

# **Interaktionen und Signalweiterleitung von Dectin-1 in dendritischen, tolerogenen dendritischen Zellen sowie Transfektionsmodellen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Philipp Kotthoff  
aus Meschede**

**Bonn 2017**



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Peter Brossart
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Burgdorf

Tag der Promotion: 28.05.2018  
Erscheinungsjahr: 2018



# Zusammenfassung

Dectin-1 ist ein Musterkennungsrezeptor auf Zellen des Immunsystems, welcher beta-Glukane in der Zellwand von pathogenen Pilzen erkennen und über Syk-vermittelte Signalwege sowohl Mechanismen des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems auslösen kann.

In dieser Arbeit wurden neue Interaktionen und die vermittelte Signalweiterleitung des C-Typ Lektin-Rezeptors Dectin-1 untersucht. Im Detail wurde vor allem die Möglichkeit einer Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 untersucht, die aufgrund von Vorversuchen in diesem Labor wahrscheinlich war. Außerdem wurde die Signalweiterleitung von Dectin-1 in Dexamethason behandelten dendritischen Zellen untersucht, welche hohe Mengen Dectin-1 exprimieren und tolerogene Eigenschaften haben. Die Ergebnisse wurden mit gewöhnlichen dendritischen Zellen verglichen. Beide Zelltypen wurden *ex vivo* aus Monozyten gesunder Spender differenziert. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Zur Untersuchung der möglichen Interaktion von Dectin-1 und Annexin 1 wurden zwei verschiedene Zelllinien mit Dectin-1 bzw. Dectin-1 und Annexin 1 transfiziert. Hek293-Zellen, die mit Dectin-1 transfiziert wurden, nahmen beta-Glukane auf und transportierten diese in Kompartimente mit verringertem pH-Wert. Hek293-Zellen exprimierten geringe Mengen des möglichen Dectin-1 Interaktionspartners Annexin 1. Ausschalten des Annexin-1 Gens mittels eines CRISPR/Cas9-Plasmids führte zu einer signifikanten Verringerung der Aufnahme von FITC-Zymosan.

Die Expression von Annexin 1 und Dectin-1 in Schneider Zellen führte analog zu einer erhöhten Aufnahme von FITC-Zymosan gegenüber Schneider Zellen die nur Dectin-1 exprimierten. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz konnte weiterhin gezeigt werden, dass Dectin-1 und Annexin 1 auf phagosomalen Strukturen kolokalisieren. Dies konnte sowohl für transfizierte Schneider Zellen, als auch für dendritische Zellen gezeigt werden. Mittels Präzipitationsexperimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass Annexin 1 in Abhängigkeit von Calciumionen an Zymosan bindet. Da Annexin 1 auch auf geschädigten Zellen externalisiert wird, wurde untersucht ob Dectin-1 an diese bindet. Dazu wurde die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 in *E. coli* exprimiert und anschließend im Labormaßstab aufgereinigt. Bindungsstudien an geschädigten Jurkat-Zellen, die Annexin 1 an ihrer Oberfläche externalisierten, zeigten eine Bindung der rekombinanten extrazellulären Domäne von Dectin-1 an diese

Zellen. Die Entfernung von Annexin 1 von der Oberfläche zeigte allerdings, dass weiterhin eine Bindung von Dectin-1 nachgewiesen werden konnte. Annexin 1 konnte allerdings in Eluaten detektiert werden, wenn Dectin-1 aus Lysaten doppelt transfizierter Schneider S2 Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers präzipitiert wurde.

Die Aufnahme von mit Zellfarbstoffen gefärbten geschädigten Zellen durch Dectin-1 transfizierte Hek293 wurde ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dectin-1 zu einer Erhöhung der Aufnahme von geschädigten Zellen führt. Dectin-1 scheint eine Rolle bei der Aufnahme von geschädigten Zellen zu spielen. Die Strukturen die Dectin-1 dabei bindet, bleiben im Rahmen dieser Arbeit unklar.

Die Behandlung von Patienten mit Dexamethason kann zu einem erhöhtem Risiko einer Infektion mit Pathogenen wie Pilzen führen. Es wurde gezeigt, dass Dectin-1 einer der wichtigsten Rezeptoren zur Erkennung von beta-Glukanen in der Zellwand von Pilzen ist. Die Stimulation von Dectin-1 erhöht die Produktion von Zytokinen und Chemokinen und die T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von dendritischen Zellen und vermittelt so die Überwindung von Pilzinfektionen.

Hier wurde erstmals gezeigt, dass antigen-präsentierende Zellen, die in Gegenwart von Dexamethason generiert werden (Dex-DC), hohe Level von Dectin-1 exprimieren, keine allogeenen T-Zellen zur Proliferation anregen können und eine deutliche verringerte Expression kostimulatorischer Moleküle zeigen, wenn diese mit Dectin-1 Liganden stimuliert wurden. Stimulation von Dex-DC mit beta-Glukanen löste eine starke Phosphorylierung der Kinase Syk aus und erhöhte die Sekretion von IL-10 und IL-1beta, während die Sekretion von IL-12, IL-23 und TNF-alpha reduziert war. Syk nachfolgend wurde STAT3 phosphoryliert und die nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren, die die Aktivierung und Funktion von dendritischen Zellen beeinflussen, verhindert. p50, ein IL-10 induzierender Transkriptionsfaktor, wurde hingegen in hoher Konzentration in nukleären Lysaten von Dex-DC nachgewiesen.

Zusätzlich kam es zu einer verstärkten Bildung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC, die *in vivo* zu Gewebeschäden beitragen könnten. Die Generation von Superoxid-Anionen war Syk-, src- und Dectin-1-abhängig. Die Syk-Aktivität wird durch mehrere Phosphatasen wie CD45 und SHP-1 reguliert. In Lysaten von Dex-DC konnte eine verringerte Expression der Phosphatase SHP-1 nachgewiesen werden, während CD45 in gleichem Maße exprimiert wurde. Insgesamt schien Dexamethason vor allem die von Dectin-1 vermittelte adaptive Immunantwort zu beeinflussen, während Mechanismen des angeborenen Immunsystems teilweise betont werden. Vermutlich spielte die Aktivierung von STAT3 über Dectin-1/Syk hierbei eine entscheidende Rolle. Dex-DC die mit dem Jak/STAT-Inhibitor Ruxolitinib vorbehandelt wurden, zeigten nach Stimulation mit LPS oder Curdlan eine deutliche Erhöhung der Expression

des kostimulatorischen Moleküls CD86. Insgesamt scheinen Mechanismen des angeborenen Immunsystems in Dex-DC im Vergleich zu iDC teils verstärkt aktiviert zu werden, wenn Dectin-1 auf diesen stimuliert wurde. Dieser Befund zeigt wie wichtig die adaptive Immunantwort – wie die durch Dectin-1 vermittelte Induktion und Aktivierung von Th1/Th17 Zellen – möglicherweise bei der Kontrolle von *C. albicans*-Infektionen ist.

Die unter Dexamethason generierten antigenpräsentierenden Zellen entsprechen in ihrem Phänotyp tolerogenen dendritischen Zellen. Tolerogene dendritische Zellen sind möglicherweise ein interessantes Werkzeug zur Vermittlung von Toleranz gegenüber Selbstantigenen. Dectin-1 ist möglicherweise geeignet um Antigene in tolerogene Zellen zu schleusen und dadurch antigenspezifische Toleranz zu vermitteln. In dieser Arbeit wurde dazu das Modellprotein DQ-BSA an Zymosan angelagert und zu verschiedenen Dectin-1 exprimierenden Zellen gegeben. DC und Dex-DC zeigten eine effiziente Aufnahme von Zymosan, an das DQ-BSA angelagert wurde, über Dectin-1. Gegenüber der alleinigen Zugabe von DQ-BSA konnte eine erhöhte Prozessierung bei Aufnahme von DQ-BSA zusammen mit Zymosan festgestellt werden. Die Machinerie zur Prozessierung von Antigenen war demzufolge in Dex-DC nicht eingeschränkt.

## Abstract

Dectin-1 is a pattern-recognition receptor on cells of the immune system, which recognizes beta-glucans in the cell wall of pathogenic fungi and subsequently induces innate and adaptive immune responses via Syk-mediated signaling pathways.

In this thesis new interactions and signaling of the c-type lectine receptor Dectin-1 were analyzed. In detail, the possible interaction of Dectin-1 and Annexin 1 was analyzed, which was shown to be likely as shown by previous experiments. Further, Dectin-1 mediated signaling was analyzed in dexamethasone treated dendritic cells, which express high levels of the receptor and have tolerogenic properties. These results were compared to conventional dendritic cells. Both cell types were differentiated *ex vivo* from monocytes of healthy donors. Hereinafter the main findings of the experiments is briefly presented.

To assess new interaction partners of Dectin-1, two different cell lines were transfected with Dectin-1 or Dectin-1 and Annexin 1. Hek293 cells, that were transfected with Dectin-1, efficiently engulfed beta-glucans and transported them to acidic compartments. Hek293 cells expressed low levels of Annexin 1. Knockout of Annexin 1 via a CRISPR/Cas9 knockout plasmid in Hek293 reduced uptake of FITC-Zymosan significantly. The expression of Dectin-1 and Annexin 1 in Schneider cells led to increased uptake of FITC-Zymosan as compared to Dectin-1 expressing Schneider cells. With the help of immunofluorescence, we further could show, that Annexin 1 and Dectin-1 colocalized on phagosomal structures. This could be shown for double transfected Schneider cells and monocyte-derived dendritic cells. Furthermore precipitation experiments showed, that Annexin 1 could bind to Zymosan in the presence of calcium ions. As Annexin 1 is also externalized on damaged cells, we tested if Dectin-1 binds to this cells. To do so, the extracellular domain of Dectin-1 was expressed in *E. coli* and was subsequently purified at laboratory scale. Damaged Jurkat cells, that externalized Annexin 1 on their surface, showed binding of recombinant Dectin-1. Stripping of Annexin 1 from the cell surface did not reduce binding of Dectin-1. Nevertheless it was possible to detect Annexin 1 in eluates from precipitations of Dectin-1 from lysates of double transfected cells.

Uptake of damaged cells by Dectin-1 transfected Hek293 was analyzed by using stained apoptotic cells. Transfection of Dectin-1 into Hek293 led to an increased uptake of damaged Jurkat cells. Dectin-1 seems to play role in uptake of damaged cells. The structures that are recognized by Dectin-1 remain unclear



in the context of this work.

Treatment of patients with glucocorticoids often results in an increased risk of infection with pathogens such as fungi. Dectin-1 was shown to be one of the major receptors for fungal beta-glucans. Activation of Dectin-1 increases the production of cytokines, chemokines and T-cell stimulatory capacity of DC and mediates resolution of fungal infections.

Here we show that antigen-presenting cells generated in the presence of dexamethasone (Dex-DC) expressed high levels of Dectin-1, had a reduced capacity to stimulate T-cell proliferation and decreased expression of costimulatory molecules, that could not be enhanced upon stimulation with Dectin-1 ligands. Stimulation of Dex-DC with beta-glucans induced a strong upregulation of Syk-kinase phosphorylation and increased secretion of IL-10 and IL-1beta, while the production of IL-12, IL-23 and TNF-alpha was reduced or absent. Downstream of Syk, stimulation of Dectin-1 on Dex-DC resulted in phosphorylation of STAT3 and reduced nuclear translocation of transcription factors involved in dendritic cell activation and function. Solely p50, a IL-10 inducing transcription factor, could be detected in nuclear lysates of Dex-DC.

Additionally there was an increased generation of superoxide-anions by Dex-DC, which might contribute to tissue damage in *C. albicans* infection *in vivo*. Generation of superoxide-anions was dependent on Syk, src and Dectin-1. The activity of Syk is modulated by phosphatases like CD45 and SHP-1. In lysates of Dex-DC SHP-1 expression was reduced, whereas expression of CD45 was not affected. Taken together treatment of DC with dexamethasone seemed to influence Dectin-1 mediated adaptive response, whereas mechanisms of the innate response were partly pronounced. Presumably activation of STAT3 via Dectin-1/Syk played an important role in this process. Dex-DC that were pre-treated with the Jak/STAT-inhibitor ruxolitinib showed an increased expression of CD86 after stimulation with LPS or curdlan. Taken together these results showed that innate mechanisms of the immune system are pronounced compared to iDC when Dectin-1 was stimulated. This findings showed how important adaptive immune response – like induction and activation of Th1/Th17 cells via Dectin-1 – might be to control infections with *C. albicans*.

The phenotype of antigen-presenting cell generated under the influence of dexamethasone corresponds to tolerogenic dendritic cells. Tolerogenic dendritic cells are presumably an interesting tool to mediate tolerance against self-antigens. Dectin-1 might be suitable to deliver antigens into tolerogenic cells to induce antigen-specific tolerance. In this thesis the model protein DQ-BSA was coated to zymosan and different Dectin-1 expressing cells were stimulated. DC and Dex-DC showed an efficient uptake of DQ-BSA coated zymosan via Dectin-1. Compared to treatment with DQ-BSA, there only was an increase in processing of DQ-BSA when coated to zymosan. The machinery for processing of antigens seemed not to be affected in Dex-DC.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Dendritische Zellen . . . . .	1
1.1.1 Stellung im Immunsystem . . . . .	1
1.1.2 Tolerogene dendritische Zellen . . . . .	5
1.2 Dectin-1 . . . . .	8
1.2.1 Allgemeines . . . . .	8
1.2.2 Struktur . . . . .	9
1.2.3 Dectin-1 Liganden . . . . .	10
1.2.4 Dectin-1 vermittelte Signaltransduktion . . . . .	12
1.2.5 Dectin-1 in angeborener und adaptiver Immunität . . . . .	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material . . . . .	17
2.2 Methoden . . . . .	32
2.2.1 Molekularbiologische Methoden . . . . .	32
2.2.2 Zellbiologische Methoden . . . . .	34
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden . . . . .	39
<b>3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen</b>	<b>46</b>
3.1 Generierung Dectin-1- und Annexin 1 exprimierender Zellen . . . . .	46
3.2 Annexin 1-knockout in Dectin-1-transfizierten Hek293-Zellen reduziert die Aufnahme von FITC-Zymosan . . . . .	60
3.3 Annexin I bindet Calcium-abhängig und Dectin-1-unabhängig an Zymosan- und HKCA-Partikel . . . . .	64
3.4 Bei der Aufnahme von beta-Glukanen durch dendritische Zellen zeigt sich eine Kolokalisation von Dectin-1 und Annexin 1 auf phagosomalen Membranen . . . . .	67
3.5 Klonierung und Expression der rekombinanten, extrazellulären Domäne von Dectin-1 . . . . .	70
3.6 Die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 bindet an geschädigte Zellen . . . . .	73

3.7	Mit Dectin-1 transfizierte Hek293 nehmen vermehrt geschädigte Zellen auf. . . . .	75
3.8	Ko-Immunpräzipitation von Annexin 1 und Dectin-1 aus Schneider S2 Zelllysaten . . . . .	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen</b>	<b>79</b>
4.1	Differentielle Expression von Oberflächenmarkern auf iDC und Dex-DC . . . . .	79
4.1.1	Die Dectin-1-Expression ist auf der Oberfläche von Dex-DC signifikant erhöht . . . . .	80
4.1.2	Stimulation mit beta-Glukanen induziert keine Hochregulation kostimulatorischer Proteine auf Dex-DC . . . . .	82
4.1.3	Dex-DC exprimieren CD11c, DC-SIGN aber kein CD1a . . . . .	88
4.1.4	Dex-DC exprimieren die Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7 . . . . .	90
4.2	Dex-DC sezernieren Interleukin-10 während ihrer Generierung	92
4.3	Phagozytotische-Eigenschaften von iDC und Dex-DC . . . . .	94
4.3.1	Dex-DC nehmen mehr FITC-Zymosan auf als dendritische Zellen . . . . .	94
4.3.2	Dex-DC nehmen mehr apoptotische Hek293 Zellen auf als iDC . . . . .	98
4.4	Dex-DC verfügen über stark eingeschränkte T-Zell-stimulatorische Eigenschaften . . . . .	100
4.5	Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in dendritischen und tolerogenen dendritischen Zellen . . . . .	103
4.5.1	Die Kinase Syk ist nach Stimulation mit beta-Glukanen in Dex-DC hyperaktiviert . . . . .	103
4.5.2	Syk-Hyperaktivierung sorgt für erhöhte Freisetzung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC nach Stimulation mit Zymosan oder Curdlan . . . . .	105
4.5.3	Dex-DC haben ein antiinflammatorisches Zytokinprofil nach Stimulation von Dectin-1 mit Curdlan . . . . .	109
4.5.4	Die Interleukin-1 beta Sekretion von Dex-DC ist nach Stimulation mit beta-Glukanen erhöht und ist Caspase- und Syk-abhängig. . . . .	112
4.5.5	Hyperaktivierung von Syk und Superoxid-Anionen führen in tolerogenen dendritischen Zellen zu erhöhter Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und Erk sowie STAT-3 . . . . .	114
4.6	Die Inhibition des Jak/STAT-Signalwegs erhöht die Expression von CD86 auf Dex-DC nach Stimulation mit LPS oder Curdlan . . . . .	118
4.7	Die Expression der Phosphatase SHP-1 ist in Dex-DC herabgesetzt	119

4.8	DQ-BSA wird nach Anlagerung an Zymosan durch Dex-DC und iDC aufgenommen und anschließend prozessiert . . . . .	121
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>127</b>
5.1	Annexin 1 und Dectin-1 kolokalisieren bei der Aufnahme von Dectin-1 Liganden . . . . .	128
5.2	Dectin-1-Transfektion erhöht die Aufnahme von spätapoptotischen Zellen . . . . .	130
5.3	Generierung tolerogener dendritischer Zellen mittels Dexame- thason . . . . .	131
5.4	Dex-DC lösen nach Stimulation von Dectin-1 eine starke Reak- tion von Mechanismen des angeborenen Immunsystems und erhöhte IL-10 sowie IL-1beta Sekretion aus . . . . .	133
5.5	Dex-DC prozessieren Antigene die via Dectin-1 aufgenommen werden. . . . .	141
5.6	Dectin-1 Stimulation führt nicht zur Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> -T- Zellen durch Dex-DC . . . . .	143
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>148</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A.U.	<i>Arbitrary units</i> Willkürliche Einheiten
AP-1	Activator protein 1
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BMDC	<i>Bone Marrow-derived Dendritic Cell</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
CTLD	<i>C-type lectin domain</i>
Da	Dalton
DC	<i>Dendritic cell</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
HDAC	Histone deacetylase
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factors
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	Messenger-RNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MW	<i>Molecular weight</i> Molekulargewicht

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TIM	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule</i>
WGP	<i>Whole glucan particles</i>

Außerdem werden die Standardabkürzungen für die proteinogenen Aminosäuren im Ein- bzw. Dreibuchstabencode, SI-Einheiten und die gültigen Elementsymbole verwendet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Dendritische Zellen

### 1.1.1 Stellung im Immunsystem

Die 1973 erstmals in Mäusen entdeckten dendritischen Zellen kommen überall in geringer Anzahl im Körper von Wirbeltieren vor und fungieren dort als immunologische Wächterzellen (Steinman und Cohn, 1973; Steinman und Witmer, 1978; Steinman, 2012). Bei dendritischen Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe verschiedener Subpopulationen, die sowohl exogenes als auch endogenes Material im Körper aufspüren und aufnehmen können. Die beiden Hauptklassen sind myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen. Dendritische Zellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen. Durch Präsentation der aufgenommenen Antigene können dendritische Zellen eine antigenspezifische, adaptive Immunantwort initiieren oder antigenspezifische Toleranz vermitteln. Durch Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität sind dendritische Zellen die wichtigsten Vermittler antigenspezifischer Immunität oder Toleranz.

Zur Erkennung von Pathogenen besitzen dendritische Zellen Mustereerkennungsrezeptoren (PRRs: *pattern recognition receptors*) auf ihrer Oberfläche, die zum angeborenen Immunsystem gehören und auch von Neutrophilen und Makrophagen exprimiert werden. Diese Mustereerkennungsrezeptoren erkennen jeweils spezifische, hochkonservierte Strukturen an der Oberfläche von pathogenen Mikroorganismen. Durch die Erkennung hochkonservierter Strukturen kann das angeborene Immunsystem trotz der großen Anzahl verschiedener pathogener Mikroorganismen diese mit einer überschaubaren Anzahl von Rezeptoren erkennen. Diese hochkonservierten Strukturen auf Mikroorganismen werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet. Die Mustereerkennungsrezeptoren leiten nach er-



folgt extrazellulärer Ligandenbindung das Signal in das Zellinnere weiter und lösen dort eine Signaltransduktionskaskade aus, die zu Transkription und Proteinbiosynthese aus, die zur Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen, Antigenpräsentation und der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle führt, die immunstimulatorisch wirken (Akira u. a., 2006; Granucci u. a., 2014).

Durch endogene Gefahrensignale (DAMPs: *danger associated molecular patterns*), die beispielsweise durch Infektionen, Gewebeschäden (Apoptose/Nekrose) oder andere Stress-Faktoren vermittelt werden, können dendritische Zellen auch in Abwesenheit von exogenen Material aktiviert werden. Es wird dann von einer sterilen Entzündung gesprochen. Bei DAMPs handelt es sich um körpereigene Strukturen, die im Normalfall nicht von Zellen des Immunsystems erkannt werden können, da sie sich z.B. im Zellinneren verbergen und so nicht für PRRs erkennbar sind. So sind z.B. intrazelluläre Proteine die durch Nekrose plötzlich für Zellen des Immunsystems erreichbar sind, eine Quelle von DAMPs. Neben Proteinen und Nukleinsäuren sind auch kleine Moleküle wie ATP, das intrazellulär gespeichert wird, eine mögliche Quelle für DAMPs. DAMPs können wie PAMPs von PRRs erkannt werden (Gallo und Gallucci, 2013).

Dendritische Zellen sind wie bereits erwähnt besonders effiziente antigen-präsentierende-Zellen. Nach Aufnahme von Material wird dieses intrazellulär proteolytisch prozessiert. Dazu stehen dendritischen Zellen proteolytische Systeme im endosomalen/lysosomalen System, dem Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Verfügung. Die proteolytisch gebildeten Peptide werden ATP-abhängig über TAP1/TAP2 in das ER transportiert. MHC-Moleküle werden im ER mit den entstandenen Peptide (10- bis 15-mere) beladen und an die Zelloberfläche transportiert. Dort können die MHC-Peptid-Komplexe von T-Zellen mittels des T-Zell-Rezeptors erkannt werden (*Signal 1*) und die Proliferation und Differenzierung von Effektor-T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen oder Helfer-T-Zellen induziert werden. Zur Induktion der Proliferation bzw. der Aktivierung von T-Zellen ist neben der Interaktion von peptid-beladenen MHC-I/II und dem T-Zell-Rezeptor ein zweites Signal notwendig. Dazu exprimieren dendritische Zellen Moleküle wie CD80/CD86 oder CD40 auf ihrer Oberfläche die als kostimulatorische Moleküle an Moleküle auf T-Zellen wie CD28 oder CD40L binden (*Signal 2*) und die T-Zellen so aktivieren. Gleichzei-

tige Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. IL-12, IL-1beta oder IL-23 durch dendritische Zellen wirkt stimulierend auf T-Zellen und determiniert die weitere Differenzierung der T-Zellen in verschiedene Subpopulationen (*Signal 3*) (Mellman, 2013).

Für eine maximale Aktivierung von T-Zellen sind alle drei Signale notwendig. *Signal 2* kommt dabei eine Schlüsselrolle zu. Neben aktivierenden sind auch inhibierende Signale von dendritischen Zellen an T-Zellen möglich, die eine Immunantwort verhindern oder abschwächen um eine Schädigung des Körpers zu verhindern. So ist die Interaktion von CD80/CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen mit CTLA4 auf T-Zellen solch ein (ko-)inhibitorisches Signal. Ein weiterer inhibitorischer Signalweg ist die Interaktion von PD1 auf T-Zellen mit PD-L1 oder PD-L2 auf dendritischen Zellen oder  $T_{regs}$  (Granucci u. a., 2014).

Die Präsentation von Antigenen ist über MHC-I oder MHC-II möglich. Im Allgemeinen präsentieren MHC-I-Moleküle Peptide, die durch proteolytische Prozessierung von intrazellulären Proteinen entstanden sind. Diese Peptide können auch viralen Ursprungs sein. An die Zelloberfläche transportierte, peptidbeladene MHC-I-Moleküle werden mittels T-Zell-Rezeptor durch zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen erkannt und ggf. aktiviert. MHC-II-Moleküle sind mit Peptiden beladen, die aus exogenem Material generiert wurden. Aufgenommen wurde dieses Material beispielsweise durch Endozytose oder Makropinozytose. Dies können z.B. Bestandteile von Pilzen oder anderen pathogenen Mikroorganismen sein. Beladene MHC-II-Moleküle werden durch  $CD4^+$  T-Zellen erkannt und ggf. aktiviert. Eine Besonderheit dendritischer Zellen ist die Fähigkeit Antigene bzw. Peptide extrazellulären Ursprungs mittels MHC-I an zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen zu präsentieren. Dieser Vorgang wird *Cross-Presentation* bzw. Kreuzpräsentation genannt. Die Peptide werden entweder im Zytosol oder in vakuolischen Strukturen generiert. Nicht alle Subtypen von dendritischen Zellen können Peptide kreuzpräsentieren. Im Menschen sind vor allem  $CD1^+$  dendritische Zellen in der Lage *Cross-Presentation* durchzuführen. In Mäusen sind  $CD8^+$  und  $CD103^+$  dendritische Zellen in der Lage extrazelluläre Antigene via MHC-I zu präsentieren (Das u. a., 2015).

Nach Aufnahme von Pathogenen prozessieren dendritische Zellen die aufgenommenen Antigene und präsentieren die entstandenen Peptide über MHC-I

bzw. MHC-II Moleküle an  $CD8^+$  bzw.  $CD4^+$  T-Zellen. Präsentation von Antigenen allein ist nicht ausreichend um eine adaptive Immunantwort gegen das aufgenommene Antigen auszulösen. Die T-Zellen müssen vorher in bestimmte Subtypen differenzieren (T-Zell Polarisation). Im wesentlichen können naive  $CD4^+$  T-Zellen zu Th1-, Th2-, Th17-Zellen und  $T_{regs}(CD4^+, CD25^+)$  differenzieren. In welchen Subtyp eine T-Zelle ausdifferenziert wird durch Zytokine in der Umgebung bestimmt die z.B. durch aktivierte dendritische Zellen ausgeschüttet werden. Das Zytokinprofil dendritischer Zellen ist wiederum abhängig von dem initialen Stimulus und dem stimulierten Rezeptor. Ausdifferenzierte Th1-Zellen sezernieren  $IFN-\gamma$  und aktivieren damit Makrophagen in ihrer Umgebung. Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 zur Bekämpfung von Endoparasiten. Th17 Zellen sezernieren IL-17 und aktivieren phagozytische Zellen wie Neutrophile zur Bekämpfung von Bakterien und Pilzen. Regulatorische T-Zellen ( $T_{regs}$ ) kontrollieren die Aktivität der zuvor genannten Sub-Typen. Dazu nutzen  $T_{regs}$  z.B. das auf ihrer Oberfläche exprimierte PD-L1 oder andere inhibitorische Moleküle (Steinman und Banchereau, 2007; Geijtenbeek und Gringhuis, 2009).

Eine weitere wichtige Funktion von dendritischen Zellen ist die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen. Während des *steady states* kommen dendritische Zellen laufend in Kontakt mit Selbstantigenen, die aufgenommen und an T-Zellen präsentiert werden. In diesem Falle werden jedoch keine Effektor-T-Zellen gebildet, sondern die bereits erwähnten regulatorischen  $T_{regs}$ , welche die Proliferation und Aktivität anderer T-Zellen inhibieren können. Diese induzierten regulatorischen T-Zellen vermitteln Toleranz gegenüber Selbstantigenen. Weitere durch dendritische Zellen vermittelte Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen sind Induktion von T-Zell-Anergie/Apoptose, Ausschüttung von toleranzinduzierenden Cytokinen wie IL-10 und Deletion von selbstreaktiven T-Zellen (Mayer u. a., 2012).

Während des *steady states* werden dendritische Zellen als unreif bezeichnet. Unreife dendritische Zellen haben erhöhte phagozytische/endozytische Eigenschaften. Weiterhin haben unreife dendritische Zellen wenig ausgeprägte antigenpräsentierende Eigenschaften durch verringerte Bildung von MHC-Peptid-Komplexen an ihrer Zelloberfläche. Durch Kontakt eines PRRs mit

einem PAMP reifen dendritische Zellen. Durch die Reifung verlieren bzw. verringern die Zellen ihre endozytischen Fähigkeiten und werden zu effektiven, T-Zell-aktivierenden Zellen. Die Synthese und der Transport an die Zelloberfläche von MHC-Peptid-Komplexen wird hochgefahren. Außerdem wird die Expression von Chemokin-Rezeptoren hochreguliert, was die Mobilität der aktivierten dendritischen Zellen erhöht. Durch die erhöhte Mobilität können die aktivierten Zellen in die Lymphknoten migrieren und dort naive T-Zellen stimulieren. Apoptose ist ein weiterer Mechanismus der Toleranz vermittelt. Stirbt eine Zelle durch Apoptose, werden normalerweise keine intrazellulären Bestandteile in die Umgebung abgegeben, die als DAMP dendritische Zellen aktivieren können. Nekrose beschreibt eine Art Zelltod, bei der intrazelluläres Material (DAMPs) in die Umgebung abgegeben wird und dort dendritische Zellen aktivieren kann (Mellman, 2013; Mellman und Steinman, 2001; Steinman und Banchereau, 2007; Trombetta und Mellman, 2005; Medzhitov, 2007; Walker und Abbas, 2002).

Die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen kann unter bestimmten Umständen verloren gehen. Dendritische Zellen und DAMPs spielen dabei eine wichtige Rolle. Wenn dendritische Zellen in einem bestimmten Szenario (Beispielsweise eine bestimmte inflammatorische Mikroumgebung oder ein intrinsischer genetischer Defekt) endogenes Material aufnehmen (z.B. DNA mit TLR-stimulierenden Eigenschaften), in der Folge aktiviert werden und dann das aufgenommene Material an T-Zellen präsentieren, kann dies zu Autoimmunität führen (Gallo und Gallucci, 2013).

### **1.1.2 Tolerogene dendritische Zellen**

Tolerogene dendritische Zellen sind möglicherweise ein vielversprechendes Werkzeug zukünftiger zellbasierter Therapien gegen Autoimmunität oder Abstoßungsreaktionen beispielsweise nach Transplantationen. Abstoßung von allogenen Transplantaten kann zwar durch Gabe von Immunsuppressiva gedämpft werden, eine dauerhafte Toleranz gegen über dem Transplantat lässt sich so aber nicht erzielen. Darüber hinaus spielen Nebenwirkungen einer Immunsuppression wie eine erhöhte Infektanfälligkeit eine große Rolle. *Ex vivo* generierte tolerogene dendritische Zellen sollen im besten Fall antigenspezifische, permanente Toleranz vermitteln können, wenn sie in den Patienten

zurückgeführt werden. Dies kann über T-Zell-Deletion, Anergie oder Proliferation von  $T_{Regs}$  geschehen. Autoimmunität entsteht u.a. durch T-Zellen die Selbstantigene oder Antigene eines Transplantats erkennen. In Nagern wurde bereits eine Vielzahl von Studien mit zellbasierten Therapien durchgeführt (Moreau u. a., 2012a).

Toleranz kann durch dendritische Zellen auf verschieden Weise vermittelt werden. Oben wurde bereits beschrieben, wie die Interaktion von inhibitorischen Molekülen auf dendritischen- und T-Zellen eine adaptive Immunantwort dämpfen kann.

Neben Oberflächenmolekülen auf antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle ist das Zytokin IL-10 ein wichtiger Vermittler von Toleranz. IL-10 und sein Rezeptor (IL-10-R) beeinflussen Signalwege wie z.B. den NF- $\kappa$ B-Weg. Die Translokation des NF- $\kappa$ B-Proteins p65 (RelA) in den Zellkern wird durch Bildung von p50-Homodimeren im Zellkern verhindert (Driessler u. a., 2004). Werden dendritische Zellen in Gegenwart von IL-10 kultiviert und über PRRs aktiviert, differenzieren diese zu Zellen mit einem tolerogenen Phänotyp (IL-10 APCs) mit reduzierter Expression kostimulatorischer Moleküle und mit erhöhter Expression inhibitorischer Moleküle wie ILT2/3/4 heran (Torres-Aguilar u. a., 2010). Auch das Zytokinprofil dendritischer Zellen wird durch IL-10 Zugabe verändert. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 und TNF-alpha, werden zwar in etwa gleichem Maße sezerniert, die Sekretion von IL-10 ist allerdings stark erhöht (Hubo u. a., 2013).

Neben IL-10 lassen sich tolerogene dendritische Zellen durch Zugabe von Vitamin D3 (1,25-dihydroxyvitamin D3), Dexamethason oder einer Kombination aus diesen beiden *in vitro* generieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Vitamin D3 den tolerogenen Phänotyp durch die Aktivierung metabolischer Signalwege erzeugt. Vor allem die Verfügbarkeit von Glucose und seine Verstoffwechslung durch Glykolyse führt bei Vitamin D3 induzierten tolerogenen dendritischen Zellen zur Herunterregulation von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86. Außerdem erhöht sich das IL-10:IL-12p70 Verhältnis (Ferreira u. a., 2015). Andere Substanzen die tolerogene dendritische Zellen *in vitro* induzieren können sind Rapamycin, Vitamin A und Wachstumsfaktoren wie G-CSF und VEGF (Rutella u. a., 2006).

In Gegenwart von Dexamethason und/oder Vitamin D3 generierte dendriti-

sche Zellen verhalten sich ähnlich. Die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen ist bei Stimulation mit PAMPs deutlich herabgesetzt. Zytokine aus der IL-12 Familie werden nicht sezerniert. Die IL-10 Sekretion ist dagegen stark erhöht. Allogene T-Zellen werden *in vitro* durch tolerogene dendritische Zellen nicht zur Proliferation angeregt. Rückführung von Dexamethason-induzierten tolerogenen dendritischen Zellen vor allo-Transplantation verringert dessen Abstoßung. Neben der Inhibition der Proliferation allo-reaktiver T-Zellen können Vitamin D3 induzierte tolerogene dendritische Zellen die Apoptose von T-Zellen stimulieren. Die Suppression der T-Zell-Aktivität ist dabei abhängig von Zell-Zell-Kontakt. Vitamin D3- und Dexamethason-induzierte tolerogene dendritische Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression von PD-L1. Vitamin D3 Behandlung führt zu einer Hochregulation von PD-L1 im Vergleich zu konventionell generierten dendritischen Zellen und Dexamethason-induzierten tolerogenen dendritischen Zellen. (Nikolic und Roep, 2013; Xia u. a., 2005; Unger u. a., 2009; Moreau u. a., 2012b).

Die Aufrechterhaltung von Toleranz beruht neben den beschriebenen T-Zell-extrinsischen Mechanismen, die durch tolerogene Zellen ausgelöst werden, auf der Induktion von T-Zell-intrinsischen Mechanismen wie Anergie, Deletion, T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften ( $T_{Regs}$ ) und der Induktion von T-Zellen, die dämpfende Zytokine sezernieren (z.B. Th2 Zellen, die in einigen Fällen wie Diabetes Toleranz vermitteln (Walker und Abbas, 2002)). T-Zell-Anergie ist ein permanenter Zustand von Inaktivität. T-Zellen gehen in diesen Zustand über wenn sie mit einer antigenpräsentierenden Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor interagieren und kein kostimulatorisches Signal empfangen. Auch ein inhibitorisches Signal kann Anergie erzeugen. Dies kann beispielsweise durch Interaktion von kostimulatorischen Molekülen wie CD86/CD80 auf antigenpräsentierenden Zellen mit einem inhibierenden Molekülen wie CTLA4 auf T-Zellen geschehen. T-Zell-Deletion kann durch FAS/FAS-L-induzierte Apoptose von T-Zellen nach Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle geschehen. Deletion von T-Zellen kann zentral (Thymus) oder in der Peripherie vonstatten gehen (Walker und Abbas, 2002).

*In vivo* verlieren dendritische Zellen, die im *steady state* sind, ihre toleranzvermittelnden Eigenschaften bei Kontakt mit PAMPs oder DAMPs (Nikolic und Roep, 2013). Es gibt aber Hinweise, dass dendritische Zellen mit permanent

tolerogenen Eigenschaften *in vivo* existieren. Im Gehirn von Mäusen wurde eine Population dendritischer Zellen entdeckt, die Toleranz in einem autoinflammatorischen Setting vermitteln (Yogev u. a., 2012). Der tolerogene Phänotyp von *in vitro* mit IL-10, Vitamin D3 oder Dexamethason induzierten dendritischer Zellen ist auch nach Entfernung der jeweiligen Substanz stabil. Auch bei Restimulation dieser Zellen (Xia u. a., 2005; Hubo u. a., 2013; Ferreira u. a., 2015). Diese Tatsache ist von besonderem Interesse für zellbasierte Vakzinierungen gegen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Typ-1 Diabetes (Giannoukakis u. a., 2011; Zhang u. a., 2013) oder Arthritis (Stoop u. a., 2010; Popov u. a., 2006). Nach Rückführung von *ex vivo* generierten tolerogenen dendritischen Zellen kommen diese im Körper wiederholt mit pro-inflammatorischen Signalen in Kontakt. Antigen-spezifische tolerogene dendritische Zellen können über die Lieferung von Selbstantigenen an endozytische Rezeptoren wie Dec-205 oder Dectin-1 gewonnen werden (Petzold u. a., 2012; Keler u. a., 2007; Steinman u. a., 2003; Unger u. a., 2009).

## 1.2 Dectin-1

### 1.2.1 Allgemeines

Die Erkennung von Pathogenen durch Bestandteile des angeborenen Immunsystems ist von immenser Bedeutung. So sind vor allem immunsupprimierte Menschen (z.B. nach Transplantationen, HIV-Infektion oder Chemotherapie) anfällig für Infektionen mit Pathogenen wie z.B. *C. albicans*. Invasive Infektionen mit *C. albicans* zeichnen sich trotz neuer fungizider Therapeutika durch eine hohen Mortalitätsrate aus (Gudlaugsson u. a., 2003). Daher ist es besonders wichtig neue therapeutische Ansätze zu identifizieren um eine bessere Therapie invasiver Infektionen zu ermöglichen (Gow u. a., 2007). Dabei stehen vor allem Bestandteile des angeborenen Immunsystems im Fokus. Bestimmte Musterkennungsrezeptoren (PRRs: *pattern-recognition receptors*) erkennen Pathogene durch Detektion konservierter Bestandteile an ihrer Oberfläche. In der Zellwand von *C. albicans* und anderen pathogenen Pilzen sind verschiedene Kohlenhydrate eingebaut, die von verschiedenen Rezeptoren erkannt werden können. Beta-Glukane sind einer dieser Bestandteile und werden hauptsächlich durch Dectin-1 (Gow u. a., 2007) aber auch CR3 erkannt (Brown und Gordon,

2005; Huang u. a., 2015).

Dectin-1 (Gen-Symbol: CLEC7A, Synonyme: BGR, CLECSF12, DECTIN1) ist ein Typ II Transmembranprotein, das im Menschen auf dem *natural killer gene complex* auf dem Chromosom 12p12.3-p13.2 zwischen OLR1 und CD94 lokalisiert ist (Hermanz-Falcón u. a., 2001). Bei Dectin-1 handelt es sich um ein C-Typ Lektin-ähnliches Protein, das wie Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) zu den Mustererkennungsrezeptoren gehört. C-Typ Lektine wurden ursprünglich als Rezeptorfamilie definiert, die Kohlenhydrate mittels ihrer Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (CRD: *carbohydrate recognition domain*) erkennt. Für CRD-homologe Domänen (CTLDs: *C-Type lectin-like domains*) wurden auch Liganden gefunden die keine Kohlenhydrat-Struktur besitzen (Plato u. a., 2013).

Wie andere C-Typ Lektine erkennt Dectin-1 hochkonservierte Kohlenhydrat-Strukturen auf der Oberfläche von pathogenen Mikroorganismen wie z.B. Pilzen (Brown, 2006). Dectin-1 wird auf vielen phagozytischen Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen exprimiert. Außerdem wurde Dectin-1 auf einer Subpopulation von T-Zellen nachgewiesen (Brown, 2006).

Eine Punktmutation in der cytoplasmatischen Domäne (Tyr238X) von Dectin-1 im Menschen führt zu chronischen, mukokutanen Candidosen Ferwerda u. a. (2009). Im Falle dieser speziellen Punktmutation ist die Aufnahme von Pilzen durch Phagozytose nicht beeinträchtigt. Viel mehr wird die korrekte Immunantwort durch reduzierte Zytokin-Ausschüttung verhindert. Eine erhöhte Anfälligkeit für eine systemische Candidose konnte hingegen durch die Autoren nicht festgestellt werden, was vermutlich an der nicht eingeschränkten Fähigkeit die Pathogene aufzunehmen liegt (Maródi und Erdős, 2010). Experimente mit *knockout*-Mäusen zeigen einen ähnlichen Effekt (Rosas u. a., 2008).

### 1.2.2 Struktur

Bisher sind zehn Isoformen von Dectin-1 beschrieben worden. Die beiden Hauptisoformen sind Isoform 1 und Isoform 2, wobei Isoform 2 die dominierende ist. In der Literatur werden diese beiden Isoformen meist als Dectin-1a und Dectin-1b bezeichnet (Magrane und Uniprot Consortium, 2011). Die beiden Hauptisoformen besitzen eine extrazelluläre CRD und eine zytoplasmatische Domäne mit einem ITAM-ähnlichen Motiv. Dectin 1a verfügt darüber hinaus



über eine *Stalk*-Region, welche die Transmembrandomäne mit der extrazellulären Domäne verbindet (Hollmig u. a., 2009).

Nur die beiden Isoformen a und b können beta-Glukane erkennen und binden. Den anderen Isoformen fehlt die CRD (Kato u. a., 2006). Die humanen und murinen Isoformen von Dectin-1 sind strukturell ähnlich, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Glykosylierung. Während die murinen Isoform a und b von Dectin-1 an Aminosäuren ihrer CRD N-glykosyliert vorliegen, ist nur die humane Isoform a an Aminosäuren ihrer *Stalk*-Region N-glykosyliert. Die humane Isoform b ist nicht glykosyliert (Kato u. a., 2006). Die Glykosylierung scheint den Transport von Dectin-1 an die Zelloberfläche positiv zu beeinflussen (Kato u. a., 2006).

Durch Strukturaufklärung mittels Röntgenbeugung konnte die Oberflächenstruktur von Dectin-1 weiter charakterisiert werden. Die Bindungstasche (definiert durch Trp221 und His223) für beta-Glukane hat einen hydrophoben Charakter. Darüber hinaus wurden Dectin-1 Dimere bei Bindung des beta-Glukans Laminarin beschrieben. *In vivo* wurden bisher keine Dimere von Dectin-1 nachgewiesen. Darüber hinaus wurde eine Bindungsstelle für Calcium-Ionen gefunden. Calcium ist zwar nicht notwendig um beta-Glukane zu binden, scheint jedoch die Stabilität der Faltung der CRD zu erhöhen (Brown u. a., 2007). Es gibt Hinweise, dass die Kinase Syk nach Bindung von beta-Glukanen zwei Dectin-1-Monomere miteinander verbrückt (Rogers u. a., 2005). Dimer-Bildung von C-Typ Lektinen wird häufig über die *Stalk*-Region vermittelt (Marshall und Gordon, 2004).

In murinen Modellen konnte festgestellt werden, dass das Expressionsmuster von Dectin-1 Isoformen die Aktivierung von Th1- und Th17 Zellen beeinflusst (Carvalho u. a., 2012). Je nach dominierender Isoform wurden verschiedenen Level von TNF-alpha nach Stimulation von Dectin-1 gemessen. Murine Makrophagen zeigten in Transfektionsmodellen nach Stimulation von Dectin-1b eine erhöhte TNF-alpha Sekretion gegenüber mit Dectin-1a transfizierten Makrophagen (Heinsbroek u. a., 2006; Yokota u. a., 2001).

### 1.2.3 Dectin-1 Liganden

Hauptliganden von Dectin-1 sind wie bereits erwähnt beta-1,3-Glukane. In Pilzen sind beta-Glukane einer der Hauptbestandteile ihrer Zellwand und

haben immunstimulatorische Eigenschaften (Kankkunen u. a., 2010). Beta-Glukane sind Polymere aus D-Glukose die über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Saijo und Iwakura, 2011). Neben intakten und hitze-inaktivierten *C. albicans* werden *in vitro* und *in vivo* häufig isolierte beta-Glukane wie Zymosan, Curdlan, Laminarin oder WGP *whole glucan particles* verwendet um Dectin-1 zu stimulieren. Dectin-1 bindet zwar lösliche beta-Glukane wie Laminarin aus *Laminaria digitata* mit hoher Affinität, es scheint jedoch im Gegensatz zu partikulären Liganden keine Signalweiterleitung ausgelöst zu werden (Gantner u. a., 2005; Brown u. a., 2002; Gersuk u. a., 2006). Zymosan enthält neben beta-Glukanen weitere Bestandteile die TLR-stimulierend wirken (Walachowski u. a., 2016; Goodridge u. a., 2007).

Curdlan ist ein aus dem Bodenbakterium *Alcaligenes faecalis* isolierter Dectin-1 Ligand dessen TLR-stimulierende Eigenschaften unklar sind. Einige Arbeitsgruppen beschreiben Curdlan als reinen Dectin-1 Liganden (Goodridge u. a., 2009; Kankkunen u. a., 2010), während andere in neueren Arbeiten auch TLR-stimulierende Eigenschaften feststellen konnten (Ganesan u. a., 2014; Kim u. a., 2016).

Der Gehalt an beta-Glukanen scheint einen Einfluss auf die ausgelöste Signalweiterleitung zu haben. Präparationen von Zymosan mit steigendem beta-Glukan-Anteil lösen in murinen Makrophagen eine unterschiedliche Signalweiterleitung und Zytokin-Sekretion (Walachowski u. a., 2016).

Neben exogenen Liganden gibt es Hinweise auf endogene Strukturen an die Dectin-1 binden kann. So beschreiben Chiba u. a. (2014), dass Dectin-1 an Zuckerreste, die an der Oberfläche von Tumorzellen vorkommen bindet. Nach Bindung an diese Zuckerreste werden über den Transkriptionsfaktor IRF 5 und IFN-beta-Sekretion natürliche Killerzellen aktiviert, die diese Tumorzellen lysieren. Eine Bindung von Dectin-1 an Tumorzellen und apoptotische Zellen konnte durch Weck u. a. (2008) gezeigt werden. Neben Zuckerresten wurden bisher auch Protein-Liganden für Dectin-1 nachgewiesen. Thiagarajan u. a. (2013) haben gezeigt, dass Dectin-1 und das Strukturprotein Vimentin in einem entzündlichen Arteriosklerose-Modell kolokalisieren und *in vitro* eine Interaktion der beiden Proteine zur Bildung von Superoxid-Anionen führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 an T-Zellen bindet und in Gegenwart von anti-CD3 Antikörper deren Proliferation stimuliert (Ariizumi

u. a., 2000).

Interaktionen von Dectin-1 mit den Tetraspaninen CD37 und CD63 haben vermutlich einen stabilisierenden Einfluss auf Dectin-1 *Cluster* an der Zelloberfläche. CD37 ist darüber hinaus an der Regulation Dectin-1 vermittelter IL-6 Sekretion beteiligt (Mantegazza u. a., 2004; Meyer-Wentrup u. a., 2007; Yan u. a., 2014). Dectin-1 lokalisiert nach seiner Aktivierung auf *lipid rafts* (Xu u. a., 2009; de Turrís u. a., 2015).

Interessanterweise gibt es Hinweise, dass Dectin-1 auch an der Erkennung von Mykobakterien beteiligt ist. Mykobakterien besitzen keine beta-Glukanhaltigen Strukturen. Es wird vermutet, dass Dectin-1 zusammen mit TLR-2 Strukturen auf Mykobakterien erkennt und eine Immunantwort vermitteln kann (Saijo und Iwakura, 2011).

#### 1.2.4 Dectin-1 vermittelte Signaltransduktion

Dectin-1 kann einige verschiedene Signalwege nach Stimulation mit beta-Glukanen und anderen stimulierenden Liganden aktivieren, die im Folgenden beschrieben werden. Dectin-1 vermittelte Signaltransduktion führt u.a. zur Sekretion von TNF-alpha, CXCL2, IL-23, IL-6, IL-10 und weiteren Zytokinen und Chemokinen (Reid u. a., 2009).

Ein Großteil der von Dectin-1 ausgelösten Signalwege ist abhängig von der Kinase Syk. Dectin-1 ist ein phagozytischer Rezeptor. Aufnahme von partikulären beta-Glukanen scheint unter bestimmten Bedingungen allerdings unabhängig von Syk zu sein (Goodridge u. a., 2012; Underhill u. a., 2005). Auf der anderen Seite ist Dectin-1 vermittelte Signalweiterleitung unabhängig von der Aufnahme von beta-Glukanen in das Zellinnere und Rezeptorinternalisierung (McCann u. a., 2005). Bestätigt wurde dies durch Experimente mit verkürzten Dectin-1 Varianten, denen die intrazelluläre Domäne fehlt (Rogers u. a., 2005).

Die Kinase Syk bindet an die phosphorylierte ITAM-ähnliche Domäne von Dectin-1. Die ITAM-ähnliche Domäne wird durch die Kinase Src phosphoryliert. Ausgelöst wird diese Phosphorylierung vermutlich durch Cluster-Bildung von Dectin-1 Molekülen nach Bindung von partikulären beta-Glukanen. Syk bindet mittels seiner SH2-Domänen an die phosphorylierten Aminosäuren (Underhill u. a., 2005).

Über Syk kann Dectin-1 verschiedene Signalwege auslösen. Zum Beispiel

die Synthese und Sekretion von IFN-beta über den Transkriptionsfaktor IRF5 (del Fresno u. a., 2013; Chiba u. a., 2014) oder die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Underhill u. a., 2005; Thiagarajan u. a., 2013).

In einigen Fällen wirken TLR2 und Dectin-1 synergistisch über das Adapterprotein MyD88 (Brown u. a., 2003). Dectin-1 ist grundsätzlich aber auch autonom in der Lage eine Immunantwort auszulösen. So führt Stimulation von Dectin-1 mit Zymosan Syk-abhängig, aber TLR-unabhängig, zur Expression und Sekretion von IL-2 und IL-10. Im konkreten Fall wurden Syk-*knockout* und MyD88-*knockout* BMDCs untersucht, so dass dieser TLR-abhängige Signalweg nicht aktiviert werden kann (Rogers u. a., 2005).

Außerdem konnte für dendritische Zellen und Makrophagen gezeigt werden, dass Dectin-1 TLR-unabhängig die Expression von SOCS1 stimuliert, was wiederum zu einer Inhibition des NfκB-Signalweges und reduzierter IL-12/IL-10 Sekretion führt. Dieser Signalweg ist Syk-, Src- und *proline-rich tyrosine kinase 2*-abhängig. *Proline-rich tyrosine kinase 2* aktiviert die MAP-Kinase Erk, welche SOCS1-Expression induziert. SOCS1-vermittelte Effekte scheinen die Polarisation von Th17 Zellen zu stimulieren (Eberle und Dalpke, 2012).

In dendritischen Zellen wurde gezeigt, dass Dectin-1 auf so genannten *Lipid Rafts* lokalisiert ist. Wurde die Integrität der *Lipid Rafts* durch Zugabe von βmD zerstört, wurde ein verringerter Ca-Influx sowie eine verringerte Aktivierung von Syk und der MAP-Kinase erk nachgewiesen, wenn Dectin-1 stimuliert wurde (Xu u. a., 2009).

