

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Charakterisierung der Aspergillus-spezifischen  
T-Helferzellantwort bei gesunden Probanden  
und Patienten nach Chemotherapie und  
allogener Stammzelltransplantation**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung  
des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**vorgelegt von  
CLAUDIA RUTH BOLLINGER  
aus Tübingen**

**2004**

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

Erster Berichterstatter:

Privatdozent Dr. H. Hebart

Zweiter Berichterstatter:

Professor Dr. H.G. Rammensee

*Für meine Eltern  
und in liebevollem Andenken  
an meine Großmutter Veronika Ihum*



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Übersicht	1
1.1.2 Die Funktion der MHC-Moleküle bei der adaptiven Immunität	2
1.1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle	3
1.1.4 MHC-Klasse-II-Moleküle	4
1.2 Antigenprozessierung und Präsentation	5
1.2.1 MHC-Klasse-I-abhängige Antigenverarbeitung	5
1.2.2 MHC-Klasse-II-abhängige Antigenverarbeitung	6
1.3 T-Lymphozyten	7
1.3.1 Aktivierung von T-Lymphozyten <i>in vivo</i>	8
1.3.2 T-Effektorzellen und deren Funktionen	9
1.3.2.1 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)	9
1.3.2.2 T-Helferzellen (Abb. 1)	10
1.4 <i>Aspergillus fumigatus</i> und Aspergillose	14
1.4.1 Taxonomie und Charakterisierung des Organismus	14
1.4.2 Folgen der <i>Aspergillus fumigatus</i> Exposition für den Menschen	14
1.4.3 Klinische Symptome und Diagnose der invasiven Aspergillose	16
1.4.4 Behandlung und Prophylaxe der Aspergillose	18
1.5 Problemstellung und Zielsetzung	20
<b>2 Material und Methoden</b>	22
2.1 Material und Bezugsquellen	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	22
2.2 Zell-Spender	24
2.2.1 Einteilung der Patienten anhand des klinischen Verlaufs der IA	25
2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	25
2.4 Antigenpräsentierende Zellen	26
2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl	26
2.6 Einfrieren von Zellen	27
2.7 Auftauen von Zellen	27
2.8 Herstellung von <i>Aspergillus</i> -Antigenen	28
2.8.1 Konidiensuspension	28
2.8.2 Intra- und extrazelluläre <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigenextrakte	28
2.8.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antigenlysate	30
2.8.3 Rekombinante <i>Aspergillus fumigatus</i> -Proteine	31
2.9 Proliferationsassays	32
2.9.1 Proliferationstestungen mit PBMC	32
2.9.2 Proliferationstestung mit selektionierten CD4+/CD8+ T-Zellen	34
2.9.3 Proliferationstestung mit vorstimulierten T-Zelllinien	35
2.10 Herstellung von <i>Aspergillus</i> -spezifischen T-Zelllinien	35
2.11 Magnetic Cell Sorting zur CD4+/CD8+ Selektion aus PBMC	36

---

---

2.12 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse	37
2.12.1 Materialien für FACS-Analyse	37
2.12.2 FACS-Markierung	37
2.13 IFN- $\gamma$ ELISPOT	38
2.14 Zytokin-ELISAs	40
2.15 Statistische Verfahren	41
<b>3 Ergebnisse</b>	43
3.1 Gesunde Probanden	43
3.1.1 Austestung der verschiedenen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigene	43
3.1.1.1 Intrazelluläre Antigenextrakte von <i>Aspergillus fumigatus</i>	43
3.1.1.1.1 EC SAB	43
3.1.1.1.2 EC EXL	45
3.1.1.2 Extrazelluläre Antigenlysate von <i>Aspergillus fumigatus</i>	45
3.1.1.2.1 PP SAB	45
3.1.1.2.2 PP EXL	46
3.1.1.3 Hitzeinaktivierte Konidien von <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
3.1.1.4 Rekombinante Proteine von <i>Aspergillus fumigatus</i>	48
3.1.1.4.1 Catalase (90 kDa)	48
3.1.1.4.2 Dipeptidylpeptidase V (88 kDa)	49
3.1.1.4.3 Weitere rekombinante Proteine von <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
3.1.2 Bestimmung der Proliferation selektionierter T-Zellen auf EC SAB	51
3.1.3 Bestimmung der Zytokinproduktion von Aspergillus-spezifischen T-Zellen mittels IFN- $\gamma$ ELISPOT und Zytokin-ELISA	53
3.1.3.1 IFN- $\gamma$ Freisetzung von PBMC gesunder Probanden im ELISPOT	53
3.1.3.2 Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand von gesunden Probanden	54
3.1.4 Kultivierung von Aspergillus-spezifischen T-Zelllinien	56
3.2 Hämatologische Patienten	60
3.2.1 Austestung der verschiedenen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigene	60
3.2.1.1 Intrazelluläre Antigenextrakte von <i>Aspergillus fumigatus</i>	60
3.2.1.1.1 EC SAB	60
3.2.1.1.2 EC EXL	61
3.2.1.2 Extrazelluläre Antigenlysate von <i>Aspergillus fumigatus</i>	61
3.2.1.2.1 PP SAB	61
3.2.1.2.2 PP EXL	61
3.2.1.3 Hitzeinaktivierte Konidien von <i>Aspergillus fumigatus</i>	62
3.2.1.4 Rekombinante Proteine von <i>Aspergillus fumigatus</i>	62
3.2.1.4.1 Catalase (90 kDa)	62
3.2.1.4.2 Dipeptidylpeptidase V (88 kDa)	63
3.2.2 T-Zellantwort bei Patienten mit klinischem Anhalt für eine IA	64
3.2.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	64
3.2.2.2 Aspergillus-spezifische T-Zellantworten bei Patienten mit IA nach Chemotherapie und allogener Stammzelltransplantation	65

---

---

3.2.2.2.1 Korrelation der T-Zellreaktion der Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der IA (zum Zeitpunkt der Blutentnahme)	65
3.2.2.3 Zytokinproduktion der Aspergillus-spezifischen T-Zellen von Patienten mit IA	66
3.2.3 Vergleichende Analyse der lymphoproliferativen Antworten auf <i>Aspergillus fumigatus</i> , Tetanus-Toxoid und <i>Cytomegalievirus</i> bei Patienten spät nach allogener Stammzelltransplantation	73
3.2.4 Sequentielle Untersuchung der T-Zellreaktion im klinischen Verlauf der invasiven Aspergillose	77
<b>4 Diskussion</b>	81
<b>5 Zusammenfassung</b>	90
<b>6 Literaturangaben</b>	92

---

---

## Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenanteil
% (wt/vol)	Gewichtsanteil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Aspergillus
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
ag	Atogramm
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AIDS	<i>acquired Immuno deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo	allogen
AmB	Amphotericin B
AML	akute myeloische Leukämie
APC	<i>antigen presenting cells</i>
ARA-C	Cytosinarabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	bovines Serumalbumin
BU	Busulfan
Cat 19	Catalase 19
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
conc.	Konzentration
cpm	<i>counts per minute</i>
CY	Cyclophosphamid
d	Tag
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP V	Dipeptidylpeptidase V
EC	<i>Extrait Cellulaire</i> , Zellextrakt
EC EXL	intrazelluläres Antigenextrakt (im Hefeextrakt-Medium gezüchtet)
EC SAB	intrazelluläres Antigenextrakt (im Sabouraud-Medium gezüchtet)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EXL	<i>Extrait de Levure</i> , Hefeextrakt
ext.	ausgedehnt
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FLU	Fludarabin
g	Gramm

---

---

GvHD	<i>graft-versus-host disease</i> , Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung
Gy	Gray
h	Stunde
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IA	invasive Aspergillose
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
li	invariante Kette
IL	Interleukin
KBq	Kilobequerel
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
Ko	Konidien
l	Liter
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAK	Monoklonaler Antikörper
MDS	myelodysplastisches Syndrom
Mep 5	Metalloprotease
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MUD	<i>matched unrelated donor</i>
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	not done
ng	Nanogramm
NHL	non-Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
Pat.	Patient
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBSZT	Stammzelltransplantation aus peripherem Blut
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pep 6	Aspartatprotease
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PP	<i>Précipité</i> , Präzipitat
PP EXL	extrazelluläres Antigenlysat (im Hefeextrakt-Medium gezüchtet)
PP SAB	extrazelluläres Antigenlysat (im Sabouraud-Medium gezüchtet)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
SAB	Sabouraud-Medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Sod Mang 2	Superoxid Dismutase

---

---

SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub> 1/2	T-Helferzellsubpopulationen
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanus-Toxoid
U	Unit
VP 16	Etoposid

---

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

### 1.1.1 Übersicht

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hochdifferenzier- ten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln. Es dient dazu, den vertebraten Körper vor Infektionen mit potentiell schädlichen Mikroorganismen wie pathogenen Pilzen, Viren, Bakterien und Parasiten zu schützen, sowie anomale (z.B. maligne entartete) Körperzellen kontinuierlich zu eliminieren. Klinisch manifestiert sich das Unterdrücken, bzw. komplette Fehlen bestimmter Bestandteile des Immunsystems praktisch immer durch eine erhöhte Infektionsanfälligkeit. Die Fähigkeit eines intakt funktionier- enden vertebraten Organismus, sich gegen von außen eindringende Krank- heitserreger und deren Gifte zur Wehr setzen zu können, basiert auf einem zweistufigen Verteidigungsmechanismus: Eine erste Verteidigungslinie bildet die angeborene oder natürliche Immunität, den zweiten Pfeiler des Immunsy- stems die erworbene oder adaptive Immunität.

Die natürliche Immunität stellt die frühe, antigenunspezifische Phase der Ab- wehr von Pathogenen ohne vorausgegangenen Kontakt mit ihnen dar. Sie hat die Aufgabe, eine Infektion während der vier bis sieben Tage, die bis zum Ein- setzen der erworbenen Immunantwort vergehen, in Schach zu halten und be- ruht auf gleichbleibenden Reaktionen gegen allgemein vorkommende Merk- male von Krankheitserregern. Wichtige Komponenten der angeborenen Immu- nität sind mechanische und chemische Barrieren, wie intakte Haut mit ihrem Säuremantel, Schleimhaut, Lysozym und Magensäure, sowie das Komplement- system und spezialisierte Zellen wie Phagozyten und natürliche Killerzellen. Weiterhin sind die Elemente der Entzündungsantwort: Vasodilatation, Extrava- sion inflammatorischer Zellen, die Proteine der akuten Phase und chemische Botenstoffe wie Histamin, Interferone und Interleukine zu nennen.

---

Im Gegensatz zur natürlichen Immunität hat sich die erworbene oder adaptive Immunität im Laufe der Evolution zu einem effizienten Abwehrmechanismus entwickelt, der Pathogene antikörpervermittelt oder zellvermittelt bekämpft. In beiden Fällen ist die Immunantwort hochspezifisch für das jeweilige Antigen und wird durch dieses erst aktiviert.

Das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität ist die klonale Selektion von Lymphozyten. Vier Merkmale sind dafür bezeichnend: Spezifität, Diversität, Toleranz gegenüber Autoantigenen sowie Gedächtnis. Das System stützt sich auf drei Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen: Antigenpräsentierende Zellen (APC), B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.

Für die Auslösung von humoralen und zellvermittelten Antworten sind stets Interaktionen zwischen mindestens zwei der genannten Zelltypen notwendig.

B-Lymphozyten, die mit den von ihnen sezernierten Antikörpern die wesentlichen Effektoren der humoralen Abwehr darstellen, benötigen für ihre Aktivierung ein Signal von einer antigenspezifischen T-Helferzelle, während die zellulären Effektoren der adaptiven Immunität, die T-Lymphozyten, durch APC aktiviert werden.

Die Subpopulation der T-Helferzellen wirkt aktivierend und regulierend auf andere Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen, zytotoxische T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen. Dagegen ist die Hauptaufgabe der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) die Elimination von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen durch Induktion von Apoptose und direkte Lyse (Perforin, Granzym B) in den Zielzellen (Janeway und Travers, 1997).

### **1.1.2 Die Funktion der MHC-Moleküle bei der adaptiven Immunität**

Die Antigenerkennung bei den beiden Arten der adaptiven Immunität - humoral und zellulär - wird durch zwei unterschiedliche Gruppen von hochvariablen Rezeptormolekülen vermittelt; Immunglobuline - sezerniert in extrazelluläre Räume des Körpers, als Antikörper bezeichnet - dienen auf B-Zellen als

---

Rezeptoren, die das Antigen in seiner dreidimensionalen nativen Struktur erkennen. Dabei kann neben Proteinen auch jede andere chemische Struktur ein Antikörperepitop darstellen. Die Hauptaufgabe der Antikörper besteht darin, extrazelluläre Pathogene und deren Produkte in ihrer nativen Form entweder zu neutralisieren oder zu opsonieren.

T-Lymphozyten erkennen dagegen mit ihren antigenspezifischen Rezeptoren (TCR) Fragmente von Proteinen, sogenannte Peptide, die durch intrazelluläre Proteolyse erzeugt wurden und durch Moleküle einer Familie von höchst polymorphen Glykoproteinen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Moleküle werden von einer Gruppe von Genen - dem *major histocompatibility complex* (MHC), der auf Chromosom 6 des Menschen liegt - kodiert. Eine weitere Bezeichnung für die menschlichen MHC-Moleküle ist *human leukocyte antigens* (HLA).

T-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und fremden Peptiden, die an ein MHC-Molekül gebunden sind, zu diskriminieren. Die Funktion der MHC-Moleküle ist, das Proteinrepertoire der sie tragenden Zelle für die im Körper ständig patrouillierenden T-Zellen an der Zelloberfläche abtastbar zu machen.

In der MHC-Genregion werden zwei Klassen von MHC-Molekülen (Klasse I und II) kodiert. Diese sind zu unterscheiden aufgrund ihrer verschiedenartigen Molekülstruktur, der Länge und intrazellulären Herkunft der präsentierten Peptide sowie aufgrund der Subpopulation von T-Zellen, die durch sie stimuliert werden.

### **1.1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle**

Die MHC-Moleküle beider Klassen sind Heterodimere. Bei Klasse-I-Molekülen, die auf der Zellmembran von nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers und auf Thrombozyten zu finden sind, besteht die schwere  $\alpha$ -Kette (um 43 kDa) aus drei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen

---

zytoplasmatischen Bereich. Die kleinere, völlig extrazellulär gelegene Polypeptidkette, das  $\beta_2$ -Mikroglobulin (12 kDa), liegt nicht-kovalent assoziiert an die  $\alpha$ -Kette vor. Kodiert werden die schweren Ketten der HLA-Klasse-I-Moleküle in drei, sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus (Rammensee et al., 1997) auszeichnenden Genloci - HLA-A, -B und -C - auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 im Bereich des MHC.

Im Gegensatz dazu liegt das Gen für das funktionell monomorphe  $\beta_2$ -Mikroglobulin außerhalb des MHC auf Chromosom 15 des Menschen, obwohl es einen Teil des MHC-Klasse-I-Moleküls kodiert.

Als weiterer Bestandteil der MHC-Genregion sind die nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Loci, beispielsweise HLA-E, -G und -H, zu nennen, deren Produkte noch nicht so gut charakterisiert sind und teilweise Funktionen außerhalb des Immunsystems erfüllen (Diehl et al., 1996; Feder et al., 1996; Braud et al., 1997; Braud et al., 1998).

MHC-Klasse-I-Moleküle binden aufgrund ihrer Struktur Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge.

Antigene, die an MHC-I-Moleküle gebunden sind, werden von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkannt.

#### **1.1.4 MHC-Klasse-II-Moleküle**

MHC-Klasse-II-Moleküle besitzen einige signifikante Unterschiede im Vergleich zu Klasse-I-Molekülen. Sie sind aus zwei, nahezu gleich schweren, nicht-kovalent verknüpften Transmembranglykoproteinketten,  $\alpha$  (34 kDa) und  $\beta$  (29 kDa), aufgebaut, die jeweils zwei extrazelluläre Domänen, eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt enthalten. Kodiert werden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von je drei Genloci, HLA-DP, -DQ und -DR.

Die membranfernen, zu verschiedenen Ketten gehörenden  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Domänen bilden einen dem MHC-Klasse-I-Molekül ähnlichen peptidbindenden Spalt, der jedoch an beiden Enden offen ist. Dadurch können Peptidliganden

---

variabler Länge (12-25 Aminosäuren) von Klasse-II-Molekülen präsentiert werden (Brown et al.,1993; Rammensee et al.,1997).

MHC-Klasse-II-Moleküle werden gewöhnlich nur von Zellen des Thymusstroma und in einer Untergruppe der blutbildenen Zellen, hauptsächlich professionelle APC, exprimiert. Dazu gehören dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Die präsentierten Peptide sind entweder von Proteinen intrazellulären Ursprungs oder sie entstammen phagozytotisch, endozytotisch oder pinozytotisch aufgenommenen Proteinen, die im endosomal-lysosomalen System prozessiert wurden. Die Proteinfragmente werden nach der Prozessierung in einem speziellen Zellkompartiment (MIIC) auf die MHC-Klasse-II-Moleküle geladen.

Nach Einwirkung des inflammatorischen Zytokins Interferon- $\gamma$  können auch andere Zelltypen MHC-II-Moleküle exprimieren.

CD4+ T-Helferzellen erkennen Antigene, die an MHC-II-Moleküle gebunden sind.

## **1.2 Antigenprozessierung und Präsentation**

### **1.2.1 MHC-Klasse-I-abhängige Antigenverarbeitung**

Antigenfragmente, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, stammen von endogenen, d.h. innerhalb der Zelle synthetisierten Antigenen oder von viralen Proteinen, die ebenfalls im Zytoplasma der Zelle erzeugt wurden. Zum größten Teil fallen diese an MHC-I gebundenen Peptide als Nebenprodukte des kontinuierlichen, zytoplasmatischen Proteinabbaus, primär über den Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Weg, an (Schild und Rammensee, 2000). Im Innenraum des Proteasoms, das ein multikatalytischer Proteasekomplex ist, werden die Proteine in 3-25 Aminosäuren lange Peptide zerlegt.

Der Transport dieser Peptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER), in dem die Beladung der dort synthetisierten MHC-Moleküle stattfindet, erfolgt ATP-abhängig über das heterodimere Transporterprotein TAP (*transporter*)

---

*associated with antigen processing*). Im ER erfolgt der Zusammenbau der MHC-I-Peptid-Komplexe unter Mithilfe der Chaperone, Calnexin und Calreticulin. Über das Protein Tapasin bindet ein Komplex aus schwerer Kette,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Calreticulin an den TAP-Komplex, bis schließlich Peptidtransport durch TAP und Peptidbindung an das MHC-I-Molekül für die Ausbildung des MHC-Peptid-Komplexes sorgt, welcher dann entlang des sekretorischen Wegs (konstitutiver Weg für Membran- und sekretorische Proteine über Golgi-Apparat und exozytotische Vesikel) weitertransportiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Pamer und Cresswell, 1998).

### **1.2.2 MHC-Klasse-II-abhängige Antigenverarbeitung**

Bereits in Abschnitt 1.1.4 wurde erwähnt, daß MHC-Klasse-II-Moleküle Peptide präsentieren, die insbesondere von extrazellulären Antigenen (wie z.B. Pilze) stammen und durch endosomale Proteolyse entstanden sind. Die exogenen Antigene werden dabei in intrazelluläre Vesikel aufgenommen. Diese sogenannten Endosomen werden zunehmend saurer, wenn sie sich in Richtung auf das Zellinnere bewegen. Die Vesikel des endosomal-lysosomalen Abbauweges enthalten Proteasen wie Cathepsin B, D und L, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind und mit der Zeit die Proteine spalten, die sich in den Endosomen befinden.

Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden wie alle anderen Glykoproteine der Zelloberfläche im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Darum muß verhindert werden, daß sie in zu frühen Stadien ihrer Biosynthese Peptide, die durch den TAP-Transporter in das Lumen des ER gelangen, oder neusynthetisierte zelleigene Polypeptide binden. Die Bindung von Peptiden wird dadurch blockiert, daß den MHC-II-Molekülen ein Protein beigefügt wird, das als MHC-II-assoziierte invariante Kette (Ii) bezeichnet wird. Im ER schließen sich invariante Ketten und Klasse II-Heterodimere zum Klasse-II/Ii-Komplex zusammen. Ii bindet dabei so an das MHC-II-Molekül, daß ein Teil seiner Polypeptidkette

---

den zukünftigen Peptidbindungsspalt vorübergehend besetzt (Roche und Cresswell, 1990). Der Klasse-II-Ii-Komplex wird zunächst entlang des normalen sekretorischen Weges bis zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert, wird dort dann aber in den endosomal-lysosomalen Weg umgeleitet, um den Kontakt zwischen MHC-Klasse-II-Molekülen und den endosomal abgebauten Antigenfragmenten herzustellen. In speziellen MHC-II-Kompartimenten wird die invariante Kette Ii so gespalten, daß davon nur noch ein kleines Fragment an das MHC-Klasse-II-Molekül gebunden bleibt. Anschließend wird dieses Fragment gegen antigene Peptide des endosomalen Weges ausgetauscht. Von diesen Kompartimenten werden die mit den zu präsentierenden Peptiden beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert (Ferrari et al., 1997).

### **1.3 T-Lymphozyten**

Lymphozyten umfassen zahlreiche funktionelle Subpopulationen, die sich voneinander durch die Expression ihrer jeweiligen Zelloberflächenproteine unterscheiden. Sie lassen sich differenzieren in T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Allen T-Zellen ist gemein, daß sie auf ihrer Oberfläche einen T-Zellrezeptor (TCR) bestimmter Spezifität besitzen. Jeder T-Zellrezeptor besteht aus einem Heterodimer aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, zumeist  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Nur eine kleine Population von T-Zellen exprimiert einen TCR aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Während der T-Zellreifung kann durch genetische Umlagerungen ein geschätztes Repertoire von bis zu  $10^{15}$  TCR unterschiedlicher Spezifität für verschiedene Antigene entstehen (Abbas et al., 1997).

Die T-Zellrezeptoren sind für die Antigenerkennung durch T-Zellen, die von körpereigenen MHC-Molekülen abhängig sind, verantwortlich. D.h. TCR eines Individuums können Peptide fremder Antigene nur in Verbindung mit eigenen

---

MHC-Molekülen erkennen und darauf reagieren. Dies wird als Restriktion bezeichnet (Zinkernagel und Doherty, 1974). Mit dem TCR ist der sogenannte CD3-Komplex an der Zelloberfläche stabil verbunden und leitet Signale ins Innere der Zelle nach erfolgreicher Aktivierung.

Während der Antigenerkennung assoziieren sich zudem CD4- und CD8-Proteine auf der T-Zelloberfläche mit Komponenten des TCR. Aus diesem Grund werden sie als Korezeptoren bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der differentiellen Erkennung von MHC-Klasse-II- und Klasse-I-Molekülen, wobei CD4 an unveränderliche Teile des MHC-II-Moleküls und CD8 an konservierte Regionen des MHC-I-Moleküls bindet.

### **1.3.1 Aktivierung von T-Lymphozyten *in vivo***

Um Antigene spezifisch zu bekämpfen, müssen naive T-Zellen zuerst aktiviert werden, um sich in T-Effektorzellen umwandeln zu können. Dieser Vorgang wird als Priming bezeichnet. Dabei führt das erste Zusammentreffen einer naiven T-Zelle mit einem Antigen auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle zu einer primären Immunantwort und erzeugt gleichzeitig ein immunologisches Gedächtnis, das einen Schutz vor nachfolgenden Angriffen der gleichen Pathogene bietet.

Für die Aktivierung von T-Zellen werden zwei unabhängige Signale benötigt. Das erste Signal an die T-Zelle, die auf einer APC ein spezifisches Antigen erkannt hat, resultiert aus der Bindung von TCR und CD4- bzw. CD8-Korezeptor an den passenden Peptid-MHC-Komplex. Jedoch wird die klonale Expansion von T-Zellen nur induziert, wenn ein zweites, kostimulierendes Signal von der APC durch die Bindung ihres B7-Moleküls mit CD28 auf der T-Zelle erfolgt (Linsley et al., 1990).

Antigenerkennung ohne kostimulierendes Signal oder zu kurze CD28-B7-Bindung kann die T-Zellproliferation inhibieren und eine antigenspezifische Hyporeaktivität oder Anergie hervorrufen (Jenkins, 1994).

---

Nur wenn beide, antigenspezifische und kostimulierende Signale richtig erzeugt werden, beginnen die naiven T-Zellen sich zu differenzieren und mit der Produktion und Sekretion von IL-2 sowie der Expression hochaffiner IL-2-Rezeptoren (Linsley et al., 1991); dadurch wird die weitere Aktivierung, Proliferation und Differenzierung dieser Zellen zu T-Effektorzellen in die Wege geleitet (Linsley und Ledbetter, 1993).

### **1.3.2 T-Effektorzellen und deren Funktionen**

Wie unter Abschnitt 1.3.1 erwähnt, induziert IL-2 die klonale Expansion naiver T-Zellen und die anschließende Differenzierung ihrer Nachkommen zu T-Effektorzellen. Es wird unterschieden zwischen zytotoxischen T-Zellen und Helfer-T-Zellen.

#### **1.3.2.1 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)**

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus dem Thymus kommen, sind schon dafür vorbestimmt, zytotoxische T-Zellen zu werden, obwohl sie zu diesem Zeitpunkt noch keine der differenzierten Funktionen von Effektorzellen besitzen. Erst wenn die naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert worden sind und sich zu CTL ausdifferenziert haben, können sie Zellen töten, auf deren Oberfläche der entsprechende Peptid-MHC-I-Komplex erkannt wurde. Dies geschieht entweder durch Freisetzung porenbildender Substanzen wie das Zytotoxin Perforin (Podack et al., 1991) oder durch Expression eines membrangebundenen Effektormoleküls, des Fas-Liganden, der auf Zielzellen bindet und eine Apoptose induziert (Apostov et al., 1993).

---

### **1.3.2.2 T-Helferzellen (Abb. 1)**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die die gemeinsamen Vorläuferzellen der beiden Untergruppen der T-Helferzellen bilden (Kamogawa et al., 1993), können sich nach einer Aktivierung entweder zu einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Zelle entwickeln, die nach ihrer Stimulierung unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihren Funktionen unterscheiden (Abb. 1). Da die Entscheidung, T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen zu werden, bereits in den Anfangsstadien der Immunantwort fällt, beim ersten Kontakt mit einem Antigen auf einem MHC-II-Molekül, ist vor allem die Fähigkeit der Pathogene, die Zytokinproduktion durch Zellen des angeborenen Immunsystems zu stimulieren, für die Form der folgenden adaptiven Antwort entscheidend (O'Garra, 1998). Die Entwicklung der verschiedenen T-Helferzellgruppen wird bestimmt von der Art des Antigens, sowie dem genetischen Hintergrund des Wirtsorganismus und wahrscheinlich auch der Dosis und Eintrittsroute des Antigens (Abbas et al., 1996; Constant et al., 1995; Constant und Bottomly, 1997).

Im Verlauf der T-Zellaktivierung finden Veränderungen in der Chromatinstruktur und Methylierung von IL-4-, IL-13- und IFN- $\gamma$ -Genen statt (Agarwal und Rao, 1998; Bird et al., 1998; Young et al., 1994).

Die selektive Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen führt zu einer zellvermittelten, protektiven Immunität und erfolgt durch Stimulation naiver antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-12, das nach einem bestimmten Antigenstimulus von antigenpräsentierenden Zellen (APC) produziert wird (Hsieh et al., 1993). IL-12 ist lediglich für das Priming von T<sub>H</sub>1-Zellen bei einer Erstinfektion mit intrazellulären Pathogenen erforderlich, nicht jedoch für die weitere Aufrechterhaltung der T<sub>H</sub>1-Antwort bei chronischen Infektionen. Bei Autoimmunerkrankungen hingegen, ist die ständige Gegenwart von IL-12 notwendig, um die T<sub>H</sub>1-Antwort aufrecht zu erhalten (Seder et al., 1996). T<sub>H</sub>1-Zellen sind auf die Aktivierung von APC spezialisiert, die Pathogene enthalten oder aufnehmen. Sie sezernieren das Zytokin IFN- $\gamma$  und andere Effektormoleküle, die eine Eradikation intrazellulärer Pathogene bewirken (Almerigogna et al., 1996; Mosmann et al.,

---

1986). Außerdem exprimieren sie den CD40- und/oder den Fas-Liganden, die beide zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehören. Während jedoch der CD40-Ligand Makrophagen aktiviert, löst der Fas-Ligand (Zhang et al., 1997), wie bei CTL, den programmierten Zelltod der antigenpräsentierenden Zielzellen aus; daher beeinflussen ihre Expressionsmuster stark die Funktion. Darüber hinaus können  $T_H1$ -Zellen B-Lymphozyten dazu anregen, stark opsonierende Antikörper zu bilden (Gilbert et al., 1992), die zu bestimmten IgG-Unterklassen gehören.

Im Gegensatz zu  $T_H1$ -Zellen ruft die selektive Produktion von  $T_H2$ -Zellen, vermittelt durch IL-4 (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1991), das sowohl von CD4+ T-Zellen und NK1.1+ T-Zellen (Poynter et al., 1997) selbst, als auch Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen (Paul et al., 1993) bereitgestellt werden kann, eine humorale Immunität hervor besonders im Zusammenhang mit Atopie und allergischbedingten Entzündungen (Romagnani, 1994).  $T_H2$ -Zellen sind auf die B-Zell-Aktivierung spezialisiert. Sie sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und die Wachstumsfaktoren IL-4 und IL-5 der B-Zelle (O'Garra, 1998). Ferner exprimieren sie den CD40-Liganden, der an CD40 auf der B-Zelle bindet und diese zur Proliferation und IgM-Produktion anregt.

