

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Untersuchungen über den Einfluss von
immunsuppressiven Substanzen auf die Interaktion
dendritischer Zellen mit Aspergillus fumigatus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Andreas Richard Mickan

aus

Aalen

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Hebart

2.Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Lan

1 EINLEITUNG	4
1.1 Das Immunsystem	5
1.1.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems.....	5
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	6
1.1.3 Dendritische Zellen im Immunsystem	8
1.1.4 Die Antigenpräsentation.....	9
1.1.5 Antigenpräsentation an MHC-Klasse-I-Molekülen.....	10
1.1.6 Antigenpräsentation an MHC-Klasse-II-Molekülen.....	12
1.1.7 Aktivierung von T-Lymphozyten	13
1.1.8 T-Effektorzellen	15
1.2 Charakterisierung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
1.2.1 Immunabwehr gegen <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
1.2.2 Erkrankungen durch <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
1.2.3 Diagnose und klinische Symptomatik der Aspergillose	18
1.3 Immunsuppressiva	19
1.3.1 Glucocorticoide	19
1.3.2 Ciclosporin A.....	20
1.3.3 FK 506	21
1.3.4 Rapamycin	22
1.4 Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Verwendete Geräte	24
2.2 Gebrauchsmaterialien	24
2.3 Reagenzien	25
2.4 Verwendete Kits	26
2.5 Isolierung von mononukleären Zellen	26
2.5.1 Bestimmung der Zellzahl.....	27
2.5.2 Einfrieren von Zellen	27
2.5.3 Auftauen von Zellen	28
2.5.4 Positivselektion mit CD14 Microbeads	28
2.6 Generierung von dendritischen Zellen	29
2.7 Inkubation der DCs mit verschiedenen Antigenen	30
2.8 Antigenherstellung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
2.8.1 Konidienpräparation	30
2.8.2 Hyphengenerierung.....	31
2.8.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigenextrakte	31
2.9 Durchflusszytometrie	32
2.9.1 Färbung der Zellen.....	32

2.9.2 Fixierung der gefärbten Zellen	33
2.9.3 Messung im Durchflusszytometer	33
2.10 Proliferationsassays mit PBMC.....	34
2.11 Quantitative Zytokin-ELISA-Untersuchungen	35
2.12 Statistische Verfahren.....	36
3 ERGEBNISSE	38
3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>-induzierte Ausreifung von mo-DCs	38
3.1.1 Inkubation mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigenextrakten.....	38
3.1.2 Proteinpräzipitat von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antigenen (PPSAB).....	38
3.1.3 Zelluläres Extrakt von <i>Aspergillus fumigatus</i> (ECSAB)	43
3.1.4 Inkubationen mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -Hyphen	45
3.2 Einfluß klinisch angewandter Immunsuppressiva.....	48
3.2.1 Proliferationstests.....	50
3.2.2 Mo-DC-Ausreifung unter Immunsuppressivaeinfluss	52
3.2.3 Il-4- und IFN- γ -Produktion unter Immunsuppressiva	
4 DISKUSSION	56
4.1 Zusammenfassung	66
5 LITERATURLISTE	74

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Um unseren Körper vor dem Befall durch Mikroorganismen, vor Schadstoffen, Giften und vor der Entstehung maligner Zellen zu schützen, hat sich über den Zeitraum von 400 Millionen Jahren ein hoch entwickeltes, anpassungsfähiges Abwehrsystem entwickelt.

Dieses Immunsystem, das über 1×10^{12} Zellen umfasst, setzt sich aus zwei Grundpfeilern zusammen. Den ersten Verteidigungsmechanismus bildet die angeborene Immunität, die von Geburt an ohne jeglichen Antigenkontakt vorhanden ist. Den zweiten Pfeiler stellt die adaptive Immunabwehr dar, die sich nach Kontakt mit pathogenen Erregern oder Stoffen entwickelt.

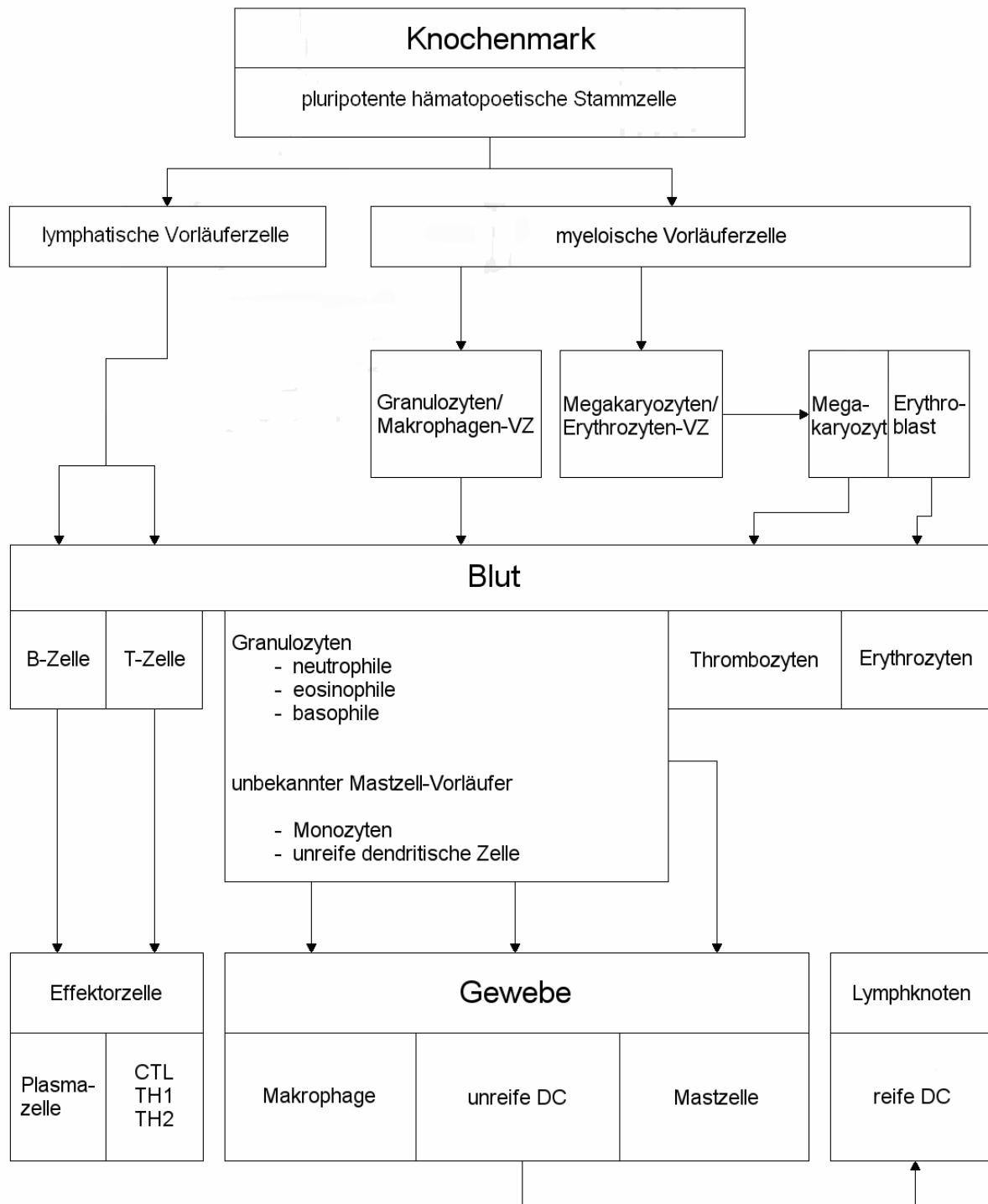
Die angeborene Abwehr umfasst zum einem mechanisch/chemische Barrieren, wie etwa die Haut, die Magensäure, Lysozym und das Komplementsystem, zum anderen gehören aber auch hoch spezialisierte Zellen des Immunsystems wie Phagozyten und NK-Zellen zu dieser ersten Stufe der Abwehr.

Die Aufgaben dieser Abwehrzellen bestehen in der Elimination von Mikroorganismen und der von ihnen befallenen Körperzellen, sowie der Ausschüttung immunmodulierender Zytokine. Ebenso zählen Vasodilatation, akute-Phase-Proteine und Entzündungsmediatoren wie Interleukine, Interferone oder Histamin zur ersten Immunantwort. Die angeborene Immunität dient dabei einerseits der Kontrolle einer Infektion in der Frühphase, andererseits spielen ihre Komponenten auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Die adaptive Immunantwort, die durch B-Zellen und T-Zellen vermittelt wird, setzt verzögert ein, da dieses System nach Kontakt mit einem pathogenen Organismus Zeit benötigt, um antigenspezifische Abwehrmechanismen gegen den Eindringling zu generieren.

1.1.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Bildung zellulärer Blutbestandteile



Bildung der verschiedenen Blutzellpopulationen
 (Nach Janeway/Travers: Immunbiologie, Garland Publ.2001, Fig. 1.3 S.4)

Der Ursprung aller Zellen des Immunsystems liegt im Knochenmark.

Hier entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen die zellulären Bestandteile des Immunsystems.

Während die Zellen der angeborenen Immunität aus myeloischen Vorläuferzellen generiert werden, bilden sich die der adaptiven Immunabwehr aus lymphopoetischen Stammzellen.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Für die gezielte antigenspezifische Abwehr von Mikroorganismen bedient sich der Körper der sehr komplexen und mit der angeborenen Immunabwehr vernetzten adaptiven Immunantwort. Nur dieses System ist dabei in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, das den Körper vor wiederholten Infektionen mit dem gleichen Erreger schützen kann. Das Grundprinzip der adaptiven Abwehr ist hierbei die klonale Expansion von Immunzellen. Die spezifische Immunantwort besteht aus der humoralen (antikörpervermittelten) und der zellulären Immunabwehr. B-Lymphozyten neutralisieren hierbei extrazelluläre Pathogene mit Hilfe von Antikörpern, welche Antigene für Phagozyten des unspezifischen Systems opsonieren oder das Komplementsystem zu einer Lysierung von körperfremden Zellen anregen (Tomlinson, 1993).

Die andere Komponente ist die zelluläre Immunantwort, die intrazelluläre Bakterien, virusinfizierte und maligne Zellen zerstört. Diese Form der Abwehr wird im angeborenen System von den Makrophagen und den Natürlichen Killer (NK) Zellen geleistet. Die NK-Zellen töten dabei insbesondere virusinfizierte Zellen unabhängig vom pathologischen Agens (Biron and Brossay, 2001).

Im adaptiven System kommt diese Rolle den im Thymus gereiften T-Zellen zu.

Die T-Lymphozyten unterteilen sich in zytotoxische T-Zellen (CTL), die von Erregern befallene oder maligne veränderte Zellen eliminieren, und T-Helferzellen, die eine immunvermittelnde und immunmodulierende Rolle haben. Die zelluläre Abwehr ist bei ihrer Aufgabe hierbei auf die Unterstützung durch antigenpräsentierende und immunmodulierende Zellen angewiesen, die zum großen Teil dem unspezifischen Immunsystem angehören. Zu diesen antigenpräsentierenden Zellen (APC) gehören neben Makrophagen und den B-Zellen, die auch zur Antigenpräsentierung befähigt sind, insbesondere die dendritischen Zellen.

1.1.3 Dendritische Zellen im Immunsystem

Die dendritischen Zellen stellen durch ihre zentrale Rolle in der Antigenpräsentation eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar (Palucka and Banchereau, 1999). Die DCs stammen wie die Granulozyten, Mastzellen und Monozyten von myeloischen Vorläuferzelle aus dem Knochenmark ab, wobei auch Monozyten in der Lage sind, nach Stimulation mit Zytokinen in dendritische Zellen zu transformieren (Palucka et al., 1998;) (Di Pucchio et al., 2003) (Zhou and Tedder, 1996).

Sowohl die aus dem Knochenmark stammenden DCs, als auch die aus Monozyten gereiften, werden zunächst als unreife DCs bezeichnet. Da diese unreifen dendritischen Zellen noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommen sind, fehlen ihnen noch die zur Aktivierung und Wachstumsstimulation naiver T-Zellen notwendigen MHC- und costimulatorischen Moleküle. Die unreifen dendritischen Zellen gelangen über das Blut in das periphere Gewebe. Typische Vertreter gewebständiger unreifer DCs stellen etwa die Langerhans-Zellen der Haut dar. Kommen die unreifen DCs im Gewebe mit Krankheitserregern in Kontakt, so sind sie in der Lage, diese zu erkennen und aufzunehmen.

Außerdem ist es ihnen möglich, Antigene sowohl unspezifisch über Makropinocytose als auch über spezifische Mechanismen wie den DEC 205-Rezeptor phagozytotisch aufzunehmen. Einmal mit einem Antigen in Berührung gekommen, beginnt die dendritische Zelle aus dem Gewebe über die Lymphbahnen in benachbartes Lymphgewebe auszuwandern. Die Wanderungsbewegungen der dendritischen Zellen hin zum Ort der Infektion, und nach Antigenexposition ins lymphatische Gewebe werden, von Chemokinen und den dazu passenden Rezeptoren auf den DCs gesteuert. Hierbei werden nach Antigenkontakt die Rezeptoren für inflammatorische Chemokine herunterreguliert, und andere Rezeptoren, wie etwa der CCR7-Rezeptor hochreguliert (Sozzani et al., 2000). Schon während dieser Phase kommt es im Rahmen der Antigenprozessierung zu einem Ausreifungsprozess hin zu T-Zell-aktivierenden reifen dendritischen Zellen. Bei diesem Vorgang verlieren die DCs ihre Möglichkeiten zur Phagozytose, die Expression des DEC 205-Rezeptor wird herunterreguliert, und auch die Makropinocytose ist nicht länger möglich. Stattdessen beginnt die ausreifende dendritische Zelle, Oberflächenmoleküle zur Antigenpräsentation, wie langlebige MHC-Moleküle der Klasse I und II zu exprimieren. Auch Adhäsionsmoleküle wie etwa

DC-SIGN oder das B7-Molekül, die bei Stimulation naiver T-Zellen von wichtiger Bedeutung sind, erscheinen nun vermehrt auf der Zelloberfläche der dendritischen Zelle. Nach Beendigung der Ausreifung ist die dendritische Zelle perfekt zur Antigenpräsentation der aufgenommenen Antigene angepasst. Außerdem beginnt die reife dendritische Zelle noch das Chemokin DC-CK zu sezernieren, um gezielt naive T-Zellen anzulocken (Banchereau et al., 2000).

Neben der Präsentation von Antigenen eingedrungener Mikroorganismen spielen DCs auch in anderen Bereichen des Immunsystems eine tragende Rolle. So sind DCs bei der Ausreifung von cytotoxischen T-Zellen im Thymus von entscheidender Bedeutung, indem sie den reifenden T-Zellen körpereigene Peptide präsentieren, so dass autoimmun reagierende T-Zellen erkannt und ausgeschaltet werden können (Morelli and Thomson, 2003) (Banchereau and Steinman, 1998) (Legge et al., 2002). Auch weitere Aufgabengebiete dendritischer Zellen, etwa im Rahmen des Wachstums und der Ausdifferenzierung von B-Zellen (Jego et al., 2005), oder bei der Stimulierung der Zytotoxizität von NK-Zellen (Nishioka et al., 2001) sind beschrieben. So stellen die dendritischen Zellen nicht nur die potentesten APCs dar, sondern fungieren auch als wichtige Schaltstelle im ganzen Immunsystem (Banchereau et al., 2003b).

1.1.4 Die Antigenpräsentation

Ein Antigen stellt eine Substanzklasse dar, die eine spezifische Immunreaktion auslösen kann oder mit den Komponenten einer bereits laufenden Immunreaktion reagiert. Der Name Antigen leitet sich hierbei vom engl. „antibody generating“ ab, also der Fähigkeit, eine Antikörperbildung auszulösen. Bei als Antigen wirksamen Substanzen handelte es sich dabei vor allem um Proteine. Doch auch niedermolekulare Stoffe sind in der Lage, eine Abwehrreaktion auszulösen, allerdings nur, wenn sie durch eine Bindung an körpereigene Proteine (als ein Hapten-Carrier-Komplex) zu Vollantigenen werden.

Während B-Zellen über Immunglobuline als Rezeptoren von sich aus in der Lage sind, extrazelluläre Antigene zu erkennen, sind T-Lymphozyten auf die Präsentation der Antigene durch körpereigene Zellen angewiesen. Die Rezeptoren der T-Zellen (TCR) können Peptide nur erkennen, wenn diese an spezielle Moleküle auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen gebunden sind. Diese Moleküle, bei

denen es sich um spezialisierte, höchst polymorphe Glykoproteine handelt, gehören zum Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC). MHC-Moleküle, welche seit ihrer Entdeckung beim Menschen in der 50er Jahren auch als „Humane Leukozyten Antigene“ (HLA) bezeichnet werden, zeichnen sich durch einen starken Polymorphismus aus (Schreuder et al., 2005) und werden auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 codiert. T-Zellen können Peptiden, die über HLA-Moleküle präsentiert werden, als körpereigen und körperfremd unterscheiden. So können die zirkulierenden T-Lymphozyten durch die MHC-Moleküle an der Oberfläche der Körperzellen diese ständig auf etwaige Fremdpeptide hin überprüfen. Bei den HLA-Molekülen werden hierbei mehrere Klassen unterschieden. Diese unterscheiden sich durch ihre Molekülstruktur und ihre intrazelluläre Herkunft. Für die Antigenpräsentation sind hauptsächlich die MHC-Moleküle der Klassen I (HLA-ABC) und II (HLA-DR) interessant, wobei auch die anderen Haupt- und Nebenklassen, von denen es wegen des extremen Polymorphismus für jede Klasse zahlreiche gibt, im Immunsystem wichtige Funktionen innehaben und somit ständiger Teil der Forschung sind (Diehl et al., 1996; Maenaka and Jones, 1999).

1.1.5 Antigenpräsentation an MHC-Klasse-I-Molekülen

Beim MHC-Klasse-I-Molekül handelt es sich um ein Heterodimer, das sich aus drei Hauptbestandteilen zusammensetzt, einer schweren α -Kette, dem β_2 -Mikroglobulin und einem antigenen Peptid. Es kommt auf der Oberfläche fast aller Körperzellen vor. Die schwere α -Kette mit etwa 44 kDa, gliedert sich in einen zytoplasmatischen Bereich, die Transmembranregion und drei extrazelluläre Domänen. Die schwere Kette wird von drei verschiedenen Genorten mit hohem Polymorphismus kodiert (HLA-ABC). Ein weiteres Bauteil ist eine leichte Polypeptidkette von 12kDa, das β_2 -Mikroglobulin, welches völlig extrazellulär nicht-kovalent an die schwere Kette gebunden vorliegt. Die Genloci des β_2 -Mikroglobulins sind im Gegensatz zur schweren Kette nicht auf dem Chromosom 6 sondern auf dem Chromosom 15 gelegen. Der letzte Bestandteil ist schließlich das antigenes Peptid, das aus 8-10 Aminosäuren besteht und an das MHC-Molekül gebunden ist. Diese Peptide stammen von intrazellulär synthetisierten Proteinen ab, die

mit Hilfe von Proteasomen (zytoplasmatischen Proteinase-Komplexen) in kleinere Peptide zerlegt wurden (Niedermann et al., 1999). Es sind also endogene Proteinfragmente, bei denen es sich um körpereigene, virale oder tumorspezifische Peptide handeln kann. Die fertigen Peptide werden anschließend über ein intrazelluläres Transportsystem, den ATP-abhängigen heterodimeren TAP-Komplex (transporter associated with antigen processing), in das endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht, in dem die MHC-Klasse-I-Moleküle der Zelle synthetisiert werden. Dort bindet das Peptid mit Hilfe von Chaperonen, Calnexin und Calretikulin an die bindende Region des MHC-Moleküls. Hierbei wird die schwere Kette, das β_2 -Mikroglobulin und das Calreticulin mit Hilfe des Proteins Tapasin an den TAP-Komplex gebunden, bis schließlich die Bindung des Peptids an das MHC-Molekül etabliert ist.

Der fertige MHC-Peptid-Komplex wird durch den Golgi-Apparat in ein exozytotisches Vesikel eingeschlossen und zur Zelloberfläche transportiert, wo der Komplex daraufhin in die Zellmembran eingebaut wird (Hakenberg et al., 2003; Niedermann et al., 1999; Pamer and Cresswell, 1998; York and Rock, 1996).

Bei der Antigenpräsentation an T-Lymphocyten gibt es eine MHC-abhängige Restriktion, das heißt T-Zellen können Peptide nur in Verbindung von MHC-Molekülen erkennen (Hofmann et al., 2001; Pamer and Cresswell, 1998).

T-Zellen, die an den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex binden, besitzen das Oberflächenmolekül CD 8. Dieser Co-Rezeptor bindet die invariante Region des Komplexes und ist dabei MHC-spezifisch. Neben dem Corezeptor haben die T-Lymphocyten einen T-Zellrezeptor (TCR), welcher den Peptid-MHC-Komplex erkennt. Beim T-Zellrezeptor handelt es sich um ein Heterodimer, das sich aus zwei Polypeptidketten zumeist aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt. Der TCR weist eine hohe genetische Variabilität auf, so dass unter den T-Zellen bis zu 10^{15} Varianten mit unterschiedlicher Antigenspezifität vorkommen können.

Der T-Zell-Rezeptor ist mit dem CD 3-Komplex der Zelle verbunden, durch den es bei einer Bindung des TCR mit einem MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex zur Weiterleitung des Signals in die Zelle kommt. Das Signal ist dann Teil der Aktivierung des CD8 positiven T-Lymphocyten, der daraufhin zu einem zytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) ausdifferenziert. Um eine Aktivierung und Ausdifferenzierung zu einer T-Effektor-Zelle hin zu erreichen, bedarf es weiterer costimulatorischer Moleküle, die nur auf spezialisierten APC wie den dendritischen

Zellen vorhanden sind. Bindet nun ein reifer zytotoxischer T-Lymphozyt an den Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex, so tötet er die Zielzelle mit Hilfe des lytischen Enzyms Perforin oder durch über Fas-Liganden induzierte Apoptose ab (Apsarov et al., 1993; Squier and Cohen, 1994).

1.1.6 Antigenpräsentation an MHC-Klasse-II-Molekülen

MHC-Klasse-II-Moleküle dienen der Präsentation von Peptiden, die aus dem Extrazellularraum stammen und durch APCs per Phagozytose oder Mikropinocytose aufgenommen wurden. Die Klasse-II-Moleküle werden insbesondere auf B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Hierbei spielen letztere bei der Induktion einer T-Zell-Antwort die entscheidende Rolle (Fearon, 1999).

Die aufgenommenen Proteine müssen natürlich zuerst durch endosomale Proteolyse auf Peptidgröße gespalten werden. Für diesen Vorgang schließt die antigenpräsentierende Zelle Proteine in Vesikel ein, in denen dann der endosomal-lysosomale Abbau erfolgt.

Die Vesikel zeichnen sich zum einen durch einen niedrigen pH-Wert aus, enthalten zum anderen proteolytische Enzyme wie Cathepsin B,D und L (Nakagawa and Rudensky, 1999; They and Amigorena, 2001).

MHC-Klasse-II-Moleküle entstehen wie alle Glykoproteine im endoplasmatischen Retikulum durch Ribosomen. Sie bestehen aus zwei Transmembranproteinen, und zwar aus jeweils einer hochpolymorphen α - und β -Kette. Da diese, im Unterschied zu Klasse-I-Molekülen, keine von der Zelle synthetisierten Peptide aus dem ER binden und präsentieren sollen, wird die Peptidbindungsstelle vorübergehend blockiert. Dies erfolgt durch eine invariante γ -Kette (Ii), die an jeweils drei MHC-Klasse-II-Dimere andockt und sich über deren Peptidbindungsspalten legt. Vom ER aus gelangen die jetzt aus neun Ketten bestehenden MHC-Klasse-II/Ii-Komplexe nun über sekretorischen Transport zum Golgi-Apparat, wo sie in Vesikel eingeschlossen in Richtung Zelloberfläche transportiert werden. Unterwegs treffen sie auf die Endosomen, mit den in ihnen eingeschlossenen exogenen Peptiden, und verschmelzen zum Teil mit diesen. Die invariante γ -Kette wird nun in mehreren Schritten durch saure Proteasen wie Cathepsin S und L gespalten. Die Spaltung geht dabei soweit, dass auf den Peptidbindungsstellen der nun wieder einzeln vorliegenden MHC-Klasse-II-Moleküle nur ein kleines Fragment, der so genannte

CLIP (class II-associated invariant-chain peptid), verbleibt. Das Fragment wird dann durch ein exogenes Peptid aus dem Endosom ersetzt, wobei die Bindung eines Peptids für die Stabilität des heterodimeren MHC-II-Moleküls entscheidend ist. Nicht beladene MHCs sind nach dem Transport zur Zelloberfläche auf dieser nur für kurze Zeit vorhanden, ehe sie destabilisieren (Braciale et al., 1987; Chapman, 1998; Malcherek et al., 1998; Roche and Cresswell, 1991).

1.1.7 Aktivierung von T-Lymphozyten

Naive T-Zellen wandern, nachdem sie aus dem Thymus ausgeschleust wurden, durch die Blutbahn und das periphere Lymphgewebe.

Auf ihrem Weg begegnen sie anderen Körperzellen und tasten diese bei Kontakt nach MHC-Peptid-Komplexen ab. Dies dient dabei nicht nur der Antigenerkennung, sondern ist auch entscheidend für das Überleben der T-Zelle selbst.

Den insbesondere dendritische Zellen geben während dieser Bindung Überlebenssignale an die T-Lymphozyten ab, ohne die es zur Apoptose dieser Lymphozyten kommt.

Diese ständigen Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und APCs sind ein wichtiger Vorgang und stellen den Kontakt jeder peptidbeladenen antigenpräsentierenden Zelle mit möglichst vielen T-Lymphozyten sicher. Aufgrund der hohen Variabilität des T-Zellrezeptors ist cirka eine von 10^4 - 10^6 T-Zellen für das präsentierte Antigen spezifisch.

Trifft nun ein T-Lymphozyt im Lymphgewebe auf eine antigenpräsentierende Zelle, so gehen die beiden Zellen über interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) und dazu passenden Andockstellen eine relativ stabile Bindung ein.