Neben Syk sind die beiden Proteine CARD9 und Raf-1 wichtig für Dectin-1 vermittelte Signaltransduktion. CARD9 assoziiert mit BCL10 und MALT1 für die Aktivierung des NF-κB- und NFAT-Signalwegs (Reid u. a., 2009; Lee und Kim, 2014). Die Aktivierung des NF-κB Signalwegs kann auch über Raf-1 durch Dectin-1 aktiviert werden (Gringhuis u. a., 2009).

Neben *C. albicans* induzieren WGP-Partikel und andere Dectin-1-Agonisten im Tiermodell die Differenzierung von neutrophilen myeloiden Suppressorzellen, welche in einem murinen Transplantations-Modell die Mortalität einer invasiver *C. albicans*-Infektion reduzierten. Der Effekt wird vermutlich durch Inhibition von hyperinflammatorischen Th17-Zellen vermittelt (Rieber u. a., 2015). Es wurde gezeigt, dass IL-17 an *C. albicans* bindet und dessen Überleben erhöht (Zelante u. a., 2012). Das Dämpfen der Immunantwort durch neutrophile

myeloide Suppressorzellen scheint für den infizierten Wirt vorteilhaft zu sein (Zelante u. a., 2007). Im Menschen ist eine Defizienz von Dectin-1 mit einem erhöhtem Auftreten mukokutaner Candidosen assoziiert (Ferwerda u. a., 2009).

Kürzlich konnte zudem festgestellt werden, dass das Adapterprotein SCIMP *downstream* von Src und Syk nach Stimulation von Dectin-1 mit Zymosan phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von SCIMP scheint wichtig für die Produktion proninflammatorischer Zytokine und der Aktivität der MAP-Kinase Erk und p38 zu sein (Kralova u. a., 2016).

### 1.2.5 Dectin-1 in angeborener und adaptiver Immunität

Dectin-1 kann sowohl Effekte auslösen die dem angeborenen als auch dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden. Diese Effekte wurden oben schon angesprochen, sollen hier aber nochmals im Gesamtzusammenhang dargestellt werden.

Phagozytose von beta-Glukan-haltigen Strukturen, Sekretion von Zytokinen und die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies sind die durch Dectin-1 ausgelösten Effekte, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden. Reaktive Sauerstoffspezies sind eine Gruppe von reaktiven Metaboliten wie z.B. Wasserstoffperoxid.

Werden Dectin-1 Liganden aufgenommen, kommt es an den Membranen der Endosomen zur Produktion von reaktivem Sauerstoff. Dieser wird durch das membranständige Enzym NADPH-Oxidase gebildet. Dectin-1 stimuliert die Bildung des Superoxid-Anions ( $O_2^-$ ). Reagiert das Superoxid-Anion mit Stickstoffmonoxid (NO) kommt es zur Bildung des Peroxynitrit-Anions ( $ONOO^-$ ), welches biozide Eigenschaften hat (Kohchi u. a., 2009). Des Weiteren können reaktive Sauerstoffspezies, die durch Dectin-1 Stimulation generiert werden, das NLRP3-Inflammasom und die MAP-Kinasen Erk und p38 aktivieren (Saijo und Iwakura, 2011; Kohchi u. a., 2009). Superoxid-Anionen werden außerdem während des normalen Stoffwechsels gebildet, aber schnell durch Superoxid-Dismutase Proteine zu Wasserstoffperoxid und in der Folge zu Sauerstoff und Wasser abgebaut (Zelko u. a., 2002).

Der pathogene Pilz *Histoplasma capsulatum* exprimiert das Protein Eng1, das beta-Glukane enzymatisch spalten kann und sich so der Erkennung von Dectin-1 entzieht. Folge ist eine verzögerte Immunantwort und eine deutlich verringerte

te Zahl von Th17 Zellen im Vergleich zu *Eng1-knockout Histoplasma capsulatum* (Garfoot u. a., 2016; Brown, 2016).

Die adaptive Immunantwort durch Dectin-1 wird *in vivo* und *in vitro* durch auf seine Aktivierung folgende Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1- und Th17 Zellen ausgelöst. Dies ist unabhängig von TLR-Signalwegen möglich. T<sub>regs</sub> können durch Stimulation von Dectin-1 zu Th17 Zellen polarisieren. In einigen Fällen scheinen IL-17 produzierende T-Zellen vorteilhaft für den Wirt zu sein, in anderen Fällen schädlich (Rieber u. a., 2015). Möglicherweise agiert Dectin-1 als Signalmolekül, dass pro- und anti-inflammatorische Signalwege im Gleichgewicht hält (Saijo und Iwakura, 2011; Zelante u. a., 2007). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund eine Rolle bei der durch Dectin-1 ausgelösten adaptiven Immunantwort spielt (Carvalho u. a., 2012). Neben CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann Dectin-1 in Mäusen auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* und *in vitro* aktivieren. Inkubation von dendritischen Zellen mit dem schwach immunogenen Protein OVA zusammen mit dem Dectin1-Liganden Curdlan zeigte eine stark erhöhte spezifische Induktion von transgenen, OVA-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Aktivierung war dabei abhängig von IL-12p70. IL-12p70 Sekretion durch Curdlan-stimulierte dendritische Zellen wird durch IFN-gamma ausgelöst, das durch T-Zellen sezerniert wird. Die Stimulation von dendritischen Zellen mit Curdlan in Abwesenheit von T-Zellen führt nicht zu Sekretion von höheren Mengen IL-12p70 (Leibundgut-Landmann u. a., 2008). Für Dectin-1 konnte zudem eine Rolle bei der schon beschriebenen Kreuz-Präsentation nachgewiesen werden (Weck u. a., 2008).

Am wenigsten erforscht ist die Rolle von Dectin-1 auf B-Zellen. Bisher ist lediglich bekannt, dass die Aktivierung von Dectin-1 auf B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und B-Zell Proliferation führt, wie Seo u. a. (2013) in Mäusen zeigen konnten. Interessanterweise war dabei der genetische Hintergrund (C57BL/6 vs. BALB/c) der verwendeten Tiere von Bedeutung. Die Produktion von Antikörpern bei Stimulation von Dectin-1 ist vermutlich TLR4-abhängig, da Antikörper nur bei Koinkubation von Zellen mit LPS und beta-Glukanen gemessen werden konnte.

Das synthetische beta-Glukan BTH1677 (Biothera Pharmaceutical Inc., Eagan, MN, USA) findet in Kombination mit Cetuximab (Bristol-Myers Squibb) An-

wendung in klinischen Studien mit dem Ziel die Wirksamkeit dieses anti-EGFR Antikörpers bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms zu erhöhen. Die Wirksamkeit beruht in erster Linie auf der Aktivierung von Immunzellen wie dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen, die dann die mit Antikörpern opsonierten Tumorzellen angreifen (Halstenson u. a., 2016; Segal u. a., 2016). CR3 und Dectin-1 sind dabei die entscheidenden Moleküle für die vermittelte Wirksamkeit (Leonardo u. a., 2016). Beta-Glukane sind daher möglicherweise vielversprechende Adjuvantien in der Tumorthherapie mit monoklonalen Antikörpern.

Zusammengefasst ist Dectin-1 ein PRR der sowohl Teile des angeborenen als auch alle Teile des adaptiven Immunsystems aktivieren kann. Die Aussicht, dass Dectin-1 weitere, unbekannte Liganden abseits von beta-Glukanen hat, macht eine weitere Erforschung von Dectin-1, seiner vermittelten Signalwegen und seiner Interaktionspartner interessant. Des Weiteren macht die Fähigkeit von Dectin-1 Endozytose/Phagozytose auszulösen den Rezeptor interessant für Vakzinierungen/*Antigen-Delivery* (Xie u. a., 2010; Lipinski u. a., 2013; Palucka und Banchereau, 2013).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Grundchemikalien

Alle verwendeten Grundchemikalien wurden über Sigma (Steinheim, DE), Applichem (Darmstadt, DE), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Serva (Heidelberg, DE) oder Merck (Darmstadt, DE) bezogen.

#### Pufferlösungen

Name	Zusammensetzung
PBS (Invitrogen)	2.66 mM KCl 1.47 mM 137.9 mM NaCl 8.05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0 - 7.3
RIPA-Lysepuffer	PBS pH 7.0 - 7.3 1 % (v/v) Igepal CA-630 0.5 % (w/v) Na-Deoxycholat 0.1 % (w/v) SDS 2 mM EDTA 2mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF 1 mM Na-Orthovanadat
Nativer Lysepuffer	20 mM HEPES pH 7.4



	1 % (w/v) Octylglucopyranosid 2mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF 1 mM Na-Orthovanadat 0 – 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Lysepuffer Kernextrakte I	10 mM HEPES pH 7.5 10 mM KCl 0.1 mM EDTA 1 mM DTT 0.5 % (v/v) Nonidet-P40 1 mM PMSF
Lysepuffer Kernextrakte II	20 mM HEPES pH 7.5 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM PMSF
3 X SDS-PAGE Probenpuffer	180 mM Tris HCl 6 % SDS 28 % Glycerol 0.001 % (w/v) Bromphenolblau
10 X Laufpuffer	250 mM Tris 1.92 M Glycin
Laufpuffer SDS-PAGE	1 X Laufpuffer 0.1 % (w/v) SDS
Transferpuffer Western-Blot	1 X Laufpuffer 0.05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) MeOH

50 X TAE-Puffer	242 g Tris 100 ml 0.5 M EDTA 57.1 ml Eisessig ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
IP-Lyse- und Waschpuffer	20 mM HEPES pH 7.4 140 mM NaCl 1 % (w/v) Ocyglucopyranosid
IP-AK-Bindepuffer	PBS pH 7.0 - 7.3 0.02 % (v/v) Tween-20
10 X TBS-Puffer	500 ml Tris HCl pH 8.0 420.75 g NaCl ad 5000 ml dH <sub>2</sub> O
Blocking-Puffer Western-Blot	1 X TBS-Puffer 5 % (w/v) BSA 0.1 % (v/v) Tween-20
Waschpuffer Western-Blot (TBS-T)	1 X TBS-Puffer 0.1 % (v/v) Tween-20
AK-Puffer Western Blot	1 TBS-Puffer 2.5 % (w/v) BSA 0.1 % (v/v) Tween-20
Fixierungspuffer IC Fixation Buffer	eBioscience San Diego CA, USA

**Antikörper**

**Name**

**Hersteller**

Anti-Annexin 1, Maus IgG1

BD Biosciences,

Anti-Dectin-1, Ziege IgG	Heidelberg, DE R&D, Abingdon, UK
Anti-SHP-1, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-pSyk(Y525\526), Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-pSTAT3(Y705), Maus IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-STAT3, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-c-Jun, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-Tubulin- $\alpha$ , Maus IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-RelA(p65), Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-pSTAT1, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-AP-1, Maus IgG	ABGENT, San Diego, CA USA
Anti-NFATC1, Maus IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-PU.1, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-IRF5, Maus IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-p38, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-pp38, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-pERK1/2 Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-poly-Histidin, Maus IgG1	R&D,

Anti-C-Rel, Maus IgG	Abingdon, UK Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-RelB, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-p50, Ziege IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Anti-Dectin-1 PE, Maus IgG2b	R&D, Abingdon, UK
Maus IgG2b PE	R&D, Abingdon, UK
Anti-FPR2 FITC, Maus IgG	R&D, Abingdon, UK
Anti-Maus IgG1 APC, Ratte IgG	BD Biosciences, Heidelberg, DE
DyLight-konjugierte anti-IgG AKs	Thermo Waltham MA, USA
Antikörper CD-Marker (wenn nicht anders angegeben)	Beckmann Coulter Krefeld, DE
Isotypkontrollen FACS (wenn nicht anders angegeben)	Beckmann Coulter Krefeld, DE
Anti-Maus/Ziege/Kaninchen-IgG-HRP	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE

### Kits

Name	Hersteller
QIAGEN Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAGEN Midiprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE

TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Total ROS/Superoxide Detection Kit	Enzo Life Sciences Lörrach, DE
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 IFN- $\beta$ ELISA Kit	R&D Abingdon, UK Invivogen San Diego CA, USA
Superscript cDNA Synthesis Kit	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Neon <sup>®</sup> Transfection System 10 und 100 $\mu$ l Kit	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Waltham MA, USA
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes	Thermo Waltham MA, USA
DES <sup>®</sup> Blastocidin Support Kit	Invitrogen Carlsbad CA, USA

### Zelllinien und Mikroorganismen

Name	Hersteller
One Shot <sup>®</sup> TOP10 <i>E. coli</i>	Invitrogen Carlsbad CA, USA
SG13009 <i>E. coli</i>	Qiagen, Hilden, DE
M15 <i>E. coli</i>	Qiagen, Hilden, DE
K562 Zelllinie	DSMZ, Braunschweig, DE
Schneider S2 Zelllinie	Invitrogen

Hek293 Zelllinie	Carslbad CA, USA
Jurkat Zelllinie	Laborbestand

### Plasmide

Name	Hersteller
pCR2.1-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen Carslbad CA, USA
pcDNA3.1 <sup>+</sup>	Invitrogen Carslbad CA, USA
pAc5.1/V5-His A, B, C	Invitrogen Carslbad CA, USA
pCoBlast	Invitrogen Carslbad CA, USA
pcDNA3-mRFP	Addgene Plasmid # 13032 (Doug Golenbock) Cambridge MA, USA
pQE-30 Xa	Qiagen Hilden, DE
Annexin I CRISPR/Cas9 KO Plasmid	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Annexin I HDR Plasmid	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE

### Primer

Name, Sequenz (5'→3')	Hersteller
Dec-1_ECD <sub>long</sub> for ggatccaccatggctatttgagatccaat	MWG Eurofins Ebersberg, DE
Dec-1_ECD <sub>long</sub> rev	MWG Eurofins

gtcgacaatactatatgagggcacacctacaca	Ebersberg, DE
Dec-1_ECD <sub>short</sub> for ggatccgttctttccagcccttgcc	MWG Eurofins Ebersberg, DE
Dec-1_ECD <sub>short</sub> rev gtcgacactccttctccacccttctc	MWG Eurofins Ebersberg, DE
Dectin-1 <sub>full-length</sub> for gaattgggctctcaagaacaatgga	MWG Eurofins Ebersberg, DE
Dectin-1 <sub>full-length</sub> rev ctcgagtctccttctccacccttctc	MWG Eurofins Ebersberg, DE
Dectin-1 <sub>full-length</sub> mRFP rev ctcgagcattgaaaacttcttctcac	MWG Eurofins Ebersberg, DE
AnxA1 <sub>full-length</sub> for ggtaccaagcaagaaggtagagataaagac	MWG Eurofins Ebersberg, DE
AnxA1 <sub>full-length</sub> rev ctcgagaatttagtttctccacaagagc	MWG Eurofins Ebersberg, DE

**Enzyme, Zytokine, Chemokine, Marker**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
FastDigest EcoRI	Fermentas Waltham MA, USA
FastDigest XhoI	Fermentas Waltham MA, USA
FastDigest KpnI	Fermentas Waltham MA, USA
FastDigest Sall	Fermentas

FastDigest BamHI	Waltham MA, USA Fermentas
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	Waltham MA, USA Fermentas
Lysozym	Waltham MA, USA Applichem Darmstadt, DE
DNase I	Sigma Steinheim, DE
IL-4	R&D, Abingdon, UK
IL-10	R&D, Abingdon, UK
GM-CSF	Berlex Laboratories Inc. Wayne NJ, USA
1kb Plus DNA Ladder (20 - 20.000 Bp)	Fermentas Waltham MA, USA
Rainbow Molecular Weight Marker (12 - 250 kDa)	GE Healthcare Freiburg, DE
PageRuler Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)	Fermentas Waltham MA, USA

### **Medien, Seren und Antibiotika**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX	Invitrogen Carlsbad CA, USA
X-VIVO 20 Medium	Lonza Basel, CH
Schneiders Insect Medium	Sigma Steinheim, DE
<i>E. coli</i> Fast-Media LB AGAR Amp	Invivogen San Diego CA, USA



<i>E. coli</i> Fast-Media X-GAL Agar Amp	Invivogen San Diego CA, USA
<i>E. coli</i> Fast-Media TB Liquid	Invivogen San Diego CA, USA
Plasmid <i>Transfection Medium</i>	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
UltraCruz® <i>Transfection Reagent</i>	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Puromycin	Invivogen San Diego CA, USA
Blasticidin	Invivogen San Diego CA, USA
G418	Invivogen San Diego CA, USA
Kanamycin	Applichem Darmstadt, DE
Ampicillin	Applichem Darmstadt, DE
FCS	Invivogen San Diego CA, USA
Esel-Serum	Merck Darmstadt, DE

### Geräte

Name	Hersteller
96-Well Plate Reader Synergy2	BioTek Bad Friedrichshall, DE
Durchflusszytometer NAVIOS	Beckmann Coulter Krefeld, DE
Mikroskop CKX41	Olympus

Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Düsseldorf, DE Zeiss
ECL Imager ImageQuant LAS 4000	Oberkochen, DE GE Healthcare Freiburg, DE
FPLC Anlage ÄKTA	GE Healthcare Freiburg, DE
Kammer SDS-PAGE Mini-PROTEAN II	BioRad München, DE
Mini Trans-Blot Kammer	BioRad München, DE
Pipetten	Eppendorf Hamburg, DE
UV-Vis Spektrometer SimpliNano	GE Healthcare Freiburg, DE
Zentrifuge 3-30 KS	SIGMA Osterode am Harz, DE
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf Hamburg, DE
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckmann Coulter Krefeld, DE
Zentrifuge 3SR+	Thermo Waltham MA, USA
Thermomixer	Eppendorf Hamburg, DE
Sterilbank KSP18	Thermo Waltham MA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell i240	Thermo Waltham MA, USA
Szintillationszähler microbeta trilux 1450	Perkin Elmer Rodgau, DE
Harvester	Perkin Elmer Rodgau, DE
Neon <sup>®</sup> Transfection System	Invitrogen

Thermocycler Veriti	Carlsbad CA, USA Applied Biosystems Carlsbad CA, USA
Reinstwassersystem Arium Pro UV	Sartorius Göttingen, DE
Stratalinker 1800	Stratagene La Jolla CA, DE

### **Sonstiges Material**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Dynabeads <sup>®</sup> Protein G	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Zymosan A	Sigma Steinheim, DE
FITC-Zymosan	Invitrogen Carlsbad CA, USA
pHRodo Green-Zymosan	Invitrogen Carlsbad CA, USA
DQ-BSA	Invitrogen Carlsbad CA, USA
Curdlan	Wako Neuss, DE
HKCA	Invivogen San Diego CA, USA
DAPI	Thermo Waltham MA, USA
Cytochalasin D	Merck Darmstadt, DE
ProLong <sup>®</sup> Diamond Antifade Mountant	Invitrogen Carlsbad CA, USA
IPTG	Applichem Darmstadt, DE

Dexamethason	Sigma Steinheim, DE
PP2	Sigma Steinheim, DE
R406	Axon Medchem BV Groningen, NL
TMB Substrate Reagent Set BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg, DE
LPS	Sigma Steinheim, DE
Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1	Serva Heidelberg, DE
TEMED	Serva Heidelberg, DE
HD Green DNA-Farbstoff	INTAS Göttingen, DE
Ficoll-Lösung	Merck Darmstadt, DE
Zentrifugenfiltrerröhrchen 10 kDa MWCO	Merck Millipore Darmstadt, DE
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer Rodgau, DE
Printed Filtermat für Szintillationszähler	Perkin Elmer Rodgau, DE
BSA Protein Standard	Thermo Waltham MA, USA
Cell-Tracker-Farbstoffe	Invitrogen Carlsbad CA, USA
7AAD Farbstoff	Beckmann Coulter Krefeld, DE
Thymidin [ <sup>3</sup> H] für MLR	Hartmann Analytic Braunschweig, DE
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Berlin, DE

WesternBright ECL HRP Substrat	Advansta Menlo Park CA, USA
Poly-L-Lysin Lösung 0.1 % (w/v)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, DE
Deckgläser, rund, 13 mm, # 1.5	VWR International Darmstadt, DE
Zellkulturflaschen T75	Corning Corning NY, USA
12-Well-Platten	Corning Corning NY, USA
6-/24-/96-Well-Platten	Greiner Bio-One Frickenhausen, DE
96-Well Platte PolySorb	Nunc Thermo Waltham MA, USA
Serologische Pipetten (2.5/5/10/25/50 ml)	Greiner Bio-One Frickenhausen, DE
10 cm Zellkulturschalen	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Pasteurpipetten	Sarstedt Nurnbrecht, DE
Pipettenspitzen (steril) (10/100/200/1000 µl)	Nerbe Plus Winsen (Luhe), DE
Pipettenspitzen (unsteril) (10/100/200/1000 µl)	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Kryotubes 1 und 2 ml	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Reaktionsgefäß 1.5 ml	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt Nürnbrecht, DE
Highspeed Zentrifugenröhrchen	Thermo Waltham MA, USA

PCR-Reaktionsgefäß 0.2 ml

Axygen

Union City CA, USA

Nitrocellulose-Membran 0.2  $\mu\text{m}$

GE Healthcare

Freiburg, DE

Filterpapier 3 mm

Whatman

Maidstone, UK

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### Isolierung von RNA

RNA wurde mit Hilfe eines Qiagen-Kits isoliert. Dabei wurden die Arbeitsanweisungen des Herstellers berücksichtigt. Die Konzentration der RNA-Proben wurde mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrophotometers ermittelt.

#### Herstellung von cDNA mittels RT-PCR

Zur Synthese von cDNA aus isolierter mRNA wurde ein ein Kit nach dem Prinzip der RT-PCR der Firma Invitrogen verwendet. Da stets mRNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurden Oligo-dT-Primer zur Erststrangsynthese verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der entstandenen RT-PCR-Produkte wurde mittels UV-Vis Spektrophotometer ermittelt.

#### Vervielfältigung von cDNA-Trankripten mittels PCR

Als Matrize für die Vervielfältigung diente stets cDNA oder Plasmid-DNA mit entsprechendem Matrize. Pro Reaktionsgefäß wurde 0.2  $\mu$ g DNA eingesetzt. Je nach Primer- und Matrizen-Kombination wurden die verschiedenen Phasen der PCR angepasst. Tabelle 2.1 ist das PCR-Protokoll für die Vervielfältigung der kodierenden Sequenzen von Annexin 1 und Dectin-1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: PCR-Protokoll für die Amplifizierung von Annexin 1 und Dectin-1 cDNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	je 40
Annealing	58 °C	40 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Stopp	4 °C	$\infty$	

Vervielfältigte Transkripte wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mit Hilfe des QIAEX II Kits von Qiagen gemäß Herstellerangaben isoliert. Durch die eingesetzte Taq-Polymerase entsteht bei allen PCR-Produkten ein 3'-A-Überhang.

### **Klonierung der extrazellulären Domäne von Dectin-1 in pQE30 xa**

Nach Aufreinigung der kodierenden Sequenz der extrazellulären Domäne von Dectin-1 (Dectin-1-ECD), wurde diese zunächst mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR 2.1-TOPO subkloniert. Dies erfolgte durch einstündige Inkubation des prälinearisierten Vektors mit dem gereinigten PCR-Produkt (1:10) und 1  $\mu$ l ( $\cong$  5 U) T4-Ligase. Chemisch-kompetente *E. coli* wurden dann mittels Hitzeschock gemäß Herstellerangaben mit diesem Ligationsansatz transformiert. Dazu wurde der Ligationsansatz zuvor 1:10 verdünnt und 1  $\mu$ l dieser Lösung zu den kompetenten *E. Coli* gegeben und diese dann für 30 s in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad gegeben. Nach Inkubation des Transformationsansatzes für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln, wurden 100  $\mu$ l des Ansatzes auf LB-Agar X-Gal Platten (+ Ampicillin) über Nacht ausplattiert. Augenscheinlich positive Bakterienkolonien (Blau-Weiß-Selektion) wurden am nächsten Tag in 2 ml TB-Amp-Medium expandiert. Nach ausreichender Expansion der Kulturen wurde deren Plasmid-DNA isoliert und anschließend die Konzentration bestimmt. Danach wurden sowohl 1  $\mu$ g des Expressionsvektors pQE 30 xa als auch der pCR 2.1-TOPO-Vektor/Dectin-1-ECD mit den Restriktionsenzymen SallI und BamHI geschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente, die anschließende Ligation in den Zielvektor und die Transformation in *E. coli* erfolgte wie bereits oben beschrieben. Zur Expression der Dectin-1-ECD wurden die Stämme M15 und SG13009 von Qiagen verwendet. Das Design der verwendeten Primer stellte sicher, dass die kodierende Sequenz der Dectin-1-ECD im Leserahmen des Startcodons und Histidin-*Tags* des pQE 30 xa Vektors liegt. Es wurden zwei Varianten der Dectin-1-ECD konstruiert: DecECD<sub>long</sub> bestehen aus der extrazellulären Domäne von Dectin mit stalk-Region und DecECD<sub>short</sub> ohne stalk-Region. Alle Konstrukte wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.



### **Klonierung von Annexin 1 und Dectin-1 in pcDNA3 und pAc5.1/V5-His und Transfektion von Hek293- und Schneider (S2) Zellen**

Alle vorbereitenden molekularbiologischen Schritte wurden analog zu der bereits beschriebenen Klonierung der Dectin-1-ECD durchgeführt.

Restriktionsenzyme wurden entsprechend den verwendeten Primern und den Zielvektoren pcDNA3-mRFP, pcDNA3.1<sup>+</sup> oder pAc5.1/V5-His verwendet. Die für die Transfektion benötigte Plasmid-DNA wurde im *MidiPrep*-Verfahren aufgereinigt.

Hek293 Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem *Neon Transfection System* von Invitrogen transfiziert. Als Parameter wurden 2 Pulse mit 1150 V für 20 ms verwendet. Die Selektion der Hek293-Zellen fand unter 800 µg/ml G418 statt.

Schneider (S2) Zellen wurden gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des *Calcium Phosphate Transfection Kits* von Invitrogen transfiziert. Positive Klone wurden unter 25 µg/ml Blasticidin im Zellkulturmedium selektiert.

### **Annexin 1 knockout in Dectin-1 transfizierten Hek293-Zellen mittels CRISPR/Cas9-KO-Plasmid**

Dectin-1 transfizierte Hek293 Zellen wurden mit einem kommerziell erhältlichen Annexin-1 *Knockout*-Plasmid, das auf der CRISPR/Cas9-Technologie basiert, transfiziert. Zur Selektion wurde ein passendes HDR-Plasmid co-transfiziert, welches eine Puromycin-Resistenz vermittelt. Die Plasmide wurden nach Angaben des Herstellers mittels Transfektionsreagenz (Santa Cruz Bio) in die Zellen eingebracht. Die Selektion erfolgte unter Zugabe von 3 µg/ml Puromycin zum Zellkulturmedium.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **Zellkultur**

Humane Zelllinien wurden in RPMI-Medium (+ Penicillin/Streptomycin; + 10 % FCS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Schneider S2 Zellen wurden bei Raumtemperatur in Schneider S2 Medium (+ Penicillin/Streptomycin; + 10% FCS) kultiviert. Die Langzeit-Lagerung von Zellen erfolgte bei -150 °C oder in

Flüssigstickstoff in FCS + 10 % DMSO oder RPMI-Medium + 10 % FCS + 10 % DMSO.

### **Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe eines Hämatozytometers bestimmt. Zum Ausschluss nicht-vitaler Zellen wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet.

### **In vitro-Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes**

Monozyten wurden aus *buffy-coats* mittels Plastikadhärenz gewonnen. Dazu wurden zunächst die mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) mittels Ficoll-Dichtegradient von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt. Je *buffy-coat* wurde ein 180 ml Gemisch aus PBS und Blut hergestellt. Zur Abtrennung der PBMCs wurden je 30 ml des PBS/Blut-Gemischs auf 12 ml Ficoll-Lösung gegeben und ohne Bremse für 20 min bei 700 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich die PBMCs auf dem Ficoll angereichert und konnten mit einer Pasteurpipette abgesaugt werden. Die abgesaugten Zellen wurden dann nach drei Waschschritten in X-VIVO 20 Medium ausgesät und 2 h bei 37 °C inkubiert. Pro Flasche (T75) wurden maximal  $1 \times 10^8$  oder pro *Well* einer 6-*Well*-Platte maximal  $3 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Die nach 90 min adhärirten Monozyten wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und dann in RPMI-Medium weiter kultiviert. Direkt im Anschluss erfolgte die erste Zugabe von je 20 ng/ml IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF. Die Zugabe wurde an den Tagen 2, 4 und 6 der Kultivierung wiederholt. Nach 6 oder 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und ggf. für Versuche neu in geeignete Zellkultur-Platten oder -Flaschen ausgesät. Die Oberflächenmarker der so generierten dendritischen Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht.

### **In vitro-Generierung tolerogener dendritischer Zellen aus Monozyten**

Die Generierung tolerogener dendritischer Zellen erfolgte analog zur Generierung dendritischer Zellen unter zusätzlicher Zugabe von 20 ng/ml IL-10 (IL-10 APCs) oder 100 nM Dexamethason (Dex-DCs) zu den genannten Zeitpunkten.

### **Isolierung von T-Zellen**

Die Isolierung von T-Zellen erfolgte unter Anwendung der MACS-Technologie. Dazu wurden zunächst wie bereits beschrieben die PBMCs des Blutes isoliert. Die weitere Isolation der T-Zellen aus der isolierten Leukozyten-Population erfolgte dabei gemäß den Angaben des Herstellers.

### **Stimulation von dendritischen Zellen und tolerogenen dendritischen Zellen mit LPS und $\beta$ -Glukanen**

Zu untersuchende Zellen wurden zur Stimulation mit LPS oder  $\beta$ -Glukanen zunächst in geeigneter Zellzahl ausgesät und für mindestens 2 h ruhen gelassen. Dann wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml), Zymosan (100  $\mu$ g/ml) oder Curdlan (100  $\mu$ g/ml bis 400  $\mu$ g/ml) je nach Experiment für 30 min, 45 min, 4 h oder 24 h stimuliert.

### **Durchflusszytometrie**

Alle untersuchten Zellen wurden vor Inkubation mit fluoreszenzmarkierten-Antikörpern zweimal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (550 g; 5 min) und anschließend mit der den Herstellerangaben entsprechenden Menge Antikörper versetzt. Als Negativkontrolle dienten fluoreszenzmarkierte Isotyp-Kontrollantikörper oder bei indirekter Färbung der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper ohne Zugabe des Erstantikörpers. Bei Inkubation mit nicht-fluoreszenzmarkierten Erstantikörpern wurden nach einem weiteren Waschschriff entsprechende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Inkubiert wurden je nach Antikörper für je 30 min bei Raumtemperatur oder 4 °C. Vor der Messung wurden die Proben einmal mit je 1 ml PBS gewaschen, dann abzentrifugiert (550 g; 5 min) und in 0.3 bis 0.5 ml PBS resuspendiert. Filtersätze und Laser wurden entsprechend der verwendeten Fluorophore gewählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo (Tree Star, Ashland OR, USA). Bei der Auswertung wurde das *Gate* so gewählt, dass Zellschrott und tote Zellen ausgeschlossen waren. Sofern mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) angegeben sind, wurden diese Werte durch Abzug der MFI der Isotyp-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe ermittelt.

### **Bindung der extrazellulären Domäne von Dectin-1 an Zymosan-Partikel und geschädigte Zellen.**

Die Bindung der rekombinanten extrazellulären Domäne von Dectin-1 (Dectin-1-ECD) an Tumorzellen wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Experimente untersucht. Tumorzellen oder Zymosan-Partikel wurden dazu mit  $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  ECD (Kontrollprotein: His-DHFR in gleicher Konzentration) für 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation mit der ECD wurden die Zellen oder die Zymosan-Partikel zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert ( $550 \text{ g}$ ; 5 min) und dann mit  $2 \mu\text{g}$  anti-His oder anti-Dectin Antikörper für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten und Zentrifugation ( $550 \text{ g}$ ; 5 min) wurde ein passender fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper gemäß Herstellerangaben zu den Zellen/Partikeln gegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation wurden die Zellen/Partikel erneut gewaschen, abzentrifugiert, und dann in 0.5 ml PBS resuspendiert und analysiert.

### **Gemischte Leukozyten Reaktion (MLR)**

Zunächst wurden dendritische Zellen bzw. tolerogene dendritische Zellen wie oben beschrieben generiert. Dann wurden  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  und  $1 \times 10^3$  Zellen (je als 4-fach Ansatz) in je  $100 \mu\text{l}$  in einer 96-Well-Platte mit Flachboden ausgesät.

Zu den ausgesäten dendritischen Zellen wurden dann  $1 \times 10^5$  allogene T-Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Medium gegeben. Das Gesamtvolumen pro Well betrug dann  $200 \mu\text{l}$ . Es folgte eine Inkubationszeit von fünf Tagen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ .

Nach Ablauf der 5-tägigen Inkubationszeit wurde  $20 \mu\text{l}$  einer Mischung aus  $19 \mu\text{l}$  Zellkulturmedium und  $1 \mu\text{l}$  (entspricht  $1 \mu\text{C}$ ) Tritium-Stammlösung. Es folgte eine weitere Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  für 16 bis 18 h. Danach wurden die Zellen geerntet und auf ein Vlies übertragen. Das Vlies wurde getrocknet und anschließend in einen Beutel mit Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Abschließend erfolgt die Messung der Ereignisse pro Minute in einem Szintillationszähler.

### **Zellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Die Färbung von Zellen mit den *Cell-Tracker*-Farbstoffen CMFDA oder CMPTX erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerangaben.

### **Induktion von Apoptose mittels Staurosporin oder ultravioletter Strahlung**

Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  Staurosporin versetzt oder 150  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVC-Strahlung ausgesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. In manchen Versuchen wurden die Zellen vor Apoptose-Induktion mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

### **Detektion reaktiver Sauerstoffspezies**

Zur Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen pro *Well* in einer 24-*Well* Platte ausgesät. Die Zellen wurden vor der Stimulation für mindestens 2 h und maximal über Nacht unter Standardbedingungen weiter kultiviert. In einigen Experimenten wurden Tyrosinkinaseinhibitoren zu den zu stimulierenden Zellen gegeben. Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zu den Zellen gegeben. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder 100 - 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan für 45 min bei 37 °C. Zusammen mit den stimulierenden Substanzen wurden die Farbstoffe des Kits zur Detektion von Superoxid-Anionen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugegeben. Das verwendete Kit ermöglicht durch zwei verschiedene Farbstoffe die Unterscheidung zwischen der Generierung von Superoxid-Anionen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies. Die Farbstoffe wurden jeweils 1:5000 eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und direkt in FACS-Röhrchen überführt und die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies quantifiziert.

### **Phagozytose-Tests**

Sollten Zellen auf ihre phagozytotischen Eigenschaften hin untersucht werden, wurden die Zellen zunächst mindestens 2 h vor Versuchsbeginn in geeigneten Reaktionsgefäßen ausgesät. Untersucht wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln wie pHrodo-Zymosan, FITC-Zymosan, unkonjugierten  $\beta$ -Glukan-Partikeln oder apoptotischen Zellen. Pro Einzelversuch wurden 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pHrodo Zymosan, 5  $\mu\text{g}$  FITC-Zymosan,  $1 \times 10^6/\text{ml}$  HKCA oder apoptotische Zellen im Verhältnis 5:1 zugegeben. Für  $\beta$ -Glukan-Partikel betrug die anschließende Aufnahmephase zwischen 10 und 90 min. Apoptotische Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 bis 24 h mit den Phagozyten inkubiert.

Sollte die Phagozytose mikroskopisch untersucht werden, wurden die Zellen zuvor auf runden, Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen ausgesät. Wenn Inhibitoren wie z.B. Cytochalasin D ( $2 \mu\text{M}$ ) benutzt wurden, wurden diese 30 min vor Behandlung der Zellen zugegeben.

In einigen durchflusszytometrischen Versuchen wurde die Fluoreszenz von nicht-aufgenommenen FITC-Zyмосan mit 0,1 % Trypanblau in PBS (pH 4.5) gequench (Busetto u. a., 2004). Außerdem wurde in einigen Fällen extrazellulär gebundenes FITC-Zyмосan nach Inkubationsende durch Verdau mit Trypsin/EDTA entfernt.

### **Detektion von DQ-BSA Abbau**

Um den Abbau des Modellproteins BSA in Zellen nachzuweisen wurde DQ-BSA verwendet. DQ-BSA wurde zu  $1 \text{ mg/ml}$  in PBS aufgenommen. Um Zyмосan-Partikel mit DQ-BSA zu *coat*en wurden diese für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit DQ-BSA inkubiert. Die Endkonzentrationen der Suspension waren  $50 \mu\text{g/ml}$  Zyмосan und  $0.5 \text{ mg/ml}$  DQ-BSA. Mit den *gecoateten* Partikeln wurden dann transfizierte Hek293, dendritische und tolerogene dendritische Zelle für verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Versuche wurden in 24-Well-Platten durchgeführt. Pro Kavität wurden  $20 \mu\text{l}$  der beschriebenen Suspension eingesetzt.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **Expression und Aufreinigung der extrazellulären Domäne von Dectin-1**

Die Expression der Dectin-1-ECD erfolgte in 500 ml Kulturen (TB-Amp-Kan) bei  $37^\circ\text{C}$  und Schütteln bei 150 rpm. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) von etwa 0.5 bis 0.8 wachsen gelassen. Danach wurde mit einer finalen IPTG-Konzentration von 1 mM die Expression des Zielproteins für 4 h induziert. Danach wurden die Bakterien bei 4.000 g und  $4^\circ\text{C}$  für 20 min abzentrifugiert. Die Bakterien wurden dann zunächst bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Aufreinigung der extrazellulären Domäne erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurden die Bakterien in Lysepuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSE, 1 mM DTT, pH 9.0) aufgenommen. Nach Zugabe von  $1 \text{ mg/ml}$  Lysozym für 20 min wurde die Suspension 3 mal in

flüssigem Stickstoff eingefroren und nach jedem Einfrieren wieder aufgetaut um eine Lyse der Bakteren zu erreichen. Es folgte die Zugabe von DNase und Inkubation der Suspension bei 37 °C bis die Viskosität nachgelassen hatte. Nach Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C wurde ein Pellett aus *Inclusion Bodies* erhalten, das die ungefaltete Dectin-1-ECD enthält. Dieses Pellett wurde 3 mal in Lysepuffer (+ DNase, +Lysozym, + 0,5 % Triton-X100,) aufgenommen und nach 10 min jeweils nochmal bei 4 °C und 15.000 g abzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit Lysepuffer ohne Triton-X100.

Die gewaschenen *Inclusion Bodies* wurden dann in IB-Lysepuffer (100 mM Tris, 50 mM Glycin, 8,5 M Harnstoff, 5 mM GSSH, 0,5 mM GSSG) über Nacht bei 4 °C unter rühren lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden am Folgetag bei 4 °C und 15.000 g abzentrifugiert.

Die nun in denaturierter aber gelöster Form vorliegende Dectin-1-ECD wurde dann mittels mehrerer Dialyse-Schritte in ihre native Konformation rückgefaltet. Dabei wurde die Konzentration des Harnstoffs Schrittweise von 8.5 M auf 0 M reduziert. Das Protokoll ist Tabelle 2.2 zu entnehmen. Sollten sich während der Dialyse Präzipitate gebildet haben, wurden diese durch einen weiteren Zentrifugationsschritt entfernt. Nach dem letzten Dialyse-Schritt wurde die erhaltene

Tabelle 2.2: Abfolge der schrittweisen Reduktion der Harnstoffkonzentration in der Dectin-1-ECD Proteinlösung.

Schritt	Harnstoffkonzentration im Dialysepuffer	Dauer
1	2 M	4 °C über Nacht
2	1 M	4 °C über Nacht
3	0 M	4 °C über Nacht
3	0 M ohne PMSF und EDTA	4 °C über Nacht

Proteinlösung bei 4 °C und 20.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mittels spezieller Zentrifugenfilterröhrchen (10 kDa MWCO) weiter aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde dann mittels BCA-Assay ermittelt und auf 0.5 mg/ml eingestellt. Das aufgereinigte Protein wurde dann mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit hin untersucht, anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde die Bindung an  $\beta$ -Glukan-Partikel (Zymosan) im Durchflusszytometer untersucht um die Aktivität des Protein zu

untersuchen.

### **Herstellung von Zelllysaten**

Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe eines angemessenen Volumens RIPA-Puffer auf Eis unter periodischem Schütteln lysiert. Danach wurden die Lysate bei 4 °C und 14.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test vorbereitet.

### **Herstellung von Kernlysaten**

Zur Untersuchung von nukleären Proteinen wurde zunächst die zytosolische Fraktion von den Zellkernen getrennt. Als Startmaterial dienten zwischen  $1 \times 10^6$  und  $2 \times 10^6$  Zellen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Lysepuffer I für Kernextrakte unter periodischem Schütteln auf Eis lysiert. Nach Abzentrifugation der Kerne wurden diese noch drei mal mit Lysepuffer I gewaschen. Für die eigentliche Kernlyse wurde Lysepuffer II verwendet. Die Lyse der Kerne erfolgte auf Eis. Nach einem letzten Zentrifugationschritt für 15 min bei 14.000 g wurde der erhaltene Überstand bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **Immunpräzipitation**

Zur Anreicherung bestimmter Proteine wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Vorbereitend wurden zunächst die gewünschten Antikörper an magnetische Protein G-Kügelchen gebunden. Dazu wurden 2 bis 5  $\mu\text{g}$  Antikörper für eine Stunde bei 4 °C unter Rotation zu 25  $\mu\text{l}$  Protein G-Kügelchen-Aufschlammung in 200  $\mu\text{l}$  PBS + 0.02 % Tween-20 gegeben. Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem weniger stringenten Puffer (IP-Lyse- und Waschpuffer) lysiert und — wie bereits für RIPA-Zelllysate beschrieben — weiterverarbeitet. Die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml eingestellt.

Der Komplex aus Protein G-Kügelchen und Antikörper wurde vor Zugabe des Proteinlysats einmal gewaschen. Die Inkubation der Lysate mit dem Protein G-Antikörper-Komplex variierte zwischen 1 h und 24 h und fand unter Rotation bei 4 °C statt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Protein G-Kügelchen dreimal mit je 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer gewaschen und dann in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach einem weiteren Waschschrift mit



200  $\mu$ l Lysepuffer wurden die Protein G-Kügelchen mit 30  $\mu$ l 1 X SDS-PAGE Probenpuffer versetzt. Nach Erhitzen auf 95 °C für 5 min wurden die Proben auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen oder bis zur Analyse eingefroren.

### **Beta-Glukan-Präzipitation**

Zur Isolierung von  $\beta$ -Glukan-bindenden Proteinen wurden zunächst native Zelllysate hergestellt. Zu den Zelllysaten wurde dreimal mit nativem Lysepuffer gewaschenes Zymosan (je Probe 300  $\mu$ g Zymosan oder  $5 \times 10^6$  HKCA) gegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Lysepuffer + 5 % BSA sowie unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von Calciumchlorid oder EGTA unter Rotation bei 4 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die  $\beta$ -Glukane zunächst bei 2.000 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und dann in 200  $\mu$ l Lysepuffer neu aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und die abzentrifugierten  $\beta$ -Glukan Partikel mit 30  $\mu$ l 1 X SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Überstände auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

### **Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test**

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit Hilfe des BCA-Test colorimetrisch bestimmt. Zur Quantifizierung der unbekanntenen Probenkonzentration wurde eine BSA-Standardreihe (2  $\mu$ g/ml, 1.5  $\mu$ g/ml, 0.75  $\mu$ g/ml, 0.375  $\mu$ g/ml, 0.188  $\mu$ g/ml, 0.094  $\mu$ g/ml) verwendet. Gemessen wurde beim Absorptionsmaximum (560 nm) der BCA-Reagenz. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gen5-Software (Biotek, Bad Friedrichshall).

### **SDS-PAGE und Immunblot**

Zelllysate wurden zur weiteren Untersuchung auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte dabei unter denaturierenden Bedingungen als SDS-PAGE. Die Proteine werden dabei durch ihre unterschiedliche Mobilität in der Gel-Matrix nach Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 bis 130 V der Größe nach aufgetrennt. Die durch das SDS mit einer negativen Nettoladung ausgestatteten Proteine wandern dabei zur Anode. In einigen Fällen wurde

nach Beendigung der Auftrennung das SDS-Gel mit Coomassie-Blau eingefärbt um das Bandenmuster der in der Probe enthaltenen Proteine in den Gelspuren sichtbar zu machen. War dies nicht der Fall wurde wie folgt verfahren:

Nach Erreichen des Gel-Endes durch die Lauffront wurde das SDS-Gel dem Tank entnommen und die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde ein *Sandwich* aus Schwämmchen, Filterpapier, SDS-Gel und Nitrocellulosemembran zusammengesetzt. Dieses *Sandwich* wurde dann in einen mit eiskaltem Transfer-Puffer befüllten Tank gegeben, der Tank auf Eis gestellt und ein elektrischer Strom von 250 mA für 60 bis 70 min angelegt. Die Proteine wandern aus der Gel-Matrix Richtung Anode und werden dabei von der Nitrocellulosemembran gestoppt und auf ihr immobilisiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und dann mit TBS-T + 5 % BSA inkubiert um die freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Geblockt wurde unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran mit einer Antikörper-Lösung in TBS-T + 2.5 % BSA über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Verdünnung der Antikörper in der Lösung orientierte sich dabei an den Angaben der Hersteller und eigenen Erfahrungswerten.

Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und dann mit einer Lösung eines passenden HRP-konjugierten Zweitantikörpers und TBS-T + 2.5 % BSA inkubiert. Der Zweitantikörper wurde zuvor 1 zu 10.000 in TBS-T + 2.5 % BSA aufgenommen. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T und einem letzten Waschschriff mit TBS, wurde die Membran aus dem Reaktionsgefäß entnommen und auf einem Stück Frischhaltefolie mit etwa 1 ml ECL-Lösung benetzt. Nach etwa 30 s wurde die überschüssige ECL-Lösung entfernt und die Chemilumineszenz mit Hilfe eines Kamerasystems digital detektiert.

### **Immunzytochemie**

Zur Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen wurden zunächst sterile, runde Deckgläschen (Dicke # 1.5) für 1 h mit 0.01 % Poly-L-Lysin in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Je ein Deckgläschen wurde dazu in ein *Well* einer 24-*Well*-Platte gegeben. Es folgten drei Waschschriffe mit je 1 ml PBS pro

*Well* und Deckgläschen. Sollten die Deckgläschen direkt benutzt werden, wurde ein weiterer Waschschrift mit 1 ml Zellkulturmedium pro *Well* durchgeführt. Sollten die Poly-L-Lysine behandelten Deckgläschen erst am nächsten Tag verwendet werden, wurden diese nach dem Waschen mit PBS über Nacht bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet.

Nach diesen vorbereitenden Schritten wurden die zu untersuchenden Zellen in die *Wells* mit den behandelten Deckgläschen gegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht im Inkubator ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann mit LPS oder  $\beta$ -Glukanen stimuliert. In einigen Fällen wurden 30 min vor der Stimulation der Zellen Syk-, Src- oder Phagozytoseinhibitoren zu den Zellen gegeben. Nach Beendigung der Stimulation (10 bis 60 min) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit 500  $\mu$ l Fixierungspuffer bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschschriften mit je 1 ml PBS pro *Well* folgte die Permeabilisierung der fixierten Zellen mit PBS + 0.5 % Tween-20 für 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 1 ml PBS + 0.05 % Tween-20 pro *Well* wurden die Zellen mit PBS + 5 % Eseserum und 0.05 % Tween-20 inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Geblockt wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach drei Waschschriften wurden die Zellen mit einer Lösung aus PBS, Erstantikörper (1:50 bis 1:200), 2 % Eseserum und 0.05 % Tween-20 inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Deckgläschen mit den adhärerten Zellen wurden dann dreimal gewaschen und für 1 h mit einer Lösung aus PBS, fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper (1:500), 2 % Eseserum und 0.05 % Tween-20 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellkerne für 1 min mit 500  $\mu$ l einer DAPI-Lösung (Stammlösung 1:1000 in PBS + 0.05 % Tween-20) angefärbt. Nach einem letzten Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O wurden die Deckgläschen aus der 24-*Well*-Platte entnommen und mit den Zellen nach unten auf einem mit *Mounting*-Medium präparierten Objektträger fixiert.

Die Objektträger wurden über Nacht im Dunkeln ruhen gelassen bis das *Mounting*-Medium sich verfestigt hatte. Danach konnten die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop mit passenden Lichtquellen und Filtern untersucht werden. Die Langzeit-Aufbewahrung der Proben erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

### **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A)**

Alle verwendeten Kits nutzen die *Sandwich*-Technik zum Nachweis der entsprechenden Ziel-Antigene. Alle ermittelten Werte beruhen auf einem Vergleich mit einer Standardreihe bestehend aus Nullwert und sieben verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Antigen-Standards. Gemessen wurde beim Absorptionsmaximum (450 nm) des TMB-Substrats. Eine Referenzmessung der Absorption bei 560 nm wurde von diesen Werten abgezogen. Die weitere Durchführung der Tests erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gen5-Software (Biotek, Bad Friedrichshall).

# 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

In vorhergehenden Versuchen wurde mittels *Pulldown*-Experimenten und Immunpräzipitationen das Protein Annexin 1 als potentieller endogener Dectin-1 Ligand ermittelt. Dieser Sachverhalt sollte genauer untersucht und verifiziert werden. Dazu wurden Hek293-Zellen und Schneider (S2) Zellen mit Dectin-1 oder/und Annexin 1 transfiziert. So sollte – falls es zu einer Interaktion der beiden Proteine kommt – auch untersucht werden, ob es sich um eine *cis*- oder *trans*-Interaktion handelt. Die Untersuchungen wurden später auch auf dendritische Zellen ausgeweitet. Außerdem wurde die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und für Bindungsstudien eingesetzt.

## 3.1 Generierung Dectin-1- und Annexin 1 exprimierender Zellen

### Expression von Dectin-1 in Hek293-Zellen

Hek293-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und anschließend unter Zugabe von 800  $\mu\text{g/ml}$  G418 selektiert. Nach Generierung einer polyklonalen Zelllinie wurden Zellen in einer 96-Loch-Platten vereinzelt und unter Selektionsbedingungen expandiert. Nach Selektion einiger Kolonien wurden diese in Selektionsmedium (300  $\mu\text{g/ml}$  G418) expandiert und nochmals auf Expression von Dectin-1 untersucht.

In Abbildung 3.1 ist die Expression von Dectin-1 auf transfizierten Hek293-Zellen zu sehen. Als Kontrolle dienten Hek293, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden. In Abbildung 3.1A sind Dectin-1 transfizierte

Zellen zu sehen, in Abbildung 3.1B die Kontrollzellen. Jeweils links sind die Zellen, die mit Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert worden sind. Die Zellen im rechten Teil der Abbildung wurden mit anti-Dectin PE Antikörper und anti-Annexin 1 + anti-Maus IgG1 APC Antikörper inkubiert. Wie erwartet konnte lediglich auf den mit Dectin-1 transfizierten Hek293-Zellen Dectin-1 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Annexin 1 war auf der Zelloberfläche von Hek293 in geringen Mengen nachweisbar.

Um die Funktion von Dectin-1 auf Hek293-Zellen weiter zu überprüfen, wurden die transfizierten Zellen zusammen mit pHRodo-Zymosan inkubiert (Abbildung 3.2). Die an das Zymosan konjugierte pHRodo-Gruppe emittiert nur bei saurem pH-Wert ( $< 6$ ) eine grüne Fluoreszenz, wenn sie mit einem blauen Laser angeregt wird. Nach seiner Aufnahme wird Zymosan in Vesikeln im Zellinneren weiter transportiert. Während der Reifung des Phagosoms verändert sich das Milieu im inneren des Vesikels im Laufe der Zeit hin zu einem sauren pH-Wert. So kann mit pHRodo-konjugiertem Zymosan eine Aufnahme ins Zellinnere von einer äußeren Bindung unterschieden werden.

