REHAB Basel, Schweiz
03/2001	Famulatur Anaesthesiologie und Intensivmedizin, AKH Wien, Österreich
2002	2 Famulaturen Mikrobiologische Diagnostik, MvP Institut, LMU München
08/2003	Famulatur Pädiatrie, Dr. von Haunersche Kinderklinik, LMU München
2003	Wöchentlich Infektionskolloquium, Herr Prof. Dr. Bogner
04/2004-07/2004	Praktisches Jahr: Core1 Medicine (Innere Medizin), MGH, Harvard Medical School, Boston, USA
07/2004-08/2004	Praktisches Jahr: Infectious Diseases Elective at the BIDMC, Harvard Medical School, Boston, USA
04/2004-08/2004	“EBM course”, Erika Riley and Ashish Jha, “PBL training”, “Psychology of learning”, “Learning from phases of group

10. Lebenslauf

	discussion”, Toni Peters, “Alternative models to PBL”, David Cardozo, “Case writing”, “Tutoring” und “Tutorial Observation”, Mimi Wetzel, Bob Stanton and Peg Hinrichs, alle Harvard Medical School, Boston, USA
08/2004-12/2004	Praktisches Jahr: Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Klinikum Großhadern, und Augustinum, LMU München
12/2004-04/2004	Praktisches Jahr: Chirurgie, Klinikum Innenstadt, LMU München
Stipendien	
2003	Graduiertenkolleg 303 Infektion und Immunität der DFG
2004	Stipendium der Harvard-Munich Alliance
2005	Forschungsstipendium der DFG für einen 18monatigen Aufenthalt am Partners AIDS Research Center, MGH, Harvard Medical School, Boston, USA
Interessen	
	Reisen (Südafrika, Thailand, Nordafrika, Sri Lanka, Weißrußland, USA und Europäische Länder) Sport (Hiking, Segeln, Skifahren, Laufen, Jazz dance, Eiskunstlauf) Musik klassische Musik (12 Jahre Geigenunterricht und Orchester)