Diese ermöglicht es der T-Zelle, die präsentierten Peptide auf den zahlreichen MHC-Molekülen abzutasten. Zu den für die T-Zellaktivierung wichtigen Adhäsionsmolekülen, die großteils zur Immunglobulin-Superfamilie gerechnet werden, gehören neben den schon erwähnten T-Zell-Corezeptoren CD 4 und CD8, dem B-Zell-Corezeptor CD 19 und den Peptidbindungsstellen der MHC-Moleküle, die interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAMS) 1 (CD54), 2 (CD 102) und 3 (CD50), die Integrine LFA-1, LFA-2 (CD2) und LFA-3 (CD58) und das Lectin DC-SIGN.

Aufgrund der Synergie, mit der sich die in Abbildung 1.2 dargestellten

Interaktionen zwischen den Adhäsionsmolekülen abspielen, ist die genaue Bedeutung der einzelnen Bindungen noch unbekannt. Kommt es nun dazu, dass eine T-Zelle ein präsentiertes Peptid als zu ihrem TCR passend erkennt, so wird die interzelluläre Bindung über eine affinitätssteigernde Konformationsänderung des LFA-1-Liganden verstärkt. Diese stabilisierte Assoziation der Zellen kann über mehrere Tage bestehen bleiben.

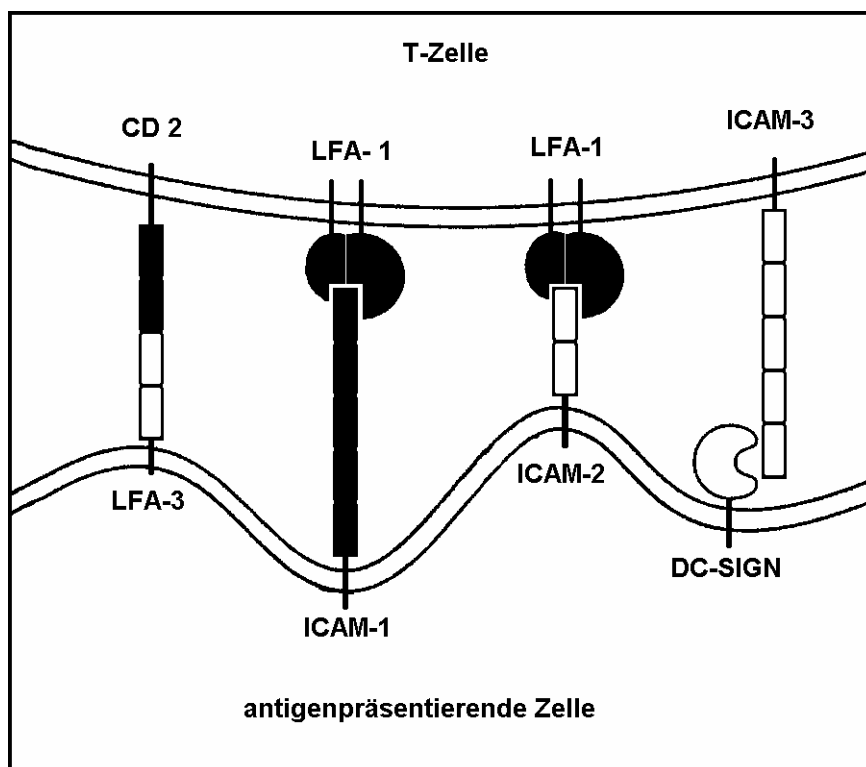


Abb. 2: Adhäsionsmoleküle zwischen T-Zellen antigenpräsentierenden Zellen
(nach Janeway/Travers : Immunbiologie, Garland Publ. 2001 Fig.8.8)

In diesem Zeitraum erfolgt dann die Aktivierung und klonale Vermehrung der naiven T-Lymphozyten. Die T-Zellaktivierung wird dabei allerdings nicht durch die Erkennung des passenden Peptid und die verstärkte Bindung an die antigenpräsentierende Zelle allein ausgelöst, sondern sie bedarf starker costimulatorischer Signale, die von APCs bei dieser Bindung ausgehen. Diese Signale werden insbesondere über die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) vermittelt. Bei diesen handelt es sich um Homodimere, die, wie der

dazugehörige Rezeptor auch, wiederum der Immunglobulin-Superfamilie angehören (Lanier et al., 1995; Schweitzer et al., 1997).

Die Bindung der B7-Moleküle an den passenden CD28-Rezeptor auf der T-Zelle löst im Zusammenwirken mit der Peptiderkennung schließlich die Aktivierung des T-Lymphozyten aus (Howland et al., 2000; Linsley and Ledbetter, 1993).

Die aktivierte T-Zelle beginnt daraufhin mit der Synthese einer Vielzahl von Proteinen, die der Umformung zur T-Effektorzelle und der Modifizierung der costimulatorischen Signale dienen. Auch bilden sich weitere Bindungen zwischen dem Lymphozyten und der APC mit unterschiedlichen Wirkungen auf beide Zellen aus. Über die Expression des CD40-Liganden, der an das CD40-Molekül der antigenpräsentierenden Zelle bindet, erfolgt eine zusätzliche Aktivierungswirkung auf die T-Zelle, und die APC wird zur vermehrten Synthese von B7-Molekülen angeregt (Andreasen et al., 2000; Mackey et al., 1998).

Auch das 4-1BB-Molekül, das der aktivierte Lymphozyt zu bilden beginnt, hat nach seiner Bindung an den entsprechenden Liganden auf dem APC Signalwirkung auf beide Zellen. Diese beiden Moleküle der TNF-Familie sind ein gutes Beispiel für die bei der T-Zellaktivierung als Dialog bezeichnete Signalübermittlung. Bleiben im Rahmen der antigenspezifischen Bindung costimulatorische Signale aus, so wird die T-Zelle nicht aktiviert und verfällt in den Zustand der Anergie, was sie für den späteren Erhalt stimulierender Signale unempfindlich macht.

Auch ist es nicht möglich, dass Peptidpräsentation und costimulatorisches Signal von zwei verschiedenen Zellen ausgehen, um eine Aktivierung auszulösen (Banchereau and Steinman, 1998; Dilioglou et al., 2003; Gause et al., 1995).

Neben den direkten Zellbindungen tragen Chemokine wie der autokrine Wachstumsfaktor Interleukin-2 zur Aktivierung und Proliferation der heranreifenden T-Effektorzellen bei (Linsley et al., 1991).

1.1.8 T-Effektorzellen und ihre Funktionen

Bei den T-Effektorzellen wird zwischen zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphocyten sowie immunstimulierend und modulierend wirkenden CD4⁺ T-Helferzellen unterschieden. Während die T-Lymphocyten der zellulären Immunabwehr infizierter Körperzellen gezielt zerstören (Callan et al., 2000), wirken die T-Helferzellen auf andere

Immunzellen ein und regen diese zur Abwehr von Mikroorganismen an. Die CD4+-Effektorzelle kommen dabei in zwei Unterarten vor. Zum einen gibt es die T_H1-Zellen, die über Chemokinproduktion, wie etwa IL-12 und INF- γ , vor allem die zellvermittelte Immunabwehr anregen. Sie führen also zur Stimulation von APCs. Die T_H2-Zellen hingegen sind auf die Aktivierung der B-Zellaktivität spezialisiert und sezernieren B-Zellwachstumsfaktoren wie IL-4 und IL-5 (Constant and Bottomly, 1997b).

1.2 Charakterisierung von *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist neben den Hefepilzen der wichtigste Erreger von Pilzinfektionen. Er gehört mit den ebenfalls pathogenen Aspergillusarten *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* zu den so genannten rauchgrauen Gießkannenschimmelpilzen.

Diese saprophytischen Pilze stellen ubiquitär vorkommende Erreger dar, die sowohl im Erdreich als auch in der Luft zu finden sind.

Ein weiteres Merkmal von *Aspergillus fumigatus* ist die enorme Umweltresistenz, die das Überleben bei Temperaturen bis 70°C ermöglicht. Morphologisch sind septierte Hyphen und Konidiensporen charakteristisch. Hierbei trägt jeder Konidienkopf tausende dieser 2-3 μm großen Sporen (Banerjee and Kurup, 2003; Latge, 1999b).

1.2.1 Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*

Trotz der Allgegenwärtigkeit und der quasi ständigen Exposition mit dem Schimmelpilz über Kontakt mit Erde oder konidienhaltiger Raumluft entwickeln gesunde immunkompetente Menschen relativ selten durch *Aspergillus fumigatus* ausgelöste Erkrankungen. Da die *Aspergillus fumigatus*-Konidien aufgrund ihres geringen Durchmessers in die Alveolen der Lunge vordringen können, stellen die Atemwege die Haupteintrittspforte für den Schimmelpilz in den menschlichen Körper dar.

Bei immunsupprimierten Patienten ist die Lunge auch der Hauptmanifestationsort der invasiven Aspergillose. Die Immunabwehr gegen den eindringenden Schimmelpilz erfolgt vorrangig durch das angeborene Immunsystem. Die Hauptlast bei der Abwehr tragen neben mechanischen Barrieren, wie etwa die Zilienbewegung in den tieferen

Atemwegen, die Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten der Lunge (Ibrahim-Granet et al., 2003).

Aspergillus fumigatus ist es teilweise möglich, der Phagozytose zu entgehen. Dies geschieht indem die Konidien durch „nicht professionelle“ Phagozyten wie tracheobronchiale Epithelzellen, Alveolarepithelzellen vom Typ II oder Endothelzellen der Lunge internalisiert werden, ohne das der Pilz dabei unschädlich gemacht wird. Die dann entstehende Infektion des lokalen Lungengewebes, die mit vaskulärer Ausbreitung des Erregers einhergehen kann, bedarf einer Immunantwort durch das adaptive Abwehrsystem. Die genauen Vorgänge und die Rolle der einzelnen Immuneffektorzellen, wie etwa die T-Zellantwort über zytotoxische T-Lymphozyten und T_H -1 und T_H -2 T-Helferzellen (Hebart et al., 2002b), oder die Aufgaben von Makrophagen und dendritischen Zellen (Buentke and Scheynius, 2003b; Graziutti et al., 2001b), ist hierbei noch nicht abschließend geklärt und ein Feld intensiver Forschung.

1.2.2 Erkrankungen bei Immunsupprimierten durch *Aspergillus fumigatus*

Beim immunkompetenten Menschen verursacht *Aspergillus fumigatus* vorrangig Probleme in Form von Hypersensitivitätsreaktionen und induziert so eine exogen-allergischen Alveolitis. Patienten ohne voll funktionsfähige Immunabwehr hingegen sind gefährdet, lokale oder systemische invasive Infektionen durch den sich vermehrenden Erreger selbst zu entwickeln (Dixon et al., 1996a).

Die in der modernen Medizin immer häufiger therapeutisch eingesetzte Immunsuppression hat dazu geführt, dass invasive Infektionen durch den früher als schwach pathogen geltenden Erreger *Aspergillus fumigatus* immer mehr zur einer letalen Bedrohung werden. So ist der über die Lungenalveolen eindringende Schimmelpilz bei immunsupprimierten Patienten Auslöser akuter Bronchitiden und Pneumonien. Diese gehen mit Atelektasenbildung, Gefäßarrosionen mit Hämoptyse und infarzierenden Gefäßverschlüssen einher, und führen bei Disseminierung des Erregers zu weiteren schwerwiegenden Erkrankungen wie dem Befall von Herz, Gehirn, Schilddrüse, Haut etc. (Bodey and Vartivarian, 1989b; Cohen and Heffner, 1992b; Horgan and Powderly, 1997).

Die enorme Brisanz der *Aspergillus fumigatus*-Infektion liegt dabei zum einen in der wachsenden Erkrankungshäufigkeit im genannten Patientengut, da mittlerweile bis

zu 25% aller Leukämiepatienten (Singh and Paterson, 2005; de Pauw and Meunier, 1999a), über 10% aller immunsuppremierten Hochrisikopatienten (Boon et al., 1991b) und ein beträchtlicher Anteil der HIV-Erkrankten (Maertens et al., 2001a; Holding et al., 2000b; Khoo and Denning, 1994) im Verlauf ihrer Krankengeschichte eine invasive Aspergillose entwickeln. Zum anderen zeichnet sich die disseminierte Infektion durch eine extrem hohe Mortalitätsrate aus (Kontoyiannis and Bodey, 2002; Latge, 1999b; Levitz, 1989).

1.2.3 Diagnose und klinische Symptomatik der Aspergillose

Die klinischen Symptome der invasiven Aspergillose hängen vom Ausmaß und der Lokalisation des Befalls im Wirtsorganismus ab. Ein großes Problem vor allem im frühen Stadium der Erkrankung ist, die unspezifische Symptomatik. Neben trockenem Husten, Pleuraschmerz und Dyspnoe ist Fieber häufig das einzig auftretende Merkmal der Infektion, was eine Diagnose zu diesem Zeitpunkt äußerst schwierig gestaltet. Der histopathologische Nachweis von Myzelienwachstum im Gewebe des Patienten erfolgt oft erst bei der Autopsie des bereits an der Infektion verstorbenen Patienten. Um eine sichere Diagnose zu ermöglichen wurden vom „National Institute of Allergy and Diseases/Mycoses Study Group“ zusammen mit der „European Organization for Research and Treatment of Cancer/invasive Fungal Infections Cooperative Group“ neue einheitlich standardisierte Diagnosekriterien erarbeitet. Nach diesen Maßstäben liegt eine „erwiesene“ invasive Aspergillose bei histopathologischem/zytopathologischem Nachweis oder einer steril entnommenen positiven Kultur vor. Eine „wahrscheinliche“ IA hingegen definiert sich durch das Vorliegen von Wirtsfaktoren, wie über 10 Tage persistierende Neutropenie ($<500/\mu\text{l}$), antibiotikarefraktäres unklares Fieber über mehr als 96 Stunden, Kortikoidmedikation über einen längeren Zeitraum, Anzeichen einer „Graft-versus-Host Disease“ und eines positiven Pilznachweises (z.B. positive Sputumkultur oder positive Zytologie aus einem Sinusaspirat). Außerdem muss ein definiertes klinisches Zeichen wie z.B. pulmonale Infiltrate vorliegen. Zur Diagnose einer „möglichen“ invasiven Aspergillose genügt das Vorhandensein eines Wirtsfaktors in Verbindung mit einem Erregernachweis oder einem klinischen Zeichen. Die Diagnose wird in Zukunft durch sensitive Nachweisverfahren, wie beispielsweise „Polymerase chain reaktion“ (PCR) zur Detektion spezifischer *Aspergillus*-Sequenzen im Patientenblut oder eines

Sandwich-ELISA, der den Zellwandbestandteil Galactomannan nachweist, weiter verbessert.

Auch die Computertomographie, die röntgenologische Zeichen wie „Halo“-Bildung durch hämorrhagische Nekrosen früher und exakter erfassen kann, gehört inzwischen zum zentralen Spektrum der diagnostischen Möglichkeiten.

1.3 Immunsuppressiva

Substanzen die in der Lage sind, Reaktionen des Immunsystems zu unterdrücken, werden als Immunsuppressiva bezeichnet. Diese Einflussnahme auf die körpereigene Antigenabwehr ist vor allem bei Autoimmunerkrankungen und Organtransplantationen erforderlich. Als wirksame Stoffe befinden sich derzeit Glucocorticoide, Zytostatika, Antikörper und neuere Substanzen wie Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus in der klinischen Anwendung. Da Dexamethason, Rapamycin, Ciclosporin A und FK 506 in den Versuchen der Arbeit exemplarisch untersucht wurden, werden diese Substanzen im Folgenden vorgestellt.

1.3.1 Glukokortikoide

Diese Substanzgruppe findet ihren Ursprung in den physiologischen Glukokortikoiden, die in der menschlichen Nebenniere gebildet werden, wie z.B. das Kortisol. Die therapeutische Bedeutung liegt hier vor allem in der immunsuppressiven aber auch in der antiphlogistischen und antiallergischen Wirkung der Kortisol-Derivate. Durch chemische Modifizierung der Muttersubstanz konnte die immunsuppressive Wirksamkeit der Derivate immer weiter gesteigert werden, wohingegen andere Wirkungen auf den menschlichen Organismus gleich blieben oder gesenkt wurden. Das im Folgenden eingesetzte Dexamethason etwa hat eine gegenüber Kortisol um den Faktor dreißig gesteigerte glukokortikoide Potenz, ohne dabei irgendeine mineralokortikoide Wirkung zu entfalten. Diese anderen Effekte auf den Stoffwechsel umfassen unter anderem die Förderung der Glukoneogenese, Lipolyse, Thrombozytenproduktion und Mikrozirkulation, Retentionsteigerung von Natriumionen, Sekretionserhöhung von Kalium- und Calciumionen und Senkung der Gonadotropinsekretion und Gonadenfunktion. Die immunsuppressive Wirkung der

Glukokortikoide basiert auf eine Einflussnahme dieser Moleküle auf die Proteinsynthese von Immunzellen wie Makrophagen und T-Helfer-Zellen. Sie hemmen dabei über intrazelluläre Rezeptoren die Interleukin-1-Bildung in Makrophagen und die Interleukin-2-Bildung in T-Lymphozyten. Außerdem werden die Prostaglandinsynthese durch Blockade der COX-2-Induktion, und auch die Synthese anderer Zytokine wie etwa Tumornekrosefaktor- α oder Interferone durch die Kortisol-Derivate gehemmt. Der entscheidende Effekt liegt hierbei in der Unterbrechung der T-Zellaktivierungskaskade durch die Transkriptionshemmung der hierfür erforderlichen Interleukine. Hauptnebenwirkungen der Glukokortikoide umfassen ab einer Schwellendosis (7,5 mg Prednisolon-Äquivalent) die Ausbildung eines Cushing-Syndroms, erhöhte Infektionsrate, verzögerte Wundheilung und katabole Erscheinungen wie Muskelatrophie.

Die Substanzklasse der Glukokortikoide findet in der Medizin Anwendung bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie Hauterscheinungen, allergischen Reaktionen, malignen Tumoren, Erkrankungen der Leber, der Nieren, des Nervensystems und aus dem rheumatischen Bereich, sowie Schockzuständen und anderen Störungen (Adcock, 2003; Adcock et al., 2004; Buttgereit, 2000; Payne and Adcock, 2001).

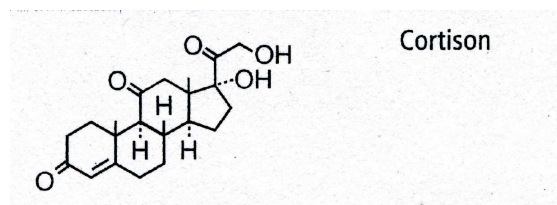


Abb. 3: Das Kortisolmolekül ist die Ursprungssubstanz alle Kortisolderivate (Abbildung aus Mutschler : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001)

1.3.2 Ciclosporin A

Beim Ciclosporin handelt es sich um ein neueres Medikament, dessen Wirkstoff vom dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gebildet wird.

Dem immunmodulatorische Effekt dieses hydrophoben zyklischen Polypeptides liegt eine große Affinität zum Cyclophilin, einem Protein der Immunophiline, zu Grunde.

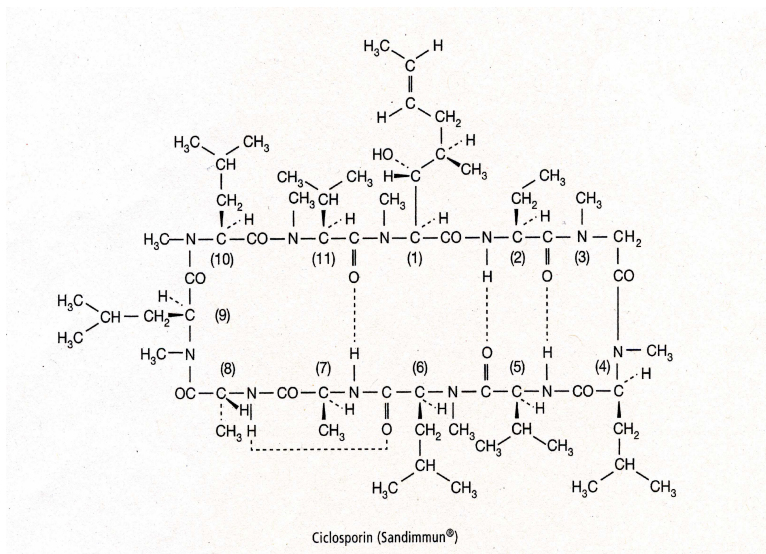


Abb. 4: Ciclosporinmolekül (Abbildung aus Mutschler : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001)

Der Komplex aus Ciclosporin und Cyclophilin hemmt die Calcium-abhängige Protein-Phosphatase-Aktivität des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes. Dieser spielt unter anderem eine zentrale Rolle bei der Transkription im Zellkern von T-Zellen und hemmt somit die Synthese von Botenstoffen und hierbei insbesondere dem Interleukin 2. Ciclosporin A beeinflusst hierbei nur die T-Zellen und nicht die Phagozytoseaktivität der Zellen des retikulo-endothelialen-Systems. Da Ciclosporin im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva nicht myelotoxisch wirkt, findet es vor allem bei Organtransplantationen und der Knochenmarkstransplantationen Verwendung. An Nebenwirkungen verursacht die Substanz vor allem Nephrotoxizität, Kardiotoxizität und Leberschädigungen. Des Weiteren zählen Hirsutismus, Gingivahyperplasie und Ödembildung zu den unerwünschten Effekten. Ciclosporin hat eine schlechte Bioverfügbarkeit und eine Halbwertszeit von 6 -16 Stunden, so dass häufige Spiegelkontrollen notwendig sind (Kaye et al., 1992; Liu et al., 1991; O'Keefe et al., 1992; Ruhlmann and Nordheim, 1997).

1.3.3 FK 506

Beim FK 506 oder auch Tacrolimus handelt es sich ebenfalls um ein Immunsuppressivum der neuen Generation. Sowohl im Nebenwirkungsspektrum als auch im Wirkmechanismus ist diese Substanz dem Ciclosporin sehr ähnlich, nur dass es weder Hirsutismus noch die angesprochene Gingivahyperplasie auslöst, aber zusätzlich neurotoxisch ist.

Außerdem bildet es mit einem anderen Immunophilin, nämlich dem FK-Bindungsprotein-12, einen Wirkkomplex. Allerdings geht die Wirkung des Makrolid-Lactons FK 506 weiter als die des Ciclosporins, da es neben den T-Zellen auch die B-Lymphozyten-Aktivität über eine Transkriptionsblockade des Tumornekrosefaktors- α hemmt. Auch beim Tacrolimus, das von *Streptomyces tsukubaensis* gebildet wird, liegt eine schlechte Bioverfügbarkeit und eine dem Ciclosporin ähnliche Plasmahalbwertszeit vor, so dass auch hier ein Drugmonitoring nötig ist.

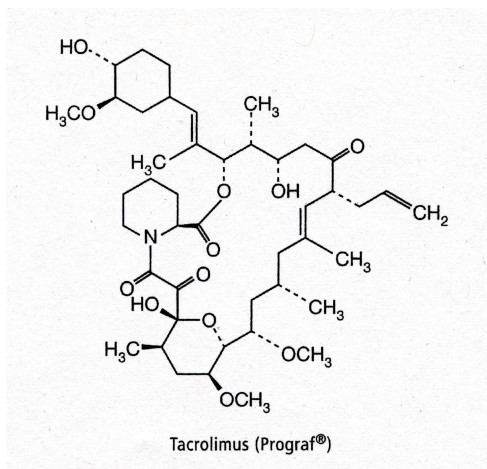


Abb. 5: FK 506-Molekül-Darstellung
(Abbildung aus Mutschler : Lehrbuch der
Pharmakologie und Toxikologie,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001)

1.3.4 Rapamycin

Rapamycin oder auch Sirolimus ist eine Substanz die in seiner Wirkung dem FK 506 sehr nahe steht. Auch dieser Stoff bindet an das Immunophilin FKBP-12 und bildet einen immunsuppressiv wirkenden Komplex.

Dieser blockiert aber im Gegensatz zum Tacrolimus und Ciclosporin nicht den Calcineurin-Calmodulin-Komplex, sondern bindet TOR-Proteine (targets of rapamycin), die über eine Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Domäne die Interleukin-2-Signaltransduktion unterbrechen.

Rapamycin hemmt also nicht die Interleukin-2-Synthese an sich, sondern inhibiert dessen Signalwirkung auf die Zellproliferation der B- und T-Lymphozyten. Das Nebenwirkungsprofil fällt bei dieser Substanz, die aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird, günstiger aus als bei den Vergleichsstoffen.

Die Nephrotoxizität ist geringer ausgeprägt als bei Ciclosporin und es tritt auch keine Intimaproliferation auf. Jedoch wird als kardiovaskulärer Risikofaktor vermehrt die Entwicklung von Hyperlipidämien verursacht. (Sehgal, 1998).

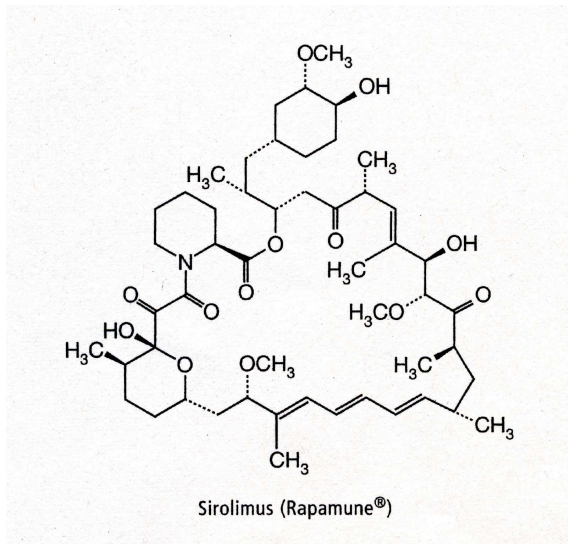


Abb. 6: Rapamycin-Molekül-Darstellung
(Abbildung aus Mutschler : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001)

1.4 Zielsetzung

Die invasive Aspergillose und vor allem die dazugehörige Immunantwort sind schon lange ein Feld intensiver experimenteller Forschung.

In Vorarbeiten wurde von der Arbeitsgruppe die T-Zell-Antwort gegen spezifische *Aspergillus fumigatus*-Antigene in gesunden Probanden und auch bei Aspergillosepatienten untersucht (Hebart et al., 2002c).