Wie in Abbildung 3.2 gezeigt ist, nahmen die Kontrollzellen (Histogramme in Teil A) kein Zymosan auf. Die Dectin-1 transfizierten Hek293-Zellen nahmen pHRodo-Zymosan über Dectin-1 auf. Als Kontrolle wurden beide Zelllinien 30 min mit dem Phagozytose-Inhibitor Cytochalasin D ( $2 \mu\text{M}$ ) vorinkubiert und dann mit pHRodo-Zymosan stimuliert. In diesem Fall kam es nur zur oberflächlichen Bindung von Zymosan an der Oberfläche der Dectin-1 transfizierten Zellen.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

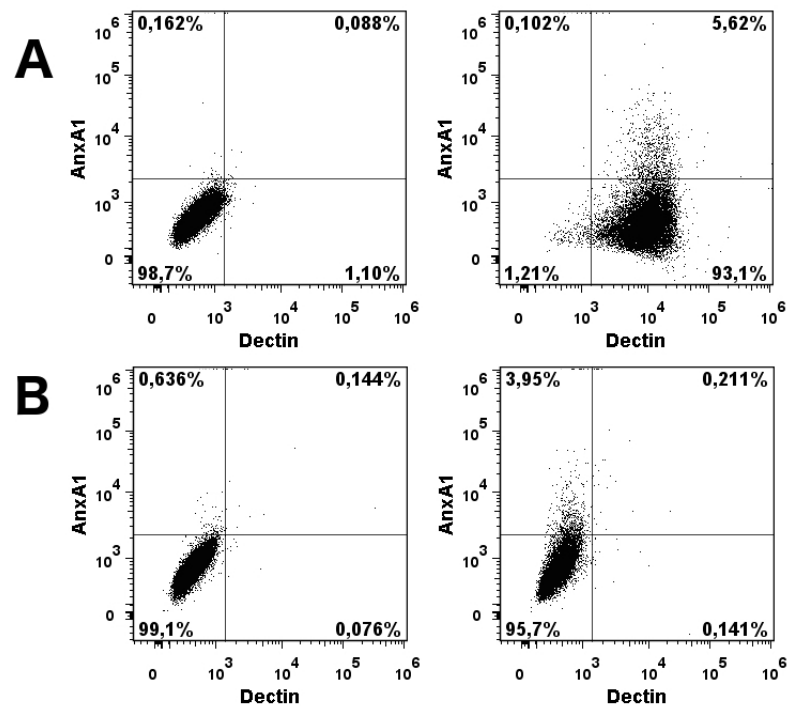


Abbildung 3.1: Dectin-1-Expression auf der Oberfläche von transfizierten Hek293-Zellen. Nach der Isolation von einer Dectin-1 exprimierenden monoklonalen Hek293-Zelllinie wurde die Expression auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die beiden Punkt-Diagramme in Teil A zeigen mit Dectin-1 transfizierte Hek293-Zellen. Die beiden Punkt-Diagramme in Teil B zeigen Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Jeweils links ist die Inkubation mit Maus IgG2b-PE oder anti-Maus IgG1-APC zu sehen. Rechts die Inkubation mit anti-Dectin-1-PE und anti-Annexin 1 + anti-Maus IgG1-APC.

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

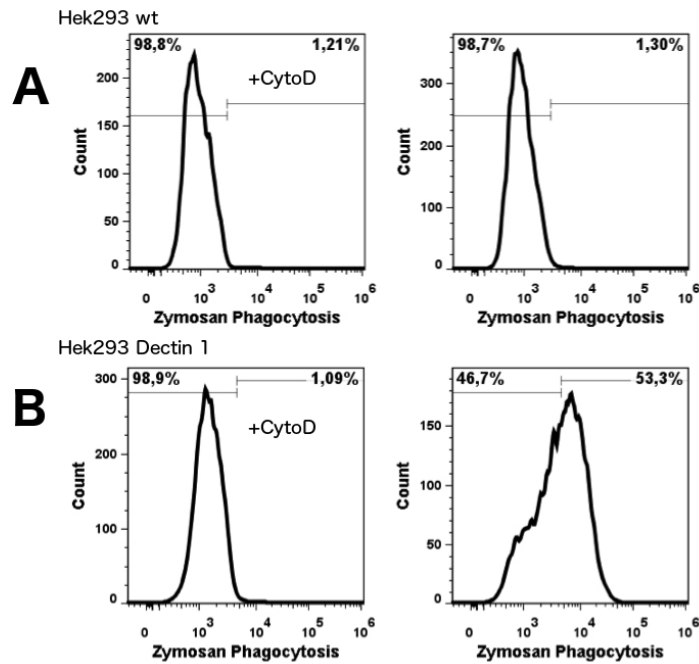


Abbildung 3.2: pHRodo-Zymosan Aufnahme durch Dectin-1-transfizierte Hek293-Zellen. Dectin-1- und mit Leervektor-transfizierte Hek293-Zellen wurden für 60 min mit 5  $\mu$ g/ml pHRodo Green Zymosan inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in den linken Histogrammen 30 min vor ihrer Stimulation mit 2  $\mu$ M Cytochalasin D vorbehandelt.



### **Doppeltransfektion von Schneider (S2) Zellen mit Annexin 1 und Dectin-1**

Schneider (S2) Zellen lassen sich vergleichsweise einfach mit mehreren Plasmiden transfizieren. Zusammen mit den Expressionsplasmiden kann ein Selektionsplasmid (hier pCoBlast), welches eine Antibiotikaresistenz (hier: Resistenz gegen Blastocidin) vermittelt, in die Zellen eingebracht. Nach Konstruktion der Expressionsplasmide mit den kodierenden Sequenzen von Dectin-1 und Annexin 1 wurden diese zusammen mit dem Selektionsplasmid mittels Calciumphosphat-Methode in die Zellen eingebracht. Nach Selektion, Vereinzlung und Expansion in Medium mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Blastocidin wurden die Zellen zunächst mittels Durchflusszytometrie auf Dectin-1 und Annexin 1 Expression untersucht (Abbildung 3.3).

Es konnte eine starke Expression von Dectin-1 und/oder Annexin 1 an der Oberfläche von einzel- bzw. doppelt transfizierten Schneider (S2) Zellen nachgewiesen werden. Die Kontrollzellen, die nur mit dem Selektionsvektor transfiziert wurden, zeigten wie erwartet keine Expression von humanen Annexin 1 oder Dectin-1. Überraschend war die starke Oberflächenexposition von Annexin 1, welches normalerweise hauptsächlich intrazellulär lokalisiert ist.

Mittels Immunblot (Abbildung 3.4) wurde anschließend humanes Dectin-1 und Annexin 1 in Lysaten von einfach- und doppelt transfizierten Schneider (S2) Zellen nachgewiesen. Die Expression von Dectin-1 und/oder Annexin 1 war vergleichbar in doppelt und einfach transfizierten Zellen.

Zur weiteren Analyse der Funktion von Dectin-1 und Annexin 1 auf Schneider (S2) Zellen wurden die transfizierten Zellen zusammen mit FITC-Zymosan inkubiert (Abbildung 3.5). Zur Unterscheidung von Bindung und Aufnahme von FITC-Zymosan wurden die mit FITC-Zymosan inkubierten Zellen in PBS (pH-Wert 4.5) mit 0.1 % Trypanblau resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Trypanblau und der erniedrigte pH-Wert *quenchen* die Fluoreszenz der an Zymosan konjugierten FITC-Gruppe. Im Zellinneren wird die Fluoreszenz von aufgenommenen FITC-Zymosan nicht beeinträchtigt. Versuche mit pHRodo-Zymosan waren nicht zufriedenstellend und lassen vermuten, dass Zymosan in Schneider (S2) Zellen nicht verstärkt in saure Kompartimente transportiert wird. Allerdings wurden für Dectin-1 und Annexin 1 exprimierende Schneider Zellen höhere Werte ermittelt (Abbildung 3.6). Als Kontrolle wurden die Zellen bei 0 °C (*auf Eis*) mit FITC-Zymosan inkubiert oder mit Cytochalasin

D vorbehandelt.

In Abbildung 3.5 sind in (a) und (b) mehrere solcher Experimente zusammengefasst. Abbildung 3.5a zeigt die prozentual-positiven Zellen für FITC-Zymosan nach 30-minütiger Inkubation. Abbildung 3.5b zeigt die MFI der Proben aus Abbildung 3.5a. Es konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0.0001$ ) zwischen einzel- und doppelt transfizierten S2 Zellen festgestellt werden.

Um eine Aufnahme durch Schneider (S2) Zellen zu verifizieren, wurden die Zellen mittels Immunzytochemie/Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 3.7 und 3.8). Mit Annexin 1 und Dectin-1 transfizierte Zellen schienen HKCA (*heat-killed c. albicans*) besser aufnehmen zu können. Durch diese Zellen wurden deutlich mehr Partikel aufgenommen. Nur mit Dectin-1 transfizierte Schneider Zellen zeigten zwar eine effektive Bindung von HKCA, aber nur eine geringfügige Ausbildung von geschlossenen phagosomalen Strukturen. Außerdem war bei doppelt-transfizierten Zelle eine stärkere Akkumulation von Dectin-1 an HCKA-Artikel festzustellen. Dies war auch der Fall, wenn die Partikel noch nicht ganz aufgenommen wurden. Teils kommt es zur Kolokalisation von Annexin 1 und Dectin-1.

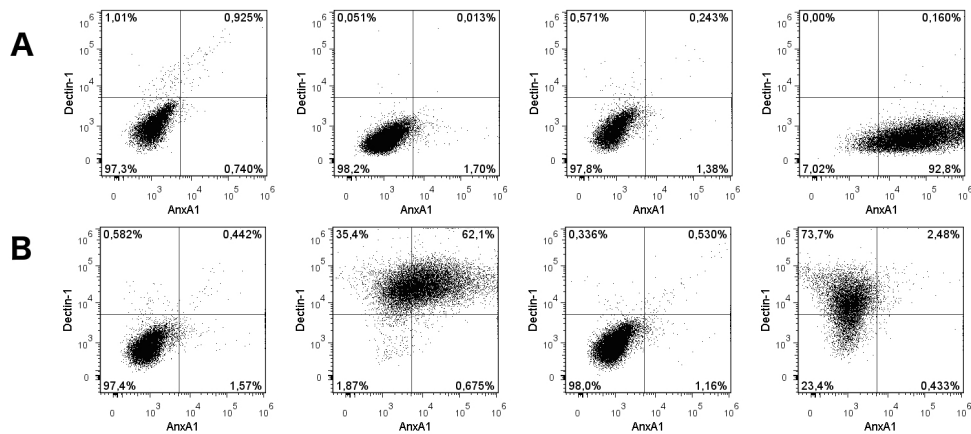
In Abbildung 3.9 ist die Intensität der Dectin-1 Anfärbung an jeweils einer repräsentativen Stelle gezeigt. Die weiße Linie zeigt den Verlauf des Intensitätsprofils der Dectin-1 Fluoreszenz. Rechts in der Abbildung ist das Intensitätsprofil für einfach- und doppelt-transfizierte Schneider Zellen dargestellt. Während die phagosomalen Strukturen bei doppelt transfizierten Schneider Zellen in dem repräsentativen Profil geschlossen waren, waren an den einfach transfizierten Zellen HKCA-Partikel größtenteils nur oberflächlich gebunden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dectin-1 in Schneider (S2) Zellen und Hek293 Zellen ausreichend ist, um diesen Zellen die Fähigkeit zu verleihen partikuläre beta-Glukane aufzunehmen. In Hek293 Zellen wurde dabei die Kinase Syk aktiviert (im Folgendem gezeigt) und pHRodo-Zymosan in saure Zellkompartimente transportiert. Schneider (S2) Zellen, die doppelt mit Annexin 1 und Dectin 1 transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu nur mit Dectin-1 transfizierten Zellen eine erhöhte Aufnahme von FITC-Zymosan bei vergleichbarer Expression von Dectin-1. Die Aufnahme von beta-Glukanen durch transfizierte Schneider (S2) Zellen wurde mittels Immunzytochemie verifiziert (Abbildung 3.7). Dectin-1 Transfektion war aus-

reichend, um Schneider (S2) Zellen die Fähigkeit zu verleihen beta-Glukane zu binden und aufzunehmen. In Abbildung 3.7 ist zu sehen, dass sich bei Inkubation dieser Zellen zusammen mit HKCA Dectin-1-positive phagosomale Strukturen ausbildeten. Dies war für einfach- und doppelt transfizierte Zellen der Fall. Im Falle von doppelt transfizierten Zellen waren diese Strukturen größtenteils ebenfalls positiv für Annexin 1. Annexin-1 transfizierte nahmen wie Kontroll-Schneider (S2) Zellen keine beta-Glukane auf oder haben diese gebunden.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---



Abbildungung 3.3: Dectin-1 bzw. Annexin 1-Expression auf transfizierten Schneider-Zellen. Monoklonale Schneider-Zelllinien wurden mittels Durchflusszytometrie auf Annexin 1- und Dectin-1-Expression untersucht. Die beiden Punkt-Diagramme oben links zeigen Kontrollzellen die lediglich mit dem Selektionsvektor transfiziert wurden. In A rechts sind Annexin 1 transfizierte Zellen gezeigt. Unten links sind doppelt-transfizierte Zellen gezeigt. In B rechts ist die Dectin-1-transfizierte Zelllinie zu sehen. Die Färbung erfolgte im Falle der Kontrollexperimente mit Maus IgG2b-PE und anti-Maus IgG1-APC und mit anti-Dectin-PE und anti-Annexin 1/anti-Maus IgG1-APC für die spezifischen Färbungen.

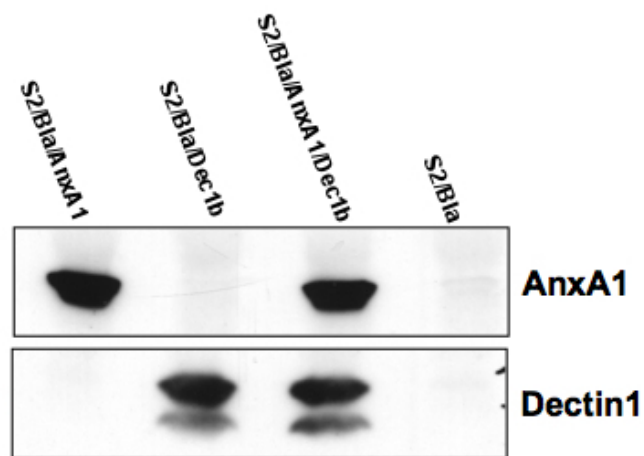
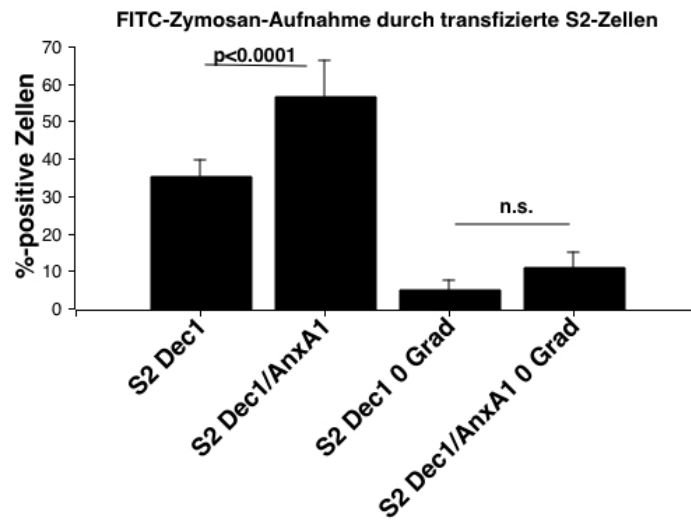
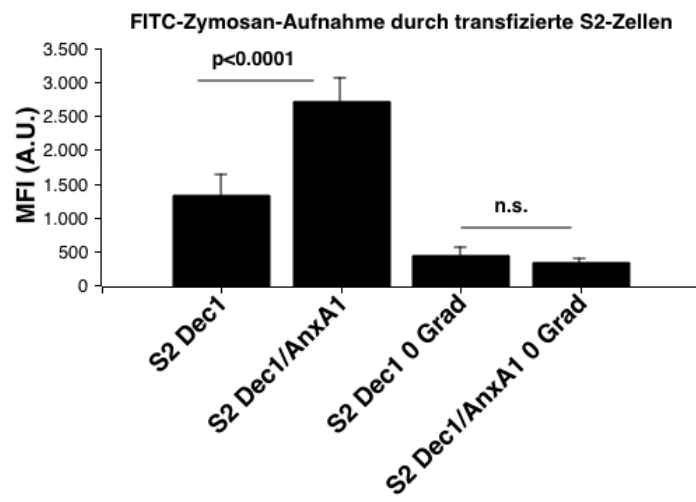


Abbildung 3.4: Dectin- bzw. Annexin 1-Expression von transfizierten Schneider-Zellen. Einfach- und doppelt-transfizierte Schneider-Zellen wurden lysiert und mittels Immunblot auf Expression von Annexin I- und Dectin-1-Expression geprüft.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen



(a)



(b)

Abbildung 3.5: FITC-Zymosan-Aufnahme durch transfizierten Schneider S2-Zellen. (a) zeigt den prozentualen Anteil der Zellen die FITC-Zymosan aufgenommen haben. (b) zeigt die zugehörige MFI der beiden Zellpopulationen. S2-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  FITC-Zymosan für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  oder auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in PBS pH 4.5 + 0.1 % Trypanblau aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die statistische Auswertung wurde mittels t-Test durchgeführt. Die Werte für die FITC-Zymosan-Aufnahme bei  $37^\circ\text{C}$  stammen aus acht Experimenten. Die Werte für die Aufnahme bei  $0^\circ\text{C}$  stammen aus drei Experimenten.

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

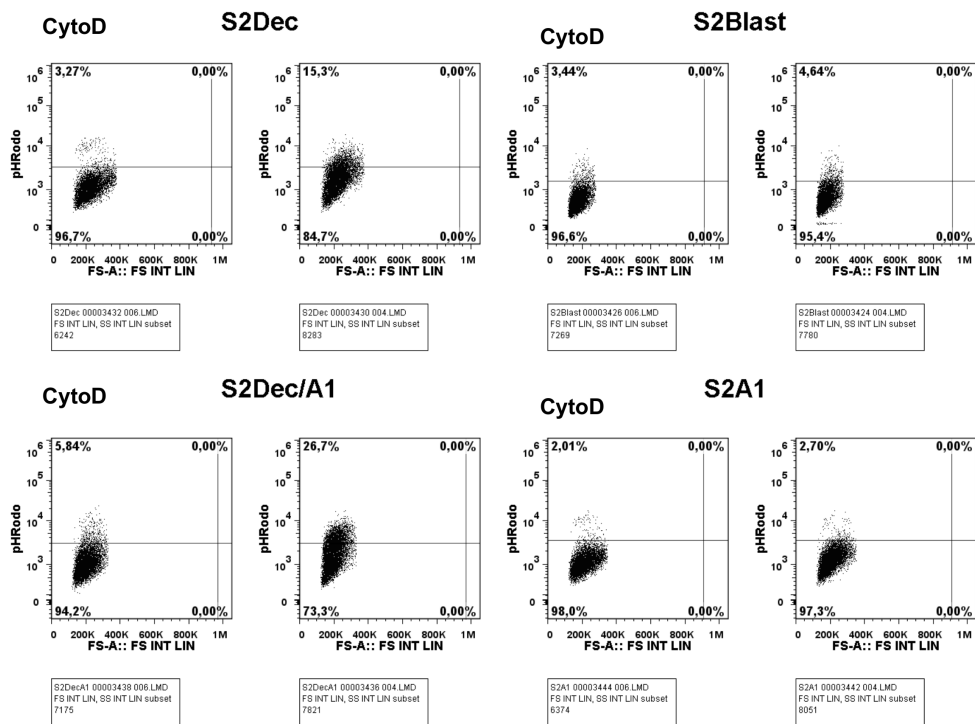


Abbildung 3.6: Aufnahme von pHRodo-Zymosan durch transfizierte Schneider Zellen. Schneider Zellen wurden wie beschrieben für 2 Stunden mit pHRodo-Zymosan inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

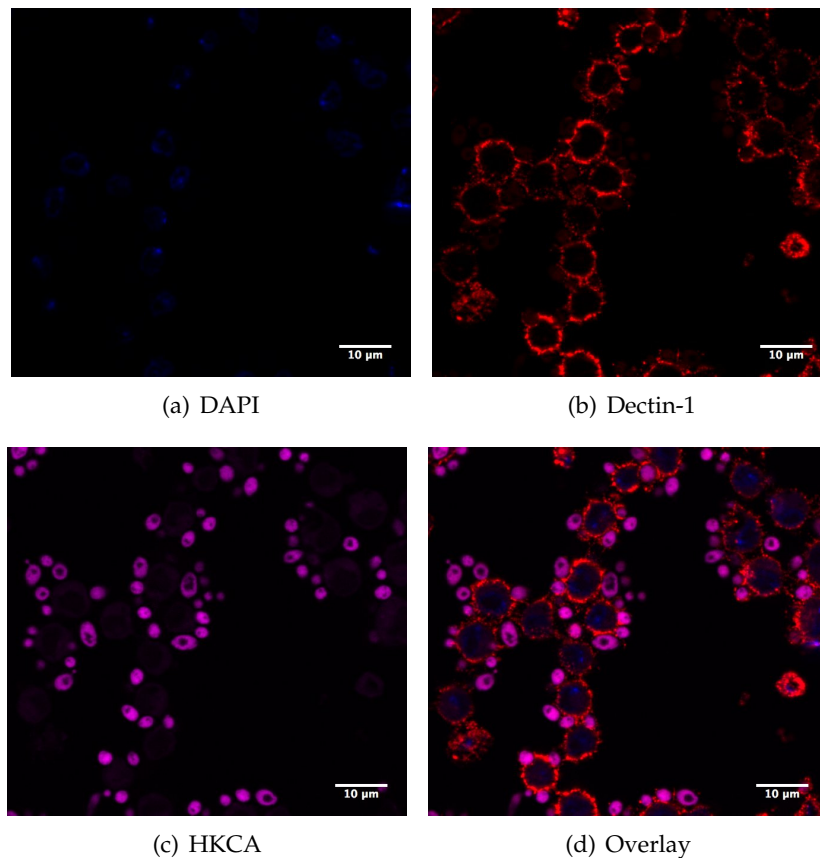


Abbildung 3.7: HKCA-Aufnahme durch transfizierte Schneider (S2) Zellen. Dectin-1 transfizierte Schneider (S2) Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Dectin-1 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein passender DyLight 594-konjugierte Zweitantikörper (Rot) zugegeben. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.



### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

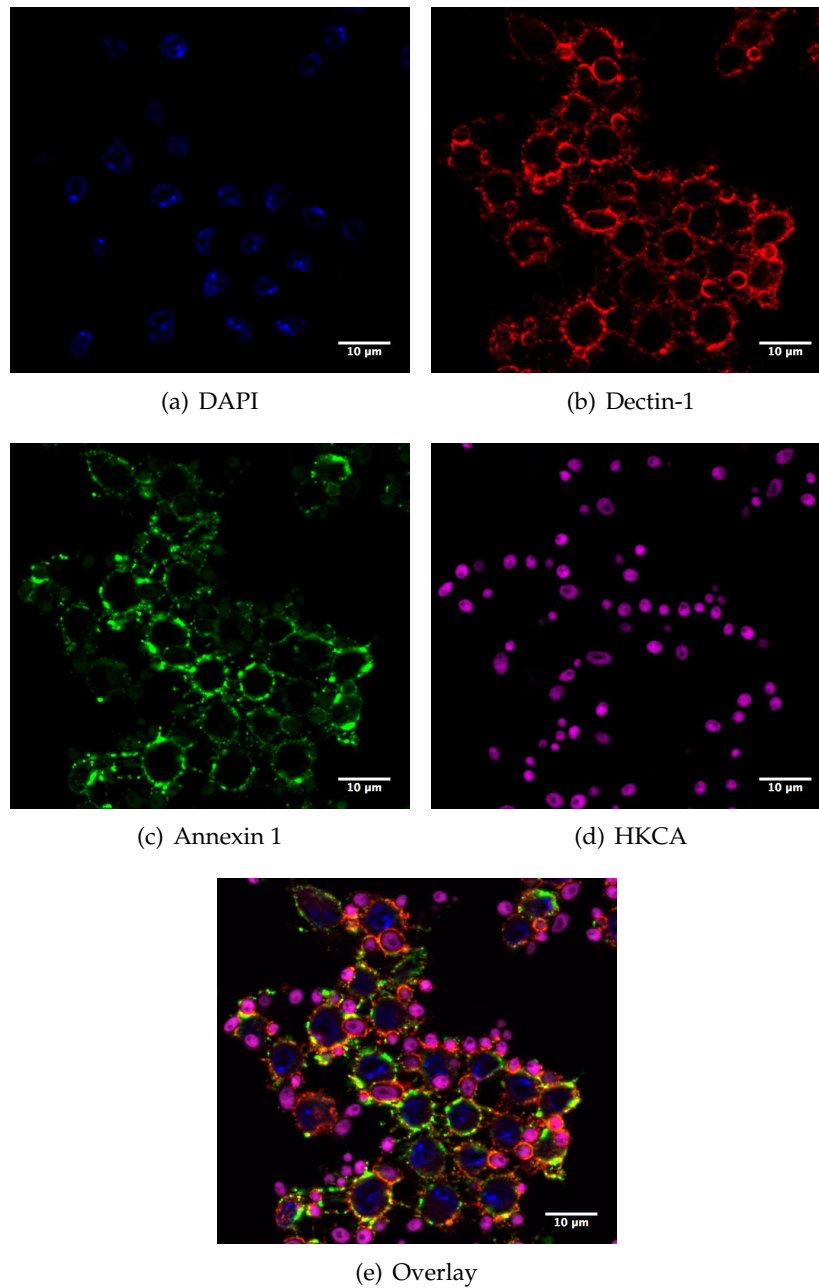
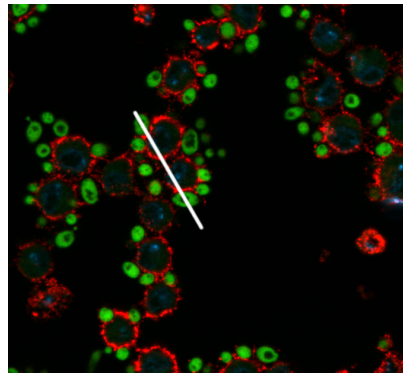
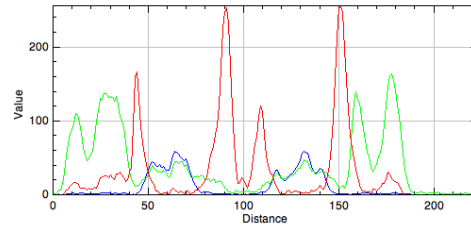


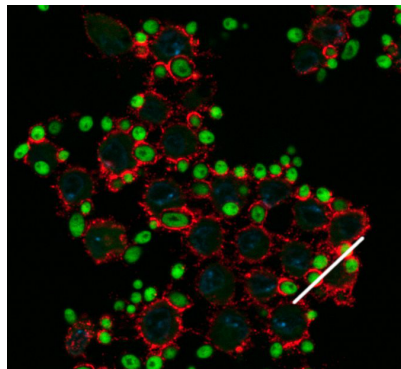
Abbildung 3.8: HKCA-Aufnahme durch transfizierte Schneider (S2) Zellen. Dectin1 und Annexin 1 transfizierte Schneider (S2) Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Dectin-1 und Annexin 1 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden passende DyLight 594(Rot)/650(Grün)-konjugierte Zweitantikörper zugegeben. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.



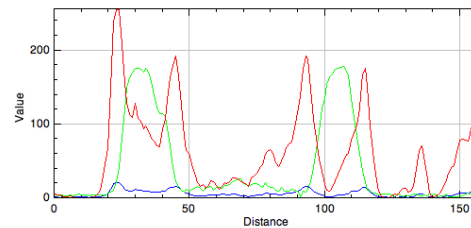
(a) Dectin-1+



(b) Dectin-1+



(c) Dectin-1+/Annexin 1+



(d) Dectin-1+/Annexin 1+

Abbildung 3.9: Analyse phagosomaler Strukturen von einfach- und doppelt-transfizierten Schneider Zellen. Repräsentative Phagosomen wurden mit Hilfe der Software *FIJI* analysiert (weiße Linie). Das Farbprofil links zeigt die Intensität der Dectin-1 Färbung nach Inkubation mit HKCA. (a)/(b): Dectin-1 transfizierte Schneider Zellen. (c)/(d): Dectin-1/Annexin 1 transfizierte Schneider Zellen.

### **3.2 Annexin 1-knockout in Dectin-1-transfizierten Hek293-Zellen reduziert die Aufnahme von FITC-Zymosan**

Um auch in Hek293-Zellen einen Zusammenhang zwischen Annexin-1 Expression und Aufnahme von Dectin-1-Agonisten zu untersuchen, wurde das Annexin 1-kodierende Gen in der monoklonale Dectin-1 exprimierende Hek293-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9 ausgeschaltet. Die Expression von Annexin 1 in Hek293/Dectin1+ wurde nach Selektion mit Puromycin mittels Immunblot überprüft (Abbildung 3.10)

Die Expression von Dectin-1 auf der Zelloberfläche nach erfolgtem Annexin 1 *knockout* wurde überprüft. Das Abschalten des Annexin 1 Gens in Hek293-Zellen führte zu keiner veränderten Expression von Dectin-1 auf der Oberfläche von Hek293-Zellen (Abbildung 3.11).

Da in Schneider (S2) Zellen gezeigt werden konnte, dass Annexin 1 eine Rolle bei der Aufnahme von beta-Glukanen durch Dectin-1 zu spielen scheint, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob der *knockout* von Annexin 1 in Dectin-1 transfizierten Hek293 eine Veränderung der Zymosan-Aufnahme bewirkt.

Abbildung 3.12 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte MFI von Dectin-1 exprimierenden Hek293-Zellen nach 30 min Inkubation mit FITC-Zymosan. Es wurde ein signifikanter Unterschied bei der Aufnahme durch Zellen die Annexin 1 exprimieren und den Annexin 1-defizienten Zellen festgestellt.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

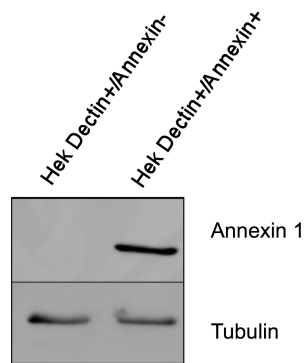


Abbildung 3.10: Annexin 1-*knockout* in Dectin-1 exprimierenden Hek293 Zellen. Dectin-1-transfizierte Hek293 Zellen wurden mit einem einem Annexin 1 CRISPR/Cas9 *knockout*-Plasmid und einem Annexin 1 HDR-Plasmid wie im Methodenteil beschrieben transfiziert und mittels Puromycin selektiert. Dargestellt ist ein Immunblot bei dem auf Expression von Annexin 1 und Tubulin geprüft wurde.

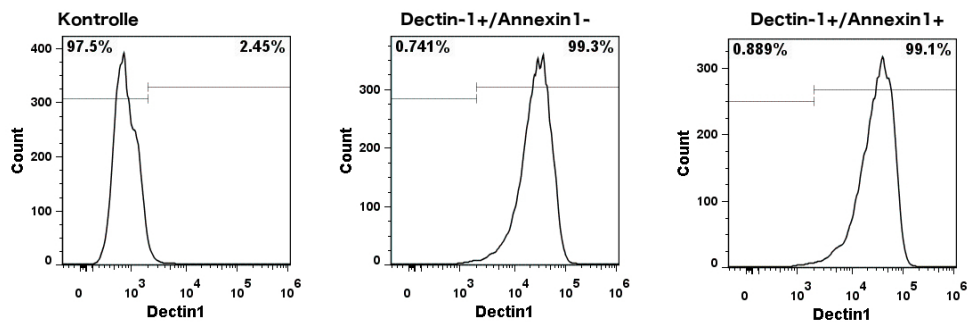


Abbildung 3.11: Dectin-1 Expression auf der Oberfläche von Dectin-1 transfizierten Hek293 Zellen vor und nach Annexin 1-*knockout*. Als Kontrolle wurden mit Leervektor transfizierte Hek293-Zellen verwendet. Alle Zelltypen wurden für 30 min mit anti-Dectin-1 PE Antikörper inkubiert.

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

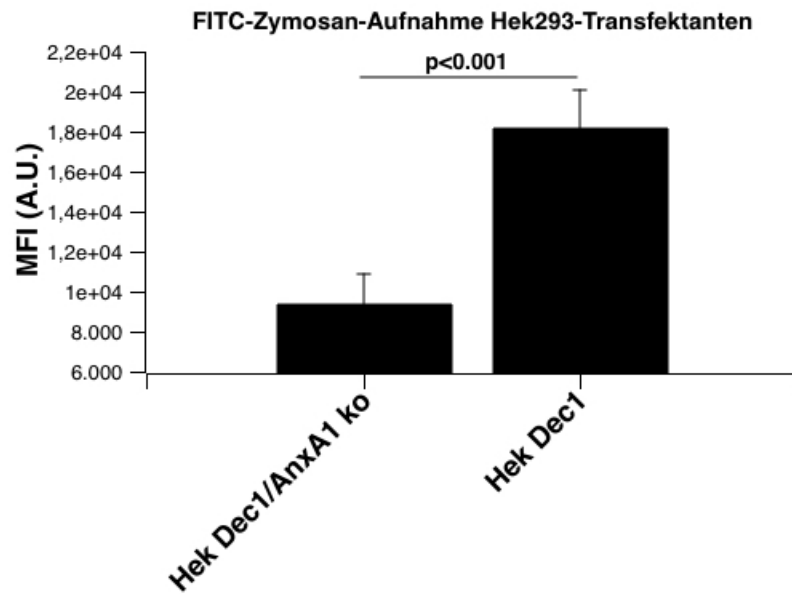


Abbildung 3.12: FITC-Zymosan-Aufnahme von Dectin-1-transfizierten Hek293-Zellen vor und nach Annexin 1-knockout. Nach Annexin 1-knockout mittels Crispr/Cas9-Plasmid wurden die Zellen für 30 min mit  $5 \mu\text{g/ml}$  FITC-Zymosan inkubiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus vier Experimenten.

### Syk wird nach Stimulation mit beta-Glukanen in Dectin-1 transfizierten Hek293 Zellen phosphoryliert

Als nächstes wurde die Phosphorylierung der Kinase Syk nach Stimulation von Dectin-1 auf transfizierten Hek293-Zellen untersucht. Zur Stimulation wurden die Dectin-1 Agonisten Zymosan, HKCA und Curdlan verwendet. Der Immunblot in Abbildung 3.13 zeigt die Phosphorylierung von Syk an den Tyrosinen 525 und 526 nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit den angegebenen Liganden. HKCA und Zymosan lösten eine starke Phosphorylierung von Syk aus. Die Phosphorylierung durch Curdlan fiel geringer aus. Vermutlich aufgrund des geringeren Zell zu Partikel Verhältnisses durch die vergleichsweise großen Curdlan-Partikel. Es bestand kein Unterschied zwischen Annexin 1 exprimierenden und Annexin 1 defizienten Zellen.

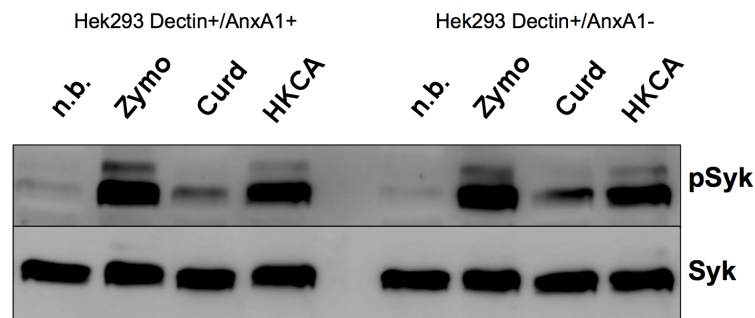


Abbildung 3.13: Syk-Phosphorylierung an den Tyrosinen 525 und 526 in transfizierten Hek293-Zellen nach Stimulation mit Curdlan, HKCA und Zymosan vor und nach Annexin 1 *knockout*. Dectin-1-tranfizierte Hek293-Zellen wurden 30 min mit 100  $\mu$ g Zymosan/Curdlan oder  $1 \times 10^7$  HKCA inkubiert, lysiert und mittels Immunblot auf Phosphorylierung der Kinase Syk geprüft.

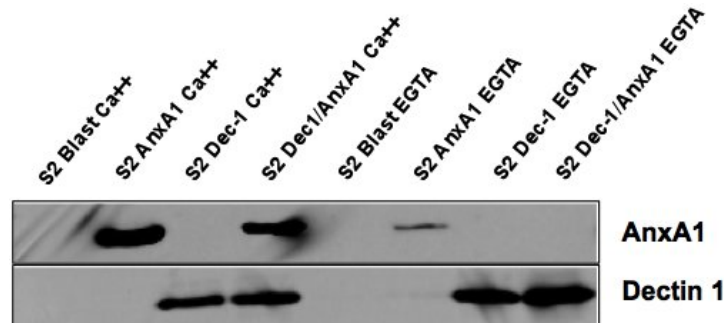
### 3.3 Annexin I bindet Calcium-abhängig und Dectin-1-unabhängig an Zymosan- und HKCA-Partikel

Eine direkte Bindung von Annexin 1 an *C. albicans* wurde bereits in der Literatur beschrieben. Annexin 1 sorgt auf Epithelzellen der Mundschleimhaut für eine Verringerung des Wachstums von *C. albicans* (Lilly u. a., 2010). Annexin 1 besitzt mehrere Calcium-bindende Domänen, die die Bindung an verschiedene Liganden beeinflussen.

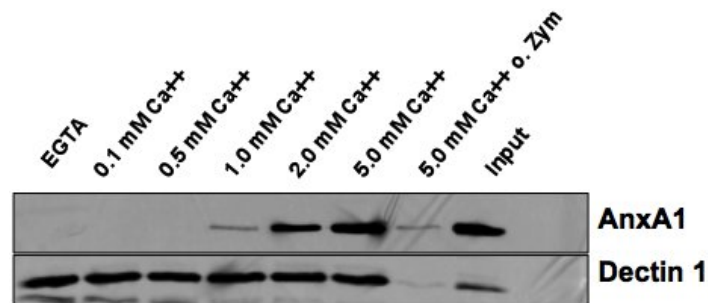
Um zu überprüfen, ob Annexin 1 *in vitro* an Zymosan-Partikel bindet, wurden native Lysate von mit Annexin 1 und/oder Dectin-1 transfizierten Schneider (S2) Zellen angefertigt und zusammen mit Zymosan inkubiert.

Nach mehren Waschschrinen wurden die an Zymosan gebundenen Proteine mit 1X SDS-PAGE Probenpuffer eluiert, denaturiert/reduziert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und dann mittels Immunblot auf Vorhandensein von Dectin-1 und Annexin 1 in den Eluatn getestet. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, wurde Annexin 1 unabhängig von der Koexpression von Dectin-1 an Zymosan gebunden (Abbildung 3.14a). Die Konzentration von Calciumionen im Puffer war dabei entscheidend, ob Annexin 1 an Zymosan binden konnten (Abbildung 3.14b). Mindestens 1 mM Calciumchlorid im Puffer war nötig, um eine Bindung von Annexin 1 an Zymosan nachweisen zu können. EGTA, ein Calcium Chelator, verhinderte die Bindung von Annexin 1 an Zymosan. Die Bindung von Dectin-1 an Zymosan war Calcium-unabhängig.

Wurden statt Zymosan hitze-inaktivierte *C. albicans* (HKCA) verwendet, war das Ergebnis der Präzipitationsexperimente vergleichbar (Abbildung 3.15). In doppelt-transfizierten Zellen konnte allerdings erst ab einer Konzentration von 5 mM Calciumchlorid eine deutliche Bindung von Annexin 1 an hitze-inaktivierte *C. albicans* nachgewiesen werden. Auch Dectin-1 hat bei erhöhter Calcium-Konzentration verstärkt an hitze-inaktivierte *C. albicans* gebunden.



(a)



(b)

Abbildung 3.14: Direkte Bindung von Dectin-1 und Annexin 1 an Zymosan-Partikel in Abhängigkeit von Calcium-Ionen. Lysate von Annexin 1- und Dectin-1-transfizierten Schneider S2 Zellen sowie Kontrollzellen (S2 Blast) wurden wie beschrieben mit Zymosan inkubiert. (a) zeigt die Bindung bei Vorhandensein von Calcium-Ionen (2 mM) von Annexin 1 an Zymosan-Partikel unabhängig von Dectin. EGTA (5 mM) verringert oder verhindert die Bindung von Annexin 1. (b) steigende Konzentrationen von Calcium-Ionen erhöhen die Bindung von Annexin 1 an Zymosan. Dectin-1 bleibt davon unberührt. Eine Probe wurde ohne Zugabe von Zymosan bearbeitet um zu zeigen, dass es sich nicht um Präzipitationseffekte der Proteine nach Zugabe von Calcium handelt. Die Gelspur mit der Bezeichnung *Input* zeigt den Nachweis von Dectin-1 und Annexin 1 aus 20  $\mu$ l Ursprungslysate bevor es mit Zymosan inkubiert wurde.



3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

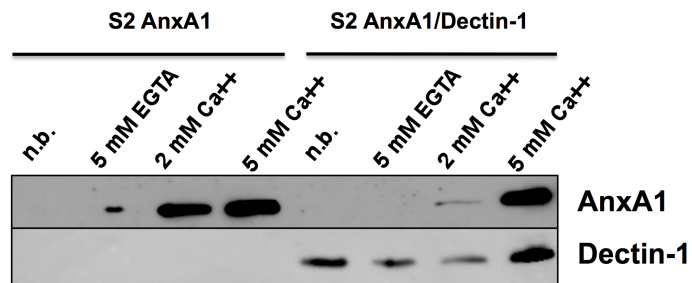


Abbildung 3.15: Direkte Bindung von Dectin-1 und Annexin 1 an hitze-inaktivierte *C. albicans* in Abhängigkeit von Calcium-Ionen. Die Durchführung erfolgte analog zu der Präzipitation mit Zymosan. Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^7$  hitze-inaktivierte *C. albicans* mit den Lysaten inkubiert.

### **3.4 Bei der Aufnahme von beta-Glukanen durch dendritische Zellen zeigt sich eine Kolokalisation von Dectin-1 und Annexin 1 auf phagosomalen Membranen**

Nachdem ein Einfluss auf die Aufnahme von Dectin-1-Agonisten durch Annexin in zwei Transfektionsmodellen nachgewiesen werden konnte, wurden dendritische Zellen mit hitze-inaktivierten *C. albicans* (HKCA) stimuliert und mittels Immunzytochemie auf Annexin 1 und Dectin-1 untersucht (Abbildung 3.16). Auf phagosomalen Membranen, die HKCA-Partikeln (violett) enthalten, konnte eine Akkumulation von Annexin 1 (grün) und Dectin-1 (rot) beobachtet werden (Abbildung 3.16 und 3.17).

Die Zellen in Abbildung 3.16 wurden für 30 min mit HKCA inkubiert. In Abbildung 3.17 wurden die dendritischen Zellen für 10 min mit HKCA stimuliert um frühe phagosomale Strukturen zu untersuchen. In (a) bis (c) der Abbildung sind die Fluoreszenz von Dectin-1, Annexin 1 und ein *Overlay* der Fluoreszenz von Dectin-1, Annexin 1, DAPI und HKCA zu sehen. Abbildung 3.17e zeigt das Intensitätsprofil der Dectin-1 und Annexin 1 Fluoreszenz an ausgewählten phagosomalen Strukturen (weiße Linie). Auf allen hier untersuchten repräsentativen Strukturen konnte eine Kolokalisation in vergleichbarer Intensität von Annexin 1 und Dectin-1 beobachtet werden.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

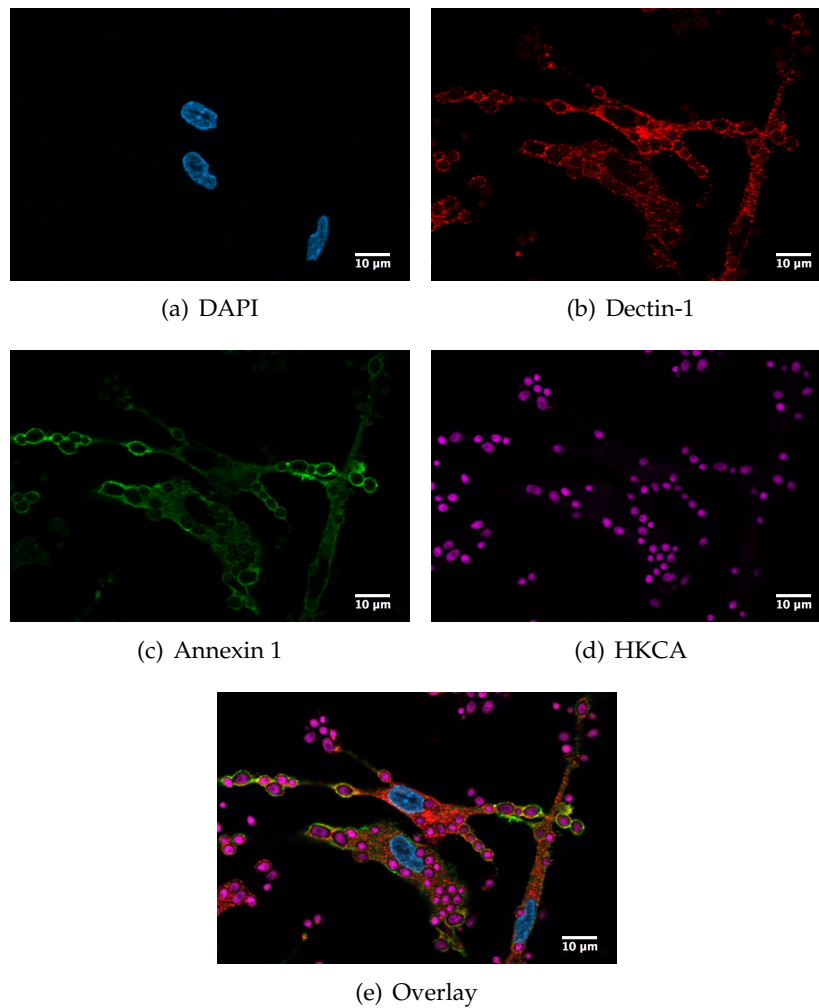


Abbildung 3.16: Lokalisation von Annexin 1 (grün) und Dectin-1(rot) auf phagosomalen Membranen. Dendritische Zellen wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF aus Monozyten generiert. Nach Stimulation für 15 min mit HKCA-Partikeln wurden die dendritischen Zellen fixiert, permeabilisiert, mit 10 % Esel-Serum geblockt und anschließend mit anti-Dectin-1 und anti-Annexin 1 Antikörpern inkubiert. Danach wurden die Zellen mit anti-Maus IgG DyLight 593 und anti-Ziege IgG DyLight 650 inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. HKCA-Partikel haben eine Autofluoreszenz im FITC-Kanal (violett).

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

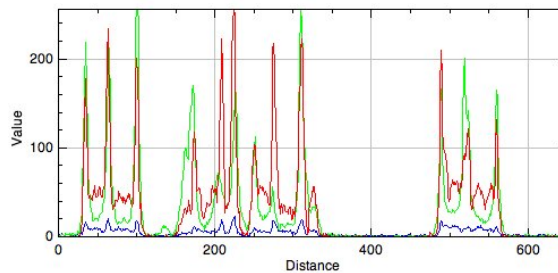
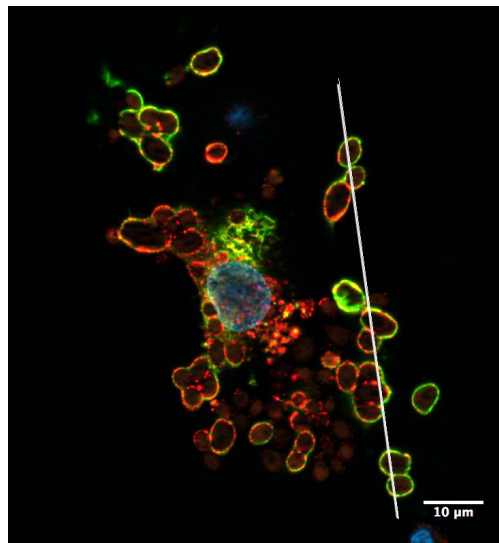
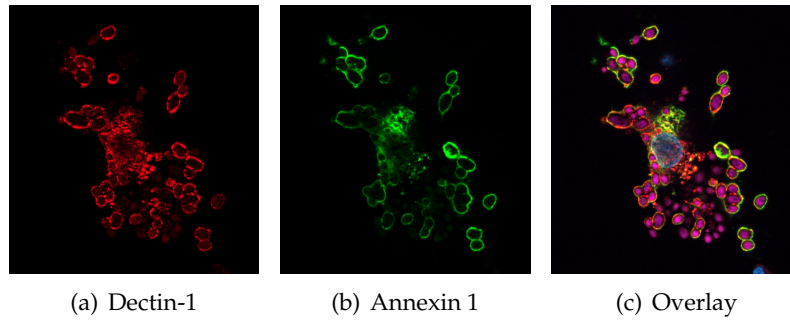


Abbildung 3.17: Lokalisation von Annexin 1 (grün) und Dectin-1(rot) von DC auf phagosomalen Membranen nach Inkubation mit HKCA (pink). (c) zeigt das Intensitätsprofil von Annexin 1 und Dectin-1 auf ausgewählten (weiße Linie) phagosomalen Strukturen.

### 3.5 Klonierung und Expression der rekombinanten, extrazellulären Domäne von Dectin-1

Da Annexin-1 auf apoptotischen Zellen externalisiert wird und dort als *Eat-me*-Signal fungiert (Weyd u. a., 2013; Blume u. a., 2009), sollte untersucht werden, ob Dectin-1 Annexin 1 auf apoptotischen Zellen binden kann. Dazu wurde die extrazelluläre Domäne wie im Methodenteil beschrieben in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nachfolgend sind zunächst die Ergebnisse der Expression und Aufreinigung gezeigt.

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Dectin-1-Domänen gestaltete sich zunächst als schwierig. Eine native Aufarbeitung des Proteins war nur in sehr geringen Ausbeuten möglich. Die Rückfaltung des denaturierten Proteins erwies sich als die bessere Option.

In Abbildung 3.18 ist ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel auf das verschiedene Mengen einer Aufarbeitung der beiden Dectin-1 ECDs abgebildet. ECD 1 bezieht sich auf die extrazelluläre Domäne inklusive *Stalk*-Region und ECD 2 auf die extrazelluläre Domäne ohne *Stalk*-Region

Die erhaltene Reinheit ist unter der Berücksichtigung der vorhandenen Laborausstattung als gut zu bezeichnen. Verunreinigungen kamen auf dem Coomassie-gefärbtem Gel erst bei hohen Mengen ECD 1 oder ECD 2 zum Vorschein. Beide rekombinanten Proteine wanderten in der SDS-PAGE in etwa auf der Höhe des zu erwartenden Molekulargewichts. Die ECD 1 erschien bei ca. 24 kDa und die ECD 2 bei ca. 14 kDa.

Das nötige Rückfalten der denaturierten Proteine führte während der Aufreinigung zu größeren Verlusten zwischen den verschiedenen Dialyse-Schritten. Die Ausbeute pro 500 ml *E. coli*-Kultur bewegte sich trotz dieser Verluste im Milligramm-Bereich.

Zur Kontrolle der Aktivität der extrazellulären Domäne wurden Bindungsstudien an beta-Glukan-Partikeln durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die rekombinante ECD in der Lage ist an beta-Glukan-Partikel zu binden. Als Kontrolle wurde ein ebenfalls in *E. coli* aufgereinigtes Kontrollprotein (5xHis-DHFR) verwendet, welches nicht an beta-Glukan-Partikel bindet. In Abbildung 3.19 sind zwei repräsentative Histogramme durchflusszytometrischer Messungen zu sehen.