Die produzierten Zytokine der beiden T-Helferzellsubpopulationen zeigen reziproke regulierende Effekte auf die Funktion und Entwicklung humaner  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellklone (Maggi et al., 1992; O'Garra, 1998). Beispielsweise hemmt das von  $T_H1$ -Zellen produzierte IFN- $\gamma$  die Entwicklung von  $T_H2$ -Zellen (Fitch et al., 1993) sowie humorale Immunantworten.

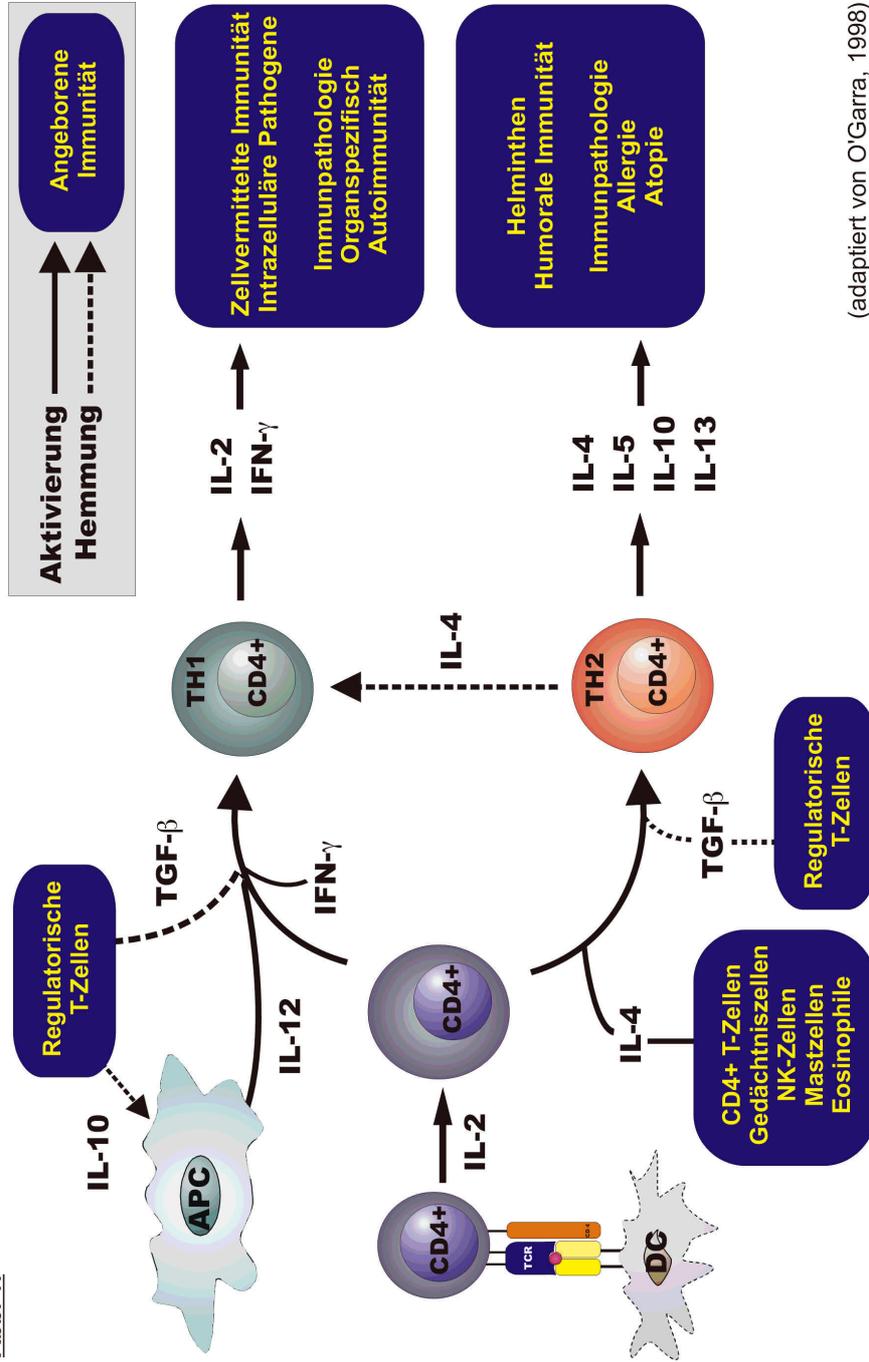
Die Entwicklung einer  $T_H1$ -Antwort kann dagegen von  $T_H2$ -Zellen direkt durch das von ihnen sezernierte IL-4 antagonisiert werden und indirekt durch ihr IL-10, das die IL-12 Produktion von stimulierten Makrophagen inhibiert (Moore et al., 1993; Sher und Coffman, 1992).

Trotz der prominenten Rolle, die die Zytokine bei der Entwicklung der T-Effektorzellen spielen, haben Einzelzellanalysen demonstriert, daß selbst höchstpolarisierte T-Helferzellsubpopulationen oft mit Zellen der entgegengesetzten Subpopulation kontaminiert sind (Kelso et al., 1995), was nicht

---

unbedingt feststellbar war durch die Messung der von ihnen sezernierten Zytokine im Kulturüberstand. Das Unvermögen eine vollkommen homogene Subpopulation zu bekommen, kann einerseits eine experimentelle oder biologische Unfähigkeit beim Generierungsprozess widerspiegeln, andererseits könnte es auch ein Indikator dafür sein, daß T-Helferzellen eine nicht zu unterschätzende Autonomie besitzen, die es ihnen ermöglicht, unabhängig von extrazellulären Signalen, Entscheidungen zu treffen (Reiner und Seder, 1999).

Abb. 1:



(adaptiert von O'Garra, 1998)

---

## **1.4 *Aspergillus fumigatus* und Aspergillose**

### **1.4.1 Taxonomie und Charakterisierung des Organismus**

*Aspergillus fumigatus*, auch als rauchgrauer Gießkannenschimmel bezeichnet, ist einer der am häufigsten ubiquitär vorkommenden saprophytischen Pilze, der natürlicherweise im Erdreich enthalten ist, eine wesentliche Rolle bei der Wiederverwertung von Kohlenstoff (C) und Stickstoff (N) aus sich zersetzendem organischen Material spielt und durch die Luft übertragen wird. Er gehört einer thermophilen Gattung an, die bei Temperaturen bis 55°C ein sehr schnelles Wachstum zeigt und sogar bis zu 70°C überlebt.

Dabei bildet *Aspergillus fumigatus* reichlich Hyphen und Sporen, wobei jeder Konidienkopf tausende von Konidien hervorbringt. Diese in die Atmosphäre freigesetzten Konidien haben einen Durchmesser von 2-3 µm, d.h. sie sind klein genug, um die Lungenalveolen zu erreichen (Latgé, 1999).

### **1.4.2 Folgen der *Aspergillus fumigatus* Exposition für den Menschen**

Jeder Mensch atmet täglich mindestens einige hundert *Aspergillus fumigatus*-Konidien ein (Chazalet et al., 1998; Hospenthal et al., 1998). Deshalb ist der häufigste Manifestationsort der Aspergillose die Lunge, obwohl eine Dissemination in jedes Organ möglich ist. Darüber hinaus weisen die meisten gesunden Menschen aufgrund des ständigen Kontakts mit den Konidien geringe anti-*Aspergillus fumigatus*-Antikörpertiter auf (Igea et al., 1993; Kauffman et al., 1986; Kurup et al., 1990; Latgé et al., 1991; Trompelt et al., 1994; van Rens et al., 1998).

Bei immunkompetenten Personen ist die Inhalation der *Aspergillus*-Konidien zumeist harmlos, da sie relativ effizient durch die angeborenen Abwehrmechanismen eliminiert werden (Roilides et al., 1998). Eine Hauptrolle spielen dabei die Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten der Lunge, die die

---

Konidien phagozytieren und töten, bevor sich eine Infektion ausbilden kann (Levitz et al., 1986; Madan et al., 1997). Jedoch kann diese Barriere möglicherweise umgangen werden, indem "nicht-professionelle" Phagozyten wie tracheo-bronchiale Epithelzellen, Alveolarepithelzellen vom Typ II sowie Endothelzellen Konidien internalisieren, und über diesen Weg Lungengewebe kolonisiert oder eine vaskuläre Ausbreitung des Pilzes im Organismus initiiert werden kann (DeHart et al., 1997; Paris et al., 1997).

Jahrelang galt *Aspergillus fumigatus* als schwach pathogen. Bei gesunden Personen kann es nach Exposition mit *Aspergillus species* zu einer Hypersensitivitätsreaktion kommen, wie beispielsweise die exogen-allergische Alveolitis (Farmerlunge) oder bei Patienten mit vorbestehendem Asthma (Bromley und Donaldson, 1996) oder zystischer Fibrose eine eosinophile Pneumonie (allergische bronchopulmonale Aspergillose, ABPA) (Hunninghake und Richerson, 1995); gelegentlich werden auch Aspergillome, sogenannte Pilzknoten, beobachtet, die sich bei Immunkompetenten mit einer zugrundeliegenden Lungenerkrankung in Bronchiektasen oder in Lungenkavernen bei erfolgreich behandelten Tuberkulosepatienten bilden können (Bennett, 1995).

Mit der Zunahme von immunsupprimierten Patienten hat sich *Aspergillus fumigatus* während der letzten zehn Jahre in Industrieländern zu einem der bedeutendsten Pilzpathogene entwickelt, das schwere und zumeist tödliche invasive Infektionen verursacht (Andriole, 1993; Beck-Sagué et al., 1993; Cohen et al., 1993; Denning, 1998; Rogers, 1995). *Aspergillus fumigatus* ist neben *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. nidulans* für ca. 90% der Aspergillus-Infektionen verantwortlich (Bodey und Vartivarian, 1989; Kurup und Kumar, 1991). Im Jahre 1992 betrug der Anteil der invasiven Aspergillose (IA) ungefähr 30% der Pilzinfektionen bei Patienten, die an Krebs verstarben; an einer IA erkrankten schätzungsweise 10-25% aller Leukämiepatienten, bei denen trotz antimykotischer Behandlung die Mortalitätsrate bei 80-90% liegt (Bodey et al., 1992; Denning, 1996; Groll et al., 1996). Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT), bei denen in 5-11% der Fälle eine IA auftritt, weisen eine Mortalität von 50-100% auf (Latgé, 1999; Wald et al., 1997). Heutzutage

---

zählt die IA zu einer der Haupttodesursachen nach Leukämietherapie, hämatopoetischer Stammzell- und solider Organtransplantation (Patel und Paya, 1997; Salonen und Nikoskelainen, 1993).

### **1.4.3 Klinische Symptome und Diagnose der invasiven Aspergillose**

Die Gruppe der Hochrisikopersonen für eine invasive Aspergillose (IA) umfaßt neutropenische Patienten nach Chemotherapie, aber auch nicht-neutropenische Patienten unter Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten oder mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten wie z.B. der SCID (*severe combined immune deficiency*), CGD (*chronic granulomatous disease*) (Mouy et al., 1989), AIDS (*acquired immuno deficiency syndrome*; CD4+ < 100/µl) (Khoo und Denning, 1994; Lortholary et al., 1993) und nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT) (Denning, 1998). Nur sehr selten tritt eine IA bei immunkompetenten Personen auf (Karim et al., 1997).

Vier Arten der IA sind bisher beschrieben worden (Denning, 1998): (i) akute oder chronische Lungenaspergillose, die häufigste Form der IA; (ii) Tracheobronchitis und obstruktive Erkrankung der Bronchien; (iii) akute invasive Sinusitis; sowie die disseminierte Aspergillose, die oft das Gehirn betrifft (10-40% bei Knochenmarktransplantierten) aber auch viele andere Organe (z.B. Haut, Nieren, Herz und Augen).

Die klinischen Merkmale der verschiedenen Arten der IA sind abhängig von den unterschiedlichen Lokalisationen und den zugrundeliegenden Erkrankungen. Die Symptome einer IA der Lunge sind eher unspezifisch und somit wenig hilfreich, um das Augenmerk auf eine IA zu richten. Dazu zählen trockener Husten, Fieber, Pleuraschmerzen, Dyspnoe bis hin zu Hämoptysis; häufig ist Fieber die einzige klinische Beschwerdesymptomatik.

Besonders in frühen Stadien gilt die IA als schwer diagnostizierbar. Um eine IA zu beweisen, muß histopathologisch Myzelienwachstum im Gewebe dokumentiert werden, das leider meistens erst bei Autopsie gewonnen werden kann

---

(Boon et al., 1991; Groll et al., 1996). Für eine definitive Spezies-Differenzierung sind immunhistochemische Färbungen oder *in situ* Hybridisierungstechniken erforderlich (Kaufman et al., 1997).

Da es bisher keinen Konsens über die Kriterien für die definitive oder wahrscheinliche Diagnose einer IA gab, wurden die diagnostischen Kriterien für die IA von Studie zu Studie unterschiedlich definiert und eine Vielzahl von Begriffen verwendet, wie "erwiesen", "höchst wahrscheinlich", "wahrscheinlich", "möglich" und "Verdacht auf". Erst kürzlich hat jedoch die "European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group" (EORTC/IFICG) zusammen mit der "National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Mycoses Study Group" (NIAID/MSG) die IA nach diagnostischen Konsenskriterien neu klassifiziert und somit einen einheitlichen Standard für "erwiesene", "wahrscheinliche" und "mögliche" invasive Pilzinfektionen definiert (Ascioglu et al., 2002). Demzufolge ist für die Diagnose einer "erwiesenen" invasiven Aspergillose ein histologischer/zytopathologischer Nachweis der Pilzinfektion erforderlich und/oder eine positive Kultur, die steril von einem normalerweise keimfreien, aber klinisch oder radiologisch auffälligen Ort der Infektion gewonnen wird. Zur Diagnose einer "wahrscheinlichen" IA bedarf es mindestens eines definierten Wirtsfaktors (Neutropenie  $<500/\mu\text{l}$  länger als 10 Tage; Fieber, länger als 96 Stunden anhaltend und refraktär gegen Breitspektrumantibiotika; Zeichen und Symptome einer Graft-versus-Host Disease (GvHD) oder verlängerte Einnahme von Kortikosteroiden) sowie eines mikrobiologischen Faktors (positive Kultur aus Sputum oder bronchoalveolärer Lavage (BAL), positive Zytologie/direkter mikroskopischer Pilznachweis eines Sinusspirats) kombiniert mit einem wichtigen klinischen Kriterium (neue pulmonale Infiltrate im CT, "Halo"-Zeichen, Luftsichelzeichen, radiologische Hinweise für eine invasive Infektion eines Sinus oder des zentralen Nervensystems). Eine "mögliche" IA wird bestimmt durch mindestens ein Kriterium aus der Gruppe der Wirtsfaktoren mit zusätzlich einem mikrobiologischen oder einem klinischen Kennzeichen.

---

Die Computertomographie ist sensitiver als das Röntgen und zeigt die Ausdehnung und Anzahl der Pilzläsionen. In frühen Stadien der IA können Computertomogramme spezifische Zeichen einer Infektion enthüllen, wie die typische "Halo"-Bildung, die aus der hämorrhagischen Nekrose, die eine Pilzläsion umgibt, resultiert (Caillot et al., 1997).

Der positive Vorhersagewert einer Sputumkultur von neutropenischen oder knochenmarktransplantierten Patienten beträgt laut Horvath und Dummer (1996) > 70%.

Zur Detektion von Aspergillus-Pathogenen im Serum oder Plasma sind einerseits ein Sandwich-ELISA als eine sehr sensitive Methode zur Frühdiagnose einer IA geeignet (Latgé et al., 1994; Severens et al., 1997; Stynen et al., 1995). Andererseits können mittels einer höchst sensitiven und spezifischen PCR, die eine hochkonservierte Sequenz der multicopy 18S rRNA Gene zahlreicher Pilzpathogene amplifiziert und analysiert, *Aspergillus species* im Blut detektiert werden (Einsele et al., 1997).

#### **1.4.4 Behandlung und Prophylaxe der Aspergillose**

Bis vor kurzem waren nur Amphotericin B (AmB) für die intravenöse und Itraconazol für die orale Behandlung einer Aspergillose verfügbar (De Pauw, 1997; Denning, 1996; Denning, 1998). Trotz ihrer Aktivität *in vitro*, ist die Wirksamkeit dieser Medikamente gegen *Aspergillus fumigatus in vivo* niedrig. Folglich ist nach wie vor eine sehr hohe Mortalitätsrate der IA zu verzeichnen.

Seit neuestem sind auch Variconazol (Vfend) und Cospofungin zugelassen.

AmB gilt immer noch als goldener Standard für die antimykotische Therapie der IA (Brajtburg und Bolard, 1996). In einigen randomisierten Studien wurde es auch als Chemoprophylaxe zur Vermeidung des Auftretens einer IA bei Immunkomprimierten eingesetzt. Deren Ergebnisse deuten an, daß Intranasalsprays von AmB die Lungenkolonisation durch den Organismus reduzieren können (Trigg et al., 1997). Desweiteren erwies sich zur Prophylaxe bei KMT-Patienten

---

eine AmB-Dosis von 1mg/kg/d als vorteilhaft. Die Wirksamkeit niedriger Dosen (0,1-0,5 mg/kg/d) bleibt jedoch umstritten (Riley et al., 1994). AmB bindet bevorzugt an Ergosterol der Pilzmembranen, bildet Transmembrankanäle und erhöht somit die Permeabilität für monovalente Kationen (Rosin, 1992). Es schädigt Pilzzellen stärker als Zellen von Vertebraten, bei denen es sich an das Cholesterin anlagert. Trotzdem ruft es häufig Nebenwirkungen hervor, insbesondere Nephrotoxizität, die bei gleichzeitiger Verabreichung von Cyclosporin A, noch synergistisch gefördert wird (Pathak et al., 1998; Patterson, 1998). Im Gegensatz zum herkömmlichen AmB wirkt liposomales AmB wie z.B. AmBisome (Nexstar) weniger toxisch auf humane Zellen und weist ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil auf (Ringdén et al., 1994). Wichtig für die Prognose einer IA sind das frühe Einleiten der antimykotischen Therapie sowie bei Leukämiepatienten die Regeneration der Neutropenie und/oder Reduktion der Immunsuppression bei KMT-Patienten (Denning, 1998). Bei allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten treten zu der Neutropenie im Gegensatz zu autolog Transplantierten oder Patienten mit akuter Leukämie weitere Risikofaktoren hinzu. Eine der Hauptkomplikationen der KMT-Patienten ist die sogenannte Graft-versus-Host (GvH) Erkrankung, die bisher mit Immunsuppressiva wie Cyclosporin oder Steroiden behandelt wird. Daher kann eine Immuntherapie bei stark immunsupprimierten Patienten als hilfreiches Adjuvans zur konventionellen antimykotischen Behandlung dienen (Kullberg, 1997). Die Ziele der Immunmodulatoren bestehen darin, die Zahl der Neutrophilen und Makrophagen zu erhöhen, die Kinetik dieser Zellen am Infektionsort zu modifizieren und/oder die Phagozyten so zu aktivieren, daß sie die Pilzzellen wirksamer abtöten können. G-CSF und GM-CSF verkürzen erfolgreich die Dauer einer Neutropenie bei Risikopatienten (Kullberg und Anaissie, 1998; Rodriguez-Adrian et al., 1998).

---

## 1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Weltweit wird eine stetige Zunahme von Pilzinfektionen beobachtet (Groll et al., 1996). Betroffen sind insbesondere Patienten mit hämatologischen Neoplasien und langandauernden Neutropeniephasen nach Chemotherapie. Verursacht werden diese Infektionen vor allem durch *Candida* und *Aspergillus species*. Die Entwicklung der letzten Jahre zeigte insbesondere eine Zunahme invasiver Aspergillus-Infektionen bei nicht-neutropenischen Patienten mit T-Zelldefekten wie z.B. Patienten mit fortgeschrittener AIDS-Erkrankung und schwerer Lymphozytopenie (Addrizzo-Harris et al., 1997) oder Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit persistierendem Immundefekt (Wald et al., 1997).

Die spezifischen zellulären Immunmechanismen des Menschen gegen *Aspergillus species* sind bislang wenig untersucht. Erste Daten im Mausmodell zeigen, daß eine T<sub>H</sub>1-Antwort eine protektive Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* aufrechterhalten kann, wohingegen eine T<sub>H</sub>2-Antwort mit einem letalen Ausgang einer Aspergillus-Infektion assoziiert ist (Cenci et al., 1997). Mäuse, die nach einer ersten Exposition mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien Aspergillus-spezifische Antikörper bilden, die in 90% gegen die 88 kDa Dipeptidylpeptidase V (Latgé, unpublished data), eines der beiden Hauptantigene, das von Antikörpern im Serum von Patienten mit Aspergillomen erkannt wird, gerichtet sind, sind bei Reexposition mit einer letalen Dosis von Aspergillus-Konidien vor der Infektion geschützt (Latgé, 1999). IL-10, ein typisches T<sub>H</sub>2-Zytokin, hemmt die Bildung von Sauerstoffradikalen sowie die intrazelluläre Zerstörung von Aspergillus-Hyphen durch Phagozyten (Roilides et al., 1997). Dieser Effekt von IL-10 kann durch die gleichzeitige Gabe von T<sub>H</sub>1-Zytokinen wie z.B. IFN- $\gamma$  antagonisiert werden. Gesunde Probanden weisen in ca. 80% eine T-Zellproliferation gegen hitzeinaktivierte Aspergillus-Konidien auf (Graziutti et al., 1997). Darüber hinaus wurde bei Patienten mit allergischer bronchopulmonaler Aspergillose bereits für die HLA-Restriktion DR2 und DR5, ein

---

T<sub>H</sub>-Zell Peptidepitop charakterisiert (Chauhan et al., 1996; Chauhan et al., 1997).

Nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) sind die zellulären Immuneffektormechanismen gegen Pilzantigene, insbesondere *Aspergillus fumigatus*-Antigene, bislang nicht erforscht. Aufgrund der steigenden Inzidenz und extrem hohen Mortalität der invasiven Aspergillose ist die Charakterisierung der gegen *Aspergillus species* gerichteten Immuneffektormechanismen im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien von großer klinischer Bedeutung. Daher sollte in dieser Arbeit die Rolle der Aspergillus-spezifischen T-Zellantwort von T-Zellen aus dem peripheren Blut bei gesunden Probanden sowie hämatologischen Patienten mit Aspergillose nach Leukämietherapie und Patienten spät nach allogener SZT untersucht werden. Durch Austestung der Lymphoproliferation auf Stimuli von unterschiedlichen Aspergillus-Antigenen, wie hitzeinaktivierte Konidien, intra- und extrazelluläre *Aspergillus fumigatus*-Extrakte sowie verschiedene rekombinante Proteine, sollte eine Eingrenzung der T-Zellreaktivität erfolgen, um mögliche immundominante Antigene zu definieren. Desweiteren wurde versucht, Aspergillus-spezifische T-Zelllinien zu generieren. Im klinischen Teil des Projekts sollte die Rekonstitution einer Aspergillus-spezifischen T-Zellantwort bei Patienten nach allogener SZT analysiert und mit dem klinischen Verlauf korreliert werden, um Hochrisikopatienten besser bestimmen zu können.

---

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material und Bezugsquellen**

#### **2.1.1 Geräte**

Bestrahlungsbombe	Gammacell 1000
FacsCalibur®	Becton Dickinson
Mikroskope	Leitz, LaborluxS
	Leitz, Diavert
MiniMACS	Miltenyi Biotec
Pipetten	Eppendorf
Sterile Arbeitsbank	Heraeus, LaminAir HBB2448
Stickstoff-Tanks	Chronos Messer Griesheim
Szintillationszähler	LKB Wallac 1205 Betaplate®
Wärmeschrank	Nuaire™, US Autoflow
Zellerntevorrichtung	LBK 1295-001 cell harvester
Zentrifuge	IEC, Centra GP8R

#### **2.1.2 Verbrauchsgegenstände**

##### Kulturmedien für Proliferationsassays und Zelllinien

Die Chemikalien wurden über die Universitäts-Apotheke, Tübingen, bezogen.

RPMI 1640 mit Glutamax-I und 25 mM HEPES Puffer	Gibco BRL, Grand Island, NY, USA
Gentamicinsulfat	Refobacin® 80 mg, Merck, Darmstadt
10% fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, St. Louis
10% inaktiviertes Humanserum (gepoolt, CMV-negative Spender)	Abteilung für Transfusionsmedizin, Pforzheim

---

Das CMV-negative Humanserum wurde auf CMV-Antikörper im Virologischen Institut, Tübingen untersucht. Die Chargen wurden 30 Minuten lang bei 56°C hitzeinaktiviert und anschließend auf Mycoplasmen sowie auf Cytotoxizität oder verstärkte Mitogenität getestet. Danach wurden die Seren gepoolt und über einen Glasfilter (GF92) und einen 0,8 µm Membranfilter (ME27) filtriert, um dann bei -20°C gelagert zu werden. Vor Gebrauch wurde das Humanserum noch einmal mit einer 0,45 µm Einmal-Sterilfiltrationseinheit (Minisart-N) filtriert.

#### Einfriermedium

20% fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, St. Louis
10% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, München
70% RPMI 1640 mit Glutamax-I und 25 mM Hepes Puffer	Gibco BRL, Grand Island, NY, USA

#### Dichtegradientenzentrifugation

FicoLiteH	Linaris, Bettingen am Main
Hanks´ Balanced Salt Solution	PAA, Linz, Austria

#### Radioaktives Material

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham-Buchler, Braunschweig
----------------------------	--------------------------------

#### Kulturplatten

24-Loch-Kulturplatte	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Kulturplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark

#### Filter

Glasfilter	GF92, Schleicher&Schüll, Dassel
0,8 µm Membranfilter	ME27, Schleicher&Schüll, Dassel
0,45 µm Sterilfilter	Minisart-N, Sartorius

---

### Färbelösung für die Zellzahlbestimmung lebender Zellen

0,5% Trypanblau ad 0,9% NaCl                      Sigma, München

### Proliferationsassay

Interleukin-2 (IL-2)                                      Biotest, Dreieich  
Phytohämagglutinin (PHA)                              Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
Tetanus-Toxoid (TT)                                      Chiron Behring GmbH & Co, Marburg  
CMV-Antigen    Biodesign, Dunn, Asbach

### Erntefilter und Szintillationsflüssigkeit

Printed Filtermat A                                      Wallace Oy, Turku, Finnland  
Szintillationsflüssigkeit                                  LKB Beta Plate Scint, Pharmacia

### Einfriger- und Zentrifugiergefäße

Kryoröhrchen    Greiner, Nürtingen  
Zentrifugenröhrchen                                      Falcon, Heidelberg

## **2.2 Zell-Spender**

Patienten der Medizinischen Klinik - Abteilung II für Hämatologie, Onkologie und Immunologie - der Universität Tübingen, mit Verdacht auf eine Aspergillus-Infektion, beziehungsweise erwiesener invasiver Aspergillose im Verlauf ihrer Krankengeschichte, stellten 20-50 ml ihres Blutes zur Verfügung. Alle Patienten wurden ausführlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis, Blut für diese Studie zur Immunrekonstitution zu spenden.

Zum Vergleich wurde auch Blut von gesunden, freiwilligen Probanden gewonnen.

---

### **2.2.1 Einteilung der Patienten anhand des klinischen Verlaufs der IA**

Das klinische Ansprechen der Patienten mit invasiver Aspergillose auf die antimykotische Therapie wurde radiologisch beurteilt. Drei Gruppen wurden hierbei computertomographisch anhand des Zustands der Lungeninfiltrate unterschieden. Wenn die Läsionen kleiner als bei vorhergehenden Computertomogrammen waren, gehörten sie dem Kollektiv der Patienten mit IA in Regression an. War kein Unterschied in der Ausprägung der IA-Manifestation festzustellen, wurden sie in die Gruppe der Patienten mit stabiler IA eingeteilt. Hatten sich die Infiltrate und/oder Lungenrundherde gegenüber der Voruntersuchung jedoch verschlechtert, wurden die Patienten der Gruppe mit progredienter IA zugeordnet.

### **2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut**

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes können aufgrund ihrer Dichte von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden.

Frisches natriumheparinisiertes Blut wurde 1:1 mit Hanks Salzlösung verdünnt und jeweils 30 ml davon in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Hypaque (FicoLiteH, Linaris, Bettingen am Main, spezifische Dichte 1,078 g/l) geschichtet. Anschließend wurde 25 Minuten lang mit 2000 rpm bei 20°C zentrifugiert. Die zwischen Ficoll und verdünntem Blutplasma entstandene Interphase, in welcher sich die Fraktion der mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) angesammelt hatte, wurde behutsam mit einer sterilen Einwegpipette entnommen, und die Zellsuspension mit Hanks wiederum verdünnt (mindestens im Verhältnis 1:1). Danach wurde die verdünnte Zellsuspension zweimal 10 Minuten lang bei 1500 rpm gewaschen, der Überstand verworfen, das Pellet in RPMI 1640 mit 10% HS aufgenommen, gezählt (2.5) und auf die entsprechende Konzentration zur folgenden

---

Stimulation mit Antigen eingestellt. Die überschüssigen Zellen wurden eingefroren (2.6).