Die Rolle der dendritischen Zellen als Übermittler der antigenen Information an die Effektorzellen des Immunsystems und als modulierende Zelle bei der Immunantwort ist, im Bezug auf invasive Pilzinfektionen, noch nicht abschließend geklärt.

Auch die Frage in wie weit immunmodulatorische Medikamente, wie sie nach allogener Stammzelltransplantation zur Vermeidung einer Graft versus host-disease verabreicht werden, die Funktion der dendritischen Zellen beeinflussen, ist noch weitgehend unerforscht.

Ziel dieser Hypothesen generierenden Arbeit war es, den Einfluss häufig angewandter Immunsuppressiva auf die durch *Aspergillus-fumigatus*-Antigene induzierte Immunreaktion und die Stimulation einer *Aspergillus fumigatus*-spezifischen Immunantwort zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Brutschrank (Heraeus BBD 6220)	Kendro Laboratory Produkts, Osterode
FACS-Calibur – Flowcytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
CellQuest –Version 3.3	Becton Dickinson, Heidelberg
Intel-Pentium 4-PC	Comtech, USA
Macintosh, OS9	Apple Computer, USA
Kühlschrank -80°C	San yo, Japan
Kühlschrank -20°C / +4°C	Liebher r, Ochsenhausen
Microsoft-Office 2002	Microsoft, USA
Mikroskop Laborlux S	Leica, Bensheim
Mikroskop Diavert	Leica, Bensheim
Pipetten 10/100/1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 5ml	Corning Inc. , USA
Pipetten 10/25ml	BD Labware, Frankreich
Pipettierhilfe Hirschmann	Neolab Laborbedarf, Heidelberg
Wasserbad 37°C	GF L, Burgwedel
Wasserbad 42°C/95°C	Memmer t GmbH, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Biofuge 12	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3-S-R	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge IEC Centra GP8R	Thermo Life Sciences, Egelbach
MACS MS+ Seperation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim

2.2 Gebrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 5ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15/50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Tubes 1,5ml	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen 10/100/1000µl	Biozym, Hessisch Oldendorf

Kulturplatte Cellstar 24/96 Well	Greiner, Solingen
Kulturplatte Multiwell 6 Well	BD/Falcon, Heidelberg

2.3 Reagenzien

Biocoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CMV-Antigen	Biodesign, Dunn, Asbach
Cyclosporin A	Sigma, USA
Dexamethason	Sigma, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5%	Sigma, Deisenhofen
EDTA 0,5 M (ph 8)	Bio Whittaker, USA
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
FACS-Antikörper :	
- Anti – IgG (FITS/PE/PerCP)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD3 (PerCP)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD4 (PE)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD8 (FITS)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD14 (PE)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD19(PE)	Becton Dickison, Heidelberg
- Anti – CD40 (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – CD56(PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – CD80 (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – CD83 (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – CD86 (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – HLA DR (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – ABC (PE)	Pharmingen (BD), Heidelberg
- Anti – CD1a (FITS)	DAKO, Dänemark
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
FK-506 (Tacrolimus)	Calbiochem
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma Cell Culture, USA
Formaldehyd 2%, neutral-gepuffert	Sigma, Deisenhofen

Gentamicinsulfat (Refobacin ® 80mg)	Merck, Darmstadt
GM-CSF (Leukomax ®)	Novartis, Schweiz
Hanks` Balanced Salt Solution	Gibco (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
Interleukin 2 (Proleukin ®)	Chiron, USA
Interleukin 4	R&D Systems, Wiesbaden
Phytohämagglutinin (PHA)	Gibco BRL, NY, USA
Rapamycin	Sigma, USA
RPMI-1640 – Medium (+Glutamax)	Gibco (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
Tetanus-Toxoid (TT)	Chiron Behring GmbH&Co, ;Marburg
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden
Trypanblau 0,4%	Gibson (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
[³ H]-Thymidin	Amerham-Buchler, Braunschweig
Tween	Merck, Darmstadt
Yeast-Nitrogen-Base-Medium	Gibco BRL, NY, USA

2.4 Verwendete Kits

Quantikine® HS human IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
Human IFN- γ BMS228CE	Bender MedSystems GmbH, Wien

2.5 Isolierung von mononukleären Zellen

Die für die vorgenommenen Versuche erforderlichen humanen „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMCs) wurden entweder aus frischem EDTA-Blut oder aus Buffy coats (erythrozytenabgereichertes Zellkonzentrat) gesunder Blutspender der transfusions-medizinischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen gewonnen.

Die mononukleären Zellen wurden hierbei aufgrund unterschiedlicher Dichte von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Dafür wurde das Blut 1:1 mit der Hanks`balanced salt solution verdünnt und anschließend in einem 50ml Falcon tube auf die Biocoll separating solution (Eine Mischung des Kohlenhydrat-Polymers Ficoll™ und der jodhaltigen Verbindung Metrizamid) im Verhältnis 3:2 aufgeschichtet. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase zwischen Ficoll-Gradient und

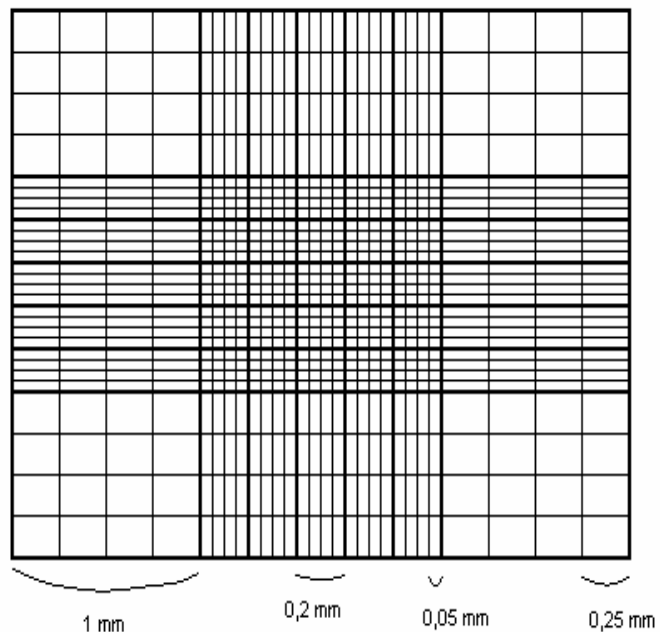
verdünntem Blutplasma mit dem größten Anteil der mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert und in neue 50ml Falcon tubes überführt. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal mit Hanks bei 1300 rpm gewaschen.

2.5.1 Bestimmung der Zellzahl

Bei der Auszählung der Zellen wurden zuerst 20µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau vermischt, wobei sich tote Zellen anfärben und somit nicht gezählt wurden. Bei der Isolierung aus Buffy Coats, bei denen die Zellzahl im Bereich von 10^8 lag, wurde die Zellsuspension noch 1:10 mit Hanks-Lösung verdünnt. anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Zwischen dem Deckglas und dem Zählnetz bestand ein Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe). Das Volumen über einem der 9 großen Quadrate des Netzes entspricht 0,1µl ($1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm}$). Somit entsprach die Zellzahl eines Quadrates der Zellzahl in 0,1µl der Suspension.

Abb. 7: Neubauer-Zählkammer



Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mussten alle Verdünnungen berücksichtigt werden.

2.5.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellsuspension mit einer Konzentration zwischen 5×10^6 und 1×10^7 Zellen/ml

wurde zuerst bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet im halben Endvolumen 40% FCS/RPMI aufgenommen. Anschließend wurde gekühltes 20%-iges DMSO/RPMI hinzu gegeben, so dass die Endkonzentration des FCS 20 % und die des DMSO 10% betrug. Die fertige Zelllösung wurde in 1ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt, sofort auf Eis gestellt, eine Woche bei -70°C gelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff bei -180°C eingefroren.

2.5.3 Auftauen von Zellen

Da der Auftauvorgang schnell vonstatten gehen musste, um die toxische Wirkung des DMSO auf die Zellen bei Temperaturen über 4°C nicht zum Tragen kommen zu lassen, wurden die Kryoröhrchen einige Sekunden in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Bevor die Zellsuspension endgültig auftaute, wurde sie in ein vorbereitetes Zentrifugationsröhrchen mit RPMI 1640 geschüttet und bei 1300 rpm 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.5.4 Positivselektion mit Hilfe von CD14 Microbeads

Aus den gewonnenen mononukleären Zellen wurden nun mit Hilfe von mit Antikörpern konjugierten kolloidalen super-paramagnetischen Microbeads die Zellen gewonnen, die das menschliche Zelloberflächenantigen CD14 trugen. Hierbei wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl bei 4°C und 1300 rpm über 10 min zentrifugiert, wobei der entstandene Überstand anschließend vollständig entfernt werden musste. Die verbliebenen Zellen wurden in einer Lösung aus 800µl Hanks mit 2mM EDTA und 1% FCS je 1×10^8 Zellen aufgenommen. Danach wurden 200µl CD14 Microbeads pro 1×10^8 Zellen dazugegeben. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurde die Mischung mit Hanks + 2mM EDTA + 1% FCS auf 20ml aufgefüllt und sogleich bei 4°C/ 1300 rpm abzentrifugiert.

Unterdessen wurden die MACS-MS⁺-Trennsäulen, von denen pro 1×10^8 Zellen eine benötigt wurde, in die dazugehörigen Magneten eingefügt und mit 3ml gekühltem Hanks/ 2mM EDTA / 1% FCS vorgespült.

Die mittlerweile abzentrifugierten Zellen wurden wiederum in 500µl der Hanks/EDTA/FCS-Lösung aufgenommen und daraufhin über die Magnetsäule gegeben. Während die unmarkierten negativen Zellen die Säule ungehindert passieren konnten, wurden die magnetisch markierten Zellen im Magnetfeld, das die Säule umgab, zurückgehalten. Die Säulen wurden nun noch 3X mit Hanks/ 2mM EDTA / 1% FCS durchgespült. Danach wurden sie aus dem Magneten genommen und die positiv-selektierte Fraktion konnte aus den Säulen gespült werden. Anschließend wurden die Zellen gereinigt und ausgezählt.

2.6 Generierung von dendritischen Zellen

Die über das MACS-System gewonnenen CD14⁺-Zellen wurden im Folgenden zur Generierung von dendritischen Zellen weiterverwendet. Hierzu wurden die selektierten CD14 positiven Monozyten in RPMI + 10% FCS in ein Konzentrat von 3×10^6 Zellen in 3ml Medium aufgenommen.

Außerdem wurde an Zytokinen 1µl GM-CSF pro 3ml Medium und 4,1µl IL4 pro 3ml Medium beigemischt. Zur Generierung reifer dendritischer Zellen, musste zusätzlich 10ng TNF-α pro ml Medium dazugefügt werden. Die fertige Zellpräparation wurde dann auf 6-Well Platten ausgesät, wobei jeweils 3ml der Suspension in jedes Well pipetiert wurden. Die fertigen Platten wurden daraufhin 2 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer 95%igen Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und es wurde aus jedem Well 1ml Flüssigkeit entnommen. Die in dem abpipetierten Medium enthaltenen Zellen wurden abzentrifugiert, in neuem RPMI + 10% FCS aufgenommen und mit frischen Zytokinen versetzt.

Nach weiteren 2 Tagen wurde die Erneuerung des Medium wiederholt.

Während der Inkubation der Zellkulturen mussten diese laufend mit dem Mikroskop morphologisch beurteilt und auf mögliche Kontamination hin untersucht werden.

Nach Ablauf einer Woche konnten die Zellen geerntet werden, wobei die Platten mit den fertigen DCs zuerst heruntergekühlt werden mussten, um die Adhärenz der Zellen am Plattenboden zu vermindern. Danach wurde die Zellsuspension unter mehrfachem Nachspülen aus den Wells abgesaugt. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Anzahl, der generierten dendritischen Zellen bestimmt.

2.7 Inkubation der DCs mit Antigenen

Nach der Generierung der unreifen dendritischen Zellen wurden diese mit unterschiedlichen Antigenen und immunsuppressiv wirkenden Substanzen versetzt. Die DCs wurden hierzu auf 1×10^6 Zellen pro ml Medium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in 24-Well-Platten eingebracht und mit den im Versuchsaufbau beschriebenen Substanzmengen beimpft. Daraufhin wurden die Platten über 24h bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{Luftfeuchtigkeit}$ im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit mussten die Platten erst ca. 30 min auf Eis gelagert werden, um die Zelladhärenzen am Plattenboden aufzuheben, bevor die Zellen aus der 24well-Platten entnommen werden konnten. Nach diesem Vorgang konnte man die Zellen in der Zentrifuge reinigen, die Zellzahl bestimmen und die DCs für anschließende Messungen einstellen.

2.8 Antigenherstellung von *Aspergillus fumigatus*

2.8.1 Konidienpräparation

Sowohl die *Aspergillus fumigatus*-Konidien, als auch die daraus gewonnenen Hyphen wurden im Tübinger Institut für Mikrobiologie von Dipl. Biochem. Ziad Haddad hergestellt. Zur Gewinnung der Konidien wurden 20 µl einer Konidien-Stamm-Suspension von *Aspergillus fumigatus* in destilliertem Wasser auf einer Sabouraud-2%-Glucose-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C für ca. 4 –5 Tage inkubiert. Sobald sich dunkelgrüne Kolonien auf der Platte gebildet hatten konnten die Konidien entnommen werden. Die Kolonienplatten wurden mit PBS/0,001 % Tween besprüht, um die Konidien von der Oberfläche zu lösen. Tween verringerte dabei die Hydrophobizität der Konidienoberfläche. Die sich bildenden Tropfen wurden daraufhin von der Platte gesammelt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nachdem die Konidienzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, wurde die Suspension bei 9000 rpm über 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet in RPMI aufgenommen und in Eppendorf-Tubes aliquotiert.

2.8.2 Hyphengenerierung

Um aus den so hergestellten Konidien Hyphen zu generieren, wurden 10^6 Konidien in 1 ml „Yeast Nitrogen Base – Medium“ bei 37°C über 18 Stunden inkubiert.

Das so angezüchtete Hyphenmyzel wurde danach zweimal mit Hanks vermengt und bei 5000 rpm und 4°C über 5 min zentrifugiert. Da für die Versuche nur abgetötete Hyphen verwendet werden konnten, wurden die Hyphen für 24 Stunden bei 4°C in 70 %igem Ethanol-PBS inkubiert. Danach erfolgten nochmals zwei Waschvorgänge mit Hanks bei 5000 rpm und 4°C über 5 min. Zuletzt wurden die Hyphen in RPMI aufgenommen, auf 10^6 Hyphen/ml eingestellt und in Aliquots zu je einem ml bei -80°C gelagert.

2.8.3 *Aspergillus fumigatus*-Antigenextrakte

Die verwendeten *Aspergillus*-Präparationen stammten aus dem „Laboratoire des Aspergillus“, Institut Pasteur Paris, und wurden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jean Paul Latgè hergestellt.

Die Antigenpräparationen basierten auf Konidien des *Aspergillus fumigatus*-Stamms CBS 144-89, der von einem Patienten mit invasiver Aspergillose isoliert und in Schrägkultur auf 2%-igem Malzextrakt-Agar angezüchtet wurde. Der Stamm kam hierbei aus der Sammlung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ in Baarn, Holland. Die Konidien wurden in einem 150 ml Erlenmeyerkolben inokuliert, die entweder 50 ml Hefeextrakt (EXL)-Medium (99% [vol/vol] Aqua dest., 1% [wt/vol] Hefeextrakt (Difco, Detroit, Michigan) oder 50 ml Sabouraud (SAB)-Medium (97% [vol/vol] Aqua dest., 2% [wt/vol] Glucose, 1% [wt/vol] Mycopepton Biokar (Prolabo, Beauvais, Frankreich) enthielten. Diese Mediumansätze wurden anschließend bei 200 rpm und 37°C über 24 Stunden belassen, und danach in einen mit 1,2 l Sabouraud- oder Hefeextrakt-Medium gefüllten Gärungsapparat (LSL Biolafitte, Saint Germain en Laye, Frankreich) gegeben. Das in der Apparatur zu 8% [vol/vol] enthaltene Inokulum verblieb 18 Stunden bei 26°C, Belüftung mit 50 l pro min und 500 rpm Rotation in diesem, bevor es im nächsten Arbeitsschritt filtriert wurde.

Das Filtrat musste nach Präzipitation mit vier Volumen 90%-igem Ethanol für 48 h bei 4°C gelagert werden, um die Gärungsreaktion zum Stehen zu bekommen.

Weiter wurde der sich bildende Niederschlag herunterzentrifugiert, das Pellet in 50mM Ammonium-Acetat aufgenommen und das hieraus resultierende Präzipitat aus extrazellulären *Aspergillus*-Antigenen (PP) bei -80°C gelagert. Die im Filter (BECO-CP 00, E. Begerow GmbH & Co, Langenlonsheim, Deutschland) verbliebenen Myzelien wurden mehrfach mit dest. Wasser gewaschen und danach in 30 ml TRIS-HCL-Puffer (50 mM, pH 7,5) pro 10g feuchte Mycelien gegeben. Diese Mischung wurde in einen Zellhomogenisator (B. Braun, Melsung AG, Deutschland) mit Hilfe von Glaskügelchen zerkleinert und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, das sogenannte „Extrait cellulaire“ (EC) enthielt nun intrazelluläre, wasserlösliche Antigene. Somit konnte durch zwei verschiedene Medien sowohl ein extrazellulärer, (PP SAB, PP EXL) als auch ein intrazellulärer (EC SAB, EC EXL) Antigenextrakt hergestellt werden, wobei die Zusammensetzung der Antigenextrakte eine gewisse Variabilität aufweist, und von mehreren Faktoren wie Inkubationszeit, Kulturbedingungen, Kulturmedium etc. abhängt.

2.9 Durchflusszytometrie

2.9.1 Färbung der Zellen

Zur späteren Analyse im Durchflusszytometer mussten die Zellen entsprechend aufbereitet und je nach Fragestellung mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Hierbei wurden die Zellen in einem 50 ml Falcon-tube auf 1×10^5 – 1×10^6 Zellen eingestellt und dann bei 1300 rpm herunterzentrifugiert. Das sich bildende Pellet wurde daraufhin in 200 µl 4°C kaltem Hanks/10% FCS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 5 µl jedes zur Fragestellung gehörigen Antikörpers versetzt.

Dieser Ansatz wurde nun 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert, daraufhin mit ebenfalls 4°C kaltem Hanks/10% FCS auf 50 ml aufgefüllt und schließlich bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Bei der Zellfärbung wurden hauptsächlich die an Phycoerythrin (PE) gekoppelten Antikörper gegen die cluster of differentiation (CD) CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 sowie HLA-DR (MHC II) und HLA-ABC (MHC I) verwendet.

Diese wurden gegen den, an Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten, CD 1a Antikörper gemessen. Bei CD1a handelte es sich um 49 kDa schwere Oberflächenmoleküle, die auf DCs sowie auf Langerhans-Zellen und Thymuszellen vorkommen mit einer dem MHC-Klasse-I-Molekül ähnlichen Struktur.

Außerdem wurde als Isotypenkontrolle sowie zur Kompensationseinstellung des Zytometers ein unspezifischer Antikörper (IgG), jeweils an die Farbstoffe PE und FITC-Form gekoppelt, gegeneinander gemessen.

Die so für das Durchflusszytometer aufbereiteten Zellen konnten entweder sofort gemessen werden, oder sie wurden in einem weiteren Arbeitsschritt fixiert.

2.9.2 Fixierung der gefärbten Zellen

Die zuvor mit Antikörpern markierten Zellen wurden zur Fixierung zuerst im FACS-Röhrchen mit 2ml Hanks/2% Formaldehyd resuspendiert und bei 130 rpm abzentrifugiert. Anschließend nahm man die Zellen in 200 µl Hanks/2% Formaldehyd auf und verpackte die FACS-Röhrchen lichtgeschützt, wodurch es möglich war, sie bei 4°C mehrere Tage bis zur Messung zu lagern.

2.9.3 Messung im Durchflusszytometer

Am Durchflusszytometer wurde die Zellsuspension durch eine Pumpe eingesaugt und in einer vibrierende Fließkammer in Einzellsuspension gebracht, so dass die Zellen dann einzeln an den Laserstrahlen vorbeigeführt werden konnten. Die dabei entstandene Streuung des gebündelten Lichts, die vom Photomultiplier erfasst wurde, teilte sich in zwei Kategorien ein. Zum einen entstand die so genannte Vorwärtslichtstreuung (forward scattering), die positiv mit der Größe der gemessenen Zellen korrelierte, zum anderen die Seitwärtslichtstreuung, die aus einem 90° Winkel gemessen wurde und mit der Kern-Plasma-Relation korrelierte. Durch diese zwei Informationen konnte zwischen Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation, granuliertem Zytoplasma und großem Volumen (z.B. Granulozyten) und kleineren Zellen mit verhältnismäßig großem Kernanteil (z.B. Lymphozyten) unterschieden werden.

Außerdem maß das Durchflusszytometer die Fluoreszenz, der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe. Hierbei konnten verschiedene Antikörper gleichzeitig zum

Einsatz kommen, da sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verbunden werden konnten, die sich bei der Messung anhand ihrer Gipfel im Fluoreszenzspektrum differenzieren ließen.

Sowohl die Messung als auch die spätere Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest-Software ver.3.3 an einem, zum Durchflusszytometer gehörigen, Macintosh

Computer. Die Messungen von Einfach- und Mehrfachfärbungen unterschieden sich dabei in der, bei mehreren Färbungen notwendigen, Kompensationseinstellungen durch Kontrollproben. Bei den Durchflusszytometer-Analysen und der sich daran anschließenden Auswertungen mit der FACS-Calibur-Software wurden die gemessenen Zellpopulationen zu einem Wert der mittleren Fluoreszenzdichte (mean fluorescence intensity = MFI) zusammengefasst.

2.10 Proliferationsassays mit PBMC

Stimulationseffekte verschiedener *Aspergillus*-Antigene auf T-Lymphozyten wurden mit Hilfe von PBMCs Proliferationsassays erfasst. Hierbei wurde der Einfluss von dendritischen Zellen und immunmodulierenden Reagenzien auf diese Immunreaktionen während der Inkubation untersucht.

Zur Stimulation wurden allogene Zellen anderer Spender,

Aspergillus fumigatus spezifische Präparationen wie PP SAB, EC SAB und *Aspergillus*-Hyphen, Kontrollantigene wie Tetanustoxoid (25µg/ml), CMV

-Lysat (0.2mg/ml) und das polyklonale Mitogen PHA (1% [vol/vol]) verwandt.

Um eine Verwendung von PBMCs und monocyte derived DCs des gleichen Spenders zu ermöglichen, mussten PBMCs bis zum Abschluss der DC-Generierung eingefroren werden. Die Proliferatonstests wurden in 96-Well-Rundbodenplatten in Triplikaten durchgeführt.

In jedem Well wurden 1×10^5 PBMCs eingesetzt, die in 200 µl RPMI/10%

FCS aufgenommen waren. Als Negativkontrolle wurden sowohl reine

Mediumansätze als auch Versuchsansätze mit PBMC und DCs ohne Antigenzugabe eingesetzt. Alle Versuchsansätze wurden über 5 Tage bei 37°C/5% CO₂ /95%

Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden den

Zellen pro Well 37 KBq [3H]-Thymidin hinzugesetzt, wonach die Ansätze weitere

18 Stunden im Brutschrank inkubiert werden mussten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Erntegerät aus den Platten entfernt und auf Glasfaserfilter aufgebracht, 3 Stunden luftgetrocknet, daraufhin in eine Szintillationsflüssigkeit getaucht und anschließend eingeschweißt. Die Proliferation konnte nun indirekt über den Einbau des radioaktiven Thymidins in die DNA, der sich vermehrenden Zellen, nachgewiesen werden.

Hierbei korrelierte das Ausmaß der DNA-Replikation und damit der Zell-Proliferation mit der im Zellmaterial auf den Glasfaserfilter messbaren Radioaktivität.

Diese Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Beta-Szintillationszählers erfasst.

Die gemessenen Rohdaten der Triplicate wurden in cpm angegeben und wurden später mit auf einem Personal-Computer mit Windows-EXCEL in Mittelwerte für jeden Ansatz umgerechnet, sowie graphisch dargestellt.

2.11 Quantitative Zytokinbestimmung mittels ELISA

Im ELISA wurden Überstände der durchgeführten Proliferationstests oder Durchflusszytometer-Analysen nach Vollendung der Inkubationszeit analysiert. Bei den Durchflusszytometer-Versuchen mit DCs in 24-well-Platten wurde 1 ml Überstand/well gewonnen, wohingegen bei den Proliferatonstests nur 100 µl/Well aus den 96-Well-Platten entnommen werden konnte.

Die Überstände wurden bis zur Testdurchführung bei -70°C eingefroren. Die Proben wurden bei der Zytokinbestimmung dann auf 96-Well-Platten als doublets zu je 100 µl/well hinzu gegeben. Diese Platten waren am Boden mit monoklonalen Antikörpern gegen das entsprechende Zytokin benetzt, so dass in den Proben enthaltenes IL-4 bzw. INF- γ fixiert wurde.

Das am Boden der Platten gebundene Zytokin wurde über an Biotin gekoppelte INF- γ -Antikörper bzw. Peroxidasegekoppelte IL-4-Antikörper gemessen. Für die Antikörperbindungsreaktionen waren jeweils vom Hersteller vorgegebene Inkubationszeiten erforderlich.

Nach einigen Waschsritten gemäß dem Versuchsprotokoll wurde jedem Well ein ebenfalls im Kit enthaltene Substratlösung hinzu gegeben. Beim INF- γ -ELISA wurde den Ansätzen vorher noch Streptavidin-HRP zugegeben, um das antikörpergekoppelte Biotin zu binden und der Ansatz wurde danach erneut gewaschen.

Durch das Substrat wurde schließlich eine Färbungsreaktion in Gang gesetzt, die nach einem im jeweiligen Versuchsprotokoll festgesetzten Zeitpunkt mit Hilfe einer Stop-solution beendet werden musste. Die Messung der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm für INF- γ und IL-10 bzw. 490nm bei IL-4. Alle Lichtabsorptionsanalysen wurden hierbei in einem SLT Spectra ELISA-Reader im Zentrallabor für Innere Medizin der Universität Tübingen vorgenommen und mit der Synelisa ver. 3.3 Software ausgewertet.