Während die rekombinante Dectin-1-ECD an Zymosan-Partikel gebunden hat, konnte für das DHFR-Kontrollprotein keine Bindung an Zymosan nachgewiesen werden (Abbildung 3.19b). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Inkubation von Zymosan-Partikeln nur mit Erst- und Zweitantikörper (Abbildung 3.19a) beobachtet. Die rekombinante ECD schien somit in aktiver Konformation vorzuliegen und war in der Lage Zymosan zu binden.

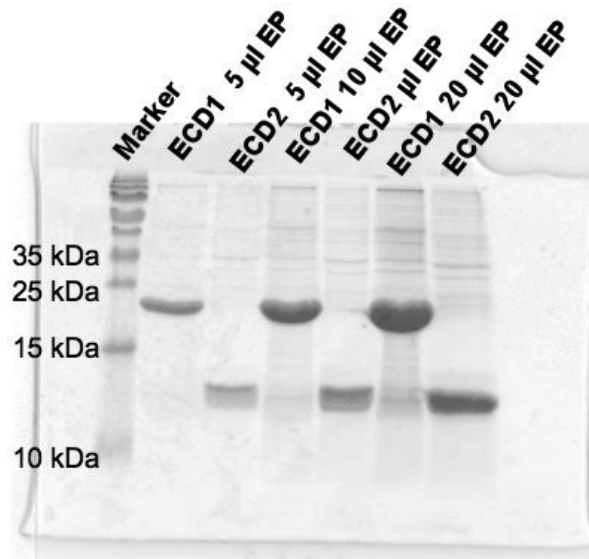


Abbildung 3.18: Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes Polyacrylamid-Gel mit verschiedenen Mengen beider Dectin-1-ECDs. Die Proben wurden vor der endgültigen Aufkonzentrierung auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und analysiert. Ganz links ist ein Proteingrößenmarker aufgetragen (170 bis 10 kDa)

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen

---

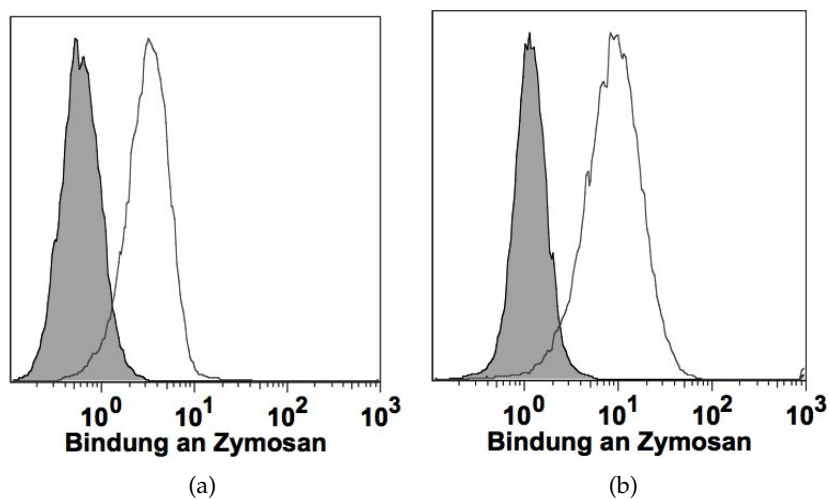


Abbildung 3.19: Bindung von rekombinanter Dectin-1-ECD an Zymosan-Partikel. Alle Inkubationsschritte wurden bei 4 °C für 1 h (ECD/DHFR) oder 30 min (Antikörper) durchgeführt. **(a)**: geschlossenes Histogramm: Zymosan + anti-PolyHis + anti Maus-IgG1-APC, offenes Histogramm: Zymosan + Dectin-1-ECD + anti-PolyHis + anti-Maus IgG1-APC; **(b)**: geschlossenes Histogramm: Zymosan + 5xHis-DHFR + anti-PolyHis + anti Maus-IgG1-APC, offenes Histogramm: Zymosan + Dectin-1-ECD + anti-PolyHis + anti-Maus IgG1 APC

### 3.6 Die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 bindet an geschädigte Zellen

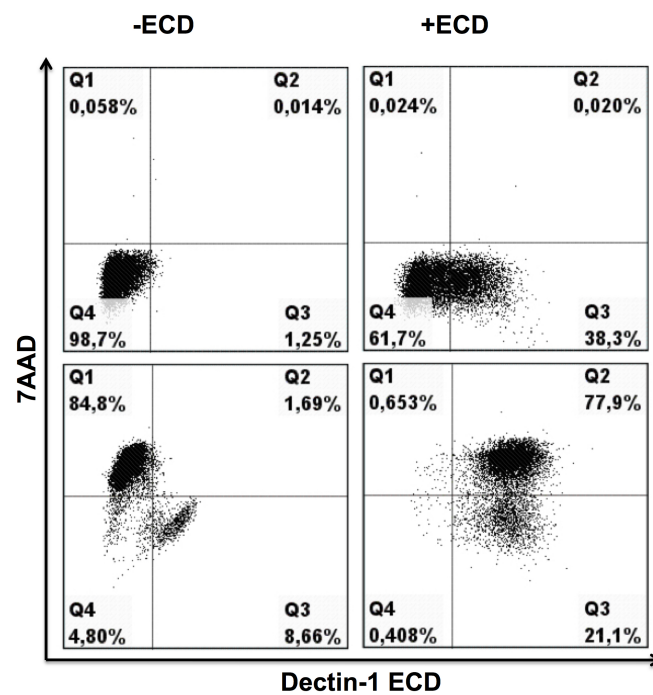
Als nächstes wurde die Bindung von Dectin-1 an geschädigte Zellen untersucht. Dazu wurden Jurkat Zellen mit 5  $\mu$ M Staurosporin behandelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann nacheinander mit extrazellulärer Dectin-1 Domäne, anti-poly-Histidin Antikörper und anti-Maus IgG1 APC Antikörper inkubiert. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt, um Zellen sichtbar zu machen, die ihre Membranintegrität verloren haben.

Die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 hat an unbehandelte und an mit Staurosporin behandelte, geschädigte Jurkat Zellen (3.20a) gebunden. Die Bindung an 7AAD-positive Jurkat Zellen fiel am stärksten aus.

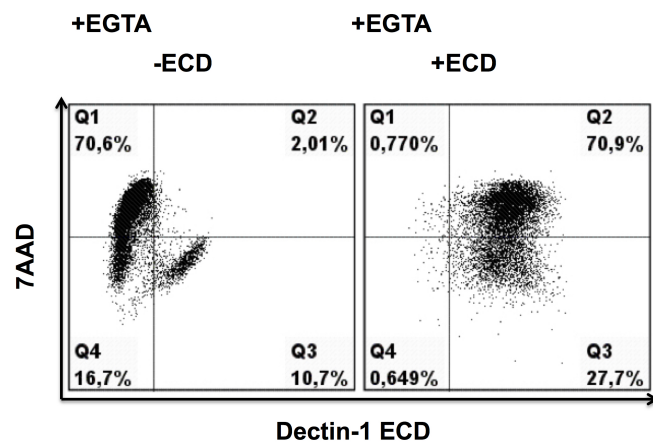
Es wurde gezeigt, dass Annexin-1 durch einen Waschschrift mit EGTA-haltigem Puffer von apoptotischen und nekrotischen Zellen entfernt werden kann (Blume u. a., 2009). Auf die Bindung von Dectin-1 an 7AAD-positive Zellen hatte EGTA keinen Einfluss (Abbildung 3.20b). Dies legt nahe, dass Annexin 1 auf 7AAD-positiven Zellen nicht von Dectin-1 erkannt wird. Bestätigt wurde dies durch Experimente mit Annexin-1 transfizierten Schneider S2 Zellen. Die Dectin-1-ECD hat nicht verstärkt an diese Zellen gebunden, obwohl sie große Mengen Annexin 1 an ihrer Oberfläche exprimierten (nicht gezeigt). *Pull-down*-Versuche und Ko-Immünpräzipitationen zeigten jedoch eine Ko-Elution von Dectin-1 und Annexin 1 (später gezeigt). Welchen Liganden Dectin-1 auf geschädigten Jurkat-Zellen erkennt blieb unklar.



3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen



(a)



(b)

Abbildung 3.20: Bindung der rekombinanten extrazellulären Domäne von Dectin-1 an Jurkat Zellen. Jurkat Zellen wurden mit  $5 \mu\text{M}$  Staurosporin behandelt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. (a) Die Zellen wurden nach Ernte und Waschen mit oder ohne  $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  Dectin-1-ECD für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit anti-poly-Histidin-Antikörper für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Abschließend wurden die Zellen für 30 min mit anti-Mouse IgG1 APC inkubiert. 7AAD wurde vor der durchflusszytometrischen Analyse für 10 min zu den Zellen gegeben. (b) Behandlung mit 5 mM EGTA vor Zellfärbung.

### **3.7 Mit Dectin-1 transfizierte Hek293 nehmen vermehrt geschädigte Zellen auf.**

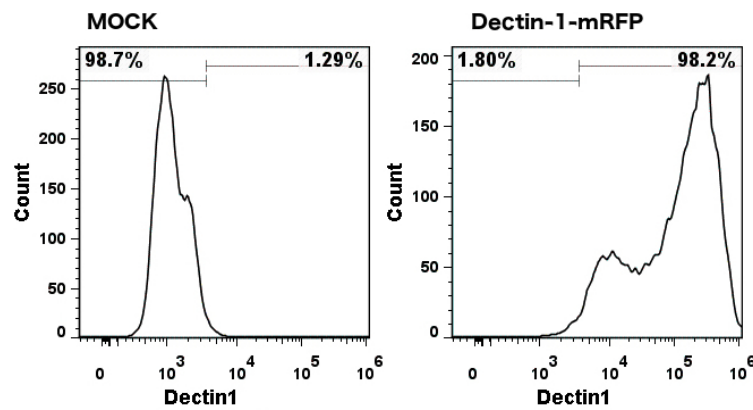
Um weiter zu untersuchen, ob Dectin-1 Liganden auf geschädigten Zellen bindet, wurde ein Dectin-1-mRFP-Fusionsprotein in Hek293 exprimiert. Dazu war ein neuer *reverse*-Primer nötig um mRFP *in frame* mit Dectin-1 exprimieren zu können. Nach Transfektion, Selektion mit G418 und Vereinzelung wurde eine monoklonale Zelllinie erhalten, die Dectin-1-mRFP exprimierten und Dectin-1-Agonisten aufnehmen konnten (Abbildung 3.21). Es ist gut zu erkennen, wie sich Dectin-1-mRFP an die hitzeinaktivierten *C. albicans* Partikel anlagerte und eine Aufnahme ins Zellinnere vermittelte.

Zur weiteren Untersuchung wurden Dectin-1-mRFP exprimierende Hek293 zusammen mit CMFDA-gefärbten, geschädigten Jurkat Zellen inkubiert. Die Analyse nach 4 h Kokultur erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 3.22a) und Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 3.22b). Dectin-1-mRFP-transfizierte Hek293 nahmen etwas mehr CMFDA-gefärbte Jurkat Zellen auf als Kontrollzellen. Hek293 können geschädigte Zellen über das  $\alpha V\beta 5$ -Integrin aufnehmen (Albert u. a., 2000). Durch Dectin-1 kommt es zu einer leichten, aber signifikanten Zunahme der Aufnahme von CMFDA-gefärbten Jurkat Zellen. Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die Aufnahme von Bestandteilen der gefärbten Zellen durch Hek293. Eine verstärkte Anlagerung von Dectin-1-mRFP an geschädigte Jurkat Zellen konnte nicht beobachtet werden.

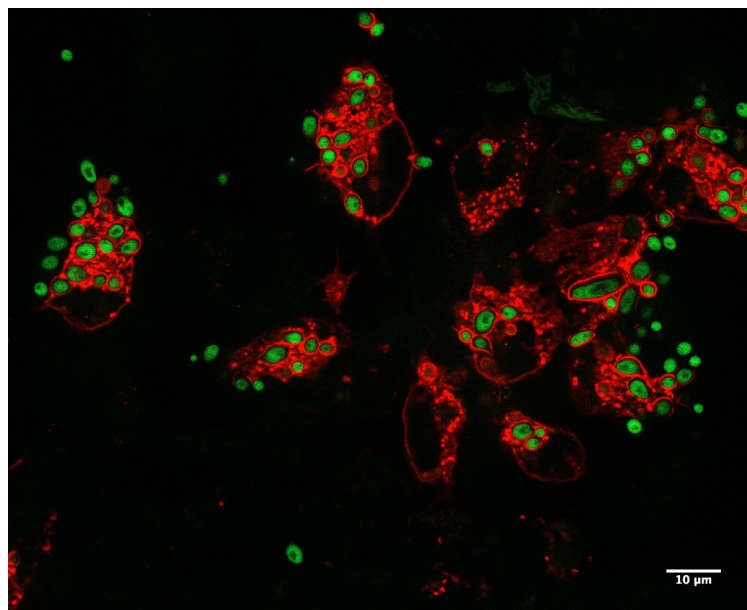
### **3.8 Ko-Immunpräzipitation von Annexin 1 und Dectin-1 aus Schneider S2 Zelllysaten**

Um eine direkte Interaktion von Dectin-1 und Annexin 1 feststellen zu können wurden Zelllysate aus doppelt- und einfach-transfizierten Schneider S2 Zellen hergestellt und für Immunpräzipitationen verwendet. Dectin-1 Antikörper wurden an eine magnetische Protein G-Matrix gebunden und mit Zelllysaten von Dectin-1- und Dectin-1/Annexin 1-transfizierten inkubiert. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Protein G-Matrix drei Mal mit Lysepuffer gewaschen. Danach wurden die verbliebenen Proteine mit 1X SDS-PAGE Puffer

3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen



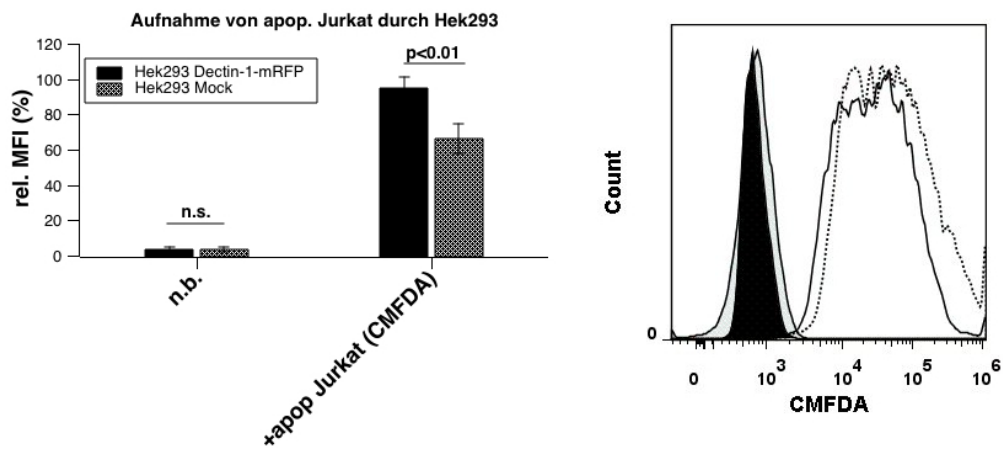
(a)



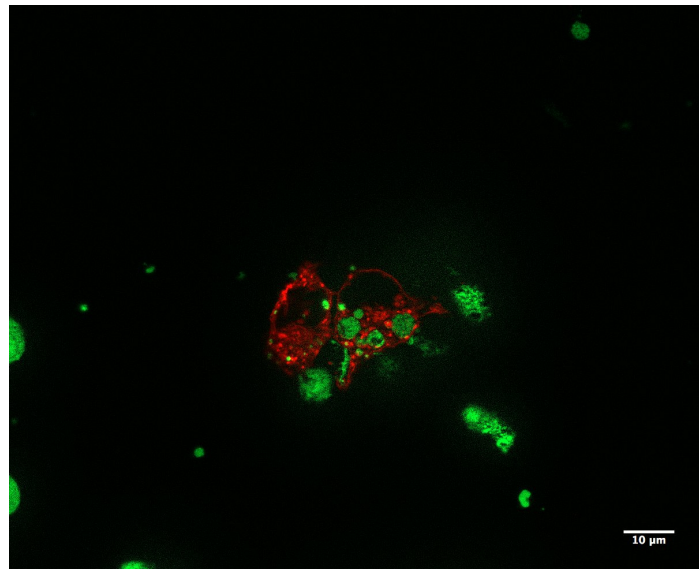
(b)

Abbildung 3.21: Oberflächenexpression von Dectin-1-mRFP (a) und Aufnahme von hitzeinaktivierten *C. albicans* (b) durch transfizierte Hek293. (a) Mit Dectin-1-mRFP transfizierte und mit Leervektor (Mock) transfizierte Hek293 Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit 1 μg anti-Dectin-1 Antikörper und dann mit 5 μl anti-Ziege IgG DyLight 488 inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. (b) Dectin-1-mRFP exprimierende Hek293 wurden auf Poly-L-Lysine *gecoateten* Deckgläsern ausgesät und für 30 min mit 1x10<sup>6</sup> hitzeinaktivierten *C. albicans* stimuliert, fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Gezeigt ist eine Ebene eines Z-Stapels. Rot: Dectin-1-mRFP; Grün: hitzeinaktivierte *C. albicans*.

### 3 Ergebnisse Teil I: Untersuchungen zur Interaktion von Dectin-1 mit Annexin 1 und geschädigten Zellen



(a)



(b)

Abbildung 3.22: Aufnahme von geschädigten, CMFDA-gefärbten Jurkat Zellen durch Dectin-1-mRFP-transfizierte Hek293. Hek293 Zellen wurden für 4 h 1:5 mit CMFDA-gefärbten Jurkat Zellen bei 37 °C inkubiert und dann durchflusszytometrisch analysiert(a, links). Die Histogramme repräsentieren nicht-behandelte Kontrollproben (geschlossen) und mit CMFDA<sup>+</sup>-Jurkat Zellen behandelte Zellen (gepunktet: Hek293 Dectin-1-mRFP; durchgehend: Hek293 Mock). (b) zeigt fixierte Hek293 die Dectin-1-mRFP exprimieren und für 4 h auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen zusammen mit CMFDA<sup>+</sup>-Jurkat Zellen inkubiert wurden. Das Bild zeigt eine einzelne Ebene eines Z-Stapels. Rot: Dectin-1mRFP, Grün: CMFDA<sup>+</sup>-Jurkat Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 4 Experimenten. p-Werte wurden mit Hilfe des t-Tests ermittelt.

eluiert. Das Eluat wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrozellulose wurde zuerst auf Annexin 1 und dann auf Dectin-1 im Eluat getestet (Abbildung 3.23). Eine Bande bei etwa 36 kDa taucht in der Spur auf, auf der die Proteine des Eluats von Lysaten aus doppelt-transfizierten Zellen aufgetrennt wurde. Diese Bande repräsentiert Annexin 1. Weitere Banden bei etwa 55 kDa und 25 kDa repräsentieren die schwere und leichte Kette des anti-Dectin-1 Antikörpers. Der Test auf Dectin-1 zeigt in beiden Spuren eine Bande bei etwa 22 kDa die Dectin-1 repräsentiert. Die Bande unterhalb der leichten Kette ist möglicherweise eine glykosylierte Form von Dectin-1. Auch schwere und leichte Kette des anti-Dectin-1 Antikörpers sind hier zu sehen.

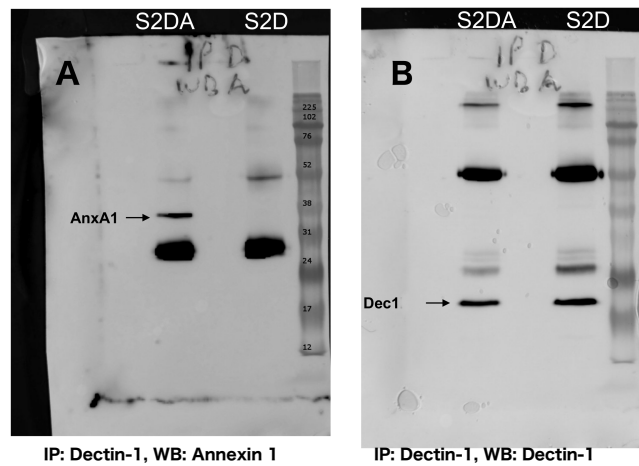


Abbildung 3.23: Co-Immunpräzipitation von Dectin-1 und Annexin 1 aus Lysaten transfizierter Schneider (S2) Zellen. Lysate von doppelt (S2DA)- und einfach (S2D) transfizierten Schneider (S2) Zellen wurden mit Anti-Dectin-1 Antikörpern die zuvor an Protein G Kügelchen gebunden worden sind über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden nach drei Waschschrinen mit 1x Probenpuffer eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und dann auf Nitrocellulose transferiert. Es folgte die Detektion von (A) Annexin 1 (Anx 1) und (B) Dectin-1 auf der Nitrocellulose mittels Antikörpern gegen Dectin-1/Annexin 1 und den passenden HRP-konjugierten Zweitantikörpern. l.c.: *light chain*; h.c.: *heavy chain*

## 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

Dectin-1 ist der wichtigste beta-Glukan Rezeptor auf Zellen des Immunsystems. In der Einleitung dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Dectin-1 für die angeborene und adaptive Immunantwort beschrieben. Erste Versuche zeigten, dass Dectin-1 auf tolerogenen dendritischen Zellen (IL-10- und Dexamethason-induziert) verstärkt exprimiert wurde. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der erhöhten Anfälligkeit für *Candida*-Infektionen von Patienten die mit Dexamethason behandelt werden von Interesse.

Durch die Fähigkeit von Dectin-1 alle Teile des adaptiven Immunsystems zu aktivieren, ist Dectin-1 ein interessantes Ziel für zellbasierte Vakzinierungen. In diesem Teil der Arbeit wurde Dectin-1 und seine in diesen Zellen vermittelte Signalweiterleitung detailliert untersucht.

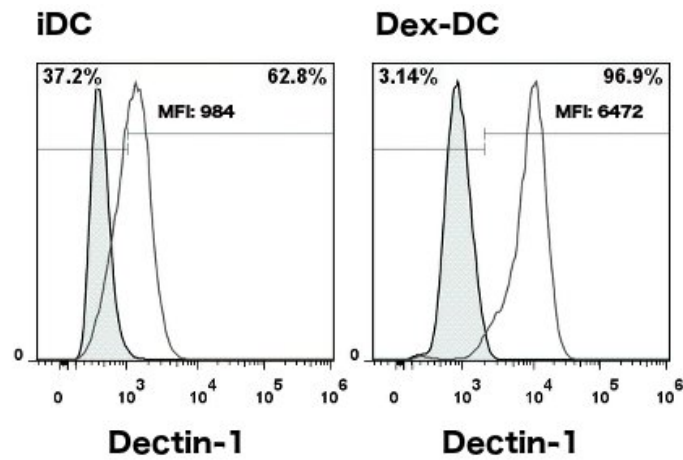
### 4.1 Differentielle Expression von Oberflächenmarkern auf iDC und Dex-DC

Nach Differenzierung Dexamethason-induzierter tolerogener dendritischer Zellen (Dex-DC) aus Monozyten, welche aus *buffy-coats* gesunder Spender isoliert wurden, wurden die Oberflächenmarker dieser Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Als Vergleich dienten mittels IL-4 und GM-CSF generierte dendritische Zellen des selben Spenders. Nach Abschluss der Differenzierung ähnelte die Morphologie von Dex-DC augenscheinlich den von gewöhnlichen *in vitro* generierten dendritischen Zellen.

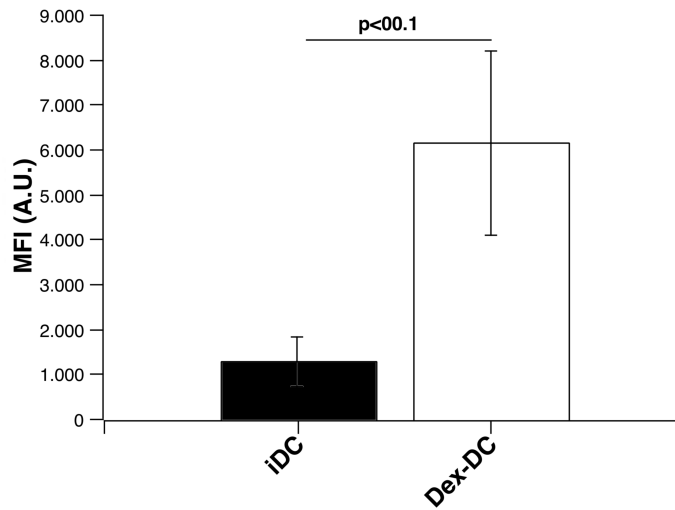
Im Folgenden wird die Expression einiger Oberflächenmarker direkt nach Abschluss der Differenzierung und in einigen Fällen nach Stimulation der beiden DC-Populationen mit beta-Glukanen analysiert und präsentiert.

#### **4.1.1 Die Dectin-1-Expression ist auf der Oberfläche von Dex-DC signifikant erhöht**

Dex-DC und iDC wurden nach ihrer Differenzierung im Durchflusszytometer auf Expression des beta-Glukan-Rezeptors Dectin-1 auf ihrer Oberfläche untersucht. In Abbildung 4.1a ist ein repräsentatives Histogramm der Oberflächenexpression von Dectin-1 auf iDC und Dex-DC gezeigt. In Abbildung 4.1b ist die durchflusszytometrisch ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf beiden Zelltypen als Balkendiagramm dargestellt. Die ermittelten Werte stammen aus sieben unabhängigen Experimenten von sieben unterschiedlichen Spendern. Die MFI der Isotypkontrolle wurde bei Angabe der MFI von der MFI der Probe abgezogen.



(a)



(b)

Abbildung 4.1: Expression von Dectin-1 auf der Zelloberfläche von iDC und Dex-DC. (a) repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von Dectin-1 auf iDC und Dex-DC mit Angabe der MFI. (b) Dectin-1 Expression auf der Oberfläche von iDC und Dex-DC mehrerer Spender. Dargestellt ist die MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus sieben unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt.



#### **4.1.2 Stimulation mit beta-Glukanen induziert keine Hochregulation kostimulatorischer Proteine auf Dex-DC**

Werden dendritische Zellen mit beta-Glukanen stimuliert, wird durch Dectin-1 vermittelte Signalwege eine Reifung dieser Zellen induziert. Dabei kommt es zur Hochregulation der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86. In Abbildung 4.2 wurden iDC und Dex-DC mit je 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder Curdlan stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Stimulus für 16 h wurden die in der Abbildung genannten CD-Marker wie beschrieben mit Antikörpern angefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert.

Keiner der klassischen Reifungsmarker wurde auf Dex-DC hochreguliert, während es bei dendritischen Zellen erwartungsgemäß zu einer starken Hochregulation von CD80, CD83 und CD86 kam. CD80 und CD86 sind kostimulatorische Moleküle, welche die T-Zell-Aktivierung und deren Differenzierung maßgeblich beeinflussen.

Wie in der Abbildung 4.2 außerdem zu sehen ist, stimulierten Zymosan und Curdlan die Expression von CD80, CD83 und CD86 auf iDC in gleichem Maße. Beide beta-Glukane induzierten eine ähnlich starke Hochregulation der Reifungsmarker auf iDC. Zymosan besitzt neben seiner Eigenschaft als Dectin-Agonist außerdem TLR2-stimulierende Eigenschaften (Dillon u. a., 2006). Curdlan gilt hingegen als spezifischerer Dectin-1-Agonist.

In Abbildung 4.3 ist die Expression der beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche von iDC und Dex-DC aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Beide CD-Marker wurden auf dendritischen Zellen nach Stimulation mit den beta-Glukanen Zymosan und Curdlan stark hochreguliert. Dex-DC zeigten hingegen keine Hochregulierung von CD80 und CD86.

Neben den Reifungsmarkern CD80/CD83/CD86 wurden weitere Oberflächenproteine auf iDC und Dex-DC analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

CD11b ist Bestandteil von CR3, welcher als Heterodimer zusammen mit CD18 neben Dectin-1 der wichtigste beta-Glukan erkennende Rezeptor ist. Die Expression auf Dex-DC war im Vergleich zu iDC deutlich reduziert. Nach Inkubation mit Zymosan oder Curdlan konnte auf iDC und Dex-DC eine Reduktion der Oberflächenexpression von CD11b gemessen werden.

Die beiden inhibitorischen Proteine PD-L1 und PD-L2 wurden auf beiden Zelltypen exprimiert. Die Expression fiel vor der Stimulation in etwa gleich aus. Nach Stimulation mit beta-Glukanen wurde auf beiden Zellen eine erhöhte Expression von PD-L1 beobachtet, die für iDC höher ausfiel. Die Expression von PD-L2 wurde nur geringfügig durch Stimulation mit Curdlan oder Zymosan beeinflusst.

Das MHC-II Protein HLA-DR wurde sowohl auf iDC als auch auf Dex-DC exprimiert und wurde nach Stimulation von Dectin-1 geringfügig stärker exprimiert.

Zusammengefasst ließen sich unter Dexamethason generierte tolerogene dendritische Zellen nicht mit Hilfe von beta-Glukanen aktivieren, obwohl diese Dectin-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Expression von Dectin-1 war – wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben – heraufgesetzt auf diesen Zellen.

Die Dectin-1-Expression nahm bei Stimulation mit beta-Glukanen bei beiden Zelltypen ab. Abbildung 4.5 zeigt repräsentative Histogramme von iDC und Dex-DC der Dectin-1-Expression vor und nach Stimulation mit Zymosan oder Curdlan.

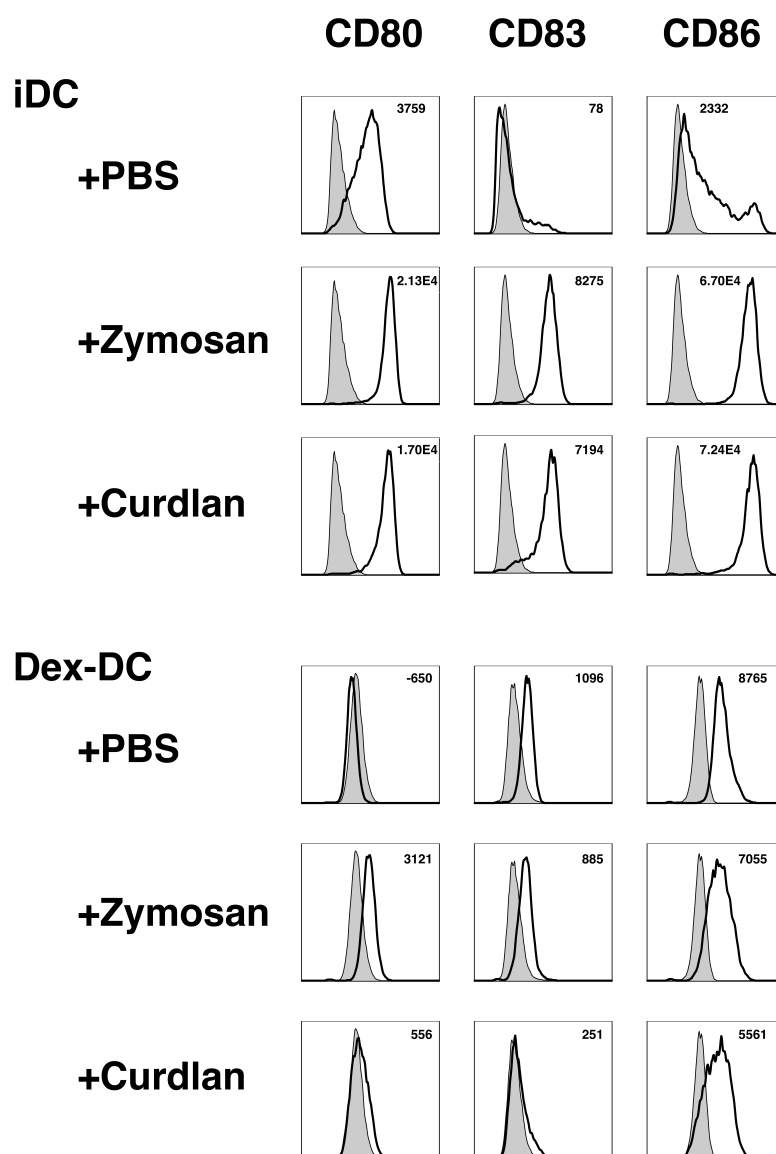
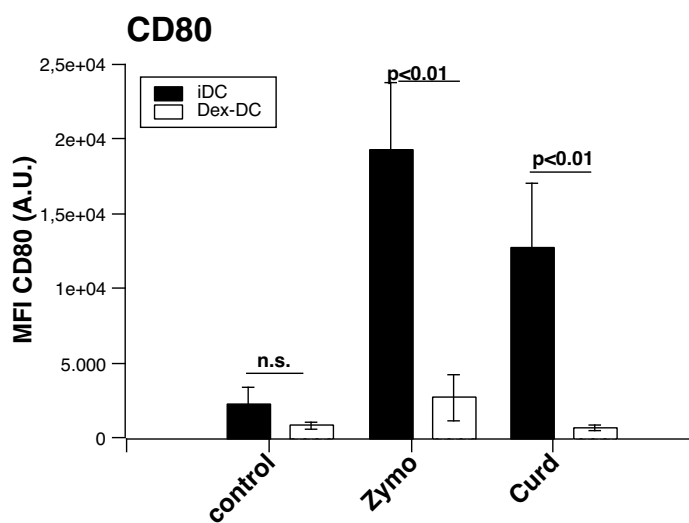
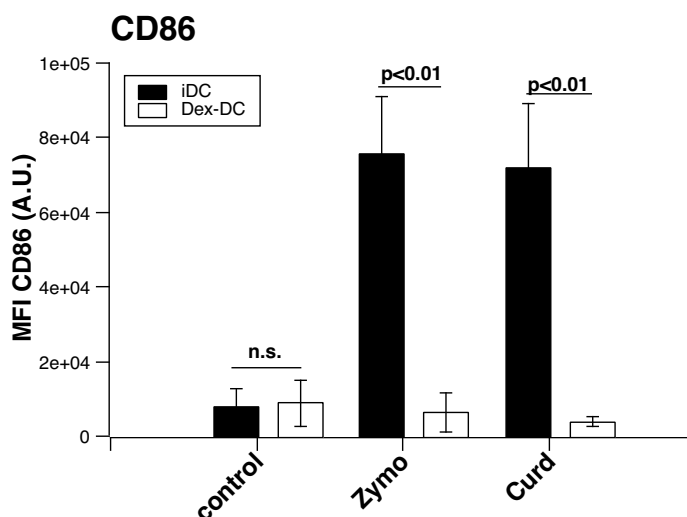


Abbildung 4.2: Expression der Reifungsmarker CD80/CD83/CD86 auf iDC und Dex-DC vor und nach 16 h Stimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder Curdlan. Beide Zelltypen wurden wie beschrieben aus Monozyten differenziert, geerntet, neu ausgesät und dann mit Zymosan oder Curdlan stimuliert. Nach Stimulation mit beta-Glukanen wurden die Zellen gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen die genannten Oberflächen-Marker inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Das geschlossene Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle, die schwarze Linie die Expression der CD-Marker. Die Zahlenwerte geben die MFI nach Abzug der MFI der Isotyp-Kontrolle an.



(a)



(b)

Abbildung 4.3: Expression von CD80 (a) und CD86 (b) auf iDC und Dex-DC. iDC und Dex-DC wurden wie beschrieben generiert, geerntet und neu in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 16 h Stimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder Curdlan wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen CD80 und CD86 inkubiert. In den Diagrammen (a) und (b) ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) nach Abzug der MFI der Isotyp-Kontrolle zu sehen. Es sind Mittelwerte der MFI von drei unabhängigen Experimenten unter Angabe der Standardabweichung gezeigt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Test bestimmt.

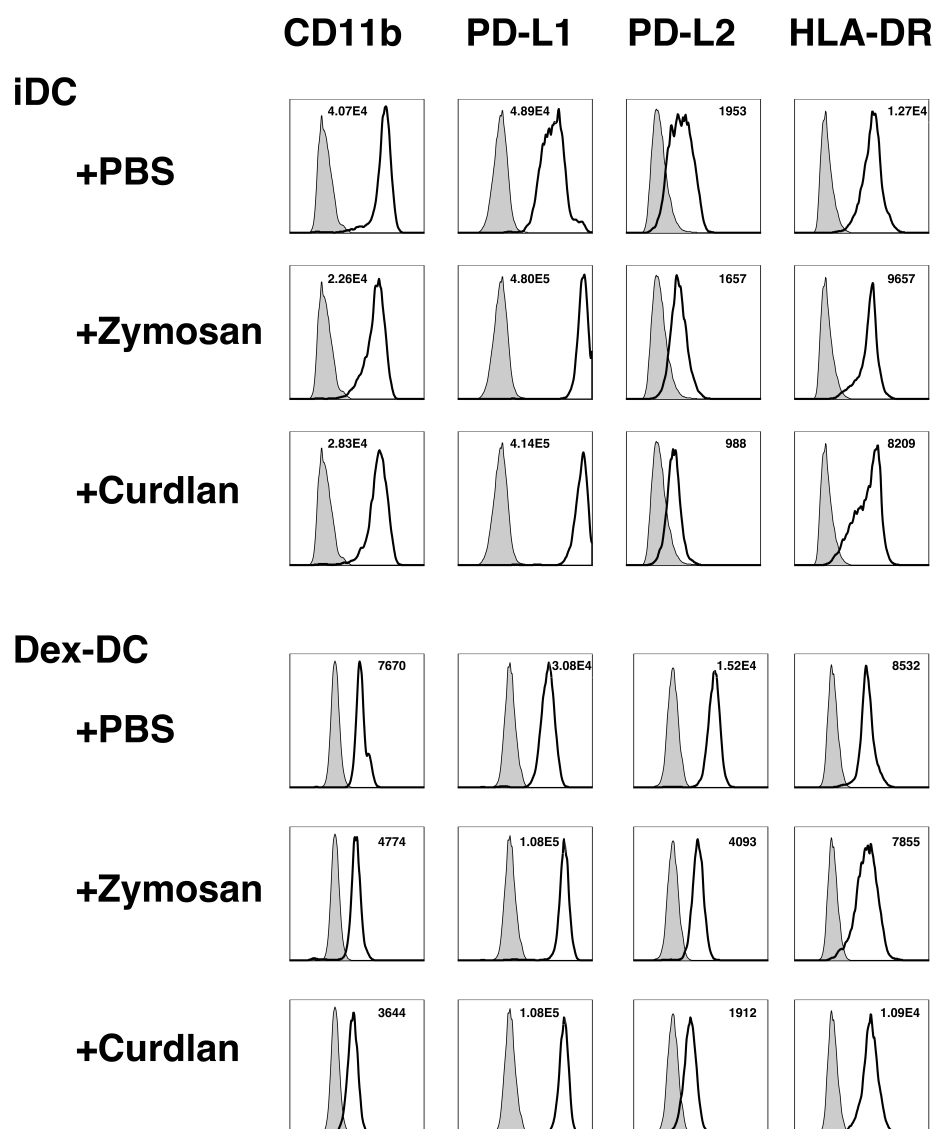


Abbildung 4.4: Expression einiger Oberflächenmarker auf iDC und Dex-DC vor und nach Stimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder Curdlan für 16 h. Beide Zelltypen wurden wie beschrieben aus Monozyten differenziert, geerntet, neu ausgesät und dann mit Zymosan oder Curdlan stimuliert. Nach Stimulation mit beta-Glukanen wurden die Zellen gewaschen und mit Antikörpern gegen die genannten Oberflächen-Marker für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Das geschlossene Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle, die schwarze Linie die Expression der CD-Marker. Die Zahlenwerte geben die MFI nach Abzug der MFI der Isotyp-Kontrolle an.

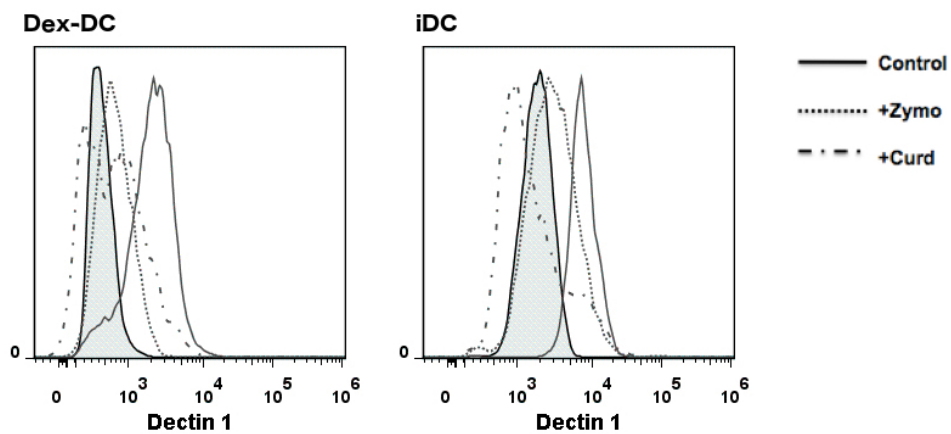


Abbildung 4.5: Dectin-1-Expression auf der Oberfläche von iDC und Dex-DC vor und nach Inkubation mit Zymosan oder Curdlan. Das geschlossene Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle, das offene Histogramm die Zellen vor Stimulation, das gepunktete Histogramm Zymosan-stimulierte und das gepunktet-gestrichelte Histogramm Curdlan stimulierten Zellen.

#### **4.1.3 Dex-DC exprimieren CD11c, DC-SIGN aber kein CD1a**

Neben den Reifungsmarkern, CD11b und Dectin-1 wurden noch einige andere Oberflächenmoleküle auf iDC und Dex-DC untersucht.

In Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass die Differenzierung unter Einfluss von Dexamethason zu einer vollständig Inhibition der CD1a-Expression führte, während CD1a auf iDC wie erwartet exprimiert wurde. CD1a ist ein antigenpräsentierendes Protein, das vorwiegend endo- und exogene Lipide und Glykolipide bindet und T-Zellen präsentiert (Vincent u. a., 2005; Salamero u. a., 2001; Sloma u. a., 2008).

Die Marker CD11c und DC-SIGN sind in geringeren Mengen auf Dex-DC im Vergleich zu iDC zu finden 4.6. CD11c ist ein Integrin, das wichtig für die Adhäsion und chemotaktischen Eigenschaften von Zellen ist. DC-SIGN ist ein phagozytischer Rezeptor der hauptsächlich Liganden mit mannosehaltigen Strukturen erkennt und internalisiert, welche dann prozessiert und an T-Zellen präsentiert werden (Engering u. a., 2002).

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

---

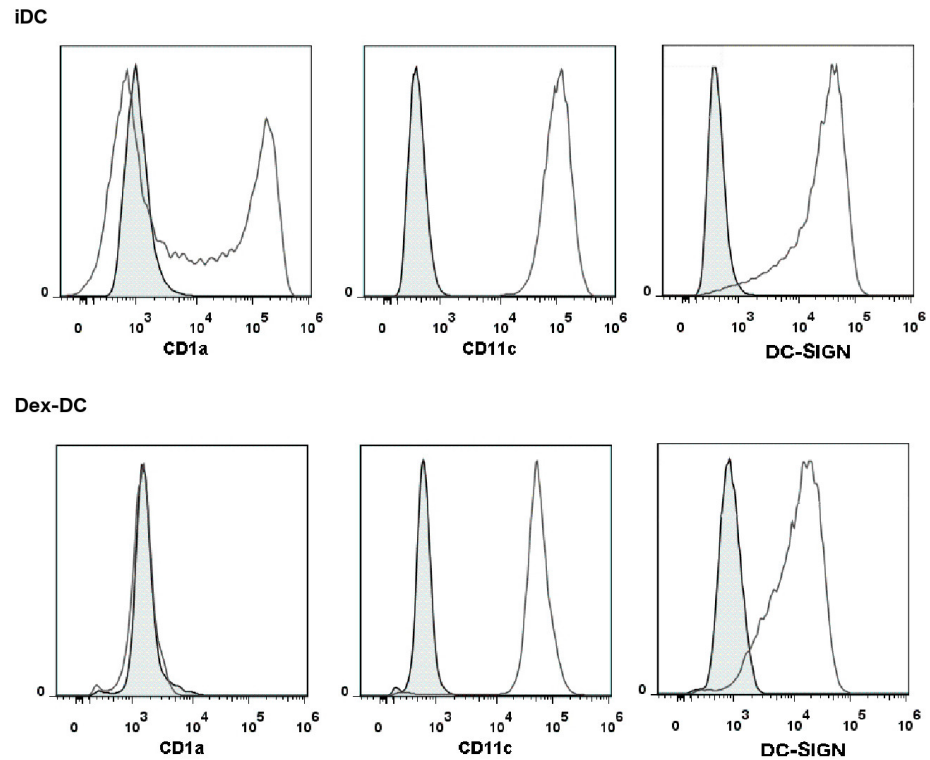


Abbildung 4.6: Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD11c und DC-SIGN auf iDC und Dex-DC nach Abschluss der Differenzierung. Monozyten wurden wie beschrieben isoliert und anschließend zu iDC (20 ng/ml IL-4; 100 ng/ml GM-CSF) oder Dex-DC differenziert (20 ng/ml IL-4; 100 ng/ml GM-CSF; 100 nM Dexamethason). Nach Ernte der Zellen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die genannten Oberflächenmarker für 30 min bei RT inkubiert und dann im Durchflusszytometer analysiert. Das geschlossene Histogramm zeigt die mit Isotyp-Kontrollantikörper behandelten Zellen. Das offene Histogramm zeigt die mit spezifischen Antikörpern behandelten Zellen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.



#### 4.1.4 Dex-DC exprimieren die Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7

Neben den bekannten Reifungsmarkern dendritischer Zellen wurde die Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7 untersucht. In Abbildung 4.7 ist die Expression dieser Rezeptoren auf iDC und Dex-DC vor und nach Stimulation mit 100 µg/ml Curdlan oder Zymosan zu sehen.

Vor Stimulation mit Curdlan waren iDC und Dex-DC FPR2-negativ. Nach erfolgter Stimulation erhöhten Dex-DC die Expression von FPR2 auf ihrer Oberfläche. Dendritische Zellen zeigten geringfügige FPR2-Expression nach Stimulation mit Curdlan. Stimulation mit Zymosan induzierte auf iDC die Expression von FPR2. FPR2 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor der eine breite Palette endogener und exogener Liganden erkennt, welche pro- oder antiinflammatorische Signalwege stimulieren können (Chen u. a., 2014; Cooray u. a., 2013).

Beide Zelltypen waren bereits vor Stimulation CXCR4-positiv. Nach Stimulation mit Curdlan oder Zymosan erhöhten dendritische Zellen die Expression von CXCR4. Dex-DC erhöhten ihre CXCR4-Expression nicht nach Stimulation mit Curdlan oder Zymosan. CXCR4 ist ein chemotaktischer Rezeptor der den Liganden SDF-1 bindet und es dendritischen Zellen erlaubt in peripheres Gewebe zu migrieren (Ricart u. a., 2011).

CCR7 ist ein weiterer wichtiger chemotaktischer Rezeptor. Sein Ligand ist MIP-3-beta. Der Rezeptor leitet aktivierte dendritische Zellen aus der Peripherie zu den Lymphknoten wo sie Antigene an naive T-Zellen präsentieren (Riol-Blanco u. a., 2005). Die Expression von CCR7 wurde auf iDC und Dex-DC nach Stimulation mit Zymosan hochreguliert. Curdlan bewirkte hingegen nur eine geringe Hochregulation von CCR7 auf iDC und Dex-DC.

Zusammengefasst deutet die Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7 auf ein nicht eingeschränktes Migrationsverhalten von Dex-DC hin.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

---

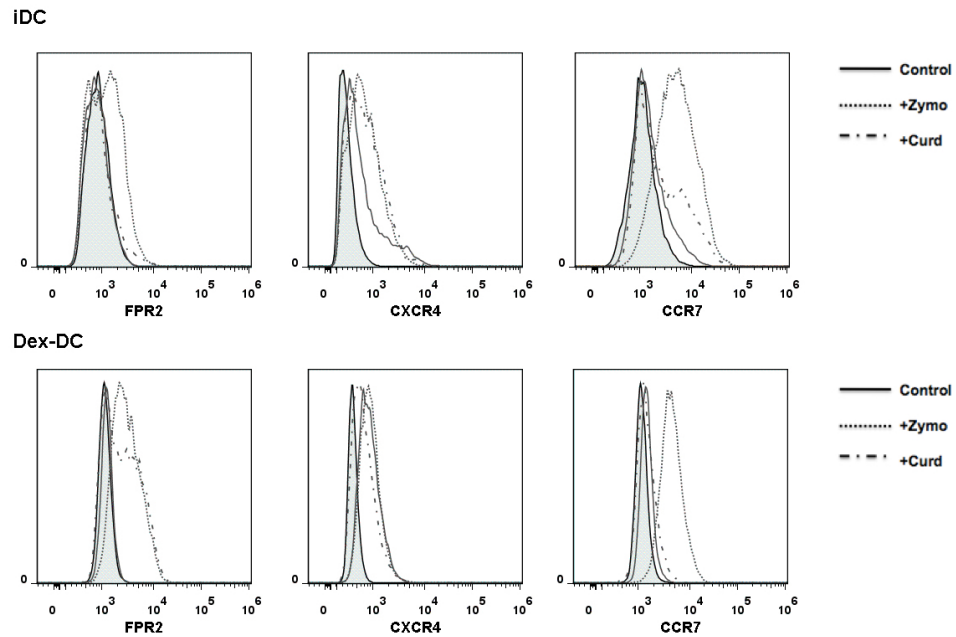


Abbildung 4.7: Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7 auf iDC und Dex-DC. iDC und Dex-DC wurden nach 24 h Stimulation mit 100  $\mu$ g Curdlan oder Zymosan mit Antikörpern gegen CXCR4, FPR2 oder CCR7 inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Das geschlossene Histogramm stellt die Isotyp-Kontrolle dar. Das offene Histogramm repräsentiert nicht-stimulierte Zellen. Das gepunktete Histogramm stellt die mit Zymosan stimulierten Zellen dar. Curdlan stimulierte Zellen werden durch das gepunktet-gestrichelte Histogramm dargestellt.

## 4.2 Dex-DC sezernieren Interleukin-10 während ihrer Generierung

Während der hier durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt, dass Dex-DC einem durch IL-10 induziertem tolerogenen Zelltyp ähnelt. Daher wurde die IL-10 Sekretion während der Differenzierung von Monozyten mit IL-4/GM-CSF bzw. IL-4/GM-CSF/Dexamethason untersucht.

In Abbildung 4.8 ist zu sehen, dass Dexamethason die Sekretion von IL-10 stimulierte. Bereits an Tag 1 nach Beginn der Kultivierung wurden signifikante Mengen von IL-10 im Zellkulturüberstand von Monozyten nachgewiesen, die mit IL-4/GM-CSF/Dexamethason behandelt wurden. Bis Tag 5 der Differenzierung stiegen die IL-10 Werte auf etwa 70 pg/ml an und verblieben an Tag sechs auf etwa diesem Niveau. An Tag sechs war auch in den Überständen der IL-4/GM-CSF behandelten Zellen eine geringe Menge IL-10 (etwa 10 pg/ml) nachweisbar. IL-10 scheint einer der Dexamethason-ausgelösten Faktoren zu sein, die einen tolerogenen Zelltyp hervorbringen.