## **2.4 Antigenpräsentierende Zellen**

Als antigenpräsentierende Zellen (APC) wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut eingesetzt, die von den entsprechenden Spendern (2.3) stammten. Diese Zellen waren automatisch bei den frischen Stimulationsansätzen in den PBMC enthalten. Bei mehrwöchiger Zellkultivierung wurden sie regelmäßig nach der Induktionsphase bei den erneuten Antigenstimulationen zugegeben in 2- bis 5-fach höherer Konzentration als die jeweils aktuelle Zahl der vorstimulierten PBL. In letzterem Fall wurden die APC vor Zugabe zu den Kulturen mit 30 Gy bestrahlt.

## **2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl**

10 µl einer homogenen Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0,5% [wt/vol]) 1:1 verdünnt und die Zahl der ungefärbten, d.h. die Zahl der vitalen Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) bestimmt. Dabei wurden immer 2 Großquadrate ausgezählt.

Formel für die Lebendzellzahl:

Gezählte Zellzahl x 10 x Volumen der Zellen in µl = Gesamtzellzahl

---

## **2.6 Einfrieren von Zellen**

Die Zellkonzentration beim Einfrieren lag in der Regel zwischen  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 1500 rpm, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in halbem Endvolumen 40% FCS/RPMI aufgenommen (die Endkonzentration von FCS im Einfriermedium beträgt 20%). Danach erfolgte die Zugabe von gekühltem, 20%-igem DMSO/RPMI (Endkonzentration 10% DMSO). Je 1 ml der so erhaltenen Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden sofort auf Eis gestellt, danach bis zu einer Woche bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff ( $-180^\circ\text{C}$ ) überführt.

## **2.7 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen wurden die erforderlichen Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellsuspensionen aus dem Stickstoff-Tank herausgesucht und mit flüssigem Stickstoff in einem Dewar-Gefäß transportiert. Der Auftauvorgang sollte schnell vor sich gehen. Zu diesem Zweck wurden die Röhrchen einige Sekunden lang in ein  $37^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad gestellt, bis der Eisklumpen sich von der Wand gelöst hatte. Der Inhalt jedes Kryoröhrchens wurde sofort in ein vorbereitetes 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, das 5 ml RPMI 1640 enthielt. Die Kryoröhrchen wurden mit 1 ml RPMI 1640 nachgespült und der Inhalt zu den übrigen Zellen gegeben. Danach erfolgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei  $10^\circ\text{C}$  mit 1000 rpm. Der Überstand wurde sorgfältig abgekippt, das Zellpellet durch Ziehen des Röhrchens über einen Ständer resuspendiert und mit 10% HS/RPMI 1640 auf 2 ml aufgefüllt, die Zellzahl wurde bestimmt und auf die gewünschte Konzentration mit 10% HS/RPMI 1640 eingestellt.

---

## **2.8 Herstellung von Aspergillus-Antigenen**

### **2.8.1 Konidiensuspension**

Die Suspension der hitzeinaktivierten *Aspergillus fumigatus*-Konidien des Stammes va 10447 wurde im Tübinger Hygiene-Institut von Frau PD Dr. Schumacher hergestellt nach einer Methode von Graziutti et al. (1997). Nach dreitägiger Kultivierung auf Sabouraud Dextrose Agar (Difco, Detroit) wurden die Konidien geerntet, durch sterile Gaze filtriert, in einem Wasserbad bei 100°C eine Stunde lang abgetötet, mit Salzlösung anschließend gewaschen und dann bei -4°C aufbewahrt. Die Konidiensuspension wurde auf  $10^6$  Konidien/ml und die zweite Charge doppelt konzentriert auf  $2 \times 10^6$  Konidien/ml eingestellt. Die hitzeinaktivierten *A. fumigatus*-Konidien wurden auf ihre Sterilität hin geprüft, indem sie 10 Tage lang auf Sabouraud Dextrose Agar subkultiviert wurden.

### **2.8.2 Intra- und extrazelluläre *Aspergillus fumigatus*-Antigenextrakte**

Die Herstellung der Aspergillus-Antigengemische, bestehend aus Proteinen, Polysacchariden und Glykoproteinen, erfolgte im "Laboratoire des Aspergillus", Institut Pasteur, Paris unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jean-Paul Latgé.

Die antigenen Eigenschaften von *Aspergillus fumigatus*-Extrakten sind schon lange Zeit im Blickpunkt der Forschung und dienten als Basis für die frühe Entwicklung immunologischer Tests, die Verwendung fanden in der serologischen Diagnose der Aspergillose bei immunkompetenten Wirtsorganismen (Latgé, 1999). Es gibt qualitative und quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Antigenextrakte, die in verschiedenen Laboren hergestellt werden und sogar zwischen Antigenextrakt-Chargen aus dem selben Labor (Hearn, 1992). Die Variabilität der Antigenzusammensetzung in den Extrakten scheint nicht von dem Aspergillus-Stamm oder der Wachstumstemperatur abzuhängen, sondern viel mehr von der Inkubationszeit, den

---

Kulturbedingungen sowie der Zusammensetzung des Kulturmediums. Die besten komplexen Antigenpräparationen gelingen während aktivem Pilzwachstum (1 Tag bei 37°C) in einem zuckerfreien Medium, das nur ein einziges Proteinsubstrat oder Proteinhydrolysat wie beispielsweise das Sabouraud-Medium enthält (Latgé, 1995). Darüber hinaus induziert die hohe Hexosekonzentration in solch einem Medium einen sauren pH während des Wachstums und beeinflusst dadurch stark das Schema der produzierten Antigene (Little et al., 1993; Moutaouakil et al., 1993). Die Zusammensetzung solch eines Mediums scheint nahe an den natürlichen Ernährungsbedingungen zu liegen, auf die der Pilz in den Lungen trifft, d.h. eine proteinreiche Umgebung, die primär aus Kollagen und Elastin besteht mit einem pH von ca. 7,4 (Latgé, 1999).

Es wurden Konidien des *Aspergillus fumigatus*-Stammes CBS 144-89 aus der Sammlung des "Centraalbureau voor Schimmelcultures" (Baarn, Holland) verwendet. Dieser Aspergillus-Stamm wurde von einem Patienten mit invasiver Aspergillose isoliert und in Schrägkultur auf 2%-igem Malzextrakt-Agar angezüchtet. Die Konidien wurden in 150 ml Erlenmeyerkolben inokuliert, die bereits entweder 50 ml Sabouraud (SAB)-Medium (97% [vol/vol] Aqua dest., 2% [wt/vol] Glucose, 1% [wt/vol] Mycopepton Biokar (Prolabo, Beauvais, Frankreich)) oder 50 ml Hefeextrakt (EXL)-Medium (99% [vol/vol] Aqua dest., 1% [wt/vol] Hefeextrakt (Difco, Detroit, Michigan)) enthielten. 24 h lang wurden die Inokula, die mit dem Aspergillus-Stamm besäten Medium-Ansätze, in heftiger Bewegung gelassen mit 200 rpm bei 37°C. Danach wurden die geschüttelten Kulturen in 2-Liter Gärungsapparaturen (LSL Biolafitte, Saint Germain en Laye, Frankreich) gegeben, die 1,2 l Sabouraud- oder Hefeextrakt-Medium enthielten. Die Bedingungen für die nun folgenden 18 h-Kulturen lauteten: Inokulum, 8% (vol/vol); Temperatur, 26°C; Belüftung, 50 l Luft pro min; Rotation, 500 rpm. Anschließend wurden die Kulturen filtriert. Das Filtrat wurde mit 4 Volumen 90%-igem Ethanol präzipitiert und 48 h in einer Kühlkammer bei 4°C stehen gelassen, um die Gärung zu stoppen. Dann wurde der Niederschlag

---

herunterzentrifugiert, und das Pellet in 50 mM Ammonium-Acetat aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Das somit erhaltene Präzipitat (PP) enthält zahlreiche extrazelluläre *Aspergillus*-Antigene.

Das auf dem Filter (BECO-CP 00, E. Begerow GmbH & Co, Langenlonsheim, Deutschland) aufgefangene Myzelium wurde mehrmals ausgiebig mit Aqua dest. gewaschen und danach je 10 g feuchtes Myzelium in 30 ml TRIS-HCl-Puffer (50mM, pH 7,5) mit Glaskügelchen in einem Zellhomogenisator (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) zerkleinert. Im Anschluß daran wurde diese Substanz 10 Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand, das sogenannte *Extrait cellulaire* (EC) - Zellextrakt - wurde aufgefangen und enthält sämtliche intrazelluläre, wasserlösliche *Aspergillus fumigatus*-Antigene.

Es wurde also auf der Basis von zwei verschiedenen Medien je ein extrazellulärer (PP SAB, PP EXL) und ein intrazellulärer (EC SAB, EC EXL) Antigenextrakt hergestellt.

### **2.8.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antigenlysate**

Mit der Bio-Rad Methode, basierend auf der Proteinfärbung mit Coomassie-Blau und bovinem Serum Albumin (BSA) als Standard, wurde die Konzentration der Proteine in den Antigengemischen bestimmt. Für die Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) Analyse wurden Proben der vier *Aspergillus fumigatus*-Antigenlysate bei 100°C, 4 Minuten lang in einem Puffer gelöst, der 0,5% (wt/vol) SDS und 1,25% (vol/vol) Mercaptoethanol beinhaltetete. Die Elektrophorese wurde mittels des diskontinuierlichen Puffersystems von LAEMMLI in einem 12,5% Acrylamidgel durchgeführt. Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie Brilliantblau R250 (0,01% [wt/vol] in Methanol-Essigsäure).

---

Die Proteinkonzentrationen in den o.g. Antigengemischen betragen:

EC SAB:	4	mg Protein/ml
EC EXL:	16	mg Protein/ml
PP SAB:	0,5	mg Protein/ml
PP EXL:	0,6	mg Protein/ml

### **2.8.3 Rekombinante *Aspergillus fumigatus*-Proteine**

Die rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Proteine wurden von Herrn Prof. Dr. Jean-Paul Latgé, "Laboratoire des Aspergillus", Institut Pasteur, Paris zur Verfügung gestellt.

Alle Proteine wurden rekombinant in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Die Produktion erfolgte strikt nach Anweisung der Hersteller des Invitrogen® Kits (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA), d.h.: es wurde Methanol zum Wachstumsmedium hinzugefügt, da alle Gene der Kontrolle des Alkoholoxidasepromotors unterliegen.

Aufgrund der Forschungsergebnisse von Herrn Prof. Dr. Michel Monod, Abteilung für Dermatologie des "Centre Hospitalier Universitaire Vaudois", 1011 Lausanne, Schweiz, war es möglich, die Proteine **Metalloprotease Mep 5** (40 kDa) (Monod et al., 1993), **Aspartatprotease Pep 6** (38 kDa), **Ribonuklease RNase** (18 kDa, *Asp f I*) (Arruda et al., 1990; Jensen et al., 1993; Knutsen et al., 1994; Lamy et al., 1991; Latgé et al., 1991; Madan et al., 1997) sowie die **Superoxid Dismutase Sod Mang 2** (19 kDa) (Hamilton et al., 1995; Holdom et al., 1996) herzustellen. Die Produktion der **Catalase Cat 19** (90 kDa) (Hearn et al., 1992; López-Medrano et al., 1995; López-Medrano et al., 1996) ist von Calera et al. (1997) beschrieben worden. Die Herstellung der **Dipeptidylpeptidase V DPP V** (88 kDa) (Kobayashi et al., 1993) erfolgte nach einer Methode von Beauvais et al. (1997).

---

Die erste Charge von DPP V (Konzentration: 1 mg Protein/ml) war in 50 mM Histidin aufgenommen worden.

Sechs weitere rekombinante Proteine (Konzentration: 1 µg Protein/ml) waren in 50 mM Carbonatpuffer (pH 9,6) aufgenommen worden. Es stand jeweils 1 ml von Mep 5, Pep 6, Cat 19 und RNase zur Verfügung.

Da diese rekombinanten Proteine, wie sich in den Proliferationsassays herausstellte, zu niedrig konzentriert waren, wurden folgende höher konzentrierte Chargen ausgetestet, die in 50 mM Histidin aufgenommen worden waren:

RNase	52,5 µg Protein/ml (2x1 ml),
Pep 6	578 µg Protein/ml (1x1 ml),
Mep 5	230 µg Protein/ml (1x1 ml),
Cat 19	112 µg Protein/ml (2x1 ml),
DPP V	2. Charge: 730 µg Protein/ml (1x400 µl) und 3. Charge: 870 µg Protein/ml (1x200 µl),
Sod Mang 2	225 µg Protein/ml (2x1 ml)

## **2.9 Proliferationsassays**

### **2.9.1 Proliferationstestungen mit PBMC**

Zur Überprüfung der spezifischen T-Zellreaktivität, von Patienten und gesunden Probanden, auf verschiedene *Aspergillus*-Antigene wurden 6-Tages-Proliferationstests durchgeführt.

Der Proliferationsassay wurde in 96-Loch-Rundbodenplatten jeweils in Triplikaten ausgeführt. Es wurden pro Loch  $1 \times 10^5$  PBMC kultiviert in 200 µl RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I und 25 mM HEPES-Puffer, dem 10% HS zugesetzt war und 200 µg/ml Gentamicinsulfat. Die *Aspergillus fumigatus*-Antigene wurden in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben:

EC SAB:	50 µg/ml - 50 ng/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
EC EXL:	500 µg/ml - 50 ng/ml (in 10er Verdünnungsstufen)

---

PP SAB:	50 µg/ml - 5 ng/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
PP EXL:	50 µg/ml - 5 ng/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
Konidien:	5 x 10 <sup>5</sup> Konidien/ml - 5 x 10 <sup>2</sup> Konidien/ml
Cat 19:	5 µg/ml - 5 ng/ml (500 ag/ml) (in 10er Verdünnungsstufen)
DPP V:	5 µg/ml - 500 pg/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
Sod Mang 2:	5 µg/ml - 5 pg/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
Mep 5:	5 µg/ml - 500 pg/ml (5 pg/ml) (in 10er Verdünnungsstufen)
Pep 6:	5 µg/ml - 5 pg/ml (in 10er Verdünnungsstufen)
RNase:	5 µg/ml - 5 pg/ml (in 10er Verdünnungsstufen)

Als Positivkontrollen für die unspezifische Stimulierbarkeit der Lymphozyten allgemein, wurde das rekombinante Zytokin IL-2 (50 U/ml) verwendet. Das polyclonale Mitogen PHA (1% [vol/vol]) diente als Positivkontrolle durch unspezifische Aktivierung aller T-Lymphozyten und Tetanus-Toxoid (TT) (20 µg/ml) durch spezifische Stimulation MHC-II-restringierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Tetanus-geimpften Personen. CMV-Antigen (500 ng/ml) wurde zum Vergleich der Immunrestitution der Pilz-spezifischen mit der Virus-spezifischen lymphoproliferativen Antwort bei Patienten spät nach allogener SZT eingesetzt.

Die Negativkontrolle bestand aus dem Medium, in dem auch die Zellen aufgenommen worden waren. Sie stellte also die Fraktion der unstimulierten Zellen dar.

Die Zellen wurden 6 Tage lang bei 37°C in einer feuchten, 5% CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre kultiviert. Für die letzten 18 h, wurden der Kultur 37 KBq [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro Loch hinzugefügt. Nach Abschluß der Inkubation, wurden die Zellen, mit Hilfe eines Zellerntegeräts, auf Glasfaserfilter aufgebracht. Diese Filter wurden 3 h lang luftgetrocknet, bevor sie in Szintillationsflüssigkeit getränkt und eingeschweißt wurden. Die antigeninduzierte T-Zellproliferation wurde über den Einbau des radioaktiven Tritiums [<sup>3</sup>H], in die DNA sich teilender Zellen, mit dem Beta-Szintillationszähler in cpm (counts per minute) gemessen. Die ermittelte Radioaktivität korreliert mit dem Ausmaß an DNA-Replikation und Proliferation.

---

Die Absolutwerte wurden als Mittelwert der jeweiligen Triplets in cpm angegeben. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse untereinander, wurde der Stimulations-Index (SI) berechnet, der definiert ist als Quotient aus mittlerem Absolutwert der  $\alpha$ -Emission stimulierter Zellen und der mittleren Absolutemission unstimulierter Zellen (Negativkontrolle).

### **2.9.2 Proliferationstestung mit selektionierten CD4+/CD8+ T-Zellen**

Die Proliferationsassays mit den durch MACS (2.11) selektionierten CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden nach dem selben Schema, wie unter 2.9.1 beschrieben, durchgeführt und noch erweitert durch Zugabe von autologen, bestrahlten APC (2.4) im Verhältnis 1:1. Jedoch wurde lediglich die Stimulierbarkeit der CD4+ T-Zellen, der CD8+ T-Zellen bzw. der CD4-CD8- Zellfraktion auf das *Aspergillus fumigatus*-Antigenlysat EC SAB (2.8.2) getestet. EC SAB wurde in 10er Verdünnungsstufen von 50  $\mu$ g/ml bis 50 ng/ml eingesetzt. Die effektive Lymphoproliferation wird gebildet aus der Differenz der  $\alpha$ -Emission von Antigen-stimulierten Zellen und nicht Antigen-stimulierten Zellen.

#### Kontrollansätze:

1. unseparierte PBMC + Medium/IL2/PHA/TT
2. unseparierte PBMC + EC SAB
3. CD4+ T-Zellen + Medium/IL2/TT/APC
4. CD4+ T-Zellen + EC SAB
5. CD4+ T-Zellen + EC SAB + APC
6. CD8+ T-Zellen + Medium/IL2/TT/APC
7. CD8+ T-Zellen + EC SAB
8. CD8+ T-Zellen + EC SAB + APC
9. CD4-CD8- Zellen + Medium/APC
10. CD4-CD8- Zellen + EC SAB
11. CD4-CD8- Zellen + EC SAB + APC

---

### **2.9.3 Proliferationstestung mit vorstimulierten T-Zelllinien**

Zur Untersuchung der Spezifität von T-Zelllinien wurden ebenfalls 6-Tages-Proliferationsassays ähnlich, wie unter 2.9.1, durchgeführt, jedoch mit einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  stimulierten T-Zellen/Loch und zusätzlich dem 2- bis 5-fachen an autologen, bestrahlten PBMC als APC.

### **2.10 Herstellung von Aspergillus-spezifischen T-Zelllinien**

Die Kultivierung von humanen T-Zelllinien erfolgte aus PBMC von Patienten und gesunden Spendern.

Zur Induktion wurden  $1 \times 10^7$  PBMC in 10 ml RPMI 1640 mit Glutamax-I und 25 mM HEPES Puffer, dem 200 µg/ml Gentamicinsulfat und 10% HS zugesetzt worden waren, zusammen mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenen (Cat 19: 2,5 µg/ml bzw. 5 µg/ml, Sod Mang 2: 10 µg/ml, EC EXL: 5 µg/ml, PP EXL: 0,5 µg/ml, PP SAB: 1:64 (1:50)) inkubiert. Nach 7 Tagen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde 30 U/ml IL-2 zugesetzt und die Kultur weitere 3 Tage im Brutschrank gelassen.

Am 10. Tag wurden die stimulierten T-Zellblasten gewaschen, gezählt und in einer 24-Loch-Platte weiterkultiviert. Es wurden pro Loch  $5 \times 10^5$  T-Zellblasten in 2 ml von oben genanntem Mediumgemisch mit dem 2- bis 5-fachen an autologen, bestrahlten PBMC ("feeders"), 30 U/ml IL-2 und einem Fünftel bzw. einem Achtel der Ausgangskonzentration der Antigene eingesetzt.

Im Folgenden wurden die T-Zellblasten einmal wöchentlich restimuliert. Waren die Löcher noch vor Ablauf einer Woche voll bewachsen, wurden die Zellen geteilt und mit frischem Medium (RPMI mit IL-2, HS und Gentamicinsulfat, aber ohne *Aspergillus fumigatus*-Antigen und ohne "feeders") aufgefüllt.

---

## **2.11 Magnetic Cell Sorting zur CD4+/CD8+ Selektion aus PBMC**

Für die magnetische Zellseparation (MACS) von CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten aus isolierten PBMC wurden zunächst je  $1 \times 10^7$  der gewaschenen PBMC in 80  $\mu$ l Phosphat-gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2), die mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA versetzt war, aufgenommen. Die Zellen wurden nun magnetisch markiert mit kolloidalen super-paramagnetischen MicroBeads (MACS CD4 bzw. CD8 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), die an monoklonale Maus-Antikörper konjugiert waren, die gegen das menschliche Zelloberflächenantigen CD4 (Leu<sup>TM</sup>-3a) oder CD8 (Leu<sup>TM</sup>-2a) gerichtet sind. Es wurden je 20  $\mu$ l der MACS CD4 oder CD8 MicroBeads zu den Zellen hinzugefügt, gut durchmischt und 15 Minuten lang bei 8°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 ml von oben genanntem Puffer gewaschen, 10 Minuten lang mit 200 rpm zentrifugiert und wiederum in 500  $\mu$ l Puffer aufgenommen. Danach wurde eine Säule vom Typ MS<sup>+</sup>, die in das Magnetfeld eines Mini-MACS Separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) plaziert worden war, mit 500  $\mu$ l Puffer gefüllt, die vorbehandelten Zellen darauf gegeben und dreimal mit 500  $\mu$ l Puffer nachgespült. Während die nicht-markierten negativen Zellen die Säule ungestört passierten, wurden die magnetisch markierten CD4+ oder CD8+ Zellen in der Säule im Bereich des Magnetfeldes zurückgehalten. Somit wurden die unmarkierten, CD4- oder CD8- Zellen von den CD4+ bzw. CD8+ Zellen getrennt. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld, konnten die CD4+ oder CD8+ Zellen, als positiv selektierte Zellfraktion, separat aufgefangen und für Proliferationsassays eingesetzt werden. Nachdem die CD4+ und CD8+ Zellen aus den PBMC selektioniert worden waren, blieb die Fraktion der CD4-CD8- Zellen übrig.

---

## **2.12 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse**

### **2.12.1 Materialien für FACS-Analyse**

Monoklonale murine Antikörper der Firma Pharmingen (Hamburg) in 3 verschiedenen Markierungen: FITC, PE, Cyochrome:

Anti-CD3	allgemeiner T-Zellmarker
Anti-CD4	Marker für T-Helferzellen
Anti-CD8	Marker für cytotoxische T-Zellen
Anti-CD14	Marker für myelomonozytische Zellen
Anti-CD19	Marker für B-Zellen
Anti-CD25	Marker für aktivierte T-Zellen
Anti-CD56	Marker für NK-Zellen

### **Puffer und Lösungen**

Waschpuffer:

450 ml Hanks´ Balanced Salt Solution	PAA, Linz, Austria
325 mg Natriumazid	Serva, Heidelberg
50 ml FCS	Sigma, St. Louis, USA

### **2.12.2 FACS-Markierung**

Zur immunphänotypischen Charakterisierung und Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen der T-Zelllinien am Zytofluorographen (fluorescence-activated-cell-sorter, FACS) wurden murine monoklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenproteine, die die unterschiedlichen Subpopulationen der Lymphozyten exprimierten, in 3 verschiedenen Markierungen eingesetzt. Es erfolgte eine Bindung der spezifischen konjugierten MAK an die Lymphozyten. Zunächst wurden frische oder aufgetaute Zellen gezählt und 10 Minuten bei 1000 rpm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und je  $2 \times 10^5$

---

Zellen in 500 µl Waschpuffer aufgenommen. Um durch die Blockade der Fc-Rezeptoren ein unspezifisches Binden der AK zu verhindern, wurde zum Waschmedium 10% FCS hinzugefügt. Zu der Zellsuspension wurden je 10 µl der o.g. konjugierten MAK in FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) hinzupipetiert, gründlich durchmischt und dann unter Lichtschutz 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen und Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden 50 µl einer 1:100 in Waschpuffer verdünnten Lösung von 2 mg/ml Propidiumjodid zugegeben.

Diese 2- bis 3-fach markierten Proben wurden mit dem FacsCalibur® (Becton Dickinson) gemessen und mit einem Computerprogramm ausgewertet.

Als Negativkontrolle und zum Einstellen des Gerätes dienten bei jeder Färbung Isotypenkontrollen.

## **2.13 IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Der ELISPOT ist eine Variation des ELISA. Dabei werden Zellen auf Antikörper (AK) gegeben, die an einer Plastikoberfläche immobilisiert sind. Diese fangen die Sekretionsprodukte der Zellen ein. Anschließend weist man die Sekretionsprodukte wie beim ELISA mit Hilfe eines enzymgekoppelten AK nach. Eine enzymatische Farbreaktion findet nur dort statt, wo spezifische AK gebunden sind. So werden farbige Flecken (Spots) sichtbar, anhand derer man die Zahl der Zellen, die ein bestimmtes Produkt sezernieren, bestimmen kann bzw. die Freisetzung dieses Produktes quantifizieren kann.

Es wurde eine Nitrocellulose HA-Platte (MAHA S4510, Millipore) mit 1 µg/well anti-humanem IFN- $\gamma$  Antikörper (Mab-D1K, MABTECH, Hölzel, Köln) beschichtet, der in 100 µl sterilem kalzium- und magnesiumfreien PBS gelöst war. Über Nacht wurde die Platte bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die beschich-

---

tete Platte fünfmal mit 200 µl/well PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden zum Blockieren 100 µl/well RPMI 1640 mit 10% Humanserum (HS) zugegeben, und die Platte wurde eine Stunde lang bei 37°C ruhen gelassen. Währenddessen wurden 1 x 10<sup>5</sup> PBMC/100 µl aufgenommen, sowohl in reinem HS, als auch in HS, dem entweder das *Aspergillus fumigatus*-Antigenextrakt EC SAB in Konzentrationen von 10 µg/ml sowie 20 µg/ml oder 1% PHA zugesetzt worden war. Je 100 µl dieser Zellsuspensionen wurde in Triplikaten in die Löcher gegeben und 20 h lang bei 37°C im Brutschrank, in einer feuchten, 5% CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre, inkubiert. Nachdem die Platte sechsmal mit PBS/Tween20 0,05% in einer Schüssel gewaschen worden war, wurden 0,2 µg/well eines enzymgekoppelten anti-humanen IFN-γ AKs (Mab 7B6-1-Biotin, MABTECH, Hölzel, Köln), der in 100 µl PBS/BSA 0,5% gelöst worden war, zu den Zellen in die Löcher hinzugefügt. Wiederum wurde die Platte 2 Stunden lang bei 37°C ruhen gelassen und anschließend im gleichen Puffer wie zuvor sechsmal gewaschen. Danach wurden 100 µl/well eines Avidin-Peroxidase-Komplexes (Vectastain Elite Kit, Vector) zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach einer Stunde wurde dreimal mit dem Puffer und weitere dreimal mit reinem PBS gewaschen. Schließlich wurden 100 µl/well AEC-Substrat-Lösung, hergestellt aus 1 Tablette AEC (Sigma, St. Louis, USA), die in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 47,5 ml Acetatpuffer (bestehend aus 46,9 ml Millipore H<sub>2</sub>O + 4,6 ml 0,1 N Essigsäure + 11 ml 0,1 N NaAcetat-Lösung) ergänzt worden war, zugegeben. Als Reaktionsstarter wurden zu den 50 ml AEC-Lösung 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% hinzugefügt, gut gemischt und steril filtriert durch einen 0,45 µm-Spritzen-Filter. Um die Reaktion nach 4 Minuten zu stoppen, wurde die Platte unter fließendem, destilliertem Wasser gewaschen. Eine Nacht lang wurde die Platte dann bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und danach bei 4°C aufbewahrt, bis die Spots ausgewertet wurden.

---

## 2.14 Zytokin-ELISAs

Die quantitative Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand lässt sich mit käuflich erwerbbaaren ELISAs durchführen. Es wurden ELISA-Kits der Firmen R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA und Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Echingen verwendet. Die ELISAs wurden zur Unterscheidung von T-Zellen des Typs T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 ausgewählt. Der Quantikine<sup>®</sup> human IL-4 Kit, R&D wurde nach dem rekombinanten NIBSC/WHO IL-4 internationalen Standard lot 88/656 eingestellt mittels der Umrechnungsformel:

NIBSC (88/656) äquivalenter Wert (IU/ml) = 0,0163 x Quantikine<sup>®</sup> IL-4 Wert (pg/ml).

Der rekombinante Standard des Milenia<sup>®</sup> IL-10 ELISA, DPC, wurde am NIBSC-Standard 92/515 kalibriert.

Der IFN- $\gamma$  Standard, Biozol, wurde nach dem internationalen Referenzstandard NBSB lot 82/587 geeicht.

Alle Assays sind sowohl für den Nachweis von natürlichen humanen als auch rekombinanten humanen Zytokinen geeignet. Die Zellkulturüberstände wurden nach 5 Tagesstimulation der PBMC, beziehungsweise nach einer Induktionsphase von 10 Tagen und den darauf folgenden weiteren Simulationen entnommen. Sie wurden sofort bei -70°C eingefroren. Nach Angaben der Hersteller wurde die Bestimmung der Zytokinkonzentration durchgeführt. Die ELISA-Platten waren mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für das jeweilige Zytokin vorbeschichtet. Nach der Inkubation bildeten diese Antikörper mit den, in den Zellkulturüberständen enthaltenen Zytokinen einen Immunkomplex, der mit einem zweiten, gegen das Zytokin gerichteten, Peroxidase-konjugierten Antikörper (bei IL-4 und IL-10), beziehungsweise Biotin-konjugierten Antikörper (bei IFN- $\gamma$ ) nachgewiesen wurde. Bei Zugabe von Substratlösung erhielt man eine Farbreaktion, die proportional zu der gebundenen Zytokinmenge war. Die Lichtabsorption des Farbstoffs wurde bei 450 nm in einem SLT Spectra ELISA-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Synelisa Version

---

3.2 der Firma Elias. Die Standardkurven wurden entweder nach der linearen Regressionsmethode (IFN- $\gamma$ ) oder nach der 4-Parameter-Methode (IL-4, IL-10) ausgewertet und die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine innerhalb dieser Standardkurve automatisch mittels des oben genannten Programms berechnet.