Dabei dienten ebenfalls auf die 96-Well-Platten gegebene Verdünnungsreihen des jeweiligen Zytokins in mitgelieferter Standardform als Eichkurve, die dem ELISA-reader und der dazugehörigen Software eine quantitative Bestimmung in den Proben ermöglichte.

Folgende ELISA-Kits wurden verwendet:

- Quantikine[®] HS human IL-4 ELISA-kits der Firma R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA
- human IFN- γ ELISA-kit der Firma Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

Der Quantikine[®] HS human IL-4 Kit, R&D wurde nach rekombinantem NIBSC/WHO IL-4 internationalem Standard lot 88/656 eingestellt und mit Hilfe der Umrechnungsformel ausgewertet:

$$\text{NIBSC (88/656) äquivalenter Wert (IU/ml)} = 0,0163 \times \text{Quantikine}^{\text{®}} \text{ IL-4 Wert (pg/ml)}$$

Der human IFN- γ ELISA-Kit, Bender MedSystems wurde mit hochgereinigtem, rekombinantem IFN- γ nach internationalem Referenzstandard NIBSC lot 82/587 geeicht.

2.12 Statistische Verfahren

Die statistischen Analysen, die in der Arbeit enthalten sind, wurden ohne vorher bestehende Ergebnishypothesen und zu rein deskriptiven Zwecken erstellt.

Für die Versuche mit dem Durchflußzytometer wurden alle Ergebnisse als MFI (mean fluorescence index) und Spannweiten angegeben.

Für die Zellverteilung wurde die Normalverteilung exemplarisch anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Hilfe der CellQuest-Software ver. 3.3 für Macintosh Computer untersucht.

Beim MFI wurde hierbei von Normalverteilung ausgegangen. Der Student-T-Test für verbundene Stichproben wurde angewandt, um die unterschiedliche Ausprägung des MFI in den inkubierten Proben im Vergleich zur identisch behandelten Negativkontrollpopulation zu untersuchen.

Die Testergebnisse wurden mit einem nominalen P-Wert angegeben, wobei ein P-Wert von $P < 0,05$ mit der Einschränkung von teils kleinen Fallzahlen als statistisch auffällig betrachtet werden konnten, aber nicht zwingend auf eine Signifikanz schließen ließen.

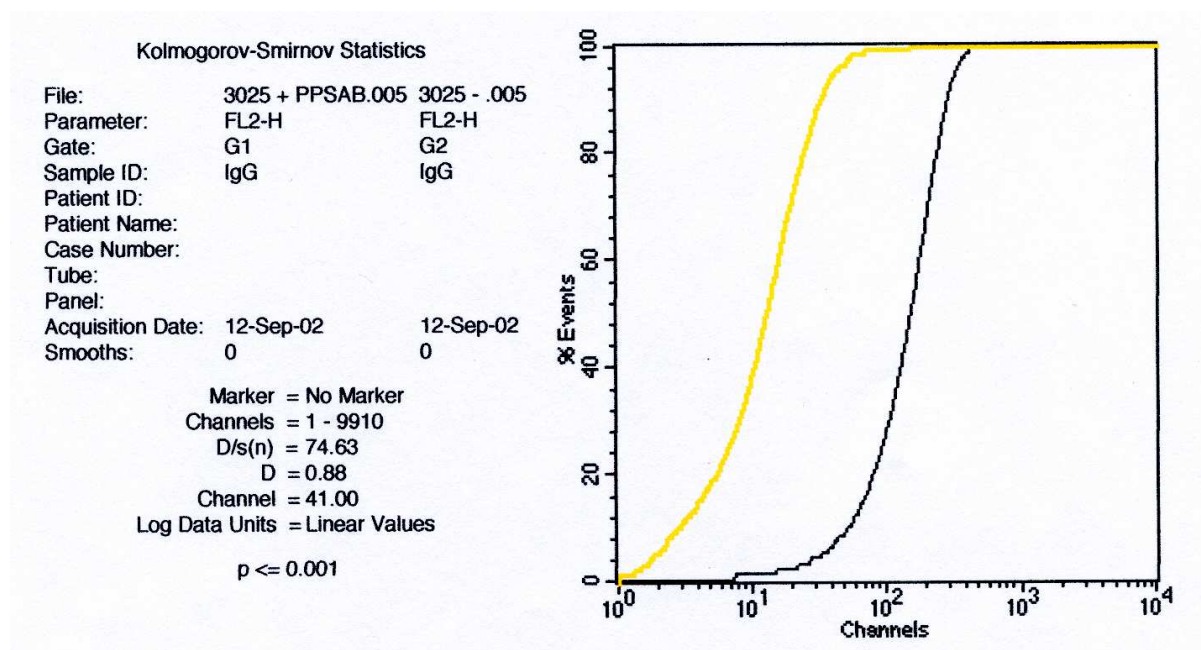


Abb. 8: Kolmogorov-Smirnov-Statistik am Beispiel des Buffy-Coats 02623025-60

Des Weiteren wurde die Korrelation teilweise anhand eines nominalen R-Wertes angegeben.

Für die Ergebnisse des Pilotversuchs mit Immunsuppressivaeinsatz wurde aufgrund zu geringer Fallzahlen auf statistische Analysen verzichtet, so dass diese nur in Form von Rohdaten und Tabellen dargestellt wurden.

Die Analysen wurden mit Hilfe des JMP-Programs Version 3.1.6.2 durchgeführt und anschließend ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 *Aspergillus fumigatus*-induzierte Ausreifung von moDCs

3.1.1 Inkubation mit *Aspergillus fumigatus*-Antigenextrakten

Die über eine Woche hinweg aus Monozyten generierten dendritischen Zellen wurden nach dem Ernten mit PPSAB und ECSAB versetzt.

3.1.2 Proteinpräzipitat von *Aspergillus*-Antigenen (PPSAB)

Die moDCs wurden nach der Ernte über 24h mit PPSAB inkubiert.

Als Kontrollpopulation wurde bei allen Buffy-Coats ein Teil der mo-DCs vor der Inkubation separiert und daraufhin ohne Antigenzugabe ebenfalls für 24h im Brutschrank gelagert und anschließend als Negativkontrolle gereinigt und gefärbt.

Die Färbung erfolgte mit an Fluoresceinisothiocyanat- (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelten Antikörpern. Bei der Messung im Durchflusszytometer und der anschließenden Auswertung mit der CellQuest-Software ver.3.3 fand als erster Schritt zunächst immer die Kalibrierung anhand der IgG (FITC und PE) statt.

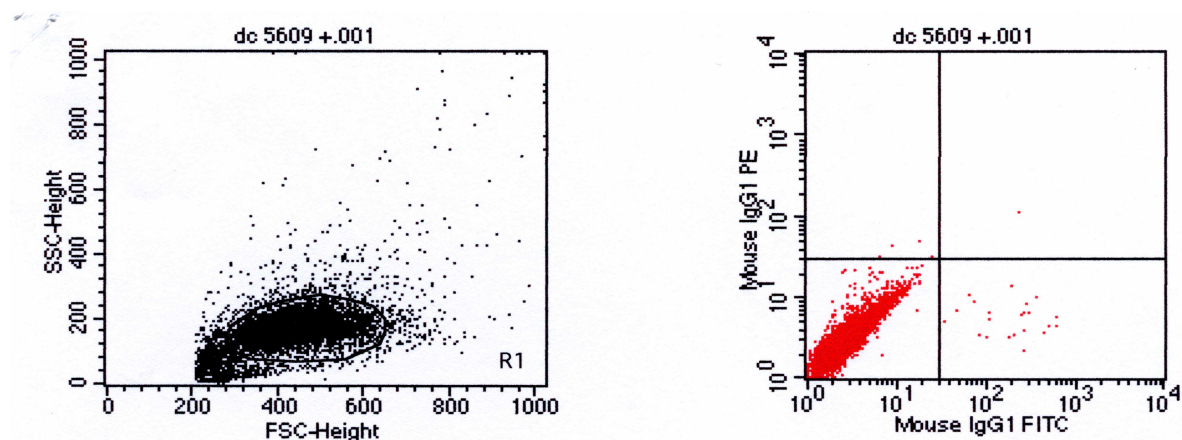
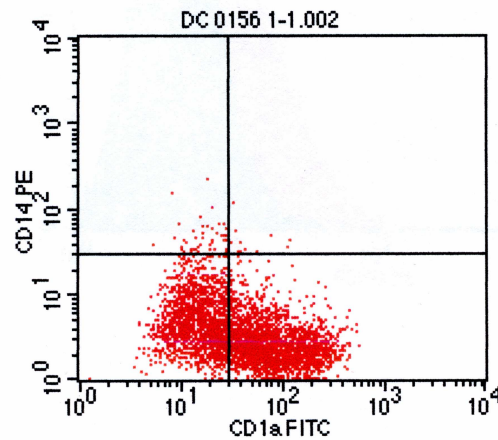


Abb. 9: Kalibrierung und Fluoreszenzabstimmung (am Beispiel des Buffy-coats 02625609-60)

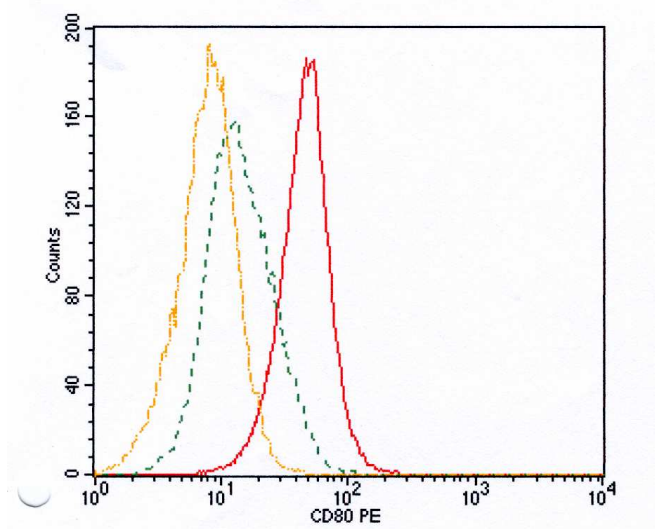
Durch die Messung von CD 1a und CD 14 konnte der Anteil ausgereifter DCs bestimmt werden.

Abb. 10: Ausreifungstest anhand von CD1a und CD14 (Buffy-coat 03630156-60)



Mit diese Ausreifungsbestimmung wurde sichergestellt, dass es sich bei den untersuchten Zellen vor Inkubation um unausgereifte moDCs und nicht um Monozyten oder bereits ausgereifte DCs handelte. Außerdem konnte der steigende Anteil ausgereifter DCs nach Inkubation exemplarisch dargestellt werden. Daraufhin folgten die Messungen zur Bestimmung von Veränderungen an der Zelloberfläche der DCs. Hierbei wurde die für ausreifende dendritische Zellen typischen Parameter untersucht. Diese bestanden aus dem MHC-Klasse-II (HLA-DR), den costimulatorischen Molekülen CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD83 (HB15). Die MFI-Werte sowohl der unstimulierten Kontrollpopulationen als auch der mit PPSAB inkubierten dendritischen Zellen wurden im Folgenden für alle gemessenen Oberflächenmarker dargestellt und miteinander verglichen. Für den Marker CD 80 zeigte sich folgendes Ergebnis:

Abb. 11: Overlaydiagramm mit erhöhter CD 80-Expression bei PPSAB-Population (rot) im Vergleich zur Negativkontrolle (grün) und Isotopenkontrolle (gelb) am Beispiel des Buffy-Coats 03600421-60



Bei den 9 Versuchen mit Buffy-Coats (n=9) lag der Mittelwert des MFI bei den positiven Zellpopulationen mit ca. 20000 Zellen pro Population bei Mtlw. = 25,96 (Spannweite: 11,98 – 58,69). Bei den Negativkontrollen (n=9), deren Populationen auch einen ungefähren Umfang von 20000 Zellen/Population aufwiesen, hatten die gemessenen MFI-Werte einen Mittelwert = 10,14 (Spannweite: 5,4 – 18,53) und lagen damit klar unter denen der mit PPSAB behandelten DCs.

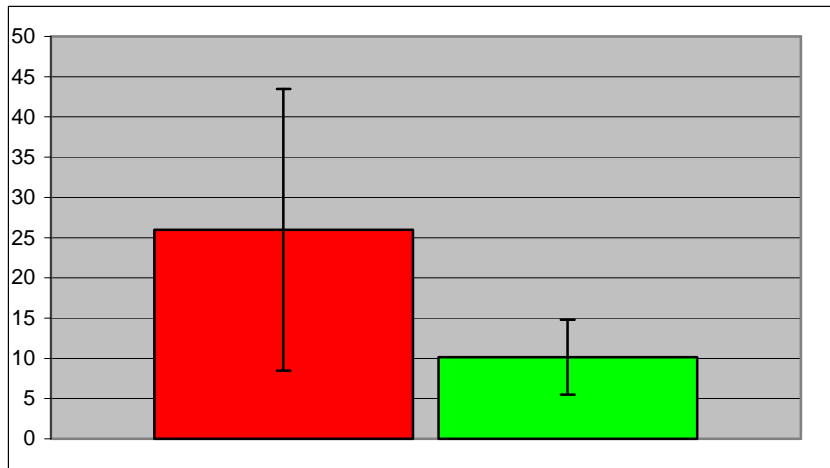


Abb. 12: CD 80 Vergleich zwischen PPSAB-Versuchsreihe (rot) verglichen mit der Negativpopulation (grün) (bei N=9)

Bei der statistischen Auswertung ergab sich eine Auffälligkeit mit einem p-Wert von 0,0177 und einer Korrelation von R=0,45.

Die Auswertung für das ebenfalls auf ausgereiften DCs vorkommende Oberflächenmolekül CD 83 ergab für die inkubierten Zellen für den MFI einen Mittelwert von 10,20 (Spannweite: 6,47 – 16,21). Wohingegen die unbehandelten Zellen die nicht dem Aspergillus-Antigenen ausgesetzt waren im Mittel einen MFI-Wert von 5,25 (Spannweite: 3,55 – 7,73) aufwiesen (n=9).

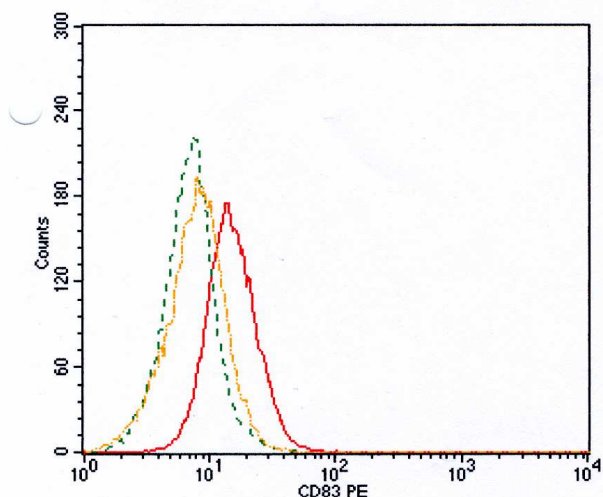


Abb. 13: Overlaydiagramm für CD 83 mit PPSAB-Population (rot), Negativkontrolle (grün) und Isotopenkontrolle (gelb) bei Buffy-Coat 03600421-60

Da die getesteten Zellen denen der CD 80-Tests entsprachen lagen die Populationsgrößen auch hier bei ca. 20000 Zellen pro Versuch.

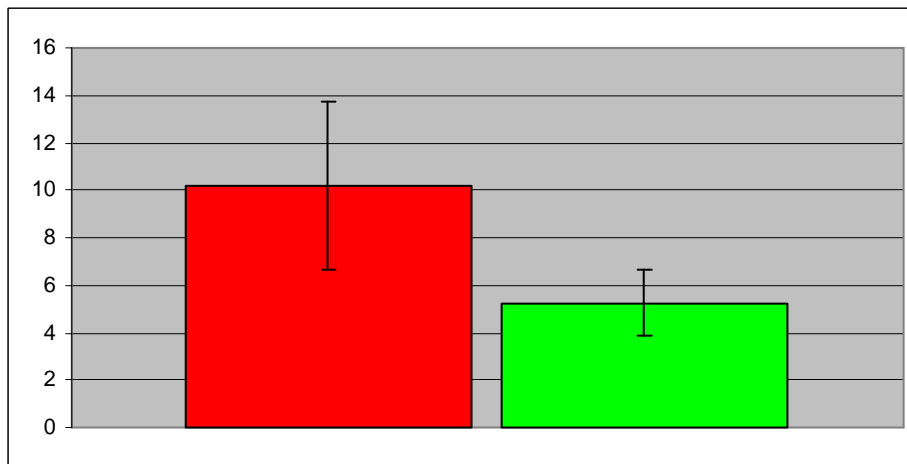


Abb. 14:
CD 83 Vergleich
zwischen MFI bei
der PPSAB-Reihe
(rot) und
Negativkontrolle
(grün) (bei N=9)

Mit einem p-Wert von 0,0006 und einer Korrelation, die bei $R=0,71$ lag, zeigt sich auch hier ein statistisch zumindest auffälliges Ergebnis. Auch für den CD 86 Marker, der wie CD 80 eine Co-Rezeptorfunktion für T-Zellmembranproteine innehat, wurden entsprechende Messungen vorgenommen. Der MFI-Mittelwert lag hier für die mit PPSAB behandelten moDCs bei 130,42 (Spannweite: 59,6 – 213,07).

Die moDCs der negativen Kontrollgruppe hingegen wiesen bei der mean fluorescence intensity nur einen Mittelwert von 26,55 (Spannweite: 13,44 – 62,39) auf. Der p-Wert lag in diesem Fall bei 0,0001, die Korrelation bei $R=0,56$.

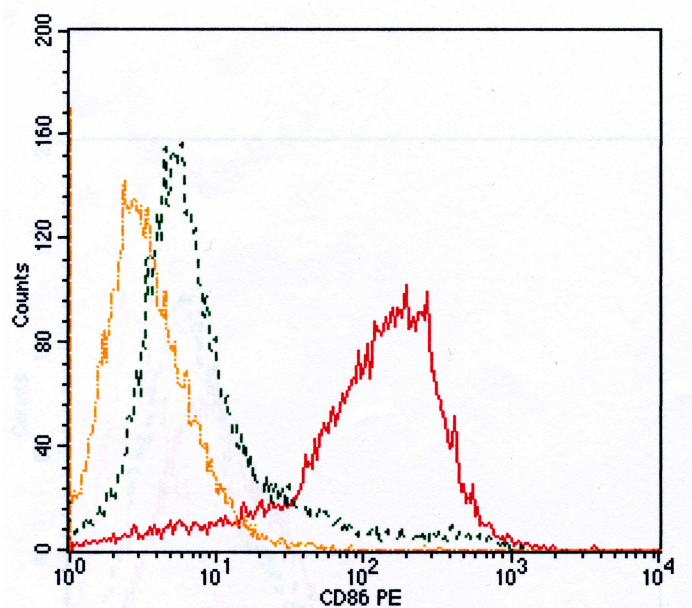


Abb. 15:
Erhöhte CD 86 Expression bei mit
PPSAB
behandelten moDCs (rot dargestellt) im
Vergleich zur unbehandelten
Kontrollpopulation (grün dargestellt) und
der Isotypenkontrolle (gelbe Linie) am
Beispiel des Buffy-Coats 02625609-60

Auch bei diesen Messungen (N=9) lag der Populationsumfang bei ca. 20000 Zellen je Versuchsreihe.

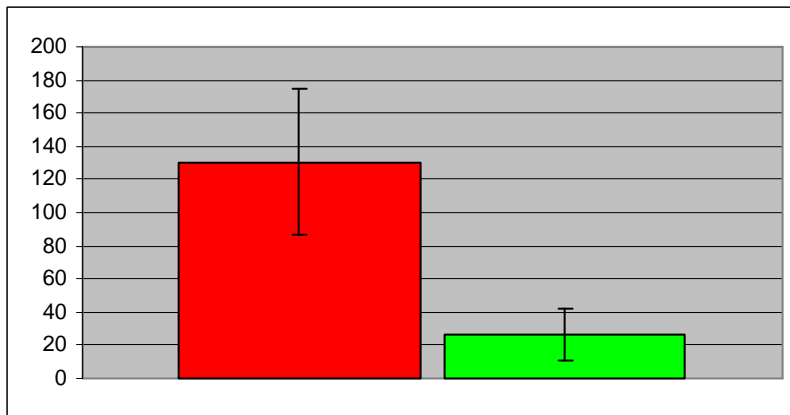


Abb. 16:

CD 86 MFI-Verleich der PPSAB-moDCs (rot) zur Negativkontrolle (grün) (bei N=9)

Als weiteres Oberflächenprotein auf den moDCs , welches als Hinweis auf die durch PPSAB induzierte Aktivierung bestimmt wurde, waren die MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR) von Interesse. Diese zeigten bei den Versuch (n=9) eine gemessene MFI welche bei den inkubierten dendritischen Zellen im Mittel bei 129,03 (Spannweite: 7,85 – 269,46) lag. Die Negativpopulationen wiesen auch hier eine geringere Fluoreszenzdichte auf, die hier einen Mittelwert von 47,46 (Spannweite: 2,72 – 88,72) ergab.

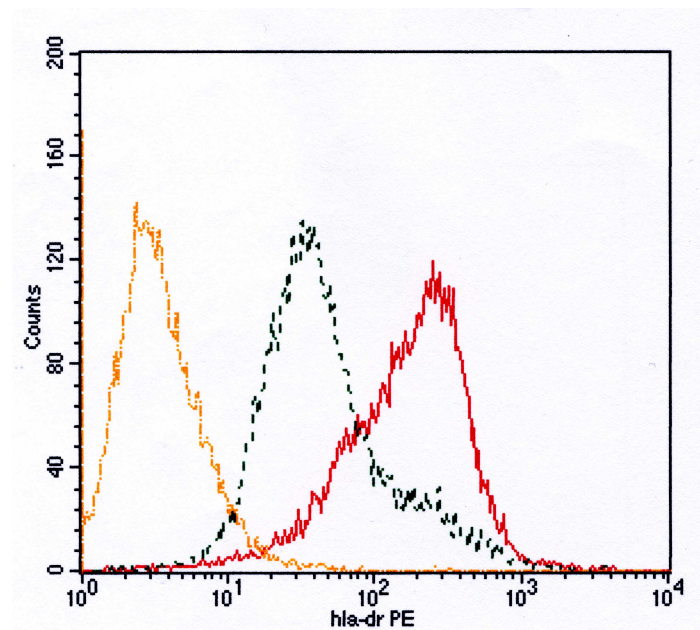


Abb. 17:

Overlaydiagramm für HLA-DR mit PPSAB-Reihe (rot), Negativreihe (grün) und Isotopenkontrolle (gelb) anhand des Buffy-Coats 02625609-60

Auch für diesen Marker war mit einem p-Wert von 0,0036 bei einer Korrelation von $R=0,97$ eine Auffälligkeit auszumachen.

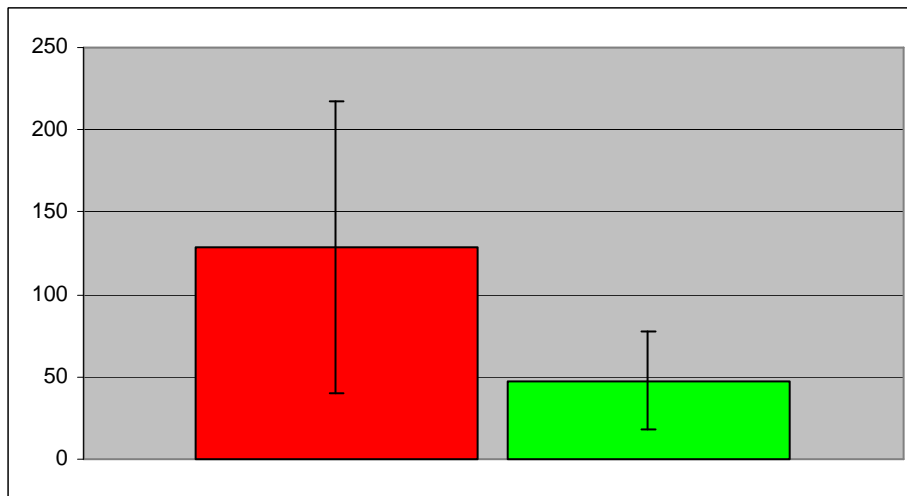


Abb. 18:
Balkendiagramm mit MFI-Vergleich der PPSAB- Populationen (rot dargestellt) und der Negativkontrollen (grün) für HLA-DR (bei N=9)

Des Weiteren wurde bei den letzten zwei Versuchsreihen (Buffy-Coats 0360421-60 und 03601064-60) zusätzlich der MFI für den CD 40 Marker bestimmt, bei dem es sich wie im Eingangsteil beschrieben um ein costimulatorisches Molekül zur T-Zellaktivierung handelte. Der mittlere MFI-Wert lag für die inkubierten Zellen bei 263,54 (Spannweite: 268,64 – 258,44) und für die negativen DCs bei 50,25 (Spannweite: 49,85 – 50,66), was ebenfalls für eine abgelaufene Aktivierung durch den PPSAB-Antigenkomplex spricht.

3.1.3 Zelluläres Extrakt von *Aspergillus fumigatus* (ECSAB)

Ähnlich dem PPSAB wurde auch das „Extrait cellulaire“ den generierten dendritischen Zellen über 24h beigemischt, wobei die Versuchsbedingungen denen der PPSAB-Austestungen entsprachen.

Auch hierbei hatte als Vergleichspopulation eine Negativkontrolle ohne Antigenzusatz dieselbe Versuchsanordnung durchlaufen.

Die ECSAB-Lösung wurde hierbei wie zuvor das PPSAB nach Anweisung des „Laboratoire des Aspergillus“ mit einer Konzentration von 5µl/ml Zellsuspension (bei 10^6 Zellen pro ml) eingesetzt.

Von dieser Versuchsreihe wurden nur drei Läufe durchgeführt, da nach deren Auswertung keine ausreichende Aktivierung der moDCs zu erkennen war. Für den CD 40 Marker lag der mittlere MFI für die inkubierten DCs bei 5,83 (Spannweite: 8,66 – 4,05), für die negativen Zellen bei 5,09 (Spannweite: 7,58 – 3,76).

Auch bei CD 80 lagen die MFI-Werte mit 8,92 (Spannweite: 14,14 – 5,27) für die Positiven und 7,86 (Spannweite: 12,81 – 4,86) für den Negativmittelwert nicht weit auseinander.