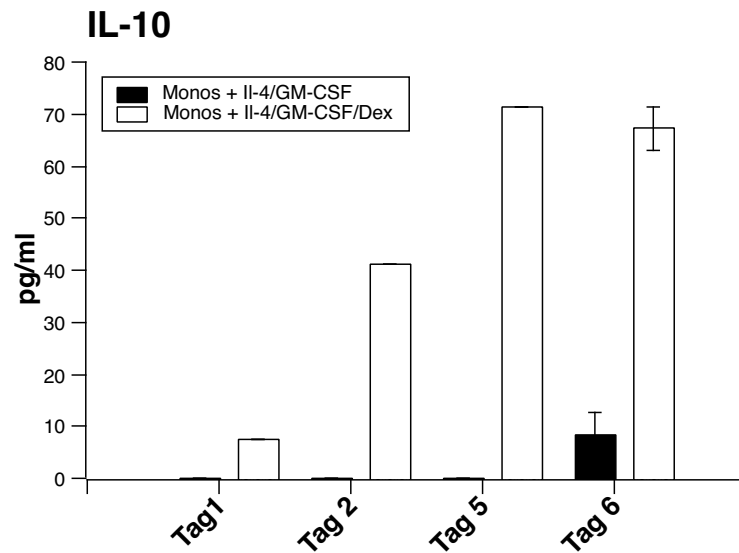


Abbildung 4.8: IL-10 Sekretion während der Reifung von iDC und Dex-DC mit IL-4/GM-CSF bzw. IL-4/GM-CSF/Dexamethason. Monozyten wurden aus peripherem Blut mittels Plastikadhärenz isoliert und über 7 Tage zu iDC bzw Dex-DC differenziert. An den Tagen 1, 2, 5 und 6 nach der ersten Zugabe von IL-4/GM-CSF bzw. IL-4/GM-CSF/Dexamethason wurde eine Probe des Zellkulturüberstand entnommen und wurde mittels ELISA auf IL-10 Sekretion untersucht. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

## 4.3 Phagozytotische-Eigenschaften von iDC und Dex-DC

### 4.3.1 Dex-DC nehmen mehr FITC-Zymosan auf als dendritische Zellen

Da Dex-DC signifikant mehr Dectin-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten, wurde in den folgenden Experimenten die Aufnahme des Dectin-1-Agonisten Zymosan und von apoptotischen Zellen durch Dex-DC untersucht. Zum Einsatz kamen dabei Immunzytochemische- sowie durchflusszytometrische Methoden. Die Aufnahme des Dectin-1 Agonisten Zymosan wurde zunächst mit FITC-markierten Zymosan untersucht. Dazu wurden iDC und Dex-DC zunächst in 24-Loch-Platten ausgesät. Je Kavität wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und dann für 30 min mit  $15 \mu\text{g}$  FITC-Zymosan stimuliert. Inhibitoren wurden ggf. 30 min vor Zymosan-Stimulation zu den Zellen gegeben.

In Abbildung 4.9 ist die mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Kanals eines repräsentativen Experiments für unterschiedlich behandelte Zellen zu sehen. Es wurden für jeden Zelltyp jeweils unbehandelte, mit FITC-Zymosan behandelte und mit  $2 \mu\text{M}$  Cytochalasin D vorinkubierte und dann mit FITC-Zymosan behandelte Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Cytochalasin D verhindert die Polymerisation von Actin zu F-Actin und verhindert dadurch die Aufnahme von FITC-Zymosan in das Zellinnere.

Die mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Kanals kann als Maß für die Aufnahme von FITC-Zymosan genommen werden. Dex-DC scheinen somit mehr FITC-Zymosan aufzunehmen als iDC. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Dex-DC war nach 30-minütiger Stimulation mit FITC-Zymosan etwa 70 % höher als die der iDC. Durch Zugabe des F-Actin-Inhibitors Cytochalasin D nahm die Aufnahme von FITC-Zymosan für beide Zellpopulationen stark ab. Die höhere Dectin-1-Expression auf tolerogenen dendritischen Zellen korreliert also mit der erhöhten Aufnahme von FITC-Zymosan.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Messungen wurden immunzytochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt. In Abbildungen 4.10 und 4.11 ist jeweils ein repräsentatives immunzytochemisches Experiment zu sehen.

Beide Zelltypen wurden für 30 min mit hitzeinaktivierten *C. albicans* bei

37 °C inkubiert, fixiert, mit Antikörpern gegen Dectin-1 inkubiert und dann mit einem DyLight 594-markierten anti-Ziege-IgG Antikörper inkubiert (rot). Zur Anfärbung der genomischen DNA wurde DAPI (blau) verwendet. Die hitzeinaktivierten *C. albicans* waren autofluoreszent und im FITC-Kanal (grün) sichtbar.

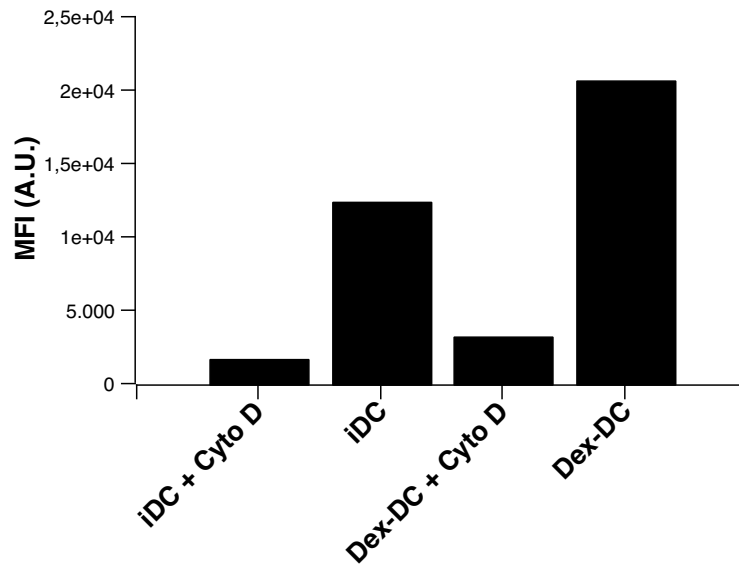


Abbildung 4.9: Aufnahme von FITC-Zymosan durch iDC und Dex-DC. Beide Zelltypen wurden 30 min mit 15  $\mu$ g FITC-Zymosan bei 37 °C stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit 2  $\mu$ M Cytochalasin D vorbehandelte Zellen.

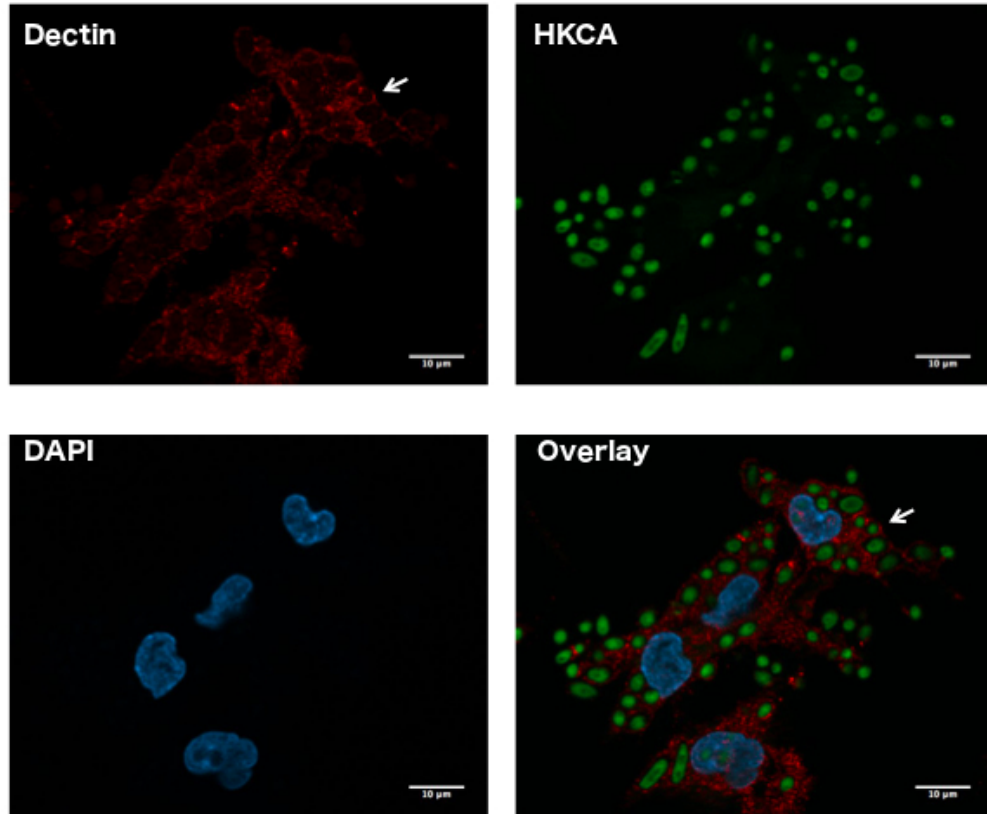


Abbildung 4.10: Mit anti-Dectin-1 Antikörper und DyLight594-konjugiertem Zweitan-tikörper gefärbte iDC nach HKCA-Zugabe. iDC wurden mit  $1 \times 10^6$  HKCA für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen zuerst mit anti-Dectin-1 Antikörper (1:50) und dann mit anti-Ziege-IgG DyLight 594 inkubiert. Nach *mounten* der Deckgläschen wurden die Zellen am Zeiss Observer Z1 untersucht. Der weiße Pfeil kennzeichnet phagosomale Membranen mit deutlicher Anreicherung von Dectin-1.

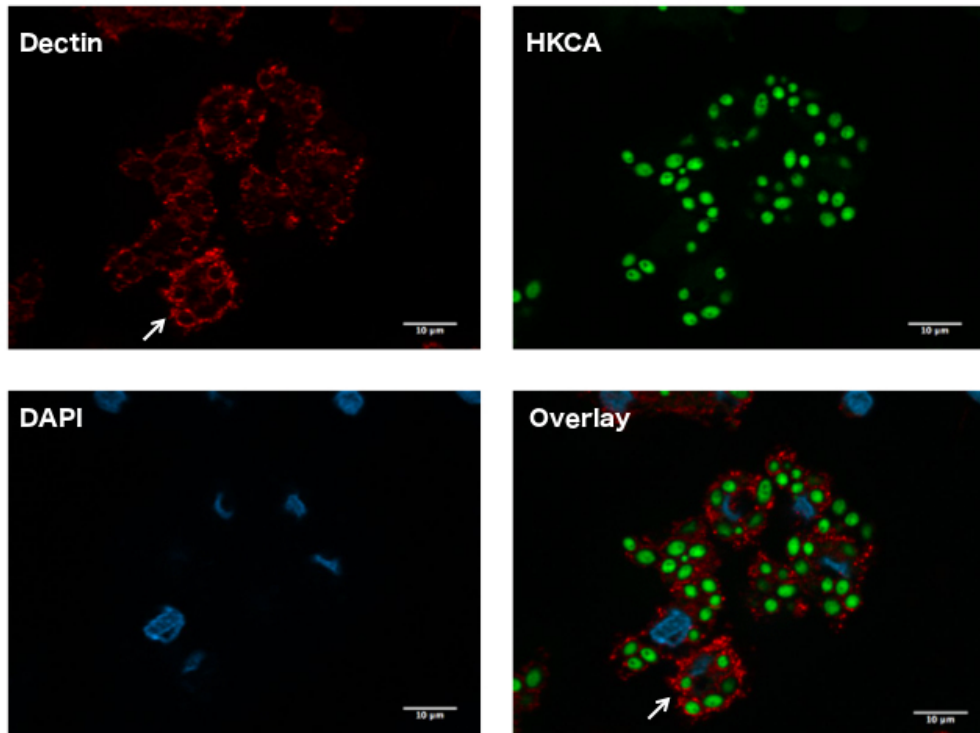


Abbildung 4.11: Mit anti-Dectin-1 Antikörper und DyLight594-konjugiertem Zweitantikörper gefärbte Dex-DC nach HKCA-Zugabe. Dex-DC wurden mit  $1 \times 10^6$  HKCA für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen zuerst mit  $\alpha$ -Dectin-1 Antikörper (1:50) und dann mit anti-Ziege-IgG DyLight 594 inkubiert. Nach *mounten* der Deckgläschen wurden die Zellen am Zeiss Observer Z1 untersucht. Der weiße Pfeil kennzeichnet phagosomale Membranen mit deutlicher Anreicherung von Dectin-1.



### **4.3.2 Dex-DC nehmen mehr apoptotische Hek293 Zellen auf als iDC**

Tolerogene dendritische Zellen gelten wegen ihrer speziellen Eigenschaften als mögliche zellbasierende Therapeutika gegen Autoimmunkrankheiten. Werden bekannte krankheitsspezifische Autoantigene in tolerogene dendritische Zellen eingebracht, können diese die aufgenommenen Antigene an T-Zellen präsentieren und – z.B. durch Anergie – Toleranz vermitteln (Suwandi u. a., 2015). Geschädigte Zellen sind Ursprung endogener potentieller Autoantigene. Daher wurde untersucht ob Dex-DC verstärkt apoptotische Zellen aufnehmen können.

Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, nahmen Dex-DC im Vergleich zu dendritischen Zellen mehr CMPTX-markierte apoptotische Hek293-Zellen auf. Zur Kontrolle wurde das Experiment bei 4 °C unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Bei 4 °C konnte nur eine geringe Zunahme der CMPTX-Fluoreszenz in beiden Zelltypen beobachtet werden. Demzufolge kam es bei 4 °C zu keiner Aufnahme von geschädigten bzw. apoptotischen Zellen durch iDC und Dex-DC.

Zusammengefasst haben Dex-DC eine höhere phagozytotische Aktivität bei Inkubation mit Zymosan und apoptotischen Hek293 Zellen im Vergleich zu unreifen dendritischen Zellen.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

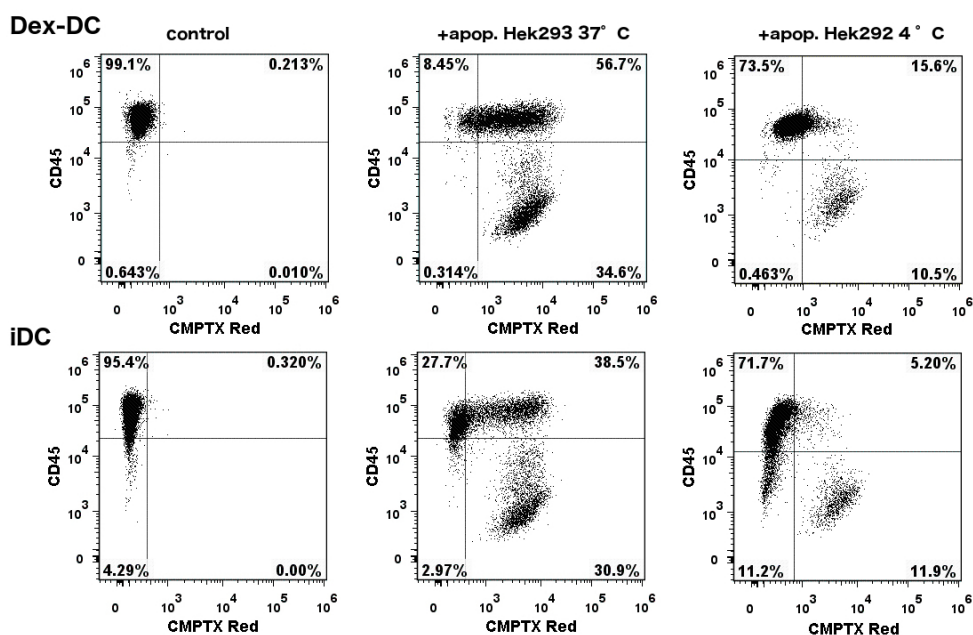


Abbildung 4.12: Aufnahme CMPTX-gefärbter apoptotischer Hek293-Zellen durch iDC und Dex-DC Zellen. Hek293-Zellen wurden mit CMPTX gefärbt, mit 100 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C Strahlung behandelt und über Nacht bei 37 °C oder 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nun apoptotischen Zellen im Verhältnis 1:1 zu dendritischen oder tolerogenen dendritischen Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h bei 37 °C oder 4 °C wurden die Zellen geerntet und mit anti-CD45-FITC Antikörper inkubiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die Punkt-Diagramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

#### 4.4 Dex-DC verfügen über stark eingeschränkte T-Zell-stimulatorische Eigenschaften

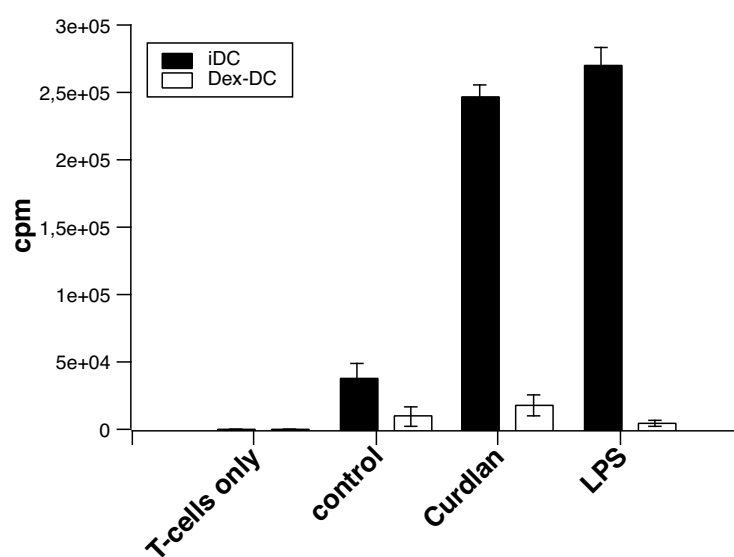
Durch die verringerte Expression kostimulatorischer Moleküle und der erhöhten Expression von PD-L-1 als Vertreter der koinhibierenden Moleküle war es unwahrscheinlich, dass Dex-DC allogene T-Zellen aktivieren können. Die Untersuchung der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften mittels gemischter Leukozyten Reaktion bestätigte diese Annahme. Beide Zelltypen wurden wie im Methodenteil beschrieben zusammen mit T-Zellen in Gegenwart von [<sup>3</sup>H]-Thymidin inkubiert.

In Abbildung 4.13 sind zwei Versuche zur allogenen T-Zell-Proliferation durch iDC und Dex-DC gezeigt. Abbildung 4.13a zeigt eine gemischte Leukozyten Reaktion im Verhältnis 10:1 (CD4<sup>+</sup> T-Zellen:iDC/Dex-DC). In Abbildung 4.13b ist das Verhältnis 5:1.

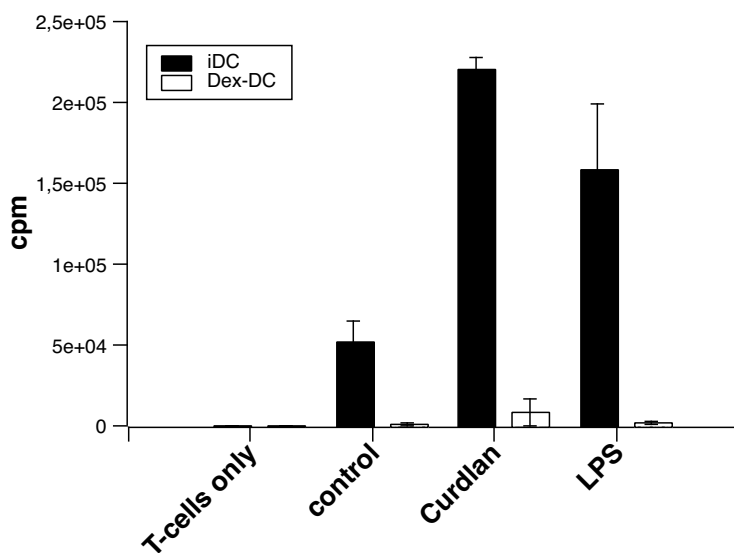
Wie zu erwarten war, induzierten Dex-DC keine Proliferation allogener T-Zellen bei Stimulation mit LPS oder Curdlan. iDC induzierten bei Stimulation mit LPS oder Curdlan die Proliferation allogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Tolerogene dendritische Zellen oder auch myeloide Supressorzellen inhibierten die Proliferation von T-Zellen z.B. durch induzierte T-Zell-Anergie. Im wesentlichen geschieht dies durch inhibitorische Moleküle auf ihrer Oberfläche (z.B. PD-L1) oder durch das fehlen kostimulatorischer Moleküle wie CD80/CD86 bei Interaktion von T-Zell-Rezeptor und Peptid-beladendem MHC-Protein. Die tolerogene dendritische Zelle bindet zwar z.B. mittels MHC-II an den T-Zell-Rezeptor (Signal 1), aber ohne die weitere Stimulation der T-Zelle durch CD80/CD86 (*Signal 2*) kommt es zu keiner Aktivierung dieser T-Zelle. Dieses Verhalten tolerogener dendritischer Zellen macht sie interessant für zellbasierte Therapien gegen Autoimmunerkrankungen (Ten Brinke u. a., 2015).

Im Überstand der Ko-Kulturen wurde außerdem die Konzentration des Zytokins IFN- $\gamma$  ermittelt (Abb. 4.14). Wie zu sehen ist, wurde in Gegenwart von Dex-DC nach Stimulation mit Curdlan nur etwa 10 pg/ml IFN- $\gamma$  im Überstand nachgewiesen. Im Überstand von Ko-Kulturen mit iDC wurde eine Konzentration von etwa 50 pg/ml gemessen.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen



(a)



(b)

Abbildung 4.13: Proliferation von allogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 5 Tagen Kokultur mit iDC oder Dex-DC. (a) zeigt die Kokultivierung von 1x10<sup>4</sup> iDC oder Dex-DC mit 1x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In (b) wurden 5x10<sup>4</sup> iDC und Dex-DC zusammen mit 1x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen inkubiert. Als Maß für die Proliferation wurde der Zerfall von verstoffwechselten [<sup>3</sup>H]-Thymidin mittels beta-Szintillationszähler detektiert. Alle Proben wurden 4-fach angesetzt und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. cpm: *counts per minute*

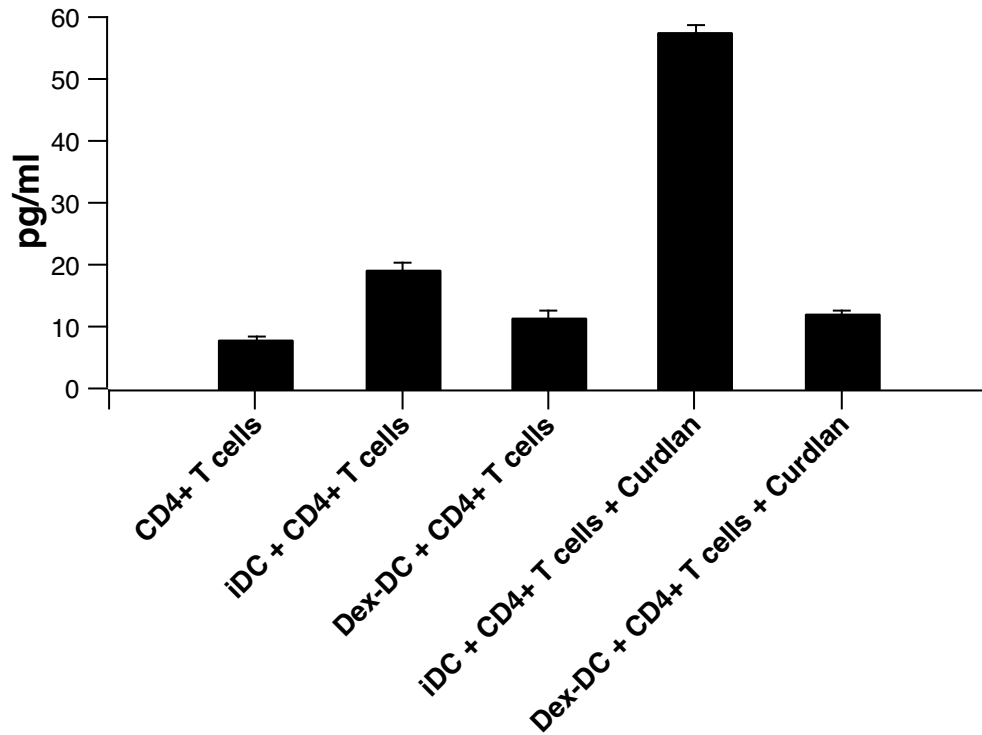


Abbildung 4.14: Sekretion von IFN- $\gamma$  durch allogene CD4<sup>+</sup> T-Zellen. iDC oder Dex-DC wurden wie beim MLR-Assay zusammen mit allogenen T-Zellen inkubiert und zuvor mit Curdlan stimuliert. Im Überstand dieser Ko-Kulturen wurde dann mittels E.L.I.S.A die IFN- $\gamma$  Konzentration ermittelt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.

## 4.5 Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in dendritischen und tolerogenen dendritischen Zellen

Um die Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in Dex-DC zu charakterisieren wurden zunächst die freigesetzten Chemokine, Zytokine und die anschließend in der Zelle aktivierten Signalwege nach Stimulation von Dectin-1 untersucht. Im Folgenden wird zunächst auf die Aktivierung der Kinase Syk eingegangen. Außerdem wurde das Zytokinprofil von iDC und Dex-DC nach Stimulation mit Dectin-1 Agonisten analysiert. Anschließend wird auf die von Dectin-1-vermittelten Signalwege in beiden Zelltypen eingegangen.

Auf die Dectin-1 vermittelte IL-1beta Sekretion wird in einem gesonderten Unterkapitel eingegangen, da diese getrennt von den anderen Zytokinen untersucht wurde.

### 4.5.1 Die Kinase Syk ist nach Stimulation mit beta-Glukanen in Dex-DC hyperaktiviert

Dex-DC exprimierten mehr Dectin-1 auf ihrer Oberfläche (Abbildung 4.1) als konventionell generierte dendritische Zellen (iDC), nahmen beta-Glukane auf (Abbildung 3.19 und 4.10), reiften jedoch nach Stimulation mit diesen aber nicht (Abbildung 4.2) und induzierten keine Proliferation allogener T-Zellen (Abbildung 4.13). Werden beta-Glukane durch Dectin-1 erkannt, wird durch die Kinasen Src und Syk eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst.

Zunächst wurde die Aktivierung der Kinase Syk nach Stimulation von Dectin-1 untersucht. Syk ist eine nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, welche die Signaltransduktion *downstream* von vielen Rezeptoren initiiert. Dabei spielt die Kinase eine wichtige Rolle in Prozessen des angeborenen und adaptiven Immunsystem. Speziell seien hier die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, die Aktivierung des Inflammasoms und die NF-kappa-B vermittelte Cytokin- und Chemokinsekretion genannt (Gringhuis u. a., 2012).

Als Marker für die Aktivität von Syk wurde die Phosphorylierung der beiden Tyrosine 525 und 526 im Aktivierungs-*loop* untersucht, welche essentiell für die Funktion von Syk sind (Zhang u. a., 2000). Die Phosphorylierung wurde mittels Immunblot wie im Methodenteil beschrieben analysiert.

In Abbildung 4.15 ist das Ergebnis eines repräsentativen Immunblots zu se-

hen, bei dem iDC und Dex-DC mit verschiedenen Dectin-Agonisten stimuliert wurden. Beide Zelltypen wurden für 30 min mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan (Zymo), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan (Curd) oder  $1 \times 10^7$  hitzeinaktivierten *C. albicans* (HKCA) stimuliert. Wie zu sehen ist, war die Phosphorylierung von Syk in Lysaten von Dex-DC deutlich ausgeprägter als in Lysaten von iDC. Dabei fiel die Phosphorylierung von Syk im Falle von Curdlan schwächer aus. Dies lag vermutlich an dem kleineren Zell:Partikel Verhältnis. Curdlan-Partikel sind wesentlich größer als Zymosan-Partikel oder hitzeinaktivierte *C. albicans* (Kankkunen u. a., 2010).

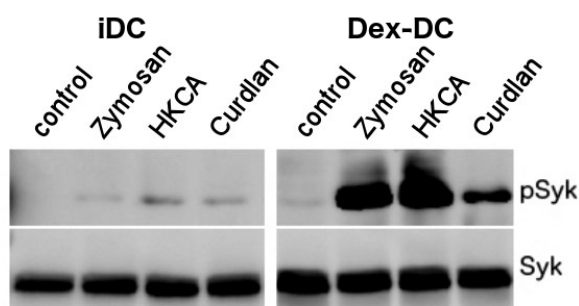


Abbildung 4.15: Phosphorylierung von Syk an den Tyrosinen 525 und 526 nach 30-minütiger Stimulation mit verschiedenen Dectin-Agonisten.  $2 \times 10^6$  dendritische oder Dex-DC wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 30 min lang mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan oder  $1 \times 10^7$  HKCA stimuliert. Nach Zellernte, Lyse der Zellen und BCA-Test wurden 25  $\mu\text{g}$  Proteinlysate je Gelspur aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Membranen wurden nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit TBS-T + 5 % BSA mit anti-pSyk525/526 (1:1000 in TBS-T + 2 % BSA) über Nacht inkubiert. Nach Inkubation mit einem anti-Kaninchen-IgG Antikörper wurden die Signale der ECL-Reaktion digital detektiert.

#### 4.5.2 Syk-Hyperaktivierung sorgt für erhöhte Freisetzung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC nach Stimulation mit Zymosan oder Curdlan

Durch die Aktivierung von Syk über Dectin-1 kann die Generierung von Superoxid-Anionen induziert werden (Thiagarajan u. a., 2013), welche eine Rolle in der Aktivierung des Inflammasoms spielen (Menu und Vince, 2011). Das Inflammasom ist für die Aktivierung von Caspasen verantwortlich, die pro-IL-1beta spalten und damit die Sekretion von aktivem IL-1beta induzieren (Shao u. a., 2015).

Abbildung 4.16 zeigt die Bildung von Superoxid-Anionen von iDC und Dex-DC 45 min nach Stimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan (a) oder Curdlan (b). Die Detektion der Superoxid-Anion-Bildung wurde durchflusszytometrisch durchgeführt. Während iDC nach Stimulation mit Zymosan oder Curdlan eine geringfügige Generierung von Superoxid-Anionen zeigten, war die Generierung in Dex-DC deutlich erhöht. Wenn mit Curdlan stimuliert wurde, waren höhere Konzentrationen von Curdlan notwendig um Superoxid-Anionen zu induzieren (Abb. 4.16d).

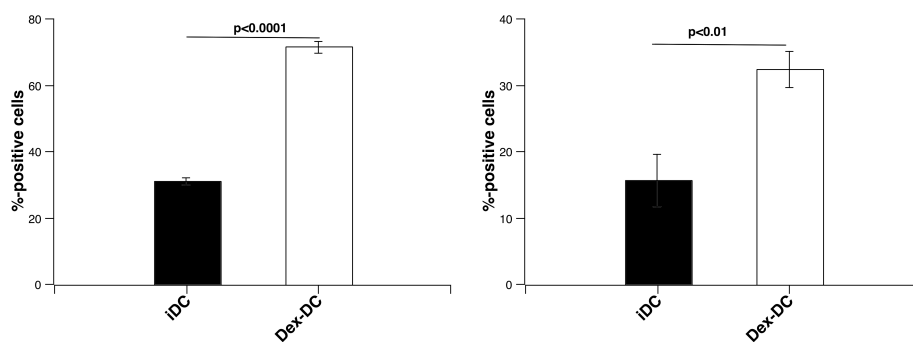
In Abbildung 4.16c ist zu sehen, dass LPS keine Superoxid-Anionen-Bildung stimulierte. Curdlan, in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , stimulierte nur geringfügig die Bildung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC. Im Falle von iDC ist bei dieser Konzentration keine Bildung von Superoxid-Anionen zu beobachten gewesen. Um die Abhängigkeit der Superoxid-Anion-Generierung von Syk und Dectin-1 zu ermitteln, wurden iDC und Dex-DC zusammen mit verschiedenen Inhibitoren oder einem anti-Dectin-1 Antikörper 30 min inkubiert, bevor diese für 45 min mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zymosan oder 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan stimuliert wurden.

In Abbildung 4.17a,b ist der Effekt der Inhibitoren PP2, R406 und eines Dectin-1 Antikörpers auf die Superoxid-Anion-Generierung gezeigt. Der Syk-Inhibitor R406 sorgte für eine deutlich erniedrigte Superoxid-Anion Generierung durch iDC und Dex-DC. Der Src-Inhibitor PP2 regulierte die Superoxid-Anion-Generierung ebenfalls deutlich herunter. Der Dectin-1-Antikörper blockierte effektiv die beta-Glukan Bindungsstelle von Dectin-1 und inhibiert die Generierung von Superoxid-Anionen durch iDC und Dex-DC nach Stimulation mit Curdlan oder Zymosan.



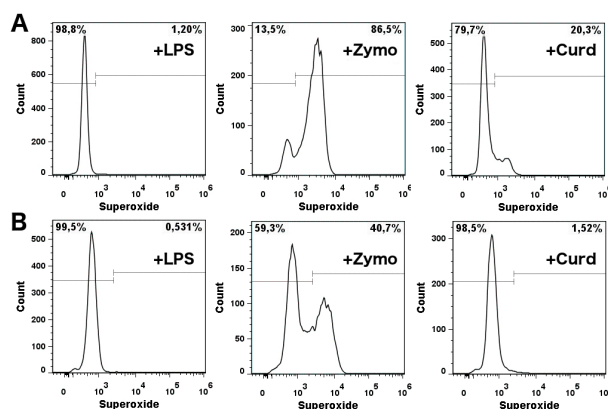
Zusammengefasst scheint die Dectin-1 vermittelte Hyperaktivierung von Syk in Dex-DC verantwortlich für die erhöhte Bildung von Superoxid-Anion verantwortlich zu sein. Die Spezifität wurde durch Inhibitoren und Antikörper gegen Dectin-1 nachgewiesen. Stimulation mit Curdlan induzierte nur eine geringe Bildung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC, wenn es in den gleichen Mengen wie Zymosan verwendet wurde. Höhere Konzentrationen von Curdlan zeigten genau wie im Falle von Zymosan eine erhöhte Bildung von Superoxid-Anionen in Dex-DC gegenüber iDC. Grund hierfür war vermutlich das bereits erwähnte reduzierte Zell zu Partikel Verhältnis bei Einsatz einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

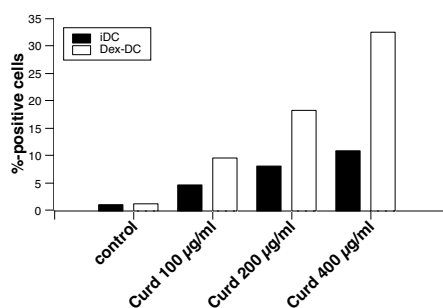


(a) +Zymosan

(b) +Curdlan



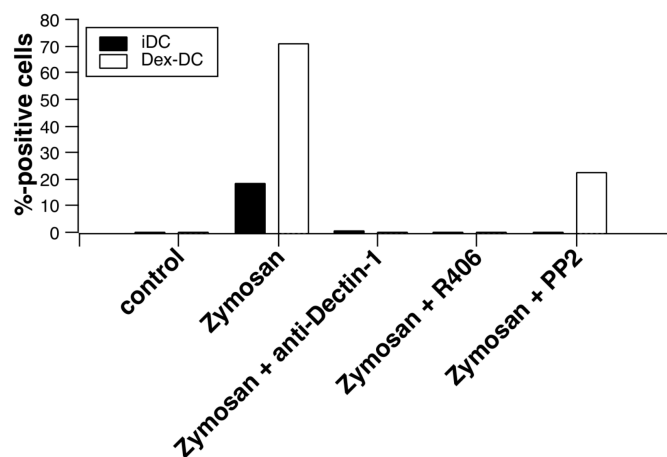
(c)



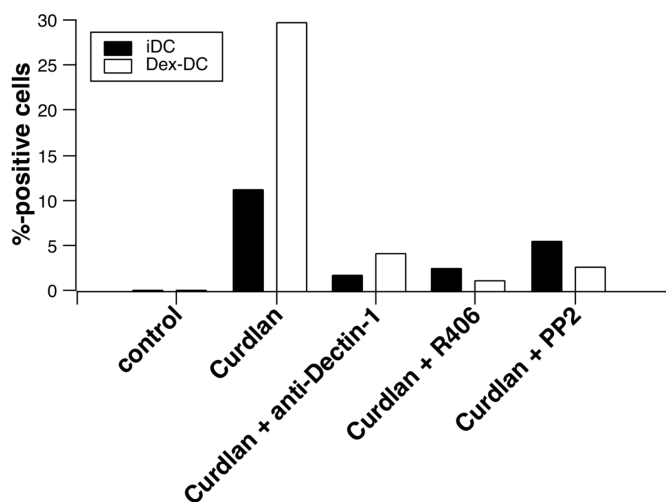
(d)

Abbildung 4.16: Superoxid-Anion Generierung in iDC und Dex-DC. (a) iDC und Dex-DC wurden für 45 min mit 100 µg/ml Zymosan und Superoxid-Detektionsreagenz inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. (b) iDC und Dex-DC wurden zusammen mit 400 µg/ml Curdlan wie in (a) inkubiert. (c) iDC und Dex-DC wurden zusammen mit 100 µg/ml Curdlan, Zymosan oder 100 ng/ml LPS wie in (a) inkubiert. (d) iDC und Dex-DC wurden zusammen mit 0 bis 400 µg/ml Curdlan wie in (a) inkubiert.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen



(a)



(b)

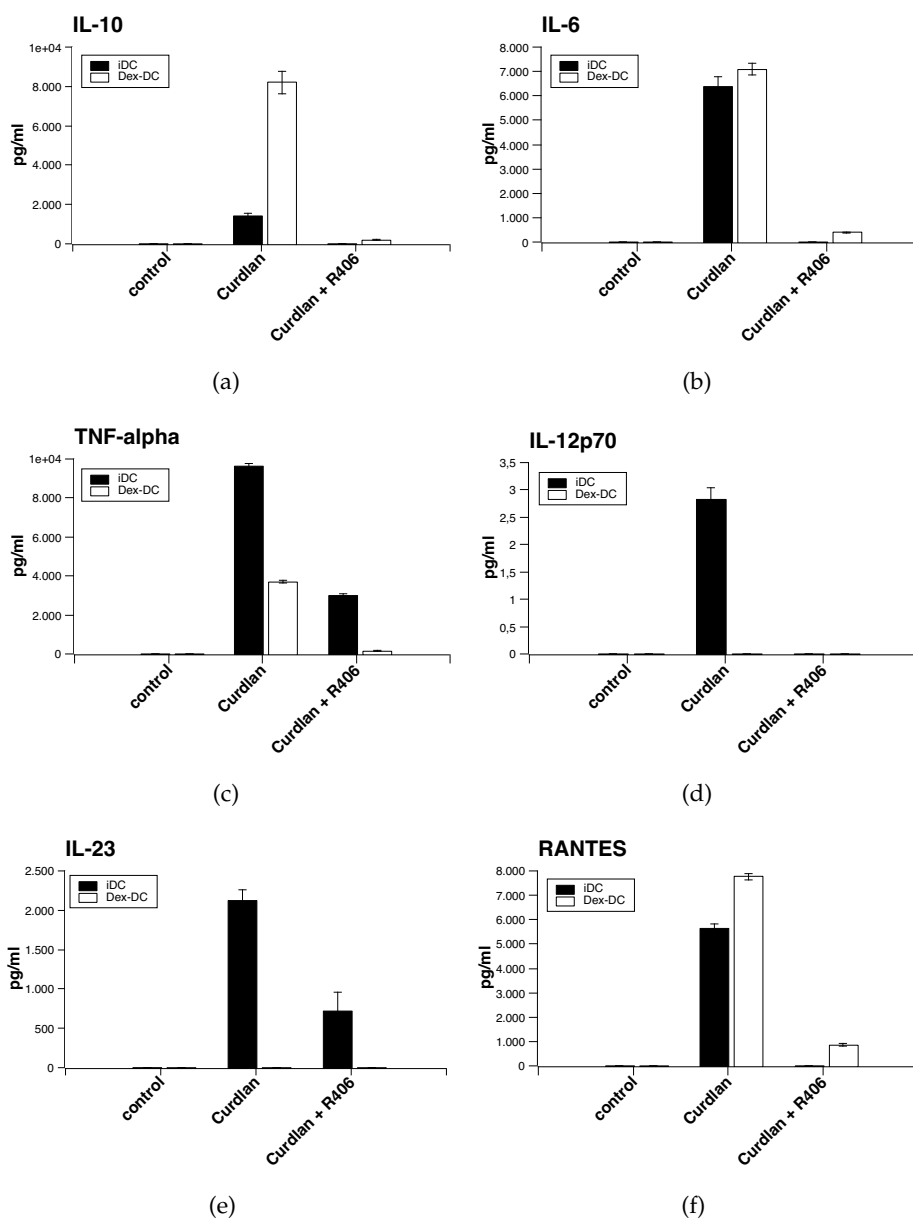
Abbildung 4.17: Inhibition der Superoxid-Anion-Produktion durch R406, PP2 und einen anti-Dectin-1-Antikörper. iDC und Dex-DC wurden 30 min mit den Inhibitoren PP2 (5  $\mu$ M), R406 (2.5  $\mu$ M) oder 5  $\mu$ g/ml Dectin-1-Antikörper vorinkubiert und anschließend mit 100  $\mu$ g/ml oder 400  $\mu$ g/ml für 45 min stimuliert. Gleichzeitig mit der Zymosan- bzw Curdlan-Zugabe erfolgte die Zugabe des Superoxid-Detektionsfarbstoffs. Die prozentual für Superoxid-Anionen positiven Zellen wurden unter Berücksichtigung der unbehandelten Probe ermittelt.

#### **4.5.3 Dex-DC haben ein antiinflammatorisches Zytokinprofil nach Stimulation von Dectin-1 mit Curdlan**

Die Zytokinsekretion von Dex-DC und iDC wurden nach Stimulation für 18 h mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan untersucht. Um den Einfluss von Syk auf die Zytokinsekretion zu untersuchen wurden zusätzlich R406 behandelte iDC und Dex-DC untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte iDC und Dex-DC.

In Abbildung 4.18 sind repräsentative Säulendiagramme des Nachweises von IL-10, IL-6, TNF-alpha, IL-12p70, IL-23 und RANTES zu sehen. Antiinflammatorisch wirksames IL-10 wurde durch Dex-DC weit stärker als durch iDC sezerniert. IL-6 wurde in etwa gleich von beiden Zelltypen freigesetzt. Das proinflammatorische Zytokin TNF-alpha wurde durch Dex-DC im Vergleich zu iDC reduziert sezerniert. IL-12p70 wurde durch Dex-DC nicht und durch iDC nur in sehr geringen Mengen sezerniert. IL-23, ein Zytokin, das für die Polarisation von Th17-Zellen wichtig ist, wurde ebenfalls nur durch iDC gebildet und freigesetzt. Das Chemokin RANTES wurde interessanterweise in höheren Mengen durch Dex-DC sezerniert. In allen Fällen schien die Sekretion der untersuchten Zytokine abhängig von Syk vermittelter Signalweiterleitung zu sein, da die Sekretion durch R406 in allen Fällen deutlich herunterreguliert wurde.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen



Abbildungung 4.18: Zytokinausschüttung von iDC und Dex-DC nach Stimulation von Dectin-1. (a) - (f) iDC und Dex-DC wurden für 18 h mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Curdlan inkubiert und die Überstände mittels ELISA auf die angegebenen Zytokine untersucht.

### IFN-beta

IFN-beta Expression und Sekretion nach Infektion mit *C. albicans* wird über Dectin-1/IRF5 vermittelt (del Fresno u. a., 2013). Wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist, war die Sekretion von IFN-beta durch Dex-DC stark eingeschränkt. Dex-DC sezernierten deutlich weniger IFN-beta nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Stimulation mit Curdlan induzierte hingegen keine messbare Sekretion von IFN-beta durch iDC und Dex-DC.

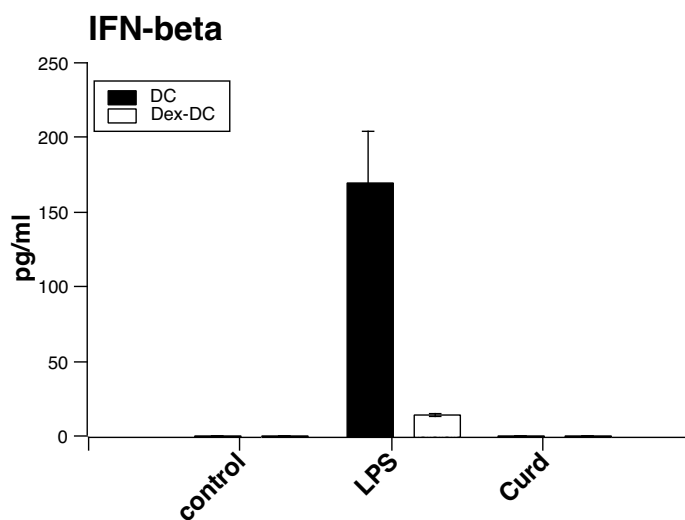


Abbildung 4.19: IFN-beta Sekretion durch iDC und Dex-DC nach Stimulation für 24 h mit Curdlan oder LPS. Der Nachweis erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

#### **4.5.4 Die Interleukin-1 beta Sekretion von Dex-DC ist nach Stimulation mit beta-Glukanen erhöht und ist Caspase- und Syk-abhängig.**

Die Dectin-1-vermittelte Sekretion von IL-1beta durch iDC und Dex-DC wurde detailliert untersucht. In Abbildung 4.20a ist die Sekretion von IL-1beta nach Stimulation mit Curdlan zu sehen. Die Stimulation von Dectin-1 führte zu einer deutlich erhöhten Ausschüttung von IL-1beta durch Dex-DC im Vergleich zu iDC. Dex-DC sezernierten ein Vielfaches an IL1-beta im Vergleich zu iDC wenn sie mit Curdlan stimuliert wurden.

Der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK inhibierte die Sekretion von IL-1beta nach Curdlan-Stimulation von Dex-DC deutlich (Abbildung 4.20b). In dendritischen Zellen war die IL-1beta nach zVAD-FMK-Zugabe nicht mehr detektierbar.

Nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS (Abbildung 4.20c) war die IL-1beta Sekretion von Dex-DC und iDC vergleichbar.

Zur weiteren Analyse wurde die Abhängigkeit der IL-1beta Sekretion von der Kinase Syk untersucht. In Abbildung 4.20a ist zu sehen, dass Vorinkubation von iDC und Dex-DC mit den Syk-Inhibitor R406 (2.5  $\mu$ M) oder dem Src-Inhibitor PP2 (5  $\mu$ M) zu einer erheblichen Reduktion der IL-1beta Sekretion führte. Vorbehandlung mit N-Acetylcystein (NAC; 20 mM) führte zu keiner Verringerung der IL1-beta Sekretion nach Stimulation von Dex-DC mit Curdlan. iDC sezernierten nach Vorbehandlung mit NAC weniger IL-1beta.

Die Kinase Src phosphoryliert Tyrosine der intrazellulären Domäne von Dectin-1 und bildet so Bindungsstellen für Syk. Syk kann mit seinen SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine binden. Eine Inhibition von Src führte so zu einer Unterbrechung der Signalweiterleitung durch Syk (Majeed u. a., 2001). Interessanterweise wurde die Sekretion von IL-1beta durch iDC nicht durch PP2 beeinflusst, wohingegen R406 die IL-1beta-Sekretion deutlich verringerte.

#### 4 Ergebnisse Teil II: Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung in tolerogenen dendritischen Zellen

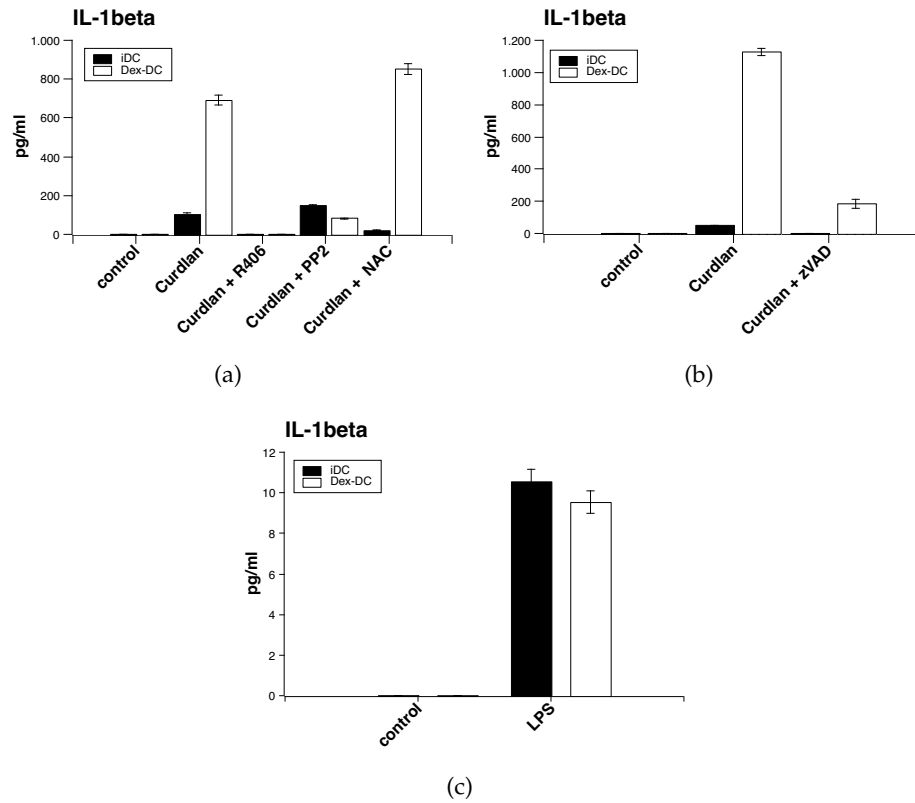


Abbildung 4.20: IL-1beta Sekretion durch iDC und Dex-DC nach Stimulation mit Curdlan oder LPS. (a) iDC oder Dex-DC wurden für 30 min mit 10  $\mu$ M zVad vorbehandelt oder unbehandelt für 18 h mit 100  $\mu$ g/ml Curdlan inkubiert und der Zellkulturüberstand auf IL-1beta Sekretion untersucht. (b) IL-1beta Sekretion nach Inhibierung von Syk (R406), Src (PP2) und ROS (NAC). R406 wurde 2.5  $\mu$ M, PP2 5  $\mu$ M oder 20 mM NAC für 30 min vorinkubiert und dann wie in (a) stimuliert und die Überstände analysiert. (c) iDC und Dex-DC wurden für 18 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert und dann wie in (a) untersucht.



#### **4.5.5 Hyperaktivierung von Syk und Superoxid-Anionen führen in tolerogenen dendritischen Zellen zu erhöhter Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und Erk sowie STAT-3**

Neben der Generierung von Superoxid-Anionen wurden die Syk nachgeschalteten Signalmoleküle mittels Immunblot analysiert.

Zunächst wurde die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und Erk und STAT-3 nach Stimulation mit Zymosan oder Curdlan untersucht. In Abbildung 4.21 ist zu sehen, dass neben der Hyperaktivierung der Kinase Syk die beiden MAP-Kinasen p38 und Erk in Lysaten von Dex-DC nach 30 min Stimulation mit Zymosan oder Curdlan stärker phosphoryliert waren als in Lysaten von iDC. Das gleiche galt für die Phosphorylierung von STAT-3. Hier war ein ähnlicher Effekt wie bei der Generierung von Superoxid-Anionen durch Dex-DC zu beobachten. Vermutlich durch das schon erwähnte geringere Zell:Partikel-Verhältnis fiel die Phosphorylierung von Syk, p38, Erk und STAT-3 bei Stimulation mit Curdlan im Vergleich zur Stimulation mit Zymosan geringer aus. Ein weiterer Grund könnte die geringere Generierung von Superoxid-Anionen durch Curdlan gewesen sein. Oxidativer Stress kann zu einer erhöhten Phosphorylierung von MAP-Kinasen und STAT-3 führen (Son u. a., 2011; Wu u. a., 2006; Keshari u. a., 2013; Hu u. a., 2011; Liu u. a., 2009; Chen u. a., 2015), was vor der Hintergrund der erhöhten Superoxid-Anion Bildung durch Dex-DC von Interesse ist.

In weiteren Untersuchungen wurde die Translokation einiger Transkriptionsfaktoren in den Zellkern nach Stimulation mit beta-Glukanen untersucht. In Abbildung 4.22 sind Immunblots von nukleären Lysaten zu sehen, in denen die aufgeführten Proteine mittels geeigneter Antikörper nachgewiesen wurden.