## **2.15 Statistische Verfahren**

Die statistischen Analysen in dieser Pilotstudie wurden zu rein deskriptiven Zwecken durchgeführt ohne vorherbestehende Hypothesen. Die Auswertung wurde gemeinsam mit Herrn C. Meisner vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Tübingen, vorgenommen. Alle untersuchten Variablen waren, entsprechend der Immunreaktionen in der Grundgesamtheit aller Lymphozytenspender, nicht normalverteilt. Deshalb wurden sie mit ihren Medianen und Spannweiten beschrieben. Wilcoxon signed-ranks Tests für abhängige Variablen wurden angewandt, um die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten bei verschiedenen Konzentrationen jeweils ein und des selben Antigens zu erfassen. Mann-Whitney U Tests wurden durchgeführt, um die Verteilungen der Variablen zwischen Patienten mit progredienten klinischen Manifestationen einer invasiven Aspergillose und Patienten mit offensichtlichem klinischen Ansprechen auf eine antimykotische Behandlung zu vergleichen. Spearman's rank-order Korrelationskoeffizienten wurden errechnet, um die Verbindung zwischen Aspergillus-spezifischer Lymphoproliferation, Neutrophilenzahlen und Steroiddosen sowie zwischen Steroiddosen und der IFN- $\gamma$  Ausschüttung in Kulturüberständen zu beschreiben. McNemar's Tests und Sign Tests wurden angewandt, um die lymphoproliferativen Antworten nach Stimulation mit CMV, EC SAB und Tetanus-Toxoid zu vergleichen sowie die IFN- $\gamma$ /IL-10 Verhältnisse. Die Testergebnisse wurden mit zweiseitigen nominalen P-Werten präsentiert. Ein P-Wert von  $P < 0,05$  gilt als statistisch auffällig.

---

Die Analysen wurden mit den Programmen JMP Version 3.1.6.2 und SAS System für Windows 8.0 Software durchgeführt (SAS Institute, Cary, NC).

---

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Gesunde Probanden**

#### **3.1.1 Austestung der verschiedenen *Aspergillus fumigatus*-Antigene**

Die sechs Tage andauernde Lymphozytenproliferation, induziert durch unterschiedliche *Aspergillus fumigatus*-Antigene, gemessen durch die  $\alpha$ -Emission inkorporierten Tritiums ( $[^3\text{H}]$ -Thymidin) [cpm], wurde durch den Stimulations-Index (SI) erfaßt. Der SI ist definiert als Quotient aus mittlerem Absolutwert der  $\alpha$ -Emission stimulierter Zellen und der mittleren Absolutemission unstimulierter Zellen (Negativkontrolle). Ein SI von  $\geq 3$  wurde als positive lymphoproliferative Antwort gewertet. Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine hypothesengenerierende Pilotstudie zur Austestung der Lymphozytenproliferation auf unterschiedliche *Aspergillus fumigatus*-Antigene. Es wurde die Hypothese überprüft, daß Aspergillus-Antigene eine konzentrationsabhängige Proliferation auslösen.

##### **3.1.1.1 Intrazelluläre Antigenextrakte von *Aspergillus fumigatus***

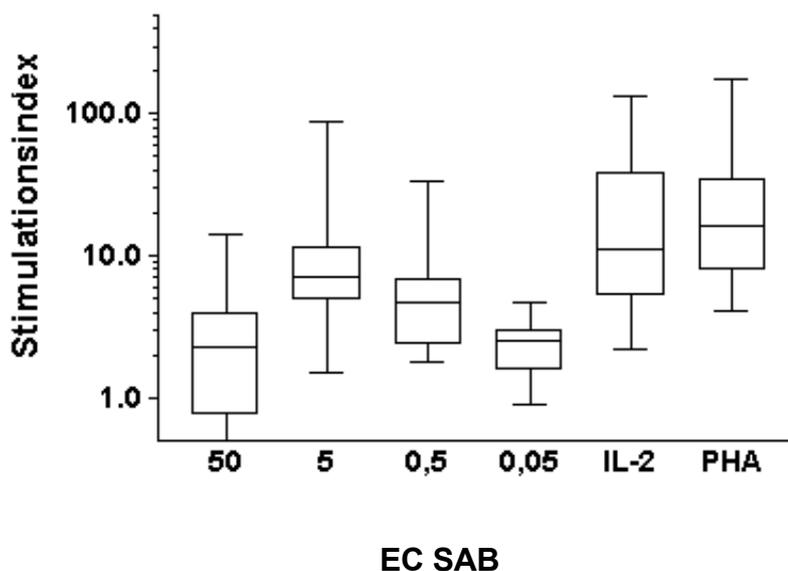
###### **3.1.1.1.1 EC SAB**

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von gesunden Probanden (n=16) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des *Aspergillus fumigatus*-Zellextrakts EC SAB inkubiert. Die Titrationsreihe erstreckte sich von 50  $\mu\text{g}$  bis 50 ng Protein/ml (Abb. 2). Bei 14 von 16 gesunden Probanden (87,5%) wurde ein maximaler Stimulations-Index von  $\geq 3$  am sechsten Tag des Proliferationsassays dokumentiert [Median der maximalen SI für EC SAB: 7,1; Spannweite: 2,1 - 86,9]. Alle Testpersonen zeigten eine gute Lymphoproliferation nach Stimulation mit PHA und Tetanus-Toxoid (TT) [Median SI für PHA: 15,6; Spannweite: 4,1 - 176,5; Median SI für TT: 9,4; Spannweite: 3,3 - 191,6]. PHA diente als Positivkontrolle durch unspezifische Aktivierung aller T-Lymphozyten und TT durch spezifische Stimulation MHC-II-restringierter CD4+

---

T-Lymphozyten in Tetanus-geimpften Personen. Die selben 14 Probanden, die auf EC SAB auffällig reagiert hatten, zeigten auch unter Kultur mit dem Lymphokin IL-2 positive Ergebnisse mit ebenfalls großer Variationsbreite [Median SI für IL-2: 11; Spannweite: 2,2 - 132,5]. Die Lymphozyten, die im Rahmen der Titrationsreihe mit 5 µg/ml des Antigengemisches EC SAB stimuliert wurden, demonstrierten maximale Proliferation. Im Vergleich war diese Konzentration der Proteinkonzentration von 50 µg/ml um das 3,3-fache ( $P < 0,0001$ ), der von 500 ng/ml um das 1,5-fache ( $P = 0,013$ ) und der von 50 ng/ml um das 2,5-fache ( $P < 0,0001$ ) überlegen. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Experimente mit EC SAB die 5 µg/ml Konzentration ausgewählt.

**Abb. 2:**



**Abb. 2** zeigt die SI der Verdünnungsreihe von EC SAB in Konzentrationen von 50 - 0,05 µg/ml mit IL-2 und PHA als Positivkontrollen. Die Grenzen dieses Box-Plots geben die Spannweite des kleinsten und größten SI-Wertes wieder.

---

### **3.1.1.1.2 EC EXL**

Die lymphoproliferative Antwort auf das Zellextrakt EC EXL (gewonnen aus *Aspergillus fumigatus* im Hefemedium) wurde an den selben gesunden Probanden (n=16) wie bei EC SAB getestet. Die Konzentration von EC EXL betrug 500 µg Protein/ml, die in Zehnerschritten bis auf 50 ng Protein/ml heruntertitriert wurde. Außerdem entstammten die Blutproben teilweise anderen Zeitpunkten, als jene für die Austestung von EC SAB. Nach Inkubation der PBMC mit EC EXL zeigte sich bei 9 der 16 Testpersonen (56,25%) ein maximaler SI  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 3,35; Spannweite: 1,5 - 126,2]. Wiederum wiesen PHA und Tetanus-Toxoid in allen Fällen positive Proliferationsergebnisse auf [Median SI für PHA: 15,6; Spannweite: 4,1 - 115,4; Median SI für TT: 9,4; Spannweite: 3,3 - 292,2]. Analog zu den Meßwerten der IL-2-Kultur bei EC SAB zeigten auch bei dieser Versuchsreihe die selben 14 Probanden auffällige Proliferation [Median SI für IL-2: 11; Spannweite: 2,2 - 420,6]. Lymphozyten, die mit 5 µg/ml EC EXL stimuliert wurden, proliferierten im Vergleich zu anderen Proteinmengen um ein Vielfaches mehr (500 µg/ml: 23,1-fach (P<0,0001); 50 µg/ml: 1,1-fach (P=0,64); 500 ng/ml: 1,2-fach (P=0,005); 50 ng/ml: 3,7-fach (P=0,008)). Daraus läßt sich schließen, daß zwischen der 5 µg/ml und der 50 µg/ml Konzentration von EC EXL kein wesentlicher Unterschied besteht und somit beide gleichermaßen gut geeignet sind zur Induktion der Lymphozytenproliferation.

### **3.1.1.2 Extrazelluläre Antigenlysate von *Aspergillus fumigatus***

#### **3.1.1.2.1 PP SAB**

Die Austestung der lymphoproliferativen Antwort auf das *Aspergillus fumigatus*-Präzipitat des Sabouraud-Mediums PP SAB (Kulturüberstand) erfolgte parallel zu der Versuchsreihe mit EC EXL. PBMC der selben gesunden Probanden

---

wurden mit PP SAB stimuliert (Ausnahme Proband Nr. 13). Die Stichproben-  
größe umfaßte daher nur 15 Personen. Die verwendeten Proteinkonzentra-  
tionen von PP SAB bei den Verdünnungsreihen deckten einen Bereich von 50  
µg/ml bis 5 ng/ml ab. Bei 6 der 15 untersuchten Personen (40%) fand sich ein  
maximaler Stimulations-Index von  $\geq 3$  am sechsten Tag des Proliferationsas-  
says [Median der maximalen SI: 2,1; Spannweite: 1,3 - 53,0]. Im Vergleich zu  
der EC EXL-Versuchsreihe zeigten PHA und Tetanus-Toxoid ebenfalls  
ausschließlich positive Proliferationsergebnisse aber leicht verschobene Medi-  
ane aufgrund der veränderten Stichprobengröße [Median SI für PHA: 15,6;  
Spannweite: 4,1 - 115,4; Median SI für TT: 9,1; Spannweite: 3,3 - 292,2]. Unter  
IL-2 waren die Stimulations-Indices bei 13 der 15 Probanden  $\geq 3$  [Median SI für  
IL-2: 10,4; Spannweite: 2,2 - 420,6]. Die beste Lymphoproliferation nach Stimu-  
lation mit PP SAB wurde bei einer Konzentration von 50 ng/ml beobachtet.  
Diese war den anderen Proteingehalten überlegen (50 µg/ml: 9,5-fach  
( $P=0,008$ ); 5 µg/ml: 10,3-fach ( $P<0,0001$ ); 500 ng/ml: 2,2-fach ( $P=0,005$ ); 5  
ng/ml: 1,1-fach ( $P=0,552$ )). Zwischen der 50 ng/ml und 5 ng/ml Konzentration  
ist demzufolge statistisch kein auffälliger Unterschied festzustellen, obwohl bei  
50 ng/ml die Lymphoproliferation etwas dominanter war. Demnach eignen sich  
diese beiden Konzentrationen von PP SAB zur Stimulation von Lymphozyten.

### **3.1.1.2.2 PP EXL**

Die Untersuchungen mit dem Präzipitat PP EXL (von *Aspergillus fumigatus* im  
Hefemedium) wurden an den PBMC der selben 15 gesunden Probanden  
durchgeführt, die auch mit PP SAB stimuliert worden waren. Die eingesetzten  
Proteinkonzentrationen von PP EXL reichten von 50 µg/ml bis 5 ng/ml. Mit die-  
sem Antigengemisch wiesen die PBMC von 8 der 15 Versuchspersonen  
(53,3%) nach der sechstägigen Kultur einen maximalen SI von  $\geq 3$  auf [Median  
der maximalen SI: 3,0; Spannweite: 1,2 - 22,7]. Für die Positivkontrollen PHA,  
Tetanus-Toxoid und IL-2 gelten die selben Ergebnisse, die bereits im

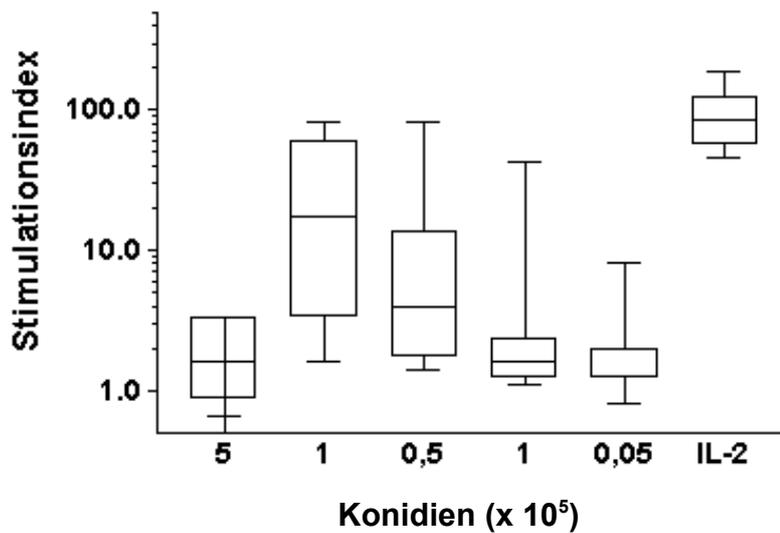
---

vorhergehenden Abschnitt 3.1.1.2.1 unter PP SAB aufgeführt worden sind. Die Proliferation nach Stimulation mit der besten Konzentration von 500 ng/ml PP EXL stellte sich um 20,1-fach stärker heraus als mit 50 µg/ml ( $P=0,0001$ ) und 2,45-fach stärker als mit 5 ng/ml ( $P=0,016$ ). Die dazwischen liegenden Konzentrationen (5 µg/ml und 50 ng/ml) zeigten hingegen im Vergleich zu 500 ng/ml keine signifikanten Unterschiede in der Stimulation.

### **3.1.1.3 Hitzeinaktivierte Konidien von *Aspergillus fumigatus***

Mit einer Suspension hitzeinaktivierter Konidien verschiedener Konzentrationen ( $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^3$  Konidien/ml) wurden bei 8 gesunden Probanden Proliferationsanalysen an PBMC durchgeführt (Abb. 3). Dabei vermehrten sich die Zellen von 7 der 8 Personen (87,5%) stark mit jeweils einem maximalen SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 17,45; Spannweite: 2 - 83,1]. Bei allen getesteten Probanden wurde IL-2 als Kontrolle eingesetzt, das ausschließlich positive Ergebnisse lieferte [Median der SI für IL-2: 83,85; Spannweite: 46,2 - 190,3]. Zudem wurde PHA bei 5 der 8 Personen mituntersucht, das ebenfalls in allen Fällen auffällige Lymphoproliferationen hervorrief [Median der SI für PHA: 86,3; Spannweite: 18,5 - 234,6]. Wie sich in den Verdünnungsreihen mit den hitzeinaktivierten Konidien herausstellte, lag die beste lymphoproliferative Antwort bei einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Konidien/ml. Diese war um den Faktor 8,15 höher als bei  $5 \times 10^5$  Konidien/ml ( $P=0,031$ ), um 1,7 höher als bei  $5 \times 10^4$  ( $P=0,078$ ), um 3,2 höher als bei  $1 \times 10^4$  ( $P=0,016$ ) und um 6,15 höher als bei  $5 \times 10^3$  Konidien/ml ( $P=0,031$ ).

**Abb. 3:**



**Abb. 3** stellt die SI der Verdünnungsreihe der Konidien suspension in Konzentrationen von  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^3$  Konidien/ml mit IL-2 als Positivkontrolle dar. Die Grenzen dieses Box-Plots geben die Spannweite des kleinsten und größten SI-Wertes wieder.

### **3.1.1.4 Rekombinante Proteine von *Aspergillus fumigatus***

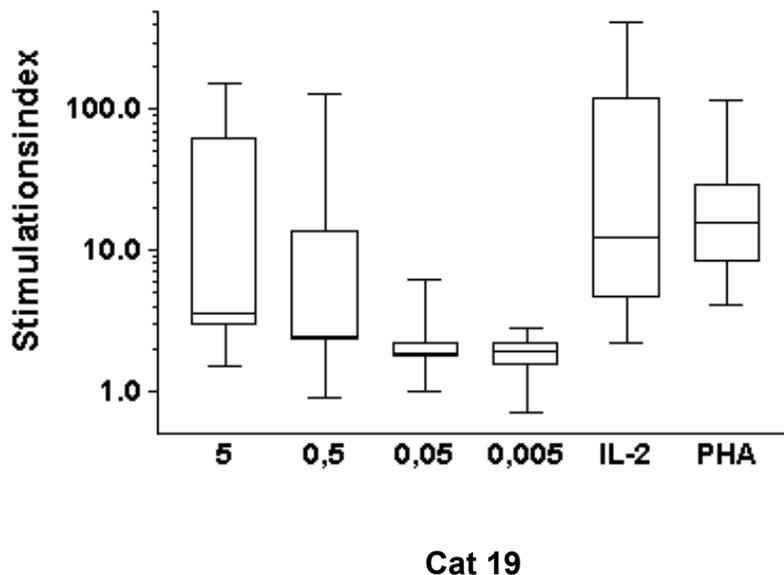
#### **3.1.1.4.1 Catalase (90 kDa)**

Das rekombinant in der Hefe *Pichia Pastoris* exprimierte *Aspergillus fumigatus*-Protein Catalase (Cat 19), diente bei 11 gesunden Probanden als Stimulans der PBMC (Abb. 4). Davon offenbarten 8 Personen (72,7%) einen maximalen SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 3,6; Spannweite: 2,2 - 153,3]. PHA und Tetanus-Toxoid führten in allen Fällen zu einer positiven Lymphoproliferation [Median SI für PHA: 15,6; Spannweite: 4,1 - 115,4; Median SI für TT: 9,7; Spannweite: 3,3 - 292,2]. Die Stimmulations-Indices unter IL-2 waren bei 9 der 11 Testpersonen  $\geq 3$  [Median SI für IL-2: 12,2; Spannweite: 2,2 - 420,6].

---

Es zeigte sich, daß die beste lymphoproliferative Antwort bei einer Konzentration von 5 µg Protein/ml zu finden war, die zugleich dem höchstmöglichen ausgetesteten Proteingehalt entsprach. Im Vergleich zu den drei niedrigeren Konzentrationen von Cat 19 proliferierten die PBMC nach Zugabe von 5 µg/ml um das 1,5-fache gegenüber 500 ng/ml ( $P=0,014$ ), um das 1,85-fache gegenüber 50 ng/ml ( $P=0,010$ ) und um das 2,1-fache gegenüber 5 ng/ml ( $P=0,004$ ).

**Abb. 4:**



**Abb. 4** demonstriert den Vergleich der SI der Verdünnungsreihe von Cat 19 in Konzentrationen von 5 - 0,05 µg/ml mit den Positivkontrollen IL-2 und PHA. Die Grenzen dieses Box-Plots geben die Spannweite des kleinsten und größten SI-Wertes wieder.

### **3.1.1.4.2 Dipeptidylpeptidase V (88 kDa)**

Die ebenfalls in *Pichia Pastoris* rekombinant produzierte Dipeptidylpeptidase V von *Aspergillus fumigatus* (DPP V), wurde bei 16 gesunden Probanden zur

---

Lymphozytenstimulation eingesetzt. Das Spektrum der verwendeten Proteinkonzentrationen erstreckte sich von 5 µg/ml bis 500 pg/ml. Ein maximaler SI von  $\geq 3$  ließ sich bei 4 der 16 Versuchspersonen (25%) beobachten [Median der maximalen SI: 1,95; Spannweite: 0,9 - 8,4]. PHA und Tetanus-Toxoid induzierten bei allen untersuchten Probanden eine starke Lymphoproliferation [Median SI für PHA: 15,6; Spannweite: 4,1 - 78,5; Median SI für TT: 9,4; Spannweite: 3,3 - 247,2]. Die Stimations-Indices unter IL-2 waren bei 9 der 11 Testpersonen  $\geq 3$  [Median SI für IL-2: 11; Spannweite: 2,2 - 132,5].

Am besten proliferierten die PBMC bei einer Konzentration von 500 ng Protein/ml. Bei dieser Konzentration war die lymphoproliferative Antwort nach Stimulation mit DPP V leicht gegenüber den anderen ausgetesteten Konzentrationen erhöht. Jedoch zeigte nur der Vergleich der SI der 500 ng/ml Konzentration mit den SI der 500 pg/ml Konzentration einen auffälligen Unterschied von  $P=0,004$ .

#### **3.1.1.4.3 Weitere rekombinante Proteine von *Aspergillus fumigatus***

Die Austestung der rekombinanten Superoxid Dismutase (Sod Mang 2) erfolgte an PBMC von 4 verschiedenen gesunden Probanden. Die Lymphozyten aller 4 Testpersonen zeigten bei der höchstmöglichen eingesetzten Konzentration von 5 µg/ml, die wie bei allen diesen rekombinanten Proteinen durch die geringe Menge des zur Verfügung stehenden Antigens limitiert wurde, einen maximalen SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI für Sod Mang 2: 155,65; Spannweite: 8,6 - 167,9]. Parallel dazu wurde auch die Lymphozytenstimulation mit der Metalloprotease (Mep 5; 230 µg/ml), Aspartatprotease (Pep 6; 578 µg/ml) und der Ribonuklease (RNase, hergestellt im *Pichia Pastoris*-Stamm 46.29; 52,5 µg/ml) untersucht. Ebenfalls bei 5 µg Protein/ml war unter Stimulation mit Mep 5 bei 3 der 4 Testpersonen ein positiver maximaler SI festzuhalten [Median der maximalen SI für Mep 5: 18,45; Spannweite: 1,8 - 44,7] und unter Pep 6 wiederum sogar bei allen 4 Probanden [Median der maximalen SI für

---

Pep 6: 56,9; Spannweite: 3,9 - 141,0]. Mit der RNase hingegen zeigten nur die PBMC von 1 der 4 Testpersonen (25%) eine gute Lymphoproliferation bei 500 ng/ml [Median der maximalen SI für RNase: 1,9; Spannweite: 0,6 - 3,7].

Kultivierung mit PHA, Tetanus-Toxoid sowie IL-2 führten bei allen untersuchten Personen zu einer sehr starken Lymphozytenvermehrung [Median SI für PHA: 64,6; Spannweite: 27,2 - 115,4; Median SI für TT: 174,55; Spannweite: 80,9 - 292,2; Median SI für IL-2: 139,3; Spannweite: 106,8 - 420,6].

### **3.1.2 Bestimmung der Proliferation selektionierter T-Zellen auf EC SAB**

Im folgenden wurde die proliferative Kapazität einzelner T-Zellpopulationen auf Induktion mit EC SAB untersucht. Dafür wurden zunächst isolierte PBMC von drei Probanden (Nr. 24, Nr. 12 und Nr. 29) mittels MACS (2.11) nach CD4+ beziehungsweise CD8+ und bei Proband Nr. 29 noch zusätzlich nach CD4-CD8- T-Zellfraktionen (in Tabelle I, aber nicht in Abb. 5 aufgeführt) selektioniert. In all diesen Fällen zeigte es sich, daß sich die Untergruppe der CD4+ T-Zellen als Reaktion auf EC SAB rasch vermehrte in Anwesenheit von autologen, bestrahlten PBMC zur Antigenpräsentation (APC), während die effektive Lymphoproliferation (2.9.2) sowohl der CD4+ T-Zellen ohne autologe, bestrahlte PBMC, als auch der CD8+ Population und CD4-CD8- Populationen gering war (Tabelle I; Abb. 5). Im Vergleich zu CD4+ T-Zellen proliferierten PBMC nicht ganz so stark, aber dennoch gut. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden die berechneten Werte der effektiven Lymphoproliferation der verschiedenen Fraktionen in Relation zur CD4+ Subpopulation mit APC (100%) prozentual angegeben.

---

**Tabelle I:**

Proband Nr. 24

<b>Zellfraktion</b>	<b>5 µg/ml EC SAB [cpm]</b>	<b>ohne EC SAB [cpm]</b>	<b>Emissions- differenz [cpm]</b>	<b>effektive Proliferation [%]</b>
CD4+APC+	46.164	2.136	44.028	100
CD4+APC-	3.324	126	3.198	7,3
CD8+APC+	2.102	114	1.988	4,5
PBMC	22.005	222	21.783	49,5

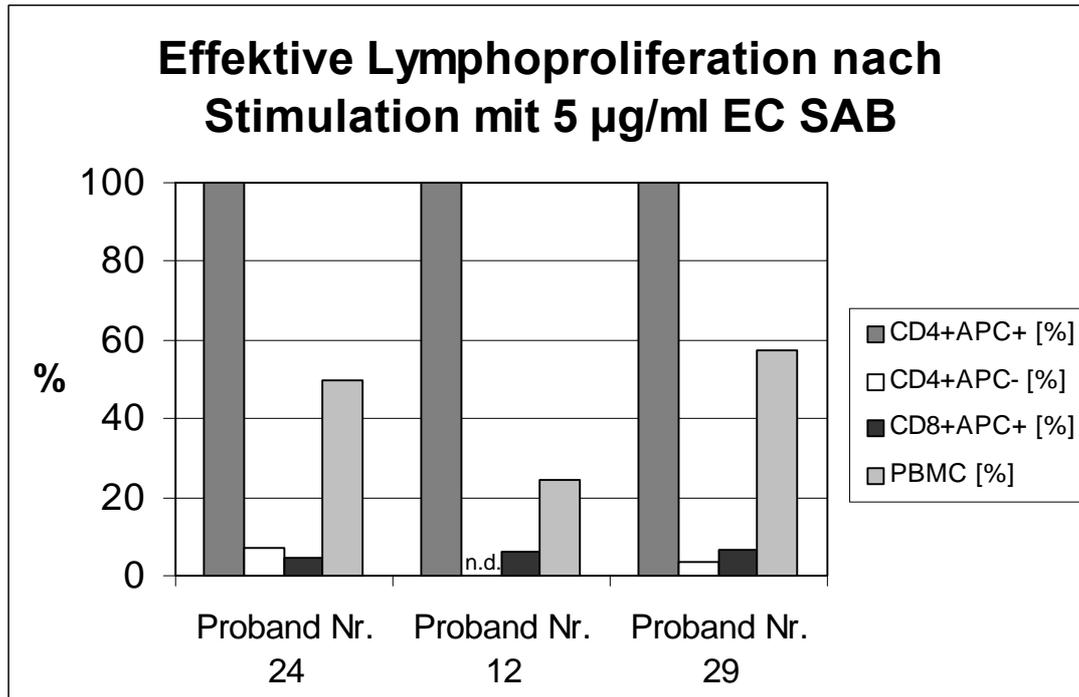
Proband Nr. 12

<b>Zellfraktion</b>	<b>5 µg/ml EC SAB [cpm]</b>	<b>ohne EC SAB [cpm]</b>	<b>Emissions- differenz [cpm]</b>	<b>effektive Proliferation [%]</b>
CD4+APC+	44.858	2.656	42.202	100
CD4+APC-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD8+APC+	2.761	115	2.646	6,3
PBMC	10.422	120	10.302	24,4

Proband Nr. 29

<b>Zellfraktion</b>	<b>5 µg/ml EC SAB [cpm]</b>	<b>ohne EC SAB [cpm]</b>	<b>Emissions- differenz [cpm]</b>	<b>effektive Proliferation [%]</b>
CD4+APC+	59.066	1.574	57.492	100
CD4+APC-	2.075	112	1.963	3,4
CD8+APC+	4.053	228	3.825	6,7
PBMC	33.361	265	33.096	57,6
CD8+APC-	57	67	-10	0
CD4-CD8-APC+	3.786	519	3.267	5,7
CD4-CD8-APC-	445	351	94	0,2

**Abb. 5:**

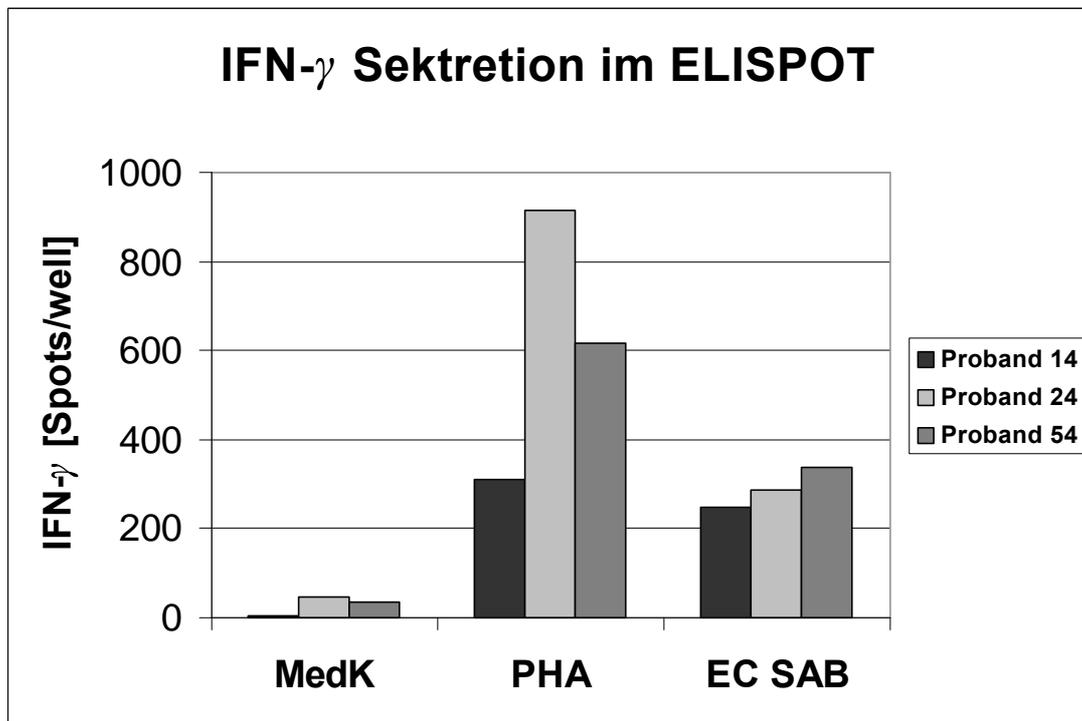


### **3.1.3 Bestimmung der Zytokinproduktion von Aspergillus-spezifischen T-Zellen mittels IFN- $\gamma$ ELISPOT und Zytokin-ELISA**

#### **3.1.3.1 IFN- $\gamma$ Freisetzung von PBMC gesunder Probanden im ELISPOT**

Die Zytokinsekretion von PBMC dreier gesunder Probanden (14, 24, 54) nach Stimulation mit dem Antigengemisch EC SAB wurde zunächst mit der Methode des IFN- $\gamma$  ELISPOTs (2.13) untersucht. Wie auch bei den Proliferationsassays wurde mit dem unspezifischen T-Zellstimulans PHA das Ausmaß der IFN- $\gamma$ -Freisetzung der potentiellen Effektorzellen aus der Gruppe der PBMC ermittelt. Dabei handelt es sich sowohl um CD4+ als auch CD8+ T-Zellen, die IFN- $\gamma$  sezernieren. Nach Stimulation mit dem Antigenextrakt EC SAB in einer Konzentration von 10 µg/ml zeigten zwischen 250 und 340 Zellen pro  $10^5$  PBMC eine spezifische IFN- $\gamma$  Freisetzung (Abb. 6).