Ähnliches galt für CD 83 mit 11,17 (Spannweite: 26,32 – 2,96) als Mittelwert des MFI der inkubierten Zellen und 10,3 (Spannweite: 24,21 – 3,22) für die unbehandelte Kontrollpopulation.

Der mittlere MFI bei CD 86 ergab bei den ECSAB-Zellen den Wert 10,82 (Spannweite: 10,29 - 7,78) und bei der Negativkontrolle 7,86 (Spannweite: 9,79 – 6,33), so dass hier zumindest ein geringer Anstieg zu verzeichnen war.

Bei den MHC-Klasse-II Molekülen (HLA-DR) war mit einem mittleren MFI für die Positivgruppe von 116,65 (Spannweite: 214,28 – 52,72) und 113,42 (Spannweite: 167,32 – 43,76) für die Kontrolle keine nennenswerte Aktivierung zu sehen.

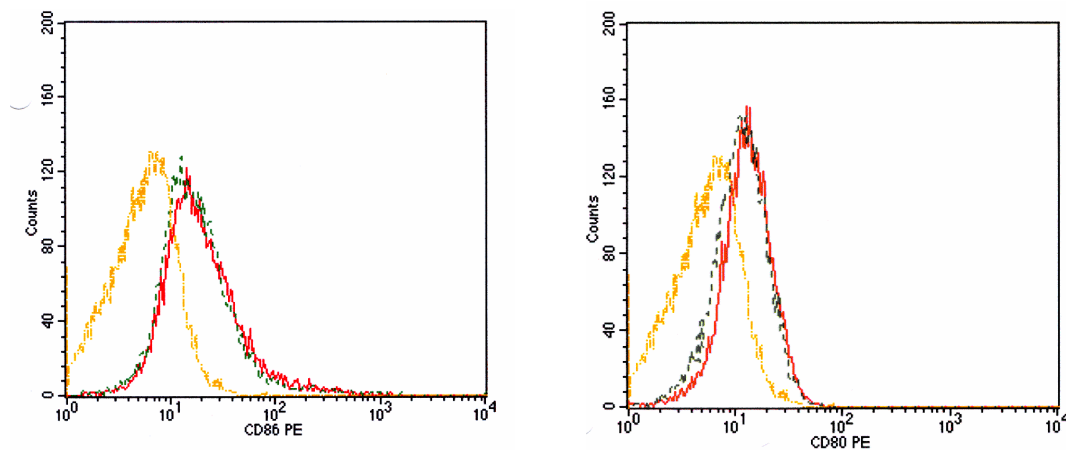


Abb. 19: Overlaydiagramme für CD 86 und CD 80 mit ECSAB inkubierten moDCs (rot dargestellt) der Negativpopulation (grün dargestellt) und der Isotypenkontrolle (gelb dargestellt) am Beispiel des Buffy-Coats 03625714-60

3.1.4 Inkubationen mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen

In weiteren Versuchsreihen wurden direkt mit Alkohol abgetötete Aspergillushyphen den dendritischen Zellen zugegeben.

Die Konzentration der angewendeten Hyphen lag bei 5 Hyphen pro Monozyt und die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 37°/ 5% CO₂/ 95% Luftfeuchtigkeit.

Bei der Antigenfärbung wurde nun der CD 40-Marker mitbestimmt.

Es wurden fünf Versuchsreihen (n=5) mit abgetöteten Hyphen durchgeführt, wobei auch hier der „mean fluorescence index“ (MFI) als Vergleichsparameter zwischen den Versuchsreihen und den passenden Negativreihen verwendet wurde.

Bei den Messungen zum CD 40 Marker ergab sich für die mit Hyphen inkubierten Zellen ein mittlerer MFI Wert von 237,064 (Spannweite: 156,29 – 355,25).

Damit lag die Expression dieses Oberflächenmoleküls über dem Wert bei den nicht beimpften mo-DCs von 81,922 (Spannweite: 57,27 – 141,94).

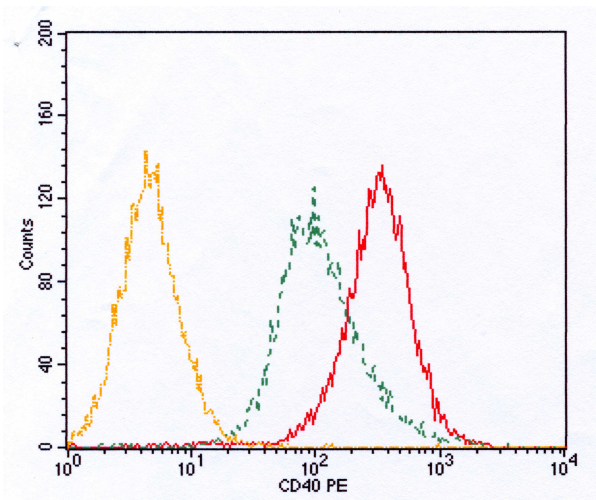


Abb. 20: Overlay-Diagramm mit CD 40 Expressionsvergleich am Beispiel des Buffy-Coat 03639248-60. Die Kurve der inkubierten mo-DCs (hier rot) weist hier ein höheres Niveau als die Negativkontrolle (hier grün) und die Isotypenkontrolle (hier gelb).

Mit einem p-Wert von 0,0026 und einer Korrelation von R=0,917 fand sich ein statistisch auffälliges Ergebnis.

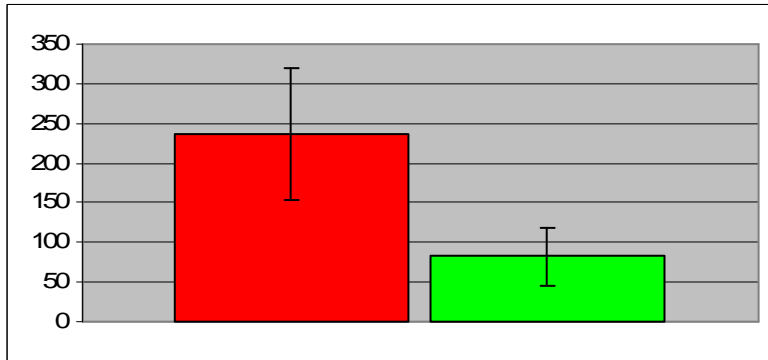


Abb. 21:
Vergleichsdiagramm des MFI für CD40 mit inkubierten mo-DCs (rot) gegenüber den nicht inkubierten Vergleichspopulationen (grün) mit Standardabweichung.

Auch beim schon zuvor erläuterten CD 80 Marker lag der Mittelwert des MFI der Versuchsreihen mit 46,71 (Spannweite: 18,35 – 70,64) weit höher als bei den negativen Vergleichstestungen, wo nur ein Wert von 15,21 (Spannweite: 5,65 – 28,49) erreicht wurde.

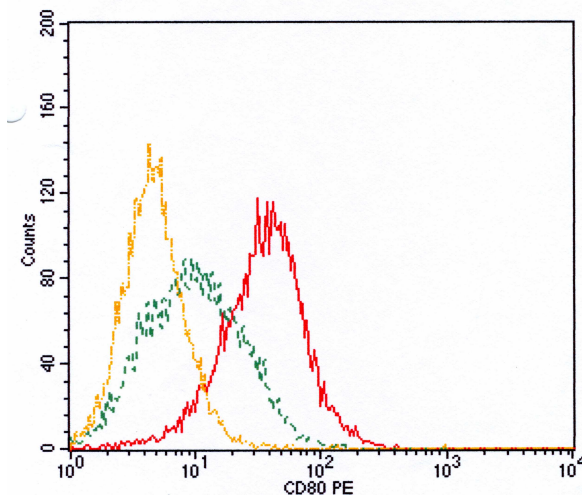


Abb. 22:
Overlay-Diagramm mit CD 80 Expressionsvergleich am Beispiel des Buffy-Coats 03639248-60. Die mit Hyphen beimpften Zellen sind rot dargestellt, die Negativkontrolle grün und gelb die Isotypenkontrolle.

In diesem Fall lag der p-Wert bei 0,0113 und die Korrelation bei $R=0,77$.

Bei der Expression des CD 83 Oberflächenmoleküls war der Unterschied weniger stark ausgeprägt. Der Mittelwert des MFI verzeichnete für die positiven mo-DCs 8,61 (Spannweite: 7,35 – 9,5) und 6,01 (Spannweite: 3,24 – 8,32), der p-Wert lag bei 0,041.

Für das Oberflächenmolekül CD86, war die Steigerung der Präsentation an der Zelloberfläche weit stärker. Der MFI der mo-DCs mit Antigeninkubation lag im Mittel hier bei 221,618 (Spannweite: 127,82 – 331,65), wohingegen die Zellen der Negativpopulation nur einen mittleren MFI-Wert von 23,208 (Spannweite: 12,16 – 45,42) erreichten.

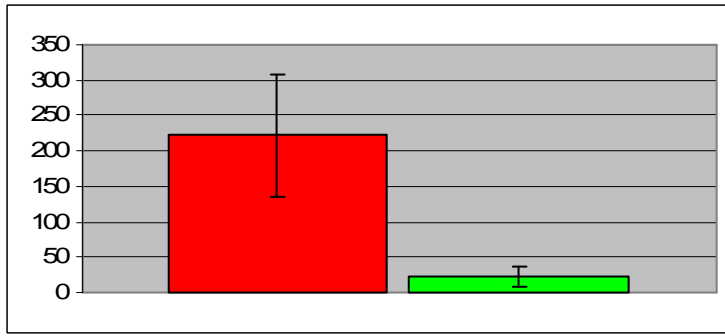


Abb. 23:
CD 86 Vergleich mit Hyphen inkubierten mo-DCs (rot) und Negativkontrolle (grün)

Bei der statistischen Auswertung war auch hier ein auffälliges Ergebnis zu sehen (p-Wert : 0,007).

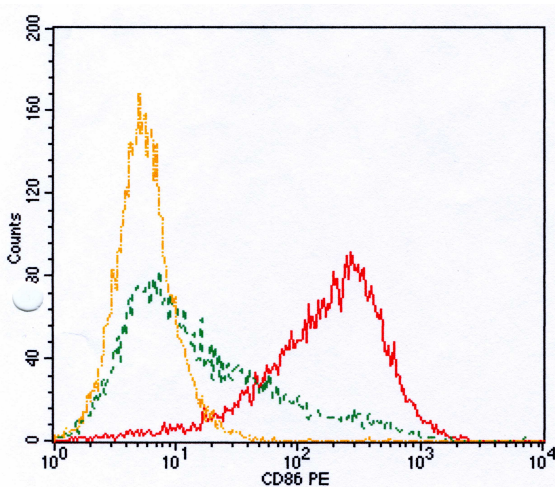


Abb. 24:
CD 86 Overlay-Diagramm mit Hyphen inkubierten mo-DCs (rot), Negativkontrolle (grün) und Isotypenkontrolle (gelb) (Buffy-Coat 03639248)

Auch bei der Messung der MHC-II-Expression (HLA-DR) zeigten sich ähnlich hohe Ausprägungsunterschiede. Für die mit Hyphen beimpften Zellen lag der Mittelwert des MFI bei 385,294 (Spannweite: 296,71 – 489,24), die Negativkontrolle hingegen zeigte einen mittleren MFI von 148,392 (Spannweite: 121,8 – 171).

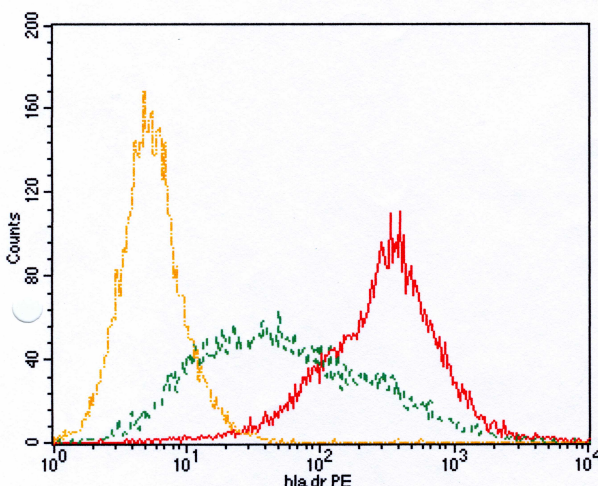


Abb. 25:
Overlay-Diagramm für HLA-DR exemplarisch für den Buffy-Coat 03639248, mit Inkubierten mo-DCs (hier rot dargestellt), Negativkontrolle (hier grün dargestellt) und Isotypenkontrolle (hier gelb dargestellt)

Der p-Wert von 0,0015 und eine Korrelation von $R=0,569$ konnte auch für diesen Marker als statistisch auffällig gewertet werden.

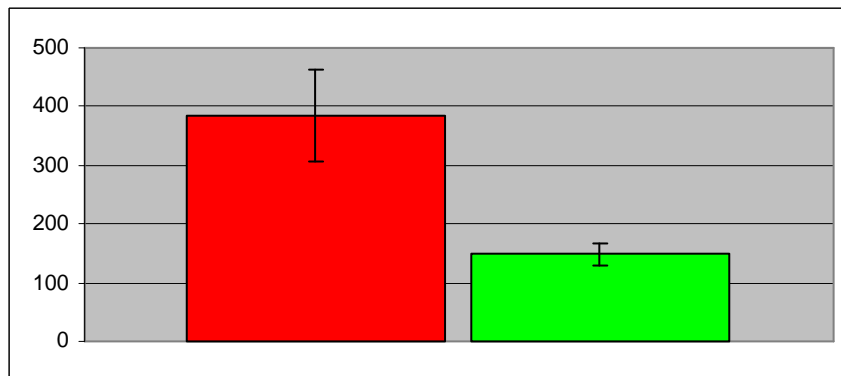


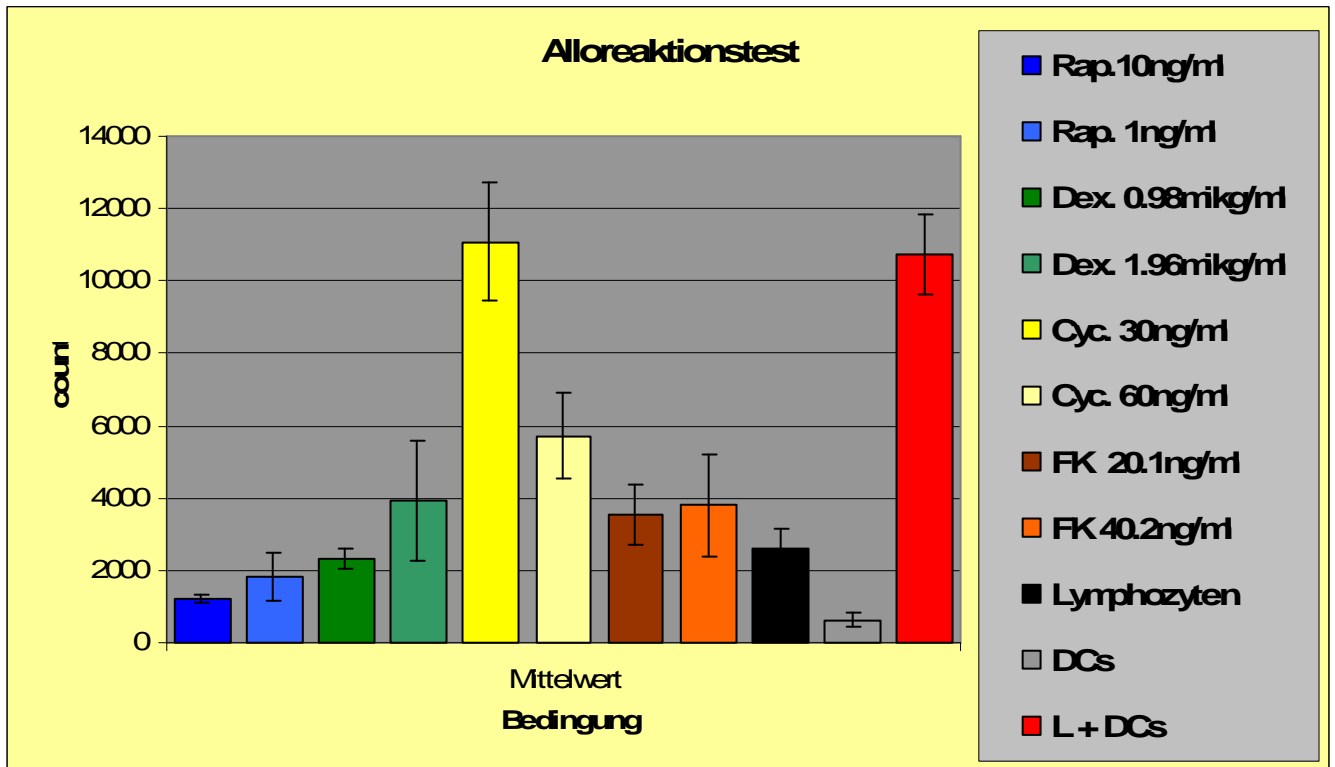
Abb. 26:
HLA-DR Vergleich mit
beimpften moDCs (rot)
und Negativkontrolle
(grün)

3.2 Einfluss klinisch angewandter Immunsuppressiva

Um die Auswirkungen der immunsuppressiv wirkenden Substanzen Rapamycin, Cyclosporin A, FK 506 und Dexamethason auf die in den vorangegangenen Versuchen erfassten Ergebnisse zu untersuchen, wurden weitere Test mit *Aspergillus fumigatus* Inkubationen durchgeführt.

Hierbei sollte die Ausreifung von moDCs nach Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen und deren Beeinflussbarkeit durch diese Immunsuppressiva getestet werden. Außerdem sollten die Auswirkungen der Substanzen auf die *Aspergillus-fumigatus*-spezifische Lymphoproliferation bestimmt werden. Vor den eigentlichen Versuchsreihen waren dabei einige Vorversuche notwendig um die Wirkung der Substanzen in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration auf Lymphozyten einzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden erst Proliferationstest ($n=5$) mit PBMCs unter Einfluss von Immunsuppressiva durchgeführt, bei denen diese mit allogenen Fremdzellen konfrontiert wurden. Die in der Konzentration $1 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ pro well eingesetzten PBMC wurden mit allogenen dendritischen Zellen in der Konzentration $1 \times 10^4 / 50 \mu\text{l}$ pro well versetzt. Hierzu wurden die Immunsuppressiva Dexamethason ($0,98 \mu\text{g/ml}$ und $1,96 \mu\text{g/ml}$), Rapamycin (1ng/ml und 10ng/ml), Cyclosporin A (30ng/ml und 60ng/ml) und FK 506 ($20,1 \text{ng/ml}$ und $40,2 \text{ng/ml}$) zugesetzt. Bei diesen Versuchen diente wieder eine Negativpopulation ohne Immunsuppressivagabe als Vergleichsansatz.

Abb. 27: Beispieldiagramm einer gemischten Lymphozytenkultur unter Immunsuppressivgabe



In diesen Vorversuchen zeigte sich für alle vier Immunsuppressiva eine konzentrationsabhängige Unterdrückung der Lymphoproliferation.

Die Wirkung auf die Lymphoproliferation nach allogener Stimulation zeigt für die Immunsuppressiva in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration unterschiedliche Ergebnisse.

Nach Abschluss dieser Vorversuche begannen die eigentlichen Proliferationstests. Zum einen wurden die PBMCS mit Aspergillus-Hyphen inkubiert, zum anderen kamen Tetanustoxin, CMV-Lysat, ECSAB, und polyklonales Mitogen als Kontrollantigene zum Einsatz.

Neben reinen Mediumkontrollen wurde jedes Antigen mit PBMCs ohne Zusatz von mo-DCs inkubiert.

Nach einigen Reinigungsschritten wurden die DCs wieder mit den aufgetauten Rest-PBMCs vereint. Dieser Ansatz wurde mit den erwähnten Antigenen versetzt, in fünf Populationen unterteilt und mit den verschiedenen Immunsuppressiva beimpft.

Die Konzentration der immunsuppressiven Substanzen orientierte sich an publizierten Konzentrationen (Rapamycin 10ng/ml, Cyclosporin A 48ng/ml, FK 506 8,04ng/ml und Dexamethason 0,4µg/ml).

3.2.1 Ergebnisse der Proliferationstests

Das Ausmaß der Aktivierung und damit der Teilungsrate wurde hierbei als Stimulationsindex angegeben. Die Messungen der unbehandelten PBMCs ohne Zusatz von Antigenen, dendritischen Zellen oder Immunsuppressiva diente als Grundlage zur Bestimmung des Stimulationsindex.

Da die Ergebnisse der drei vorgenommenen Testreihen ähnliche Ergebnisse zeigten, wurden die Ergebnisse exemplarisch an der Versuchsreihe des Buffy-Coats: 04602076-60 vorgestellt. Die Resultate der restlichen Reihen wurden im Anhang tabellarisch aufgezeigt. In den PBMC-Proliferationstests mit den verschiedenen Antigenansätzen und Kontrollpopulationen zeigte sich, dass die Teilungsrate der PBMCs durch die Anwesenheit von zur Ausreifung angeregten dendritischen Zellen stark angeregt wurde. Lag der Wert des Proliferationsindex im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen bei den PBMCs, die nur mit Hyphen inkubiert wurden, bei 4,339 (Buffy-Coat: 04602076-60), so zeigte sich bei den PBMCs, denen zusätzlich noch autogene dendritische Zellen als APCs zugesetzt wurden, ein Indexwert von 38,516 (04602076-60).

Auch bei der Testreihe mit dem ECSAB-Antigen erhöhte sich die Teilungsrate durch den Zusatz der mo-DCs erheblich, so ließ sich hier ein Anstieg von 1,937 ohne DCs hin zu 19,123 mit DCs messen. Bei den anderen eingesetzten Antigenen waren weniger starke Proliferationssteigerungen zu verzeichnen, so lagen die Werte beim CMV-Lysat bei 13,227 für die reine PBMC-Reihe und bei 23,786 für die Probe mit Dendritenzugabe. Auch beim Tetanustoxin war eine Steigerung von 6,465 zu 19,462 durch den APC-Einfluss zu verzeichnen. Der geringere Anstieg durch die zusätzliche Zugabe von dendritischen Zellen ist dadurch zu begründen, dass in den verwendeten PBMCs schon verfahrensbedingt APCs (Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten) enthalten sind. Bei der Austestung der immunsuppressiven Substanzen, die immer einem Ansatz mit PBMCs, Antigen und dendritischen Zellen zusätzlich beigefügt wurden, zeigten sich unterschiedliche Wirkstärken bei den eingesetzten Stoffen. So erwies sich Rapamycin in der Konzentration von 10ng/ml bei der Unterdrückung der Zellproliferation als potentestes Mittel, und zeigte in allen Testreihen eine stark ausgeprägte Minderung des Proliferationsindex im Verhältnis zur Vergleichsprobe mit PBMCs, Antigen und mo-DCs. Im Beispiel des Buffy-Coats 04602076-60 lag der Indexwert bei den mit Hyphen beimpften Zellen für Rapamycin mit 4,93 auf dem

Niveau der Lymphozytenprobe ohne APCs und weit unter dem Wert für die Probe mit DCs (38,516), obwohl auch im Rapamycinansatz mo-DCs enthalten waren. Beim CMV-Lysat lag das Ergebnis mit 3,751 sogar unter dem Ansatzes ohne APC-Zugabe (13,227). Bei ECSAB (Indexwert : 3,635) und Tetanus (Indexwert: 2,656) waren die Ergebnisse entsprechend. Für das Cortisol-Derivat Dexamethason zeigte sich ein geringerer Effekt.

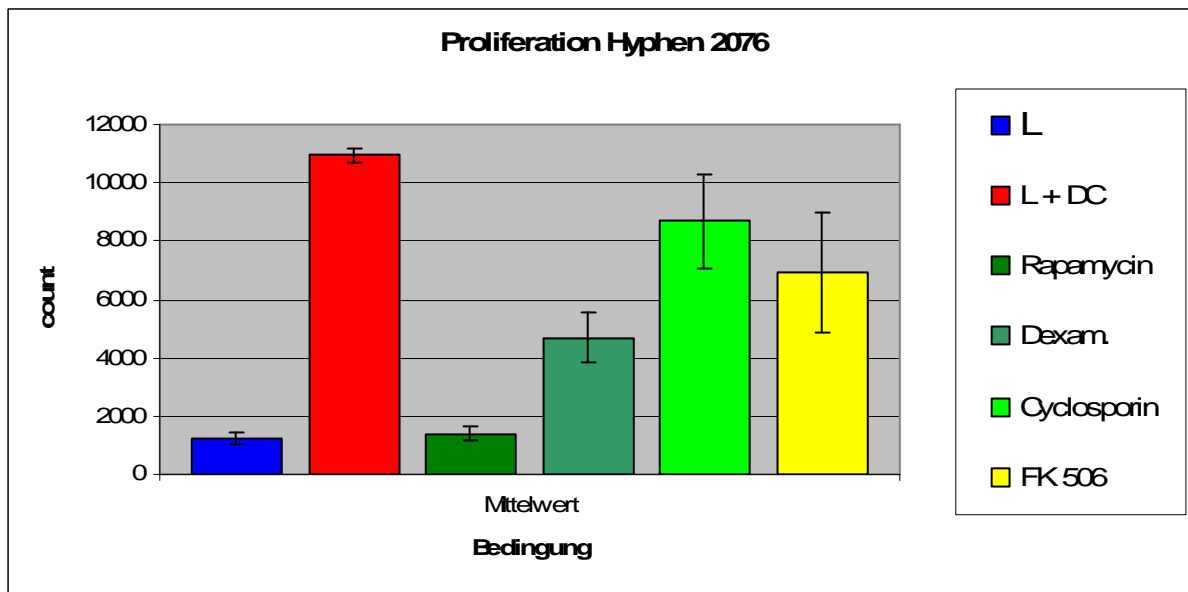


Abb. 28: Proliferation mit *Aspergillus-fumigatus*-Hyphen unter Immunsuppressivaeinfluss (Buffy-Coats 04602076-60)

Bei den Versuchsreihen mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen war im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Glucocorticoid eine Reduktion der Teilungsaktivität der Zellen zu verzeichnen, die ca. um den Faktor 2 erniedrigt war. Beim Beispiel des Buffy – Coats 04602076-60 lag der Proliferationsindexwert bei 16,472 im Gegensatz zu 38,516 ohne Dexamethason.