RelA als Vertreter der NF- $\kappa$ B Familie wurde in Dex-DC nach Stimulation für 4 h mit beta-Glukanen nur geringfügig in den Zellkern transportiert. Für c-Rel und RelB, zwei weitere Vertreter der NF- $\kappa$ B Familie wurde keine Translokation in die Zellkerne von Dex-DC beobachtet. iDC zeigten nach Dectin-1 Stimulation eine starke Translokation von c-Rel und RelB in ihre Zellkerne. p50, als weiterer Vertreter der NF- $\kappa$ B Familie, wurde in Dex-DC nach Stimulation von Dectin-1 in deren Zellkerne transportiert. Auch in Zellkernen von iDC konnte p50 nachgewiesen werden. Andere durch Dectin-1 aktivierte Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP.1 und c-Jun wurden nach Stimulation nicht in Zellkernen

von Dex-DC nachgewiesen. Der Transkriptionsfaktor PU.1, der wichtig für die korrekte Differenzierung dendritischer Zellen ist (Carotta u. a., 2010), war in Kernlysaten von iDC nachweisbar aber nicht in denen von Dex-DC.

Die Translokation von phosphorylierten STAT-Proteinen bewirkt ebenfalls die Transkription von Genen mit entsprechenden Promotorregionen. In Dex-DC wurde STAT-1 nicht in den Zellkern transloziert. In iDC konnte jedoch phosphoryliertes STAT-1 im Zellkern nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsfaktor IRF5 war in beiden Zelltypen auch ohne Stimulation von Dectin-1 im Zellkern nachzuweisen. In nukleären Lysaten von Dex-DC war eine etwas verringerte Menge feststellbar.

Zusammengefasst war die Translokation bekannter, durch Dectin-1 aktivierter Transkriptionsfaktoren, in Zellkerne von Dex-DC stark eingeschränkt. Dabei wird angenommen, dass die Transkription von IL-1beta abhängig von RelA ist (Hiscott u. a., 1993). Die Transkriptionsfaktoren STAT-1, AP.1, NFATC1 und c-Jun, deren nukleäre Translokation in Zellkerne von iDC durch Stimulation mit beta-Glukanen induziert wurde, waren nicht in den Zellkernen von Dex-DC nachweisbar. Für lebende Bakterien und LPS wurde eine essentielle Rolle von STAT-3 für die Produktion von IL-1beta in Makrophagen nachgewiesen (Samavati u. a., 2009).

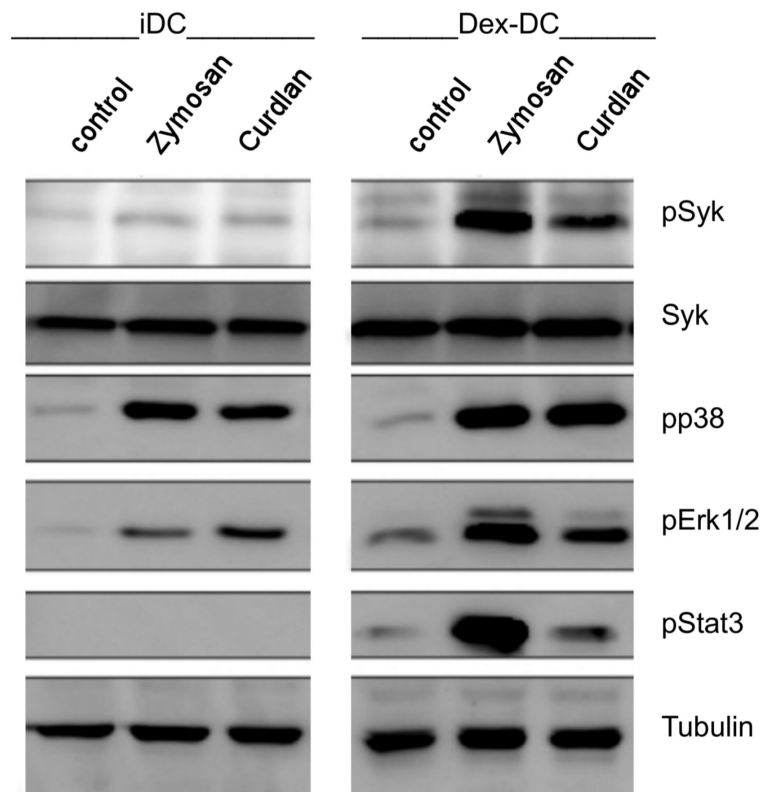


Abbildung 4.21: Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in iDC und Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen. In Lysaten von iDC und Dex-DC wurden die in der Abbildung aufgeführten Proteine mittels Immunblot nachgewiesen. Vor Lyse der Zellen wurden die Zellen für 30 min mit den Dectin-1-Agonisten Curdlan (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Zymosan (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Pro Gelspur wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen.

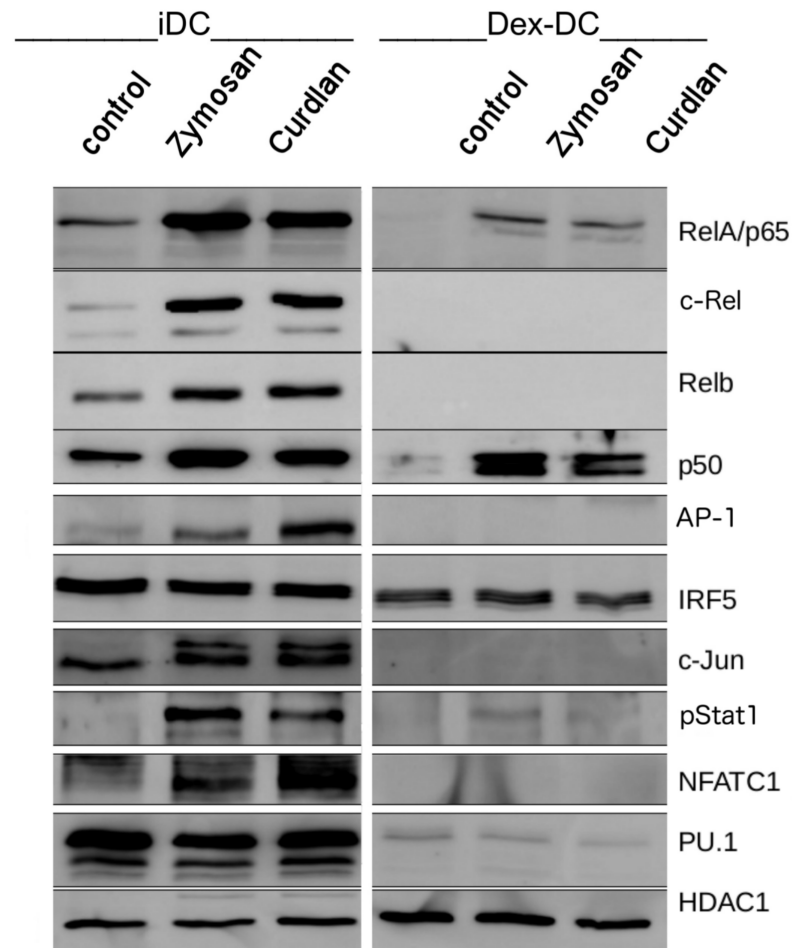


Abbildung 4.22: Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in iDC und Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen. In nukleären Lysaten von iDC und Dex-DC wurden die in der Abbildung aufgeführten Proteine mittels Immunblot nachgewiesen. Vor Lyse der Zellen wurden die Zellen für 4 h mit den Dectin-1-Agonisten Curdlan (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Zymosan (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Pro Gelspur wurden 20  $\mu\text{l}$  nukleäres Lysat von je  $2 \times 10^6$  Zellen aufgetragen.

## 4.6 Die Inhibition des Jak/STAT-Signalwegs erhöht die Expression von CD86 auf Dex-DC nach Stimulation mit LPS oder Curdlan

In einem weiteren Experiment wurde untersucht inwieweit die Phosphorylierung von STAT-3 für die fehlende Hochregulation kostimulatorischer Moleküle verantwortlich ist. In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen STAT-3-Phosphorylierung und Expression von CD80, MHC-Molekülen und CD86 gezeigt (z.B.: Levitzki (2012)).

In Abbildung 4.23 ist die Expression von CD86 auf tolerogenen dendritischen Zellen gezeigt. Wie zu sehen ist, bewirkte eine Inhibition des Jak/STAT-Signalwegs durch Ruxolitinib ( $1 \mu\text{M}$ ; 30 min vor Stimulation) nach 24 h eine deutlich höhere Expression von CD86 an der Oberfläche nach vorheriger Stimulation mit LPS oder Curdlan. Für MHC-Moleküle und CD80 konnte keine Veränderung der Oberflächenexpression nach Stimulation mit LPS oder Curdlan festgestellt werden.

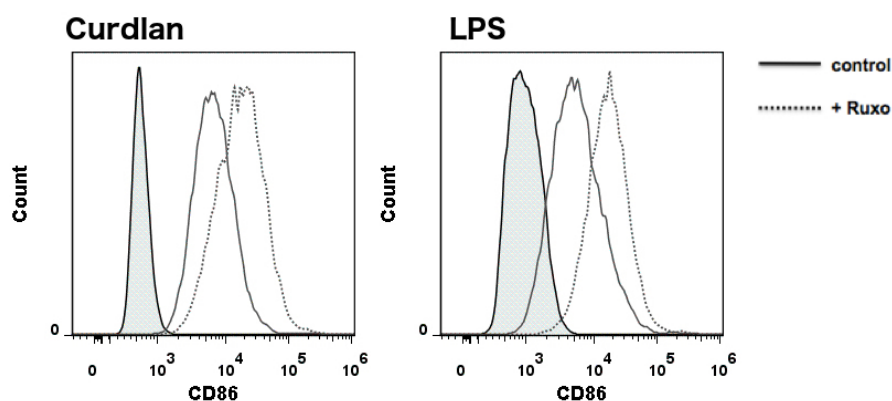
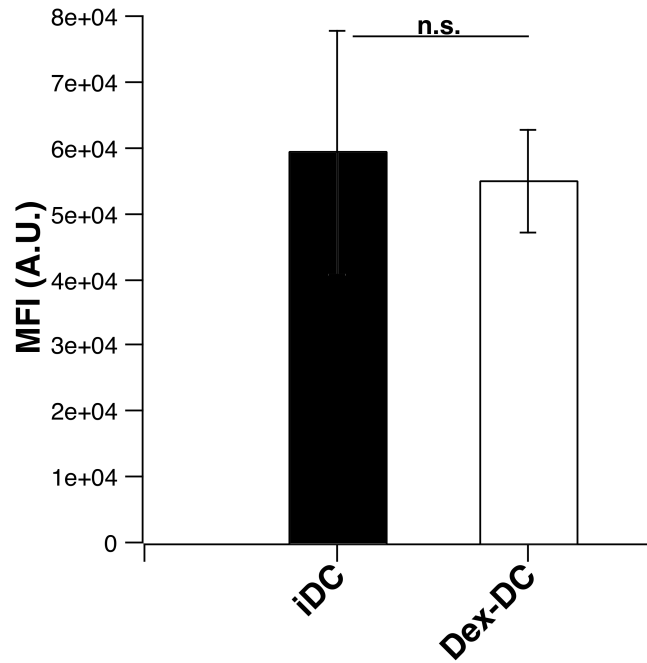


Abbildung 4.23: Einfluss von Ruxolitinib auf die CD86-Expression auf Dex-DC. Dex-DC wurden 30 min vor Stimulation mit  $100 \mu\text{g/ml}$  Curdlan oder  $100 \text{ ng/ml}$  LPS mit  $1 \mu\text{M}$  Ruxolitinib vorbehandelt. Nach 24 h wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf CD86-Expression untersucht. Das gefüllte Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle, das geschlossene Histogramm die Probe ohne Ruxolitinib-Vorbehandlung und das gepunktete Histogramm zeigt die mit Ruxolitinib vorbehandelten Proben.

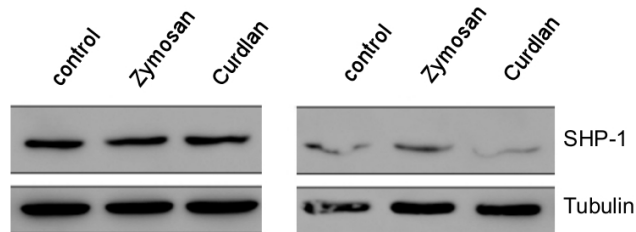
## 4.7 Die Expression der Phosphatase SHP-1 ist in Dex-DC herabgesetzt

Um die Ursache für die Hyperaktivität von Syk in Dex-DC zu erklären, wurden die Expression der beiden Phosphatasen SHP-1 und CD45 auf bzw. in iDC und Dex-DC untersucht. CD45 ist eine Phosphatase die nach Aufnahme von beta-Glukanen via Dectin-1 die Phosphorylierung an der cytoplasmatischen Region von Dectin-1 entfernt. Diese Phosphorylierungsstelle dient als Andockstelle für die Kinase Src und Syk Goodridge u. a. (2011). SHP-1 ist in B-Zellen und anderen Zellen verantwortlich für die Dephosphorylierung von Syk (Alsadeq u. a., 2014; Huang u. a., 2003; Reth und Brummer, 2004). Die Expression von CD45 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abbildung 4.24a sind mehrere Experimente zusammengefasst, die die Expression von CD45 (ausgedrückt als MFI) auf der Oberfläche von iDC und Dex-DC zeigen. CD45 wurde auf Dex-DC im Vergleich zu iDC in etwa gleich stark auf der Oberfläche exprimiert.

Mittels Immunblot wurde die Expression der Phosphatase SHP-1 untersucht. In Lysaten von iDC und Dex-DC ist wie in Abbildung 4.24b zu sehen ist, eine unterschiedliche Expression von SHP-1 beobachtet worden. Die Expression in Dex-DC war deutlich geringer als in iDC. Es wäre möglich, dass die verringerte SHP-1-Expression zu der Hyperaktivierung von Syk in Dex-DC beiträgt.



(a)



(b)

Abbildung 4.24: Expression von CD45 und SHP-1 in Dex-DC und iDC. (a) Expression von CD45 auf iDC und Dex-DC; N=4. (b) Expression von SHP-1 und Tubulin in iDC und Dex-DC.

## 4.8 DQ-BSA wird nach Anlagerung an Zymosan durch Dex-DC und iDC aufgenommen und anschließend prozessiert

Um die Funktion von Dectin-1 als Ziel für Antigen-Lieferung und die generelle Fähigkeit zur Antigenprozessierung in iDC und Dex-DC zu überprüfen, wurden Zymosan-Partikel mit DQ-BSA *gecoatet*. DQ-markiertes BSA diente als Modellprotein. Bei Abbau von DQ-markiertem BSA lassen sich die gebildeten Peptide mit einem blauen Laser anregen. Die angeregten Peptide emittieren eine grüne Fluoreszenz. Im intakten Zustand liegt DQ-BSA in einem selbstgequenchten Zustand vor.

Wie in Abbildung 4.25 zu sehen ist, wurde DQ-BSA von Hek293 Zellen aufgenommen und prozessiert. Dectin-1 spielte bei der Aufnahme offensichtlich keine Rolle. Werden jedoch Zymosan-Partikel für 30 min mit DQ-BSA *gecoatet*, erhöht sich die Fluoreszenzintensität der Dectin-1 transfizierten Hek293 Zellen im Vergleich zu Kontroll Hek293. DQ-BSA schien gemeinsam mit Zymosan über Dectin-1 aufgenommen worden zu sein. Hek293 die mit Leervektor transfiziert wurden, konnten nur freies DQ-BSA über Macropinozytose aufnehmen. An Zymosan gebundenes DQ-BSA, dass durch Dectin-1 transfizierte Hek293 Zellen aufgenommen wurde, schien schneller und effizienter prozessiert zu werden und setzt folglich mehr grüne Fluoreszenz frei. Für Dectin-1 transfizierte Zelllinien wurde gezeigt, dass aufgenommene beta-Glukane in endosomale Kompartimente transportiert werden (Herre u. a., 2004). In dieser Arbeit konnte dies auch für Hek293 Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.2).

Das obige Experiment wurde anschließend mit iDC und Dex-DC durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.26). Dendritische Zellen zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der Gesamtfluoreszenz wenn sie mit DQ-BSA bzw. DQ-BSA-*gecoateten* Zymosan für 30 bzw. 60 min inkubiert wurden.

Dex-DC zeigten hingegen nach 30 und 60 min eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität, wenn sie mit DQ-BSA-*gecoatetem* Zymosan inkubiert wurden.

Zur weiteren Untersuchung wurden iDC und Dex-DC zunächst auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen ausgesät und dann wie zuvor beschrieben



mit DQ-BSA und DQ-BSA-*gecoatetem* Zymosan inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen fixiert und auf Objektträgern fixiert. In Abbildung 4.26 sind iDC und Dex-DC in 400-facher Vergrößerung zu sehen. Wenn die Zellen nur mit DQ-BSA behandelt wurden, waren im Zytosol kleine grüne Strukturen zu erkennen, in denen das aufgenommene DQ-BSA abgebaut wird. Werden die Zellen mit *gecoatetem* Zymosan inkubiert, ist an vielen Stellen an denen Zymosan aufgenommen wurde eine intensive grüne Fluoreszenz nachweisbar. Einige Partikel die anscheinend erst kürzlich aufgenommen wurden waren blass grün bzw. noch nicht-fluoreszent. Zymosan-Partikel, die sich außerhalb der Zellen befinden, waren ebenfalls nicht-fluoreszent.

Das Experiment wurde mit Zymosan wiederholt, das mit DQ-BSA inkubiert wurde und danach zwei Mal mit PBS gewaschen wurde, um nicht angelagertes DQ-BSA zu entfernen. In Abbildung 4.28 sind Aufnahmen dieses Experiments zu sehen. Die Ergebnisse glichen in etwa den zuvor durchgeführten Experimenten. *Gecoatetes* Zymosan wurde aufgenommen und in Kompartimente transportiert in denen Abbau von Proteinen stattfindet.

Zusammengefasst scheint sich DQ-BSA als Modellprotein an Zymosan anlagern zu können. Da Zymosan ein poröses Material ist, ist es wahrscheinlich, dass DQ-BSA in Kavitäten des Materials eingeschlossen wurde. Das Zymosan diente als Vehikel für die Aufnahme von DQ-BSA. DQ-BSA wurde offensichtlich in dem selben Kompartiment wie Zymosan prozessiert. Hek293, die mit Dectin-1 transfiziert wurden, zeigten darüber hinaus, dass Dectin-1 Expression die Prozessierung von DQ-BSA erhöhte wenn dieses an Zymosan konjugiert ist. Ob dies Auswirkungen auf die Antigenpräsentation hatte, müsste in weiteren Experimenten überprüft werden. Die Experimente mit Dectin-1-exprimierenden Hek293 zeigt aber, dass Dectin-1 DQ-BSA-*gecoatetes* Zymosan erkennen und dessen Aufnahme vermitteln konnte. Ein murines Modell bestehend aus dendritischen Zellen und transgenen OT-I/II-Zellen und OVA als Modellprotein wäre darüber hinaus geeignet um zu prüfen ob OVA-Peptide verstärkt über MHC-I/II präsentiert werden. Festzuhalten ist, dass die Maschinerie zur Prozessierung von Antigenen in Dex-DC funktionierte.

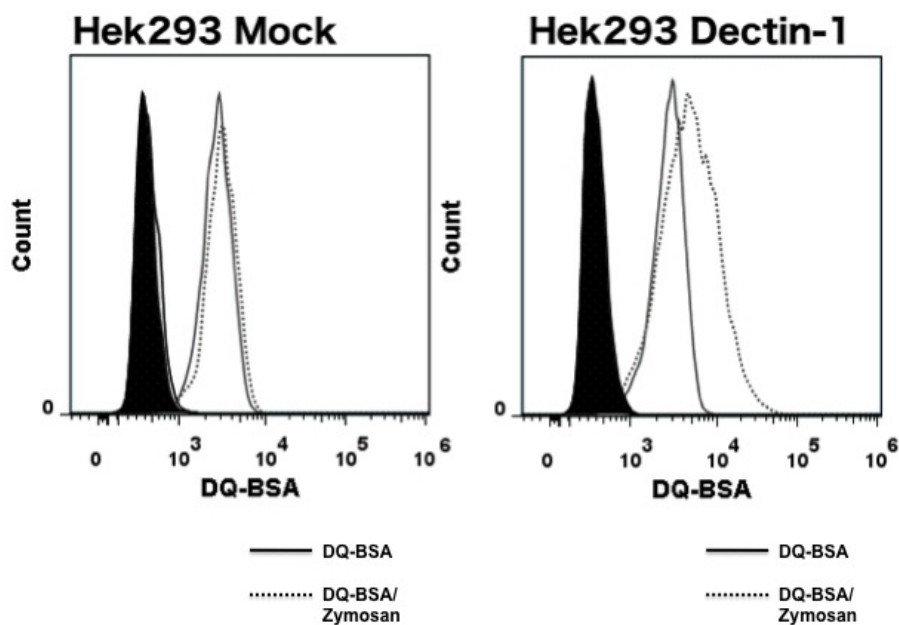


Abbildung 4.25: DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch Dectin-1 transfizierte Hek293 Zellen. Transfizierte Hek293 Zellen (Mock: Leervektor) wurden zusammen mit DQ-BSA *gecoateten* Zymosan-Partikeln ( $10 \mu\text{g}$  DQ-BSA pro  $100 \mu\text{g}$  Zymosan), Zymosan ( $100 \mu\text{g}$ ) oder DQ-BSA ( $10 \mu\text{g}$ ) für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und im FL1-Kanal durchflusszytometrisch untersucht. Die beiden geschlossenen Histogramme zeigen unbehandelte (schwarz getönt) und mit Zymosan (schwarz gefüllt) behandelte Zellen. Das offene Histogramm zeigt DQ-BSA behandelte Zellen und das gepunktete Histogramm zeigt Behandlung mit DQ-BSA *gecoateten* Zymosan-Partikeln.

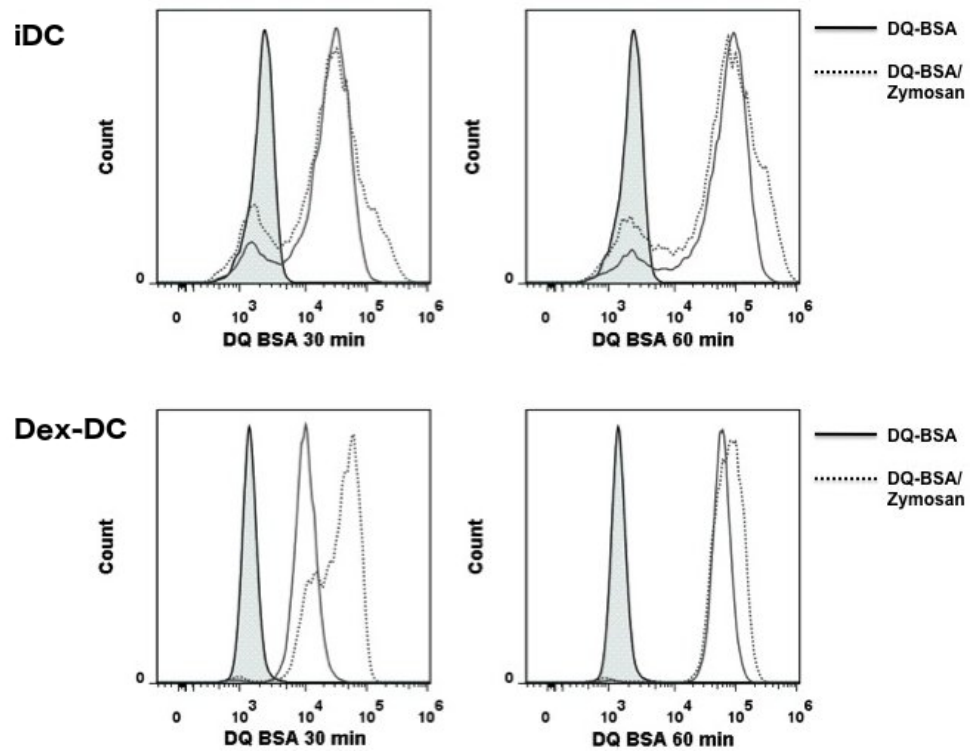


Abbildung 4.26: DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC. Beide Zelltypen wurden mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DQ-BSA bzw. einer Lösung von DQ-BSA + Zymosan (Endkonzentration DQ-BSA: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Zymosan: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse im FL-1 Kanal. Die geschlossenen Histogramme repräsentieren die Kontrollpopulationen nach 1 h bei 4°C.

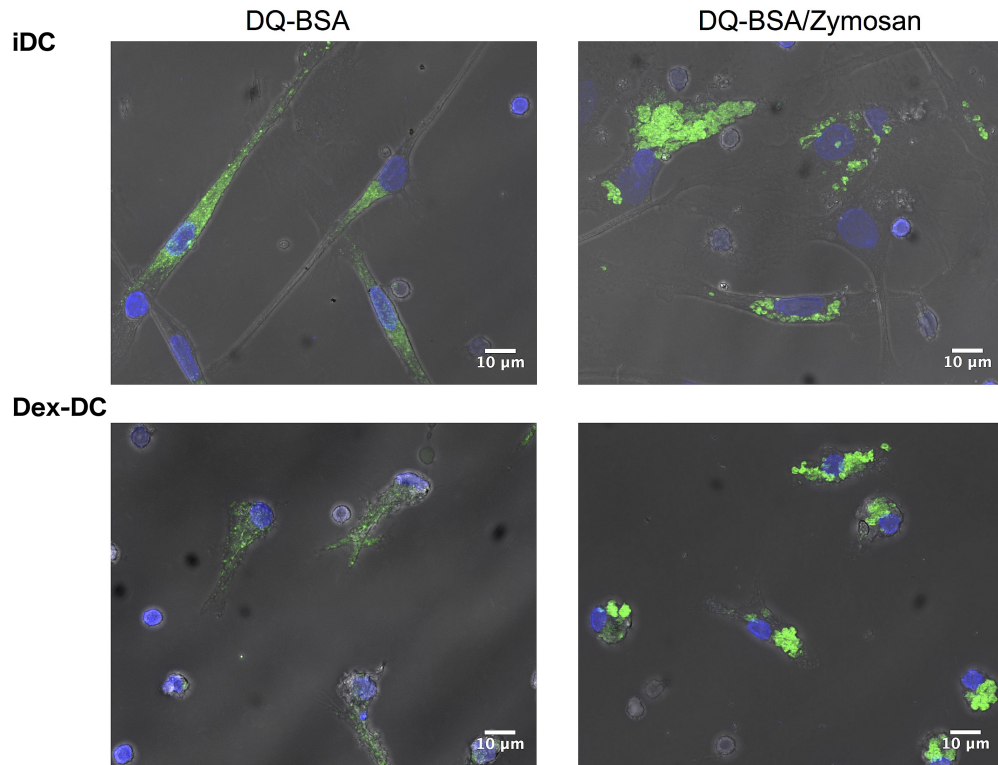


Abbildung 4.27: DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC. Beide Zelltypen wurden nach Adhäsion auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen für 2 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DQ-BSA bzw. einer Lösung von DQ-BSA + Zymosan (Endkonzentration DQ-BSA: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Zymosan: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden diese auf Objektträger *gemountet* und mikroskopisch analysiert. Dargestellt sind jeweils Maximumintensitätsprojektionen eines Z-Stapels. Grün: prozessiertes DQ-BSA; blau: DNA. Vergrößerung 400-fach.

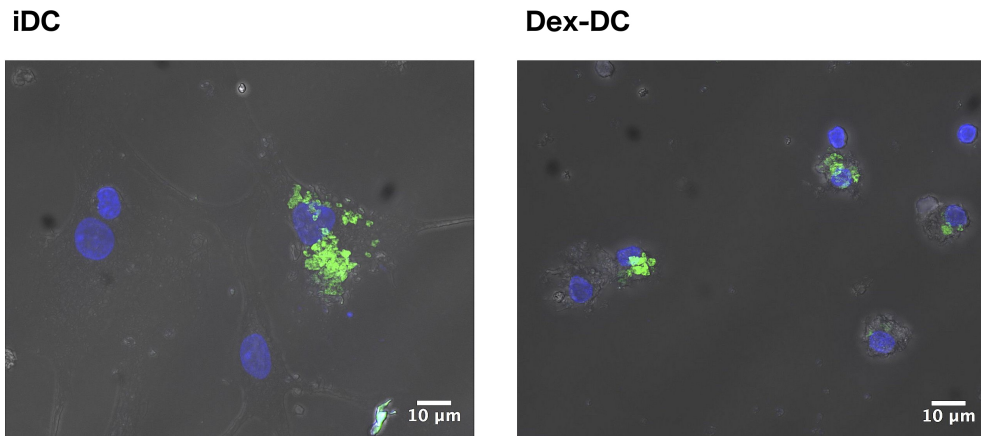


Abbildung 4.28: DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC. Beide Zelltypen wurden nach Adhäsion auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen für 2 h mit 100 µg/ml Zymosan-partikeln inkubiert das zuvor für 1 h mit einer DQ-BSA Lösung (1mg/ml) bei 37 °C inkubiert wurde. Das Zymosan wurde dann zwei Mal gewaschen und zu den Zellen gegeben. Nach Fixierung der Zellen wurden diese auf Objektträger *gemountet* und mikroskopisch analysiert. Dargestellt sind jeweils Maximumintensitätsprojektionen eines Z-Stapels. Grün: prozessiertes DQ-BSA; blau: DNA. Vergrößerung 400-fach.

## 5 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Dectin-1-vermittelte Immunantwort durch tolerogene dendritische Zellen untersucht. Schwerpunkt der Analyse lag dabei auf Dexamethason-induzierten tolerogenen dendritischen Zellen (Dex-DC). IL-10-induzierte tolerogene dendritische Zellen (IL-10 APC) wurden in einigen Experimenten ebenfalls untersucht und zeigten ein ähnliches Verhalten nach Stimulation von Dectin-1 auf ihrer Oberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass tolerogene dendritische Zellen nach Stimulation mit Dectin-1-Agonisten verstärkt die Kinase Syk phosphorylieren, IL-1 $\beta$ /IL-10 sezernieren und Superoxid-Anionen bilden. Die Aktivierung von allopathen T-Zellen ist diesen Zellen nicht möglich. Vermutlich aufgrund der fehlenden Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und gleichzeitig erhöhter Expression von PD-L1 auf Dex-DC nach Stimulation mit Dectin-1 Liganden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression von Annexin 1 die Dectin-1 vermittelte Aufnahme von beta-Glukanen beeinflusst. Es konnte eine Kollokalisierung von Dectin-1 und Annexin-1 auf phagosomalen Strukturen nachgewiesen werden, wenn dendritische Zellen oder transfizierte Schneider S2 Zellen zusammen mit hitzeinaktivierten *C. albicans* (HKCA) inkubiert wurden. Außerdem konnte eine Calcium-abhängige, aber Dectin-1-unabhängige, Bindung von Annexin 1 an Zymosan und HKCA gezeigt werden.

Die Klonierung und Expression der extrazellulären Domäne von Dectin-1 (Dectin-1 ECD) erlaubte es Bindungsstudien an Zellen durchzuführen. Die Dectin-1-ECD bindet an 7AAD-positive Jurkat-Zellen die zuvor für 16 h mit Staurosporin inkubiert oder UV-C Strahlung ausgesetzt wurden. Der Ligand auf der Oberfläche von spätapoptotischen Jurkat-Zellen ist jedoch wahrscheinlich nicht Annexin 1, obwohl Annexin 1 auf phagosomalen Strukturen mit Dectin-1 kolokalisiert und bei Präzipitation zusammen mit Dectin-1 eluiert wurde. Welchen Liganden Dectin-1 auf spätapoptotischen Jurkat Zellen bindet, bleibt unklar.

Im Folgenden werden die einzelnen Bestandteile der oben zusammengefassten Ergebnisse diskutiert.

## 5.1 Annexin 1 und Dectin-1 kolokalisieren bei der Aufnahme von Dectin-1 Liganden

Dectin-1 ließ sich problemlos auf der Zelloberfläche von Hek293 und Schneider S2 Zellen exprimieren (Abbildungen 3.2, 3.5, 3.10, 3.12). Dass die Transfektion von Zelllinien mit Dectin-1-kodierenden Plasmiden ausreicht, um diesen die Aufnahme von beta-Glukanen zu ermöglichen wurde bereits häufig angewendet um die Funktion von Dectin-1 zu charakterisieren (Brown, 2006; Underhill u. a., 2005; Brown u. a., 2002; Carvalho u. a., 2012; Herre u. a., 2004).

Für Schneider S2 Zellen und dendritischen Zellen konnte gezeigt werden, dass Annexin 1 und Dectin-1 während der Aufnahme von hitzeinaktivierten *C. albicans* kolokalisieren (Abbildung 3.7 und 3.16). Annexin 1 ist ein Protein mit immunmodulatorischen Eigenschaften, welches aber auch bei der Reparatur und Fusion von Membranen eine Rolle spielt (Leoni u. a., 2013). Auch seine Lokalisation auf Phagosomen wurde bereits beschrieben (Patel u. a., 2011; Diakonova u. a., 1997). Die Phagozytose von apoptotischen Zellen scheint ebenfalls abhängig von Annexin 1 zu sein (Tzelepis u. a., 2015). Welche Rolle Annexin 1 auf Phagosomen spielt, die Dectin-1-Liganden beinhalten bleibt im Rahmen dieser Arbeit unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ein *Knockout* von Annexin 1 in Dectin-1-transfizierten Hek293 Zellen die Aufnahme von Zymosan signifikant verringert (Abbildung 3.10). Es ist möglich, dass die Fusion der phagosomalen Synapse, die Dectin-1 vor der Partikelaufnahme formt, (Underhill und Goodridge, 2012; Niedergang u. a., 2016) mit der Zellmembran durch Abwesenheit von Annexin 1 inhibiert wird. Solch eine Rolle für Annexin 1 wurde für die Aufnahme von apoptotischen Zellen bereits beschrieben (Arur u. a., 2003; Fan u. a., 2004; Blume u. a., 2009). Die Phosphorylierung von Syk wurde durch *Knockout* von Annexin 1 in Hek293 nicht beeinflusst (Abbildung 3.13). Ebenso wurde die Dectin-1 Expression an der Oberfläche nicht beeinflusst (Abbildung 3.11).

Eine direkte Bindung von Annexin 1 an *C. albicans* ist in der Literatur bereits beschrieben worden. Lilly u. a. (2010) zeigten, dass Annexin 1 auf oralen

Epithelzellen an *C. albicans* bindet und so dessen Wachstum hemmt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Annexin 1 *in vitro* Calcium-abhängig an partikuläre beta-Glukane binden kann. Vermutlich sind jedoch eher Phospholipide, die in den Präparationen von Zymosan und HKCA vorkommen die eigentlichen Bindungsstellen für Annexin 1. Ob diese Interaktion *in vivo* eine Rolle spielt, ist schwer zu beurteilen, da millimolare Calcium-Konzentrationen notwendig waren um eine Bindung nachweisen zu können (Abbildungen 3.14, 3.15). Millimolare Calcium-Konzentrationen werden *in vivo* nicht erreicht. Genauso unklar bleibt die genaue Bindungsstelle von Annexin 1 an HKCA oder Zymosan. Neben beta-Glukanen enthalten Zymosan und HKCA andere mögliche Bindungsstellen. Dass Calcium bei der Phagozytose eine wichtige Rolle spielt wurde jedoch mehrfach beschrieben. So spielt Calcium bei der Depolymerisation des Actin-Cytoskeletts eine wichtige Rolle (Nunes und Demarex, 2010). Für Annexin 1 konnte gezeigt werden, dass Annexin 1 bei der Phagozytose von Latex-beads auf frühen Phagosomen lokalisiert (Patel u. a., 2011). Bei der Aufnahme von Dectin-1-Liganden scheint Annexin 1 auch eher auf frühen Phagosomen lokalisiert zu sein, da nicht alle beobachteten Dectin-1-positiven Phagosomen positiv für Annexin 1 waren (3.16 und 3.17). Stimulation mit Dectin-1-Liganden führt in dendritischen Zellen darüber hinaus zu erhöhtem Calcium-Influx. Dectin-1 vermittelter Ca-Influx war dabei abhängig von der Integrität von *Lipid Rafts*. Zusammen mit verringertem Ca-Influx reduzierte sich nach Auflösung der *Lipid Rafts* die Syk- und Erk-Phosphorylierung (Xu u. a., 2009). Öhman u. a. (2014) zeigten, dass Stimulation von humanen Makrophagen mit Curdlan zur Freisetzung von Exosomen führt. Diese Exosomen waren Annexin 1 positiv und ihre Freisetzung IL-1beta abhängig. Die Freisetzung von IL-1beta und den Exosomen war dabei Autophagie-abhängig. LC3, als Marker für Autophagosomen, kolokalisiert auf Dectin-1 positiven Phagosomen von Makrophagen und dendritischen Zellen die mit *heat-killed* oder lebenden *C. albicans* stimuliert wurden (Ma u. a., 2012). Die gleiche Gruppe zeigte, dass dieser Vorgang abhängig von Syk und der Bildung von Superoxid-Anionen ist. Für Exosomen, die durch tolerogene dendritische Zellen freigesetzt werden, wurde gezeigt, dass diese anti-inflammatorisch wirksam sind (Kim u. a., 2005).

In *knockout*-Modellen konnte bereits ein Einfluss auf die Aufnahme von Zymosan durch Annexin 1 nachgewiesen werden (Yona u. a., 2006). Ein ge-



nauer Mechanismus wie Annexin 1 die Aufnahme von Zymosan reguliert blieb ungenannt. Zum einen könnte Annexin 1 die Modellierung von F-Actin bei der Aufnahme von beta-Glukanen beeinflussen (Patel u. a., 2011) und so eher eine generelle Rolle bei der Aufnahme von partikulärem Material spielen (Wagner u. a., 2011). Darüberhinaus spielt Annexin 1 eine Rolle bei der Fusion von Plasmamembranen (Gerke u. a., 2005; McNeil u. a., 2006). Annexin 1 scheint außerdem bei der Prozessierung aufgenommener Antigene eine wichtige Rolle zu spielen (Tzelepis u. a., 2015). Gegen eine generelle Rolle von Annexin 1 bei der Aufnahme von partikulärem Material sprechen allerdings die Ergebnisse von Kusumwati et al. (Kusumawati u. a., 2000, 2001), die ligandenspezifische Assoziation von Annexin 1 an phagosomale Membranen feststellen konnten. Darüber hinaus konnte diese Gruppe zeigen, dass Phosphorylierung von Annexin 1 an Ser27 wichtig für die Assoziation an phagosomale Strukturen ist. Gegen eine ausschließliche Rolle von Annexin 1 bei der Modellierung des Aktin-Cytoskeletts bei Initiierung der Aufnahme von Material sprechen die Erkenntnisse von Yona u. a. (2006). Es konnte in Annexin 1 defizienten Makrophagen kein Defekte des Aktin-Cytoskeletts bei Aufnahme von Zymosan beobachtet werden. Allerdings war die Aufnahme verringert. Außerdem wurde festgestellt, dass die Zytokine IL-1beta, IL-6 und TNF-alpha in erhöhten Mengen von Annexin 1 defizienten Zellen ausgeschüttet werden (Hannon u. a., 2003; Yang u. a., 2009).

## **5.2 Dectin-1-Transfektion erhöht die Aufnahme von spätapoptotischen Zellen**

Um weitere Bindungsstudien durchzuführen, wurde die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 (Dectin-1-ECD) in *E. coli* exprimiert und anschließend aus Lysaten aufgereinigt (Abbildung 3.18). Jurkat Zellen, die Annexin 1 externalisieren wenn sie mit Staurosporin behandelt werden (Blume u. a., 2009), wurden für Bindungsstudien eingesetzt (Abbildung 3.20). Die Dectin-1-ECD bindet schwach an 7AAD-negative Zellen und verstärkt an 7AAD-positive Jurkat Zellen. Für Dectin-1 werden immer wieder endogene Liganden diskutiert. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben wurde, erkennt Dectin-1 Kohlenhydrat-Strukturen auf Tumorzellen (Chiba u. a., 2014), interagiert mit

dem Strukturprotein Vimentin (Thiagarajan u. a., 2013) und dem Tetraspanin CD37 (Meyer-Wentrup u. a., 2007; Yan u. a., 2014). Die Erkennung von apoptotischen oder nekrotischen Zellen durch Dectin-1 wird kontrovers diskutiert. Weck u. a. (2008) beschreiben die Bindung von Dectin-1 an apoptotische Zellen, während Ahrens u. a. (2012), Neumann u. a. (2014), Sancho u. a. (2009) und Hesse (2011) keine direkte Bindung feststellen konnten. Dass C-Typ Lektine geschädigte Zellen binden können, haben Ahrens u. a. (2012) und Zhang u. a. (2012) für CLEC9A zeigen können, das Actin-Filamente bindet sobald diese durch Verlust der Membranintegrität zugänglich für Interaktionen mit extrazellulären Rezeptoren sind. Hesse (2011) beschrieb für Dectin-1 zumindest eine indirekte Rolle bei der Aufnahme von apoptotischen Zellen. Für mit Dectin-1 transfizierte Makrophagen wurde durch Hesse (2011) eine erhöhte Aufnahme von sekundär nekrotischen Zellen gezeigt. Ein ähnliches Ergebnis konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (Abbildung 3.22). Albert u. a. (2000) zeigten bereits, dass Hek293 Zellen apoptotische Zellen aufnehmen können und dabei einen ähnlichen Mechanismus wie DCs nutzen. In der vorliegenden Arbeit erhöhte die Transfektion von Hek293 mit Dectin-1-mRFP die Aufnahme geschädigter Zellen leicht, aber signifikant 3.22. Wie Dectin-1 die Aufnahme erhöht bleibt unklar.

Koimmunpräzipitationen aus doppelt-transfizierten Schneiderzellen konnten eine Ko-Elution von Dectin-1 und Annexin 1 zeigen. Dies konnte jedoch für *in vitro* generierte dendritische Zellen nicht gezeigt werden. Es könnte sich aufgrund der Überexpression um ein Artefakt handeln.

### **5.3 Generierung tolerogener dendritischer Zellen mittels Dexamethason**

Zur Charakterisierung von Dex-DC wurden in dieser Arbeit die Expression von Oberflächenmarkern und die Dectin-1-vermittelte Signalweiterleitung mit iDC verglichen.

Dexamethason schien die Expression oder die Translokation an die Zelloberfläche von Dectin-1 zu stimulieren. In anderen Arbeiten wurde eine negative Regulation der Dectin-1-Expression beobachtet (Willment u. a., 2003). Allerdings handelte es sich in diesem Fall um murine Modelle und kurzzeitige

Inkubationen mit Dexamethason.

Neben einer stark erhöhten Dectin-1-Expression (Abbildung 4.1a und b) exprimierten Dex-DC kein CD1a, weniger DC-SIGN, HLA-DR und CD11c und erhöhte Level von PD-L2 (Abbildung 4.6). Nach Stimulation mit LPS oder beta-Glukanen wurden auf Dex-DCs Reifungsmarker wie CD80, CD83 und CD86 nicht hochreguliert (Abbildung 4.2 und 4.3). Allerdings erhöhte sich die Expression des inhibitorischen Moleküls PD-L1 nach Stimulation von Dectin-1 wie bei iDC (Abbildung 4.4). Beides zusammen trägt vermutlich zur fehlenden Fähigkeit von Dex-DC bei allogene T-Zell-Proliferation zu induzieren oder die Produktion von IFN- $\gamma$  zu induzieren (Abbildung 4.13 und 4.14).

Stimulation mit beta-Glukanen führte bei beiden Zelltypen zur Internalisierung von Dectin-1 (Abbildung 4.5). Dex-DC exprimierten darüber hinaus die Chemokinrezeptoren FPR2, CXCR4 und CCR7 (Abbildung 4.7), was für vorhandene migratorische Fähigkeiten spricht. FPR2-Expression wurde auf Dex-DC und iDC erst nach der Stimulation mit Curdlan nachgewiesen. Vermutlich sind die migratorischen Fähigkeiten von Dex-DC nicht eingeschränkt.

Während ihrer Generierung schütteten Dex-DC IL-10 aus (Abbildung 4.8). Bereits nach einer einzigen Stimulation der Monozyten mit Dexamethason/IL-4/GM-CSF war im Überstand IL-10 in geringen Mengen nachweisbar. Die IL-10 Konzentration im Zellkulturmedium stieg bis Tag 6 auf etwa 70 pg/ml. An Tag 6 war auch in IL-4/GM-CSF stimulierten Monozyten IL-10 in einer Konzentration von etwa 10 pg/ml nachweisbar. In einigen Versuchen in diesem Labor wurden tolerogene dendritische Zellen durch Zugabe von IL-10 induziert (IL-10-APC). IL-10-APC zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Dex-DC. Einige davon sind in dieser Arbeit gezeigt und werden später diskutiert. Der Phänotyp von Dex-DC war vermutlich zum Teil auch auf die Sekretion von IL-10 während ihrer Reifung zurückzuführen.

## 5.4 Dex-DC lösen nach Stimulation von Dectin-1 eine starke Reaktion von Mechanismen des angeborenen Immunsystems und erhöhte IL-10 sowie IL-1beta Sekretion aus

Die Expression von Dectin-1 ist in tolerogenen dendritischen Zellen (Dex-DC und IL10-APC) im Vergleich zu konventionellen, aus Monozyten generierten, dendritischen Zellen stark erhöht (Abbildung 4.1 a und b). In dieser Arbeit wurde die Dectin-1 vermittelte Signalweiterleitung in Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen untersucht. Die Behandlung mit dem Inhibitor R406 hat in den vorliegenden Experimenten gezeigt, dass die Sekretion der untersuchten Zytokine von Syk abhängig ist.

Das Zytokinprofil von Dex-DC unterschied sich von dem von iDC. Dex-DC sezernierten nach Stimulation mit Curdlan mehr IL-10 als iDC. Die Sekretion von IL-10 wurde durch Inhibition von Syk mit R406 deutlich abgesenkt (Abbildung 4.18a). Rogers u. a. (2005) zeigten, dass Syk insbesondere für die Bildung von IL-10 und IL-2 benötigt wird. *Syk-knockout* BMDCs zeigten in dieser Veröffentlichung nach Stimulation mit Zymosan eine normale Sekretion von IL-12 aber keine Sekretion von IL-2 und IL-10. Mutation am ITIM-Motif von Dectin-1 oder Dectin-1-Mutanten ohne intrazelluläre Domäne zeigten das gleiche Ergebnis. Syk bindet nach Phosphorylierung des ITIM-Motifs an Dectin-1. In der selben Veröffentlichung zeigten *MyD88-knockout* BMDCs keine Einschränkungen bei IL-10 und IL-2 Sekretion. Ein Transfektionsmodell zeigte darüberhinaus, dass die Transfektion von Dectin-1 in LK-Zellen ausreichend ist um IL-10 Produktion in diesen Zellen nach Stimulation mit Zymosan zu induzieren. MyD88-vermittelte Signalweiterleitung findet bei Dectin-1/TLR Co-Ligation statt und führt zu IL-12 Sekretion in DCs. Dieses Ergebnis passt zu der hier beobachteten erhöhten IL-10 Sekretion nach verstärkter Phosphorylierung von Syk (Abbildung 4.15). Dectin-1/Syk-Signalweiterleitung scheint somit besonders für Bildung und Sekretion von IL-10 verantwortlich zu sein und über einen eigenen Signalweg vermittelt zu werden. In Dex-DC konnte hier gezeigt werden, dass Syk-vermittelte Signalweiterleitung nach Stimulation mit beta-Glukanen dominiert und zu erhöhter IL-10 führt. Dazu passt die bei Dex-DC beobachtete reduzierte TNF-alpha und IL-12 Sekretion. Meyer-Wentrup u. a.

(2005) zeigten bereits, dass Zymosan auf DCs Dectin-1, Dectin-1/TLR2 oder TLR2 stimulieren und dabei unterschiedliche Sekretion von Zytokinen auslösen kann. Dectin-1 Stimulation führt zu IL-10 und IL-2 Sekretion. Dectin-1/TLR2 Stimulation führt zu TNF-alpha und IL-12 Sekretion. TLR2 Stimulation führt zu geringerer IL-12 und TNF-alpha Sekretion .

Die Sekretion von IL-6 unterschied sich zwischen den beiden Zelltypen nicht. R406 inhibierte die Sekretion von IL-6 durch iDC und Dex-DC (Abbildung 4.18b). TNF-alpha wurde in beiden Zelltypen nach Stimulation mit Curdlan sezerniert. Dabei war die Sekretion in Dex-DC deutlich verringert. Die Sekretion ist bei beiden Zelltypen Syk-abhängig (Abbildung 4.18c).

Die beiden Zytokine der IL-12-Familie IL-12p70 und IL-23 wurden von Dex-DC nicht sezerniert, wenn sie mit Curdlan stimuliert wurden. iDC sezernierten geringe Mengen IL-12p70 bei Stimulation mit Curdlan. IL-23 wurde nur durch iDC nach Stimulation mit Curdlan sezerniert und nicht durch Dex-DC. Syk-Inhibition durch R406 zeigte eine Verringerung der IL-23 Sekretion (Abbildung 4.18e). IL-23 kann durch oxidativen Stress inhibiert werden (Kroening u. a., 2008; Ghoreschi u. a., 2011). Zymosan- und Curdlan-Stimulation induziert die Bildung von Superoxid-Anionen in iDC und Dex-DC. Die Bildung ist dabei in Dex-DC stark erhöht. In Dex-DC sorgte der erhöhte oxidative Stress durch Stimulation von Dectin-1 mit Zymosan oder Curdlan möglicherweise für die Inhibition der IL-23 Sekretion. Das Chemokin RANTES (CCL5) wird von beiden Zelltypen sezerniert. R406 verringert die RANTES-Sekretion durch Dex-DC und iDC (Abbildung 4.18f). RANTES wirkt als chemotaktisches Molekül und ist an inflammatorischen Prozessen beteiligt und lockt andere Leukozyten wie NK-Zellen und Makrophagen zur Entzündungsstelle (Sakthivel u. a., 2008).

IFN-beta wurde durch Stimulation mit LPS von beiden Zelltypen sezerniert. iDC sezernierten höhere Mengen IFN-beta als Dex-DC. Curdlan-Stimulation führte zu keiner Sekretion von IFN-beta (Abbildung 4.19). IFN-beta trägt zur Bekämpfung von *C. albicans* (del Fresno u. a., 2013). In dieser Arbeit konnte keine durch den Dectin-1-Liganden Curdlan induzierte IFN-beta Sekretion beobachtet werden.

Die Sekretion von IL-1beta durch Dex-DC war um ein Vielfaches erhöht wenn diese mit beta-Glukanen stimuliert wurden. LPS-Stimulation führte zu einer geringen, in beiden Zelltypen vergleichbaren Sekretion von IL-1beta.

Die Sekretion war im Falle von Dex-DC Caspase- und Syk-abhängig. Inhibition von oxidativem Stress durch NAC führte nicht zu einer Verringerung der Sekretion von IL-1beta nach Stimulation mit Curdlan (Abbildung 4.18). Die Aktivierung von Dectin-1 auf Dex-DC führte also vermutlich zur Aktivierung von mindestens zwei Signalwegen die durch Syk vermittelt werden. Erstens ein Signalweg der die Generierung von Superoxid-Anionen stimulierte, welche die Phosphorylierung von weiteren *downstream*-Molekülen verstärkten, sowie die Caspase-abhängige Aktivierung des Inflammasoms, was zur Produktion, Spaltung und Freisetzung von IL1-beta führte. Dies unterscheidet Dex-DC wesentlich von Makrophagen, die mit beta-Glukanen stimuliert wurden. Für Makrophagen wurde gezeigt, dass die Inhibition von ROS zu einer Verringerung der IL-1beta Sekretion führt (Kankkunen u. a., 2010). Auch in weiteren Studien wurde die Abhängigkeit der Inflammasom-Aktivität von ROS gezeigt (Hise u. a., 2009; Tavares u. a., 2015). Andere haben gezeigt, dass ROS das Inflammasom inhibieren können oder seine Aktivierung ROS-unabhängig ist (Tschopp und Schroder, 2010; van de Veerdonk u. a., 2010; Bauernfeind u. a., 2011; Shio u. a., 2015; Iyer u. a., 2013). Da nicht alle ROS-stimulierenden Substanzen IL-1beta Freisetzung auslösen, bleibt die genaue Rolle von ROS bei der Aktivierung des Inflammasoms unklar. Darüber hinaus ist eine erhöhte Aktivierung des Inflammasoms bzw. IL-1beta Sekretion durch Dectin-1 Stimulation in einer erhöhten Freisetzung von Exosomen führt, die immunstimulatorische Eigenschaften haben (Öhman u. a., 2014).