**Abb. 6:**



### **3.1.3.2 Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand von gesunden Probanden**

Um die Aspergillus-spezifische Reaktionsantwort der T-Zellen anhand ihrer Zytokinausschüttung näher zu charakterisieren, wurden PBMC von 17 gesunden Probanden mit EC SAB in der optimalen Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert und die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 im Überstand analysiert. An 16 dieser Testpersonen wurden Proliferationsassays mit EC SAB durchgeführt (3.1.1.1.1).

Das mittlere Alter dieser 17 gesunden Probanden lag bei 41 Jahren mit einer breiten Spannweite von 23 bis 88 Jahren. Acht der Testpersonen waren männlich und die übrigen 9 weiblichen Geschlechts.

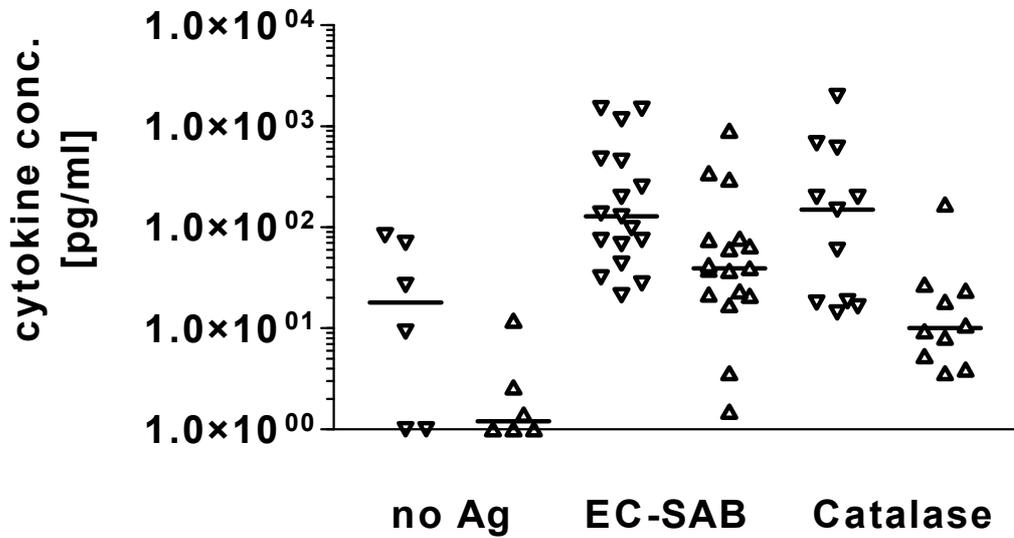
---

Zudem wurden PBMC von 11 dieser insgesamt 17 Probanden auch noch mit 5 µg/ml der rekombinanten Catalase Cat 19 zur Proliferation angeregt. Nach fünftägiger Kultivierung wurde dann das freigesetzte IFN-γ, IL-10 und IL-4 (n=12) in den Kulturüberständen mittels standardisierten ELISAs erhoben (2.14). Zur Spezifitätskontrolle der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenen wurde die Basisfreisetzung von IFN-γ und IL-10 unstimulierter PBMC nach fünftägiger Kultivierung unter gleichen Bedingungen wie bei der antigeninduzierten Proliferation bei 6 der 17 gesunden Probanden mituntersucht (Abb. 7: no Ag). IFN-γ war in einer mittleren Konzentration von 18,1 pg/ml [Spannweite: <1,0 - 83,3] im Zellüberstand zu finden. Die mittlere Konzentration von IL-10 betrug 1,2 pg/ml [Spannweite: <1,0 - 11,9]. Als Positivkontrolle für die *Aspergillus*-Antigen-unspezifische Zytokinfreisetzung, also für die allgemeine Stimulierbarkeit aller T-Lymphozyten in Kultur, diente das Mitogen PHA. Für IFN-γ ergab sich bei denselben 6 gesunden Probanden nach Stimulation mit PHA eine mittlere Konzentration von >2000 pg/ml [Spannweite: 13,3 - >2000] im Zellüberstand. Die Ausschüttung von IL-10 belief sich nach Aktivierung der PBMC mit PHA auf einer mittleren Konzentration von 389 pg/ml [Spannweite: <1,0 - 792,1].

Nach Stimulation mit EC SAB wurde ein deutlicher Anstieg in der Produktion von IFN-γ [Median 128,7; Spannweite: 21,3 - 1519 pg/ml] und von IL-10 [Median: 39,4; Spannweite: 1,5 – 899,4 pg/ml] dokumentiert (Abb. 7). 13 der 17 Probanden zeigten IFN-γ Konzentrationen, die gegenüber IL-10 um mindestens das 2-fache höher waren. Darüber hinaus wurde die Sekretion von IL-4 bei 12 der 17 gesunden Versuchspersonen mituntersucht. Auffälligerweise war bei allen 12 Probanden kein sezerniertes IL-4 meßbar. Dies läßt vermuten, daß die ELISA-Kits für IL-4 nicht sensitiv genug waren.

Die Zytokinfreisetzung in den Kulturüberständen nach Stimulation mit der 90 kDa Catalase Cat 19 lieferte kongruente Ergebnisse mit einer erhöhten Sekretion von IFN-γ [Median 149,3; Spannweite: 14,4 - >2000 pg/ml] sowie von IL-10 [Median: 10,05; Spannweite: 3,6 – 168,5 pg/ml] (Abb. 7) (Hebart et al., 2002).

**Abb. 7:**



**Abb. 7** zeigt den Vergleich der mittels ELISA gemessenen Zytokinsekretion der unstimulierten Zellen (no Ag) sowie der IFN- $\gamma$  und IL-10 Freisetzung nach Stimulation der PBMC von gesunden Probanden mit EC SAB und der Catalase Cat 19. ▽ IFN- $\gamma$ , Δ IL-10

### **3.1.4 Kultivierung von Aspergillus-spezifischen T-Zelllinien**

Um die Aspergillus-spezifischen T-Zellen im Blut weiter zu charakterisieren, wurde versucht, T-Zellen durch verschiedene *Aspergillus fumigatus*-Antigene *in vitro* zu stimulieren und als Linien zu expandieren. Es wurden 9 T-Zelllinien von 4 Gesunden etabliert. Zur Generation der T-Zelllinien wurden PBMC 10 Tage mit Aspergillus-Antigen und autologen Feederzellen (bestrahlte PBMC) stimuliert und danach durch wöchentliche Restimulation mit einem Fünftel oder einem Achtel der anfänglichen Antigenkonzentration weitergeführt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe autologer Feederzellen und von IL-2 (2.10). Die nicht vorstimulierten PBMC waren in den 6 Tage andauernden Proliferationsassays

---

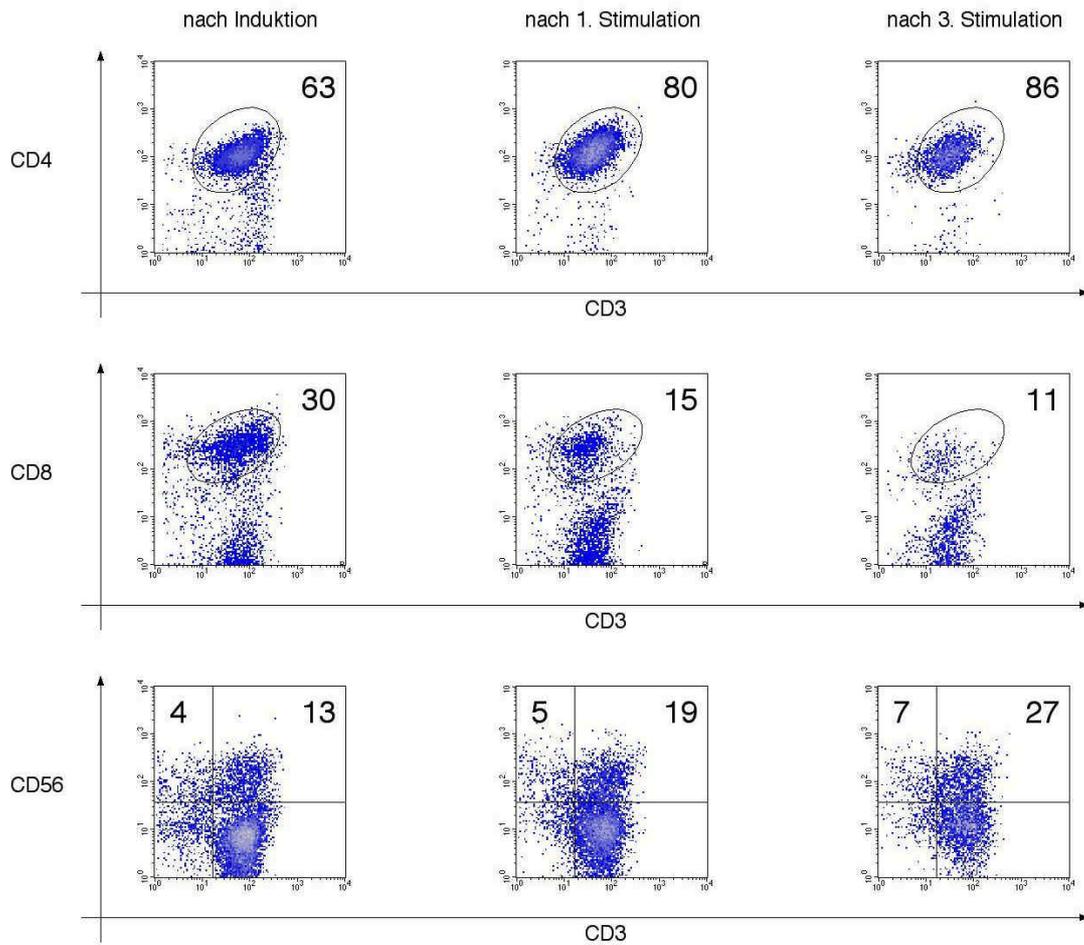
(2.9.1) funktionstüchtig und lebendig. Sie zeigten eine gute, von der Antigenkonzentration abhängige Proliferation. Nach der zehntägigen Induktionsphase zeigten die aktivierten Zellen jedoch nach erneuter Stimulation mit Antigen im Proliferationsassay (2.9.3), bei dem nur  $1 \times 10^4$  kultivierte Zellen sowie  $2-5 \times 10^4$  autologe bestrahlte PBMC eingesetzt wurden, keine spezifische Proliferation auf das Antigen. Auch in nachfolgenden Proliferationsassays nach längerer Kultivierung der T-Zelllinien ließ sich keine Proliferation Aspergillus-spezifischer T-Zellen nachweisen, obwohl im FACS (2.12) eindeutig eine vitale CD4+ T-Zellpopulation vorhanden war, so daß die Spezifität dieser T-Zelllinien leider nicht geklärt werden konnte.

Exemplarisch werden im folgenden die FACS-Ergebnisse des Probanden Nr. 24 vorgestellt, von dem eine T-Zelllinie durch Stimulation mit der rekombinanten Catalase Cat 19 und eine weitere Linie durch Stimulation mit der rekombinanten Superoxid Dismutase Sod Mang 2 generiert wurde (Abb. 8, Abb. 9). Beim Vergleich der prozentualen Anteile (Zahlen in den rechten oberen Ecken) der jeweiligen T-Zellsubpopulationen in Bezug auf die Grundgesamtheit der CD3+ T-Zellen in Kultur entsprechen, wird deutlich, daß kein qualitativer Unterschied zwischen den beiden rekombinanten Proteinen C19 und SM besteht. Beide Proteine sind potente Induktoren, da danach hohe Anteile von (63% (Cat 19) bzw. 62% (Sod Mang 2)) CD4+ T-Zellen gemessen wurden. Im Laufe der Kultivierung fand zudem eine positive Selektionierung statt mit einer weiteren relativen Zunahme der CD4+ T-Zellen in Kultur, die nach der 3. Stimulation anteilig 86% (Cat 19) bzw. 87% (Sod Mang 2) betragen. Gegenläufig verhielten sich die CD8+ T-Zellen (Abb. 8 und Abb. 9). Mit zunehmender Kultivierungsdauer war auch ein Anstieg in der Expression von CD56 auf CD3+ Zellen zu vermerken und parallel dazu eine leichte Vermehrung der CD56+CD3- NK-Zellen (Prozentwerte im linken oberen Quadranten).

**Abb. 8:**

Proband Nr. 24  
Stimulation *in vitro*

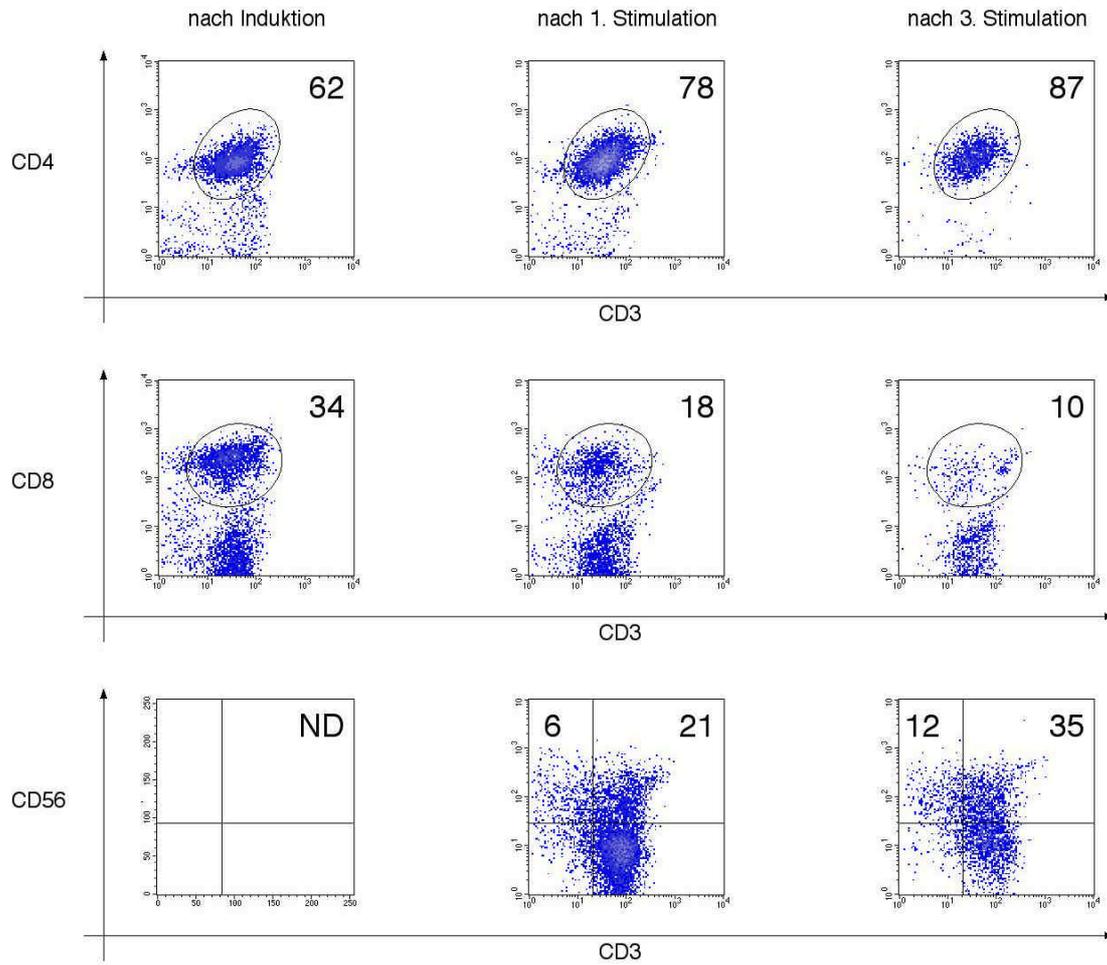
**Catalase, Cat 19**



**Abb. 9:**

Proband Nr. 24  
Stimulation *in vitro*

**Superoxid Dismutase, Sod Mang 2**



---

## **3.2 Hämatologische Patienten**

### **3.2.1 Austestung der verschiedenen *Aspergillus fumigatus*-Antigene**

#### **3.2.1.1 Intrazelluläre Antigenextrakte von *Aspergillus fumigatus***

##### **3.2.1.1.1 EC SAB**

An PBMC von 24 hämatologischen Patienten mit erwiesener, wahrscheinlicher oder vermuteter invasiver Aspergillose (1.4.3) nach Chemotherapie und/oder allogener Stammzelltransplantation (SZT) bzw. Knochenmarktransplantation wurde das *Aspergillus fumigatus*-Zellextrakt EC SAB ausgetestet. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme befanden sich einige der Patienten in Aplasie oder unter Steroidtherapie nach KMT, was bei der Analyse der Lymphoproliferation auf antigene Stimuli, insbesondere auch bei den Positivkontrollen PHA und IL-2, berücksichtigt werden muß. Wie bei den Versuchen mit den PBMC gesunder Probanden deckten die untersuchten Antigenkonzentrationen einen Bereich von 50 µg bis 50 ng Protein/ml ab. Bei 16 der 24 kranken Probanden (66,7%) wurde ein maximaler SI von  $\geq 3$  am sechsten Tag des Proliferationsassays dokumentiert [Median maximaler SI für EC SAB: 5,15; Spannweite: 0,9 - 125,9]. Die Positivkontrolle PHA zeigte eine auffällige Lymphoproliferation bei 15 von 23 Patienten [Median SI für PHA: 9,5; Spannweite: 1 - 1613,5]. Interessanterweise ließ sich bei PBMC von 6 der 8 Patienten, die nicht wesentlich auf Stimulation mit EC SAB reagiert hatten, auch mit PHA keine positive Lymphozytenvermehrung induzieren. Nach Stimulation mit TT zeigten 12 von 24 Patienten eine spezifische Proliferation [Median SI für TT: 2,6; Spannweite: 0,7 - 112,7]. Mit IL-2 dagegen waren bei 21 von 24 Probanden positive Ergebnisse zu vermerken [Median SI für IL-2: 8,4; Spannweite: 0,5 - 201,5].

---

### **3.2.1.1.2 EC EXL**

Die lymphoproliferative Antwort auf EC EXL wurde an PBMC von 23 der obigen Patienten ermittelt. Die eingesetzten Antigenkonzentrationen lagen im selben Bereich wie bei den gesunden Probanden. Nach Inkubation der PBMC mit EC EXL wiesen 10 der 23 Testpersonen (43,5%) einen maximalen SI von  $\geq 3$  auf [Median der maximalen SI: 2,6; Spannweite: 0,5 - 273,1]. Nach Stimulation mit PHA zeigten 16 der 23 kranken Probanden positive Proliferationsergebnisse [Median SI für PHA: 11,2; Spannweite: 1 - 674,9], mit TT 11 der 23 Patienten [Median SI für TT: 2; Spannweite: 0,4 - 129,5] und mit IL-2 19 der 23 Patienten [Median SI für IL-2: 8,9; Spannweite: 0,5 - 201,5].

### **3.2.1.2 Extrazelluläre Antigenlysate von *Aspergillus fumigatus***

#### **3.2.1.2.1 PP SAB**

Die Austestung der lymphoproliferativen Antwort auf PP SAB wurde an PBMC von 18 Patienten durchgeführt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen von PP SAB erstreckten sich über einen Bereich von 50 µg/ml bis 5 ng/ml. Bei 7 der 18 untersuchten Personen (39%) zeigte sich ein maximaler SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 1,95; Spannweite: 1 - 21,5], nach Stimulation mit PHA bei 11 der 18 Patienten [Median SI für PHA: 7,15; Spannweite: 1 - 236], mit TT bei 7 der 18 [Median SI für TT: 1,6; Spannweite: 0,7 - 23,6] und mit IL-2 bei 15 der 18 Probanden [Median SI für IL-2: 8,4; Spannweite: 0,5 - 201,5].

#### **3.2.1.2.2 PP EXL**

Mit PP EXL wurden Untersuchungen bei den gleichen PBMC der 18 Patienten durchgeführt, die auch mit PP SAB stimuliert worden waren. Die eingesetzten

---

Proteinkonzentrationen von PP EXL rangierten von 50 µg/ml bis 5 ng/ml. 10 der 18 Probanden (55,6%) zeigten nach der sechstägigen Lymphoproliferation mit PP EXL einen maximalen SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 3,15; Spannweite: 0,7 - 24,2]. Alle 8 Patienten, die auf PP EXL nicht proliferierten, hatten auch auf PP SAB keine Reaktion gezeigt. Für die Mediane und Spannweiten der Positivkontrollen PHA, TT und IL-2 gelten die selben Ergebnisse, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt 3.2.1.2.1 unter PP SAB beschrieben.

### **3.2.1.3 Hitzeinaktivierte Konidien von *Aspergillus fumigatus***

Bei 7 Patienten wurden mit einer Suspension hitzeinaktivierter Konidien in Konzentrationen von  $5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^2$  Konidien/ml Proliferationsanalysen der PBMC durchgeführt. Dabei vermehrten sich die Zellen von 4 der 7 kranken Probanden (57,1%) stark mit einem maximalen SI von  $\geq 3$  [Median der maximalen SI: 6,2; Spannweite: 1,2 - 83,3]. Bei allen getesteten Probanden wurde IL-2 als Kontrolle eingesetzt, wobei 6 der 7 Patienten eine IL-2 induzierte Lymphoproliferation aufwiesen [Median der SI für IL-2: 10,3; Spannweite: 1,2 - 278,1]. PHA führte bei den selben 4 Patienten, deren PBMC sich gut mit den Konidien stimulieren ließen, zu einer Lymphoproliferation, nicht jedoch bei jenen 3, die keine Reaktion auf die Konidien suspension gezeigt hatten [Median der SI für PHA: 27; Spannweite: 0,3 - 297,4].

### **3.2.1.4 Rekombinante Proteine von *Aspergillus fumigatus***

#### **3.2.1.4.1 Catalase (90 kDa)**

Die Catalase (Cat 19), die bei den PBMC der gesunden Probanden zu guten Proliferationsergebnissen geführt hatte, wurde bei 5 Patienten, die eine positive Lymphoproliferation auf EC SAB demonstriert hatten, zur Lymphozyten-

---

stimulation in Konzentrationen  $\leq 5 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Damit zeigten 2 der 5 kranken Testpersonen (40%) einen positiven maximalen SI [Median der maximalen SI: 2,6; Spannweite: 0,9 - 3,8]. Mit PHA und Tetanus-Toxoid war jeweils bei 3 der 5 Probanden eine gute Lymphoproliferation zu verzeichnen [Median SI für PHA: 4,8; Spannweite: 2 - 236; Median SI für TT: 4,6; Spannweite: 1,1 - 23,6]. Die SI von IL-2 ergaben bei allen 5 Testpersonen Werte von  $\geq 3$  [Median SI für IL-2: 19,5; Spannweite: 3,9 - 176,4] (Tabelle II).

**Tabelle II:**

Proband-Nr.	Cat 19: SI <sub>max</sub>	EC SAB: SI <sub>max</sub>	TT: SI	IL-2: SI	PHA: SI
36	2,6	20,8	23,6	3,9	2,0
37	2,1	12,3	1,3	18,0	2,5
41	3,8	29,4	4,6	143,1	136,0
50	3,5	4,3	5,0	19,5	26,4
52	0,9	10,8	1,1	176,4	4,8

### **3.2.1.4.2 Dipeptidylpeptidase V (88 kDa)**

Die rekombinante Dipeptidylpeptidase V (DPP V) wurde bei 22 Patienten zur Lymphozytenstimulation eingesetzt. Das Spektrum der verwendeten Proteinkonzentrationen erstreckte sich analog zu den Proliferationsassays der gesunden Probanden von  $5 \mu\text{g/ml}$  bis  $500 \text{ pg/ml}$ . Ein maximaler SI von  $\geq 3$  ließ sich bei lediglich 1 der 22 kranken Versuchspersonen (4,5%) registrieren [Median der maximalen SI: 1,25; Spannweite: 0,4 - 6,4]. 15 der 22 Probanden zeigten auf PHA eine starke Lymphoproliferation [Median SI für PHA: 15,6; Spannweite: 1 - 1613,5], 10 der 22 auf TT [Median SI für TT: 1,75; Spannweite: 0,4 - 44,7] und 18 der 22 auf IL-2 [Median SI für IL-2: 9,1; Spannweite: 0,5 - 201,5]. Somit bestätigten sich auch bei Patienten mit klinischem Anhalt für eine Aspergillus-Infektion die geringe Anzahl DPP V-spezifischer T-Zellen.

---

### **3.2.2 T-Zellantwort bei Patienten mit klinischem Anhalt für eine IA**

#### **3.2.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs**

Die *A. fumigatus*-spezifische T-Zellreaktion wurde mit Hilfe von Lymphoproliferationsassays und Zytokin-ELISAs an PBMC von Patienten erhoben, die eine Hochdosis-Induktions-/Konsolidierungstherapie zur Behandlung ihrer akuten myeloischen (n=8) oder ihrer akuten lymphoblastischen Leukämie (n=4) erhalten hatten. Zusätzlich wurden Patienten nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) (n=4) oder Knochenmarktransplantation (KMT) (n=4) von einem HLA-identischen, nicht verwandten Spender untersucht. Das mittlere Alter der Patienten nach Chemotherapie lag bei 46 [29-67] Jahren und das der Patienten nach allogener SZT bei 35,5 [26-48] Jahren. Männlichen Geschlechts waren 12 der Patienten und 8 weiblichen Geschlechts. Die myeloablativ Konditionierungstherapie vor einer allogenen SZT bestand entweder aus einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung (12 Gy) oder aus Busulfan (16 mg/kg Körpergewicht (KG)), beide in Kombination mit Cyclophosphamid (120 mg/kg KG). Patienten mit einer Hochrisiko-Leukämie wurden zusätzlich mit Etoposid (40 mg/kg KG) oder Cytosinarabinosid (2 x 2 g/m<sup>2</sup> an zwei aufeinander folgenden Tagen) behandelt. Zur GvHD-Prophylaxe wurde Cyclosporin A ab Tag -1 und Antithymozytenglobulin (20 mg/kg KG) an den Tagen -4 bis -2, bei den Patienten, die ein passendes Transplantat eines Geschwisters erhielten, oder 4 Tage lang, an den Tagen -4 bis -1, bei jenen Patienten, die ein Transplantat von einem HLA-identischen, jedoch nicht verwandten Spender bekamen, verabreicht.

---

### **3.2.2.2 Aspergillus-spezifische T-Zellantworten bei Patienten mit IA nach Chemotherapie und allogener Stammzelltransplantation**

Gemäß der unter 1.4.3 erwähnten Definitionen für eine IA wurde das oben beschriebene Patientenkollektiv (3.2.2.1) eingeteilt. An einer erwiesenen IA waren 5 Patienten erkrankt, 3 Patienten an einer wahrscheinlichen und 12 Patienten an einer möglichen IA. Das klinische Ansprechen der Patienten auf die antimykotische Therapie wurde radiologisch beurteilt (2.2.1 und Tabelle III).

Nach Stimulation mit dem Antigengemisch EC SAB wurde bei 14 von 18 Patienten eine positive Lymphoproliferation dokumentiert [Median SI: 9,05; Spannweite: 1,0 - 41,4] und 2 weitere Patienten (Proband Nr. 15 und Nr. 39), die nicht mit EC SAB stimuliert worden waren, zeigten nach Stimulation mit PP EXL eine positive lymphoproliferative Antwort. Bei 14 dieser insgesamt 20 Patienten zeigte sich nach Stimulation mit PHA ein SI von  $\geq 3$  [Median SI für PHA: 18,75; Spannweite: 0,6 - 332,1], mit TT, das nur bei jenen 18 Patienten mituntersucht wurde, an denen EC SAB ausgetestet worden war, bei 10 von 18 [Median SI für TT: 3,6; Spannweite: 0,7 - 27,2] und mit IL-2 bei 17 von 20 Patienten [Median SI für IL-2: 15,95; Spannweite: 0,5 - 201,5].