Auch bei den restlichen Antigenen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, bei CMV senkte sich der Proliferationswert durch den Kortikoideinsatz von 23,786 auf 12,477, für ECSAB war eine Reduktion von 19,123 auf 10,242 festzustellen.

Bei den Messungen beim Tetanustoxoid hingegen ließ sich nur eine geringe Verminderung von 19,462 auf 18,204 bestimmen. Für das Immunsuppressivum FK 506 (Tacrolimus/8,04ng/ml) war ebenfalls bei allen Durchläufen eine Unterdrückung der Zellteilung zu registrieren.

Im Beispielversuch ergaben sich folgende Werte:

Antigen	Indexwert FK 506	Indexwert Positivkontrolle
Hyphen	24,299	38,516
CMV-Lysat	17,176	23,786
ECSAB	14,204	19.123
Tetanus	16,488	19,462

Abb. 29: Proliferationsindexwerte für FK 506 (Buffy-Coats 04602076-60)

Bei der letzten Substanz, dem Ciclosporin A, war mit der eingesetzten Konzentration von 48 ng/ml kein nennenswerter Einfluss auf die Proliferationsrate der PBMCs zu sehen.

3.2.2 Mo-DC-Ausreifung unter Immunsuppressivaeinfluss

Nach den Proliferationsversuchen wurden die Auswirkungen der vier Immunsuppressiva (Rapamycin, Dexamethason, FK506 und Ciclosporin A) auf die Ausreifungsreaktion unreifer mo-DCs nach Hypheninkubation untersucht. Hierzu wurden wiederum drei Versuche mit dendritischen Zellen durchgeführt. Die Versuchsanordnung entsprach dabei dem der vorangegangenen Hypheninkubationstests, in denen die aus Monozyten gewonnenen mo-DCs über 24 Stunden im Brutschrank beimpft wurden. Ur wurde diesmal zusätzlich zu den *Aspergillus fumigatus*-Hyphen jeweils ein Immunsuppressivum mit zugegeben. Die eingesetzten Konzentrationen waren dieselben wie in den vorausgegangenen Proliferationsmessungen mit PBMCs (Rapamycin 10ng/ml, Dexamethason 0,4µg/ml, Ciclosporin A 48ng/ml, FK 504 8,04ng/ml). Die anschließend gemessenen Ergebnisse wurden dann mit denen der Positivkontrollen ohne Immunsuppressiva und denen der Negativkontrolle (nur mo-DCs ohne Hyphen jeweils mit und ohne Immunsuppressivazugabe) verglichen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit Hyphen und Immunsuppressiva zeigten hinsichtlich der Unterdrückung von Ausreifungsreaktionen eine jeweils sehr individuell verschiedene Ausprägung.

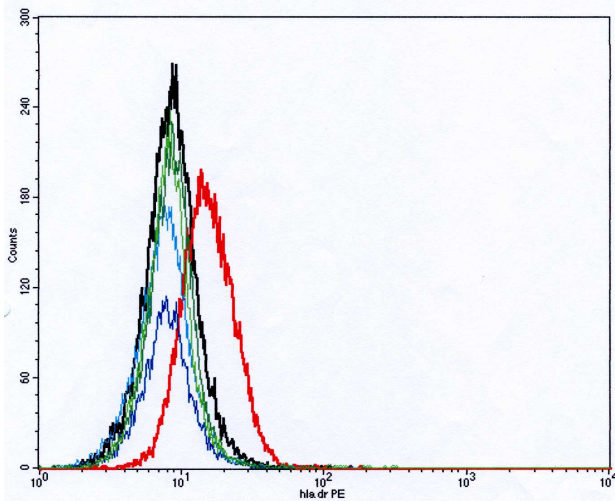


Abb. 30: Overlaydiagramm des Buffy-Coats 03600451-60 zur Zytometermessung des MHC-Klasse II-Moleküls:

Die Positivkontrolle (hier rot dargestellt) ohne Rapamycin-Zugabe liegt deutlich über den Ansätzen mit Rapamycin (hier hell- und dunkelgrün) und den Negativkontrollen

Während Dexamethason in allen drei Versuchsreihen zumindest in der Lage war die Ausprägung des CD 86 Markers zu hemmen, konnte bei den restlichen Tests mit dem Glucocortikoid kein einheitliches Bild gewonnen werden. So zeigte Dexamethason in zwei von drei Versuchen eine Senkung der CD 80 Ausprägung und in jeweils einem eine Unterdrückung des CD 40 und HLA-DR Markers. Auch das FK 506 war in zwei von drei Fällen in der Lage, die CD 86 Expression der ausgereiften mo-DCs in geringem Maß zu Senken und beim Ciclosporin A war dies nur in einem von drei Versuchen zu registrieren. Bei allen anderen Test und allen Inkubationen unter Rapamycineinfluss blieb die Ausreifung der dendritischen Zellen von den Immunsuppressivawirkungen unbeeinflusst. Diese Daten deuten an, dass insbesondere Kortikosteroide eine zentrale Rolle in der Hemmung der *Aspergillus-fumigatus*-induzierten DC-Aktivierung zukommen könnte.

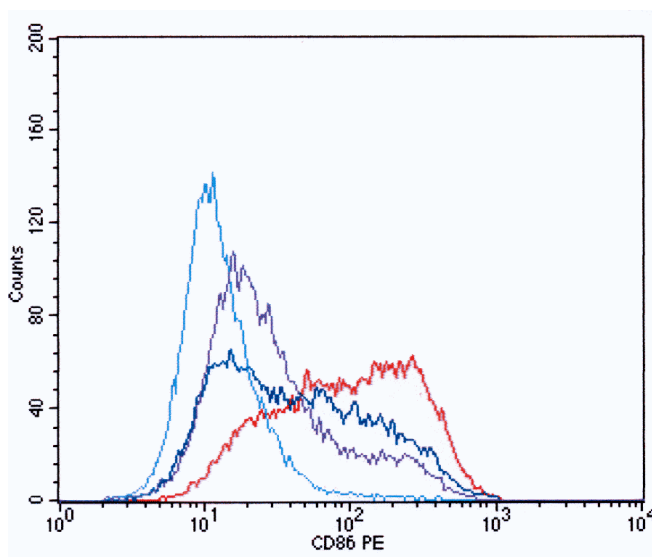


Abb. 31: Overlaydiagramm anhand des Buffy-Coats 04602076-60:

Die Positivkontrolle (hier rot dargestellt) zeigt eine höhere Ausprägung des CD 86-Oberflächenmoleküls als das bei den entsprechenden Versuchen mit Dexamethason(hellblau), FK 506 (violett) und Ciclosporin A (dunkelblau)

3.2.3 IL-4- und IFN- γ -Produktion unter Immunsuppressiva

Zusätzlich zu den Durchflusszytometer-Untersuchungen wurde die Interleukin 4 und Interferon γ -Produktion der inkubierten Zellen gemessen. Hierzu wurden nach der 24-stündigen Beimpfung der PBMC mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen unter Anwesenheit Aspergillus-spezifischer dendritischer Zellen aus den 24-Well Kulturplatten vor der Zellernte 1ml/Well Überstand abgesaugt.

Der Überstand wurde anschließend mit Hilfe von fertig gelieferten Zytokin-Elisa-Kits aufbereitet und auf die enthaltenen Zytokinmengen hin untersucht. Auch diese Versuche wurden anhand von drei Buffy-Coat (n=3) mit allen vier Immunsuppressiva wiederholt, wobei die eingesetzten Konzentrationen dieselben waren wie in den Versuchen zuvor.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Hyphen wurden auch die Experimente mit CMV-Lysat und eine Negativkontrolle auf IL-4- und IFN- γ -Gehalt hin überprüft. Hinsichtlich des Interleukins 4 zeigten die untersuchten Proben keine eindeutige Wirkung der Immunsuppressiva. Lediglich Ciclosporin A zeigte bei allen Buffy-coats eine Reduktion der IL-4-Sekretion.

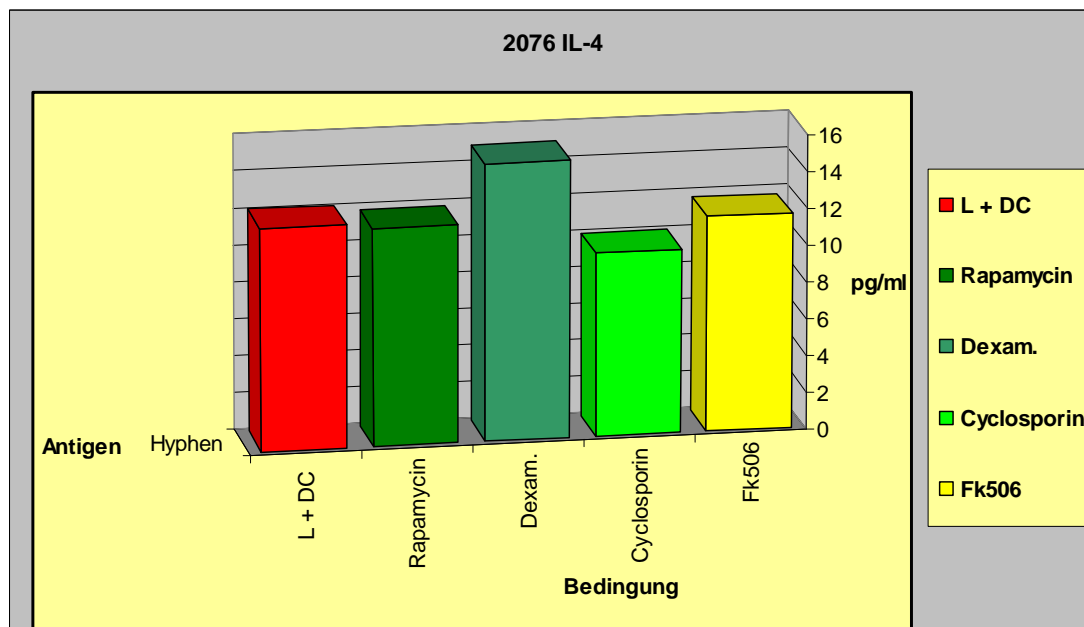


Abb. 32: Balkendiagramm zum Buffy-Coat 04602076-60: Nur Ciclosporin A (hier hellgrün dargestellt) zeigt eine größere IL-4-Reduktion

Bei den Messungen der von den PBMCs produzierten IFN- γ -Menge waren die Ergebnisse eindeutiger.

So wurde durch die Zugabe von Rapamycin die von den Zellen ausgestoßene Interferonmenge durchweg stark gesenkt.

Im Versuch mit dem Buffy-Coat 04602076-60 etwa sank die Zytokinmenge von 10,56 pg/ml in der Positivkontrolle mit PBMCs und DCs auf 0,54 pg/ml in dem mit Rapamycin versetzten Ansatz.

Auch Dexamethason bewirkte in den drei Messreihen immer eine massive Reduktion des INF- γ -Ausstoßes. In dem exemplarischen Versuch (04602076-60) sank die Menge von 10,56 pg sogar unter die Nachweisgrenze des verwendeten Zytokin-ELISAs. Für Ciclosporin A zeigte sich das gleiche Bild allerdings nicht so ausgeprägt wie bei Rapamycin und Dexamethason. Im Beispielversuch lag die Interferonproduktion mit 6,92 pg unter der Positivkontrolle. Bei der Substanz FK 506 hingegen wiesen die Messungen in nur einem von drei Tests eine Reduktion des Zytokinausstoßes auf. Beim exemplarischen Buffy-Coat lag INF- γ bei 10,72 pg und somit auf dem Niveau der Negativkontrolle.

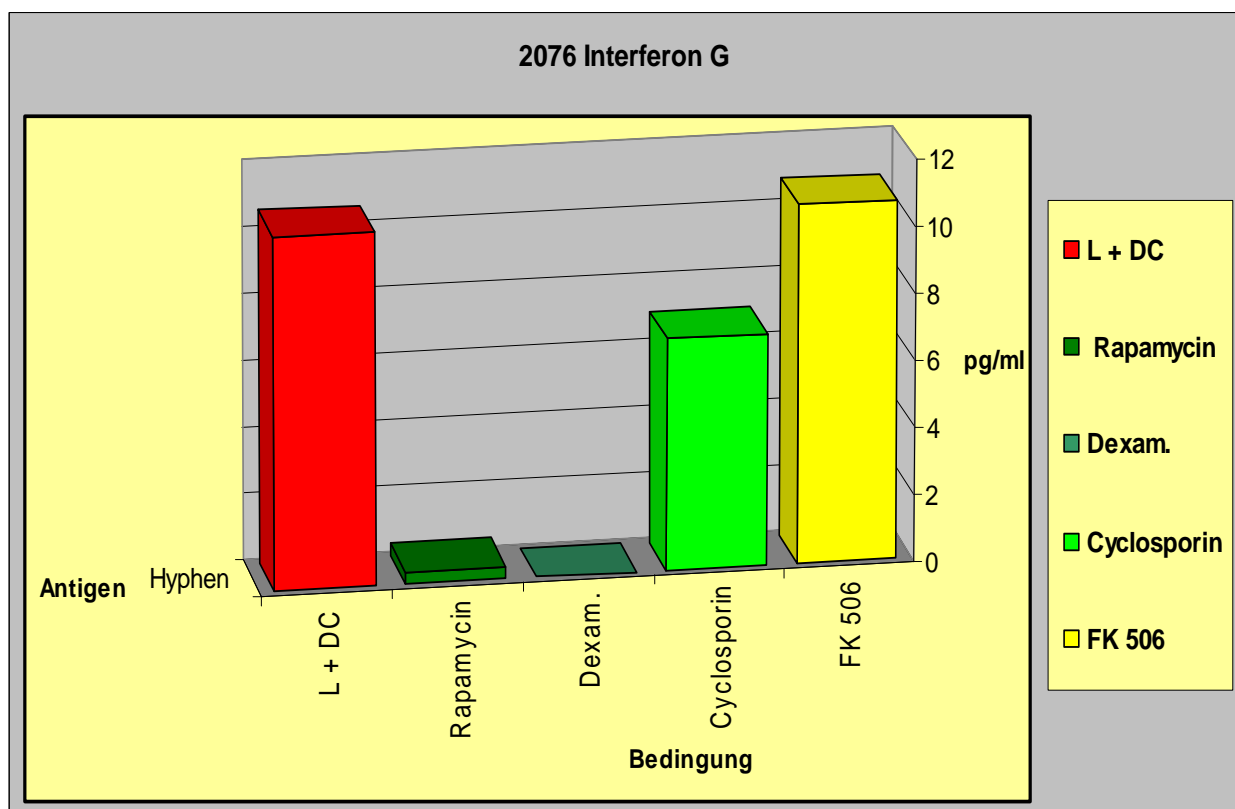


Abb. 33: Balkendiagramm anhand des Buffy-Coat 04602076-60: Die Positivkontrolle (hier rot dargestellt) liegt weit höher als die entsprechenden Werte für die Reihen mit Rapamycin, Dexamethason und Ciclosporin A

4 Diskussion

Invasive Pilzinfektionen sind über die letzten 30 Jahre zu einer immer größer werdenden Bedrohung für immunsupprimierte Patienten geworden.

Die mit zunehmender Inzidenz auftretenden opportunistischen Erreger zeichnen sich hierbei noch immer durch eine hohe Mortalitätsrate aus.

In einer vergleichenden chronologischen Untersuchung auf der Grundlage von Autopsiedaten der Universität Frankfurt etwa zeigte sich im Zeitraum zwischen 1978 und 1992 ein starker Anstieg der Prävalenz invasiver Pilzinfektionen. Lag diese 1978 bei den durchgeführten Autopsien noch bei 2,2 %, so wurde in der Zeit nach 1987 bereits eine Prävalenz von 5,1 % ermittelt. Als Haupterreger waren dabei vor allem *Candida* spp. und *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen worden.

Interessanterweise blieb die Prävalenz der *Candida*-Infektionen über dem gleichen Zeitraum hinweg konstant und zeigte sogar leichte Rückgangstendenzen, so dass vor allem das vermehrte Auftreten der invasiven Aspergillose für die Gesamtzunahme verantwortlich war (Groll et al., 1996). Das ubiquitäre Vorkommen von *Aspergillus fumigatus* sowie die wachsende Anzahl immunsupprimierter Patienten weltweit sind die ausschlaggebenden Faktoren dafür, dass die invasive Aspergillose heute zu den häufigsten Erkrankungen beim abwehrgeschwächten Patienten zählt. Mit der Zunahme der Inzidenz dieser sich meist fatal auswirkenden Erkrankung über die letzten Jahrzehnte hat sich auch die Epidemiologie der Aspergillose immer weiter verändert. Waren in der Vergangenheit in erster Linie Menschen mit hämatologischen Neoplasien aufgrund lang bestehender Granulozytopenie die Leidtragenden, so finden sich systemische Pilzinfektionen nun auch bei immunsupprimierten Patienten ohne stark gesenkte Neutrophilenanzahl. (Maertens et al., 2001b)

Invasive Aspergillosen werden insbesondere bei Patienten mit allogenen Stammzell- oder soliden Organtransplantationen beobachtet (Dixon et al., 1996b), wobei nach allogener Stammzelltransplantation und Lebertransplantationen ein weit größeres Aspergilloserisiko berichtet wird als nach Nierentransplantationen. (Boon et al., 1991a) Ein weiterer immer wichtiger werdender prädisponierender Faktor stellt die fortgeschrittene HIV Infektion dar. So erkrankten z. B. in einer Studie des National Center for Human Immunodeficiency Virus, Atlanta, Georgia 3,5% aller erfassten AIDS-Patienten an einer Aspergillose, wobei die Inzidenz bei CD 4 positiven

Lymphozyten von unter $50/\text{mm}^3$ bei 10,2 % lag. Die Anzahl der an Aspergillose Erkrankten, die nach einem Jahr noch am Leben war, lag unter 26% (Holding et al., 2000a). Neben weiteren Prädispositionsfaktoren wie etwa der chronisch granulomatösen Erkrankung (Sambatakou et al., 2003), niedriges Geburtsgewicht, schwere Krankheiten bei Neugeborenen (Dixon et al., 1996b; Moser and Murphy, 2000), Defekte der Makrophagenfunktion (Morgenstern et al., 1997) Chemotherapie oder Cavitärer Lungenbefall durch eine Tuberkulose (Lee et al., 2004) stellt vor allem auch die Behandlung mit Glucocortikoiden einen wichtigen Risikofaktor für den Ausbruch einer Aspergillose dar (Bodey and Vartivarian, 1989a).

Die pulmonale Aspergillose ist die bei weitem häufigste klinische Manifestation der Erkrankung (Lumbreras and Gavalda, 2003), da die in der Atemluft ubiquitär vorkommenden Konidien des Schimmelpilzes aufgrund ihres geringen Durchmessers leicht in die Alveolen der Lunge vordringen können (Latge, 1999a).

Bei einem Teil der Patienten kommt es zur Ausbildung eines abgeschlossenen Aspergilloms. Dies ist oft bei Patienten mit vorbestehender Tuberkulose der Fall (Lee et al., 2004). Bei schwer immunsupprimierten Patienten kommt es zur Dissiminierung der Infektion. In Untersuchungen postmortem ließen sich in vielen Fällen cerebraler Befall, Lymphknotenbeteiligung, Osteomyelitiden, infektiös bedingte Gefäßverschlüsse, Fälle von Mediastinitis sowie Aspergillusbefall von abdominalen Organen und des Blutes nachweisen. (Karim et al., 1997; Patel et al., 1996; Vaideeswar et al., 2004)

Neben seltenen Fällen von chronischer pulmonaler Aspergillose bei Patienten mit Tuberkulose und cystischer Fibrose (Denning, 2001) sind auch der primär kutane Befall mit *Aspergillus fumigatus* (Raszka, Jr. et al., 1993) und Darminfarkte als Erstmanifestation (Cohen and Heffner, 1992a) in der Literatur beschrieben worden. Die große Problematik invasiver Infektionen mit *Aspergillus*-Species ist nach wie vor die Schwierigkeit der rechtzeitigen Diagnosestellung.

Da die pulmonale Aspergillose nur sehr unspezifische Symptome zeigt, bedarf es hochsensitiver und spezifischer Screeningmethoden, um eine frühzeitige Diagnose und Behandlung zu gewährleisten. Wegen der unzureichenden Aussagekraft etablierter Untersuchungen wie Blut- und Sputumkulturen, Bronchiallavage, Biopsien und Urinuntersuchungen, werden sensitive Nachweisverfahren wie sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Polymerase-ketten-reaktion (PCR)

zum Erregernachweis eingesetzt (Gari-Toussaint and Piens, 2001; Reiss et al., 1998; Salonen et al., 2000).

Hierbei zeigt vor allem die PCR-ELISA und der quantitative LightCycler assay in klinischen Studien eine hohe Sensitivität in der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* –Infektionen (Hebart et al., 2000; Loeffler et al., 2002; Pham et al., 2003).

Neben der Diagnostik ist auch die Behandlung der invasiven Aspergillose nach wie vor ein Problemfeld der modernen Medizin. Doch auch hier gab es in der letzten Dekade sichtlich Fortschritte unter anderem durch die Einführung neuer Antimykotika. Hierbei sind vor allem Azole neuer Generation wie das Itraconazol und Voriconazol zu nennen, oder auch das seit wenigen Jahren eingesetzte Caspofungin (Maertens et al., 2004). Das seit 30 Jahren eingesetzte Amphotericin B hat vor allem in seiner besser verträglichen liposomalen Form (Ambisome) eine gute Effektivität (de Pauw and Meunier, 1999b). Um der wachsenden Bedrohung durch die Aspergillose bei immunsupprimierten Patienten und deren weiterhin extrem hohen Mortalitätsrate zu begegnen, werden Kombinationstherapien und prophylaktische Antimykotikagaben therapeutisch geprüft. (de Pauw, 2004; Lumbreras and Gavalda, 2003; Marr et al., 2004)

Die invasive Aspergillose wird auch in Zukunft eine diagnostische und therapeutische Herausforderung bleiben, da die Pathophysiologie des Pilzerregers und die aspergilluspezifischen Immunreaktionen noch nicht ausreichend untersucht sind. (Hope and Denning, 2004) Während in der Vergangenheit die Alveolarmakrophagen der Lunge und neutrophile Granulozyten als wichtigste Abwehrzellen gegen invasive Pilzerreger angesehen wurden, und die Hauptrisikofaktoren somit in einer Störung der Makrophagenfunktion oder Kortikoidsuppression gesehen wurde, so zeichnen neuere Untersuchungen ein differenzierteres Bild der ablaufenden Immunvorgänge. (Gustafson et al., 1983; Palmer et al., 1991)

So konnte in einer Studie der University of Texas nachgewiesen werden, dass Lymphozyten bereits in der Frühphase der Infektion mit *Aspergillus fumigatus* eine wichtige Rolle in der Immunabwehr innehaben. In den Untersuchungen zeigte sich, dass T-Lymphozyten bei direktem Kontakt mit den Konidien des Pilzerregers dessen Zellen nachweislich schädigen und für eine signifikante Reduktion des Erregers sorgen. Des Weiteren bewirkte der Kontakt mit T-Lymphozyten bei den Konidien von *Aspergillus fumigatus* eine verminderte Zelladhäsionsfähigkeit und somit erniedrigte Patogenität. (Martins et al., 1998)

Aber auch in fortgeschritteneren Stadien der Aspergillose spielen T-Lymphozyten eine tragende Rolle in der Erregerabwehr. In einer vergleichenden Untersuchung an der Universität Tübingen über gegen *Aspergillus fumigatus*-Antigene gerichtete Zellreaktionen, konnte die schon zuvor an Mäusen festgestellte protektive Wirkung einer überwiegenden T(H)1-Reaktion der T-Helferzellen mit einer hohen Interferon-Gamma/Interleukin 10-Ratio weiter untermauert werden.

(Cenci et al., 2000; Hebart et al., 2002a). Diese schützende Einfluss T(H)1 spezifischer Zytokine, die mit den Symptomen einer inflammatorischen Reaktion assoziiert sind, konnte im Tiermodell mit Hilfe von anti-IFN- γ - und anti-TNF- α -Antikörpern dadurch gezeigt werden, dass mit Antikörpern behandelte Tierpopulationen eine erhöhte Mortalitätsrate aufwiesen (Nagai et al., 1995). Außerdem konnte von Roilides et al. (1998) ein steigender Effekt von TNF- α auf die Phagozytosefunktion von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen in Tierversuchen nachgewiesen werden (Roilides et al., 1998).

Neben der erhöhten Resistenz gegenüber der invasiven Aspergillose durch die von CD4 positiven T-Helferzellen vermittelte T_H1-Antwort, bewiesen die Forschungsergebnisse von Cenci et al. auch die Entstehung eines T_H1-Gedächtnisses über CD4+ T-Zellen mit protektiver Wirkung gegen *Aspergillus fumigatus*. (Cenci et al., 2000) Um diese entscheidenden Funktionen in der Immunabwehr gegen Pilzerreger durch die T-Zellen zu gewährleisten, sind es immunvermittelnde Zellen zur Decodierung der Antigeninformationen nötig. Nur so ist das Immunsystem der ständigen Exposition gegenüber zwischen unizellulären und filamentösen Formen wechselnden Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* gewachsen. Neben den Alveolarmakrophagen, Granulozyten und Monozyten sind vor allem dendritische Zellen auf Antigenpräsentation und Immunmodulation spezialisierte Zellen.

Daher ist die Reaktion dieser APCs gegenüber *Aspergillus fumigatus* Thema zahlreicher Studien und auch Teil dieser Arbeit. Zur Austestung der Reaktion dendritischer Zellen wurden im Rahmen unserer Untersuchungen aus Monozyten generierte dendritische Zellen verwendet, deren Funktion, Ausreifungsreaktion und Migrationsverhalten nach den Ergebnissen mehrerer Studien mit denen von CD34 positiven dendritischen Zellen aus dem Knochenmark übereinstimmt (Richters et al., 2002; Vogelsang et al., 1999; Xu et al., 1995).