Durch die Untersuchung der Zytokin/Chemokin-Sekretion von Dex-DC und die beobachtete Abhängigkeit von Syk wurde die Aktivität dieser Kinase in iDC und Dex-DC nach Stimulation von Dectin-1 untersucht. Syk wird in Dex-DC im Vergleich zu iDC hyperaktiviert (Abbildung 4.15). Diese Hyperaktivierung sorgte vermutlich für eine starke Freisetzung von Superoxid-Anionen (Abbildung 4.16 und 4.17). Superoxid-Anionen wurden durch Dex-DC in Abhängigkeit von Dectin-1 und Syk gebildet. LPS induzierte keine Bildung von Superoxid-Anionen (Abbildung 4.16b). Superoxid-Anionen reagieren in der Zelle ggf. weiter zu Peroxynitrit, welches NF- $\kappa$ B inhibieren kann (Levrant u. a., 2005). Die *downstream* Moleküle des Syk-Signalwegs wurden in Folge der Hyperaktivierung von Syk ebenfalls in den ersten Minuten nach Stimulation mit Dectin-1-Liganden verstärkt aktiviert. Dazu zählen die MAP-Kinasen p38

und Erk und STAT-3 (Abbildung 4.21). Vermutlich durch Superoxid-Anionen, die durch Zymosan oder Curdlan induziert wurden, waren diese vorher genannten Proteine in Lysaten von Dex-DC stärker phosphoryliert als in iDC. Dass oxidativer Stress STAT3 aktivieren kann, wurde mehrfach gezeigt (Li u. a., 2012; Ng u. a., 2014; Reuter u. a., 2010; Carballo u. a., 1999; Dudley u. a., 2004). Interessanterweise führte die verstärkte Aktivierung des Syk-Signalwegs nicht zu einer erhöhten Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern von Dex-DC. RelA, c-Rel und RelB als NF $\kappa$ B Vertreter, wurden nur geringfügig in den Zellkern von Dex-DC transportiert wenn diese mit beta-Glukanen stimuliert werden. NFAT, PU.1, AP-1, c-Jun und pStat1 konnten nicht in Kernlysaten von Dex-DC nachgewiesen werden. Vor allem AP-1 ist wichtig für eine Dectin-1 vermittelte Zytokin-Sekretion. Dabei interagiert Dectin-1 mit CR-3 (Huang u. a., 2015), welcher auf Dex-DC niedriger exprimiert wurde. Lediglich p50 (NF- $\kappa$ B-Familie) und IRF5 konnten in vergleichbarer Menge in den Kernen von iDC und Dex-DC nachgewiesen werden (Abbildung 4.22). p50 kann als Dimer die Transkription von vielen pro-inflammatorischen Zytokinen hemmen, jedoch die Transkription von IL-10 stimulieren (Driessler u. a., 2004; Conner u. a., 2010; Cao u. a., 2006). Gringhuis u. a. (2011) haben gezeigt, dass Syk-*knockout* mittels siRNA die Sekretion von IL-1beta, IL-23, IL-6 und IL-12 verringert.

STAT-3 scheint in Dex-DC teilweise für die Inhibition der Reifung verantwortlich zu sein. Neben der erhöhten STAT-3-Aktivierung wurde durch Inhibition des Jak/Stat-Signalwegs mittels Ruxolitinib die Expression von CD86 auf Dex-DC nach Stimulation mit LPS und Curdlan deutlich erhöht (Abbildung 4.23). Dass STAT-3 die Expression von CD86 und anderen Proteinen wie CD80, MHC-II sowie IL-12 kontrolliert, wurde bereits mehrfach beschrieben. STAT-3 inhibiert so die Reifung von dendritischen Zellen (Levitzki, 2012).

Die verstärkte Sekretion von IL-1beta ist möglicherweise ebenfalls auf aktiviertes STAT-3 zurückzuführen. Es wurde gezeigt, dass die Sekretion von IL-1beta von STAT-3 abhängig ist (Samavati u. a., 2009; Lee u. a., 2006). Zu einem späteren Zeitpunkt sorgt IL-10 Sekretion für eine anhaltenden STAT-3 Aktivierung (Liu u. a., 2013).

Neben der Ausschüttung von Zytokinen, phagozytierten Dex-DC verstärkt Zymosan und apoptotische Zellen (Abbildung 4.9 und 4.12). Die erhöhte Zymosan-Aufnahme war vermutlich auf die erhöhte Expression von Dectin-1

zurückzuführen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass Dex-DC weitere Rezeptoren exprimieren die Zymosan erkennen und eine Aufnahme ins Zellinnere können. CD11b, welches zusammen mit CD18 als CR3 Heterodimer auch beta-Glukane erkennt, war allerdings auf Dex-DC geringer exprimiert (Abbildung 4.4).

Apoptotische Zellen werden über verschiedene Rezeptoren erkannt und aufgenommen. Darunter sind C-Typ Lektine, Integrine, TIMs und *Scavenger*-Rezeptoren (Hochreiter-Hufford und Ravichandran, 2013; Sancho und Reis e Sousa, 2013). Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 die Aufnahme von geschädigten Zellen leicht erhöht. Dectin-1 auf Dex-DC könnte demzufolge auch mit verantwortlich für die erhöhte Aufnahme apoptotischer Zellen sein, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 4.12). Eine weitere Charakterisierung der Oberflächenrezeptoren wäre aber nötig um den Anteil anderer Rezeptoren einschätzen zu können.

Eine mögliche Erklärung warum Syk in Dex-DC verstärkt aktiviert wird, ist vermutlich zum einen die höhere Expression von Dectin-1 und zum anderen möglicherweise die geringere Expression der Phosphatase SHP-1 (Abbildung 4.24b). SHP-1 kann außerdem zusätzlich durch reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid-Anionen inaktiviert werden (Meng u. a., 2002). Wie sich SHP-1 auf die IL-1beta Synthese und Prozessierung auswirkt, haben Croker u. a. (2011) in Neutrophilen gezeigt. SHP-1 Disfunktion bzw. Defizienz führt zu einer erhöhten Sekretion von IL-1beta durch Neutrophile. Darüber hinaus wurde mehrfach nachgewiesen, dass SHP-1 die Aktivität von Syk regulieren kann (Kant u. a., 2002; Huang u. a., 2003; Meng u. a., 2002; Alsadeq u. a., 2014; Lu u. a., 2012)

Die Phosphorylierung von Syk in Dex-DC könnte also zusammengefasst aufgrund mehrerer Gründe hochreguliert sein. Erstens durch die erhöhte Expression von Dectin-1, zweitens durch eine geringere Expression der Phosphatase SHP-1 und drittens durch die erhöhte Freisetzung von Superoxid-Anionen, welche SHP-1 in seiner Funktion inhibieren können. Festzuhalten ist besonders, dass Syk nachgeschaltete Signalwege im Vergleich zu iDC in Dex-DCs verändert ablaufen. Das Ausmaß der Syk-Phosphorylierung könnte hierbei entscheidend sein wie die nachgeschalteten Signalwege ablaufen.

Die Behandlung von Dexamethason führt im Tiermodell *in vivo* zu einer



eingeschränkten Differenzierung von dendritischen Zellen (Zhang u. a., 2013). Bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, nach Transplantationen oder in der Krebstherapie ist Dexamethason ein wichtiger Bestandteil (Coutinho und Chapman, 2011). Langzeitbehandlung mit Dexamethason führt zu einer erhöhten Inzidenz von Pilzerkrankungen. Diese können die Schleimhäute betreffen oder systemisch sein (Gorson (2012)). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Dexamethason die Differenzierung von dendritischen Zellen *in vitro* beeinflusst. Die erhöhte Dectin-1-Expression war zunächst überraschend vor dem Hintergrund, dass Toleranz-vermittelnde Faktoren die Expression von Dectin-1 auf Macrophagen verringern. Dabei handelte es sich allerdings um kurzzeitige Inkubationen mit verschiedenen Substanzen (Willment u. a., 2003). Genauso überraschend war die erhöhte Aufnahme von Zymosan, die erhöhte Generierung von Superoxid-Anionen, die zu vermutlich fungiziden Peroxynitrit weiterreagieren (Vazquez-Torres u. a., 1996) sowie die erhöhte IL-1beta Ausschüttung durch Aktivierung von Syk und die folgende Caspase-abhängige Aktivierung des Inflammasom. IL-1beta ist essentiell für die Bekämpfung von *C. albicans* und sorgt für die Rekrutierung von anderen Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen. Zudem stimuliert es zusammen mit IL-23 die Differenzierung von Th17-Zellen. Th17-Zellen modulieren die Immunantwort bei Kolonisation mit *C. albicans*. Neben der Eliminierung von *C. albicans* sind sie auch für ein gewisses Maß an Toleranz gegenüber dem Pilz verantwortlich (Netea u. a., 2010; Li u. a., 2010; Zelante u. a., 2009; Hernández-Santos und Gaffen, 2012; Cheng u. a., 2010; Deng u. a., 2015). Menschen mit genetischen Defekten in der IL-17 Immunität oder dem Dectin-1-Gen zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für chronische mukokutane Candidosen (Puel u. a., 2011; Ferwerda u. a., 2009). Dectin-1 vermittelte IL-1beta Sekretion hat also eine Funktion in der Induzierung von angeborener und adaptiver Immunantwort. Die Infiltration von Neutrophilen trägt maßgeblich zu den Symptomen lokaler *C. albicans*-Infektionen bei (Wilson u. a., 2013). Darüber hinaus konnte aber in Mäusen gezeigt werden, dass ROS, IL-1beta und beta-Glukane die Differenzierung von myeloide Suppressorzellen (MDSC) induzieren, die die Dectin-1 vermittelte Immunantwort modulieren (Rieber u. a., 2015).

Zusammengefasst scheint die Antwort des angeborenen Immunsystems (ROS, Phagozytose) durch Dexamethason-induzierte tolerogene dendritische

Zellen nicht eingeschränkt zu sein. In Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund eine Rolle bei der von Dectin-1 vermittelten adaptiven Immunantwort gibt. Während sich nach Dectin-1-*knockout* in C57BL/6-Mäusen die Anzahl der Th17-Zellen erhöht, zeigen BALB/c-Mäuse nach Dectin-1-*knockout* ein erhöhtes Verhältnis von Th1/Tregs (Carvalho u. a., 2012).

In Abbildung 5.1 sind die Ergebnisse nochmals grafisch zusammengefasst.

Ob beta-Glukane auf der Oberfläche von lebenden *C. albicans* für Interaktionen mit Dectin-1 zur Verfügung stehen ist umstritten und hängt u.a. vom Stamm ab (Jia u. a., 2014). Es könnten allerdings im Lauf der Immunantwort geschädigte *C. albicans* entstehen deren beta-Glukane dann exponiert sind und für die Interaktion mit Dectin-1 zur Verfügung stünden. Eine Rolle könnten dabei reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid-Anionen spielen die die Membran von Pilzen schädigen können (Mayra Denisse Ramirez-Quijas, 2015; Wheeler u. a., 2008). Des Weiteren besitzen Pilze vielfältige Mechanismen sich der Detektion durch PRRs zu entziehen. So wird die Exposition von beta-Glukanen von Pilzen durch vielfältige Mechanismen beeinflusst. So spielt z.B. die Morphologie im Falle von *C. albicans* eine Rolle Wheeler u. a. (2008) ob beta-Glukane an der Oberfläche exponiert sind. Ein anderes Beispiel ist die Expression von Eng1 durch *Histoplasma capsulatum*, welche beta-Glukane auf seiner Oberfläche entfernt und so seine Virulenz erhöht (Brown, 2016; Garfoot u. a., 2016).

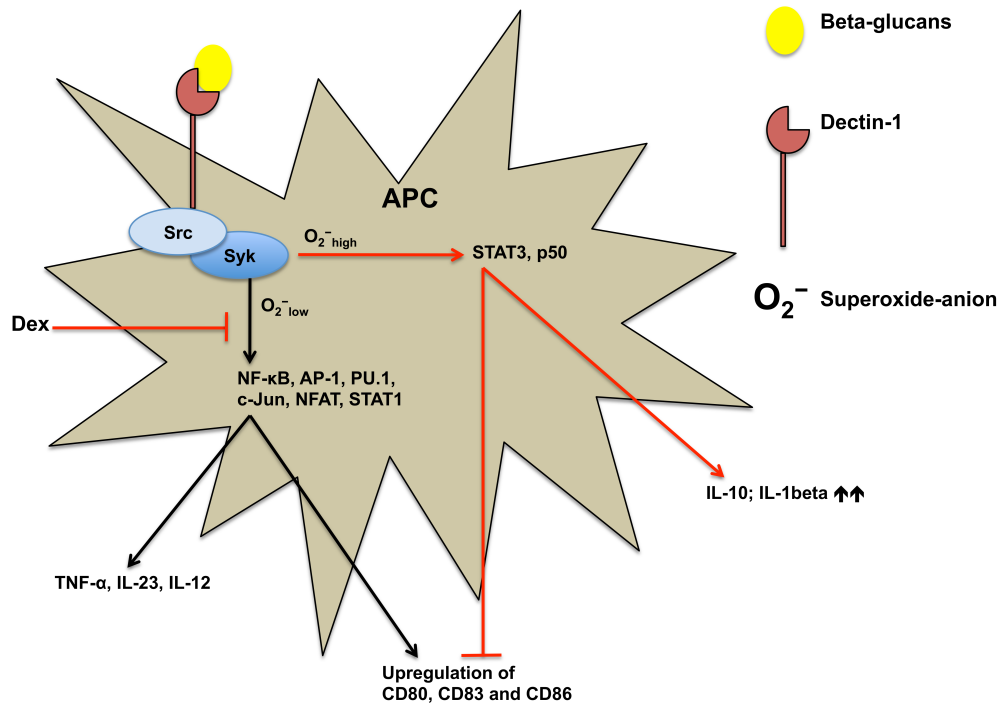


Abbildung 5.1: Dectin-1 Signalweiterleitung in Dex-DC. Stimulation von Dectin-1 auf Dex-Dc führt zu einer verstärkten Aktivierung von Syk. Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten Generierung von Superoxid-Anionen und Aktivierung von STAT3. Darüber hinaus wird p50 in den Zellkern transportiert und löst dort vermutlich eine erhöhte Expression von IL-10 aus.

## 5.5 Dex-DC prozessieren Antigene die via Dectin-1 aufgenommen werden.

Die hohe Dectin-1-Expression auf Dex-DC macht den Rezeptor interessant für Vakzinierungen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht-kovalente Konjugation des Modellproteins DQ-BSA an Zymosan-Partikel zur Prozessierung von DQ-BSA in Zymosan-enthaltenden Organellen führt. Dies konnte für transfierte Hek293, iDC und Dex-DC gezeigt werden (Abbildung 4.25 - 4.28). In Dex-DC ist die Fluoreszenz und damit die Prozessierung von an Zymosan *gecoatetem* DQ-BSA intensiver. In iDC war kein solcher Unterschied zu sehen. Durch Verfügbarkeit von Dectin-1-exprimierenden Hek293 konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 DQ-BSA-*gecoatetes* Zymosan erkennt, aufnimmt und prozessiert. Gleichzeitig wurde durch diese Versuche gezeigt, dass die Maschinerie, die für die Prozessierung von aufgenommenen Antigenen nötig ist, in Dex-DC funktioniert. Ob antigen-spezifische T-Zellen nach Aufnahme von *gecoateten* Zymosan-Partikeln gehemmt (Dex-DC) oder stimuliert (DC) werden können, wird Gegenstand zukünftiger Versuche sein. Zhang u. a. (2013) zeigen wie Dexamethason-induzierte tolerogene Zellen zusammen mit Insulin-Peptiden bei Typ-I Diabetes Toleranz vermitteln können. Dectin-1 als Zielrezeptor auf tolerogenen dendritischen Zellen für verschiedene Autoantigene könnte in weiteren Modellen effektiv Toleranz für weitere Autoantigene vermitteln. Ob die vergleichsweise hohe IL-1beta Sekretion im Rahmen von Vakzinierungen kontraproduktiv ist, ist unklar. Partikel die effizient phagozytiert werden können (Zymosan und HKCA), könnten eine deutlich geringere Menge IL-1beta freisetzen als große Partikel wie Curdlan, die schwer aufgenommen werden können.

Die starke Generierung von Superoxid-Anionen könnte sich allerdings negativ auf die Antigenpräsentation auswirken. Dendritische Zellen nutzen niedrige ROS Level um den pH-Wert in vakuolischen Strukturen optimal zu regulieren (Jancic u. a., 2007; Mantegazza u. a., 2008). Makrophagen nutzen hohe ROS-Level um aufgenommenen Pathogene schnell zu zerstören. Eine zu starke Antigen-Fragmentierung wirkt sich möglicherweise negativ auf ihre Präsentation aus (Savina u. a., 2006). LC3 scheint an diesem Prozess beteiligt zu sein. ROS lösen die LC3-Rekrutierung an endosomale Membranen aus. LC3 sorgt für eine erhöhte Fungizidität, während LC3-Defizienz in Makrophagen zu einer

erhöhten Sekretion von IL1-beta führt (Tam u. a., 2014; Ma u. a., 2012). In Dex-DC konnte eine erhöhte Prozessierung von DQ-BSA ,welches nicht-kovalent an Zymosan konjugiert wurde, nachgewiesen.

## 5.6 Dectin-1 Stimulation führt nicht zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Dex-DC

Wie aufgrund der Analyse der Oberflächenmarker nach Stimulation mit LPS oder beta-Glukanen zu erwarten war, stimulieren Dex-DC keine Proliferation von allogenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Abbildung 4.13). Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wurden von Dex-DC bei Stimulation mit Curdlan oder Zymosan nicht hochreguliert. Dazu kommt eine Erhöhung der PD-L1/L2 Expression die ebenfalls seinen Teil zur Inhibierung der Proliferation der T-Zellen beiträgt.

Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da im Rahmen von Vakzinierungen mit Antigen-beladenen tolerogenen dendritischen Zellen eine effiziente und antigen-spezifische Inhibition von T-Zellen erwünscht ist, um Toleranz zu vermitteln. Diese Spezifität bei der Vermittlung von Toleranz ist ein allgemeiner Vorteil gegenüber der globalen Unterdrückung des Immunsystems bei Transplantation und Autoimmunität, die zur Entstehung von Tumoren und Infektionen führen kann. Die Funktion des Immunsystems Fremdantigene zu erkennen und zu eliminieren bleibt erhalten (Moreau u. a., 2012a; Van Brussel u. a., 2014; Miller u. a., 2007; Zhang u. a., 2013; Geng u. a., 2015).

Dass sich Dectin-1 als *Target* für antigen-spezifische Vakzinierungen eignet, wurde schon in mehreren Studien gezeigt (Xie u. a., 2010; Carter u. a., 2006; Huang u. a., 2010; Leibundgut-Landmann u. a., 2008; De Smet u. a., 2013). Bisher wurden allerdings lediglich Szenarien untersucht in denen über Dectin-1 Antigene in die Zelle eingebracht wurden, um die Proliferation von antigen-spezifischen T-Zellen zu stimulieren. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass Dectin-1 auf tolerogenen dendritischen Zellen möglicherweise als Ziel für die Lieferung von Selbstantigenen zur Vermittlung von Immuntoleranz geeignet ist.

Vor dem Hintergrund der verstärkten Aktivierung von Mechanismen des angeborenen Immunsystems durch Dex-DC ist der oben beschriebene Befund interessant um die Wichtigkeit der adaptiven Immunantwort gegen Pilze einzuschätzen. Gegen innate Mechanismen wie die Generierung von Superoxid-Anionen haben Pilze wie *C. albicans* endogene Abwehrmechanismen entwickelt. Die Oberflächenexpression der Superoxiddismutase schützt *C. albicans* vor

oxidativem Stress (Frohner u. a., 2009). Wenn davon ausgegangen wird, dass Dexamethason die Anfälligkeit für Infektionen durch *C. albicans* erhöht, dabei aber die primäre Immunantwort von Zellen des Immunsystems (hier DCs) erhöht, dann wird deutlich, dass T-Zell vermittelte Mechanismen eine große Rolle bei der Bekämpfung von pathogenen Pilzen spielen. Verhindert wird die Einleitung einer adaptiven Immunantwort nach Stimulation von Dectin-1 durch Aktivierung von STAT3 und Inhibition von NF $\kappa$ B-abhängigen Signalwegen.

Neben Dectin-1 exprimieren dendritische Zellen weitere Rezeptoren wie CR3 (Brown und Gordon, 2005), Galectin-3 (Wu u. a., 2013) und DC-SIGN (Cambi u. a., 2003), die pathogene Pilze erkennen können. Vorallem CR3 spielt bei der Bekämpfung von pathogenen Pilzen (Gazendam u. a., 2014; Ganesan u. a., 2014). Während DC-SIGN auf beiden Zelltypen auf etwa gleichem Level expriert wird, ist die Expression von CR3 bzw. CD11b deutlich verringert. Kürzlich wurde durch Huang u. a. (2015) gezeigt, dass CR3 und Dectin-1 synergistisch zusammenarbeiten um eine adaptive Immunantwort gegen das Pathogen *Histoplasma capsulatum* auszulösen. Die verringerte Expression von CD11b auf Dex-DC könnte demzufolge ebenfalls den Phänotyp von Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen erklären.

Vermutlich ist die eingeschränkte DC-Funktion nur ein Teilaspekt der erhöhten Anfälligkeit für *Candida*-Infektionen. Neutrophile spielen *in vivo* entscheidende Rolle bei der Beseitigung von von *Candida*-Infektionen (Gazendam u. a., 2014). Darüber hinaus müsste die Rolle weiterer PRRs untersucht werden. Die Oberfläche von intakten *C. albicans* ist komplex und beinhaltet neben beta-Glukanen weitere PAMPs. Behandlung mit Dexamethason kann außerdem Neutropenien begünstigen und so ebenfalls die Infektanfälligkeit erhöhen, selbst wenn dendritische Zellen eine erhöhte Aktivität von innaten Mechanismen wie Phagozytose und Superoxid-Anion Bildung zeigen. Das durch Dex-DC sezernierte IL-10 bei Kontakt mit Dectin-1 Liganden wirkt zusätzlich dämpfend auf das Immunsystem.

## Abbildungsverzeichnis

3.1	Dectin 1-Expression auf der Oberfläche von transfizierten Hek293-Zellen. . . . .	48
3.2	pHRodo Green Zymosan Aufnahme durch Dectin-1-transfizierte Hek293-Zellen. . . . .	49
3.3	Dectin-1 bzw. Annexin 1-Expression auf transfizierten Schneider-Zellen. . . . .	53
3.4	Dectin- bzw. Annexin 1-Expression von transfizierten Schneider-Zellen. . . . .	54
3.5	FITC-Zymosan-Aufnahme durch transfizierten Schneider S2-Zellen. . . . .	55
3.6	Aufnahme von pHRodo-Zymosan durch transfizierte Schneider Zellen. . . . .	56
3.7	HKCA-Aufnahme durch transfizierte Schneider (S2) Zellen. . .	57
3.8	HKCA-Aufnahme durch transfizierte Schneider (S2) Zellen. . .	58
3.9	Analyse phagosomaler Strukturen von einfach- und doppelt-transfizierten Schneider Zellen. . . . .	59
3.10	Annexin 1- <i>knockout</i> in Dectin-1 exprimierenden Hek293 Zellen.	61
3.11	Dectin-1 Expression auf der Oberfläche von Dectin-1 transfizierten Hek293 Zellen vor und nach Annexin 1- <i>knockout</i> . . . . .	61
3.12	FITC-Zymosan-Aufnahme von Dectin-1-transfizierten Hek293-Zellen vor und nach Annexin 1-knockout. . . . .	62
3.13	Syk-Phosphorylierung an den Tyrosinen 525 und 526 in transfizierten Hek293-Zellen nach Stimulation mit Curdlan, HKCA und Zymosan vor und nach Annexin 1 <i>knockout</i> . . . . .	63
3.14	Direkte Bindung von Dectin-1 und Annexin 1 an Zymosan-Partikel.	65
3.15	Direkte Bindung von Dectin-1 und Annexin 1 an hitze-inaktivierte <i>C. albicans</i> . . . . .	66



---

3.16	Lokalisation von Annexin 1 (grün) und Dectin-1(rot) auf phagosomalen Membranen . . . . .	68
3.17	Lokalisation von Annexin 1 (grün) und Dectin-1(rot) auf phagosomalen Membranen nach Inkubation von DC mit HKCA (pink). . . . .	69
3.18	Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes Polyacrylamid-Gel mit verschiedenen Mengen beider Dectin-1-ECDs . . . . .	71
3.19	Bindung von rekombinanter Dectin-1-ECD an Zymosan-Partikel	72
3.20	Bindung der rekombinanten extrazellulären Domäne von Dectin-1 an Jurkat Zellen. . . . .	74
3.21	Oberflächenexpression von Dectin-1-mRFP (a) und Aufnahme von hitzeinaktivierten <i>C. albicans</i> (b) durch transfizierte Hek293.	76
3.22	Aufnahme von geschädigten, CMFDA-gefärbten Jurkat Zellen durch Dectin-1-mRFP-transfizierte Hek293. . . . .	77
3.23	Co-Immunpräzipitation von Dectin-1 und Annexin 1 aus Lysaten transfizierter Schneider (S2) Zellen. . . . .	78
4.1	Expression von Dectin-1 auf der Zelloberfläche von iDC und Dex-DC. . . . .	81
4.2	Expression der Reifungsmarker CD80/CD83/CD86 auf iDC und Dex-DC vor und nach 16 h Stimulation mit 100 µg/ml Zymosan oder Curdlan. . . . .	84
4.3	Expression von CD80 (a) und CD86 (b) auf iDC und Dex-DC . .	85
4.4	Expression einiger Oberflächenmarker auf iDC und Dex-DC vor und nach Stimulation mit 100 µg/ml Zymosan oder Curdlan für 16 h. . . . .	86
4.5	Dectin-1-Expression auf der Oberfläche dendritischer und tolerogener dendritischer Zellen vor und nach Inkubation mit Zymosan oder Curdlan . . . . .	87
4.6	Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD11c und DC-SIGN auf iDC und Dex-DC nach Abschluss der Differenzierung. . . .	89
4.7	Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4, FPR2 und CCR7 auf iDC und Dex-DC. . . . .	91
4.8	IL-10 Sekretion während der Reifung von iDC und Dex-DC mit IL-4/GM-CSF bzw. IL-4/GM-CSF/Dexamethason. . . . .	93

---

---

4.9	Aufnahme von FITC-Zymosan durch iDC und Dex-DC. . . . .	95
4.10	Mit anti-Dectin-1 Antikörper und DyLight594-konjugiertem Zweitantikörper gefärbte iDC nach HKCA-Zugabe. . . . .	96
4.11	Mit anti-Dectin-1 Antikörper und DyLight594-konjugiertem Zweitantikörper gefärbte Dex-DC nach HKCA-Zugabe. . . . .	97
4.12	Aufnahme CMPTX-gefärbter apoptotischer Hek293-Zellen durch iDC und Dex-DC Zellen. . . . .	99
4.13	Proliferation von allogenen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 5 Tagen Kokultur mit iDC oder Dex-DC. . . . .	101
4.14	Sekretion von IFN- $\gamma$ durch allogene CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. . . . .	102
4.15	Phosphorylierung von Syk an den Tyrosinen 525 und 526 nach 30-minütiger Stimulation mit verschiedenen Dectin-Agonisten .	104
4.16	Superoxid-Anion Generierung in iDC und Dex-DC. . . . .	107
4.17	Inhibition der Superoxid-Anion-Produktion durch R406, PP2 und einen anti-Dectin-1-Antikörper. . . . .	108
4.18	Zytokin- Chemokinausschüttung von iDC und Dex-DC nach Stimulation von Dectin-1. . . . .	110
4.19	IFN-beta Sekretion durch iDC und Dex-DC nach Stimulation für 24 h mit Curdlan oder LPS. . . . .	111
4.20	IL-1beta Sekretion von iDC und Dex-DC nach Stimulation mit Curdlan oder LPS. . . . .	113
4.21	Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in iDC und Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen . . . . .	116
4.22	Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion in iDC und Dex-DC nach Stimulation mit beta-Glukanen . . . . .	117
4.23	Einfluss von Ruxolitinib auf die CD86-Expression auf Dex-DC. .	118
4.24	Expression von CD45 und SHP-1 in Dex-DC und iDC. . . . .	120
4.25	DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch Dectin-1 transfizierte Hek293 Zellen. . . . .	123
4.26	DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC.	124
4.27	DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC.	125
4.28	DQ-BSA Aufnahme und Prozessierung durch iDC und Dex-DC.	126
5.1	Dectin-1 Signalweiterleitung in Dex-DC. . . . .	140

# Tabellenverzeichnis

2.1	PCR-Protokoll für die Amplifizierung von Annexin 1 und Dectin-1 cDNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer . . . . .	32
2.2	Abfolge der schrittweisen Reduktion der Harnstoffkonzentration in der Dectin-1-ECD Proteinlösung. . . . .	40

## Literaturverzeichnis

- [Ahrens u. a. 2012] AHRENS, Susan ; ZELENAY, Santiago ; SANCHO, David ; HANČ, Pavel ; KJÆR, Svend ; FEEST, Christoph ; FLETCHER, Georgina ; DURKIN, Charlotte ; POSTIGO, Antonio ; SKEHEL, Mark ; BATISTA, Facundo ; THOMPSON, Barry ; WAY, Michael ; SOUSA, Caetano Reis e ; SCHULZ, Oliver: F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. In: *Immunity* 36 (2012), Apr, Nr. 4, S. 635–45
- [Akira u. a. 2006] AKIRA, Shizuo ; UEMATSU, Satoshi ; TAKEUCHI, Osamu: Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (2006), Feb, Nr. 4, S. 783–801
- [Albert u. a. 2000] ALBERT, M L. ; KIM, J I. ; BIRGE, R B.: alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. In: *Nat Cell Biol* 2 (2000), Dec, Nr. 12, S. 899–905
- [Alsadeq u. a. 2014] ALSADEQ, Ameera ; HOBEIKA, Elias ; MEDGYESI, David ; KLÄSENER, Kathrin ; RETH, Michael: The role of the Syk/Shp-1 kinase-phosphatase equilibrium in B cell development and signaling. In: *J Immunol* 193 (2014), Jul, Nr. 1, S. 268–76
- [Ariizumi u. a. 2000] ARIIZUMI, K ; SHEN, G L. ; SHIKANO, S ; XU, S ; RITTER, R ; KUMAMOTO, T ; EDELBAUM, D ; MORITA, A ; BERGSTRESSER, P R. ; TAKASHIMA, A: Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Jun, Nr. 26, S. 20157–67
- [Arur u. a. 2003] ARUR, Swathi ; UCHE, Uche E. ; REZAUL, Karim ; FONG, Michael ; SCRANTON, Victoria ; COWAN, Ann E. ; MOHLER, William ; HAN, David K.: Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. In: *Dev Cell* 4 (2003), Apr, Nr. 4, S. 587–98

- [Bauernfeind u. a. 2011] BAUERNFEIND, Franz ; BARTOK, Eva ; RIEGER, Anna ; FRANCHI, Luigi ; NÚÑEZ, Gabriel ; HORNING, Veit: Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. In: *J Immunol* 187 (2011), Jul, Nr. 2, S. 613–7
- [Blume u. a. 2009] BLUME, Karin E. ; SOEROES, Szabolcs ; WAIBEL, Michaela ; KEPPELER, Hildegard ; WESSELBORG, Sebastian ; HERRMANN, Martin ; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus ; LAUBER, Kirsten: Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. In: *J Immunol* 183 (2009), Dec, Nr. 12, S. 8138–47
- [Brown 2006] BROWN, Gordon D.: Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. In: *Nat Rev Immunol* 6 (2006), Jan, Nr. 1, S. 33–43
- [Brown 2016] BROWN, Gordon D.: Trimming Surface Sugars Protects Histoplasma from Immune Attack. In: *MBio* 7 (2016), Nr. 2
- [Brown und Gordon 2005] BROWN, Gordon D. ; GORDON, Siamon: Immune recognition of fungal beta-glucans. In: *Cell Microbiol* 7 (2005), Apr, Nr. 4, S. 471–9
- [Brown u. a. 2003] BROWN, Gordon D. ; HERRE, Jurgen ; WILLIAMS, David L. ; WILLMENT, Janet A. ; MARSHALL, Andrew S J. ; GORDON, Siamon: Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. In: *J Exp Med* 197 (2003), May, Nr. 9, S. 1119–24
- [Brown u. a. 2002] BROWN, Gordon D. ; TAYLOR, Philip R. ; REID, Delyth M. ; WILLMENT, Janet A. ; WILLIAMS, David L. ; MARTINEZ-POMARES, Luisa ; WONG, Simon Y C. ; GORDON, Siamon: Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. In: *J Exp Med* 196 (2002), Aug, Nr. 3, S. 407–12
- [Brown u. a. 2007] BROWN, James ; O'CALLAGHAN, Chris A. ; MARSHALL, Andrew S J. ; GILBERT, Robert J C. ; SIEBOLD, Christian ; GORDON, Siamon ; BROWN, Gordon D. ; JONES, E Y.: Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function. In: *Protein Sci* 16 (2007), Jun, Nr. 6, S. 1042–52
- [Busetto u. a. 2004] Busetto, Sara ; Trevisan, Elisa ; Patriarca, Pierluigi ; Menegazzi, Renzo: A single-step, sensitive flow cytometric assay

for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils. In: *Cytometry A* 58 (2004), Apr, Nr. 2, S. 201–6

[Cambi u. a. 2003] CAMBI, Alessandra ; GIJZEN, Karlijn ; VRIES, I Jolanda M. de ; TORENSMA, Ruurd ; JOOSTEN, Ben ; ADEMA, Gosse J. ; NETEA, Mihai G. ; KULLBERG, Bart-Jan ; ROMANI, Luigina ; FIGDOR, Carl G.: The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. In: *Eur J Immunol* 33 (2003), Feb, Nr. 2, S. 532–8

[Cao u. a. 2006] CAO, Shanjin ; ZHANG, Xia ; EDWARDS, Justin P. ; MOSSER, David M.: NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Sep, Nr. 36, S. 26041–50

[Carballo u. a. 1999] CARBALLO, M ; CONDE, M ; EL BEKAY, R ; MARTÍN-NIETO, J ; CAMACHO, M J. ; MONTESEIRÍN, J ; CONDE, J ; BEDOYA, F J. ; SOBRINO, F: Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Jun, Nr. 25, S. 17580–6

[Carotta u. a. 2010] CAROTTA, Sebastian ; DAKIC, Aleksandar ; D'AMICO, Angela ; PANG, Swee Heng M. ; GREIG, Kylie T. ; NUTT, Stephen L. ; WU, Li: The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. In: *Immunity* 32 (2010), May, Nr. 5, S. 628–41

[Carter u. a. 2006] CARTER, Robert W. ; THOMPSON, Clare ; REID, Delyth M. ; WONG, Simon Y C. ; TOUGH, David F.: Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. In: *J Immunol* 177 (2006), Aug, Nr. 4, S. 2276–84

[Carvalho u. a. 2012] CARVALHO, Agostinho ; GIOVANNINI, Gloria ; DE LUCA, Antonella ; D'ANGELO, Carmen ; CASAGRANDE, Andrea ; IANNITTI, Rossana G. ; RICCI, Giovanni ; CUNHA, Cristina ; ROMANI, Luigina: Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. In: *Cell Mol Immunol* 9 (2012), May, Nr. 3, S. 276–86

- [Chen u. a. 2014] CHEN, Keqiang ; XIANG, Yi ; HUANG, Jiaqiang ; GONG, Wanghua ; YOSHIMURA, Teizo ; JIANG, Qun ; TESSAROLLO, Lino ; LE, Yingying ; WANG, Ji M.: The formylpeptide receptor 2 (Fpr2) and its endogenous ligand cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) promote dendritic cell maturation. In: *J Biol Chem* 289 (2014), Jun, Nr. 25, S. 17553–63
- [Chen u. a. 2015] CHEN, X ; KAMRANVAR, S A. ; MASUCCI, M G.: Oxidative stress enables Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by posttranscriptional regulation of viral and cellular growth-promoting factors. In: *Oncogene* (2015), Nov
- [Cheng u. a. 2010] CHENG, Shih-Chin ; VEERDONK, Frank van de ; SMEEKENS, Sanne ; JOOSTEN, Leo A B. ; MEER, Jos W M. van der ; KULLBERG, Bart-Jan ; NETEA, Mihai G.: *Candida albicans* dampens host defense by downregulating IL-17 production. In: *J Immunol* 185 (2010), Aug, Nr. 4, S. 2450–7
- [Chiba u. a. 2014] CHIBA, Shiho ; IKUSHIMA, Hiroaki ; UEKI, Hiroshi ; YANAI, Hideyuki ; KIMURA, Yoshitaka ; HANGAI, Sho ; NISHIO, Junko ; NEGISHI, Hideo ; TAMURA, Tomohiko ; SAIJO, Shinobu ; IWAKURA, Yoichiro ; TANIGUCHI, Tadatsugu: Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. In: *Elife* 3 (2014), S. e04177
- [Conner u. a. 2010] CONNER, James R. ; SMIRNOVA, Irina I. ; MOSEMAN, Annie P. ; POLTORAK, Alexander: IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-kappaB p50. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010), Jun, Nr. 25, S. 11477–82
- [Cooray u. a. 2013] COORAY, Sadani N. ; GOBBETTI, Thomas ; MONTERO-MELENDZ, Trinidad ; MCARTHUR, Simon ; THOMPSON, Dawn ; CLARK, Adrian J L. ; FLOWER, Roderick J. ; PERRETTI, Mauro: Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013), Nov, Nr. 45, S. 18232–7
- [Coutinho und Chapman 2011] COUTINHO, Agnes E. ; CHAPMAN, Karen E.: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids,

recent developments and mechanistic insights. In: *Mol Cell Endocrinol* 335 (2011), Mar, Nr. 1, S. 2–13

[Croker u. a. 2011] CROKER, Ben A. ; LEWIS, Rowena S. ; BABON, Jeff J. ; MINTERN, Justine D. ; JENNE, Dieter E. ; METCALF, Donald ; ZHANG, Jian-Guo ; CENGIA, Louise H. ; O'DONNELL, Joanne A. ; ROBERTS, Andrew W.: Neutrophils require SHP1 to regulate IL-1beta production and prevent inflammatory skin disease. In: *J Immunol* 186 (2011), Jan, Nr. 2, S. 1131–9

[Das u. a. 2015] DAS, Mrinmoy ; KAVERI, Srinivasa V. ; BAYRY, Jagadeesh: Cross-presentation of antigens by dendritic cells: role of autophagy. In: *Oncotarget* 6 (2015), Oct, Nr. 30, S. 28527–8

[De Smet u. a. 2013] DE SMET, Rebecca ; DEMOOR, Tine ; VERSCHUERE, Stephanie ; DULLAERS, Melissa ; OSTROFF, Gary R. ; LECLERCQ, Georges ; ALLAIS, Liesbeth ; PILETTE, Charles ; DIERENDONCK, Marijke ; DE GEEST, Bruno G. ; CUVELIER, Claude A.: beta-Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. In: *J Control Release* 172 (2013), Dec, Nr. 3, S. 671–8

[Deng u. a. 2015] DENG, Zihou ; MA, Shixin ; ZHOU, Hao ; ZANG, Aiping ; FANG, Yiyuan ; LI, Tiantian ; SHI, Huanjing ; LIU, Mei ; DU, Min ; TAYLOR, Patricia R. ; ZHU, Helen H. ; CHEN, Jianguo ; MENG, Guangxun ; LI, Fubin ; CHEN, Changbin ; ZHANG, Yan ; JIA, Xin-Ming ; LIN, Xin ; ZHANG, Xiaoming ; PEARLMAN, Eric ; LI, Xiaoxia ; FENG, Gen-Sheng ; XIAO, Hui: Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor-induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses. In: *Nat Immunol* 16 (2015), Jun, Nr. 6, S. 642–52

[Diakonova u. a. 1997] DIAKONOVA, M ; GERKE, V ; ERNST, J ; LIAUTARD, J P. ; VUSSE, G van der ; GRIFFITHS, G: Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. In: *J Cell Sci* 110 ( Pt 10) (1997), May, S. 1199–213

[Dillon u. a. 2006] DILLON, Stephanie ; AGRAWAL, Sudhanshu ; BANERJEE, Kaustuv ; LETTERIO, John ; DENNING, Timothy L. ; OSWALD-RICHTER, Kyra ; KASPROWICZ, Deborah J. ; KELLAR, Kathryn ; PARE, Jeff ; DYKE, Thomas



van ; ZIEGLER, Steven ; UNUTMAZ, Derya ; PULENDRAN, Bali: Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. In: *J Clin Invest* 116 (2006), Apr, Nr. 4, S. 916–28

[Driessler u. a. 2004] DRIESSLER, F ; VENSTROM, K ; SABAT, R ; ASADULLAH, K ; SCHOTTELIUS, A J.: Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. In: *Clin Exp Immunol* 135 (2004), Jan, Nr. 1, S. 64–73

[Dudley u. a. 2004] DUDLEY, Andrew C. ; THOMAS, David ; BEST, James ; JENKINS, Alicia: The STATs in cell stress-type responses. In: *Cell Commun Signal* 2 (2004), Aug, Nr. 1, S. 8

[Eberle und Dalpke 2012] EBERLE, Mariel E. ; DALPKE, Alexander H.: Dectin-1 stimulation induces suppressor of cytokine signaling 1, thereby modulating TLR signaling and T cell responses. In: *J Immunol* 188 (2012), Jun, Nr. 11, S. 5644–54

[Engering u. a. 2002] ENGERING, Anneke ; GEIJTENBEEK, Teunis B H. ; VLIET, Sandra J. van ; WIJERS, Mietske ; LIEMPT, Ellis van ; DEMAUREX, Nicolas ; LANZAVECCHIA, Antonio ; FRANSEN, Jack ; FIGDOR, Carl G. ; PIGUET, Vincent ; KOOYK, Yvette van: The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. In: *J Immunol* 168 (2002), Mar, Nr. 5, S. 2118–26

[Fan u. a. 2004] FAN, Xiaoxuan ; KRAHLING, Stephen ; SMITH, Douglas ; WILLIAMSON, Patrick ; SCHLEGEL, Robert A.: Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), Jun, Nr. 6, S. 2863–72

[Ferreira u. a. 2015] FERREIRA, Gabriela B. ; VANHERWEGEN, An-Sofie ; EELLEN, Guy ; GUTIÉRREZ, Ana Carolina F. ; VAN LOMMEL, Leentje ; MARCHAL, Kathleen ; VERLINDEN, Lieve ; VERSTUYF, Annemieke ; NOGUEIRA, Tatiane ; GEORGIADOU, Maria ; SCHUIT, Frans ; EIZIRIK, Décio L ; GYSEMANS, Conny ; CARMELIET, Peter ; OVERBERGH, Lut ; MATHIEU, Chantal: Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. In: *Cell Rep* (2015), Feb

- [Ferwerda u. a. 2009] FERWERDA, Bart ; FERWERDA, Gerben ; PLANTINGA, Theo S. ; WILLMENT, Janet A. ; SPRIEL, Annemiek B. van ; VENSELAAR, Hanka ; ELBERS, Clara C. ; JOHNSON, Melissa D. ; CAMBI, Alessandra ; HUYSAMEN, Cristal ; JACOBS, Liesbeth ; JANSEN, Trees ; VERHEIJEN, Karlijn ; MASTHOFF, Laury ; MORRÉ, Servaas A. ; VRIEND, Gert ; WILLIAMS, David L. ; PERFECT, John R. ; JOOSTEN, Leo A B. ; WIJMENGA, Cisca ; MEER, Jos W M. van der ; ADEMA, Gosse J. ; KULLBERG, Bart J. ; BROWN, Gordon D. ; NETEA, Mihai G.: Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. In: *N Engl J Med* 361 (2009), Oct, Nr. 18, S. 1760–7
- [del Fresno u. a. 2013] FRESNO, Carlos del ; SOULAT, Didier ; ROTH, Susanne ; BLAZEK, Katrina ; UDALOVA, Irina ; SANCHO, David ; RULAND, Jürgen ; ARDAVÍN, Carlos: Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. In: *Immunity* 38 (2013), Jun, Nr. 6, S. 1176–86
- [Frohner u. a. 2009] FROHNER, Ingrid E. ; BOURGEOIS, Christelle ; YATSYK, Kristina ; MAJER, Olivia ; KUCHLER, Karl: *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. In: *Mol Microbiol* 71 (2009), Jan, Nr. 1, S. 240–52
- [Gallo und Gallucci 2013] GALLO, Paul M. ; GALLUCCI, Stefania: The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. In: *Front Immunol* 4 (2013), S. 138
- [Ganesan u. a. 2014] GANESAN, Sandhya ; RATHINAM, Vijay A K. ; BOS-SALLER, Lukas ; ARMY, Kelly ; KAISER, William J. ; MOCARSKI, Edward S. ; DILLON, Christopher P. ; GREEN, Douglas R. ; MAYADAS, Tanya N. ; LEVITZ, Stuart M. ; HISE, Amy G. ; SILVERMAN, Neal ; FITZGERALD, Katherine A.: Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1beta production in response to beta-glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. In: *J Immunol* 193 (2014), Sep, Nr. 5, S. 2519–30
- [Gantner u. a. 2005] GANTNER, Benjamin N. ; SIMMONS, Randi M. ; UNDERHILL, David M.: Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. In: *EMBO J* 24 (2005), Mar, Nr. 6, S. 1277–86

- [Garfoot u. a. 2016] GARFOOT, Andrew L. ; SHEN, Qian ; WÜTHRICH, Marcel ; KLEIN, Bruce S. ; RAPPLEYE, Chad A.: The Eng1 beta-Glucanase Enhances Histoplasma Virulence by Reducing beta-Glucan Exposure. In: *MBio* 7 (2016), Nr. 2
- [Gazendam u. a. 2014] GAZENDAM, Roel P. ; HAMME, John L. van ; TOOL, Anton T J. ; HOUDT, Michel van ; VERKUIJLEN, Paul J J H. ; HERBST, Martin ; LIESE, Johannes G. ; VEERDONK, Frank L. van de ; ROOS, Dirk ; BERG, Timo K. van den ; KUIJPERS, Taco W.: Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. In: *Blood* 124 (2014), Jul, Nr. 4, S. 590–7
- [Geijtenbeek und Gringhuis 2009] GEIJTENBEEK, Teunis B H. ; GRINGHUIS, Sonja I.: Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. In: *Nat Rev Immunol* 9 (2009), Jul, Nr. 7, S. 465–79
- [Geng u. a. 2015] GENG, Shuang ; ZHANG, Huiyuan ; ZHOU, Xian ; HE, Yue ; ZHANG, Xiaoqian ; XIE, Xiaoping ; LI, Chaofan ; HE, Zhonghuai ; YU, Qingling ; ZHONG, Yiwei ; LOWRIE, Douglas B. ; ZHENG, Guoxing ; WANG, Bin: Diabetes tolerogenic vaccines targeting antigen-specific inflammation. In: *Hum Vaccin Immunother* 11 (2015), Nr. 2, S. 522–30
- [Gerke u. a. 2005] GERKE, Volker ; CREUTZ, Carl E. ; MOSS, Stephen E.: Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005), Jun, Nr. 6, S. 449–61
- [Gersuk u. a. 2006] GERSUK, Geoffrey M. ; UNDERHILL, David M. ; ZHU, Liqun ; MARR, Kieren A.: Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. In: *J Immunol* 176 (2006), Mar, Nr. 6, S. 3717–24
- [Ghoreschi u. a. 2011] GHORESCHI, Kamran ; BRÜCK, Jürgen ; KELLERER, Christina ; DENG, Caishu ; PENG, Haiyan ; ROTHFUSS, Oliver ; HUSSAIN, Rehana Z. ; GOCKE, Anne R. ; RESPA, Annedore ; GLOCOVA, Ivana ; VALTCHEVA, Nadejda ; ALEXANDER, Eva ; FEIL, Susanne ; FEIL, Robert ; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus ; RUPEC, Rudolf A. ; LOVETT-RACKE, Amy E. ; DRINGEN, Ralf ; RACKE, Michael K. ; RÖCKEN, Martin: Fumarates improve psoriasis

and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. In: *J Exp Med* 208 (2011), Oct, Nr. 11, S. 2291–303

[Giannoukakis u. a. 2011] GIANNOUKAKIS, Nick ; PHILLIPS, Brett ; FINEGOLD, David ; HARNAHA, Jo ; TRUCCO, Massimo: Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. In: *Diabetes Care* 34 (2011), Sep, Nr. 9, S. 2026–32

[Goodridge u. a. 2011] GOODRIDGE, Helen S. ; REYES, Christopher N. ; BECKER, Courtney A. ; KATSUMOTO, Tamiko R. ; MA, Jun ; WOLF, Andrea J. ; BOSE, Nandita ; CHAN, Anissa S H. ; MAGEE, Andrew S. ; DANIELSON, Michael E. ; WEISS, Arthur ; VASILAKOS, John P. ; UNDERHILL, David M.: Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. In: *Nature* 472 (2011), Apr, Nr. 7344, S. 471–5

[Goodridge u. a. 2007] GOODRIDGE, Helen S. ; SIMMONS, Randi M. ; UNDERHILL, David M.: Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. In: *J Immunol* 178 (2007), Mar, Nr. 5, S. 3107–15

[Goodridge u. a. 2012] GOODRIDGE, Helen S. ; UNDERHILL, David M. ; TOURET, Nicolas: Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. In: *Traffic* 13 (2012), Aug, Nr. 8, S. 1062–71

[Goodridge u. a. 2009] GOODRIDGE, Helen S. ; WOLF, Andrea J. ; UNDERHILL, David M.: Beta-glucan recognition by the innate immune system. In: *Immunol Rev* 230 (2009), Jul, Nr. 1, S. 38–50

[Gorson 2012] GORSON, Kenneth C.: An update on the management of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. In: *Ther Adv Neurol Disord* 5 (2012), Nov, Nr. 6, S. 359–73

[Gow u. a. 2007] GOW, Neil A R. ; NETEA, Mihai G. ; MUNRO, Carol A. ; FERWERDA, Gerben ; BATES, Steven ; MORA-MONTES, Héctor M ; WALKER, Louise ; JANSEN, Trees ; JACOBS, Liesbeth ; TSONI, Vicky ; BROWN, Gordon D. ; ODDS, Frank C. ; MEER, Jos W M. Van der ; BROWN, Alistair J P. ; KULLBERG, Bart J.: Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. In: *J Infect Dis* 196 (2007), Nov, Nr. 10, S. 1565–71

- [Granucci u. a. 2014] GRANUCCI, Francesca ; LUTZ, Manfred B. ; ZANONI, Ivan: The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal 2. In: *Front Immunol* 5 (2014), S. 42
- [Gringhuis u. a. 2009] GRINGHUIS, Sonja I. ; DUNNEN, Jeroen den ; LITJENS, Manja ; VLIST, Michiel van der ; WEVERS, Brigitte ; BRUIJNS, Sven C M. ; GEIJTENBEEK, Teunis B H.: Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. In: *Nat Immunol* 10 (2009), Feb, Nr. 2, S. 203–13
- [Gringhuis u. a. 2012] GRINGHUIS, Sonja I. ; KAPTEIN, Tanja M. ; WEVERS, Brigitte A. ; THEELEN, Bart ; VLIST, Michiel van der ; BOEKHOUT, Teun ; GEIJTENBEEK, Teunis B H.: Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. In: *Nat Immunol* 13 (2012), Mar, Nr. 3, S. 246–54
- [Gringhuis u. a. 2011] GRINGHUIS, Sonja I. ; WEVERS, Brigitte A. ; KAPTEIN, Tanja M. ; CAPEL, Toni M M. van ; THEELEN, Bart ; BOEKHOUT, Teun ; JONG, Esther C. de ; GEIJTENBEEK, Teunis B H.: Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. In: *PLoS Pathog* 7 (2011), Nr. 1, S. e1001259
- [Gudlaugsson u. a. 2003] GUDLAUGSSON, Olafur ; GILLESPIE, Shane ; LEE, Kathleen ; VANDE BERG, Jeff ; HU, Jianfang ; MESSER, Shawn ; HERWALDT, Loreen ; PFALLER, Michael ; DIEKEMA, Daniel: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. In: *Clin Infect Dis* 37 (2003), Nov, Nr. 9, S. 1172–7
- [Halstenson u. a. 2016] HALSTENSON, C E. ; SHAMP, T ; GARGANO, M A. ; WALSH, R M. ; PATCHEN, M L.: Two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation phase 1 studies evaluating BTH1677, a 1, 3-1,6 beta glucan pathogen associated molecular pattern, in healthy volunteer subjects. In: *Invest New Drugs* 34 (2016), Apr, Nr. 2, S. 202–15
- [Hannon u. a. 2003] HANNON, Robert ; CROXTALL, Jamie D. ; GETTING, Steve J. ; ROVIEZZO, Fiorita ; YONA, Simon ; PAUL-CLARK, Mark J. ; GAVINS, Felicity N E. ; PERRETTI, Mauro ; MORRIS, John F. ; BUCKINGHAM,

- Julia C. ; FLOWER, Roderick J.: Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. In: *FASEB J* 17 (2003), Feb, Nr. 2, S. 253–5
- [Heinsbroek u. a. 2006] HEINSBROEK, Sigrid E M. ; TAYLOR, Philip R. ; ROSAS, Marcela ; WILLMENT, Janet A. ; WILLIAMS, David L. ; GORDON, Siamon ; BROWN, Gordon D.: Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. In: *J Immunol* 176 (2006), May, Nr. 9, S. 5513–8
- [Hernanz-Falcón u. a. 2001] HERMANZ-FALCÓN, P ; ARCE, I ; RODA-NAVARRO, P ; FERNÁNDEZ-RUIZ, E: Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. In: *Immunogenetics* 53 (2001), Nr. 4, S. 288–95
- [Hernández-Santos und Gaffen 2012] HERNÁNDEZ-SANTOS, Nydiaris ; GAFFEN, Sarah L.: Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. In: *Cell Host Microbe* 11 (2012), May, Nr. 5, S. 425–35
- [Herre u. a. 2004] HERRE, Jurgen ; MARSHALL, Andrew S J. ; CARON, Emmanuelle ; EDWARDS, Alexander D. ; WILLIAMS, David L. ; SCHWEIGHOFFER, Edina ; TYBULEWICZ, Victor ; SOUSA, Caetano Reis e ; GORDON, Siamon ; BROWN, Gordon D.: Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. In: *Blood* 104 (2004), Dec, Nr. 13, S. 4038–45
- [Hesse 2011] HESSE, Connie: *CLEC7A/Dectin-1 attenuates the immune response against dying and dead cells*, Dissertation, 2011
- [Hiscott u. a. 1993] HISCOTT, J ; MAROIS, J ; GAROUFALIS, J ; D'ADDARIO, M ; ROULSTON, A ; KWAN, I ; PEPIN, N ; LACOSTE, J ; NGUYEN, H ; BENSI, G: Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. In: *Mol Cell Biol* 13 (1993), Oct, Nr. 10, S. 6231–40
- [Hise u. a. 2009] HISE, Amy G. ; TOMALKA, Jeffrey ; GANESAN, Sandhya ; PATEL, Krupen ; HALL, Brian A. ; BROWN, Gordon D. ; FITZGERALD, Katherine A.: An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. In: *Cell Host Microbe* 5 (2009), May, Nr. 5, S. 487–97

- [Hochreiter-Hufford und Ravichandran 2013] HOCHREITER-HUFFORD, Amelia ; RAVICHANDRAN, Kodi S.: Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (2013), Jan, Nr. 1, S. a008748
- [Hollmig u. a. 2009] HOLLMIG, S T. ; ARIIZUMI, Kiyoshi ; CRUZ, Ponciano D.: Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2. In: *Glycobiology* 19 (2009), Jun, Nr. 6, S. 568–75
- [Hu u. a. 2011] HU, Chi-Tan ; WU, Jia-Ru ; CHENG, Chuan-Chu ; WANG, Sindy ; WANG, Hsiao-Ting ; LEE, Ming-Che ; WANG, Ling-Jung ; PAN, Siou-Mei ; CHANG, Tsu-Yao ; WU, Wen-Sheng: Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2. In: *Clin Exp Metastasis* 28 (2011), Dec, Nr. 8, S. 851–63
- [Huang u. a. 2010] HUANG, Haibin ; OSTROFF, Gary R. ; LEE, Chrono K. ; SPECHT, Charles A. ; LEVITZ, Stuart M.: Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. In: *MBio* 1 (2010), Nr. 3
- [Huang u. a. 2015] HUANG, Juin-Hua ; LIN, Ching-Yu ; WU, Sheng-Yang ; CHEN, Wen-Yu ; CHU, Ching-Liang ; BROWN, Gordon D. ; CHUU, Chih-Pin ; WU-HSIEH, Betty A.: CR3 and Dectin-1 Collaborate in Macrophage Cytokine Response through Association on Lipid Rafts and Activation of Syk-JNK-AP-1 Pathway. In: *PLoS Pathog* 11 (2015), Jul, Nr. 7, S. e1004985
- [Huang u. a. 2003] HUANG, Zhen-Yu ; HUNTER, Sharon ; KIM, Moo-Kyung ; INDIK, Zena K. ; SCHREIBER, Alan D.: The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors FcγRIIB and FcγRIIA. In: *J Leukoc Biol* 73 (2003), Jun, Nr. 6, S. 823–9
- [Hubo u. a. 2013] HUBO, Mario ; TRINSCHEK, Bettina ; KRYCZANOWSKY, Fanny ; TUETTENBERG, Andrea ; STEINBRINK, Kerstin ; JONULEIT, Helmut: Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. In: *Front Immunol* 4 (2013), S. 82

- [Iyer u. a. 2013] IYER, Shankar S. ; HE, Qiong ; JANCZY, John R. ; ELLIOTT, Eric I. ; ZHONG, Zhenyu ; OLIVIER, Alicia K. ; SADLER, Jeffrey J. ; KNEPPER-ADRIAN, Vickie ; HAN, Renzhi ; QIAO, Liang ; EISENBARTH, Stephanie C. ; NAUSEEF, William M. ; CASSEL, Suzanne L. ; SUTTERWALA, Fayyaz S.: Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. In: *Immunity* 39 (2013), Aug, Nr. 2, S. 311–23
- [Jancic u. a. 2007] JANCIC, Carolina ; SAVINA, Ariel ; WASMEIER, Christina ; TOLMACHOVA, Tanya ; EL-BENNA, Jamel ; DANG, Pham My-Chan ; PASCOLO, Steve ; GOUGEROT-POCIDALO, Maire-Anne ; RAPOSO, Graça ; SEABRA, Miguel C. ; AMIGORENA, Sebastian: Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. In: *Nat Cell Biol* 9 (2007), Apr, Nr. 4, S. 367–78
- [Jia u. a. 2014] JIA, Xin-Ming ; TANG, Bing ; ZHU, Le-Le ; LIU, Yan-Hui ; ZHAO, Xue-Qiang ; GORJESTANI, Sara ; HSU, Yen-Michael S. ; YANG, Long ; GUAN, Jian-Hong ; XU, Guo-Tong ; LIN, Xin: CARD9 mediates Dectin-1-induced ERK activation by linking Ras-GRF1 to H-Ras for antifungal immunity. In: *J Exp Med* 211 (2014), Oct, Nr. 11, S. 2307–21
- [Kankkunen u. a. 2010] KANKKUNEN, Päivi ; TEIRILÄ, Laura ; RINTAHAKA, Johanna ; ALENIUS, Harri ; WOLFF, Henrik ; MATIKAINEN, Sampsa: (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. In: *J Immunol* 184 (2010), Jun, Nr. 11, S. 6335–42
- [Kant u. a. 2002] KANT, Anita M. ; DE, Pradip ; PENG, Xiaodong ; YI, Taolin ; RAWLINGS, David J. ; KIM, Jong S. ; DURDEN, Donald L.: SHP-1 regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. In: *Blood* 100 (2002), Sep, Nr. 5, S. 1852–9
- [Kato u. a. 2006] KATO, Yuya ; ADACHI, Yoshiyuki ; OHNO, Naohito: Contribution of N-linked oligosaccharides to the expression and functions of beta-glucan receptor, Dectin-1. In: *Biol Pharm Bull* 29 (2006), Aug, Nr. 8, S. 1580–6
- [Keler u. a. 2007] KELER, T ; HE, L ; RAMAKRISHNA, V ; CHAMPION, B: Antibody-targeted vaccines. In: *Oncogene* 26 (2007), May, Nr. 25, S. 3758–67



- [Keshari u. a. 2013] KESHARI, Ravi S. ; VERMA, Anupam ; BARTH WAL, Manoj K. ; DIKSHIT, Madhu: Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. In: *J Cell Biochem* 114 (2013), Mar, Nr. 3, S. 532–40
- [Kim u. a. 2016] KIM, Hyung S. ; PARK, Ki H. ; LEE, Hong K. ; KIM, Ji S. ; KIM, Yong G. ; LEE, Jae H. ; KIM, Ki H. ; YUN, Jieun ; HWANG, Bang Y. ; HONG, Jin T. ; KIM, Youngsoo ; HAN, Sang-Bae: Curdlan activates dendritic cells through dectin-1 and toll-like receptor 4 signaling. In: *Int Immunopharmacol* 39 (2016), Jul, S. 71–78
- [Kim u. a. 2005] KIM, Seon-Hee ; LECHMAN, Eric R. ; BIANCO, Nicole ; MENON, Rajasree ; KERAVALA, Annahita ; NASH, Joan ; MI, Zhibao ; WATKINS, Simon C. ; GAMBOTTO, Andrea ; ROBBINS, Paul D.: Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. In: *J Immunol* 174 (2005), May, Nr. 10, S. 6440–8
- [Kohchi u. a. 2009] KOHCHI, Chie ; INAGAWA, Hiroyuki ; NISHIZAWA, Takashi ; SOMA, Gen-Ichiro: ROS and innate immunity. In: *Anticancer Res* 29 (2009), Mar, Nr. 3, S. 817–21
- [Kralova u. a. 2016] KRALOVA, Jarmila ; FABISIK, Matej ; POKORNA, Jana ; SKOPCOVA, Tereza ; MALISSEN, Bernard ; BRDICKA, Tomas: The Transmembrane Adaptor Protein SCIMP Facilitates Sustained Dectin-1 Signaling in Dendritic Cells. In: *J Biol Chem* 291 (2016), Aug, Nr. 32, S. 16530–40
- [Kroening u. a. 2008] KROENING, Paula R. ; BARNES, Terrance W. ; PEASE, Larry ; LIMPER, Andrew ; KITA, Hirohito ; VASSALLO, Robert: Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. In: *J Immunol* 181 (2008), Jul, Nr. 2, S. 1536–47
- [Kusumawati u. a. 2000] KUSUMAWATI, A ; CAZEVIEILLE, C ; PORTE, F ; BETTACHE, S ; LIAUTARD, J P. ; SRI WIDADA, J: Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. In: *Microb Pathog* 28 (2000), Jun, Nr. 6, S. 343–52

- [Kusumawati u. a. 2001] KUSUMAWATI, A ; LIAUTARD, J P. ; SRI WIDADA, J: Implication of annexin 1 in phagocytosis: effects of n-terminal domain deletions and point mutations of the phosphorylation site Ser-27. In: *Cell Biol Int* 25 (2001), Nr. 8, S. 809–13
- [Lee u. a. 2006] LEE, ChuHee ; LIM, Hyung-Kyu ; SAKONG, Joon ; LEE, Yun-Sik ; KIM, Jae-Ryong ; BAEK, Suk-Hwan: Janus kinase-signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin (IL)-1beta and IL-6 production. In: *Mol Pharmacol* 69 (2006), Mar, Nr. 3, S. 1041–7
- [Lee und Kim 2014] LEE, Dong H. ; KIM, Ha W.: Innate immunity induced by fungal beta-glucans via dectin-1 signaling pathway. In: *Int J Med Mushrooms* 16 (2014), Nr. 1, S. 1–16
- [Leibundgut-Landmann u. a. 2008] LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé ; OSORIO, Fabiola ; BROWN, Gordon D. ; SOUSA, Caetano Reis e: Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. In: *Blood* 112 (2008), Dec, Nr. 13, S. 4971–80
- [Leonardo u. a. 2016] LEONARDO, Steven M. ; FULTON, Ross B. ; WURST, Lindsay R. ; GORDEN, Keith B. ; JONAS, Adria B. ; QUI, Xiaohong ; CHAN, Anissa S. ; GRAFF, Jeremy R.: Abstract A160: Imprime PGG binds to neutrophils through complement, Fc, and dectin-1 receptors, priming these cells for enhanced ROS production and tumor cell cytotoxicity. In: *Cancer Immunology Research* 4 (2016), Januar, Nr. 1 Supplement, S. A160–A160. – ISSN 2326-6066, 2326-6074
- [Leoni u. a. 2013] LEONI, Giovanna ; ALAM, Ashfaquul ; NEUMANN, Philipp-Alexander ; LAMBETH, J D. ; CHENG, Guangjie ; MCCOY, James ; HILGARTH, Roland S. ; KUNDU, Kousik ; MURTHY, Niren ; KUSTERS, Dennis ; REUTELINGSPERGER, Chris ; PERRETTI, Mauro ; PARKOS, Charles A. ; NEISH, Andrew S. ; NUSRAT, Asma: Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. In: *J Clin Invest* 123 (2013), Jan, Nr. 1, S. 443–54
- [Levitzki 2012] LEVITZKI, Alexander: Targeting the Immune System to

Fight Cancer Using Chemical Receptor Homing Vectors Carrying Polyinosine/Cytosine (PolyIC). In: *Front Oncol* 2 (2012), S. 4

[Levrاند u. a. 2005] LEVRAND, Sandra ; PESSE, Benoît ; FEIHL, François ; WAEBER, Bernard ; PACHER, Pal ; ROLLI, Joëlle ; SCHALLER, Marie-Denise ; LIAUDET, Lucas: Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF-kappaB activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Oct, Nr. 41, S. 34878–87

[Li u. a. 2010] LI, Lequn ; KIM, Jin ; BOUSSIOTIS, Vassiliki A.: IL-1beta-mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells. In: *J Immunol* 185 (2010), Oct, Nr. 7, S. 4148–53

[Li u. a. 2012] LI, Xia ; CAI, Yan ; WANG, Yu-Sheng ; SHI, Yuan-Yuan ; HOU, Wei ; XU, Chun-Sheng ; WANG, Hai-Yan ; YE, Zi ; YAO, Li-Bo ; ZHANG, Jian: Hyperglycaemia exacerbates choroidal neovascularisation in mice via the oxidative stress-induced activation of STAT3 signalling in RPE cells. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 10, S. e47600

[Lilly u. a. 2010] LILLY, E A. ; YANO, J ; FIDEL, P L.: Annexin-A1 identified as the oral epithelial cell anti-Candida effector moiety. In: *Mol Oral Microbiol* 25 (2010), Aug, Nr. 4, S. 293–304

[Lipinski u. a. 2013] LIPINSKI, Tomasz ; FITIEH, Amira ; ST PIERRE, Joelle ; OSTERGAARD, Hanne L. ; BUNDLE, David R. ; TOURET, Nicolas: Enhanced immunogenicity of a tricomponent mannan tetanus toxoid conjugate vaccine targeted to dendritic cells via Dectin-1 by incorporating beta-glucan. In: *J Immunol* 190 (2013), Apr, Nr. 8, S. 4116–28

[Liu u. a. 2009] LIU, Wen-Hsin ; CHENG, Yun-Ching ; CHANG, Long-Sen: ROS-mediated p38alpha MAPK activation and ERK inactivation responsible for upregulation of Fas and FasL and autocrine Fas-mediated cell death in Taiwan cobra phospholipase A(2)-treated U937 cells. In: *J Cell Physiol* 219 (2009), Jun, Nr. 3, S. 642–51

[Liu u. a. 2013] LIU, Wen-hua ; LIU, Jing-jin ; WU, Jian ; ZHANG, Lu-lu ; LIU, Fang ; YIN, Li ; ZHANG, Mao-mao ; YU, Bo: Novel mechanism of inhibition of

dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 1, S. e55487

[Lu u. a. 2012] LU, Rongze ; PAN, Hao ; SHIVELY, John E.: CEACAM1 negatively regulates IL-1beta production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex. In: *PLoS Pathog* 8 (2012), Nr. 4, S. e1002597

[Ma u. a. 2012] MA, Jun ; BECKER, Courtney ; LOWELL, Clifford A. ; UNDERHILL, David M.: Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. In: *J Biol Chem* 287 (2012), Oct, Nr. 41, S. 34149–56

[Magrane und Uniprot Consortium 2011] MAGRANE, Michele ; UNIPROT CONSORTIUM, Uniprot: UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. In: *Database (Oxford)* 2011 (2011), S. bar009

[Majeed u. a. 2001] MAJEED, M ; CAVEGGION, E ; LOWELL, C A. ; BERTON, G: Role of Src kinases and Syk in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. In: *J Leukoc Biol* 70 (2001), Nov, Nr. 5, S. 801–11

[Mantegazza u. a. 2004] MANTEGAZZA, Adriana R. ; BARRIO, María M. ; MOUTEL, Sandrine ; BOVER, Laura ; WECK, Markus ; BROSSART, Peter ; TEILLAUD, Jean-Luc ; MORDOH, José: CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. In: *Blood* 104 (2004), Aug, Nr. 4, S. 1183–90

[Mantegazza u. a. 2008] MANTEGAZZA, Adriana R. ; SAVINA, Ariel ; VERMEULEN, Mónica ; PÉREZ, Laura ; GEFFNER, Jorge ; HERMINE, Olivier ; ROSENZWEIG, Sergio D. ; FAURE, Florence ; AMIGORENA, Sebastián: NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. In: *Blood* 112 (2008), Dec, Nr. 12, S. 4712–22

[Maródi und Erdös 2010] MARÓDI, László ; ERDÖS, Melinda: Dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. In: *N Engl J Med* 362 (2010), Jan, Nr. 4, S. 367; author reply 367–8

- [Marshall und Gordon 2004] MARSHALL, Andrew S J. ; GORDON, Siamon: Commentary: C-type lectins on the macrophage cell surface–recent findings. In: *Eur J Immunol* 34 (2004), Jan, Nr. 1, S. 18–24
- [Mayer u. a. 2012] MAYER, Christian T. ; BEROD, Luciana ; SPARWASSER, Tim: Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. In: *Front Immunol* 3 (2012), S. 183
- [Mayra Denisse Ramirez-Quijas 2015] MAYRA DENISSE RAMIREZ-QUIJAS, Mayra Cuellar-Cruz: Effect of oxidative stress on cell wall morphology in four pathogenic *Candida* species. In: *Mycological Progress* 14 (2015), March, Nr. 8
- [McCann u. a. 2005] MCCANN, Frances ; CARMONA, Eva ; PURI, Vishwajeet ; PAGANO, Richard E. ; LIMPER, Andrew H.: Macrophage internalization of fungal beta-glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. In: *Infect Immun* 73 (2005), Oct, Nr. 10, S. 6340–9
- [McNeil u. a. 2006] MCNEIL, Anna K. ; RESCHER, Ursula ; GERKE, Volker ; MCNEIL, Paul L.: Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nov, Nr. 46, S. 35202–7
- [Medzhitov 2007] MEDZHITOV, Ruslan: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. In: *Nature* 449 (2007), Oct, Nr. 7164, S. 819–26
- [Mellman und Steinman 2001] MELLMAN, I ; STEINMAN, R M.: Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. In: *Cell* 106 (2001), Aug, Nr. 3, S. 255–8
- [Mellman 2013] MELLMAN, Ira: Dendritic cells: master regulators of the immune response. In: *Cancer Immunol Res* 1 (2013), Sep, Nr. 3, S. 145–9
- [Meng u. a. 2002] MENG, Tzu-Ching ; FUKADA, Toshiyuki ; TONKS, Nicholas K.: Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. In: *Mol Cell* 9 (2002), Feb, Nr. 2, S. 387–99

- [Menu und Vince 2011] MENU, P ; VINCE, J E.: The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. In: *Clin Exp Immunol* 166 (2011), Oct, Nr. 1, S. 1–15
- [Meyer-Wentrup u. a. 2005] MEYER-WENTRUP, Friederike ; CAMBI, Alessandra ; ADEMA, Gosse J. ; FIGDOR, Carl G.: Sweet talk: closing in on C type lectin signaling. In: *Immunity* 22 (2005), Apr, Nr. 4, S. 399–400
- [Meyer-Wentrup u. a. 2007] MEYER-WENTRUP, Friederike ; FIGDOR, Carl G. ; ANSEMS, Marleen ; BROSSART, Peter ; WRIGHT, Mark D. ; ADEMA, Gosse J. ; SPIEL, Annemiek B. van: Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. In: *J Immunol* 178 (2007), Jan, Nr. 1, S. 154–62
- [Miller u. a. 2007] MILLER, Stephen D. ; TURLEY, Danielle M. ; PODOJIL, Joseph R.: Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. In: *Nat Rev Immunol* 7 (2007), Sep, Nr. 9, S. 665–77
- [Moreau u. a. 2012a] MOREAU, Aurélie ; VAREY, Emilie ; BÉRIOU, Gaëlle ; HILL, Marcelo ; BOUCHET-DELBOS, Laurence ; SEGOVIA, Mercedes ; CUTURI, Maria-Cristina: Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials. In: *Front Immunol* 3 (2012), S. 218
- [Moreau u. a. 2012b] MOREAU, Aurélie ; VAREY, Emilie ; BOUCHET-DELBOS, Laurence ; CUTURI, Maria-Cristina: Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. In: *Transplant Res* 1 (2012), Nr. 1, S. 13
- [Netea u. a. 2010] NETEA, Mihai G. ; SIMON, Anna ; VEERDONK, Frank van de ; KULLBERG, Bart-Jan ; MEER, Jos W M. Van der ; JOOSTEN, Leo A B.: IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. In: *PLoS Pathog* 6 (2010), Feb, Nr. 2, S. e1000661
- [Neumann u. a. 2014] NEUMANN, Konstantin ; CASTIÑEIRAS-VILARIÑO, Mercedes ; HÖCKENDORF, Ulrike ; HANNESSCHLÄGER, Nicole ; LEMEER, Simone ; KUPKA, Danny ; MEYERMANN, Svenia ; LECH, Maciej ; ANDERS, Hans-Joachim ; KUSTER, Bernhard ; BUSCH, Dirk H. ; GEWIES, Andreas ; NAUMANN, Ronald ; GROSS, Olaf ; RULAND, Jürgen: Clec12a is an inhibitory

receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. In: *Immunity* 40 (2014), Mar, Nr. 3, S. 389–99

[Ng u. a. 2014] NG, Ivan H W. ; YEAP, Yvonne Y C. ; ONG, Lynette S R. ; JANS, David A. ; BOGOYEVITCH, Marie A.: Oxidative stress impairs multiple regulatory events to drive persistent cytokine-stimulated STAT3 phosphorylation. In: *Biochim Biophys Acta* 1843 (2014), Mar, Nr. 3, S. 483–94

[Niedergang u. a. 2016] NIEDERGANG, Florence ; DI BARTOLO, Vincenzo ; ALCOVER, Andrés: Comparative Anatomy of Phagocytic and Immunological Synapses. In: *Front Immunol* 7 (2016), S. 18

[Nikolic und Roep 2013] NIKOLIC, Tatjana ; ROEP, Bart O.: Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells. In: *Front Immunol* 4 (2013), S. 113

[Nunes und Demaurex 2010] NUNES, Paula ; DEMAUREX, Nicolas: The role of calcium signaling in phagocytosis. In: *J Leukoc Biol* 88 (2010), Jul, Nr. 1, S. 57–68

[Öhman u. a. 2014] ÖHMAN, Tiina ; TEIRILÄ, Laura ; LAHESMAA-KORPINEN, Anna-Maria ; CYPYK, Wojciech ; VECKMAN, Ville ; SAIJO, Shinobu ; WOLFF, Henrik ; HAUTANIEMI, Sampsa ; NYMAN, Tuula A. ; MATIKAINEN, Sampsa: Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. In: *J Immunol* 192 (2014), Jun, Nr. 12, S. 5952–62

[Palucka und Banchereau 2013] PALUCKA, Karolina ; BANCHEREAU, Jacques: Human dendritic cell subsets in vaccination. In: *Curr Opin Immunol* 25 (2013), Jun, Nr. 3, S. 396–402

[Patel u. a. 2011] PATEL, Devang M. ; AHMAD, Syed F. ; WEISS, Dieter G. ; GERKE, Volker ; KUZNETSOV, Sergei A.: Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. In: *J Cell Sci* 124 (2011), Feb, Nr. Pt 4, S. 578–88

[Petzold u. a. 2012] PETZOLD, Cathleen ; SCHALLENBERG, Sonja ; STERN, Joel N H. ; KRETSCHMER, Karsten: Targeted antigen delivery to DEC-205

- dendritic cells for tolerogenic vaccination. In: *Rev Diabet Stud* 9 (2012), Nr. 4, S. 305–18
- [Plato u. a. 2013] PLATO, Anthony ; WILLMENT, Janet A. ; BROWN, Gordon D.: C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. In: *Int Rev Immunol* 32 (2013), Apr, Nr. 2, S. 134–56
- [Popov u. a. 2006] POPOV, Igor ; LI, Mu ; ZHENG, Xiufen ; SAN, Hongtao ; ZHANG, Xusheng ; ICHIM, Thomas E. ; SUZUKI, Motohiko ; FENG, Biao ; VLADAU, Costin ; ZHONG, Robert ; GARCIA, Bertha ; STREJAN, Gill ; INMAN, Robert D. ; MIN, Wei-Ping: Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. In: *Arthritis Res Ther* 8 (2006), Nr. 5, S. R141
- [Puel u. a. 2011] PUEL, Anne ; CYPOWYJ, Sophie ; BUSTAMANTE, Jacinta ; WRIGHT, Jill F. ; LIU, Luyan ; LIM, Hye K. ; MIGAUD, Mélanie ; ISRAEL, Laura ; CHRABIEH, Maya ; AUDRY, Magali ; GUMBLETON, Matthew ; TOULON, Antoine ; BODEMER, Christine ; EL-BAGHDADI, Jamila ; WHITTERS, Matthew ; PARADIS, Theresa ; BROOKS, Jonathan ; COLLINS, Mary ; WOLFMAN, Neil M. ; AL-MUHSEN, Saleh ; GALICCHIO, Miguel ; ABEL, Laurent ; PICARD, Capucine ; CASANOVA, Jean-Laurent: Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. In: *Science* 332 (2011), Apr, Nr. 6025, S. 65–8
- [Reid u. a. 2009] REID, Delyth M. ; GOW, Neil A R. ; BROWN, Gordon D.: Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. In: *Curr Opin Immunol* 21 (2009), Feb, Nr. 1, S. 30–7
- [Reth und Brummer 2004] RETH, Michael ; BRUMMER, Tilman: Feedback regulation of lymphocyte signalling. In: *Nat Rev Immunol* 4 (2004), Apr, Nr. 4, S. 269–77
- [Reuter u. a. 2010] REUTER, Simone ; GUPTA, Subash C. ; CHATURVEDI, Madan M. ; AGGARWAL, Bharat B.: Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? In: *Free Radic Biol Med* 49 (2010), Dec, Nr. 11, S. 1603–16
- [Ricart u. a. 2011] RICART, Brendon G. ; JOHN, Beena ; LEE, Dooyoung ; HUNTER, Christopher A. ; HAMMER, Daniel A.: Dendritic cells distinguish



individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. In: *J Immunol* 186 (2011), Jan, Nr. 1, S. 53–61

[Rieber u. a. 2015] RIEBER, Nikolaus ; SINGH, Anurag ; ÖZ, Hasan ; CAREVIC, Melanie ; BOUZANI, Maria ; AMICH, Jorge ; OST, Michael ; YE, Zhiyong ; BALLBACH, Marlene ; SCHÄFER, Iris ; MEZGER, Markus ; KLIMOSCH, Sascha N. ; WEBER, Alexander N R. ; HANDGRETINGER, Rupert ; KRAPPMANN, Sven ; LIESE, Johannes ; ENGEHOLM, Maik ; SCHÜLE, Rebecca ; SALIH, Helmut R. ; MARODI, Laszlo ; SPECKMANN, Carsten ; GRIMBACHER, Bodo ; RULAND, Jürgen ; BROWN, Gordon D. ; BEILHACK, Andreas ; LOEFFLER, Juergen ; HARTL, Dominik: Pathogenic fungi regulate immunity by inducing neutrophilic myeloid-derived suppressor cells. In: *Cell Host Microbe* 17 (2015), Apr, Nr. 4, S. 507–14

[Riol-Blanco u. a. 2005] RIOL-BLANCO, Lorena ; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Noelia ; TORRES, Ana ; TEJEDOR, Alberto ; NARUMIYA, Shuh ; CORBÍ, Angel L. ; SÁNCHEZ-MATEOS, Paloma ; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, José Luis: The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. In: *J Immunol* 174 (2005), Apr, Nr. 7, S. 4070–80

[Rogers u. a. 2005] ROGERS, Neil C. ; SLACK, Emma C. ; EDWARDS, Alexander D. ; NOLTE, Martijn A. ; SCHULZ, Oliver ; SCHWEIGHOFFER, Edina ; WILLIAMS, David L. ; GORDON, Siamon ; TYBULEWICZ, Victor L. ; BROWN, Gordon D. ; SOUSA, Caetano Reis e: Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. In: *Immunity* 22 (2005), Apr, Nr. 4, S. 507–17

[Rosas u. a. 2008] ROSAS, Marcela ; LIDDIARD, Kate ; KIMBERG, Matti ; FARO-TRINDADE, Inês ; MCDONALD, Jacqueline U. ; WILLIAMS, David L. ; BROWN, Gordon D. ; TAYLOR, Philip R.: The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. In: *J Immunol* 181 (2008), Sep, Nr. 5, S. 3549–57

[Rutella u. a. 2006] RUTELLA, Sergio ; DANESE, Silvio ; LEONE, Giuseppe: Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. In: *Blood* 108 (2006), Sep, Nr. 5, S. 1435–40

- [Saijo und Iwakura 2011] SAIJO, Shinobu ; IWAKURA, Yoichiro: Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. In: *Int Immunol* 23 (2011), Aug, Nr. 8, S. 467–72
- [Sakthivel u. a. 2008] SAKTHIVEL, Senthilkumar K. ; SINGH, Udai P. ; SINGH, Shailesh ; TAUB, Dennis D. ; IGIETSEME, Joseph U. ; LILLARD, James W.: CCL5 regulation of mucosal chlamydial immunity and infection. In: *BMC Microbiol* 8 (2008), S. 136
- [Salamero u. a. 2001] SALAMERO, J ; BAUSINGER, H ; MOMMAAS, A M. ; LIPSKER, D ; PROAMER, F ; CAZENAVE, J P. ; GOUD, B ; SALLE, H de la ; HANAU, D: CD1a molecules traffic through the early recycling endosomal pathway in human Langerhans cells. In: *J Invest Dermatol* 116 (2001), Mar, Nr. 3, S. 401–8
- [Samavati u. a. 2009] SAMAVATI, Lobelia ; RASTOGI, Ruchi ; DU, Wenjin ; HÜTTEMANN, Maik ; FITE, Alemu ; FRANCHI, Luigi: STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. In: *Mol Immunol* 46 (2009), May, Nr. 8-9, S. 1867–77
- [Sancho u. a. 2009] SANCHO, David ; JOFFRE, Olivier P. ; KELLER, Anna M. ; ROGERS, Neil C. ; MARTÍNEZ, Dolores ; HERNANZ-FALCÓN, Patricia ; ROSEWELL, Ian ; SOUSA, Caetano Reis e: Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. In: *Nature* 458 (2009), Apr, Nr. 7240, S. 899–903
- [Sancho und Reis e Sousa 2013] SANCHO, David ; SOUSA, Caetano Reis e: Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. In: *Curr Opin Immunol* 25 (2013), Feb, Nr. 1, S. 46–52
- [Savina u. a. 2006] SAVINA, Ariel ; JANCIC, Carolina ; HUGUES, Stephanie ; GUERMONPREZ, Pierre ; VARGAS, Pablo ; MOURA, Ivan C. ; LENNON-DUMÉNIL, Ana-Maria ; SEABRA, Miguel C. ; RAPOSO, Graça ; AMIGORENA, Sebastian: NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. In: *Cell* 126 (2006), Jul, Nr. 1, S. 205–18

- [Segal u. a. 2016] SEGAL, Neil H. ; GADA, Purvi ; SENZER, Neil ; GARGANO, Michele A. ; PATCHEN, Myra L. ; SALTZ, Leonard B.: A Phase II Efficacy and Safety, Open-Label, Multicenter Study of Imprime PGG Injection in Combination With Cetuximab in Patients With Stage IV KRAS-Mutant Colorectal Cancer. In: *Clin Colorectal Cancer* (2016), Feb
- [Seo u. a. 2013] SEO, Beom-Seok ; LEE, Sang-Hoon ; LEE, Ju-Eon ; YOO, Yung-Choon ; LEE, Junglim ; PARK, Seok-Rae: Dectin-1 Stimulation Selectively Reinforces LPS-driven IgG1 Production by Mouse B Cells. In: *Immune Netw* 13 (2013), Oct, Nr. 5, S. 205–12
- [Shao u. a. 2015] SHAO, Bo-Zong ; XU, Zhe-Qi ; HAN, Bin-Ze ; SU, Ding-Feng ; LIU, Chong: NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. In: *Front Pharmacol* 6 (2015), S. 262
- [Shio u. a. 2015] SHIO, Marina T. ; CHRISTIAN, Jan G. ; JUNG, Jee Y. ; CHANG, Kwang-Poo ; OLIVIER, Martin: PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection. In: *PLoS Negl Trop Dis* 9 (2015), Jun, Nr. 6, S. e0003868
- [Sloma u. a. 2008] SLOMA, Ivan ; ZILBER, Marie-Thérèse ; VASSELON, Thierry ; SETTERBLAD, Niclas ; CAVALLARI, Marco ; MORI, Lucia ; DE LIBERO, Gennaro ; CHARRON, Dominique ; MOONEY, Nuala ; GELIN, Catherine: Regulation of CD1a surface expression and antigen presentation by invariant chain and lipid rafts. In: *J Immunol* 180 (2008), Jan, Nr. 2, S. 980–7
- [Son u. a. 2011] SON, Yong ; CHEONG, Yong-Kwan ; KIM, Nam-Ho ; CHUNG, Hun-Taeg ; KANG, Dae G. ; PAE, Hyun-Ock: Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? In: *J Signal Transduct* 2011 (2011), S. 792639
- [Steinman und Cohn 1973] STEINMAN, R M. ; COHN, Z A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *J Exp Med* 137 (1973), May, Nr. 5, S. 1142–62
- [Steinman und Witmer 1978] STEINMAN, R M. ; WITMER, M D.: Lymphoid

dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978), Oct, Nr. 10, S. 5132–6

- [Steinman 2012] STEINMAN, Ralph M.: Decisions about dendritic cells: past, present, and future. In: *Annu Rev Immunol* 30 (2012), S. 1–22
- [Steinman und Banchereau 2007] STEINMAN, Ralph M. ; BANCHEREAU, Jacques: Taking dendritic cells into medicine. In: *Nature* 449 (2007), Sep, Nr. 7161, S. 419–26
- [Steinman u. a. 2003] STEINMAN, Ralph M. ; HAWIGER, Daniel ; NUSSENZWEIG, Michel C.: Tolerogenic dendritic cells. In: *Annu Rev Immunol* 21 (2003), S. 685–711
- [Stoop u. a. 2010] STOOP, Jeroen N. ; HARRY, Rachel A. ; DELWIG, Alexei von ; ISAACS, John D. ; ROBINSON, John H. ; HILKENS, Catharien M U.: Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. In: *Arthritis Rheum* 62 (2010), Dec, Nr. 12, S. 3656–65
- [Suwandi u. a. 2015] SUWANDI, Jessica S. ; TOES, René E M ; NIKOLIC, Tatjana ; ROEP, Bart O.: Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells. In: *Clin Exp Rheumatol* 33 (2015), Nr. 4 Suppl 92, S. S97–103
- [Tam u. a. 2014] TAM, Jenny M. ; MANSOUR, Michael K. ; KHAN, Nida S. ; SEWARD, Michael ; PURANAM, Sravanthi ; TANNE, Antoine ; SOKOLOVSKA, Anna ; BECKER, Christine E. ; ACHARYA, Mridu ; BAIRD, Michelle A. ; CHOI, Augustine M K. ; DAVIDSON, Michael W. ; SEGAL, Brahm H. ; LACY-HULBERT, Adam ; STUART, Lynda M. ; XAVIER, Ramnik J. ; VYAS, Jatin M.: Dectin-1-dependent LC3 recruitment to phagosomes enhances fungicidal activity in macrophages. In: *J Infect Dis* 210 (2014), Dec, Nr. 11, S. 1844–54
- [Tavares u. a. 2015] TAVARES, Aldo H. ; BÜRCEL, Pedro H. ; BOCCA, Anamélia L.: Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. In: *PLoS Pathog* 11 (2015), Jul, Nr. 7, S. e1004948

- [Ten Brinke u. a. 2015] TEN BRINKE, Anja ; HILKENS, Catharien M U. ; COOLS, Nathalie ; GEISSLER, Edward K. ; HUTCHINSON, James A. ; LOMBARDI, Giovanna ; LORD, Phillip ; SAWITZKI, Birgit ; TRZONKOWSKI, Piotr ; VAN HAM, S M. ; MARTINEZ-CACERES, Eva M.: Clinical Use of Tolerogenic Dendritic Cells-Harmonization Approach in European Collaborative Effort. In: *Mediators Inflamm* 2015 (2015), S. 471719
- [Thiagarajan u. a. 2013] THIAGARAJAN, Praveena S. ; YAKUBENKO, Valentin P. ; ELSORI, Deena H. ; YADAV, Satya P. ; WILLARD, Belinda ; TAN, Carmela D. ; RODRIGUEZ, E R. ; FEBBRAIO, Maria ; CATHCART, Martha K.: Vimentin is an endogenous ligand for the pattern recognition receptor Dectin-1. In: *Cardiovasc Res* 99 (2013), Aug, Nr. 3, S. 494–504
- [Torres-Aguilar u. a. 2010] TORRES-AGUILAR, Honorio ; BLANK, Miri ; JARA, Luis J. ; SHOENFELD, Yehuda: Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity. In: *Autoimmun Rev* 10 (2010), Nov, Nr. 1, S. 8–17
- [Trombetta und Mellman 2005] TROMBETTA, E S. ; MELLMAN, Ira: Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. In: *Annu Rev Immunol* 23 (2005), S. 975–1028
- [Tschopp und Schroder 2010] TSCHOPP, Jurg ; SCHRODER, Kate: NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? In: *Nat Rev Immunol* 10 (2010), Mar, Nr. 3, S. 210–5
- [de Turrís u. a. 2015] TURRIS, Valeria de ; TELONI, Raffaella ; CHIANI, Paola ; BROMURO, Carla ; MARIOTTI, Sabrina ; PARDINI, Manuela ; NISINI, Roberto ; TOROSANTUCCI, Antonella ; GAGLIARDI, Maria C.: Candida albicans Targets a Lipid Raft/Dectin-1 Platform to Enter Human Monocytes and Induce Antigen Specific T Cell Responses. In: *PLoS One* 10 (2015), Nr. 11, S. e0142531
- [Tzelepís u. a. 2015] TZELEPIS, Fanny ; VERWAY, Mark ; DAOUD, Jamal ; GILLARD, Joshua ; HASSANI-ARDAKANI, Kimya ; DUNN, Jonathan ; DOWNEY, Jeffrey ; GENTILE, Marilena E. ; JAWORSKA, Joanna ; SANCHEZ, Anthony Michel J. ; NÉDÉLEC, Yohann ; VALI, Hojatollah ; TABRIZIAN, Maryam ; KRISTOF, Arnold S. ; KING, Irah L. ; BARREIRO, Luis B. ; DIVANGAHI, Maziar: Annexin1

regulates DC efferocytosis and cross-presentation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: *J Clin Invest* 125 (2015), Feb, Nr. 2, S. 752–68

[Underhill und Goodridge 2012] UNDERHILL, David M. ; GOODRIDGE, Helen S.: Information processing during phagocytosis. In: *Nat Rev Immunol* 12 (2012), Jul, Nr. 7, S. 492–502

[Underhill u. a. 2005] UNDERHILL, David M. ; ROSSNAGLE, Eddie ; LOWELL, Clifford A. ; SIMMONS, Randi M.: Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. In: *Blood* 106 (2005), Oct, Nr. 7, S. 2543–50

[Unger u. a. 2009] UNGER, Wendy W.J. ; LABAN, Sandra ; KLEIJWEGT, Fleur S. ; SLIK, Arno R. van der ; ROEP, Bart O.: Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. In: *Eur J Immunol* 39 (2009), Nov, Nr. 11, S. 3147–59

[Van Brussel u. a. 2014] VAN BRUSSEL, Ilse ; LEE, Wai P. ; ROMBOUTS, Miche ; NUYTS, Amber H. ; HEYLEN, Marthe ; DE WINTER, Benedicte Y. ; COOLS, Nathalie ; SCHRIJVERS, Dorien M.: Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: can the unattainable dream turn into reality? In: *Autoimmun Rev* 13 (2014), Feb, Nr. 2, S. 138–50

[Vazquez-Torres u. a. 1996] VAZQUEZ-TORRES, A ; JONES-CARSON, J ; BALISH, E: Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. In: *Infect Immun* 64 (1996), Aug, Nr. 8, S. 3127–33

[van de Veerdonk u. a. 2010] VEERDONK, Frank L. van de ; SMEEKENS, Sanne P. ; JOOSTEN, Leo A B. ; KULLBERG, Bart J. ; DINARELLO, Charles A. ; MEER, Jos W M. van der ; NETEA, Mihai G.: Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1beta inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010), Feb, Nr. 7, S. 3030–3

[Vincent u. a. 2005] VINCENT, Michael S. ; XIONG, Xiaowei ; GRANT, Ethan P. ; PENG, Wei ; BRENNER, Michael B.: CD1a-, b-, and c-restricted TCRs recognize both self and foreign antigens. In: *J Immunol* 175 (2005), Nov, Nr. 10, S. 6344–51

- [Wagner u. a. 2011] WAGNER, Britta J. ; LINDAU, Dennis ; RIPPER, Dagmar ; STIERHOF, York-Dieter ; GLATZLE, Jörg ; WITTE, Maria ; BECK, Henning ; KEPPELER, Hildegard ; LAUBER, Kirsten ; RAMMENSEE, Hans-Georg ; KÖNIGSRAINER, Alfred: Phagocytosis of dying tumor cells by human peritoneal mesothelial cells. In: *J Cell Sci* 124 (2011), May, Nr. Pt 10, S. 1644–54
- [Walachowski u. a. 2016] WALACHOWSKI, Sarah ; TABOURET, Guillaume ; FOUCRAS, Gilles: Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. In: *PLoS One* 11 (2016), Nr. 2, S. e0148464
- [Walker und Abbas 2002] WALKER, Lucy S K. ; ABBAS, Abul K.: The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2002), Jan, Nr. 1, S. 11–9
- [Weck u. a. 2008] WECK, Markus M. ; APPEL, Silke ; WERTH, Daniela ; SINZGER, Christian ; BRINGMANN, Anita ; GRÜNEBACH, Frank ; BROSSART, Peter: hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. In: *Blood* 111 (2008), Apr, Nr. 8, S. 4264–72
- [Weyd u. a. 2013] WEYD, Heiko ; ABELER-DÖRNER, Lucie ; LINKE, Björn ; MAHR, Andrea ; JAHNDEL, Veronika ; PFRANG, Sandra ; SCHNÖLZER, Martina ; FALK, Christine S. ; KRAMMER, Peter H.: Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 4, S. e62449
- [Wheeler u. a. 2008] WHEELER, Robert T. ; KOMBE, Diana ; AGARWALA, Sudeep D. ; FINK, Gerald R.: Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. In: *PLoS Pathog* 4 (2008), Dec, Nr. 12, S. e1000227
- [Willment u. a. 2003] WILLMENT, Janet A. ; LIN, Hsi-Hsien ; REID, Delyth M. ; TAYLOR, Philip R. ; WILLIAMS, David L. ; WONG, Simon Y C. ; GORDON, Siamon ; BROWN, Gordon D.: Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. In: *J Immunol* 171 (2003), Nov, Nr. 9, S. 4569–73

- [Wilson u. a. 2013] WILSON, Duncan ; HEBECKER, Betty ; MOYES, David L. ; MIRAMÓN, Pedro ; JABLONOWSKI, Nadja ; WISGOTT, Stephanie ; ALLERT, Stefanie ; NAGLIK, Julian R. ; HUBE, Bernhard: Clotrimazole dampens vaginal inflammation and neutrophil infiltration in response to *Candida albicans* infection. In: *Antimicrob Agents Chemother* 57 (2013), Oct, Nr. 10, S. 5178–80
- [Wu u. a. 2013] WU, Sheng-Yang ; YU, Jhang-Sian ; LIU, Fu-Tong ; MIAW, Shi-Chuen ; WU-HSIEH, Betty A.: Galectin-3 negatively regulates dendritic cell production of IL-23/IL-17-axis cytokines in infection by *Histoplasma capsulatum*. In: *J Immunol* 190 (2013), Apr, Nr. 7, S. 3427–37
- [Wu u. a. 2006] WU, Wen-Sheng ; TSAI, Rong K. ; CHANG, Chung H. ; WANG, Sindy ; WU, Jia-Ru ; CHANG, Yu-Xun: Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. In: *Mol Cancer Res* 4 (2006), Oct, Nr. 10, S. 747–58
- [Xia u. a. 2005] XIA, C-Q ; PENG, R ; BEATO, F ; CLARE-SALZLER, M J.: Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. In: *Scand J Immunol* 62 (2005), Jul, Nr. 1, S. 45–54
- [Xie u. a. 2010] XIE, Jianhui ; GUO, Liang ; RUAN, Yuanyuan ; ZHU, Haiyan ; WANG, Lan ; ZHOU, Lei ; YUN, Xiaojing ; GU, Jianxin: Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. In: *Biochem Biophys Res Commun* 391 (2010), Jan, Nr. 1, S. 958–62
- [Xu u. a. 2009] XU, Shengli ; HUO, Jianxin ; GUNAWAN, Merry ; SU, I-Hsin ; LAM, Kong-Peng: Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. In: *J Biol Chem* 284 (2009), Aug, Nr. 33, S. 22005–11
- [Yan u. a. 2014] YAN, Junping ; WU, Bin ; HUANG, Bo ; HUANG, Shiguang ; JIANG, Suhua ; LU, Fangli: Dectin-1-CD37 association regulates IL-6 expression during *Toxoplasma gondii* infection. In: *Parasitol Res* 113 (2014), Aug, Nr. 8, S. 2851–60
- [Yang u. a. 2009] YANG, Yuan H. ; AEBERLI, Daniel ; DACUMOS, April ; XUE, Jin R. ; MORAND, Eric F.: Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via



glucocorticoid-induced leucine zipper. In: *J Immunol* 183 (2009), Jul, Nr. 2, S. 1435–45

[Yogev u. a. 2012] YOGEV, Nir ; FROMMER, Friederike ; LUKAS, Dominika ; KAUTZ-NEU, Kordula ; KARRAM, Khalad ; IELO, Daniele ; STEBUT, Esther von ; PROBST, Hans-Christian ; BROEK, Maries van den ; RIETHMACHER, Dieter ; BIRNBERG, Tal ; BLANK, Thomas ; REIZIS, Boris ; KORN, Thomas ; WIENDL, Heinz ; JUNG, Steffen ; PRINZ, Marco ; KURSCHUS, Florian C. ; WAISMAN, Ari: Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. In: *Immunity* 37 (2012), Aug, Nr. 2, S. 264–75

[Yokota u. a. 2001] YOKOTA, K ; TAKASHIMA, A ; BERGSTRESSER, P R. ; ARIIZUMI, K: Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. In: *Gene* 272 (2001), Jul, Nr. 1-2, S. 51–60

[Yona u. a. 2006] YONA, Simon ; HEINSBROEK, Sigrid E M. ; PEISER, Leanne ; GORDON, Siamon ; PERRETTI, Mauro ; FLOWER, Roderick J.: Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. In: *Br J Pharmacol* 148 (2006), Jun, Nr. 4, S. 469–77

[Zelante u. a. 2007] ZELANTE, Teresa ; DE LUCA, Antonella ; BONIFAZI, Pierluigi ; MONTAGNOLI, Claudia ; BOZZA, Silvia ; MORETTI, Silvia ; BELLADONNA, Maria L. ; VACCA, Carmine ; CONTE, Carmela ; MOSCI, Paolo ; BISTONI, Francesco ; PUC CETTI, Paolo ; KASTELEIN, Robert A. ; KOPF, Manfred ; ROMANI, Luigina: IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. In: *Eur J Immunol* 37 (2007), Oct, Nr. 10, S. 2695–706

[Zelante u. a. 2009] ZELANTE, Teresa ; DE LUCA, Antonella ; D'ANGELO, Carmen ; MORETTI, Silvia ; ROMANI, Luigina: IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? In: *Eur J Immunol* 39 (2009), Mar, Nr. 3, S. 645–8

[Zelante u. a. 2012] ZELANTE, Teresa ; IANNITTI, Rossana G. ; DE LUCA, Antonella ; ARROYO, Javier ; BLANCO, Noelia ; SERVILLO, Giuseppe ; SANGLARD, Dominique ; REICHARD, Utz ; PALMER, Glen E. ; LATGÈ, Jean-Paul ; PUC CETTI, Paolo ; ROMANI, Luigina: Sensing of mammalian IL-17A regulates fungal adaptation and virulence. In: *Nat Commun* 3 (2012), S. 683

- [Zelko u. a. 2002] ZELKO, Igor N. ; MARIANI, Thomas J. ; FOLZ, Rodney J.: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. In: *Free Radic Biol Med* 33 (2002), Aug, Nr. 3, S. 337–49
- [Zhang u. a. 2000] ZHANG, J ; BILLINGSLEY, M L. ; KINCAID, R L. ; SIRAGANIAN, R P.: Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nov, Nr. 45, S. 35442–7
- [Zhang u. a. 2012] ZHANG, Jian-Guo ; CZABOTAR, Peter E. ; POLICHENI, Antonia N. ; CAMINSCHI, Irina ; WAN, Soo S. ; KITSOULIS, Susie ; TULLETT, Kirsteen M. ; ROBIN, Adeline Y. ; BRAMMANANTH, Rajini ; DELFT, Mark F. van ; LU, Jinhua ; O'REILLY, Lorraine A. ; JOSEFSSON, Emma C. ; KILE, Benjamin T. ; CHIN, Wei J. ; MINTERN, Justine D. ; OLSHINA, Maya A. ; WONG, Wilson ; BAUM, Jake ; WRIGHT, Mark D. ; HUANG, David C S. ; MOHANDAS, Narla ; COPPEL, Ross L. ; COLMAN, Peter M. ; NICOLA, Nicos A. ; SHORTMAN, Ken ; LAHOUD, Mireille H.: The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. In: *Immunity* 36 (2012), Apr, Nr. 4, S. 646–57
- [Zhang u. a. 2013] ZHANG, Jingyao ; GAO, Wenjuan ; YANG, Xu ; KANG, Jingjing ; ZHANG, Yongliang ; GUO, Qirui ; HU, Yanxin ; XIA, Guoliang ; KANG, Youmin: Tolerogenic vaccination reduced effector memory CD4 T cells and induced effector memory Treg cells for type I diabetes treatment. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 7, S. e70056