#### **3.2.2.2.1 Korrelation der T-Zellreaktion der Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der IA (zum Zeitpunkt der Blutentnahme)**

Eine erwiesene oder wahrscheinliche IA wurde bei 5 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) diagnostiziert (Probanden Nr. 15, 37, 40, 45, 52), und bei 3 weiteren Patienten, die eine intensive Chemotherapie zur Behandlung ihrer akuten myeloischen Leukämie erhalten hatten (Probanden Nr. 7, 10, 23) (Tabelle III). Von diesen insgesamt 8 Patienten zeigten 6 eine positive lymphoproliferative Antwort auf Stimulation mit EC SAB und ein Patient

---

(Proband Nr. 15) auf PP EXL. Eine partielle Rückbildung der klinischen Manifestationen der IA zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme wiesen 5 dieser 8 Patienten auf, und ein Patient (Proband Nr. 52) nach allogener SZT zeigte einen stabilen Zustand seiner intrazerebralen Läsionen über mehr als 6 Wochen hinweg (Tabelle III). Die Probanden Nr. 10 und 23 starben an einer disseminierten IA zu einem späteren Zeitpunkt, nachdem eine allogene SZT durchgeführt worden war.

Von den 12 Patienten mit einer möglichen IA gemäß der oben erwähnten Definitionen (Tabelle III) zeigten 9 eine EC SAB-spezifische Lymphozytenvermehrung mit SI-Werten von  $\geq 3$ . 3 von 6 Patienten mit progredienter Erkrankung aus der Gruppe der Patienten mit der Diagnose einer möglichen IA wiesen keine EC SAB-spezifische Lymphoproliferation auf.

### **3.2.2.3 Zytokinproduktion der Aspergillus-spezifischen T-Zellen von Patienten mit IA**

Die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-10 in Kulturüberstände nach Stimulation mit EC SAB wurde bei 17 Patienten des unter 3.2.2.1 erläuterten Kollektivs erhoben (Abb. 10). Als Referenz wurde die Basisfreisetzung dieser Zytokine nach fünf-tägiger Kultivierung unstimulierter PBMC von 6 der 17 Patienten ermittelt. Dabei ergaben sich sowohl für IFN- $\gamma$  als auch für IL-10 sehr niedrige Konzentrationen mit einer kleineren Streubreite als bei den gesunden Probanden (3.1.3.1) [Median für IFN- $\gamma$ : 2,4 pg/ml; Spannweite: <1,0 - 20,8 pg/ml; Median für IL-10: 1,6 pg/ml; Spannweite: <1,0 - 11,9 pg/ml]. Das mittlere IFN- $\gamma$ /IL-10 Verhältnis betrug 0,9 [Spannweite: 0,2 - 21]. Wiederum diente PHA als Stimulans für die Positivkontrolle. Für IFN- $\gamma$  resultierte bei den selben 6

---

Patienten nach Stimulation mit PHA eine mittlere Konzentration von 1100 pg/ml [Spannweite: 4 - >2000] im Zellüberstand. Die Ausschüttung von IL-10 belief sich nach Aktivierung der PBMC mit PHA auf eine mittlere Konzentration von 373,15 pg/ml [Spannweite: <1,0 - >1000].

Das Verhältnis der Freisetzung von IFN- $\gamma$  gegenüber IL-10 im Kulturüberstand war bei 7 Patienten mit günstigem Ansprechen auf die antimykotische Therapie höher [Median des Verhältnisses IFN- $\gamma$ /IL-10: 1,0; Spannweite: 0,09 - 24,8], als bei 10 Patienten mit progredienter (n=6) und stabiler (n=4) Erkrankung [Median des Verhältnisses IFN- $\gamma$ /IL-10: 0,1; Spannweite: 0,006 - 1,0] (P=0,04) (Abb. 11).

Die Korrelation der klinischen Befunde zum Zeitpunkt der Analysen zeigt mittels einer Rangkorrelation nach Spearman, daß die *A. fumigatus*-spezifische Lymphoproliferation mit der Neutrophilenzahl in Wechselbeziehung steht (R=0,459; P=0,064) und invers korreliert mit der Steroiddosis (R=-0,508; P=0,037). Ferner war die Steroidbehandlung mit einer Suppression von IFN- $\gamma$  assoziiert (R=0,572; P=0,017) nicht jedoch mit einer Unterdrückung der IL-10 Freisetzung in die Kulturüberstände (R=-0,2543; P=0,325).

Abb. 10:

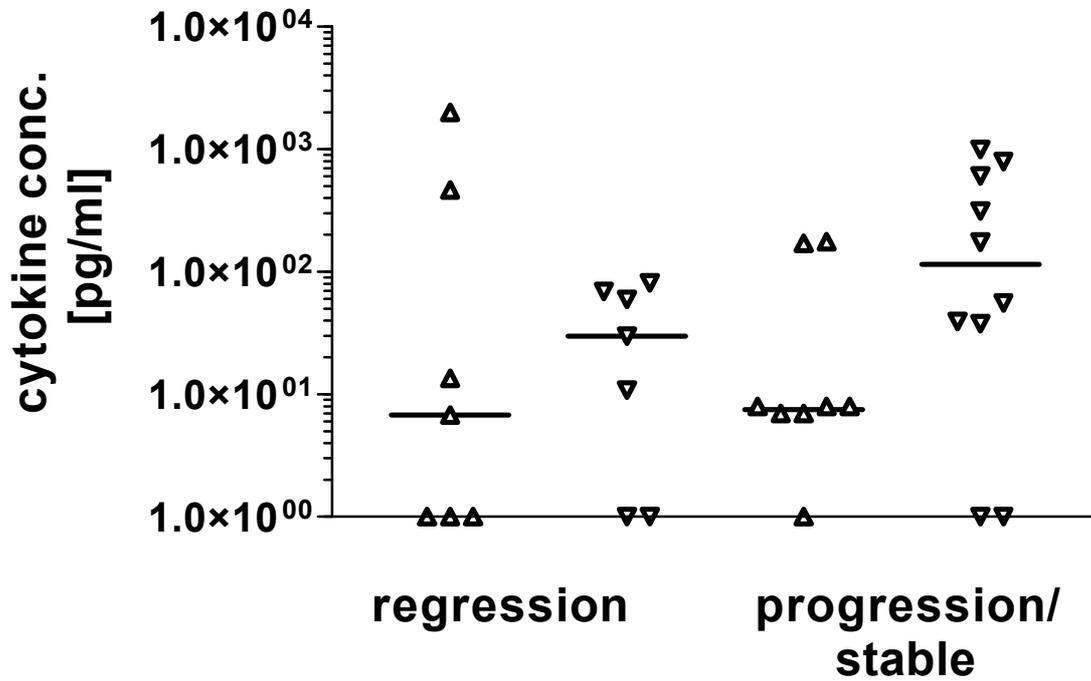
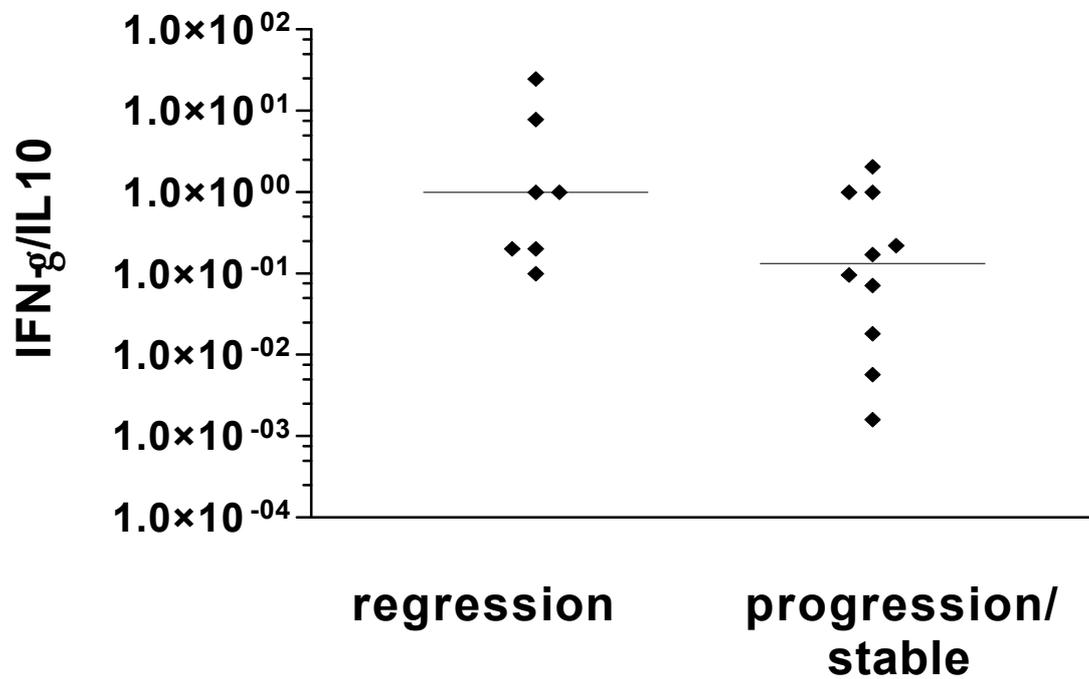


Abb. 10 stellt die mit dem ELISA gemessenen absoluten Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und IL-10 in den Kulturüberständen nach Stimulation mit EC SAB bei den Patienten mit rückläufiger IA (regression) der Zytokinsekretion der PBMC von Patienten mit progredienter (progression) oder stabiler (stable) IA gegenüber.

$\Delta$  IFN- $\gamma$ ,  $\nabla$  IL-10

**Abb. 11:**



**Abb. 11** veranschaulicht das Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 bei den Patienten mit rückläufiger IA (regression) im Vergleich zu den Patienten mit progredienter oder stabiler IA (progression/stable).

◆ Verhältnis IFN- $\gamma$ /IL-10

**Tabelle III: Charakteristika kranker Probanden**

Pat.	Grund- erkrankung	Behand- lungsmo- dalität	GvHD	Predni- solon [mg/kg]	Neutro- penie <500/ $\mu$ l [d]	SI	IFN- $\gamma$ [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	Verhältnis IFN- $\gamma$ / IL-10	Lokali- sation der IA	<i>Aspergillus</i> species	Pathologie	IA zum Zeit- punkt der Blutentnahme
<b>Patienten mit erwiesener / wahrscheinlicher invasiver Aspergillose</b>													
#37	CLL	Allo PBSZT	°II	-	16	18,5	77,3	37,5	2,1	Lunge	-	Septierte Hyphen (Lunge)	Stabil
#45	CML	Allo PBSZT	°II	1,3	27	1,4	<1	<1	-	Lunge	<i>A. fumigatus</i> (BAL)	Septierte Hyphen (Lunge, Herz)	Regression
#7	T-ALL	Chemo	-	-	33	22,8	466	59,7	7,8	Lunge, Unterarm	<i>A. flavus</i> (Biopsie)	Septierte Hyphen (Unterarm)	Regression
#10	AML	Chemo	-	-	37	9,2	>2000	80,8	>24,8	Lunge	<i>A. fumigatus</i> (Biopsie)	Septierte Hyphen (disseminiert)	Regression
#23	AML	Chemo	-	0,2	31	6,7	6,8	29,8	0,23	Lunge	<i>A. fumigatus</i> (Biopsie)	Septierte Hyphen (disseminiert)	Regression

Pat.	Grund- erkrankung	Behand- lungsmo- dalität	GvHD	Predni- solon [mg/kg]	Neutro- penie <500/ $\mu$ l [d]	SI	IFN- $\gamma$ [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	Verhältnis IFN- $\gamma$ / IL-10	Lokali- sation der IA	<i>Aspergillus</i> <i>species</i>	Pathologie	IA zum Zeit- punkt der Blutentnahme
#52	CML	MUD KMT	-	0,6	10	10,8	n.d.	n.d.	n.d.	Lunge, Gehirn	<i>A. fumigatus</i> (BAL)	-	Stabil
#15	AML	Allo PBSZT	Ext. cGvHD	0,3	-	3,6*	n.d.	n.d.	n.d.	Lunge	<i>A. fumigatus</i> (BAL)	-	Stabil
#40	AML	Allo PBSZT	Ext. cGvHD	0,7	7	12,8	<1	10,8	<0,09	Lunge	<i>A. fumigatus</i> (BAL)	-	Regression
<b>Patienten mit möglicher invasiver Aspergillose</b>													
#11	CML	MUD KMT	°II	0,2	20	2,3	<1	174,4	<0,006	Lunge	-	-	Progression
#20	CML	MUD KMT	°IV	3,6	9	3	22,3	313	0,07	Lunge	-	-	Progression
#2	CML	MUD KMT	°II	0,6	7	1	<1	55,6	<0,018	Lunge	-	-	Progression
#26	AML	Chemo	-	-	15	14,3	<1	607	<0,0016	Lunge, Gehirn	-	-	Stabil

Pat.	Grund- erkrankung	Behand- lungsmo- dalität	GvHD	Predni- solon [mg/kg]	Neutro- penie <500/ $\mu$ l [d]	SI	IFN- $\gamma$ [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	Verhältnis IFN- $\gamma$ / IL-10	Lokali- sation der IA	<i>Aspergillus</i> <i>species</i>	Pathologie	IA zum Zeit- punkt der Blutentnahme
#28	AML	Chemo	-	1,6	41	3,1	<1	<1	-	Lunge	-	-	Regression
#30	ALL	Chemo	-	0,1	28	41,4	13,5	68,7	0,2	Lunge, Gehirn	-	-	Regression
#32	AML	Chemo	-	-	16	3,4	<1	<1	-	Lunge	-	-	Progression
#36	AML	Chemo	-	-	26	20,8	3,8	39,5	0,1	Lunge	-	-	Stabil
#43	ALL	Chemo	-	1	18	31,5	170,2	>1000	<0,17	Lunge	-	-	Progression
#47	AML	Chemo	-	1,2	27	1,3	<1	<1	-	Lunge	-	-	Stabil
#50	ALL	Chemo	-	-	22	8,9	175,4	792,7	0,22	Lunge	-	-	Progression
#39	AML	Chemo	-	-	16	13,2*	n.d.	n.d.	n.d.	Lunge	-	-	Stabil

Pat., Patient; IA, invasive Aspergillose; GvHD, Graft-versus-Host Erkrankung; CLL, chronische lymphatische Leukämie; CML, chronische myeloische Leukämie; ALL, akute lymphatische Leukämie; AML, akute myeloische Leukämie; allo PBSZT, allogene periphere Blutstammzelltransplantation von einem HLA-identischen Geschwister als Spender; MUD-KMT, Knochenmarktransplantation von einem nicht verwandten Spender mit passendem HLA-Typ; ext., ausgedehnt; BAL, bronchoalveoläre Lavage.

\* Lymphoproliferation wurde mit PP EXL, einem Proteinpräzipitat von *A. fumigatus*, analysiert.

---

### **3.2.3 Vergleichende Analyse der lymphoproliferativen Antworten auf *Aspergillus fumigatus*, Tetanus-Toxoid und Cytomegalievirus bei Patienten spät nach allogener Stammzelltransplantation**

Um die Immunrekonstitution auf Antigene von Pilzen, Bakterien und Viren spät nach allogener SZT zu vergleichen, wurden Blutproben von 18 Patienten im Mittel 134 [86 - 468] Tage nach der Transplantation entnommen und analysiert. Die Charakteristika dieser Patienten sind in Tabelle IV aufgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da gemäß früherer Untersuchungen die CMV-spezifischen lymphoproliferativen Antworten bei der Mehrzahl der Patienten um den Tag 100 nach der Transplantation demonstriert werden können (Krause et al., 1997; Hebart et al., 2002).

Eine positive lymphoproliferative Antwort wurde bei 11 von 14 dieser Patienten, die vor der Transplantation CMV-seropositiv getestet worden waren und/oder ein Transplantat von einem CMV-seropositiven Spender erhalten hatten, nach Stimulation mit CMV-Antigen dokumentiert [Median der SI: 8,0; Spannweite: 1,0 - 53,8]. Im Vergleich dazu zeigten 4 der 18 Patienten nach Stimulation mit dem *Aspergillus fumigatus*-Antigen EC SAB eine positive Lymphoproliferation und 3 der 18 nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid [Median der SI für EC SAB: 1,2; Spannweite: 1,0 - 37,6; (P=0,008; McNemar's Test)], [Median der SI für TT: 1,15; Spannweite: 1,0 - 6,9; (P=0,003; McNemar's Test)] (Abb. 12A). Bei 4 CMV-seronegativen Patienten, die ein Transplantat von einem ebenfalls CMV-seronegativen Spender bekommen hatten, fand keine Lymphoproliferation auf CMV-Antigen statt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise erkrankten 3 der 4 Patienten, die eine Aspergillus-spezifische Lymphoproliferation gezeigt hatten, an einer invasiven Aspergillose nach der Transplantation (n=2) oder hatten bereits vor der Transplantation eine positive Anamnese einer IA (n=1).

Die Zytokinkonzentrationen von IFN- $\gamma$  und IL-10 wurden bei 17 Patienten nach Stimulation mit EC SAB und TT untersucht und bei 13 Patienten nach Stimulation mit CMV-Antigen. Dabei war das mittlere IFN- $\gamma$ /IL-10 Verhältnis nach Stimulation mit TT [Median: 4,04; Spannweite: 0,026 - 202] höher als bei EC

---

SAB [Median: 0,28; Spannweite: 0,006 - 2,93; (P=0,002; sign test)] und dem CMV-Antigen [Median: 0,58; Spannweite: 0,003 - 95,24; (P=0,267; sign test)] (Abb. 12B). Somit wurde die Aspergillus-spezifische T-Zellantwort der Patienten spät nach allogener SZT sowohl durch einen geringen Stimulations-Index als auch durch ein niedriges IFN- $\gamma$ /IL-10 Verhältnis charakterisiert.

**Tabelle IV:**

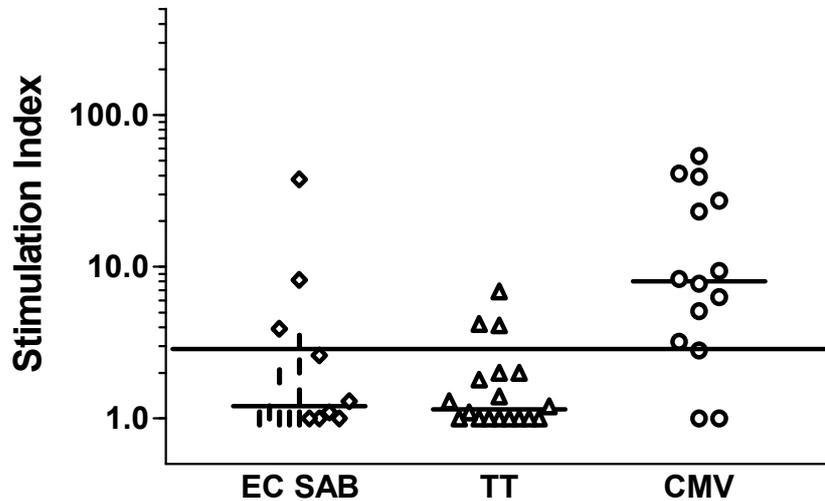
<b>Charakteristika</b>	<b>Patienten [n=18]</b>
<b>Alter [Jahre]</b> Median [Spannweite]	43,5 [17 - 58]
<b>Geschlecht</b>	
Männlich	9
Weiblich	9
<b>Grunderkrankung</b>	
CML	5
AML	4
ALL	4
NHL	4
MDS	1
<b>Patient/Spender <i>HCMV</i>-Serologie</b>	
+ / +	9
- / +	1
+ / -	4
- / -	4
<b>Konditionierungstherapie</b>	
TBI/CY ± VP16	11
BU/CY ± ARA-C	5
TBI/FLU/CY	2
<b>Art des Spenders</b>	
HLA-identischer Spender, verwandt	10
HLA-identisch, nicht verwandt	6
Nicht HLA-identisch, verwandt	2
<b>Akute GvHD</b>	
Grad 0/I	11
Grad II	4
Grad III/IV	3
<b>Chronische GvHD</b>	
Keine/limitierte Erkrankung	12
Ausgedehnte Erkrankung	6

**Tabelle IV** zeigt die klinischen Charakteristika von Patienten spät nach allogener SZT.

CML, chronische myeloische Leukämie; AML, akute myeloische Leukämie; ALL, akute lymphatische Leukämie; NHL, non-Hodgkin Lymphom; MDS, myelodysplastisches Syndrom; *HCMV*, *humanes Cytomegalievirus*; TBI, Ganzkörperbestrahlung; CY, Cyclophosphamid; VP16, Etoposid; BU, Busulfan; FLU, Fludarabin; ARA-C, Cytarabinosid; GvHD, graft-versus-host Erkrankung.

Abb. 12:

A



B

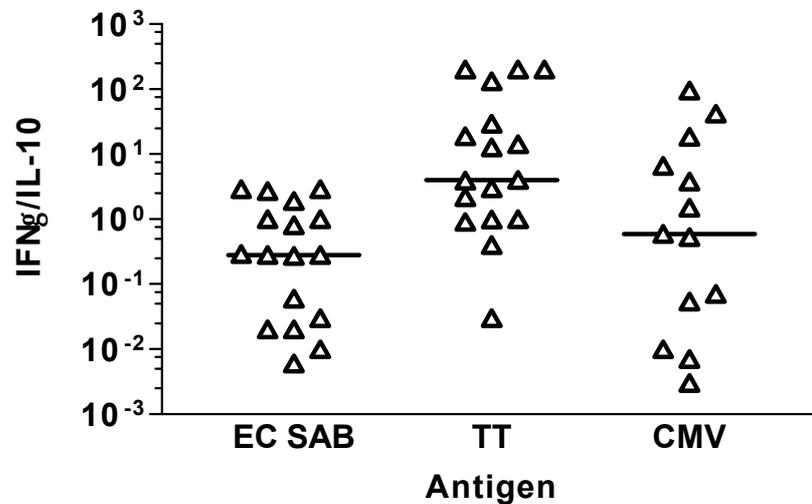


Abb. 12 zeigt den Vergleich der Analyse der Aspergillus- (EC SAB-), Tetanus-Toxoid- und CMV-Antigen-spezifischen T-Zellantworten bei Patienten spät nach allogener SZT. In Abb. 12A sind die Stimations-Indices dargestellt, in Abb. 12B das Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 der stimulierten PBMC (Hebart et al., 2002).

---

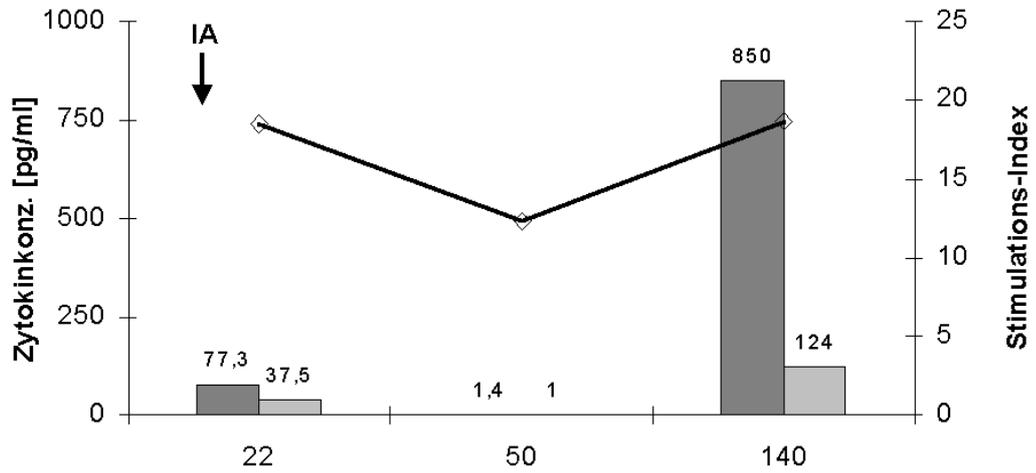
### **3.2.4 Sequentielle Untersuchung der T-Zellreaktion im klinischen Verlauf der invasiven Aspergillose**

In der folgenden Abbildung (Abb. 13) wurde von einzelnen Patienten der zeitliche Verlauf der invasiven Aspergillose nach allogener SZT dokumentiert. Parallel dazu wurden die Zytokinmuster und die Stimulations-Indices nach Stimulation mit EC SAB erhoben. Wie bereits unter 3.2.2.3 erwähnt, ist zu beachten, daß die Steroidbehandlung zur Prophylaxe oder Therapie einer GvHD mit einer Suppression von IFN- $\gamma$  assoziiert ist, nicht jedoch mit einer Unterdrückung der IL-10 Freisetzung. Ferner ist darauf hinzuweisen, daß die Blutprobengewinnung und -analyse nicht zu definierten Zeitpunkten erfolgte.

Interessanterweise verstarben schließlich 2 der 7 Patienten, die anfangs eine Besserung der IA unter antimykotischer Therapie gezeigt hatten, an einer disseminierten IA innerhalb von 3 - 14 Monaten (Tabelle III, Patienten #45 und #40; Abb. 13). Beide Patienten mußten aufgrund einer GvHD im Anschluß an eine allogene SZT intensiv immunsuppressiv behandelt werden. Die in der Abbildung 13 dargestellten Beispiele verdeutlichen, daß eine Aspergillus-spezifische Lymphoproliferation mit führender IFN- $\gamma$  Freisetzung mit einer Kontrolle der IA einhergeht, daß aber unter einer intensiven Immunsuppression diese Antwort verloren gehen kann. Zudem sind hohe IL-10 Konzentrationen nach spezifischer Stimulation mit einer ungünstigen Prognose der IA assoziiert. Somit scheint die erfolgreiche Kontrolle der invasiven Aspergillose mit einer T<sub>H</sub>1-Antwort zu korrelieren (Abb. 13, Patient #37), während ein tödlicher Verlauf der Infektion mit einem niedrigen Stimulations-Index (Abb. 13, Patient #45) und einem T<sub>H</sub>2-Zytokinmuster (Abb. 13, Patienten #40 und #2) verbunden war.