Die unausgereiften moDCs wurden nach Abschluss ihrer Generierungszeit bei den Untersuchungen drei verschiedenen *Aspergillus fumigatus* spezifischen Antigenen ausgesetzt. Bei den im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzwerten nach Antikörperfärbung zeigte sich für das native, das sezernierte und das extrazelluläre Antigenpräzipitat eine Veränderung der Oberflächenmoleküle der untersuchten DCs, die im Sinne einer Ausreifungsreaktion zu werten war. Es kam dabei zu vermehrten Expression des major histocompatibility complex (MHC) der Klasse II, des DC-spezifischen CD83-Marker sowie der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Diese Ausreifungsreaktionen der dendritischen Zellen erfolgte bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit einer Proteinkonzentration von 5µg/ml, die sich an den Vorgaben des „Laboratoire des Aspergillus“ und der ermittelten Optimalkonzentration der Vorgängerarbeit orientiert (Hebart et al., 2002a). Das ebenfalls eingesetzte native, zelluläre Extrakt von *A. fumigatus* (ECSAB), dessen lymphoproliferative Wirkung genau wie die des PPSABs experimentell bestätigt ist, zeigte hingegen keine Induktion einer Ausreifung von unreifen moDCs. Die gemessenen Parameter MHC Klasse II, CD80, CD83 und CD86 blieben auf dem Niveau der nicht inkubierten Kontrollpopulation. Im Gegensatz dazu war die Stimulationswirkung von mit durch Alkohol abgetöteten Hyphen besonders stark ausgeprägt.

Bei der 24-Stundeninkubation mit einer Hyphe/5 Zellen kam es zu einer deutlichen Hochregulierung der ausreifungstypischen Oberflächenmarker. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PPSAB und *Aspergillus fumigatus*-Hyphen eine eindeutige Ausreifung der behandelten moDCs induzieren. Diese Ergebnisse liegen in Übereinstimmung der bisher in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen. So konnte eine Forschungsgruppe der University of Texas nachweisen, dass sowohl moDCs als auch aus CD34 positiven Vorläuferzellen angezüchtete dendritische Zellen auf eine Inkubation mit hitzeinaktivierten *A. fumigatus*-Konidien im Sinne einer Ausreifung reagieren. Auch hier zeigte sich hinsichtlich der MHC-Klasse II und der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 eine vermehrte Expression an der Zelloberfläche der DCs. Des Weiteren wurde auch eine erhöhte Interleukin 12-Produktion der mit *Aspergillus* in Kontakt gekommenen DCs festgestellt (Graziutti et al., 2001a). Die starke Stimulationswirkung von *Aspergillus*antigenen auf DCs mit Induktion von deren Ausreifung ist mittlerweile in mehreren weiteren Untersuchungen bestätigt worden (Buentke and Scheynius, 2003a).

Auch die genaueren molekularen Vorgänge mit denen DCs Antigene von *A. fumigatus* binden und internalisieren sowie die dabei beteiligten Moleküle, wie das DC-spezifische ICAM-3-grabbing nonintergrin (DC-SIGN) waren in den letzten Jahren Gegenstand der Forschung (Serrano-Gomez et al., 2004). Die Rolle der unausgereiften und ausgereiften dendritischen Zellen im Ablauf der Immunreaktion gegenüber dem *Aspergillus fumigatus*-Erreger beschränkt sich nach neueren Forschungsdaten aber nicht nur auf die Phagozytose, Antigenpräsentation und Induktion einer T-Zellproliferation, wie sie sich auch in den zu dieser Arbeit gehörenden Proliferationstests zeigte. Stattdessen wird nun davon ausgegangen, dass die DCs im Rahmen ihrer Decodierung der Erregerinformation und der Antigenpräsentation gegenüber den T-Helferzellen auch die T_H-Polarisation dieser CD4⁺ T-Zellen maßgeblich beeinflussen (Claudia, M. et al., 2002).

Hierbei wird es immer wahrscheinlicher, dass für den Einfluss der DCs auf die Differenzierung in T_H1- und T_H2-Subpopulationen der CD4 positiven T-Zellen auch spezifische Untergruppen innerhalb der dendritischen Zellen verantwortlich sind. Diese Spezialisierung, die sich anscheinend während der Ausreifung der DCs über TLRs (Toll-like receptor) wie dem TLR 2 vollzieht, wäre damit der Ausgangspunkt für die Ausprägung einer gegenüber *Aspergillus fumigatus* protektiven T_H1-Immunantwort oder einer für die Aspergillose prädisponierenden T_H2-Reaktion (Bozza et al., 2002; Constant and Bottomly, 1997a; Hertz et al., 2001; Moser and Murphy, 2000). Die bedeutende Rolle des Zusammenspiels von T-Lymphozyten und dendritischer Zellen in der Immunabwehr gegenüber *Aspergillus fumigatus* lässt sich an einem wichtigen Patogenitätsfaktor des Erregers selbst festmachen. So ist es dem MD Anderson Cancer Center in Houston Texas gelungen, zu beweisen, dass das für den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* spezifische Mykotoxin Gliotoxin, einerseits die T-Zellfunktion senkt und andererseits auch die Antigenpräsentation durch APCs negativ beeinflusst. Diese Substanz konnte im Serum von Patienten mit invasiver Aspergillose nachgewiesen werden. Ferner wurde festgestellt, dass Gliotoxin sowohl in Monozyten als auch in dendritischen Zellen in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Stanzani et al., 2004).

Die Erkenntnisse aus der immunologischen Forschung werden zu experimentellen Behandlungsstrategien umgesetzt, so z.B. im Sinne einer Vakzinierung mit ex-vivo generierten autologen dendritischen Zellen, die mit *Aspergillus*-Antigenen beladen sind. Diese Vakzination mit DCs entspricht dabei im Grunde den Verfahren, die auch

bei der Behandlung von anderen Infektionen und Tumorerkrankungen derzeit in klinischen Studien untersucht werden (Banchereau et al., 2003a; Buentke and Scheynius, 2003a; Narita et al., 2001; Pospisilova et al., 2002; Ramadan et al., 2004).

Die Wirksamkeit entsprechender DC-Impfungen gegenüber *A. fumigatus* konnte im Tiermodell bereits nachgewiesen werden (Cenci et al., 2000).

Da Abwehrschwäche eine entscheidende Rolle für das Risiko der Entwicklung einer invasiven Aspergillose darstellt, ist es wichtig, die Wirkung klinisch angewandter immunsuppressiver Substanzen auf das Immunsystem und besonders auf die DCs zu untersuchen. In den Versuchen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurde daher im Rahmen eines Pilotversuchs der Einfluss von Kortikosteroiden und neuerer Immunsuppressiva auf die Ausreifung von DCs nach Kontakt mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen getestet. Ebenso wurde ihre Wirkung auf eine durch Aspergillus-spezifische DCs getriggerte Lymphoproliferation untersucht. Dexamethason und ähnliche Glucocortikoide, deren Einnahme schon lange als Risikofaktor für eine Aspergillus-Infektion gilt, haben eine hemmende Wirkung auf die Effektorfunktion und Zytokinproduktion von T-Lymphozyten gezeigt, der eine Unterbrechung der Aktivierungskaskade an mehreren Stellen und Hemmung der T-Zell-Rezeptor-Signalübertragung bei den T-Zellen zu Grunde liegt (Van Laethem et al., 2001).

Neben dem inhibitorischen Einfluss des Dexamethasons auf Lymphozyten, sind auch Effekte auf die Zellfunktion der dendritischen Zellen in der Literatur beschrieben. So beschreibt Matasic et al. (1998) die Wirkung von Dexamethason auf die Tumornekrose-Faktor alpha induzierte Ausreifung von unreifen DCs. In diesen Untersuchungen war eine Verminderung der Expression des MHC-Klasse II, der costimulatorischen Moleküle und der Interleukin 12-Produktion zu verzeichnen. Auch die Fähigkeit, allogene T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren, wurde eingeschränkt, was sich in den Proliferationstest im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls zeigte. Im Gegensatz dazu wird für monozytentypische Marker wie CD14, CD36 und CD68 eine erhöhte Präsentation auf der Oberfläche der untersuchten Zellen beschrieben (Matasic et al., 1999).

Aber auch schon bei der Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten mit Hilfe der Zytokine GM-CSF und Interleukin 4 ist die Wirkung von Dexamethason im Sinne einer sinkenden Ausdifferenzierungsrate in DCs und einer geringeren

Ausreifungsfähigkeit auf TNF- α Behandlung beschrieben worden (Piemonti et al., 1999). In einer Studie der Tohoku University School of Medicine, Japan, wird bei mit LPS und bakteriologischen Toxinen stimulierten unreifen DCs durch Dexamethason eine verminderte CD 86 Expression und eine reduzierte TNF- α -Produktion festgestellt. Einen Effekt der Substanz auf die Expressionsstärke von MHC-Klasse II oder CD54 konnte nicht aufzeigt werden (Manome et al., 2000).

Im Gegensatz dazu beschreibt de Jong et al. (1999), dass unreife DCs durch die Beeinflussung mit Hydrokortison Klobetasol-17-Propionat während einer LPS-Stimulation lediglich eine Reduktion der Ausschüttung der Zytokine IL-12, TNF- α und IL-6 zeigten, die Oberflächenmoleküle in ihrer Ausprägung jedoch unverändert blieben (de Jong et al., 1999). Auch in dem abschließenden Pilotversuch als Teil dieser Arbeit war eine ähnliche Wirkung des Dexamethasons auf die DC-Ausreifung erkennbar.

So zeigte das Kortikoid, bei Einsatz während der Inkubation mit *Aspergillus*hyphen zugesetzt, in allen Versuchen eine Reduktion der CD86 Präsentation auf der Zelloberfläche der DCs im Vergleich zur Positivkontrolle. Auch Die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD40 sowie MHC-Klasse II konnten zumindest teilweise unterdrückt werden, wohingegen die CD83-Expression unbeeinflusst blieb. Des Weiteren zeigte die Substanz erwartungsgemäß eine Senkung der *Aspergillus*-spezifischen Lymphoproliferation. Hinsichtlich der ausgeschütteten Zytokine war eine fast komplette Blockade des Interferon- γ und eine leichte Steigerung der Interleukin 4-Menge zu sehen. Die molekulare Ursache der suppressiven Wirkung auf nahezu alle Immunzellen, lies sich in den Tierexperimenten der University of California mit der Inhibition des nuklear factor kappa B (NF-kappa B) in Verbindung bringen, der bei der Aktivierung vieler immunregulatorischer Gene beteiligt ist (Auphan et al., 1995).

Auch die beiden Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK 506 (Tacrolimus), die unter anderem zur Unterdrückung von Graft-versus-host-Reaktionen bei Organ- und Knochenmarkstransplantationen eingesetzt werden, sind in der Literatur in Hinblick auf ihren Einfluss auf Immunzellen hin gut untersucht.

Im Bezug ihrer Wirkung auf T-Zellen ist für beide Substanzen eine Unterdrückung der Interleukin 2-Produktion bei CD4+ T-Lymphozyten sowie eine effektive Blockade von CD4+ und CD8+Lymphozytenfunktionen festgestellt worden (Metcalf et al., 1994; Moffatt and Metcalfe, 2000).

Bei den dendritischen Zellen jedoch zeigt sich im Vergleich zur Kortikoidwirkung für beide Substanzen eine weniger stark ausgeprägte Hemmung der durch *A.fumigatus* induzierten DC-Maturation. Die Untersuchungen der University of Massachusetts aus dem Jahr 2001 zur DC-Ausreifung unter Cyclosporin A- und Tacrolimuseinsatz ergaben keinerlei Veränderungen bei der Ausprägung typischer Oberflächenmoleküle wie CD83, CD86 oder MHC-Klasse II trotz unphysiologisch hohen Substanzmengen. Hemmende Wirkung zeigte sich hingegen bei der Ausschüttung von TNF- α und Interleukin 12 und der allostimulatorischen Kapazität der DCs (Szabo et al., 2001). Auch in einer Studie von Cos et al. ließen sich erst bei hohen Dosen von Tacrolimus (5000ng/ml) geringe Veränderungen des Zellphänotyps bei DCs erreichen (Cos et al., 2002). Während für FK 506 auch in weiteren Studien keine Veränderung der Oberflächenmoleküle im Sinne einer Ausreifungsunterdrückung festgestellt werden konnte (Monti et al., 2003; Woltman et al., 2000), gab es für Cyclosporin A durchaus auch Untersuchungen mit gegenteiligen Ergebnissen, bei denen zumindest eine verminderte Ausprägung der costimulatorischen Moleküle festgestellt wurde (Duperrier et al., 2002; Lee et al., 1999).

Obwohl Tacrolimus den Phänotyp der ausgereiften DCs nicht verändert, wird in der Literatur beschrieben das mit FK 506 behandelte dendritischen Zellen eine geringer Fähigkeit aufweisen eine T_H1-Antwort zu induzieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche geben ein ähnliches Bild der Effekte von Cyclosporin A und FK 506 wieder.

Auch hier gab es keine wirkliche Verminderung in der Ausprägung von Oberflächenmoleküle durch die Calcineurininhibitoren bei der Inkubation mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen, weder von MHC-Klasse II und CD83 noch von den costimulatorischen Molekülen, für die in der Literatur teilweise Gegenteiliges beschrieben wurde. Bei der durch *Aspergillus. fumigatus* induzierten Lymphoproliferation hingegen hatten die Substanzen sehr wohl einen inhibitorischen Effekt, der bei allen Tests nachweisbar war. FK 506 zeigte dabei eine stärkere Wirkung als Cyclosporin A, wobei beide weniger potent waren als Dexamethason und der Unterschied auch konzentrationsabhängig ist.

Bei der Ausschüttung von Interferon- γ und Interleukin 4 zeigte nur Cyclosporin A einen jeweils hemmenden Einfluss wohingegen Tacrolimus keine Veränderungen verursachte.

Rapamycin, das letzte untersuchte Immunsuppressivum, ist ebenfalls weltweit von Forschungsgruppen auf seine Beeinflussung von verschiedenen Immunzellen hin überprüft worden. So wurde für diese Substanz bereits 1995 eine Hemmung der Proliferationsstimulation über den Interleukin 2-Rezeptor bei PBMCs nachgewiesen (Degiannis and Hornung, 1995). Auch eine Unterbrechung von Aktivierungssignalen zwischen DCs und T-Lymphozyten, die in ähnlicher Weise auch bei den Calcineurininhibitoren entdeckt wurde, ist ein beschriebener Effekt bei Rapamycineinsatz (Matsue et al., 2002).

Aber auch im Bezug auf dendritische Zellen konnten Effekte von Rapamycin in mehreren Studien gezeigt werden. So konnte Forschungsgruppe Woltmann et al. (2003) zeigen, dass der Wirkstoff über eine Störung des GM-CSF-Signal an die DCs bei diesen eine Apoptose bewirken kann (Woltman et al., 2001; Woltman et al., 2003). Neben der Apoptoseinduktion, die auch in anderen Veröffentlichungen enthalten ist, scheint Rapamycin im Gegensatz zu den verwandten Substanzen Tacrolimus und Cyclosporin A auch die Ausprägung von Oberflächenmolekülen auf ausreifenden DCs zu unterdrücken.

So wird in mehreren Publikationen im Tiermodell von einer Senkung der Präsentation des MHC-Klasse II, und der Expression von CD80, CD86 und CD40 berichtet, zusammen mit einer Verminderung der IL-12- und IL-10-Produktion.

In den Tests die für diese Arbeit in ähnlicher Weise für *Aspergillus fumigatus* durchgeführt wurden, war im Gegensatz dazu keine Erniedrigung im Bezug auf die Oberflächenmarker durch Rapamycin festzustellen, wobei die Konzentration mit 10ng/ml teilweise unter der in den genannten Studien verwendeten lag. Für die Proliferationstests mit DCs und PBMCs sowie für die Interferon- γ -Ausschüttung war hingegen ein inhibitorischer Einfluss erkennbar.

4.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten angezüchtete dendritische Zellen auf die Inkubation mit verschiedenen, für den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* spezifischen, Antigenen im Sinne einer Ausreifungsreaktion reagieren. Die Inkubierten DCs wiesen dabei sowohl eine vermehrte Expression spezifischer DC-Oberflächenmoleküle, wie CD 83, als auch eine erhöhte Präsentation des, für die Interaktion mit Lymphozyten entscheidenden, major histokompatibility complex-Klasse II sowie der dazu gehörigen costimulatorischen Moleküle CD 40, CD 80, CD 83 und CD 86 auf. Des Weiteren wurde in der Studie ersichtlich, dass die eingesetzten Antigene hinsichtlich ihrer Potenz zur Ausreifungsinduktion starke Unterschiede aufweisen. So war der Ausreifungsreiz durch mit Alkohol abgetötete *Aspergillus fumigatus*-Hyphen auf die dendritischen Zellen weit größer als die des Antigengemisches ECSAB und lag auch über dem des Antigen-Präzipitats PPSAB.

Im zweiten Teil der Studie wurde im Rahmen eines groß angelegten Pilotversuchs der Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Rapamycin, Cyclosporin A, FK 506 und Dexamethason auf die Ausreifung der moDCs unter Inkubation mit *Aspergillus fumigatus*-Hyphen untersucht. Außerdem war auch die Wirkung dieser Immunsuppressiva auf die Interaktion von mit *Aspergillus fumigatus* aktivierten reifen moDCs mit PBMC, unter Anwesenheit von Aspergillushyphen, teil der Untersuchungen. Hierbei zeigte sich, dass nur Dexamethason in der Lage war, die durch Hyphen induzierte DC-Ausreifung im Sinne einer Herunterregulation der Expression costimulatorischer Moleküle zu bewirken. Bei der Interaktion der moDCs mit PBMCs hingegen war für alle Substanzen ein hemmender Einfluss auf die Proliferation der PBMCs zu erkennen, der für Rapamycin und Dexamethason stärker ausfiel als für FK506 oder Cyclosporin A. Auch die Zytokinausschüttung der PBMCs wurde beeinflusst, dabei unterdrückten Rapamycin und Dexamethason die Interferon-Gamma-Produktion der Zellen stärker als Cyclosporin A. FK 506 hatte keine Wirkung hierauf. Diese Daten belegen eine komplexe Interaktion zwischen Erreger und Immuneffektorzelle, die durch verschiedene Immunsuppressiva in unterschiedlicher Weise moduliert werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
Cox	Cyclooxygenase
CSF	Colony-stimulating-factor
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritic cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECSAB	Zelluläres Extrakt von <i>Aspergillus fumigatus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
GVHD	Graft-versus-host-disease
HIV	Human Immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Intracelluläre Adhäsionsmoleküle
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KDA	kilo-dalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
MHC	Major histocompatibility complex
MFI	Mean fluorescence intensity
Mo-dc	Monocyte-derived dendritic cell
Ng	Nanogramm
Nk-Zellen	Natürliche Killer-zellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells

PCR	Polymerase chain reaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PPSAB	Proteinpräzipitat von <i>Aspergillus</i> -Antigenen
RPM	Round per minute
RNA	Ribonucleic acid
SAB	Sabourand
TAP	Transportprozesse assoziiert mit Antigenprozessierung
TCR	T-cell receptor
TNF- α	Tumor-Nekrose Faktor α

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Immunsystems.....	4
Abbildung 2: Adhäsionsmoleküle.....	12
Abbildung 3: Cortison-Molekül.....	18
Abbildung 4: Ciclosporin-Molekül.....	19
Abbildung 5: FK-506-Molekül.....	20
Abbildung 6: Rapamycin-Molekül.....	21
Abbildung 7: Neubauer-Zählkammer.....	25
Abbildung 8: Kolmogorov-Smirnov-Statistik.....	35
Abbildung 9: Kalibrierung FACS.....	36
Abbildung 10: Ausreifungstest.....	37
Abbildung 11: CD 80-Expression PPSAB.....	37
Abbildung 12: CD 80-Vergleich.....	38
Abbildung 13: CD 83-Expression PPSAB.....	38
Abbildung 14: CD 83-Vergleich.....	39
Abbildung 15: CD 86-Expression PPSAB.....	39
Abbildung 16: CD 86-Vergleich.....	40
Abbildung 17: HLA-DR-Expression PPSAB.....	40
Abbildung 18: HLA-DR-Vergleich.....	41
Abbildung 19: CD 80- und 86-Expression ECSAB.....	42
Abbildung 20: CD 40-Expression Hyphen.....	43

Abbildung 21: CD 40-Vergleich.....	44
Abbildung 22: CD 80-Expression Hyphen.....	44
Abbildung 23: CD 83-Vergleich.....	45
Abbildung 24: CD 86-Expression Hyphen.....	45
Abbildung 25: HLA-DR-Expression Hyphen.....	45
Abbildung 26: HLA-DR-Vergleich.....	46
Abbildung 27: Alloreaktionstest.....	47
Abbildung 28: Proliferation unter Immunsuppressiva.....	49
Abbildung 29: Proliferationsindexwerte für FK 506.....	50
Abbildung 30: HLA-DR, Hyphen, Rapamycin.....	51
Abbildung 31: CD 86, Hyphen, Ciclosporin A und FK 506.....	51
Abbildung 32: Interleukin 4.....	52
Abbildung 33: Interferon G.....	53

Anhang

1) Tabellarische angeordnete MFI-Daten der eingesetzten Buffy-Coats für PPSAB

Buffy-coat	MFI CD 80 PPSAB	MFI CD 80 neg	MFI CD 83 PPSAB	MFI CD 83 neg	MFI CD 86 PPSAB	MFI CD 86 neg	MFI MHC-2 PPSAB	MFI MHC-2 neg
02625616-60	11,98	7,13	6,47	4,58	59,6	18,54	112,72	50,82
03600421-60	48,08	16,21	16,21	7,73	104,53	25,37	16,36	4,36
02625133-60	37,6	18,53	10,24	6,7	213,07	62,39	269,46	88,72
02625609-60	17,11	7,87	7,34	3,52	160,46	21,31	216,32	72,42
02624979-60	15,76	7,72	7,51	4,59	110,71	25	179,82	56,95
02624952-60	15,23	13,18	10,18	5,96	109,99	38,28	163,98	70,03
02623025-60	15,78	7,11	10,63	5,34	162,19	17,53	130,95	51,13
03606849-60	15,45	5,4	7,73	3,55	119,79	17,12	63,82	30,02
03601064-60	58,69	8,14	15,56	5,24	133,48	13,44	7,85	2,72

2) Tabellarische MFI-Daten der eingesetzten Buffy-Coats für ECSAB

Buffy-Coat	CD 40 ECSA B	CD 40 neg	CD 80 ECSA B	CD 80 neg	CD 83 ECSA B	CD 83 neg	CD 86 ECSA B	CD 86 neg	HLA-DR ECSA B	HLA-DR neg
03625714-60	8,66	7,58	14,17	12,81	26,32	24,21	7,78	7,46	80,97	167,32
03625688-60	4,05	3,76	5,27	4,86	2,96	3,22	14,4	9,79	214,28	129,2
03625877-60	4,78	3,94	7,34	5,91	4,25	3,57	10,29	6,33	54,72	43,76

3) Tabellarische MFI-Daten aller eingesetzter Buffy-Coats für Aspergillusshyphen

Buffy-Coat	CD 40 Hyphe n	CD 40 Neg.	CD 80 Hyphe n	CD 80 Neg.	CD 83 Hyphe n	CD 83 Neg.	CD 86 Hyphe n	CD 86 Neg.	HLA-DR Hyphe n	HLA-DR Neg.
03630156-60	182,37	57,27	18,35	5,65	7,35	3,24	260,8	12,16	489,24	171
03639248-60	355,25	141,94	42,19	13,34	9,47	5,03	243,25	45,42	403,25	137,31
04603291-60	156,29	65,85	65,03	28,49	8,83	8,32	127,82	27,5	296,71	156,49
04600857-60	287,04	85,61	70,64	15,4	7,9	7,42	331,65	16,6	416,82	155,36
04602076-60	204,37	58,94	37,34	13,17	9,5	6,05	144,57	14,36	320,43	121,8

4) Tabellarische Darstellung der Simulationsindizes aller eingesetzten Buffy-Coats für Hyphen

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506	Medium
04602076-60	4,339	38,516	4,93	16,472	30,55	24,299	1
04601248-60	2,19	7,5	1,98	3,44	6,29	4,3	1
03631393-60	1,04	7,78	1,2	1,03	9,27	1,91	1

5) Stimulationsindex-Tabelle für CMV-Lysat

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506	Medium
04602076-60	13,23	23,79	3,75	12,48	26,608	17,18	1
04601248-60	2,34	5,65	1	3,94	5,35	2,71	1
03631393-60	5,92	10,6	3,21	1,92	11,81	3,78	1

6) Stimulationsindex-Tabelle für ECSAB

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506	Medium
04602076-60	1,94	19,12	3,64	10,24	17,77	14,2	1
04601248-60	2,1	3,68	1,31	2,46	3,31	2,56	1
03631393-60	1,94	7,96	2,7	1,18	4,19	2,02	1

7) Interleukin 4-Tabelle für Hyphen in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506
04602076-60	0	6,03	5,89	7,5	4,97	5,83
04601248-60	4,48	3,91	3,93	6,05	0	1,64
03631393-60	0	0,03	0	0,07	0,15	0

8)) Interleukin 4-Tabelle für CMV in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506
04602076-60	0,05	5	5,7	7,37	5,63	5,4
04601248-60	0,1	2,04	5,27	5,74	2,75	2,35
03631393-60	0,28	0,15	0,4	0,17	0,13	0

9)) Interleukin 4-Tabelle für Medium-Kontrolle in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC + DC
04602076-60	1,32
04601248-60	1,49
03631393-60	0,19

10) Interferon-γ-Tabelle für Hyphen in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506
04602076-60	0	5,28	0,19	0	3,46	5,36
04601248-60	54,69	12,89	5,83	3,66	0	14,01
03631393-60	0	4,1	0,27	0	0,34	0

11) Interferon- γ -Tabelle für CMV in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC	PBMC + DC	+ RAPA.	+ DEX.	+ CYC.	+ FK 506
04602076-60	4,65	19,22	5,5	0,02	20,98	8,2
04601248-60	0,89	9,12	0,03	0,13	4,84	1,29
03631393-60	1,53	4,96	0	0	5,97	0

12) Interferon- γ -Tabelle für Medium-Kontrolle in pg/ml

Buffy-Coat	PBMC + DC
04602076-60	0
04601248-60	0
03631393-60	0

13) Tabelle für Proliferationstests unter Alloreaktion in Mittelwerten

Buffy-Coat	PBMC + DC	Dex 0,98μg/ml	Dex 1,96μg/ml	Cyc A 30ng/ml	Cyc A 60ng/ml	Fk 506 20,1ng/ml
03628125-60	10750	2339	3942	11074,33	5725	3542
03627908-60	22056	9951,33	8227,33	24471,67	8659,67	3682
03628487-60	13263,33	2935,33	2042,67	3658,67	2161,33	893
03628498-60	6697	2566	1422,67	2453,67	1561,33	1096,33
03628347-60	5417,33	2734,33	1529,67	2293	664,33	1825

14) Tabelle für Proliferationstests unter Alloreaktion in Mittelwerten

Buffy-Coat	Fk 506 40,2ng/ml	Rapamycin 1ng/ml	Rapamycin 10ng/ml	PBMC- Kontrolle	DC- Kontrolle
03628125- 60	3798,33	1824,67	1237,67	2609,67	636,33
03627908- 60	2762,33	5066	464,33	2055,67	364
03628487- 60	505,67	1778	243,33	388,33	502
03628498- 60	207,67	790,33	379,67	329,33	404,66
03628347- 60	316,67	1258,33	257,67	388,67	230,67

5 Literaturliste

1. Adcock,IM, 2003, Glucocorticoids: new mechanisms and future agents: Curr.Allergy Asthma Rep., v. 3, p. 249-257.
2. Adcock,IM, K Ito, P J Barnes, 2004, Glucocorticoids: effects on gene transcription: Proc.Am.Thorac.Soc., v. 1, p. 247-254.
3. Andreasen,SO, J E Christensen, O Marker, A R Thomsen, 2000, Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses: J.Immunol., v. 164, p. 3689-3697.
4. Apasov,S, F Redegeld, M Sitkovsky, 1993, Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors: Curr.Opin.Immunol., v. 5, p. 404-410.
5. Auphan,N, J A DiDonato, C Rosette, A Helmborg, M Karin, 1995, Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis: Science, v. 270, p. 286-290.
6. Banchereau,J, F Briere, C Caux, J Davoust, S Lebecque, Y J Liu, B Pulendran, K Palucka, 2000, Immunobiology of dendritic cells: Annu.Rev.Immunol., v. 18:767-811., p. 767-811.
7. Banchereau,J, J Fay, V Pascual, A K Palucka, 2003a, Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy: Novartis.Found.Symp., v. 252:226-35; discussion 235-8, 257-67., p. 226-235.