**Abb. 13:**

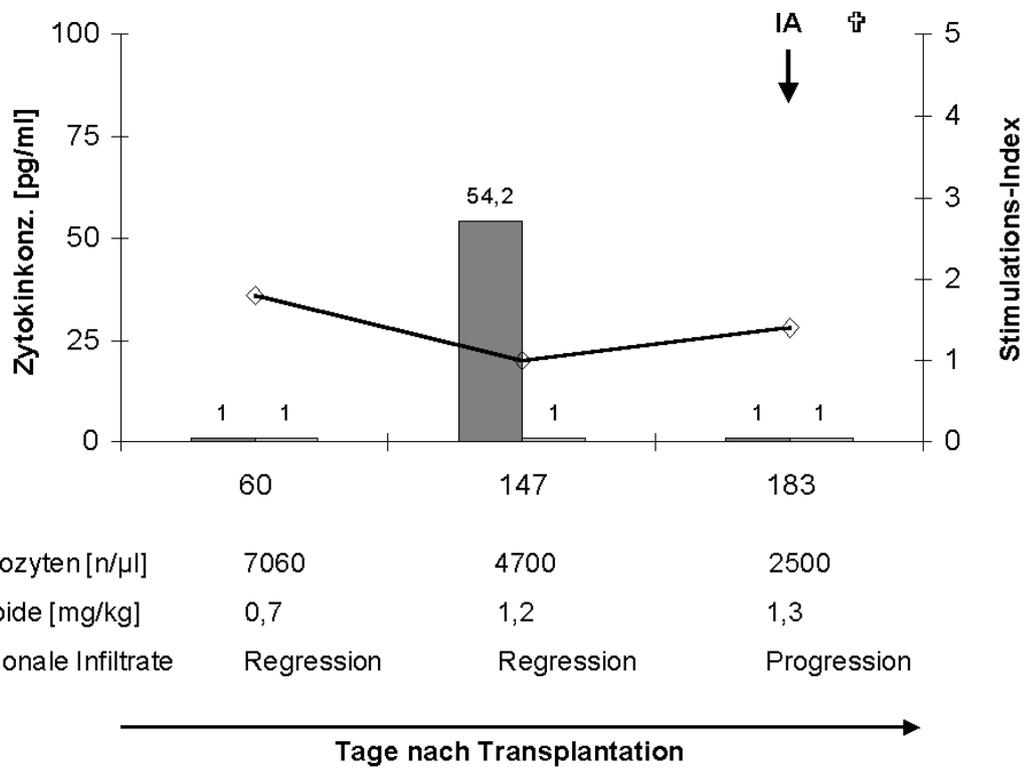
Pat. #37



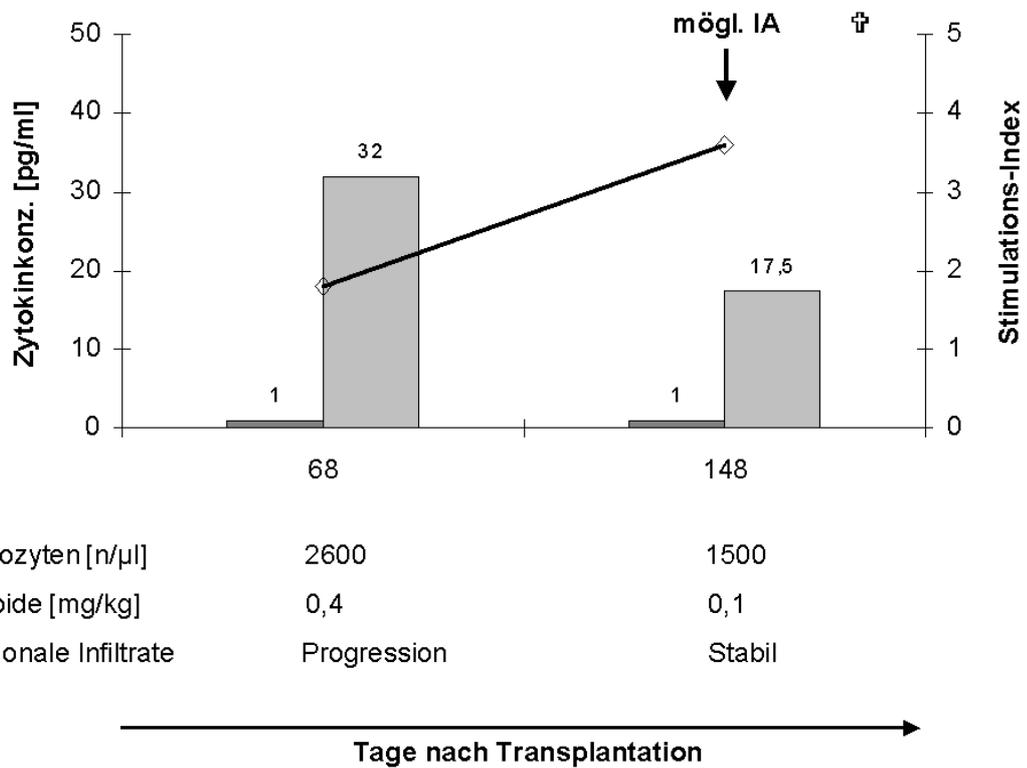
Leukozyten [n/μl]	3300	5200	5000
Steroide [mg/kg]	0	0,7	0,16
Pulmonale Infiltrate	Stabil	Regression	Regression

→  
Tage nach Transplantation

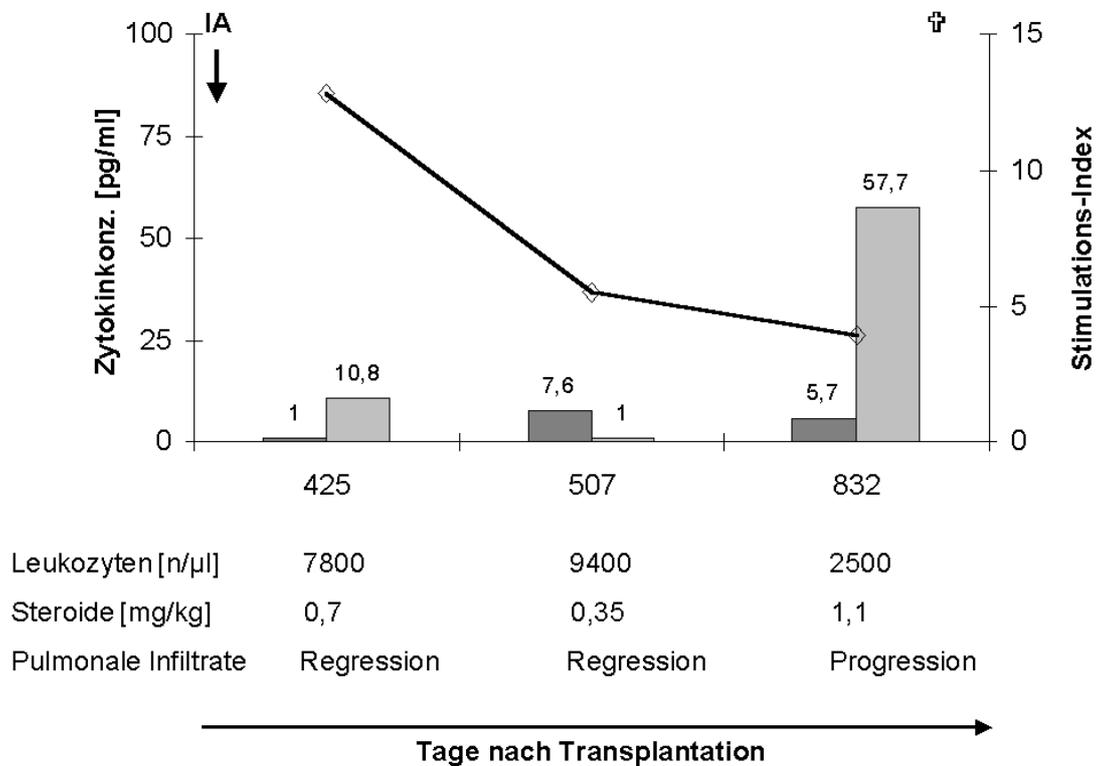
Pat. #45



Pat. #2



Pat. #40



**Abb. 13** stellt eine Längsschnittanalyse der Aspergillus-spezifischen T-Zellantworten von 4 Patienten mit IA nach allogener SZT dar. Die Langzeitkontrolle der IA war mit einer positiven Lymphoproliferation auf EC SAB und einer dominanten Sekretion von IFN- $\gamma$  assoziiert (Patient #37), während ein niedriger SI (Patient #45) und/oder eine dominante Freisetzung von IL-10 (Patienten #2 und #40) mit einer Ausbreitung der IA nach allogener SZT und einem tödlichen Verlauf in Verbindung stand.

-◇-, Stimations-Index; dunkelgraue Balken: IFN- $\gamma$ ; hellgraue Balken: IL-10

---

## 4 Diskussion

In den letzten ein bis zwei Jahrzehnten wurde ein bedeutender Wandel in der Epidemiologie der invasiven Aspergillose beobachtet. Während in früheren Jahren diese verheerende Erkrankung fast nur bei hämatologischen Patienten mit einer lang andauernden Neutropeniephase diagnostiziert wurde, wird die invasive Aspergillose mittlerweile mit zunehmender Häufigkeit bei nicht-neutropenischen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (Wald et al., 1997), bei Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion (Denning et al., 1991) und bei schwerkranken Neugeborenen (Groll et al., 1998) registriert. Die Übertragung von Sporen in der Luft gilt als Hauptinfektionsweg (Latgé, 1999). Einige Patienten sind offensichtlich besiedelt, ohne eine invasive Erkrankung zu entwickeln, bei anderen bleibt die Infektion entweder auf die Lunge begrenzt oder sie breitet sich in sämtliche Organe weiter aus und *Aspergillus fumigatus* kann bei der Obduktion in fast allen Geweben gefunden werden (Groll et al., 1996).

Die Pathophysiologie der invasiven Aspergillose, besonders bei nicht-neutropenischen Patienten, und die Rolle, die die Zytokine dabei spielen, ist noch nicht vollständig verstanden. Anerkannte Risikofaktoren für eine invasive Aspergillose sind Defekte in der Funktion von Makrophagen (Morgenstern et al., 1997), eine durch Kortikosteroide induzierte Suppression der Makrophagenfunktion (Palmer et al., 1991; Schaffner et al., 1982; Schaffner et al., 1985) sowie die lang andauernde Neutropenie (Gerson et al., 1984). Die immunsuppressive Therapie mit Kortikosteroiden verursacht im Mausmodell einen letalen Verlauf der pulmonalen invasiven Aspergillose. Zwischen mit Steroiden immunsupprimierten und immunkompetenten Mäusen haben Duong et al. (1998) große Unterschiede in der Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowie in der Expression proinflammatorischer Zytokine beobachtet. In einer kürzlich publizierten Analyse zeigte sich bei Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation eine höhere Inzidenz der invasiven Aspergillose im Vergleich zu Patienten nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation (Storek et

---

al., 2001). Der einzige Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand in einer schnelleren T-Zellrekonstitution nach der Transplantation peripherer Blutstammzellen, was auf eine mögliche Rolle der T-Zellen in der Kontrolle von Pilzinfektionen hinweist.

Die Dysregulation der Zytokinsekretion wurde als ein wichtiger Risikofaktor bei Patienten mit einer HIV-Infektion festgestellt (Clerici und Shearer, 1994). Im Mausmodell der invasiven pulmonalen Aspergillose war die Kontrolle der Infektion assoziiert mit IFN- $\gamma$  produzierenden interstitiellen Lymphozyten der Lunge und mit einer vermehrten Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Cenci et al., 1998, Cenci et al., 1999, Mehrad et al., 1999) und IL-12 (Cenci et al., 1999). Eine dominierende Freisetzung von T<sub>H</sub>2-Zytokinen von interstitiellen Lymphozyten der Lunge konnte bei Mäusen mit einer progredienten Infektion dokumentiert werden. Die Rolle einer T<sub>H</sub>1-vermittelten Resistenz gegen die invasive Aspergillose konnte experimentell durch die Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-10 sowie in IL-4 und IL-10 defizienten Versuchstieren untermauert werden (Cenci et al., 1999; Clemons et al., 2000). Ein protektiver Effekt einer *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T<sub>H</sub>1-Antwort wurde bei Tieren dokumentiert, die mit *A. fumigatus*-Konidien in einer niedrigen Dosis sensibilisiert worden waren und bei nachfolgender Exposition mit einer tödlichen Dosis des Erregers, bei nach Sensibilisierung dokumentierter T<sub>H</sub>1-Antwort, die Infektion überlebten (Cenci et al., 1998; Cenci et al., 1999). Auch von Nagai et al. (1995) wurde gezeigt, daß IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine relevante Rolle in der Kontrolle der invasiven Aspergillose spielen, da alle mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien infizierten, sowohl immunkompetenten als auch immunsupprimierten Mäuse, die mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  therapiert worden waren, überlebten. Im Gegensatz dazu betrug die Mortalität 40% - 80% bei den infizierten, immunsupprimierten Mäusen, die mit anti-IFN- $\gamma$ - oder anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern behandelt wurden. Die Behandlung immunkompetenter Mäuse mit einem Kulturextrakt von *Aspergillus fumigatus* führte zur Ausbildung einer protektiven T<sub>H</sub>1-Gedächtnis-Antwort, vermittelt durch *Aspergillus fumigatus*-spezifische IFN- $\gamma$  und IL-2 produzierende CD4+ T-Zellen, die in der Lage waren, im Maustransplantationsmodell einen

---

Schutz gegen die Ausbildung einer invasiven Aspergillose nach adoptivem Transfer auf naive Empfängertiere zu übertragen (Cenci et al., 2000).

Basierend auf diesen klinischen Beobachtungen und experimentellen Ergebnissen wurde im Rahmen dieser Arbeit die *A. fumigatus*-spezifische T-Zellantwort bei gesunden Probanden, bei immunsupprimierten hämatologischen Patienten mit klinischen Zeichen der invasiven Aspergillose und bei nicht-neutropenischen Patienten spät (>100 Tage) nach allogener SZT analysiert. Die Mehrzahl der gesunden Versuchspersonen zeigte eine positive Lymphoproliferation auf das native, zelluläre Extrakt von *A. fumigatus* (EC SAB), und auch die PBMC der meisten Patienten ließen sich damit gut stimulieren. Um die Spezifität dieser Messungen zu untermauern, wurde die Konzentrationsabhängigkeit aufgezeigt. Deshalb wurde in separaten Versuchsreihen die, für verschiedene Proteingemische nötige, Optimalkonzentration bestimmt. Diese lag sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten für EC SAB bei einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml. EC SAB war in dieser Studie das effektivste Antigen, um eine Aspergillus-spezifische T-Zellproliferation zu induzieren. EC EXL, ein weiteres natives, zelluläres Antigengemisch von *Aspergillus fumigatus*, führte bei ungefähr der Hälfte aller untersuchten gesunden und kranken Probanden zu einer Lymphoproliferation. Aber auch mit den beiden nativen, sezernierten, extrazellulären Antigenpräzipitaten PP SAB und PP EXL ließen sich T-Zellantworten erzielen. Die hitzeinaktivierten *A. fumigatus*-Konidien induzierten bei gesunden Probanden, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Graziutti et al. (1997), eine gute Lymphoproliferation bei einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Konidien/ml.

Um immunogene Determinanten von *A. fumigatus* weiter einzuengen, wurden verschiedene rekombinante Proteine analysiert. Wie die nativen *Aspergillus fumigatus*-Antigengemische, riefen auch rekombinante Proteine von *Aspergillus fumigatus* unterschiedlich gute Proliferationsantworten hervor. Die PBMC von fast allen gesunden Probanden beispielsweise reagierten positiv auf die Stimulation mit 5 µg Protein/ml der rekombinanten Catalase Cat 19.

---

Neben der Catalase (90 kDa) gilt die Dipeptidylpeptidase V, DPP V (88 kDa), als eines der beiden Hauptantigene, die für die Diagnose der Aspergillose angewandt werden (Beauvais et al., 1997). Diese beiden Antigene werden von Antikörpern in Seren von Patienten mit Aspergillomen erkannt (Kobayashi et al., 1993; López-Medrano et al., 1995; López-Medrano et al., 1996; Sarfati et al., 1995). Zudem wurde kürzlich gezeigt, daß Mäuse, die intranasal mit Konidien immunisiert wurden, eine spezifische, polyklonale Antikörperantwort sowohl gegen DPP V als auch gegen die Catalase entwickelten (Latgé, unpublished data).

Interessanterweise ließen sich in dieser Studie (Humanmodell) lediglich 4 von 16 gesunden Probanden mit DPP V stimulieren. Noch weitaus drastischer sah es bei den Patienten aus. Von 22 Patienten zeigte nur ein einziger eine positive Lymphoproliferation auf DPP V. Insgesamt wurden drei verschiedene Chargen von DPP V ausgetestet (Daten nicht gezeigt), die keine Unterschiede aufwiesen.

Das Ausbleiben einer guten lymphoproliferativen Reaktion der PBMC nach Stimulation mit diesem rekombinanten Protein war überraschend. Es ist unwahrscheinlich, daß die untersuchten Konzentrationen außerhalb des optimalen Bereichs lagen, um eine lymphoproliferative Antwort zu erzeugen, da 5 µg Protein/ml bei den anderen untersuchten rekombinanten Proteinen, wie der Catalase oder der Superoxid Dismutase, eine sehr gute Antwort induzierten. Daraus ist zu schließen, daß DPP V im Menschen kein immundominantes T-Zellantigen darstellt. Die übrigen rekombinanten Proteine wurden an kleinen Stichproben untersucht, so daß hier keine abschließende Bewertung möglich ist.

Im Gegensatz zu den reinen, rekombinanten Proteinen ist bei den nativen Antigenmischungen, die eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine enthalten, die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß Epitope dabei sind, die eine spezifische T-Zellantwort stimulieren.

In allen Fällen, in denen PHA als TCR-unspezifische Positivkontrolle mituntersucht worden war, zeigte die PBMC-Kultur von gesunden Probanden unter

---

PHA positive Proliferationsergebnisse. Bei einigen Patienten hingegen vermehrten sich die Zellen zum Teil nach Stimulation mit PHA nicht wesentlich, was auf Funktionsdefizite der T-Zellen, beispielsweise infolge Immunsuppression durch Chemotherapeutika oder Kortikosteroide im Rahmen einer GvHD, zurückzuführen ist.

Mit selektionierten T-Zellen konnte gezeigt werden, daß sich die Population der CD4+ T-Zellen in Anwesenheit von bestrahlten, autologen PBMC sehr gut mit EC SAB stimulieren ließ. PBMC wiesen im Vergleich zu der selektionierten CD4+ T-Zellkultur eine niedrigere, aber dennoch gute Proliferation auf, CD8+ T-Zellen und CD4-CD8- T-Zellen proliferierten hingegen nur gering.

Im Laufe der mehrwöchigen Kultivierung von T-Zelllinien mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Proteinen stieg der Anteil der CD4+ T-Zellen stark an, während die Fraktion der CD8+ T-Zellen abnahm. Die Spezifität der Linien konnte jedoch letztendlich nicht geklärt werden, da in den Proliferationsassays nach zehntägiger Induktion und in den nachfolgenden Proliferationsassays nach längerer Kultivierung der T-Zelllinien, kein spezifischer <sup>3</sup>H-Thymidineinbau nachweisbar war. Hier ist im weiteren eine Optimierung der Kultur- und der Readoutsysteme erforderlich.

Die Messung der Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und IL-10, die in die Kulturüberstände nach spezifischer Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenen sezerniert wurden, deutet auf eine Immunantwort vom T<sub>H</sub>1-Typ hin. Leider waren die ELISA-Kits für IL-4 nicht sensitiv genug, womit die Ergebnisse zusätzlich hätten bestärkt werden können. Die Patienten mit klinischen Zeichen einer invasiven Aspergillose, bei denen es gelang, die Infektion mit einer antimykotischen Therapie erfolgreich zu kontrollieren, zeichneten sich durch eine positive *Aspergillus fumigatus*-spezifische Lymphoproliferation aus. Ferner zeigte sich ein hohes Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 in den Kulturüberständen nach spezifischer Stimulation mit dem zellulären Extrakt EC SAB von *Aspergillus fumigatus*. Die Patienten mit einer stabilen oder progredienten IA hingegen wiesen ein niedrigeres Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 in den Kulturüberständen (P=0,04) auf. Interessanterweise verstarben schließlich 2 der 7 Patienten, die

---

anfangs eine Besserung der IA unter antimykotischer Therapie gezeigt hatten, an einer disseminierten IA. Beide Patienten hatten aufgrund einer GvHD eine verlängerte Phase der Immunsuppression im Anschluß an eine allogene SZT durchgemacht.

Diese Daten untermauern die Ergebnisse der Beobachtungen im Mausmodell zur invasiven Aspergillose, daß eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort eine wichtige Rolle spielt für die Kontrolle einer invasiven Aspergillose bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien. Ein tödlicher Verlauf der Infektion war mit einem niedrigen Stimulations-Index und einem T<sub>H</sub>2-Zytokinmuster assoziiert.

Bestärkt werden die Daten dieser Studie durch die neuesten Forschungsergebnisse von Bozza et al. (2003), die die Fähigkeit von dendritischen Zellen (DCs), die entweder mit lebenden *Aspergillus fumigatus*-Bestandteilen oder mit deren Pilz-RNA aktiviert worden waren, untersucht hatten, eine antimykotische Immunität *in vivo* zu generieren. Es zeigte sich, daß sowohl humane als auch DCs von Mäusen, die mit lebenden Pilzen gepulst oder mit Aspergillus-RNA transfiziert worden waren, eine funktionelle Reifung durchmachten, was anhand der vermehrten Expression des MHC-Klasse-II-Antigens, kostimulierender Moleküle sowie der Produktion von IL-12 als Reaktion auf *Aspergillus fumigatus*-Konidien oder deren RNA bestätigt wurde. Mit Konidien gepulste oder mit Konidien-RNA transfizierte DCs aktivierten Antigen-spezifische, IFN- $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten *in vitro* und *in vivo*. Die auf der Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-abhängigen Immunantwort beruhende antimykotische Resistenz konnte auch in Mäusen nach allogener Knochenmarktransplantation induziert werden und war mit einer schnelleren Erholung myeloischer und lymphatischer Zellen assoziiert. Die Wirksamkeit der Infusion von DCs, die mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien aktiviert worden waren, weist auf das Potential einer DC-Vakzine bei hämatologischen Patienten nach Stammzelltransplantation und Knochenmarktransplantation zur Prävention einer invasiven Aspergillose hin.

Haupttrisikofaktoren für eine invasive Aspergillose nach allogener Stammzelltransplantation sind eine verlängerte Neutropeniephase, eine akute oder chronische Graft-versus-Host Erkrankung sowie die Behandlung mit Kortiko-

---

steroiden (Wald et al., 1997). In dieser Studie zeigte sich, daß eine niedrige lymphoproliferative Antwort auf *Aspergillus fumigatus*-Antigene mit einer Kortikosteroidbehandlung und einer geringen Sekretion von IFN- $\gamma$  in die Kulturüberstände nach spezifischer Stimulation assoziiert ist. Patienten mit einer progredienten invasiven Aspergillose demonstrierten trotz einer positiven lymphoproliferativen Antwort auf *Aspergillus fumigatus*-Antigene entweder ein niedriges Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 oder eine sehr geringe Freisetzung beider Zytokine. Aus diesen Untersuchungen ist zu schließen, daß die Unterdrückung der *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T<sub>H</sub>1-Antwort nach allogener Stammzelltransplantation während einer Graft-versus-Host Erkrankung und der damit verbundenen Kortikosteroidbehandlung einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung und Progression einer invasiven Aspergillose darstellt. In Analogie zu den Ergebnissen dieser Studie zeigten Roilides et al. (2001), daß nicht-neutropenische Patienten mit einem günstigen Verlauf der IA niedrige IL-10 Werte und Patienten mit einer progredienten invasiven Aspergillose hohe IL-10 Werte in Serumproben aufwiesen.

Patienten, die eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten, sind nicht in der Lage, früh nach Transplantation eine Antigen-spezifische T-Zellantwort auszubilden (Velardi et al., 1988). Es wurde gezeigt, daß die T-Zelldepletion bei allogenen Stammzelltransplantationen mit einer langsamen Rekonstitution von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert ist (Roux et al., 1996). In einer Studie von Pirsch und Maki (1986) stellte sich die T-Zelldepletion als bedeutender prädiktiver Faktor für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose bei transplantierten Patienten heraus. Die funktionelle Wiederherstellung des T-Zellsystems nach T-Zell-depletierter allogener Stammzelltransplantation wurde von Roux et al. (1996) und Verfuerrth et al. (2000) untersucht. Verschiedene Forschungsgruppen haben eine Verlagerung von früh zu spät auftretender invasiver Aspergillose nach konventioneller hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit myeloablativer Konditionierungstherapie beschrieben. Dafür verantwortlich sind kürzere Neutropeniephasen nach Stammzelltransplantation, der Einsatz von peripheren Blutstammzellen sowie die Verabreichung

---

hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (Jantunen et al., 1997; Baddley et al., 2001; Grow et al., 2002; Marr et al., 2002; Martino et al., 2002). Die Ergebnisse der Studie von Fukuda et al. (2003) betonen ebenfalls das Risiko von spät auftretenden Schimmelpilzinfektionen (mittlerer Infektionsbeginn am Tag 107) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit nicht-myeloablativer Konditionierungstherapie. Das späte Auftreten der invasiven Aspergillose nach nicht-myeloablativer Konditionierungstherapie beruht auf einer Kombination von verschiedenen Faktoren, wie einer kurzen Neutropeniephase, Kontrolle der Infektion durch eine Restimmunität des Wirts (initial gemischter Chimerismus), verspätet einsetzende akute GvHD und konsekutive Kortikosteroidtherapie sowie die spät auftretende CMV-Infektion (McSweeney et al., 2001; Junghanss et al., 2002; Mielcarek et al., 2002; Niederwieser et al., 2003).

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der späten Infektion nach allogener Stammzelltransplantation wurde in dieser Studie die *Aspergillus fumigatus*-spezifische T-Zellrekonstitution spät (Median: 134 Tage) nach allogener SZT bei 18 Patienten im Vergleich zur Immunrekonstitution auf ein bakterielles (Tetanus-Toxoid) und ein virales Antigen (CMV) untersucht. Im Gegensatz zu den CMV- und TT-spezifischen T-Zellantworten, war die *Aspergillus*-spezifische T-Zellrekonstitution durch einen niedrigen Stimulations-Index und ein geringes IFN- $\gamma$ /IL-10 Verhältnis charakterisiert, was vermutlich zu dem verlängerten Risiko für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose in dieser Patientengruppe beiträgt. Interessanterweise erkrankten 3 der 4 Patienten, die eine *Aspergillus fumigatus*-spezifische Lymphoproliferation nach Transplantation gezeigt hatten, an einer invasiven Aspergillose nach Transplantation (n=2) oder hatten bereits vor der Transplantation eine positive Anamnese für eine IA. Dies deutet an, daß die Antigenreexposition nach Stammzelltransplantation für die Rekonstitution der *Aspergillus fumigatus*-spezifischen Lymphoproliferation von Bedeutung ist. Es verstarb jedoch keiner der 4 Patienten an dieser Infektion. Alle 4 Patienten waren CMV-seropositiv und zeigten auch auf das CMV-Antigen bereits wieder eine positive T-Zellantwort. Daraus ist zu schließen, daß diese 4

---

Patienten durch die erfolgreiche Immunrekonstitution spät nach allogener SZT in der Lage waren, einen gewissen Schutz vor dieser opportunistischen Infektion auszubilden.

---

## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde gezeigt, daß humane Lymphozyten gesunder und kranker Probanden mit invasiver Aspergillose auf verschiedene sowohl native als auch rekombinante *A. fumigatus*-Antigene *in vitro* unterschiedlich gut reagieren. Dies zeigte sich durch Aktivierung, Proliferation und die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Bei 3 Probanden konnte nach Selektionierung der PBMC in CD4+ und CD8+ T-Zellfraktionen nachgewiesen werden, daß die Subpopulation der CD4+ T-Helferzellen für die Lymphoproliferation nach Stimulation mit dem Antigengemisch EC SAB verantwortlich war. Ananolg zu diesen Ergebnissen ließ sich bei den Versuchen zur Kultivierung *Aspergillus fumigatus*-spezifischer T-Zelllinien mit rekombinanten Proteinen eine starke Zunahme der CD4+ T-Zellen und parallel dazu eine deutliche Abnahme der CD8+ T-Zellen in der Lymphozytenkultur nach rezidivierenden Stimulationen verzeichnen.

Während gesunde Versuchspersonen eine Lymphozytenantwort vom T<sub>H</sub>1-Typ mit einem hohen Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 gezeigt haben und Patienten mit regredienter invasiver Aspergillose unter antimykotischer Therapie ebenfalls eine Dominanz von IFN- $\gamma$  gegenüber IL-10 aufwiesen, zeigten Patienten mit progredientem Verlauf niedrige IFN- $\gamma$ - und hohe IL-10-Serumspiegel im Sinne einer T<sub>H</sub>2-Antwort.

Diese Daten untermauern die Hypothese, daß T-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen zur Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus* grundlegend beitragen. In der Zukunft kann eine detailliertere Analyse der *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T-Zellantwort helfen, neue antimykotische Behandlungsstrategien zu entwickeln. Beispiele wären die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen, die Hemmung von IL-10 *in vivo* oder der adoptive Transfer *Aspergillus*-spezifischer T<sub>H</sub>1-Zellen bei Hochrisikopatienten für eine invasive Aspergillose wie zum Beispiel bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.

Als nächster Schritt für die Analyse der *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T-Zellimmunität wäre es sinnvoll, Epitop-Sequenzen von *A. fumigatus* für

---

MHC-Klasse-II-Moleküle zu bestimmen, die für immuntherapeutische Ansätze von großem Interesse wären.

---

## 6 Literaturangaben

1. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996)  
Functional diversity of helper T lymphocytes  
*Nature* 383, 787-793
2. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1997)  
Cellular and Molecular Immunology  
3. Aufl., Saunders Text and Review Series
3. Addrizzo-Harris, D.J., Harkin, T.J., McGuinness, G., Naidich, D.P., Rom, W.N. (1997)  
Pulmonary Aspergilloma and AIDS. A comparison of HIV-infected and HIV-negative individuals.  
*Chest* 111, 612-618
4. Agarwal, S., Rao, A. (1998)  
Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation  
*Immunity* 9, 765-775
5. Almerigogna, F., D'Elia, M.M., De Carli, M., Del Prete, G. (1996)  
Markers of Th1 and Th2 cells  
*Chem Immunol* 63, 30-50
6. Andriole, V.T. (1993)  
Infections with *Aspergillus species*  
*Clin Infect Dis* 17, S481-S486
7. Apasov, S., Redegeld, F., Sitkovsky, M. (1993)  
Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors  
*Curr Opin Immunol* 5, 404-410
8. Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A.E., Fox, J.W., Chapman, M.D. (1990)  
*Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins  
*J Exp Med* 172, 1529-1532
9. Ascioğlu, S., Rex, J.H., De Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D.W., Donnelly, P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, J., Maertens, J., Meis, J.F., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J. (2002)  
Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus  
*Clin Infect Dis* 34, 7-14

- 
10. Baddley, J.W., Stroud, T.P., Salzman, D., Pappas, P.G. (2001)  
Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients  
*Clin Infect Dis* 32, 1319-1324
  11. Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., Kobayashi, H., Latgé, J.P. (1997)  
Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*  
*J Biol Chem* 272, 6238-6244
  12. Beck-Sagué, C.M., Jarvis, W.R., National Nosocomial Infections Surveillance System. (1993)  
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990  
*J Infect Dis* 167, 1247-1251
  13. Bennett, J.E. (1995)  
Aspergillose, 1029-1030  
in: Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S., Kasper, D.L.: *Harrisons Innere Medizin* 1; 13. Aufl., Schmailzl, K.J.G.; Blackwell Wissenschafts-Verlag
  14. Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C.R., Reiner, S.L. (1998)  
Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle  
*Immunity* 9, 229-237
  15. Bodey, G., Buelmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., Mall, G., Martino, P., Meunier, F., Milliken, S., Naoe, S., Okudaira, M., Scevola, D., Van't Wout, J. (1992)  
Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey  
*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 99-109
  16. Bodey, G.P., Vartivarian, S. (1989)  
Aspergillosis  
*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8, 413-437
  17. Boon, A.P., O'Brien, D., Adams, D.H. (1991)  
10 year review of invasive aspergillosis detected at necropsy  
*J Clin Pathol* 44, 452-454

- 
18. Bozza, S., Perruccio, K., Montagnoli, C., Gaziano, R., Bellocchio, S., Burchielli, E., Nkwanyuo, G., Pitzrra, L., Velardi, A., Romani, L. (2003)  
A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation  
Blood, prepublished online June 5, 2003
  19. Brajtburg, J., Bolard, J. (1996)  
Carrier effects on biological activity of Amphotericin B  
Clin Microbiol Rev 9, 512-531
  20. Braud, V., Jones, E.Y., McMichael, A. (1997)  
The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9  
Eur J Immunol 27, 1164-1169
  21. Braud, V.M., Allan, D.S.J., O'Callaghan, C.A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L., McMichael, A.J. (1998)  
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C  
Nature 391, 795-799
  22. Bromley, I.M.J., Donaldson, K. (1996)  
Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung  
Thorax 51, 1203-1209
  23. Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1993)  
Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1  
Nature 364, 33-39
  24. Caillot, D., Casasnovas, O., Bernard, A., Couaillier, J.F., Durand, C., Cuisenier, B., Solary, E., Piard, F., Petrella, T., Bonnin, A., Couillault, G., Dumas, M., Guy, H. (1997)  
Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery  
J Clin Oncol 15, 139-147

- 
25. Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeauvais, J.P., Diaquin, M., López-Medrano, R., Leal, F., Latgé, J.P. (1997)  
Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*  
*Infect Immun* 65, 4718-4724
  26. Cenci, E., Perito, S., Enssle, K.H., Mosci, P., Latgé, J.P., Romani, L., Bistoni, F. (1997)  
Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis  
*Infect Immun* 65, 564-570
  27. Cenci, E., Mencacci, A., Fè d'Ostiani, C., Del Sero, G., Mosci, P., Montagnoli, C., Bacci, A., Romani, L. (1998)  
Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis  
*J Infect Dis* 178, 1750-1760
  28. Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Fè d'Ostiani, C., Mosci, P., Bachmann, M., Bistoni, F., Kopf, M., Romani, L. (1999)  
Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses  
*J Infect Dis* 180, 1957-1968
  29. Cenci, E., Mencacci, A., Bacci, A., Bistoni, F., Kurup, V.P., Romani, L. (2000)  
T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis  
*J Immunol* 165, 381-388
  30. Chauhan, B., Knutsen, A.P., Hutcheson, P.S., Slavin, R.G., Bellone, C.J. (1996)  
T cell subsets, epitope mapping, and HLA-restriction in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis  
*J Clin Invest* 97, 2324-2331
  31. Chauhan, B., Santiago, L., Kirschmann, D.A., Hauptfeld, V., Knutsen, A.P., Hutcheson, P.S., Woulfe, S.L., Slavin, R.G., Schwartz, H.J., Bellone, C.J. (1997)  
The association of HLA-DR alleles and T cell activation with allergic bronchopulmonary aspergillosis  
*J Immunol* 159, 4072-4076

- 
32. Chazalet, V., Debeaupuis, J.P., Sarfati, J., Lortholary, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Thien, H.V., Gluckman, E., Brücker, G., Latgé, J.P. (1998)  
Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings  
J Clin Microbiol 36, 1494-1500
  33. Clemons, K.V., Grunig, G., Sobel, R.A., Mirels, L.F., Rennick, D.M., Stevens, D.A. (2000)  
Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis  
Clin Exp Immunol 122, 186-191
  34. Clerici, M., Shearer, G.M. (1994)  
The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights  
Immunol Today 15, 575-581
  35. Cohen, J., Denning, D.W., Viviani, M.A. (1993)  
Epidemiology of invasive aspergillosis in European cancer centres. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12, 392-393
  36. Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., Bottomly, K. (1995)  
Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells  
J Exp Med 182, 1591-1596
  37. Constant, S., Bottomly, K. (1997)  
Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches  
Annu Rev Immunol 15, 297-322
  38. De Pauw, B.E. (1997)  
Practical modalities for prevention of fungal infections in cancer patients  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16, 32-41
  39. DeHart, D.J., Agwu, D.E., Julian, N.C., Washburn, R.G. (1997)  
Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes  
J Infect Dis 175, 146-150

- 
40. Denning, D.W., Follansbee, S.E., Scolaro, M., Norris, S., Edelstein, H., Stevens, D.A. (1991)  
Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome  
N Engl J Med 324, 654-662
  41. Denning, D.W. (1996)  
Therapeutic outcome in invasive aspergillosis  
Clin Infect Dis 23, 608-615
  42. Denning, D.W. (1998)  
Invasive Aspergillosis  
Clin Infect Dis 26, 781-805
  43. Diehl, M., Münz, C., Keilholz, W., Stevanovic, S., Holmes, N., Loke, Y.W., Rammensee, H.G. (1996)  
Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters  
Curr Biol 6, 305-314
  44. Duong, M., Ouellet, N., Simard, M., Bergeron, Y., Olivier, M., Bergeron, M.G. (1998)  
Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice  
J Infect Dis 178, 1472-1482
  45. Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C.A., Bowden, R.A., van Burik, J.A., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. (1997)  
Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes  
J Clin Microbiol 35, 1353-1360
  46. Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C.E., Quintana, L., Starnes, S.M., Schatzman, R.C., Brunke, K.J., Drayna, D.T., Risch, N.J., Bacon, B.R., Wolff, R.K. (1996)  
A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis  
Nat Genet 13, 399-408

- 
47. Ferrari, G., Knight, A.M., Watts, C., Pieters, J. (1997)  
Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules  
*J Cell Biol* 139, 1433-1446
  48. Fitch, F.W., McKisic, M.D., Lancki, D.W., Gajewski, T.F. (1993)  
Differential regulation of murine T lymphocyte subsets  
*Annu Rev Immunol* 11, 29-48
  49. Fukuda, T., Boeckh, M., Carter, R.A., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Maloney, D.G., Martin, P.J., Storb, R.F., Marr, K.A. (2003)  
Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning  
*Blood* 102, 827-833
  50. Gerson, S.L., Talbot, G.H., Hurwitz, S., Strom, B.L., Lusk, E.J., Cassileth, P.A. (1984)  
Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia  
*Ann Intern Med* 100, 345-351
  51. Gilbert, K.M., Rothermel, A.L., Ernst, D.N., Hobbs, M.V., Weigle, W.O. (1992)  
Ability of tolerized Th1 and Th2 clones to stimulate B cell activation and cell cycle progression  
*Cell Immunol* 142, 1-15
  52. Graziutti, M.L., Rex, J.H., Cowart, R.E., Anaissie, E.J., Ford, A., Savary, C.A. (1997)  
*Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response  
*J Infect Dis* 176, 1579-1583
  53. Groll, A.H., Shah, P.M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Nuebling, G., Huebner, K. (1996)  
Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital  
*J Infect* 33, 23-32
  54. Groll, A.H., Jaeger, G., Allendorf, A., Herrmann, G., Schloesser, R., von Loewenich, V. (1998)  
Invasive pulmonary aspergillosis in a critically ill neonate: case report and review of invasive aspergillosis during the first 3 months of life  
*Clin Infect Dis* 27, 437-452

- 
55. Grow, W.B., Moreb, J.S., Roque, D., Manion, K., Leather, H., Reddy, V., Khan, S.A., Finiewicz, K.J., Nguyen, H., Clancy, C.J., Mehta, P.S., Wingard, J.R. (2002)  
Late onset of invasive *Aspergillus* infection in bone marrow transplant patients at a university hospital  
*Bone Marrow Transplant* 29, 15-19
  56. Hamilton, A.J., Holdom, M.D., Hay, R.J. (1995)  
Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera  
*J Clin Microbiol* 33, 495-496
  57. Hearn, V.M., Wilson, E.V., Mackenzie, D.W.R. (1992)  
Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity  
*J Med Microbiol* 36, 61-67
  58. Hearn, V.M. (1992)  
Antigenicity of *Aspergillus* species  
*J Med Vet Mycol* 30, 11-25
  59. Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latgé, J.P., Einsele, H. (2002)  
Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematological malignancies  
*Blood* 100, 4521-4528
  60. Hebart, H., Dagainik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Loeffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.G., Einsele, H. (2002)  
Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- $\gamma$ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation  
*Blood* 99, 3830-3837
  61. Holdom, M.D., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (1996)  
The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase  
*Infect Immun* 64, 3326-3332
  62. Horvath, J.A., Dummer, S. (1996)  
The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis  
*Am J Med* 100, 171-178

- 
63. Hospenthal, D.R., Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1998)  
Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation  
*Med Mycol* 36, 165-168
64. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages  
*Science* 260, 547-549
65. Hunninghake, G.W., Richerson, H.B. (1995)  
Exogen-allergische Alveolitis und eosinophile Pneumonien, 1378-1382  
in: Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S., Kasper, D.L.: *Harrisons Innere Medizin* 1; 13. Aufl., Schmailzl, K.J.G.; Blackwell Wissenschafts-Verlag;
66. Igea, J.M., Cuevas, M., Marcos, C., Lázaro, C., Compaired, J.A., Sánchez-Cano, M. (1993)  
IgG subclass response to *Aspergillus fumigatus*  
*Int Arch Allergy Immunol* 101, 277-282
67. Janeway, C.A., Travers, P. (1997)  
Immunologie  
2. Aufl., Spektrum, Akademischer Verlag
68. Jantunen, E., Ruutu, P., Niskanen, L., Volin, L., Parkkali, T., Koukila-Kahkola, P., Ruutu, T. (1997)  
Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients  
*Bone Marrow Transplant* 19, 801-808
69. Jenkins, M.K. (1994)  
The ups and downs of T cell costimulation  
*Immunity* 1, 443-446
70. Jensen, H.E., Stynen, D., Sarfati, J., Latgé, J.P. (1993)  
Detection of galactomannan and the 18 kDa antigen from *Aspergillus fumigatus* in serum and urine from cattle with systemic aspergillosis  
*J Vet Med Ser B* 40, 397-408

- 
71. Junghanss, C., Boeckh, M., Carter, R.A., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Maloney, D.G., Chauncey, T., McSweeney, P.A., Little, M.T., Corey, L., Storb, R. (2002)  
Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study  
*Blood* 99, 1978-1985
72. Kamogawa, Y., Minasi, L.A., Carding, S.R., Bottomly, K., Flavell, R.A. (1993)  
The relationship of IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells  
*Cell* 75, 985-995
73. Karim, M., Alam, M., Shah, A.A., Ahmed, R., Sheikh, H. (1997)  
Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts  
*Clin Infect Dis* 24, 723-733
74. Kauffman, H.F., van der Heide, S., Beaumont, F., Blok, H., de Vries, K. (1986)  
Class-specific antibody determination against *Aspergillus fumigatus* by means of the enzyme-linked immunosorbent assay III. Comparative study: IgG, IgA, IgM ELISA titers, precipitating antibodies and IgE binding after fractionation of the antigen  
*Int Arch Allergy Immunol* 80, 300-306
75. Kaufman, L., Standard, P.G., Jalbert, M., Kraft, D.E. (1997)  
Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies  
*J Clin Microbiol* 35, 2206-2209
76. Kelso, A., Groves, P., Troutt, A.B., Francis, K. (1995)  
Evidence for the stochastic acquisition of cytokine profile by CD4+ T cells activated in a T helper type 2-like response in vivo  
*Eur J Immunol* 25, 1168-1175
77. Khoo, S.H., Denning, D.W. (1994)  
Invasive aspergillosis in patients with AIDS  
*Clin Infect Dis* 19, S41-S48
78. Knutsen, A.P., Mueller, K.R., Levine, A.D., Chouhan, B., Hutcheson, P.S., Slavin, R.G. (1994)  
*Asp f I* CD4+ T<sub>H2</sub>-like T-cell lines in allergic bronchopulmonary aspergillosis  
*J Allergy Clin Immunol* 94, 215-221

- 
79. Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P., Bouchara, J.P., Latgé, J.P. (1993)  
An 88-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*  
*Infect Immun* 61, 4767-4771
  80. Krause, H., Hebart, H., Jahn, G., Müller, C.A., Einsele, H. (1997)  
Screening for CMV-specific T-cell proliferation to identify patients  
at risk of developing late onset CMV disease  
*Bone Marrow Transplant* 19, 1111-1116
  81. Kullberg, B.J. (1997)  
Trends in immunotherapy of fungal infections  
*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16, 51-55
  82. Kullberg, B.J., Anaissie, E.J. (1998)  
Cytokines as therapy for opportunistic fungal infections  
*Res Immunol* 149, 478-488
  83. Kurup, V.P., Kumar, A. (1991)  
Immunodiagnosis of Aspergillosis  
*Clin Microbiol Rev* 4, 439-456
  84. Lamy, B., Moutaouakil, M., Latgé, J.P., Davies, J. (1991)  
Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin,  
during human aspergillosis infections  
*Mol Microbiol* 5, 1811-1815
  85. Latgé, J.P., Moutaouakil, M., Debeaupuis, J.P., Bouchara, J.P., Haynes,  
K., Prévost, M.C. (1991)  
The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*  
*Infect Immun* 59, 2586-2594
  86. Latgé, J.P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., Sarfati, J.,  
Wieruszkeski, J.M., Parra, E., Bouchara, J.P., Fournet, B. (1994)  
Chemical and immunological characterization of the extracellular  
galactomannan of *Aspergillus fumigatus*  
*Infect Immun* 62, 5424-5433
  87. Latgé, J.P. (1995)  
Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*  
*Curr Top Med Mycol* 6, 245-281
  88. Latgé, J.P. (1999)  
*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis  
*Clin Microbiol Rev* 12, 310-350
  89. Latgé, J.P.  
Unpublished data.

- 
90. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., Paul, W.E. (1990)  
Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells  
*J Exp Med* 172, 921-929
  91. Levitz, S.M., Selsted, M.E., Ganz, T., Lehrer, R.I., Diamond, R.D. (1986)  
In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages  
*J Infect Dis* 154, 483-489
  92. Linsley, P.S., Clark, E.A., Ledbetter, J.A. (1990)  
T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5031-5035
  93. Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. (1991)  
Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation  
*J Exp Med* 173, 721-730
  94. Linsley, P.S., Ledbetter, J.A. (1993)  
The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen  
*Annu Rev Immunol* 11, 191-212
  95. Little, S.A., Longbottom, J.L., Warner, J.O. (1993)  
Optimized preparation of *Aspergillus fumigatus* extracts for allergy diagnosis  
*Clin Exp Allergy* 23, 835-842
  96. Lortholary, O., Meyohas, M.C., Dupont, B., Cadranel, J., Salmon-Ceron, D., Peyramond, D., Simonin, D., Centre d'Informations et de Soins de l'Immunodéficience Humaine de l'Est Parisien, f.t.F.C.S.G.o.A.i.A. (1993)  
Invasive Aspergillosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: report of 33 cases  
*Am J Med* 95, 177-187
  97. López-Medrano, R., Ovejero, M.C., Calera, J.A., Puente, P., Leal, F. (1995)  
An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase  
*Infect Immun* 63, 4774-4780

- 
98. López-Medrano, R., Ovejero, M.C., Calera, J.A., Puente, P., Leal, F. (1996)  
Immunoblotting patterns in the serodiagnosis of aspergilloma: antibody response to the 90 kDa *Aspergillus fumigatus* antigen  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15, 146-152
99. Madan, T., Arora, N., Sarma, P.U. (1997)  
Identification and evaluation of a major cytotoxin of *A. fumigatus*  
Mol Cell Biochem 167, 89-97
100. Madan, T., Eggleton, P., Kishore, U., Strong, P., Aggrawal, S.S., Sarma, P.U., Reid, K.B.M. (1997)  
Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages  
Infect Immun 65, 3171-3179
101. Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M.P., Ruggi, F.S., De Carli, M., Ricci, M., Romagnani, S. (1992)  
Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones  
J Immunol 148, 2142-2147
102. Marr, K.A., Carter, R.A., Boeckh, M., Martin, P., Corey, L. (2002)  
Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors  
Blood 100, 4358-4366
103. Martino, R., Subira, M., Rovira, M., Solano, C., Vazquez, L., Sanz, G.F., Urbano-Ispizua, A., Brunet, S., De la Camara, R.; alloPBSCT Infectious/Non-infectious Complications Subcommittees of the Grupo Espanol de Transplante Hematopoyetico (GETH) (2002)  
Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients  
Br J Haematol 116, 475-482
104. McSweeney, P.A., Niederwieser, D., Shizuru, J.A., Sandmaier, B.M., Molina, A.J., Maloney, D.G., Chauncey, T.R., Gooley, T.A., Hegenbart, U., Nash, R.A., Radich, J., Wagner, J.L., Minor, S., Appelbaum, F.R., Bensinger, W.I., Bryant, E., Flowers, M.E.D., Georges, G.E., Grumet, F.C., Kiem, H.P., Torok-Storb, B., Yu, C., Blume, K.G., Storb, R.F. (2001)  
Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects  
Blood 97, 3390-3400

- 
105. Mehrad, B., Strieter, R.M., Standiford, T.J. (1999)  
Role of TNF- $\alpha$  in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis  
*J Immunol* 162, 1633-1640
106. Mielcarek, M., Martin, P.J., Leisenring, W., Flowers, M.E.D., Maloney, D.G., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Storb, R. (2003)  
Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation  
*Blood* 102, 756-762
107. Monod, M., Paris, S., Sanglard, D., Jatton-Ogay, K., Bille, J., Latgé, J.P. (1993)  
Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*  
*Infect Immun* 61, 4099-4104
108. Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R. (1993)  
Interleukin-10  
*Annu Rev Immunol* 11, 165-190
109. Morgenstern, D.E., Gifford, M.A.C., Li, L.L., Doerschuk, C.M., Dinauer, M.C. (1997)  
Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*  
*J Exp Med* 185, 207-218
110. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. (1986)  
Two types of murine helper T cell clone  
*J Immunol* 136, 2348-2357
111. Moutaouakil, M., Monod, M., Prévost, M.C., Bouchara, J.P., Paris, S., Latgé, J.P. (1993)  
Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus in vitro* and *in vivo*  
*J Med Microbiol* 39, 393-399
112. Mouy, R., Fischer, A., Vilmer, E., Seger, R., Griscelli, C. (1989)  
Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease  
*J Pediatrics* 114, 555-560

- 
113. Nagai, H., Guo, J., Choi, H., Kurup, V. (1995)  
Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  protect mice from invasive aspergillosis  
*J Infect Dis* 172, 1554-1560
114. Niederwieser, D., Maris, M., Shizuru, J.A., Petersdorf, E., Hegenbart, U., Sandmaier, B.M., Maloney, D.G., Storer, B., Lange, T., Chauncey, T., Deininger, M., Ponisch, W., Anasetti, C., Woolfrey, A., Little, M.T., Blume, K.G., McSweeney P.A., Storb, R.F. (2003)  
Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases  
*Blood* 101, 1620-1629
115. O'Garra, A. (1998)  
Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets  
*Immunity* 8, 275-283
116. Palmer, L.B., Greenberg, H.E., Schiff, M.J. (1991)  
Corticosteroid treatment as a risk factor for invasive aspergillosis in patients with lung disease  
*Thorax* 46, 15-20
117. Pamer, E., Cresswell, P. (1998)  
Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing  
*Annu Rev Immunol* 16, 323-358
118. Paris, S., Boisvieux-Ulrich, E., Crestani, B., Houcine, O., Taramelli, L., Lombardi, L., Latgé, J.P. (1997)  
Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells  
*Infect Immun* 65, 1510-1514
119. Patel, R., Paya, C.V. (1997)  
Infections in solid-organ transplant recipients  
*Clin Microbiol Rev* 10, 86-124
120. Pathak, A., Pien, F.D., Carvalho, L. (1998)  
Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects  
*Clin Infect Dis* 26, 334-338

- 
121. Patterson, T.F. (1998)  
Editorial response: Approaches to therapy for invasive mycoses -  
the role of Amphotericin B  
*Clin Infect Dis* 26, 339-340
122. Paul, W.E., Seder, R.A., Plaut, M. (1993)  
Lymphokine and cytokine production by Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> cells  
*Adv Immunol* 53, 1-29
123. Pirsch, J.D., Maki, D.G. (1986)  
Infectious complications in adults with bone marrow transplanta-  
tion and T-cell depletion of donor marrow. Increased susceptibility  
to fungal infections  
*Ann Intern Med* 104, 619-631
124. Podack, E.R., Hengartner, H., Lichtenheld, M.G. (1991)  
A central role of perforin in cytolysis?  
*Annu Rev Immunol* 9, 129-157
125. Poynter, M.E., Mu, H.H., Chen, X.P., Daynes, R.A. (1997)  
Activation of NK1.1<sup>+</sup> T cells in vitro and their possible role in age-  
associated changes in inducible IL-4 production  
*Cell Immunol* 179, 22-29
126. Rammensee, H.G., Bachmann, J., Stevanovic, S. (1997)  
MHC-Ligands and Peptide Motifs  
(Austin, Texas: Landes Bioscience Publishers); Springer
127. Reiner, S.L., Seder, R.A. (1999)  
Dealing from the evolutionary pawnshop: how lymphocytes make  
decisions  
*Immunity* 11, 1-10
128. Riley, D.K., Pavia, A.T., Beatty, P.G., Petersen, F.B., Spruance, J.L.,  
Stokes, R., Evans, T.G. (1994)  
The prophylactic use of low-dose amphotericin B in bone marrow  
transplant patients  
*Am J Med* 97, 509-514
129. Ringdén, O., Tollemar, J., Dahilöf, G., Tydén, G. (1994)  
High cure rate of invasive fungal infections in immunocompromi-  
sed children using ambisome  
*Transplant Proc* 26, 175-177

- 
130. Roche, P.A., Cresswell, P. (1990)  
Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding  
*Nature* 345, 615-618
131. Rodriguez-Adrian, L.J., Graziutti, M.L., Rex, J.H., Anaissie, E.J. (1998)  
The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer: is recovery from neutropenia all that is needed?  
*Clin Infect Dis* 26, 1270-1278
132. Rogers, T.R. (1995)  
Epidemiology and control of nosocomial fungal infections  
*Curr Opin Infect Dis* 8, 287-290
133. Roilides, E., Dimitriadou, A., Kadiltsoglou, I., Sein, T., Karpouzas, J., Pizzo, P.A., Walsh, T.J. (1997)  
IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*  
*J Immunol* 158, 322-329
134. Roilides, E., Katsifa, H., Walsh, T.J. (1998)  
Pulmonary host defences against *Aspergillus fumigatus*  
*Res Immunol* 149, 454-465
135. Roilides, E., Sein, T., Roden, M., Schaufele, R.L., Walsh, T.J. (2001)  
Elevated serum concentrations of interleukin-10 in nonneutropenic patients with invasive aspergillosis  
*J Infect Dis* 183, 518-520
136. Romagnani, S. (1994)  
Lymphokine production by human T cells in disease states  
*Annu Rev Immunol* 12, 227-257
137. Rosin, H. (1992)  
Antibiotika und Chemotherapeutika; Antiinfektiöse Therapie  
Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie;  
6. Aufl., 679-688
138. Roux, E., Helg, C., Dumont-Girard, F., Chapuis, B., Jeannet, M., Roosenek, E. (1996)  
Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts  
*Blood* 87, 3984-3992

- 
139. Rowe, J.M. (1998)  
Treatment of acute myeloid leukemia with cytokines: effect on duration of neutropenia and response to infections  
*Clin Infect Dis* 26, 1290-1294
140. Salonen, J., Nikoskelainen, J. (1993)  
Lethal infections in patients with hematological malignancies  
*Eur J Haematol* 51, 102-108
141. Sarfati, J., Boucias, D.G., Latgé, J.P. (1995)  
Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced *in vivo*  
*J Med Vet Mycol* 33, 9-14
142. Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A. (1982)  
Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*  
*J Clin Invest* 69, 617-631
143. Schaffner, A. (1985)  
Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to  $\gamma$ -interferon  
*J Clin Invest* 76, 1755-1764
144. Schild, H., Rammensee, H.G. (2000)  
Perfect use of imperfection  
*Nature* 404, 709-710
145. Seder, R.A., Kelsall, B.L., Jankovic, D. (1996)  
Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease  
*J Immunol* 157, 2745-2748
146. Severens, J.L., Donnelly, J.P., Meis, J.F.G.M., De Vries Robbé, P.F., De Pauw, B.E., Verweij, P.E. (1997)  
Two strategies for managing invasive aspergillosis: a decision analysis  
*Clin Infect Dis* 25, 1148-1154
147. Sher, A., Coffman, R.L. (1992)  
Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines  
*Annu Rev Immunol* 10, 385-409

- 
148. Storek, J., Dawson, M.A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D.G., Marr, K.A., Witherspoon, R.P., Bensinger, W., Flowers, M.E.D., Martin, P., Storb, R., Appelbaum, F.R., Boeckh, M. (2001)  
Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation  
*Blood* 97, 3380-3389
149. Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J., Latgé, J.P. (1995)  
A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis  
*J Clin Microbiol* 33, 497-500
150. Swain, S.L., Huston, G., Tonkonogy, S., Weinberg, A. (1991)  
Transforming growth factor- $\beta$  and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype  
*J Immunol* 147, 2991-3000
151. Trigg, M.E., Morgan, D., Burns, T.L., Kook, H., Rumelhart, S.L., Holida, M.D., Giller, R.H. (1997)  
Successful program to prevent *Aspergillus* infections in children undergoing marrow transplantation: use of nasal amphotericin  
*Bone Marrow Transplant* 19, 43-47
152. Trompelt, J., Becker, W.-M., Schlaak, M. (1994)  
Analysis of IgG subclass and IgE response in allergic disease caused by *Aspergillus fumigatus* immunoblotting techniques  
*Int Arch Allergy Immunol* 104, 390-398
153. van Rens, M.T.M., Vernooy-Jeras, R., Merton-de Ridder, M., van Velzen-Blad, H., van den Bosch, J.M.M. (1998)  
Detection of immunoglobulins G and A to *Aspergillus fumigatus* by immunoblot analysis for monitoring *Aspergillus*-induced lung diseases  
*Eur Respir J* 11, 1274-1280
154. Velardi, A., Terenzi, A., Cucciaioni, S., Millo, R., Grossi, C.E., Grignani, F., Martelli, M.F. (1988)  
Imbalances within the peripheral blood T-helper (CD4+) and T-suppressor (CD8+) cell populations in the reconstitution phase after human bone marrow transplantation  
*Blood* 71, 1196-1200

- 
155. Verfuether, S., Peggs, K., Vyas, P., Barnett, L., O'Reilly, R.J., Mackinnon, S. (2000)  
Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire  
*Blood* 95, 3990-3995
156. Wald, A., Leisenring, W., van Burik, J.A., Bowden, R.A. (1997)  
Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation  
*J Infect Dis* 175, 1459-1466
157. Young, H.A., Ghosh, P., Ye, J., Lederer, J., Lichtman, A., Gerard, J.R., Penix, L., Wilson, C.B., Melvin, A.J., McGurn, M.E., Lewis, D.B., Taub, D.D. (1994)  
Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- $\gamma$  gene  
*J Immunol* 153, 3603-3610
158. Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R.W., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J.C., Green, D., Swain, S.L. (1997)  
Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis  
*J Exp Med* 185, 1837-1849
159. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1974)  
Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system  
*Nature* 248, 701-702

## **Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. H. Hebart und Herrn Prof. Dr. H. Einsele möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung, engagierte Unterstützung und den netten, unkomplizierten Umgang bedanken.

Herrn Prof. Dr. J. P. Latgé danke ich für seine herzliche Gastfreundschaft während der Herstellung der Antigengemische im Institut Pasteur, für die gute Kooperation, die Bereitstellung der rekombinaten Proteine und die interessanten Diskussionen bezüglich meiner Ergebnisse.

Frau F. Frank und Herrn Dr. J. Löffler gilt mein Dank für ihre Hilfe, die umfangreiche praktische sowie theoretische Unterstützung und für die private Freundschaft, die sich entwickelt hat.

Frau PD Dr. U. Schumacher vom Hygiene-Institut, Abteilung für medizinische Mikrobiologie, danke ich für die Herstellung der Konidiensuspension.

Herrn C. Meisner vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung gilt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ein großer Dank geht an Volker Teichgräber für seine liebevolle Motivation und Geduld sowie seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen im Rahmen der Verfassung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Eltern und meinen Bruder Christoph für ihre tatkräftige Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gegeben haben.

## Lebenslauf

**Name** Claudia Ruth Bollinger  
**Geburtsdatum** 12.12.1975  
**Geburtsort** Tübingen  
**Eltern** Herta Bollinger, geb. Thum, Erzieherin  
Dr. med. dent. Kraft Bollinger, Zahnarzt

### Schulbildung

1982 - 1984 Grundschule im Aischbach, Tübingen  
1984 - 1986 Carl-Joseph-Leiprecht-Grundschule, Rottenburg  
1986 - 1995 Eugen-Bolz-Gymnasium, Rottenburg  
1995 Abitur

### Studium

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
08/1997 Ärztliche Vorprüfung  
03/1999 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung  
03/2003 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung  
04/2003 Praktisches Jahr:  
- Memorial Sloan-Kettering Cancer Center , New York City,  
USA (Innere Medizin, 1.Hälfte)  
- Kreiskrankenhaus Böblingen (Innere Medizin, 2. Hälfte)  
- Kreiskrankenhaus Böblingen (Radiologie)  
- Kreiskrankenhaus Böblingen (Chirurgie)  
11/05/2004 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

## **Publikation**

Hebart, H. \*, Bollinger, C\*, Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latgé, J.P., Einsele, H. (2002)

\* geteilte Erstautorenschaft

Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematological malignancies

Blood 100, 4521-4528