8. Banchereau,J, R M Steinman, 1998, Dendritic cells and the control of immunity: *Nature*, v. 392, p. 245-252.
9. Banerjee,B, V P Kurup, 2003, Molecular biology of *Aspergillus* allergens: *Front Biosci.*, v. 8:s128-39., p. s128-s139.
10. Biron,CA, L Brossay, 2001, NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 13, p. 458-464.
11. Bodey,GP, S Vartivarian, 1989, Aspergillosis: *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 8, p. 413-437.
12. Boon,AP, D O'Brien, D H Adams, 1991, 10 year review of invasive aspergillosis detected at necropsy: *J.Clin.Pathol.*, v. 44, p. 452-454.
13. Bozza,S, R Gaziano, A Spreca, A Bacci, C Montagnoli, P di Francesco, L Romani, 2002, Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus: *J.Immunol.*, v. 168, p. 1362-1371.
14. Braciale,TJ, L A Morrison, M T Sweetser, J Sambrook, M J Gething, V L Braciale, 1987, Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes: *Immunol.Rev.*, v. 98:95-114., p. 95-114.
15. Buentke,E, A Scheynius, 2003, Dendritic cells and fungi: *APMIS*, v. 111, p. 789-796.
16. Buttgereit,F, 2000, Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions: *Z.Rheumatol.*, v. 59 Suppl 2:II/119-23., p. II/119-II/123.
17. Callan,MF, C Fazou, H Yang, T Rostron, K Poon, C Hatton, A J McMichael, 2000, CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo: *J.Clin.Invest*, v. 106, p. 1251-1261.
18. Cenci,E, A Mencacci, A Bacci, F Bistoni, V P Kurup, L Romani, 2000, T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis: *J.Immunol.*, v. 165, p. 381-388.
19. Chapman,HA, 1998, Endosomal proteolysis and MHC class II function: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 10, p. 93-102.
20. Claudia,M, A Bacci, B Silvia, R Gaziano, A Spreca, L Romani, 2002, The interaction of fungi with dendritic cells: implications for Th immunity and vaccination: *Curr.Mol.Med.*, v. 2, p. 507-524.
21. Cohen,R, J E Heffner, 1992, Bowel infarction as the initial manifestation of disseminated aspergillosis: *Chest*, v. 101, p. 877-879.
22. Constant,SL, K Bottomly, 1997b, Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 15:297-322., p. 297-322.
23. Cos,J, T Villalba, R Parra, D Gallardo, I Bilbao, C Margarit, L Massuet, 2002, FK506 in the maturation of dendritic cells: *Haematologica*, v. 87, p. 679-687.
24. de Jong,EC, P L Vieira, P Kalinski, M L Kapsenberg, 1999, Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3: *J.Leukoc.Biol.*, v. 66, p. 201-204.
25. de Pauw,B, 2004, Preventative use of antifungal drugs in patients treated for cancer: *J.Antimicrob.Chemother.*, v. 53, p. 130-132.
26. de Pauw,BE, F Meunier, 1999, The challenge of invasive fungal infection: *Chemotherapy*, v. 45 Suppl 1:1-14., p. 1-14.

27. Degiannis,D, N Hornung, 1995, Rapamycin inhibits the in vitro release of soluble interleukin-2 receptor by activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) independently of the mode of activation: *Int.J.Immunopharmacol.*, v. 17, p. 593-596.
28. Denning,DW, 2001, Chronic forms of pulmonary aspergillosis: *Clin.Microbiol.Infect.*, v. 7 Suppl 2:25-31., p. 25-31.
29. Di Pucchio,T, C Lapenta, S M Santini, M Logozzi, S Parlato, F Belardelli, 2003, CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 33, p. 358-367.
30. Diehl,M, C Munz, W Keilholz, S Stevanovic, N Holmes, Y W Loke, H G Rammensee, 1996, Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters: *Curr.Biol.*, v. 6, p. 305-314.
31. Dilioglou,S, J M Cruse, R E Lewis, 2003, Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells: *Exp.Mol.Pathol.*, v. 75, p. 18-33.
32. Dixon,DM, M M McNeil, M L Cohen, B G Gellin, J R La Montagne, 1996b, Fungal infections: a growing threat: *Public Health Rep.*, v. 111, p. 226-235.
33. Duperrier,K, A Farre, J Bienvenu, N Bleyzac, J Bernaud, L Gebuhrer, D Rigal, A Eljaafari, 2002, Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L: *J.Leukoc.Biol.*, v. 72, p. 953-961.
34. Fearon,DT, 1999, Innate immunity and the biological relevance of the acquired immune response: *QJM.*, v. 92, p. 235-237.
35. Gari-Toussaint,M, M A Piens, 2001, [Diagnosis of aspergillosis and other invasive filamentous fungal infections in hematology]: *Presse Med.*, v. 30, p. 1912-1917.
36. Gause,WC, J F Urban, P Linsley, P Lu, 1995, Role of B7 signaling in the differentiation of naive CD4+ T cells to effector interleukin-4-producing T helper cells: *Immunol.Res.*, v. 14, p. 176-188.
37. Graziutti,M, D Przepiorka, J H Rex, I Braunschweig, S Vadhan-Raj, C A Savary, 2001, Dendritic cell-mediated stimulation of the in vitro lymphocyte response to *Aspergillus*: *Bone Marrow Transplant.*, v. 27, p. 647-652..
38. Groll,AH, P M Shah, C Mentzel, M Schneider, G Just-Nuebling, K Huebner, 1996, Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital: *J.Infect.*, v. 33, p. 23-32.
39. Gustafson,TL, W Schaffner, G B Lavelly, C W Stratton, H K Johnson, R H Hutcheson, Jr., 1983, Invasive aspergillosis in renal transplant recipients: correlation with corticosteroid therapy: *J.Infect.Dis.*, v. 148, p. 230-238.
40. Hakenberg,J, A K Nussbaum, H Schild, H G Rammensee, C Kuttler, H G Holzhutter, P M Kloetzel, S H Kaufmann, H J Mollenkopf, 2003, MAPPP: MHC class I antigenic peptide processing prediction: *Appl.Bioinformatics.*, v. 2, p. 155-158.
41. Hebart,H, C Bollinger, P Fisch, J Sarfati, C Meisner, M Baur, J Loeffler, M Monod, J P Latge, H Einsele, 2002, Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies: *Blood*, v. 100, p. 4521-4528.
42. Hebart,H, J Loffler, C Meisner, F Serey, D Schmidt, A Bohme, H Martin, A Engel, D Bunje, W V Kern, U Schumacher, L Kanz, H Einsele, 2000, Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening: *J.Infect.Dis.*, v. 181, p. 1713-1719.
43. Hertz,CJ, S M Kiertscher, P J Godowski, D A Bouis, M V Norgard, M D Roth, R L Modlin, 2001, Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2: *J.Immunol.*, v. 166, p. 2444-2450.

44. Hofmann,M, A K Nussbaum, N P Emmerich, L Stoltze, H Schild, 2001, Mechanisms of MHC class I-restricted antigen presentation: *Expert.Opin.Ther.Targets.*, v. 5, p. 379-393.
45. Holding,KJ, M S Dworkin, P C Wan, D L Hanson, R M Klevens, J L Jones, P S Sullivan, 2000a, Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus: incidence and survival. *Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project: Clin.Infect.Dis.*, v. 31, p. 1253-1257.
46. Hope,WW, D W Denning, 2004, Invasive aspergillosis: current and future challenges in diagnosis and therapy: *Clin.Microbiol.Infect.*, v. 10, p. 2-4.
47. Horgan,MM, W G Powderly, 1997, Aspergillosis: *J.Int.Assoc.Physicians AIDS Care*, v. 3, p. 14-16.
48. Howland,KC, L J Ausubel, C A London, A K Abbas, 2000, The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance: *J.Immunol.*, v. 164, p. 4465-4470.
49. Ibrahim-Granet,O, B Philippe, H Boleti, E Boisvieux-Ulrich, D Grenet, M Stern, J P Latge, 2003, Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages: *Infect.Immun.*, v. 71, p. 891-903.
50. Jego,G, V Pascual, A K Palucka, J Banchereau, 2005, Dendritic cells control B cell growth and differentiation: *Curr.Dir.Autoimmun.*, v. 8:124-39., p. 124-139.
51. Karim,M, M Alam, A A Shah, R Ahmed, H Sheikh, 1997, Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts: *Clin.Infect.Dis.*, v. 24, p. 723-733.
52. Kaye,RE, D A Fruman, B E Bierer, M W Albers, L D Zydowsky, S I Ho, Y J Jin, M C Castells, S L Schreiber, C T Walsh, ., 1992, Effects of cyclosporin A and FK506 on Fc epsilon receptor type I-initiated increases in cytokine mRNA in mouse bone marrow-derived progenitor mast cells: resistance to FK506 is associated with a deficiency in FK506-binding protein FKBP12: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 89, p. 8542-8546.
53. Khoo,SH, D W Denning, 1994, Invasive aspergillosis in patients with AIDS: *Clin.Infect.Dis.*, v. 19 Suppl 1:S41-8., p. S41-S48.
54. Kontoyiannis,DP, G P Bodey, 2002, Invasive aspergillosis in 2002: an update: *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 21, p. 161-172.
55. Lanier,LL, S O'Fallon, C Somoza, J H Phillips, P S Linsley, K Okumura, D Ito, M Azuma, 1995, CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL: *J.Immunol.*, v. 154, p. 97-105.
56. Latge,JP, 1999, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 12, p. 310-350.
57. Lee,JI, R W Ganster, D A Geller, G J Burckart, A W Thomson, L Lu, 1999, Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B: *Transplantation*, v. 68, p. 1255-1263.
58. Lee,SH, B J Lee, d Y Jung, J H Kim, D S Sohn, J W Shin, J Y Kim, I W Park, B W Choi, 2004, Clinical manifestations and treatment outcomes of pulmonary aspergilloma: *Korean J.Intern.Med.*, v. 19, p. 38-42.
59. Legge,KL, R K Gregg, R Maldonado-Lopez, L Li, J C Caprio, M Moser, H Zaghouani, 2002, On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity: *J.Exp.Med.*, v. 196, p. 217-227.
60. Levitz,SM, 1989, Aspergillosis: *Infect.Dis.Clin.North Am.*, v. 3, p. 1-18.

61. Linsley,PS, W Brady, L Grosmaire, A Aruffo, N K Damle, J A Ledbetter, 1991, Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation: *J.Exp.Med.*, v. 173, p. 721-730.
62. Linsley,PS, J A Ledbetter, 1993, The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 11:191-212., p. 191-212.
63. Liu,J, J D Farmer, Jr., W S Lane, J Friedman, I Weissman, S L Schreiber, 1991, Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes: *Cell.*, v. 66, p. 807-815.
64. Loeffler,J, K Kloepfer, H Hebart, L Najvar, J R Graybill, W R Kirkpatrick, T F Patterson, K Dietz, R Bialek, H Einsele, 2002, Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis: *J.Infect.Dis.*, v. 185, p. 1203-1206.
65. Lumbreras,C, J Gavalda, 2003, [Invasive aspergillosis: clinical manifestations and treatment]: *Rev.Iberoam.Micol.*, v. 20, p. 79-89.
66. Mackey,MF, R J Barth, Jr., R J Noelle, 1998, The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells: *J.Leukoc.Biol.*, v. 63, p. 418-428.
67. Maenaka,K, E Y Jones, 1999, MHC superfamily structure and the immune system: *Curr.Opin.Struct.Biol.*, v. 9, p. 745-753.
68. Maertens,J, I Raad, G Petrikos, M Boogaerts, D Selleslag, F B Petersen, C A Sable, N A Kartsonis, A Ngai, A Taylor, T F Patterson, D W Denning, T J Walsh, 2004, Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy: *Clin.Infect.Dis.*, v. 39, p. 1563-1571.
69. Maertens,J, M Vrebois, M Boogaerts, 2001, Assessing risk factors for systemic fungal infections: *Eur.J.Cancer Care (Engl.)*, v. 10, p. 56-62.
70. Malcherek,G, C Wirblich, N Willcox, H G Rammensee, J Trowsdale, A Melms, 1998, MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation: *Eur.J.Immunol.*, v. 28, p. 1524-1533.
71. Manome,H, S Aiba, S Singh, Y Yoshino, H Tagami, 2000, Dexamethasone and cyclosporin A affect the maturation of monocyte-derived dendritic cells differently: *Int.Arch.Allergy Immunol.*, v. 122, p. 76-84.
72. Marr,KA, M Boeckh, R A Carter, H W Kim, L Corey, 2004, Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: *Clin.Infect.Dis.*, v. 39, p. 797-802.
73. Martins,MD, L J Rodriguez, C A Savary, M L Graziutti, D Deshpande, D M Cohen, R E Cowart, D G Woodside, B W McIntyre, E J Anaissie, J H Rex, 1998, Activated lymphocytes reduce adherence of *Aspergillus fumigatus*: *Med.Mycol.*, v. 36, p. 281-289.
74. Matasic,R, A B Dietz, S Vuk-Pavlovic, 1999, Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells: *J.Leukoc.Biol.*, v. 66, p. 909-914.
75. Matsue,H, C Yang, K Matsue, D Edelbaum, M Mummert, A Takashima, 2002, Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation: *J.Immunol.*, v. 169, p. 3555-3564.
76. Metcalfe,S, D Alexander, J Turner, 1994, FK 506 and cyclosporin each block antigen-induced T cell receptor signalling that is dependent on CD4 co-receptor and operates in the absence of detectable cytoplasmic calcium fluxes: *Transpl.Int.*, v. 7 Suppl 1:S549-51., p. S549-S551.

77. Moffatt,SD, S M Metcalfe, 2000, Comparison between tacrolimus and cyclosporine as immunosuppressive agents compatible with tolerance induction by CD4/CD8 blockade: *Transplantation*, v. 69, p. 1724-1726.
78. Monti,P, A Mercalli, B E Leone, D C Valerio, P Allavena, L Piemonti, 2003, Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells: *Transplantation*, v. 75, p. 137-145.
79. Morelli,AE, A W Thomson, 2003, Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction: *Immunol.Rev.*, v. 196:125-46., p. 125-146.
80. Morgenstern,DE, M A Gifford, L L Li, C M Doerschuk, M C Dinauer, 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.*, v. 185, p. 207-218.
81. Moser,M, K M Murphy, 2000, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development: *Nat.Immunol.*, v. 1, p. 199-205.
82. Nagai,H, J Guo, H Choi, V Kurup, 1995, Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis: *J.Infect.Dis.*, v. 172, p. 1554-1560.
83. Nakagawa,TY, A Y Rudensky, 1999, The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation: *Immunol.Rev.*, v. 172:121-9., p. 121-129.
84. Narita,M, M Takahashi, A Liu, F Ayres, N Satoh, T Abe, K Nikkuni, T Furukawa, K Toba, Y Aizawa, 2001, Generation of dendritic cells from leukaemia cells of a patient with acute promyelocytic leukaemia by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF-alpha: *Acta Haematol.*, v. 106, p. 89-94.
85. Niedermann,G, E Geier, M Lucchiari-Hartz, N Hitziger, A Ramsperger, K Eichmann, 1999, The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens: *Immunol.Rev.*, v. 172:29-48., p. 29-48.
86. Nishioka,Y, N Nishimura, Y Suzuki, S Sone, 2001, Human monocyte-derived and CD83(+) blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity: *Eur.J.Immunol.*, v. 31, p. 2633-2641.
87. O'Keefe,SJ, J Tamura, R L Kincaid, M J Tocci, E A O'Neill, 1992, FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin: *Nature.*, v. 357, p. 692-694.
88. Palmer,LB, H E Greenberg, M J Schiff, 1991, Corticosteroid treatment as a risk factor for invasive aspergillosis in patients with lung disease: *Thorax.*, v. 46, p. 15-20.
89. Palucka,K, J Banchereau, 1999, Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity: *J.Clin.Immunol.*, v. 19, p. 12-25.
90. Palucka,KA, N Taquet, F Sanchez-Chapuis, J C Gluckman, 1998, Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation: *J.Immunol.*, v. 160, p. 4587-4595.
91. Pamer,E, P Cresswell, 1998, Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 16:323-58., p. 323-358.
92. Patel,R, D Portela, A D Badley, W S Harmsen, J J Larson-Keller, D M Ilstrup, M R Keating, R H Wiesner, R A Krom, C V Paya, 1996, Risk factors of invasive *Candida* and non-*Candida* fungal infections after liver transplantation: *Transplantation*, v. 62, p. 926-934.
93. Payne,DN, I M Adcock, 2001, Molecular mechanisms of corticosteroid actions: *Paediatr.Respir.Rev.*, v. 2, p. 145-150.
94. Pham,AS, J J Tarrand, G S May, M S Lee, D P Kontoyiannis, X Y Han, 2003, Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR: *Am.J.Clin.Pathol.*, v. 119, p. 38-44.

95. Piemonti,L, P Monti, P Allavena, M Sironi, L Soldini, B E Leone, C Socci, V Di Carlo, 1999, Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation: *J.Immunol.*, v. 162, p. 6473-6481.
96. Pospisilova,D, J Borovickova, A Polouckova, R Spisek, A Sediva, O Hrusak, J Stary, J Bartunkova, 2002, Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: *Cancer Immunol.Immunother.*, v. 51, p. 72-78.
97. Ramadan,G, S Konings, V P Kurup, C A Keever-Taylor, 2004, Generation of Aspergillus- and CMV- specific T-cell responses using autologous fast DC: *Cytotherapy.*, v. 6, p. 223-234.
98. Raszka,WV, Jr., B L Shoupe, E G Edwards, 1993, Isolated primary cutaneous aspergillosis of the labia: *Med.Pediatr.Oncol.*, v. 21, p. 375-378.
99. Reiss,E, K Tanaka, G Bruker, V Chazalet, D Coleman, J P Debeaupuis, R Hanazawa, J P Latge, J Lortholary, K Makimura, C J Morrison, S Y Murayama, S Naoe, S Paris, J Sarfati, K Shibuya, D Sullivan, K Uchida, H Yamaguchi, 1998, Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections: *Med.Mycol.*, v. 36 Suppl 1:249-57., p. 249-257.
100. Richters,CD, I Mayen, C E Havenith, R H Beelen, E W Kamperdijk, 2002, Rat monocyte-derived dendritic cells function and migrate in the same way as isolated tissue dendritic cells: *J.Leukoc.Biol.*, v. 71, p. 582-587.
101. Roche,PA, P Cresswell, 1991, Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 88, p. 3150-3154.
102. Roilides,E, A Dimitriadou-Georgiadou, T Sein, I Kadiltoglou, T J Walsh, 1998, Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*: *Infect.Immun.*, v. 66, p. 5999-6003.
103. Ruhlmann,A, A Nordheim, 1997, Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation: *Immunobiology.*, v. 198, p. 192-206.
104. Salonen,J, O P Lehtonen, M R Terasjarvi, J Nikoskelainen, 2000, *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome: *Scand.J.Infect.Dis.*, v. 32, p. 485-490.
105. Sambatakou,H, M Guiver, D Denning, 2003, Pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease: confirmation by polymerase chain reaction and serological tests, and successful treatment with voriconazole: *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 22, p. 681-685.
106. Schreuder,GM, C K Hurley, S G Marsh, M Lau, M Fernandez-Vina, H J Noreen, M Setterholm, M Maiers, 2005, The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens: *Int.J.Immunogenet.*, v. 32, p. 19-69.
107. Schweitzer,AN, F Borriello, R C Wong, A K Abbas, A H Sharpe, 1997, Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86: *J.Immunol.*, v. 158, p. 2713-2722.
108. Sehgal,SN, 1998, Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression: *Clin.Biochem.*, v. 31, p. 335-340.
109. Serrano-Gomez,D, A Dominguez-Soto, J Ancochea, J A Jimenez-Heffernan, J A Leal, A L Corbi, 2004, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* Conidia by dendritic cells and macrophages: *J.Immunol.*, v. 173, p. 5635-5643.

110. Singh,N, D L Paterson, 2005, Aspergillus infections in transplant recipients: Clin.Microbiol.Rev., v. 18, p. 44-69.
111. Sozzani,S, P Allavena, A Vecchi, A Mantovani, 2000, Chemokines and dendritic cell traffic: J.Clin.Immunol., v. 20, p. 151-160.
112. Squier,MK, J J Cohen, 1994, Cell-mediated cytotoxic mechanisms: Curr.Opin.Immunol., v. 6, p. 447-452.
113. Stanzani,M, E Orciuolo, R Lewis, D P Kontoyiannis, S L Martins, L S St John, K V Komanduri, 2004, Aspergillus fumigatus suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes: Blood, v. ..
114. Szabo,G, C Gavala, P Mandrekar, 2001, Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells: J.Investig.Med., v. 49, p. 442-449.
115. Thery,C, S Amigorena, 2001, The cell biology of antigen presentation in dendritic cells: Curr.Opin.Immunol., v. 13, p. 45-51.
116. Tomlinson,S, 1993, Complement defense mechanisms: Curr.Opin.Immunol., v. 5, p. 83-89.
117. Vaideeswar,P, S Prasad, J R Deshpande, S P Pandit, 2004, Invasive pulmonary aspergillosis: A study of 39 cases at autopsy: J.Postgrad.Med., v. 50, p. 21-26.
118. Van Laethen, F, Baus,E.; Smyth,L.A.; Andris,F.; Bex,F.; Urbain,J.; Kioussis,D.; Leo,O., 2001, Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling, J.Exp.Med., v. 7, p. 803-814.
119. Vogelsang,G, R Bitton, S Piantadosi, V Altomonte, T Horn, R Jones, C Miller, D Marcellus, R Abrams, A Hess, 1999, Immune modulation in autologous bone marrow transplantation: cyclosporine and gamma-interferon trial: Bone Marrow Transplant., v. 24, p. 637-640.
120. Woltman,AM, J W de Fijter, S W Kamerling, S W Der-Kooij, L C Paul, M R Daha, C van Kooten, 2001, Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages: Blood, v. 98, p. 174-180.
121. Woltman,AM, J W de Fijter, S W Kamerling, L C Paul, M R Daha, C van Kooten, 2000, The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells: Eur.J.Immunol., v. 30, p. 1807-1812.
122. Woltman,AM, S W van der Kooij, P J Coffey, R Offringa, M R Daha, C van Kooten, 2003, Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression: Blood, v. 101, p. 1439-1445.
123. Xu,H, M Kramer, H P Spengler, J H Peters, 1995, Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN-gamma exhibit phenotype and function of blood dendritic cells: Adv.Exp.Med.Biol., v. 378, p. 75-78.
124. York,IA, K L Rock, 1996, Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex: Annu.Rev.Immunol., v. 14:369-96., p. 369-396.
125. Zhou,LJ, T F Tedder, 1996, CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 93, p. 2588-2592.

Danksagung

Ich danke ganz besonders meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Hebart für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen. Mit seiner freundlichen Hilfsbereitschaft, wertvollen Betreuung und engagierten Motivation sowie seiner praktischen Anleitung hat er mir sehr geholfen.

Ferner gilt mein Dank Frau Friederike Frank, inzwischen berentete medizinisch technische Assistentin an der Universität Tübingen, für Ihre umfangreiche Einführung in die Laborarbeit.

Schließlich möchte ich meinem Vater Dr. med Joachim Mickan und meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung danken.

Lebenslauf

Name: Andreas Richard Mickan

Geburtsdatum: 21.09.1977

Geburtsort: Aalen

Eltern: Gabrielle Luise Mickan, geb. Wiedbrauck, Röntgenassistentin
Dr. Joachim Mickan, Arzt

Geschwister: Angela Denise Mickan, Bürokauffrau
Philipp Piotr Mickan, Schüler
Michael Antoni Mickan, Schüler

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

Nationalität: Deutsch

Ausbildung

1985-86	Kurt-Schumacher-Grundschule Hannover – Anderten
1987-88	Solingen-Grundschule Holzminden
1989-90	Orientierungsstufe Holzminden
1991-93	Campe-Gymnasium Holzminden
1994-98	Peutingen-Gymnasium Ellwangen/Jagst
20.06.1998	Allgemeine Hochschulreife
1998-99	Wehrdienst in der Reinhardts-Kaserne Ellwangen/Jagst
SS 1999	Aufnahme des Medizinstudiums in Tübingen
29.03.2001	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
21.03.2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
07.09.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
04.05 bis 03.06	Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart
16.05.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2
August 06	Arbeitsbeginn als Assistenzarzt am Klinikum Schwäbisch Gmünd Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe