

**GRUNDLAGEN ZUM POTENTIELLEN THERAPEUTISCHEN
EINSATZ HUMANER NATÜRLICHER KILLER ZELLEN UND
SPEZIFISCHER T-ZELLEN ZUR BEKÄMPFUNG INVASIVER
MYKOSEN BEI PATIENTEN NACH ALLOGENER
STAMMZELLTRANSPLANTATION**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stanislaw Schmidt
aus Nowosibirsk

Frankfurt 2012
(D30)

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Erster Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Lehrnbecher

Datum der mündlicher Prüfung: 12. Februar 2013

MEINER FAMILIE

1	EINLEITUNG	1
1.1	Stammzelltransplantation	1
1.1.1	Allogene Stammzelltransplantation	3
1.1.2	Generierung hämatopoetischer Stammzellen	3
1.1.3	Graft-versus-host disease	4
1.1.4	Immunrekonstitution und Infektionen	6
1.2	Pilzinfektionen	9
1.2.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10
1.2.2	<i>Rhizopus oryzae</i>	11
1.2.3	Invasive Aspergillose	13
1.2.4	Invasive Mukormykose	16
1.2.5	Antimykotische Chemotherapie	16
1.2.6	Immunabwehr von Pilzinfektionen	19
1.3	T-Zellen	21
1.3.1	T-Helfer-Zellen	23
1.3.2	Zytotoxische T-Zellen	24
1.3.3	T _{Helfer} -Zellen bei Pilzinfektionen	25
1.4	NK-Zellen	26
1.4.1	NK-Zellrezeptoren	28
1.4.2	Effektormechanismen von NK-Zellen	31
1.4.3	Immunregulatorische Funktion der Natürlichen Killer Zellen	34
1.4.4	Natürlich Killer Zellen bei Pilzinfektionen	35
1.5	Zelluläre Immuntherapien	36
1.5.1	T-Zellen basierte Immuntherapie	36
1.5.2	Natürliche Killer Zellen basierte Immuntherapie	37
1.6	Ziele der Arbeit	38
2	MATERIAL UND METHODEN	40
2.1	Material	40
2.2	Methoden	49
2.2.1	Kultivierung der Pilze	49
2.2.2	Durchflusszytometrie	50
2.2.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	53
2.2.4	Isolierung und Kultivierung primärer humaner NK-Zellen	54
2.2.5	Isolierung und Kultivierung anti- <i>Rhizopus oryzae</i> T-Zellen	56
2.2.6	Herstellung Antigenpräsentierender Zellen	62
2.2.7	Bestimmung der Pilzschädigung	62
2.2.8	Statistische Analysen	65
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Antimykotische Aktivität humaner Natürlicher Killer Zellen	66
3.1.1	Einfluss Natürlicher Killer Zellen auf Hyphen und Konidien von <i>Aspergillus fumigatus</i>	66
3.1.2	Einfluss Natürlicher Killer Zellen auf Hyphen und Konidien von <i>Rhizopus oryzae</i>	68
3.1.3	Aktivierung frisch isolierter humaner NK-Zellen durch <i>Aspergillus fumigatus</i> und <i>Rhizopus oryzae</i>	70
3.1.4	Mechanismus der antimykotischer Aktivität humaner NK-Zellen	73

3.1.5	Einfluss von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> auf die Zytokinsekretion durch IL-2 stimulierte NK-Zellen	80
3.1.6	Einfluss von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> auf die Vitalität humaner IL-2 stimulierter NK-Zellen	83
3.2	Generierung und Charakterisierung von anti-<i>R. oryzae</i> T-Zellen	84
3.2.1	Isolierung und Expansion von anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	84
3.2.2	Phänotyp der generierten Zellpopulation	86
3.2.3	Zytokinproduktion nach Restimulierung durch die generierte Zellpopulation	87
3.2.4	Proliferation der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	90
3.2.5	Alloreaktives Potential der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	91
3.2.6	Einfluss von anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen auf die Aktivität von Phagozyten	93
3.2.7	Kreuzreaktivität der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen gegenüber anderen Pilzen	94
4	DISKUSSION	97
4.1	Antimykotisches Potential humaner Natürlicher Killer Zellen	98
4.1.1	Antimykotische Aktivität humaner NK-Zellen und Wirkmechanismen	99
4.1.2	Einfluss von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> auf die Zytokinproduktion von NK-Zellen	103
4.1.3	Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen durch verschiedene Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i>	106
4.2	Anti-<i>R. oryzae</i> T-Zellen als potentielle Therapieoption zur Bekämpfung invasiver Mukormykosen	110
4.2.1	Isolierung und Charakterisierung anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	110
4.2.2	Zytokinproduktion durch die generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen nach Restimulierung	111
4.2.3	Verstärkung der Phagozytose durch die generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	113
4.2.4	Proliferationsvermögen der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	114
4.2.5	Alloreaktives Potential der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen	115
4.2.6	Kreuzreaktivität der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen gegenüber anderen klinisch relevanten Pilzen	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	119
6	AUSBLICK	121
7	QUELLENVERZEICHNIS	I
8	ANHANG	XXIV
A.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XXIV
B.	TABELLENVERZEICHNIS	XXV
C.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XXVI
D.	GERÄTEVERZEICHNIS	XXXI
E.	EIDESSTATTLICHER ERKLÄRUNG	XXXIII

F. LEBENSLAUF	XXXIV
G. EIGENE PUBLIKATIONEN	XXXVI
H. KONGRESSBEITRÄGE	XXXVIII
I. DANKSAGUNG	XXXIX

1 EINLEITUNG

1.1 Stammzelltransplantation

Jährlich erkranken weltweit mehrere tausend Menschen an einer malignen Erkrankung. Einen großen Teil dieser Erkrankungen stellen Leukämien dar, die durch eine neoplastische Umwandlung von Vorläuferzellen der Blutbildung entstehen. In Deutschland erkrankten zwischen 1999 und 2008 jährlich durchschnittlich ca. 1600 Kinder unter 15 Jahren an Krebs, wobei im Durchschnitt ca. 590 dieser Kinder eine Leukämie entwickelten [1, 2]. Bei einem Teil der Patienten mit Leukämie (Hochrisikogruppe) ist die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ein wichtiger Bestandteil der Therapie. Die dabei transplantierten pluripotenten Stammzellen wandern in das Knochenmark und können sich in alle Zellpopulationen des gesunden Blutes differenzieren (Abbildung 1.1). Nach Transplantation ersetzen sie das blutbildende System des Empfängers.

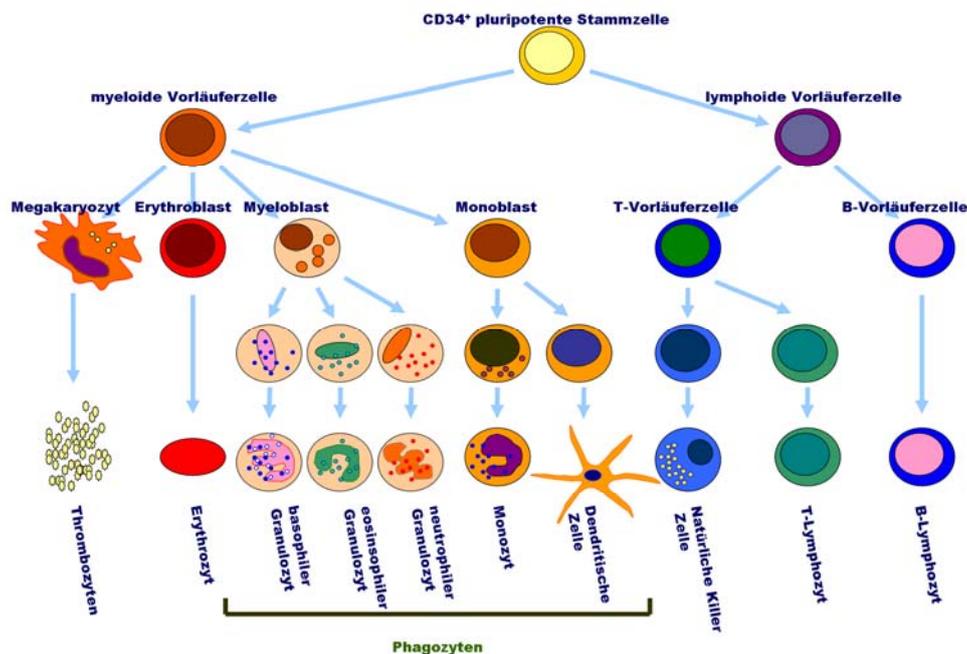


Abbildung 1.1: Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. Eine pluripotenten Stammzelle kann sich in eine Vorläuferzelle der myeloiden Zelllinien oder der lymphoiden Zelllinien differenzieren. Aus der myeloiden Vorläuferzelle entwickeln sich letztlich Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen. Aus der lymphoiden Vorläuferzelle entwickeln sich die T- und B-Lymphozyten, wobei sich aus der Vorläuferzelle der T-Zelllinien ebenfalls Natürliche Killer (NK-) Zellen ausbilden.

Bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen unterscheidet man zwischen einer autologen Transplantation, bei der dem Patienten die eigenen zuvor entnommenen Stammzellen transfundiert werden, und einer allogenen Transplantation, bei der Stammzellen einer Person auf eine andere transferiert werden, wobei bei letzteren sowohl verwandte (z.B. Geschwister) als auch unverwandte Personen als Spender in Frage kommen. Bei beiden Transplantationsarten können sowohl das Knochenmark als auch periphere Blutstammzellen als Quelle der hämatopoetischen Stammzellen dienen. Die Abbildung 1.2 zeigt den groben Verlauf einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (SZT).

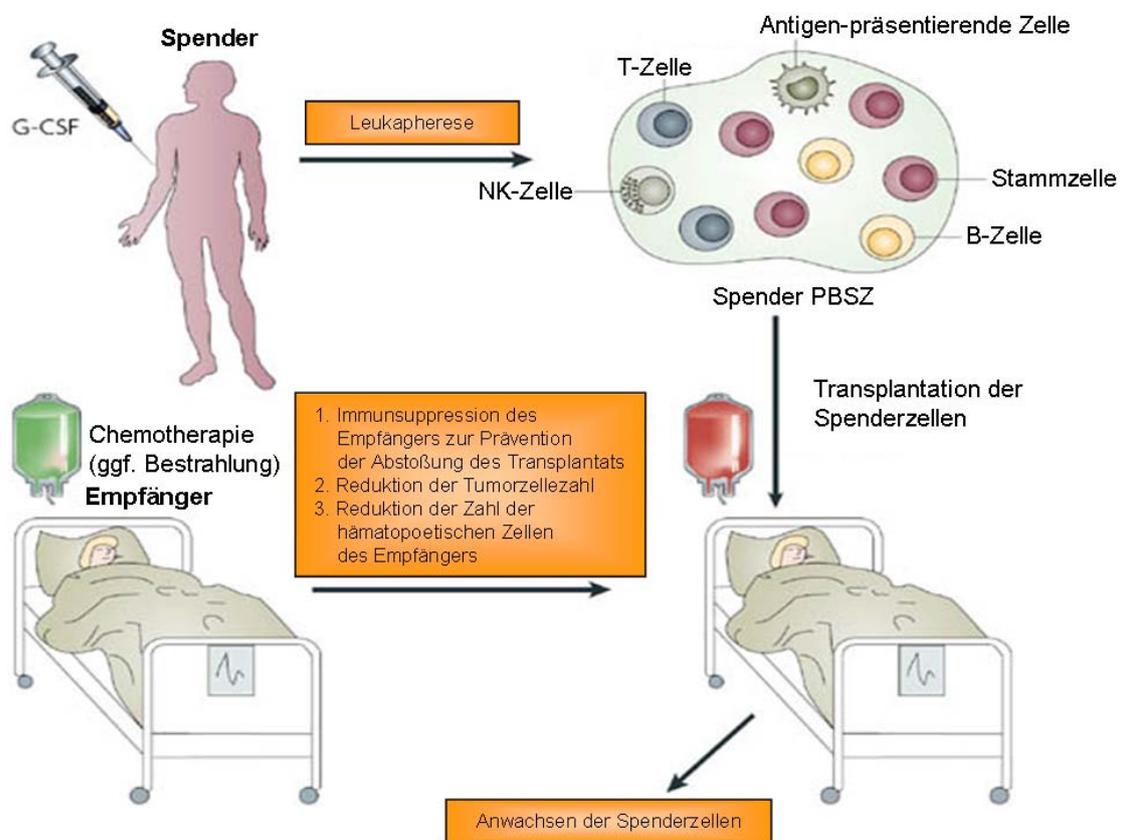


Abbildung 1.2: Verlauf einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Der Spender erhält zur Stimulation der Proliferation der Stammzellen und deren Mobilisierung, d.h. Übergang aus dem Knochenmark ins periphere Blut, den hämatopoetischen Wachstumsfaktor Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF). Durch Leukapherese werden die Blutzellen des peripheren Blutes des Spenders gewonnen und die Stammzellen isoliert. Der Empfänger wird zur Eliminierung seines blutbildenden Systems einer hochdosierten Chemotherapie in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Durch den Transfer der Spenderstammzellen erhält der Empfänger das blutbildende System des Spenders mit den molekularen Merkmalen des Spenders. NK-Zelle = Natürliche Killer Zelle; PBSZ = periphere Blutstammzellen. Abbildung aus Shlomchik, *Nat Rev Immunol*, 2007, modifiziert.

1.1.1 *Allogene Stammzelltransplantation*

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) ist eine besondere Form der Transplantation und birgt einer Reihe für diese Art der Transplantation spezifischer Risiken. Aufgrund der Spender-Empfänger-Konstellation kann sowohl der Organismus des Empfängers das transplantierte Gewebe, welcher als fremdartig angesehen wird, angreifen (*host-versus-graft disease*, HvGD), als auch die transplantierten Zellen des Spenders die Organe des Empfängers (*graft-versus-host disease*, GvHD). Diese Abstoßungsreaktionen hängen mit dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) der Zellen, der auch als humanes Leukozytenantigen-System (*human leukocyte antigen*, HLA) bezeichnet wird, zusammen. HLA-Moleküle werden zwei Klassen zugeordnet, den MHC-Klasse-I-Molekülen und MHC-Klasse-II-Molekülen, kurz MHC-I und MHC-II.

Den MHC-I-Molekülen, die sich auf allen kerntragenden Zellen und Thrombozyten finden, werden HLA-Typen A, B, und C zugeordnet. HLA-DR, -DP und -DQ gehören zu den MHC-II-Molekülen, die auf Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie den dendritischen Zellen (DZ) oder Makrophagen zu finden sind. Über MHC-I-Moleküle werden Antigene wie z.B. Peptide von Pathogenen aus dem Inneren einer Zelle an der Oberfläche präsentiert, womit beispielsweise eine Infektion angezeigt und eine durch zytotoxische T-Zellen vermittelte Eliminierung der infizierten Zelle induziert wird. Die Präsentation von Peptiden durch APZ mittels MHC-II-Moleküle dient der Aktivierung von T_{Helfer}- (T_H-) Zellen, die ihrerseits weitere Arme des Immunsystems aktivieren. Stimmt das HLA-Expressionsmuster des Spenders nicht mit dem des Empfängers überein, kann es zu Abstoßungsreaktionen kommen, die mit schweren Symptomen einhergehen. Aus diesem Grund ist die richtige Wahl des Spenders unter Berücksichtigung der HLA-Moleküle für eine allogene SZT unerlässlich.

1.1.2 *Generierung hämatopoetischer Stammzellen*

Zur Gewinnung peripherer Stammzellen wird dem Spender zur Neubildung und Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut das Wachstumshormon Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) appliziert. Anschließend werden mononukleäre Zellen aus

dem Blut des Spenders mittels Leukapherese entnommen und die Stammzellen aus dem Leukapheresat (Produkt der Leukapherese) mit Hilfe der magnetischen Zellisolierung mittels antikörperbeschichteten paramagnetischen Partikeln isoliert. Hierbei kommen im Allgemeinen zwei Strategien zum Einsatz. Eine setzt auf die Anreicherung der im Quellpräparat enthaltenen Stammzellen durch deren selektive Isolierung (z.B. mittels CD34- oder CD133-Selektion)(Sutherland et al., 1992). Bei der zweiten Strategie werden unerwünschte Zellen aus dem Präparat entfernt (z.B. mittels CD3/CD19-Depletion). Dabei binden die Antikörper an die gewünschten Oberflächenmoleküle der Zielzellen, die dann in einem Magnetfeld durch an die Antikörper gekoppelte Eisenpartikel festgehalten werden. So können entweder die gewünschten Zellen im Anschluss eluiert und somit angereichert, oder die unerwünschten Zellen aus dem Präparat entfernt werden.

Potentiell besteht ein Vorteil der CD3/CD19-Depletion gegenüber einer gezielten Selektion von Stammzellen (CD34- bzw. CD133-Selektion) darin, dass neben den Stammzellen sich auch weitere Zellen des Immunsystems des Spenders in dem so hergestellten Stammzellpräparat befinden. Zu diesen gehören neben DZ und Monozyten auch Natürliche Killer (NK-) Zellen, die zu einer beschleunigten Regeneration des Immunsystems beim Empfänger führen, und einen Effekt, der als Transplantat-gegen-Leukämie/Transplantat-gegen-Tumor-Effekt (*graft-versus-leukemia/graft-versus-tumor*, GvL/GvT) bekannt ist, gegenüber verbliebenen malignen Zellen zeigen (Lang et al., 2005; Ruggeri et al., 1999).

1.1.3 *Graft-versus-host disease*

Die Schädigung der Empfängerorgane durch das Transplantat, *graft-versus-host disease* (GvHD), stellt eine Komplikation in der SZT dar. Sie kann mit schweren Symptomen einhergehen und sogar zum Tode des Patienten führen (Lee et al., 2007). Bei der GvHD erkennen T-Zellen des Spenders die Zellen des Empfängers aufgrund einer unterschiedlichen HLA-Konstellation als fremd und induzieren eine gegen sie gerichtete Immunantwort (Kalwak et al., 2003). Diese kann sowohl durch zytotoxische CD3⁺CD8⁺ T-Zellen, die mittels zytolytischer Moleküle oder mittels Apoptose-induzierenden Liganden wirken, als auch durch CD3⁺CD4⁺ T_H-Zellen, die pro-inflammatorische Zytokine produzieren, ausgelöst werden. Zu den Symptomen der GvHD gehören

Dermatitis, Enteritis und Hepatitis, die alle einzeln oder in Kombination auftreten können. Daneben kann sich die Symptomatik auch auf die Augen und die Lunge ausweiten (Pidala 2011; Przepiorka et al., 1995; Thomas et al., 1975).

Man unterscheidet bei der GvHD zwischen einer akuten und einer chronischen Form. Als akut wird GvHD klassischerweise bezeichnet, wenn sie innerhalb der ersten 100 Tagen nach SZT auftritt. Die chronische Form tritt als ein autoimmunähnliches Syndrom nach Tag 100 auf und kann mit oder ohne ein vorangegangenes akutes Stadium der Krankheit entstehen. Die Schwere der GvHD wird in vier Grade eingeteilt, die in Tabelle 1.1 aufgeführt sind (Przepiorka et al., 1995).

Zur Prävention einer akuten GvHD können verschieden Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus), Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat Mofetil (MMF), welche die Funktion von T- und B-Zellen blockieren, gegeben werden. Kommt es trotz der präventiven Maßnahmen zu einer GvHD, können zusätzlich hochdosierte Steroide verabreicht werden (Pidala 2011). Zu beachten ist, dass die Immunsuppression in der Zeit nach SZT sich negativ auf die Rekonstitution des Immunsystems auswirken kann, was in einer lebensbedrohlichen Infektion resultieren kann.

Um Abstoßung des Transplantats durch den Empfänger zu verhindern, ist es wichtig, neben der geeigneten Spenderauswahl, das blutbildendes System des Empfängers, welches für die Abstoßung verantwortlich ist, möglichst vollständig zu eliminieren. Dies wird durch myeloablative Konditionierung, die Immunsuppression und Eradikation des hämatopoetischen immunologischen Empfängergewebes durch medikamentöse Chemotherapie (z.B. mit Fludarabin, Melphalan und OKT-3[®], ATG) sowie Ganzkörperbestrahlung, erreicht. Gleichzeitig müssen aus dem Transplantat möglichst alle unverträglichen, sogenannten alloreaktiven Zellen, die den Empfängerorganismus angreifen könnten, entfernt werden. Dazu wird das Stammzellpräparat vor der Transplantation nach den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Strategien aufbereitet.

Grad	Haut	Leber	Verdauungstrakt
0	keine Exantheme	Bilirubin: <2 mg/dL oder 35 µmol/L	keine Diarrhoe
I	Maculopapulöses Exanthem <25 % der Körperoberfläche ohne assoziierte Symptome	Bilirubin: 2 bis <3 mg/dL oder 35 - 50 µmol/L	Diarrhoe: >500-1000 ml/Tag (280 - 555 ml/m ²); Übelkeit und Erbrechen
II	Maculopapulöses Exanthem oder Erytheme mit Juckreiz oder andere assoziierte Symptome ≤25 % der Körperoberfläche oder lokale Schuppenbildung	Bilirubin: 3 bis <6 mg/dL oder 51 - 102 µmol/L	Diarrhoe: >1000-1500 ml/Tag (556 - 833 ml/m ²); Übelkeit und Erbrechen
III	Generalisierte Erythrodermie; symptomatische maculäre, papuläre oder vesikuläre Ausschläge mit Blasenbildung oder Schuppenbildung ≤50 % der Körperoberfläche	Bilirubin: 6 bis <15 mg/dL oder 103 - 225 µmol/L	Diarrhoe: >1500 ml/Tag (>833 ml/m ²); Übelkeit und Erbrechen
IV	Generalisierte exfoliative Dermatitis oder Blasenbildung	Bilirubin: >15 mg/dL oder >225 µmol/L	Diarrhoe: >1500 ml/Tag (>833 ml/m ²); Übelkeit und Erbrechen; Unterleibsschmerzen oder Darmverschluss

Tabelle 1.1: Einteilung der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (*graft-versus-host disease*, GvHD) nach Schwere der Symptome. (nach *Meeting Report des Consensus Conference on Acute GVHD Grading* (1994), Houston (USA), veröffentlicht in Przepiorka, *Bone Marrow Transplant*, 1995).

1.1.4 Immunrekonstitution und Infektionen

Der erfolgreichen SZT folgt die von den transplantierten Stammzellen ausgehende Regeneration des blutbildenden Systems des Empfängers. Dabei rekonstituieren die verschiedenen Populationen des Blutes unterschiedlich schnell und zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In der frühen Phase der Immunrekonstitution (Tag 0 - 100) nimmt nach einer Phase völliger Aplasie vorwiegend die Zahl der Zellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen) zu. Die Zellen der adaptiven Immunabwehr (T-Zellen, B-Zellen) erholen sich deutlich langsamer (Tag >100). Zwar kann in der frühen Phase auch eine Vermehrung von T-Zellen beobachtet werden, diese findet jedoch unabhängig vom Thymus statt und ist auf die reifen Spenderzellen im Transplantat zurückzuführen (Molldrem 2005; Moss et al., 2005). Diese klonale und

thymusunabhängige Vermehrung wird als homöostatische Expansion bezeichnet. Die thymusabhängige Entwicklung von neuen T-Zellen aus den transplantierten Stammzellen erfolgt stark verzögert. Die komplette Rekonstitution dieses Armes der Immunabwehr kann mehrere Monaten bis Jahre nach der Transplantation dauern (Abbildung 1.3).

Bis zu vollständigen Rekonstitution aller Arme der Immunabwehr sind die Patienten fortwährend für Infektionen verschiedener Arten äußerst empfänglich. Wird zur Vorbeugung oder Behandlung einer GvHD beim Patienten die Immunabwehr zusätzlich durch Medikamente unterdrückt, kann sich der Zeitraum der Immuninsuffizienz verlängern und das Risiko einer gefährlichen Infektion stark ansteigen. Die Schwere der Immunsuppression bzw. der Grad der Immunrekonstitution ist für die Infektionsgefahr ausschlaggebend (Davison et al., 2000).

Die Zeit der Immunrekonstitution nach SZT lässt sich in Hinsicht auf opportunistische Infektionen in 3 Phasen unterteilen (Dykewicz 2001). In der ersten Phase (Tag 0 - 30 nach SZT; *pre-engraftment phase*) gehören zu den wichtigsten Risikofaktoren die Neutropenie und Schäden der Haut und der Schleimhäute aufgrund der Chemotherapie und zentralvenöser Katheter. Die häufigsten Infektionen in diesem Zeitraum sind *Candida*- und *Aspergillus*-Infektionen, sowie Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Reaktivierung. Die im Allgemeinen mit Tag 30 nach SZT beginnende zweite Phase (*post-engraftment phase*) ist vor allem durch Insuffizienz der zellulären Immunabwehr, welche häufig mit zur Bekämpfung auftretender GvHD eingesetzten Immunsuppression und der GvHD selbst einhergeht, gekennzeichnet. In dieser Phase kommen gehäuft Infektionen mit Herpesviren, Cytomegalovirus (CMV)-Infektionen, und Pilzinfektionen mit *Pneumocystis carinii* und *Aspergillus*-Spezies vor. Ab Tag 100 nach SZT spricht man von der späten Phase (*late phase*) der Immunrekonstitution. Auch in dieser Phase besteht noch teilweise eine Insuffizienz der zellulären und der humoralen Immunabwehr, die sich gegebenenfalls durch eine auftretende GvHD und damit nötige Immunsuppression verschärfen kann. In diesem Zeitraum treten vor allem Infektionen mit CMV, Varizella-Zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und anderen weitverbreiteten Viren, Bakterieninfektionen (z.B. *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*) sowie Pilzinfektionen mit *Aspergillus* spp. auf (Kruger et al., 2005).

Durch medikamentöse Prophylaxestrategien, bessere Diagnosemöglichkeiten, verbesserten Vorbeugung und Behandlung von GvHD, und Entwicklung neuer therapeutischer Arzneimittel wurde in den letzten Jahren das Infektionsrisiko zwar deutlich gesenkt, trotzdem stellen Infektionen eine häufige Todesursache für Patienten nach SZT dar. So beträgt die infektionsassoziierte Letalität innerhalb der ersten 100 Tagen nach allogener SZT bei Kindern zwischen 7 % und 17,4 % (Busca et al., 1999) und innerhalb von zwei Jahren nach allogener SZT bis zu 20 % (Ochs et al., 1995).

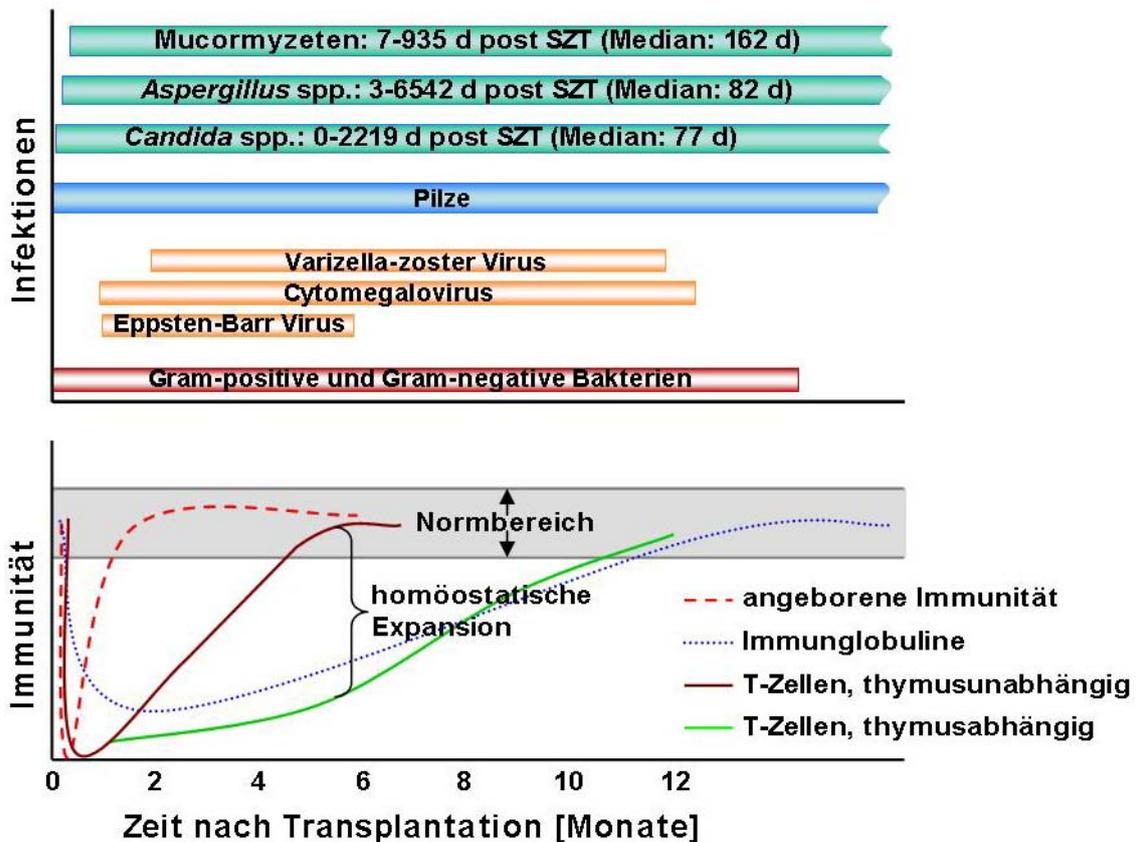


Abbildung 1.3: Immunrekonstitution und Infektionsmuster nach allogener Stammzelltransplantation. Die Zellzahl der angeborenen Immunabwehr erreicht nach der Transplantation folgenden Phase der Aplasie als erste der Normbereich. Die Zahl der Zellen der adaptiven Immunabwehr erholt sich dagegen viel langsamer und erreicht erst nach Monaten Normalwerte. Die auf die klonale, thymusunabhängige Vermehrung von transferierten T-Zellen (homöostatische Expansion) zurückzuführende Regeneration der T-Zellen erfolgt früher als die thymusabhängige Entwicklung neuer T- und B-Zellen aus dem transplantierten Stammzellpräparat. Während bakterielle und virale Infektionen vor allem in der *pre-* und *post-engraftment* Phasen auftreten und mit der Regeneration des adaptiven Immunsystems zurückgehen, können sich Infektionen mit Pilzen vom Tag der Transplantation noch bis Jahre nach dieser entwickeln. (nach Moss und Rickinson, *Nat Rev Immunol*, 2005, Molldrem, *Nature Medicine*, 2005 und Neofytos, *Clin Infect Dis*, 2009).

1.2 Pilzinfektionen

Invasive Pilzinfektionen stellen in der Transplantationsmedizin ein erhebliches Risiko für die Patienten dar. Bis zu 13 % der Patienten nach allogener SZT entwickeln eine invasive Pilzinfektion. Die häufigsten Verursacher dieser Mykosen sind Pilze der Spezies *Aspergillus* (43 % - 59,2 %), *Candida* (24,8 % - 28 %) und *Rhizopus* (7,2 % - 8 %) und die mit invasiven Mykosen assoziierte Mortalitätsrate bei Patienten nach allogener SZT erreicht je nach Literatur bis zu 90 % (Kontoyiannis et al., 2010; Neofytos et al., 2009; Pagano et al., 2007; Trenchel et al., 2000).

Die rechtzeitige Diagnose einer vorliegenden Pilzinfektion, die mit einer besseren Prognose für den Patienten einhergeht, ist ein großes Problem. Aufgrund der relativ geringen Fallzahlen und unspezifischer klinischer Symptome setzt die Identifikation einer Pilzinfektion große Erfahrung seitens des behandelnden Arztes voraus.

Eine wichtige Methode eine invasive Aspergillose zu identifizieren stellt die Bildgebung mittels Computer- oder Magnetresonanztomographie dar. Obwohl pulmonale Infiltrate, das sogenannte *halo-sign* und Einschmelzungen (*air crescent sign*) für eine invasive Aspergillose der Lunge charakteristisch sind, geben sie keine Hinweise auf den spezifischen Erreger noch sind sie vollständig diagnostisch. Ein direkter Nachweis des Erregers z.B. mittels perkutaner Biopsie ist erstrebenswert, doch häufig schwierig. Weitere neuere Methoden wie der Nachweis von Pilz-DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) oder der Nachweis von Galactomannan mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme linked immunoabsorbent assay*, ELISA; Platelia®) im Plasma zeigen in klinischen Studien gute Sensitivität und Spezifität, sind jedoch noch nicht abschließend evaluiert (Lehrnbecher et al., 2007).

Die spezifische Identifikation einer *Rhizopus*-Infektion wird zusätzlich erschwert, da sie in ihrem Verlauf weitgehend einer Aspergillose gleicht, und sich *Rhizopus* spp. und *Aspergillus* spp. morphologisch schwer unterscheiden lassen (Chamilos et al., 2005; Wahba et al., 2008). Auch gibt es bisher keine effektiven laboratorischen Nachweisverfahren für Mukormykosen (Sun et al., 2011). Laut einer Studie von Nosari et al. werden 50 % - 77 % der Infektionen mit Mukormyketen bei hämatologischen Patienten erst post mortem als solche erkannt (Nosari et al., 2000). Darüber hinaus wird

eine Mukormykose aufgrund ähnlicher Symptomatik häufig mit bakteriellen Pneumonien verwechselt (Ribes et al., 2000).

1.2.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein saprophytisch wachsender Schimmelpilz und ist weltweit verbreitet. Taxonomisch wird er dem Unterreich *Dicarya*, der Klasse der *Ascomycota*, der Subklasse der *Pezizomycotina*, der Ordnung der *Eurotiales* und der Familie *Trichocomaceae* zugeordnet (Hibbett et al., 2007).

Wegen seiner großen Fähigkeit zur Sporulation ist er ubiquitär vorhanden, wobei die Sporendichte der Luft in Gebäuden etwa 80 Sporen pro m³ (teilweise >10000 Sporen pro m³) beträgt (Shelton et al., 2002). Die runden Sporen, auch Konidien genannt, haben einen Durchmesser von 2 - 3 µm und werden an Konidiophoren gebildet, die ihrerseits aus Fußzellen der Hyphen entstehen (Latgé 1999). Die Konidiophoren haben eine Länge von etwa 500 µm und bilden an ihren Enden Vesikel, denen die Konidien bildende Phialiden aufsitzen (Abbildungen 1.4 A und 1.6 A). Nach Ablösen von den Phialiden gelangen die Konidien in die Luft und können so über weite Strecken transportiert werden. Der Lebenszyklus des Pilzes beginnt mit dem Anschwellen der ruhenden Spore. Nach Schwellung bilden die Sporen kurze hyphale Fortsätze aus, die mit der Zeit zu Hyphen auswachsen, sich verzweigen und schließlich ein weitverzweigtes Myzel ausbilden.

Konidien von *A. fumigatus* sind von einer Proteinschicht, die als Rodlet bezeichnet wird, umgeben (Paris et al., 2003), welche hauptsächlich aus Hydrophobinen A und B besteht und den Konidien Schutz vor Umwelteinflüssen gewährt. Die Auskeimung der Sporen induziert eine Reihe Prozesse, die zum Umbau der Zellwand, Umstellung des Metabolismus und der Produktion von allergen und pathogen wirkenden Stoffen führt (Rementeria et al., 2005). Eine schematische Übersicht dieser Veränderungen ist in Abbildung 7 dargestellt. So wird während des Keimungsprozesses die Rodlet-Struktur abgebaut, und die Zellwand des Pilzes übernimmt die Funktion der äußeren Schutzhülle. Die Zellwand von *A. fumigatus* ist eine komplexe Struktur aus diversen Polysacchariden (unter anderem β-1,3-Glukan, Galaktomannan, Chitin) und Proteinen, und ist einem steten Wandel unterzogen (Diamond 1988). Hyphen von *A. fumigatus*, die von Septen unterteilt werden, haben einen konstanten Durchmesser von etwa 2 - 3 µm

und bilden an Zweigstellen einen Winkel von etwa 45 ° (Abbildung 1.6 C). Kommt das Myzel in Kontakt mit Luft, werden neue Konidiophore, an denen sich wiederum Phialiden bilden, ausgebildet, und die Konidienproduktion setzt ein - der Lebenszyklus beginnt von vorne. *A. fumigatus* ist ein stark thermotoleranter Pilz, der bei Temperaturen von bis zu 55 °C wachsen kann und dessen Konidien in der Lage sind Temperaturen von 70 °C zu überleben (Raper 1965).

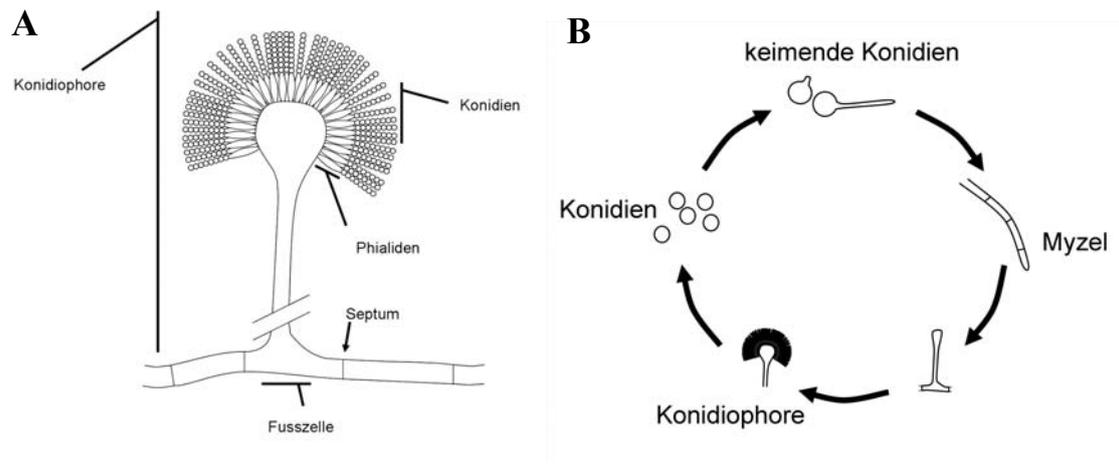


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von *A. fumigatus* und seines Lebenszyklus. A. Aus der Hyphe des *A. fumigatus* entsteht von einer sogenannten Fußzelle ausgehend eine Konidiophore, an deren Ende sich Phialiden bilden, welche durch Abschnürung Konidien erzeugen. B. Konidien, die sich durch die Luft fortbewegen, keimen bei bestimmten Bedingungen (ausreichende Feuchtigkeit, vorhandene Nährstoffe) nach Anschwellen aus, bilden Hyphen, die sich im weiteren Verlauf verzweigen. Die weitverzweigten Hyphen vieler ausgewachsener Konidien bilden schließlich ein dichtes Myzel. Bei Zugang zur Luft bilden sich aus Fußzellen einzelner Hyphen des Myzels Konidiophore, die konidienbildende Phialiden tragen. (nach Latgé, *TRENDS in Microbiology*, 2001)

Jeder Mensch kommt im Laufe seines Lebens mit *A. fumigatus* in Kontakt, was jedoch bei gesunden Individuen nur in den seltensten Fällen zu Infektionen führt. Bei immundefizienten Menschen, wie beispielsweise bei Menschen mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten oder Transplantationspatienten, ist der Befall mit diesem opportunistischen Pathogen häufig und mit einer hohen Mortalität assoziiert.

1.2.2 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae, auch bekannt als *Rhizopus arrhizus*, ist eine weltweit vorkommende Spezies der Mukormyzetten, die historisch bedingt oft als Zygomyceten bezeichnet werden. Der Pilz kann in verschiedenen Böden, in Getreide und auf Gemüse

nachgewiesen werden, und wird auch teilweise zur Nahrungsmittelherstellung (Fermentation) genutzt. Die Sporen des Pilzes sind allzeit in der Luft vorhanden, stellen aber für immunkompetente Personen keine Gefahr dar. Patienten, die Immundefizienz oder -inkompetenz aufweisen, können jedoch eine Infektion mit *R. oryzae* entwickeln, womit dieser Pilz als opportunistischer Pathogen zu betrachten ist (Ribes et al., 2000). Die oval geformten Konidien von *R. oryzae* haben einen Durchmesser von 6 – 8 µm auf 4,5 – 6 µm. Die wenig unterteilten Hyphen haben zum Teil einen sehr variablen Durchmesser von 6 - 16 µm und können wurzelähnliche Strukturen, sogenannte Rhizoide, ausbilden (Abbildungen 1.5 und 1.6 B). Taxonomisch wird *R. oryzae* der Klasse der *Glomeromycota/Zygomycota*, der Subklasse der *Mucormycotina*, der Ordnung *Mucorales*, der Familie *Mucoraceae* zugeordnet (Hibbett et al., 2007).

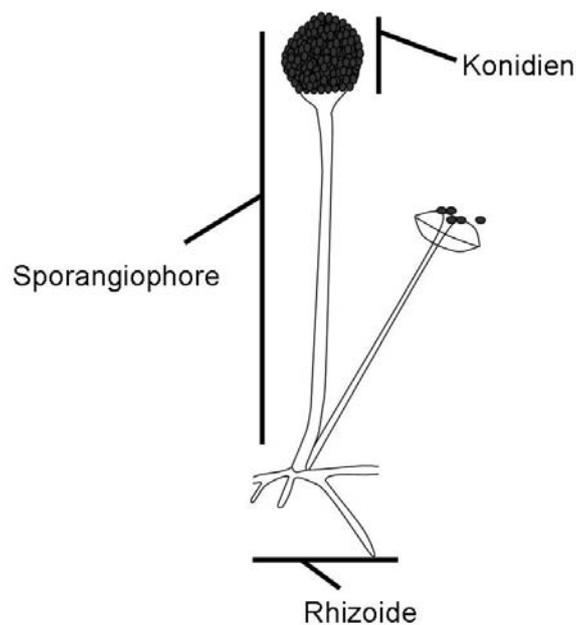


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von *R. oryzae*. Sporangiochore mit aufliegenden Konidien (Sporangiosporen). (nach G.S. de Hoog, G.J. Cuarro, M.J. Figueras, *Atlas of clinical fungi*, 2000).

Sein Lebenszyklus entspricht weitgehend dem von *A. fumigatus* (siehe Abbildung 1.4 B). Die über die Luft übertragenen Konidien keimen unter günstigen Umweltbedingungen nach Anschwellen aus und bilden hyphale Fortsätze. Diese wachsen zu Hyphen aus, welche stetig länger werden und sich verzweigen, bis ein weitverzweigtes Myzel entsteht. Die morphologischen Unterschiede des *R. oryzae*

Myzels sowie der Konidiophoren zu den entsprechenden Formen von *A. fumigatus* sind in Abbildung 1.6 dargestellt. Die Ausbildung von Rhizoiden stellt einen wesentlichen Unterschied zwischen den Hyphen von *R. oryzae* und *A. fumigatus* dar.

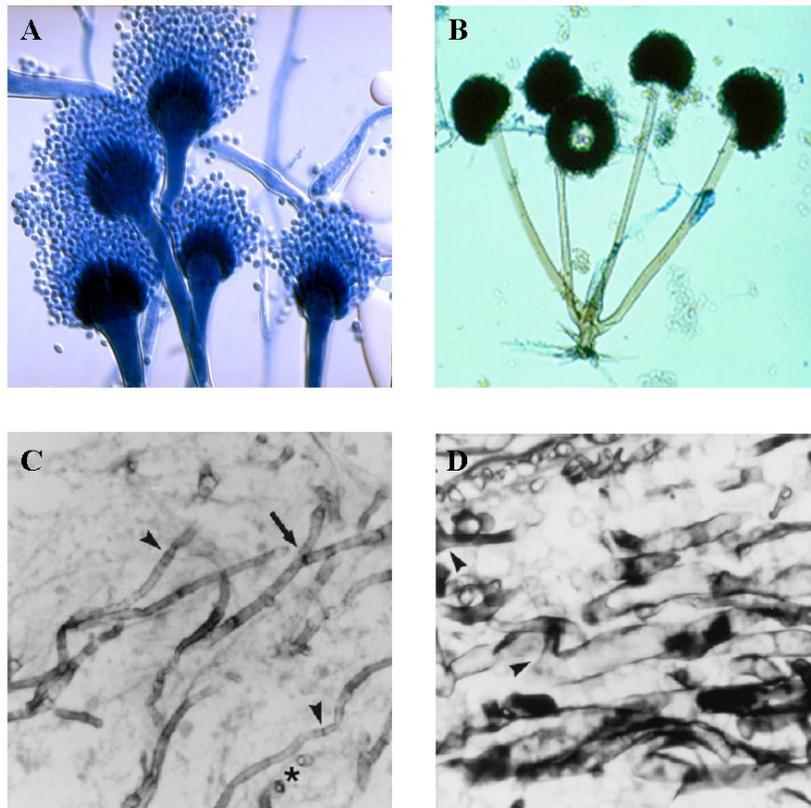


Abbildung 1.6: Mikroskopische Aufnahmen von *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus oryzae*. A. Konidiophoren von *A. fumigatus* mit gut sichtbaren Konidien. B. Konidiophoren von *R. oryzae* mit Konidienköpfen. C. *A. fumigatus* im Gewebe. *A. fumigatus* bildet dünne Hyphen gleichmäßigen Durchmessers, die durch Septen unterteilt werden. An den Zweigstellen, die einen Winkel von etwa 45 ° aufweisen (Pfeile), sind keine Verengungen oder Blastokonidien sichtbar. Abgebildet ist ein histologischer Gewebeschnitt, der mit Gomori-Methenamin-Silber gefärbt wurde. D. *R. oryzae* im Gewebe. *R. oryzae* bildet Hyphen, die sich stark im Durchmesser unterscheiden können und kaum durch Septen unterteilt sind. Verzweigungen der Hyphen bilden einen weiten Winkel von nahezu 90 ° (Pfeile). Abgebildet ist ein histologischer Gewebeschnitt, der mit Gomori-Methenamin-Silber gefärbt wurde. Abbildung A von Hossein Mirhendi, Dept. of Medical Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, bereitgestellt durch www.pfdb.net [4], Abbildung B bereitgestellt durch www.mycology.adelaide.edu.au [5], Abbildungen C + D aus Ribes, *Clinical Microbiology Reviews*, 2000.

1.2.3 Invasive Aspergillose

Ohne Behandlung beträgt die Sterblichkeitsrate invasiver Aspergillosen (IA) bei immunsupprimierten Patienten 100 %. Doch auch der Einsatz antimykotischer Medikamente führt in den meisten Fällen zu keinem Erfolg, was sich beispielsweise in

einer Mortalitätsrate bei Patienten nach SZT von bis zu 87 % niederschlägt (Lin et al., 2001; Upton et al., 2007). Etwa die Hälfte der IA manifestiert sich in den ersten drei Monaten nach SZT (Median: 82 Tage, Spannweite: 3 - 6542 Tage) (Neofytos et al., 2009), was der frühen Phase der Immunrekonstitution entspricht (siehe Kapitel 1.1.4). Eine frühe Diagnose geht mit einer besseren Prognose einher, wobei die Diagnose der IA schwierig ist, eine Erregerisolierung und Speziesbestimmung gelingt in weniger als der Hälfte der Patienten. So konnte laut einer Studie mit 234 Patienten mit festgestellter Aspergillose in 44,8 % der Fälle (42,1 % - 47,5 %) die Spezies nicht bestimmt werden (Neofytos et al., 2009).

Die meisten Aspergillosen manifestieren sich in der Lunge (80 % - 90 %), während zerebrale (10 % - 20 %) und andere Manifestationen seltener sind (Denning 1998). Die hohe Pathogenität von *Aspergillus* spp. beruht auf mehreren Umständen, die mit der Morphologie und dem Metabolismus des Pilzes zusammenhängen. So dienen einige Bestandteile der Pilzzellwand dem Pilz als Schutz vor der Immunabwehr des Wirtes, wie zum Beispiel das hydrophobe RodA Protein, welches die Aktivierung dendritischer Zellen und die Phagozytose von Konidien durch Makrophagen inhibiert (Aimanianda et al., 2009; Dagenais et al., 2010) und somit die Besiedelung des Wirtes durch den Pilz fördert. Zusätzlich produzierte Sekundärmetabolite wirken vielfältig toxisch auf den menschlichen Organismus und schützen den Pilz auf diese Weise vor der Immunabwehr (Al-Anati et al., 2006; Ben-Ami et al., 2009; Wichmann et al., 2002). So kann Gliotoxin, ein zytotoxisches und immunsupprimierendes Mykotoxin, Monozyten sowie T-Zellen schädigen und deren Funktion inhibieren (Stanzani et al., 2005). Ausgeschiedenes Kynurenin, ein Tryptophan-Metabolit, hemmt die Produktion von Interleukin (IL)-17 und inhibiert so eine optimale Immunantwort (Chai et al., 2010). Bekannte Moleküle, die mit der Virulenz von *A. fumigatus* assoziiert sind, zeigt die Abbildung 1.7.

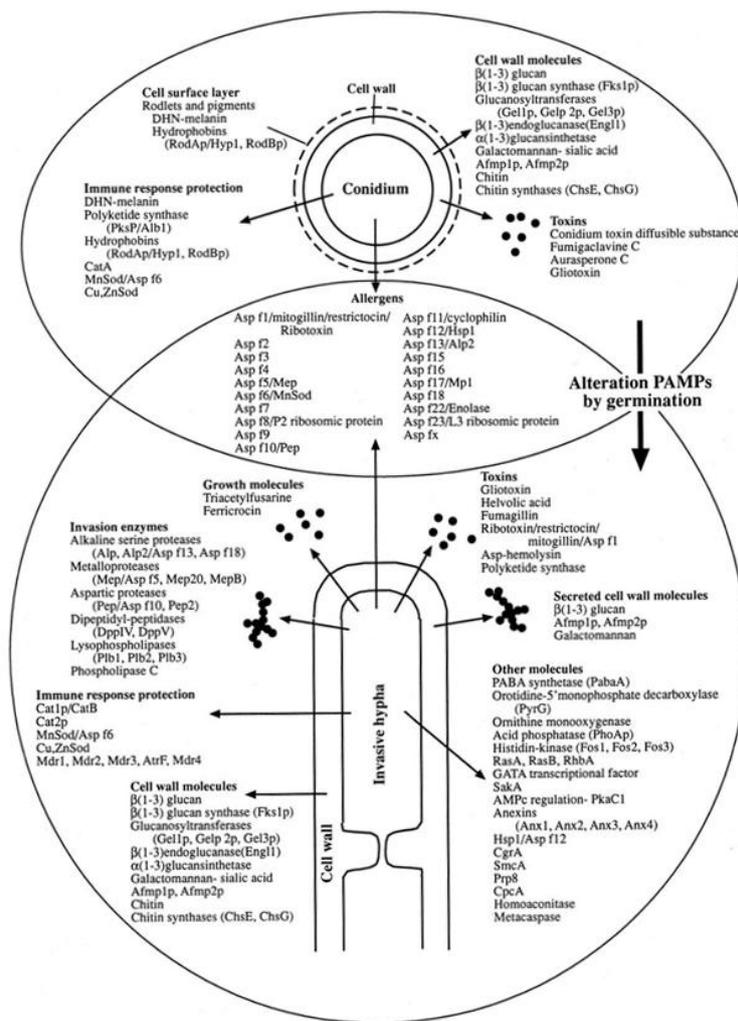


Abbildung 1.7: Mit Virulenz assoziierte Moleküle von Konidien und Hyphen von *A. fumigatus*. Die Veränderung der Morphologie während der Auskeimung der Pilzkonidien geht mit Veränderungen des Zellwandaufbaus, des Metabolismus und des Musters ausgeschiedener Toxine und anderer Moleküle einher. Abbildung aus Rementeria, *Rev Iberoam Micol*, 2005.

Des Weiteren führen von *A. fumigatus* am Ort der Infektion produzierte Proteasen zur Schädigung des umliegenden Gewebes (Rementeria et al., 2005). Die dadurch entstehenden Läsionen ermöglichen es dem Pilz unter anderem in Blutgefäße einzuwandern (Angioinvasion), was einerseits zu Blutungen, Minderdurchblutung des betroffenen Gewebes und dessen nekrotischem Absterben führen kann, zusätzlich kann es so zur Ausbreitung des Pilzes im Organismus kommen. Durch Dissemination des Pilzes können nachfolgend auch Gehirn und Herz des Patienten befallen werden, was bei vielen Patienten zum Tode führt (Denning 1998).

1.2.4 *Invasive Mukormykose*

Mukormykosen werden hauptsächlich durch Pilze des Genus *Rhizopus*, aber auch durch Spezies der Genera *Mucor*, *Rhizomucor* und *Absidia* hervorgerufen und bilden nach Aspergillose und Kandidose eine der häufigsten invasiven Pilzinfektionen. So stellen Mukormykosen etwa 8 % der invasiven Pilzkrankungen bei Patienten nach SZT dar (Kontoyiannis et al., 2010; Neofytos et al., 2009). Die Hälfte dieser Mukormykosen manifestieren sich in den ersten sechs Monaten nach SZT (Median: 173 Tage, Spannweite: 7 - 2254 Tage) (Neofytos et al., 2009), und die damit assoziierte Mortalitätsrate reicht in Abhängigkeit vom Ort der Infektion bis zu 100 % (Kontoyiannis et al., 2010; Ribes et al., 2000; Roden et al., 2005).

Mukormykosen manifestieren sich häufig rhinocerebral (1/3 bis 1/2 aller Fälle), pulmonal, kutan, subkutan oder gastrointestinal. Durch Angioinvasion, welche oftmals mit Blutungen und Hämoptysis einhergeht, kann sich der Pilz jedoch sehr schnell über den gesamten Körper des Wirtes ausbreiten und nahezu alle Organe, wie z. B. das Herz, befallen. Sind Augen von der Infektion betroffen, kann sich der Pilz ebenfalls über den Augennerv verbreiten und unter Umständen in das zentrale Nervensystem einwandern. Wie bei Aspergillosen wird die Pathogenität von *Rhizopus* spp. durch eine Reihe von von ihnen produzierter Toxine gefördert. So produzieren beispielsweise *R. stolonifer* und *R. oryzae* unter anderem Agroclavin, ein für den Menschen toxisches Ergotalkaloid, und *R. microsporus* Rhizonin A, ein Hepatitis verursachendes Toxin. Viele Vertreter der Mukormyzeten sind thermotolerant und können auch bei Temperaturen um 40 °C gut wachsen, was ihre Pathogenität zusätzlich steigert (Ribes et al., 2000).

1.2.5 *Antimykotische Chemotherapie*

Die Behandlung invasiver Pilzkrankungen mittels antimykotischer Substanzen folgt mehreren unterschiedlichen Strategien, die sich nach Anamnese des Patienten sowie indirekten und direkten Hinweisen auf eine invasive Pilzinfektion richten. Die folgende Tabelle (Tabelle 1.2) stellt die unterschiedlichen Strategien zusammenfassend dar.

Antimykotische Chemotherapie	
Primäre Prophylaxe	Präventive Gabe antimykotischer Substanzen bei Patienten mit hohem Erkrankungsrisiko
Empirische Therapie	Präventive Gabe antimykotischer Substanzen bei granulozytopenen Patienten mit persistierendem Fieber oder neu auftretendem Fieber unter adäquater empirischer antibakterieller Therapie
Präemptive Therapie	Präemptive Gabe antimykotischer Substanzen bei Patienten mit hohem Erkrankungsrisiko für eine invasive Aspergillose und Nachweis von Galaktomannan-Antigene bzw. PCR-Produkten im seriellen Screening ohne andere kompatible mikrobiologische oder radiologische Befunde
Therapie wahrscheinlicher und gesicherter Infektionen	Gabe antimykotischer Substanzen bei Risikopatienten mit kompatiblen klinischen, radiologischen und mikrobiologischen Befunden bzw. mikrobiologischem und/oder mikroskopischem Nachweis eines Pilzerregers aus sterilen Geweben bzw. Körperflüssigkeiten
Sekundärprophylaxe	Gabe antimykotischer Substanzen bei Patienten mit erfolgreich behandelten invasiven Infektionen bzw. radiologischen Restbefunden während Phasen weiterer Granulozytopenie bzw. Immunsuppression

Tabelle 1.2: Algorithmen der antimykotischen Chemotherapie. Zu den Patienten, die wegen ihrer Grunderkrankung einem hohen Infektionsrisiko ausgesetzt sind gehören Patienten mit akuter myeloischen Leukämie, Patienten des Hochrisikozweigs der akuten lymphatischen Leukämie, Patienten mit aplastischer Anämie, Patienten im Rezidiv, Patienten nach allogener SZT sowie die eine GvHD entwickelnden Patienten. Aus T. Lehrnbecher, *Infektionsmanagement in der pädiatrischen Hämatologie/Onkologie*, 2007.

Die für die antimykotische Chemotherapie hauptsächlich eingesetzten Medikamente lassen sich hinsichtlich ihrer Wirkweise in drei Klassen unterteilen. Eine Klasse dieser Medikamente (Pylene) zu der Amphotericin B Deoxycholat und Amphotericin B Lipidformulierungen gehören, schädigt durch die Interaktion mit Ergosterol die Zellmembran der Pilze und hemmt ihr Wachstum. Die zweite Klasse, die Klasse der Triazole zu der Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol und Posaconazol zählen, wirkt über die Hemmung der Ergosterol-Biosynthese, wodurch das Zellwachstums und die Zellteilung des Pilzes gehemmt werden. Die zu der dritten Klasse der Echinocandinen gehörenden Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin hemmen die Synthese von Zellwand-1-3-beta-D-Glukan, womit ebenfalls das Wachstum der Pilze gehemmt wird. Des Weiteren unterscheiden sich die verschiedenen antimykotischen Medikamente in

ihrer Wirksamkeit gegenüber einzelnen Pilzen. Die Abbildung 1.8 zeigt die etablierten Antimykotika und ihr spezifisches Wirkspektrum.

	Polyen		Triazole			Echinocandine		
	Amphotericin B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Anidulafungin	Micafungin	Caspofungin
<i>Candida albicans</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida glabrata</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida tropicalis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida krusei</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Aspergillus fumigatus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Aspergillus terreus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Aspergillus flavus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Cryptococcus neoformans</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Penicillium spp.</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Fusarium spp.</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
Zygomyceten	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 1.8: Übersicht der Wirksamkeit einiger gängiger antimykotischer Medikamente gegenüber wichtigen Verursachern von invasiven Pilzinfektionen. Dunkel grün = gut wirksam; hell grün = mäßig wirksam, gelb = kaum wirksam, rot = unwirksam. (modifiziert nach H. Hof und W. Heinz, *Kompendium Medizinische Mykologie*, 2010).

Während beispielsweise *A. fumigatus* mäßig bis gut auf viele der Antimykotika anspricht, z.B. auf Amphotericin B, Posaconazol und Voriconazol, zeigen nur wenige der heute verfügbaren antimykotischen Medikamente eine Wirkung gegenüber Zygomyceten. Allein beim Einsatz von Amphotericin B, Voriconazol sowie Posaconazol kann eine mäßige antimykotische Wirkung ausgemacht werden (Hof et al., 2010). Da der Einsatz von Antimykotika potentiell auch mit Nebenwirkungen und Toxizität verbunden ist, bleibt deren Einsatz bei bestimmten Patientengruppen oft nur stark eingeschränkt möglich. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine systemische antimykotische Prophylaxe mit einer erhöhten Pilzinfektion-assoziierten Mortalität einhergeht (Pagano et al., 2007) und der prophylaktische Einsatz von Voriconazol das Risiko von Mukormykosen sogar erhöhen kann (Kontoyiannis et al., 2005).

1.2.6 Immunabwehr von Pilzinfektionen

Pilze werden in erster Linie durch das angeborene Immunsystem erkannt und eliminiert. Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren hierzu eine Reihe von Rezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRR), die der Erkennung von sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) dienen. Die Bindung der PAMP an PRR aktiviert intrazelluläre Mechanismen in den Zellen und induziert damit verbundene zellspezifische Antworten. Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*; TLR), die zu den PRR gehören, sind neben C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR) die wichtigsten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Erkennung von Pilzen. Aus der Klasse der TLR sind hauptsächlich TLR-2, TLR-4 und TLR-9 an dieser beteiligt. TLR können unter anderem Zymosan, Phospholipomannan, *O*-verknüpfte-Mannane und von Pilzen stammende DNS als PAMP erfassen (Braedel et al., 2004; Netea et al., 2006; van de Veerdonk et al., 2008). Zu den CLR gehören unter anderem Dectin-1 und Dectin-2, DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), sowie die Mannose-Rezeptoren MRC1 und MRC2, die β -Glukane, Mannose und Mannane erkennen (Brown 2011).

Nach Inhalation werden Konidien des Pilzes durch professionelle Phagozyten über Phagozytose aufgenommen und über Zytolyse abgetötet. Hyphen werden in erster Linie durch neutrophile Granulozyten eliminiert (Diamond et al., 1978; Roilides et al., 1994; Schaffner et al., 1982). Dies findet zum Teil extrazellulär statt, da Hyphen ab einer bestimmten Größe durch diese Zellen nicht mehr phagozytiert werden können. Hierzu bilden neutrophile Granulozyten nach Stimulation durch den Erreger aus Chromatin und Granula-Proteinen bestehenden Strukturen (*neutrophil extracellular traps*; NET), welche durch Aufbrechen der Zellmembran aus den Zellen entlassen werden. Das Chromatin vermittelt hierbei die Anheftung der NET an die Pilzhyphen, die anschließend hohen Konzentrationen von degradierenden Enzymen ausgesetzt und somit abgetötet werden (Urban et al., 2006).

Die Phagozytose der Erreger durch dendritische Zellen führt zu deren Reifung, der intrazellulären Prozessierung der aufgenommenen Erreger und der Präsentation von Pathogen-assoziierten Molekülen an der Zelloberfläche über MHC-II-Moleküle. Die mit Antigenen beladenen MHC-II-Moleküle können von naiven T-Zellen mittels T-Zell-

Rezeptor (TZR) erkannt werden, was zur Differenzierung der naiven T-Zellen in die verschiedenen Effektor-T_H-Zellpopulationen führt. Die differenzierten T_H-Zellen produzieren nun entsprechend ihren Zelltypen spezifische Zytokine und regulieren so den weiteren Verlauf der Immunantwort. Ein wichtiger Faktor hierbei ist Interferon-gamma (IFN- γ), welches zu Typ-II-Interferonen zählt, und unter anderem Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen stimuliert. Es induziert und verstärkt in diesen Zellen vielfältige Mechanismen, wie z.B. Phagozytose, Zytotoxizität, Proliferation, Zytokin- und Chemokinproduktion und -ausschüttung. Daneben besitzt IFN- γ auch chemotaktische Wirkung auf Monozyten, reguliert die Differenzierung der B-Zellen und reguliert die Polarisierung der T-Zell-Antwort.

Aktiviert B-Zellen stellen gegen den Pilz gerichtete Immunglobuline (Ig) her, die allgemein in verschiedene Isotypen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden. Den Hauptanteil bilden die als Monomere vorliegenden Antikörper der IgG-Klasse. Diese binden über ihre variablen spezifischen Regionen an Antigene extrazellulärer Pathogene oder deren Antigene auf infizierten Zellen. Die konstanten Regionen (Fc-Region) der IgG-Antikörper können durch Rezeptoren vieler Zellen der Immunabwehr gebunden werden, was eine spezifische Wirkung der jeweiligen Zellen auslöst. Rezeptoren für IgG besitzen unter anderem T-, B-Lymphozyten, Thrombozyten, Makrophagen und NK-Zellen (Fc- γ III-Rezeptor, CD16). So tragen sie wesentlich zur Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen und freier Pathogenen bei. Die Bedeutung von IgG-Antikörper bei der Abwehr von Pilzen ist jedoch noch unklar.

NK-Zellen stellen vor allem in der frühen Phase der Infektion das wichtige IFN- γ zu Verfügung (Morrison et al., 2003; Park et al., 2009). Zusätzlich produzieren sie weitere Zytokine und Chemokine, wie RANTES (*regulated and normal T cell expressed and secreted*) oder GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), die immunregulatorisch und aktivierend auf viele an der Abwehr von Pilzen beteiligte Zellen wirken. Die genaue Rolle der humanen NK-Zellen ist im Zusammenhang mit Pilzinfektionen aber bisher nur unzureichend untersucht. Die folgende Abbildung (Abbildung 1.9) stellt die Immunantwort der angeborenen und adoptiven Immunabwehr bei Pilzinfektionen schematisch dar.

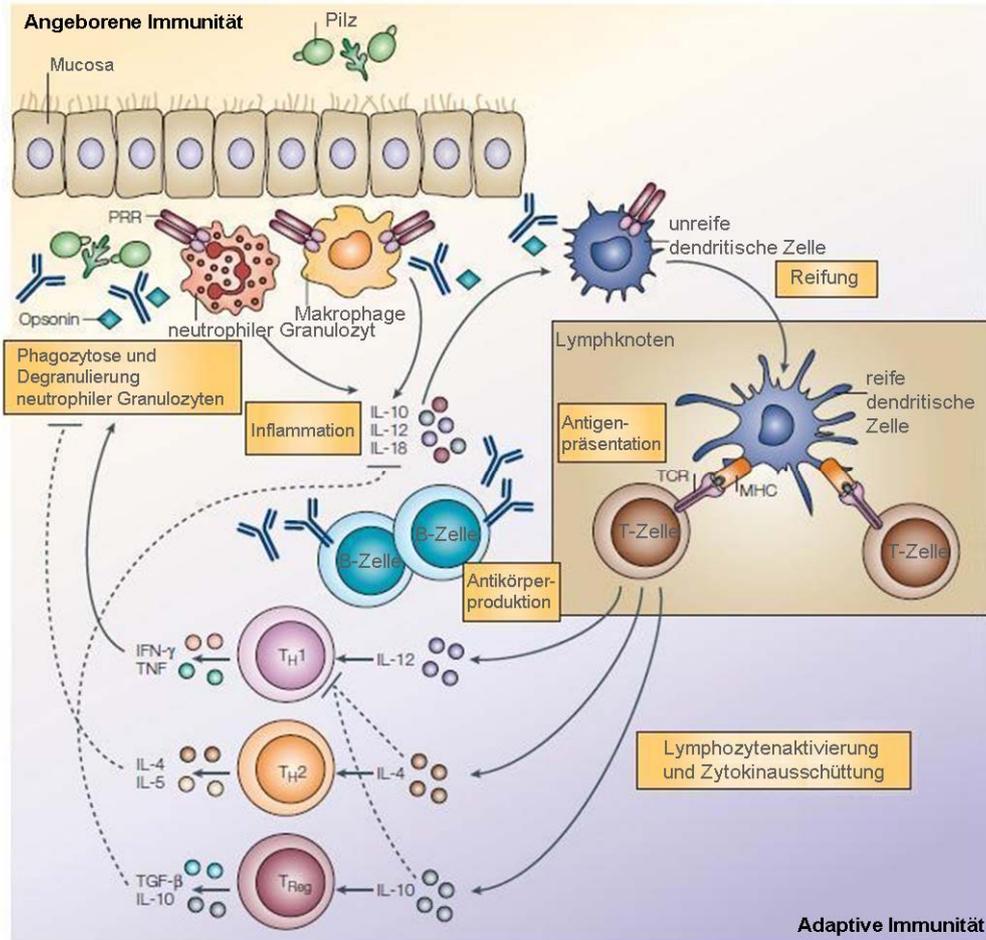


Abbildung 1.9: Immunabwehr von Pilzinfektionen. Pilze werden durch Zellen der angeborenen Immunabwehr durch entsprechende Rezeptoren (PRR) erkannt und zerstört. Phagozytose der Pilze durch unreife dendritische Zellen führt zu deren Reifung und aktiviert anschließend die Zellen der adaptiven Immunabwehr. Naiven T-Zellen differenzieren sich zu den verschiedenen Effektor-T_H-Zellen, die ihrem Zelltyp entsprechend spezifische Zytokine produzieren und so die weitere Immunantwort steuern. Durchgehende Linien deuten aktivierende Signale, gestrichelte Linien inhibierende Signale an. PRR = *pattern recognition receptor*, IL = Interleukin, IFN-γ = Interferon-gamma, TNF = Tumor-Nekrose-Faktor, TGF-β = *transforming growth factor-beta*, TCR = T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*), MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*). Abbildung aus Romani, *Nat Rev Immunol*, 2004; modifiziert.

1.3 T-Zellen

T-Lymphozyten werden hauptsächlich in zwei Subpopulationen unterteilt, die CD4⁻CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und CD4⁺CD8⁻ T_H-Zellen, die sich aus einem gemeinsamen T-Zell-Vorläufer im Thymus differenzieren. Dabei durchlaufen die Vorläuferzellen neben verschiedenen Regionen des Thymus (Kortex, Medulla) auch verschiedene Stadien der Entwicklung, die jeweils mit unterschiedlichen Mustern der

Oberflächenantigenexpression einhergehen. Es können drei Stadien bezüglich der CD4 und CD8 Expression unterschieden werden: ein Stadium, in dem die T-Zellen keines der beiden Antigenen exprimieren, das doppelt negative Stadium (*double negative*, DN), dem folgend ein Stadium, in dem beide Antigene zeitgleich exprimiert werden, das doppelt positive Stadium (*double positive*, DP), und anschließend die Trennung in die CD4SP (*single positive*, SP) T_H-Zellen und CD8SP zytotoxische T-Zellen. Die Entwicklung der beiden T-Zell-Phänotypen enthält positive und negative Selektionsmechanismen, an denen sowohl Thymusepithelzellen als auch sich im Thymus befindliche dendritische Zellen und Makrophagen beteiligt sind, und wird ebenfalls durch verschiedene Zytokine beeinflusst. Zeigen DP-Zellen eine adäquate Affinität gegenüber MHC-Molekülen der Epithelzellen oder der Antigenpräsentierenden Zellen (APZ; dendritische Zellen und Makrophagen) im Kortex (positive Selektion), wandern diese Zellen in die Medulla des Thymus ein. Exprimieren sie andererseits gegen körpereigene Proteine gerichtete Antigenrezeptoren, welche in diesem Schritt durch dendritische Zellen und Makrophagen zur Verfügung gestellt werden, erhalten sie Apoptose induzierende Signale und werden somit aussortiert (negative Selektion). Zellen, die diese Schritte erfolgreich durchlaufen haben, differenzieren sich nun in CD4SP- oder CD8SP-T-Zellen (Abbildung 1.10) und verlassen anschließend den Thymus. Beide Subpopulationen exprimieren den T-Zell-Rezeptor, der dem Erkennen von Antigenen dient, die durch Antigenpräsentierende Zellen über MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche präsentiert werden. CD4⁺ T_H-Zellen nehmen hierbei die über MHC-II dargebotenen Antigene, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen die über MHC-I dargebotene Antigene wahr. Jedes der durch die APZ präsentierten Antigene induziert die Differenzierung einer spezifischen T-Zelle, die sich klonal vermehrt und nur durch dasselbe Antigen reaktiviert werden kann. Die Gesamtpopulation der T-Zellen besteht aus einem Gemisch äußerst spezifischer T-Zellen, die sich nach erneutem Antigenkontakt vermehren und ihre Funktion ausüben. Im Blut eines gesunden Menschen können sowohl für jeweils verschiedene Pilzantigene spezifische CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T_{Helfer} (T_H)-Zellen als auch spezifische CD3⁺CD4⁻CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (Chaudhary et al., 2010).

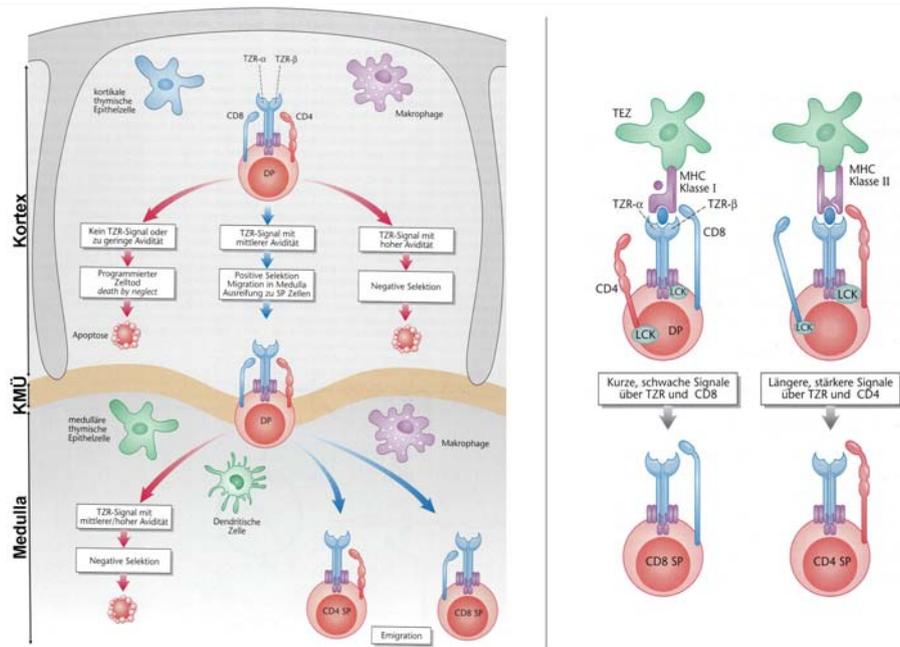


Abbildung 1.10: Differenzierung zytotoxischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Helfer-Zellen. Im Kortex des Thymus werden doppelt positive CD4⁺CD8⁺ T-Zellen aufgrund der Avidität ihrer TZR und der Fähigkeit „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden selektioniert. Die selektionierten DP-Zellen wandern daraufhin in die Medulla des Thymus, wo sie sich in CD4SP und CD8SP T-Zellen differenzieren. DP = *double positive*, SP = *single positive*, TZR = T-Zell-Antigenrezeptor, KMÜ = kortiko-medulläre Übergangszone, TEZ = thymische Epithelzelle, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*). Abbildungen aus U. Wahn, R. Seger, V. Wahn, G.A. Holländer, *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, 2005.

1.3.1 T-Helfer-Zellen

Die T_H-Population lässt sich anhand der sezernierten Zytokine in weitere Subpopulationen unterteilen. Klassischerweise unterscheidet man zwischen T_H1-Zellen, die hauptsächlich Interleukin (IL)-2, IFN- γ , und TNF- α produzieren, T_H2-Zellen, die hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren, den IL-17 und IL-22 produzierenden T_H17-Zellen, sowie den hauptsächlich IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}). Die Aktivierung der unterschiedlichen T_H-Zellen, die teilweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet, führt zu einer jeweils spezifischen Reaktion des Immunsystems und das gleichzeitige Zusammenwirken der verschiedenen T_H-Zellen reguliert die entstehende Immunantwort. So führt beispielsweise eine Polarisierung der Immunabwehr in Richtung T_H1 zu einer proinflammatorischen Immunantwort, die allgemein einer Infektion entgegenwirkt. Im

Gegensatz dazu führt eine Polarisierung in Richtung T_H2 aufgrund der von diesen Zellen produzierten T_H1 -supprimierenden Zytokine zur Eindämmung der Inflammation. T_H -Zellen können phänotypisch in zwei Populationen, den Effektorzellen (*effector T cells*) und den Gedächtniszellen (*memory T cells*), unterteilt werden. Die Effektorzellen, die einen Großteil der jeweiligen T_H -Population bilden, haben eine relativ kurze Lebensdauer und werden nach Ende der immunologischen Antwort durch den Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) eliminiert. Die Gedächtniszellen besitzen dahingegen eine lange Lebensdauer und bleiben auch nach Ende der immunologischen Antwort erhalten. Eine erneute Antigenstimulation induziert die Expansion der Gedächtniszellen und leitet so eine dem Antigen entsprechende spezifische Immunantwort ein.

1.3.2 Zytotoxische T-Zellen

Die $CD8^+$ T-Zellen wirken zytotoxisch gegenüber infizierten und entarteten Zellen, sowie gegenüber fremden Zellen, die sich histoinkompatibel zeigen. Nach Aktivierung der Zellen durch die Bindung ihres TZR an ein mit Antigenen beladenes MHC-I-Molekül der Zielzelle, bilden die zytotoxischen T-Zellen eine immunologische Synapse mit der Zielzelle aus. Anschließend geben sie die in ihren Granula gespeicherten zytotoxischen Moleküle ab und bewirken so die Lyse der Zielzelle. Des Weiteren können Apoptose induzierende Liganden wie FasL oder TRIAL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) an die entsprechenden Rezeptoren der Zielzelle binden. Beide Vorgänge induzieren die Apoptose der Zielzelle und somit ihre Eliminierung.

Analog zu T_H -Zellen bilden auch die zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt Effektor- und Gedächtniszellen, die nach erneutem Antigenkontakt reaktiviert werden. Obwohl die zytotoxische Wirkung hauptsächlich den $CD4^+CD8^+$ T-Zellen zugeschrieben wird, gibt es auch zytotoxische $CD4^+CD8^-$ T-Zellen, deren genaue Wirkweise jedoch bisher nicht geklärt ist.

1.3.3 T_{Helfer} -Zellen bei Pilzinfektionen

Verschiedene Pilzantigene können alle Arten einer T-Zell-Antwort, sprich eine T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} sowie eine T_{Reg} gerichtete T-Zell-Antwort, induzieren (Bozza et al., 2009; Murdock et al., 2011; Romani 2011). Durch das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen T_{H} -Subpopulationen wird letztendlich ein optimaler Verlauf der Immunantwort bei einer Pilzinfektion vermittelt. Eine T_{H1} -gerichtete Antwort des Immunsystems führt generell zum Schutz des Wirtes (Chai et al., 2010). T_{H1} -Zellen produzieren in großen Mengen $\text{IFN-}\gamma$, wodurch sie beispielsweise die Aktivierung von Phagozyten bewirken und die Antikörperproduktion durch B-Zellen induzieren. Die später einsetzende T_{H2} -gerichtete Antwort wirkt der Inflammation und somit dem T_{H1} -vermittelten Schutz entgegen. Die von T_{H2} -Zellen produzierten Zytokine IL-4 und IL-13 unterdrücken zum Beispiel die T_{H1} -Antwort und fördern die Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung T_{H2} -Zellen (Zhang et al., 2009). Eine erhöhte Produktion von IL-4 geht mit einer höheren Pilzlast in mit *Histoplasma capsulatum* infizierten Mäusen einher, und eine Neutralisierung von IL-4 führt zur Wiederherstellung der Immunität (Szymczak et al., 2009; Zhang et al., 2009). Zusätzlich sind von T_{H2} -Zellen aktivierte Makrophagen, im Gegensatz zu den durch T_{H1} -Zellen aktivierten Makrophagen, nicht in der Lage Pilze effektiv zu bekämpfen (Muller et al., 2007).

T_{Reg} -Zellen ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T-Zellen) produzieren IL-10, welches beispielsweise inhibitorisch auf die $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion von NK-Zellen (Peppas et al., 2010) sowie allgemein immunsupprimierend wirkt (Ferreira et al., 2010). Durch die Produktion von IL-10 fördern sie prinzipiell eine Ausweitung der Infektion (Romani et al., 2006).

Trotz dieser scheinbar negativen Wirkung auf die Immunantwort sind T_{H2} - und T_{Reg} -Zellen für einen optimalen Verlauf einer inflammatorischen Immunantwort eminent wichtig. Eine unkontrollierte inflammatorische Antwort auf eine Infektion kann zu übermäßigen Schäden des Organismus führen. Indem T_{H2} - und T_{Reg} -Zellen der Inflammation entgegenwirken, können sie einer inflammatorischen Überreaktion verhindern und so den Verlauf der Immunantwort optimieren (Romani 2011).

T_{H17} -Zellen tragen ebenfalls zum Schutz bei Pilzinfektionen bei, indem sie die Immunantwort in Richtung T_{H1} lenken, womit sie eine wichtige immunregulatorische Aufgabe bei Pilzinfektionen erfüllen (Conti et al., 2009). Zusätzlich zeigt das von ihnen

produzierte IL-22 in Abwesenheit von T_H1 -Zellen, eine wichtige antifungale Wirkung (De Luca et al., 2010).

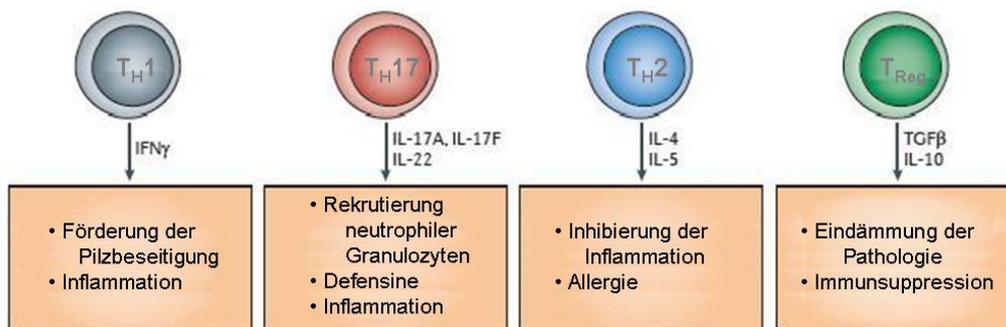


Abbildung 1.11: Regulation der Immunantwort bei Pilzinfektionen durch die verschiedenen T_H -Subpopulationen. T_H1 -Zellen produzieren in großen Mengen $IFN\gamma$, welches inflammatorisch wirkt, und fördern durch die Aktivierung von Phagozyten und B-Zellen die Eliminierung des Pilzes. Ebenso tragen T_H17 -Zellen durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, sowie durch die damit verbundene Rekrutierung von Granulozyten zum Schutz des Wirtes bei. Die durch T_H2 -Zellen produzierten Zytokine unterdrücken die T_H1 -Antwort, womit sie prinzipiell zur Manifestation und Progression der Pilzinfektion beitragen können. Regulatorische T-Zellen sorgen durch ihre immunsupprimierenden Zytokine für einen kontrollierten Ablauf der inflammatorischen Immunantwort. Durch die von ihnen ausgehende Suppression anderer Immunzellen wirken sie jedoch prinzipiell der Beseitigung des Pilzes entgegen. T_H = T-Helfer-Zelle, T_{Reg} = regulatorische T-Zelle, IL = Interleukin, $IFN\gamma$ = Interferon-gamma, TGF- β = transforming growth factor-beta. Abbildung aus Romani, *Nat Rev Immunol*, 2011, modifiziert.

1.4 NK-Zellen

Natürliche Killer (NK) Zellen stellen 5 % - 15 % der Lymphozyten im peripheren Blut und werden auch als große granuläre Lymphozyten (*large granular lymphocytes*, LGL) bezeichnet. Phänotypisch beschreibt man NK-Zellen als $CD56^+CD3^-$ Lymphozyten (Robertson et al., 1990), wobei man bei NK-Zellen des peripheren Blutes zusätzlich zwischen immunregulatorischen und zytotoxischen NK-Zellen unterscheidet.

Die immunregulatorischen NK-Zellen enthalten in ihren Granula kleine Mengen zytotoxischer Proteine und weisen eine geringe antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC) auf. Gleichzeitig produzieren sie aber in großen Mengen inflammatorische und immunregulatorische Zytokine. Im Gegensatz dazu produzieren und speichern zytotoxische NK-Zellen große Mengen zytotoxischer Proteine, weisen aber nur eine geringe Zytokinproduktion auf. Der Unterschied der beiden Subpopulationen ist nicht nur funktioneller Natur, sondern äußert sich auch im Phänotyp der Zellen. So zeigen die immunregulatorischen NK-Zellen im Vergleich zu zytotoxischen NK-Zellen nur eine geringe bis fehlende

Expression des für die ADCC wichtigen Rezeptors CD16, aber eine stärkere Expression von CD56. Die Expression der Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*; KIR) ist bei den immunregulatorischen NK-Zellen vermindert bis nicht vorhanden. Dem entgegen steht eine hohe Expression von CD62L und CCR7 (C-C Chemokinrezeptor 7, *C-C chemokine receptor type 7*), die jeweils dem Einwandern der Zellen in lymphoide Organe dienen, und von CD25, welches für die Sensitivität gegenüber IL-2 verantwortlich ist. Eine Gegenüberstellung beider NK-Zellpopulationen bietet Abbildung 1.12.

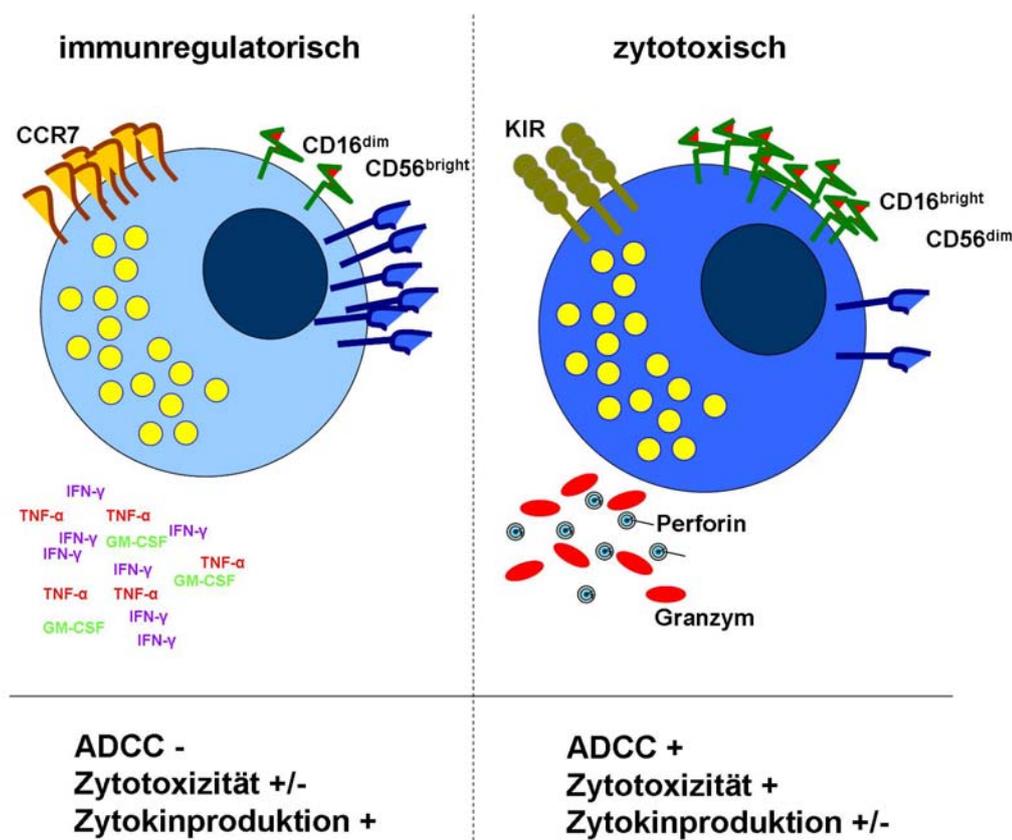


Abbildung 1.12: Subpopulationen humaner NK-Zellen. Die immunregulatorischen CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen zeichnen sich durch hohe Zytokinproduktion (unter anderem IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) und eine geringe Zytotoxizität aus. Im Gegensatz dazu zeigen zytotoxische CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen hohe Zytotoxizität, die mit einer höheren Produktion von zytotoxischen Proteinen einhergeht, und geringe Produktion von immunregulatorischen Zytokinen. ADCC = antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*), CCR7 = C-C Chemokinrezeptor 7 (*C-C chemokine receptor type 7*), IFN- γ = Interferon-gamma, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, KIR = Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*). Abbildung nach Cooper, Fehniger und Caligiuri, *TRENDS in Immunology*, 2001.

1.4.1 NK-Zellrezeptoren

NK-Zellen werden klassischerweise der angeborenen Immunabwehr zugeordnet, da sie unspezifisch ohne vorangehende Sensibilisierung Fremdzellen (z.B. Parasiten), infizierte oder entartete Zellen (Tumorzellen) erkennen und abtöten (Robertson et al., 1990). Bei der Erkennung der Zielzellen kommt den MHC-I-Molekülen, die auf fast allen kerntragenden Zellen zu finden sind, eine wichtige Rolle zu.

NK-Zellen besitzen sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren, die als Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*; KIR) bezeichnet werden. Während sich an den inhibitorischen KIR sogenannte „*long tails*“ befinden, die sich aus inhibitorischen Sequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*; ITIM) zusammensetzen, finden sich an den aktivierenden KIR „*short tails*“, die aktivierende Sequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; ITAM) tragen (Lanier 2005). MHC-I Moleküle dienen beiden Arten der KIR als Liganden. Da jedoch die inhibitorischen KIR eine höhere Affinität zu MHC-I-Molekülen als aktivierende KIR besitzen, führt die gleichzeitige Bindung von MHC-I an inhibitorische und aktivierende KIR in der Summe zu einem hemmenden Signal (Selbst-Toleranz). Fehlen jedoch MHC-I-Moleküle auf den Zielzelle in ausreichender Dichte oder ganz, überwiegen in der Summe die aktivierenden Signale, was zur Lyse der Zielzelle führt. Dieser Mechanismus der Zielzellerkennung aufgrund von MHC-I-Rezeptoren wird allgemein als die „*missing-self-recognition*“-Hypothese bezeichnet, die erstmals von Klas Kärre aufgestellt wurde (Kärre et al., 1986).

Viren können gezielt die Expression der MHC-I-Moleküle der infizierten Zelle hemmen, um eine Präsentation von Antigenen durch die infizierten Zellen zu mindern und so der Erkennung durch T-Zellen zu entgehen. Die verminderte Präsenz der MHC-I-Moleküle an der Oberfläche der infizierten Zelle führt jedoch im Gegenzug zur Aktivierung der NK-Zellen und folglich zur ihrer Eliminierung (Farag et al., 2002).

Beobachtungen der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Zellen, die eine normale MHC-I Expression aufweisen, deuten darauf hin, dass der MHC-I vermittelte Schutz überwunden werden kann, und dass weitere Faktoren, die für die Aktivierung der NK-Zellen verantwortlich sein können, vorhanden sein müssen. Daraufhin wurden ebenfalls nicht-KIR-Rezeptoren, die an der Aktivierung der NK-Zellen beteiligt sind, entdeckt (Leiden et al., 1989; Pena et al., 1990).

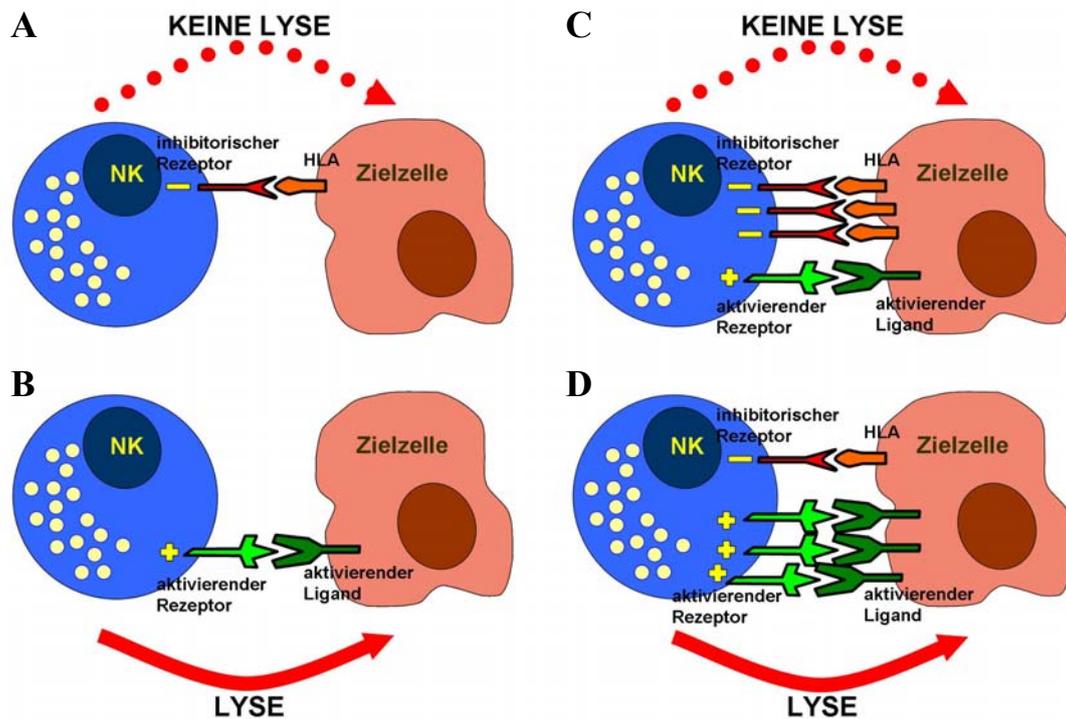


Abbildung 1.13: Regulation der NK-Zell-Aktivität durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren. A. Die Bindung von inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen an MHC-I-Moleküle der Zielzelle in Abwesenheit von aktivierenden Signalen führt nicht zur Lyse der Zielzelle. B. Sind aktivierende Signale, aber keine inhibitorischen Signale vorhanden, wird die NK-Zelle aktiviert und die Zielzelle eliminiert. C+D. Sind sowohl aktivierende als auch inhibitorische Signale vorhanden, entscheidet die Balance zwischen den beiden Signalen darüber, ob die NK-Zelle aktiviert und die Zielzelle lysiert wird, oder nicht. HLA = *human leukocyte antigen*. Abbildung nach Farag et al., *Blood*, 2002.

Natürliche zytotoxische Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Reihe Immunglobulin-ähnlicher Rezeptoren, die als Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*; NCR) bezeichnet werden. Bis heute wurden mit NKp30, NKp44 (nur auf aktivierten NK-Zellen), NKp46 und NKp65 insgesamt vier verschiedene NCR beschrieben (Biassoni 2009; Spreu et al., 2010). Die genaue Funktion dieser Rezeptoren ist nicht vollständig geklärt. Zwar ist bekannt, dass eine Aktivierung der NK-Zellen über diese Rezeptoren in einer erhöhten Zytotoxizität gegenüber Zielzellen resultiert, und die Blockierung der NCR mittels inhibitorischer Antikörper zur Unterdrückung der Zytotoxizität gegenüber

verschiedenen Tumorzellen führt (Cantoni et al., 1999; Pessino et al., 1998), doch sind die Liganden dieser Rezeptoren weitgehend unbekannt.

Bisher wurden Influenza-Virus Hämagglutinin (IV-HA) und Sendai-Virus Hämagglutinin-Neuraminidase als Liganden für NKp46 identifiziert (Mandelboim et al., 2001). NKp44 bindet an die Hämagglutinine H1 und H5N1, das Tumor-assoziierte Protein HSPGs, sowie direkt an das *Mycobacterium tuberculosis* (Arnon et al., 2001; Esin et al., 2008; Ho et al., 2008). Als Liganden für NKp30 wurden bisher BAT3 (*HLA-B associated transcript 3*) und das CMV Peptid pp65 (Arnon et al., 2005; Pogge von Strandmann et al., 2007) beschrieben.

NKG2D, welches zu den C-Lektin-ähnlichen Typ-II-Transmembranproteinen gehört, ist ebenfalls ein aktivierender Rezeptor der NK-Zellen. Zu seinen Liganden gehören unter anderem MICA und MICB, die häufig von Tumorzellen, infizierten Zellen und Zellen unter Stress an der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Aktivierung der NK-Zellen über NKG2D erhöht sowohl die Zytotoxizität der Zellen, als auch die Zytokinproduktion (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2003; Wu et al., 1999).

Die Bedeutung dieser Rezeptoren im Zusammenhang mit pathogenen Pilzen wurde bisher nicht untersucht.

Toll-ähnliche Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren ebenfalls TLR, welche der unmittelbaren Erkennung von Pathogenen dienen. Funktionelle TLR-2, TLR-3, TLR-5, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 konnten auf NK-Zellen nachgewiesen werden (Becker et al., 2003; Chalifour et al., 2004; Hart et al., 2005; Pisegna et al., 2004). So wurde von direkter Aktivierung der NK-Zellen im Zusammenhang mit *Leishmania major* Lipophosphoglykan (LPG) (Becker et al., 2003) und *Klebsiella pneumoniae* Außenmembranprotein A, welche über TLR-2 wirken, und *Escherichia coli* Flagellin (Chalifour et al., 2004), das über TLR-5 erkannt wird, berichtet. Ebenso können NK-Zellen doppelsträngige RNS mithilfe von TLR-3 direkt erkennen (Schmidt et al., 2004).

Während die Rolle der TLR bei der Erkennung und Eliminierung von pathogenen Pilzen durch andere Zellen der angeborenen Immunabwehr gut beschrieben ist, gibt es bisher keine Untersuchungen bezüglich der NK-Zell-TLR im Zusammenhang mit ihrer antifungalen Aktivität.

1.4.2 Effektormechanismen von NK-Zellen

Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität

Infizierte oder entartete Zellen präsentieren bestimmte Antigene über MHC-II-Moleküle an ihrer Oberfläche. Diese Antigene können von im Blut zirkulierenden Antikörpern erkannt werden, was zur Bindung des Antikörpers an die Zelle führt. Über CD16 (Fc- γ III-Rezeptor) sind NK-Zellen in der Lage, mit IgG-Antikörpern beladene Zellen zu identifizieren und zu lysieren (Vivier et al., 2008). Diesen Mechanismus der Zielzellyse bezeichnet man als antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC). ADCC wurde im Zusammenhang mit verschiedenen Zielzellen wie Tumorzellen (Alderson et al., 2011), Virus-infizierten Zellen (Johansson et al., 2011) und Pilzzellen (Nabavi et al., 1986) beobachtet.

Rezeptorvermittelte Zytotoxizität

NK-Zellen können Zielzellen über eine rezeptorabhängige Induktion der Apoptose eliminieren. Dabei nutzen sie sowohl den Weg über Fas/FasL-Aktivierung (CD95/CD95L) als auch über TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Trapani 1998). Die Bindung des Fas-Liganden bzw. TRAIL auf der Oberfläche der NK-Zelle an den jeweiligen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle führt zur Aktivierung einer Caspase-Kettenreaktion und letztlich zur Induktion der Apoptose der Zielzelle (Schneider et al., 1997; Schneider et al., 1997; Schneider et al., 1997; Zamai et al., 1998).

Zytotoxizität über lösliche Moleküle

NK-Zellen nutzen neben den Apoptose-induzierenden Liganden auch lösliche Faktoren zur Entfaltung ihrer zytotoxischen Aktivität. In den Granula der NK-Zellen finden sich die zytotoxischen Proteine Perforin, Granulysin sowie Granzyme (Duke et al., 1989; Krensky 2000; Pena et al., 1997; Russell et al., 2002). Diese Proteine werden nach Aktivierung der NK-Zelle, z.B. über CD16, durch Exozytose abgegeben und wirken anschließend teilweise synergetisch auf die Zielzelle (Smyth et al., 2003; Trapani et al., 1998; Veugelers et al., 2006; Walch et al., 2007). Die direkte zytotoxische Wirkung von

Perforin wird mit seiner Fähigkeit Poren in der Zellmembran zu bilden erklärt (Duke et al., 1989; Law et al., 2010) und wirkt auch in Abwesenheit anderer Proteine zytotoxisch (Smyth et al., 2003). Dabei kommt es zum Verlust intrazellulärer Substanzen der Zielzelle und dem massiven Einfluss von Wasser, welcher zum Tode der Zelle führt. Die direkte zytotoxische Wirkung von Perforin wurde bereits im Zusammenhang mit Tumorzellen sowie Pilzen beschrieben (Ma et al., 2004; Smyth et al., 2003; Smyth et al., 1999). Eine weitere Theorie, die im Laufe der Jahre aus verschiedenen Beobachtungen entstand, beschreibt die Perforin vermittelte Aufnahme von Granzym B, welches dann Apoptose der Zielzelle induziert (Trapani et al., 1998). Da jedoch die Perforin gebildeten Poren zu klein für Granzym B scheinen und zeitlich instabil sind, wurde die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) vermittelte Aufnahme von Granzym B diskutiert. Ebenso wird die Bildung eines makromolekularen Komplexes aus Granzym B, Perforin und evtl. anderen Molekülen diskutiert, der über MPR aufgenommen wird, wobei Granzym B als Ligand des Rezeptors dient. Dieser Komplex kann nach Endozytose aus den Endosomen der Zielzelle mit Hilfe von Perforin austreten und Granzym B anschließend die Apoptose induzieren (Trapani et al., 2002; Veugelers et al., 2006). Die gängigen Theorien zur Wirkung von Perforin und Granzym B sind in Abbildung 1.14 zusammengefasst.

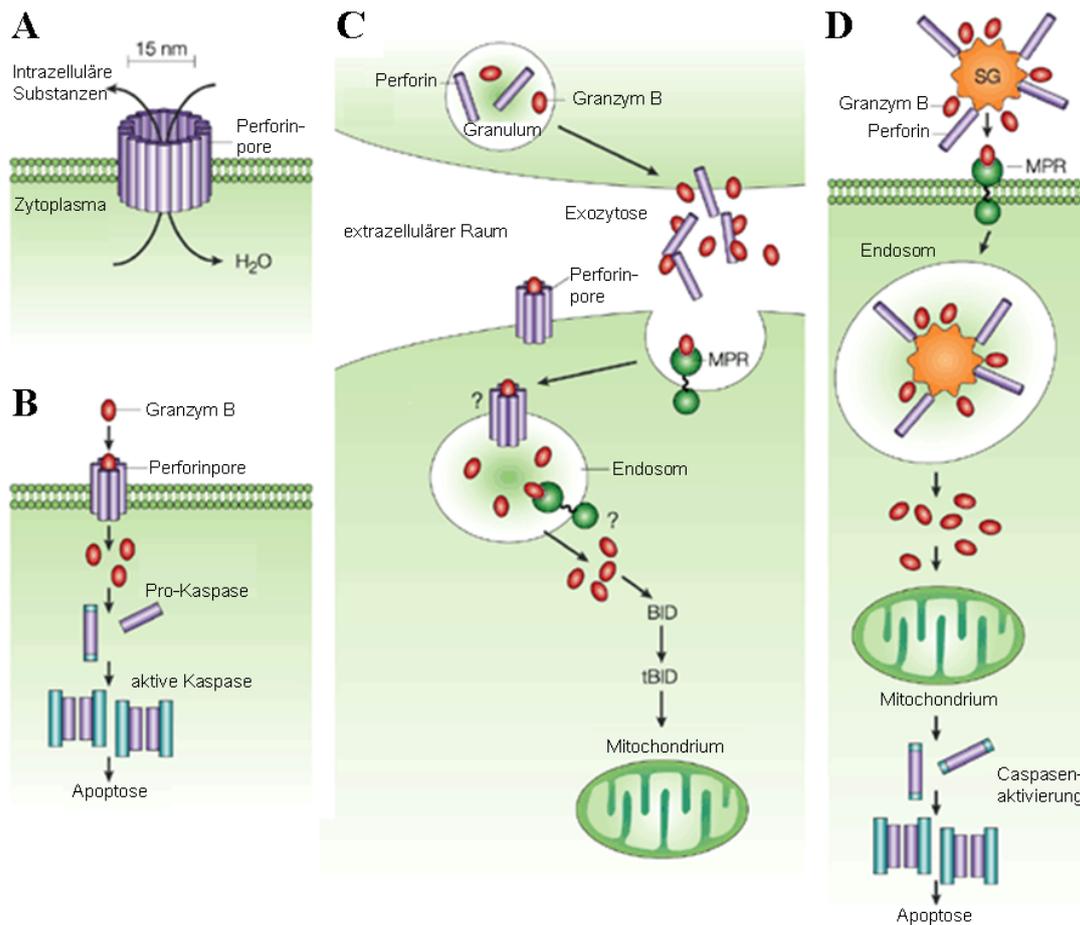


Abbildung 1.14: Hypothesen zur Wirkweise von Perforin. A. Ursprüngliches Modell der Perforinwirkung als lytisches Molekül. Aufgrund des Integritätsverlustes der Plasmamembran der Zielzelle kommt es zu einem Verlust intrazellulärer Moleküle und massivem Wassereindringen, was den Zelltod zur Folge hat. B. Porenbildung durch Caspasen die Apoptose der Zielzelle bewirken. C. Granzyme werden perforinunabhängig von der Zielzelle (über Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) aufgenommen, wo sie in Abwesenheit von Perforin unwirksam im Endosom verbleiben. Geringe Dosen Perforin (sublytisch) bewirken die Freisetzung der Granzyme aus dem Endosom, wodurch Apoptose eingeleitet wird. Die Fragezeichen deuten darauf hin, dass bisher nicht geklärt werden konnte, wie Perforin die Freisetzung der Granzyme aus dem Endosom bewirkt. Zudem konnte Perforin weder in den Endosomen noch im Zytoplasma von Zielzellen nachgewiesen werden. D. Über MPR werden makromolekulare Komplexe bestehend aus Perforin, Granzymen und möglicherweise anderen Molekülen (z.B. Serglycin, SG) in die Zielzelle aufgenommen. Perforin bewirkt die Freisetzung von Granzymen aus den Endosom. BID=BH3-interacting domain death agonist; tBID = truncated BID. Abbildung aus Trapani und Smyth, *Nat Rev Immunology*, 2002, modifiziert.

Ähnlich wie Perforin bewirkt Granulysin die Perforation der Zellmembran und induziert einen Ioneninflux, welcher aber im Gegensatz zur Perforinwirkung nicht zur direkten Lyse der Zielzelle führt, sondern Apoptose auslöst (Duke et al., 1989; Gamen et al., 1998; Kaspar et al., 2001). Die Wirkung von Granulysin bedarf keines spezifischen Rezeptors seitens der Zielzelle (Krensky et al., 2009) Die direkte Aktivität von

isoliertem Granulysin ist unter Anderem gegenüber *Cryptococcus neoformans*, *Leishmania major*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* sowie verschiedenen Tumorarten dokumentiert (Ma et al., 2004; Pena et al., 1997; Stenger et al., 1998). Eine weitere wichtige Eigenschaft von Granulysin ist seine chemotaktische Wirkung, die eine gerichtete Mobilisierung von primären NK-Zellen und von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen induziert (Deng et al., 2005).

1.4.3 *Immunregulatorische Funktion der Natürlichen Killer Zellen*

NK-Zellen produzieren eine Vielzahl an Zytokinen, die das Immunsystems auf unterschiedlichen Wegen regulieren. Primäre CD56^{bright} NK-Zellen, denen eine immunregulatorische Funktion in erster Linie zugesprochen wird, produzieren große Mengen von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- β , IL-10, IL-13 und GM-CSF, sowie von Chemokinen wie CCL4, CCL5, and CCL22 (Cooper et al., 2001; Robertson 2002). NK-Zellen werden oft als frühe Quelle für IFN- γ beschrieben, da sie dieses in der Frühphase der Infektion Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems zur Verfügung stellen und so eine rasche Immunantwort fördern. Das Muster der von den NK-Zellen produzierten Zytokine ist variabel und hängt von den aktivierenden Signalen ab. So führt die kombinierte Stimulation von CD56^{bright} NK-Zellen mit IL-12 und IL-18 zur Produktion von IFN- γ , während die Stimulation durch IL-15 und IL-18 die Produktion von GM-CSF nach sich zieht (Cooper et al., 2001; Robertson 2002). Peritt et al. sprechen in diesem Zusammenhang analog zu T_H-Zellen auch von NK1- und NK2-Zellen in Abhängigkeit von den vorwiegend produzierten Zytokinen (Peritt et al., 1998).

Des Weiteren wurde die Aufnahme und die Präsentation von viralen Antigenen durch NK-Zellen beobachtet, wodurch sie in der Lage sind, spezifische T-Zellen direkt zu aktivieren (Hanna et al., 2004; Zhang et al., 2006; Zingoni et al., 2004). Ebenso konnte eine direkte, kontaktabhängige Aktivierung von DZ durch NK-Zellen gezeigt werden (Gerosa et al., 2002).

Alle diese Qualitäten der NK-Zellen führen dazu, dass das ihnen anhaftende Bild der primitiven Killerzellen nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und sie als wichtiger

Vermittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr angesehen werden müssen.

1.4.4 *Natürlich Killer Zellen bei Pilzinfektionen*

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr (Wallace et al., 2005), sowie bei Infektionen mit Bakterien (Brill et al., 2001), Viren (Biron et al., 1999; Li et al., 2004) und Parasiten (Lieke et al., 2004). Ihre Rolle bei Infektionen mit pathogenen Pilzen ist nur unzureichend geklärt, doch ihre Beteiligung an der Immunabwehr gegenüber verschiedenen Pilzen mehrfach beschrieben. So zeigen NK-Zellen depletierte Mäuse eine erhöhte Pilzlast nach Infektion mit *C. neoformans* im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps, und die Infusion von NK-Zellen in NK-depletierte Mäuse führt zu Rekonstitution der Immunität gegenüber dem Pilz (Hidore et al., 1986; Lipscomb et al., 1987). Die Bedeutung von NK-Zellen für die Abwehr von Pilzen wurde ebenfalls sehr deutlich durch Studien von Balish et al. und Lee et al. demonstriert. Während T- und B-Zell-defiziente SCID Mäuse sowie T-Zell-depletierte Mäuse keine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber *C. albicans* zeigen, steigt diese stark bei Mäusen mit kombiniertem T-/NK-Zell-Defekt (Balish et al., 1993; Balish et al., 2001; Lee et al., 1981). Des Weiteren führt die Inhibierung der NK-Zell-Rekrutierung in die Lunge von mit *C. albicans* infizierten Mäusen durch Neutralisation von MCP-1/CCL2, zu einer erhöhten Pilzlast in der Lunge und einer erhöhten Mortalität dieser Mäuse (Morrison et al., 2003).

Der Schutzeffekt von NK-Zellen bei Pilzinfektionen wird vornehmlich mit der Produktion von Zytokinen und der durch sie vermittelte Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems assoziiert, weniger mit einer direkten antimykotische Aktivität der NK-Zellen (Algarra et al., 2002; Hidore et al., 1986; Park et al., 2009). Allerdings zeigten *in vitro* Experimente eine direkte durch NK-Zellen vermittelte Schädigung einer Vielzahl von pathogenen Pilzen. So wurde von direkter Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* berichtet (Jimenez et al., 1984; Ma et al., 2004; Marr et al., 2009; Murphy et al., 1982; Scaringi et al., 1991).

Wie bereits beschrieben, stehen NK-Zellen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Während eine rezeptorvermittelte Aktivität von

NK-Zellen gegenüber Pilzen bisher noch nicht beobachtet worden ist, gibt es Untersuchungen, die belegen, dass lösliche Moleküle an der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen beteiligt sind. So ist eine direkte, durch Perforin vermittelte zytotoxische Wirkung von NK-Zellen auf *Cryptococcus neoformans* (Ma et al., 2004) dokumentiert. ADCC konnte ebenfalls als Wirkmechanismus von NK-Zellen gegenüber diesem Pilz nachgewiesen werden (Nabavi et al., 1986).

Die an der Aktivierung der NK-Zellen durch Pilze beteiligten Moleküle und Rezeptoren konnten bisher nicht identifiziert werden. Zwar exprimieren NK-Zellen funktionelle TLR, die bei anderen Zellen an der Erkennung von Pilzen beteiligt sind (siehe Kapitel 1.2.6), ihre Rolle in diesem Zusammenhang wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Im Gegensatz zu den gut dokumentierten antifungalen Wirkungen von NK-Zellen *in vitro* und in Mausmodellen gibt es bislang kaum Berichte, die ihre Rolle im humanen System darstellen. In einem Fallbericht wurde von einer erniedrigten Zahl an NK-Zellen und deren verminderte Aktivität bei einem Patienten mit einer *Trichophyton rubrum* Infektion berichtet (Akiba et al., 2001). Ein anderer, an einer invasiven Aspergillose erkrankter Patient, bei dem eine normale Funktion der T- und B-Zellen festgestellt werden konnte, zeigte eine reduzierte Aktivität der NK-Zellen. Ob dies jedoch Ursache oder aber die Konsequenz der Erkrankung darstellte, ist unklar (Krishnaraj et al., 1993).

1.5 Zelluläre Immuntherapien

1.5.1 T-Zellen basierte Immuntherapie

Aufgrund der unbefriedigenden Heilungsraten von invasiven Pilzinfektionen, gerade bei persistierend immundefizienten Patienten rücken andere Therapieoptionen in den aktuellen Fokus der Forschung. So werden beispielsweise die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) zur Unterstützung bzw. Anregung der durch Granulozyten vermittelten Immunabwehr, die Gabe von IFN- γ zur Aktivierung der adoptiven Immunabwehr, Granulozyteninfusionen, sowie Transfusion von antigenspezifischen T-Zellen auf ihre Wirksamkeit untersucht. Es konnte bisher jedoch kein Vorteil für betroffene Patienten durch die Applikation von G-CSF oder IFN- γ festgestellt werden (Lehrnbecher et al., 2002; Safdar et al., 2005; Safdar et al., 2006).

Die Infusion von Granulozyten zeigte ebenfalls keine eindeutige Wirksamkeit (Seidel et al., 2008) und ist zudem mit Risiken wie Alloimmunisierung verbunden. Die Inkompetenz von Granulozyten zur Proliferation erfordert zudem die wiederholte Infusion dieser Zellen.

Bei Patienten mit CMV-Infektionen wurde die Transfusion von spezifischen CD8⁺ sowie von CD4⁺ T-Zellen klinisch getestet (Einsele et al., 2002; Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995;). Die adoptive Gabe dieser Zellen zeigte einen guten Effekt auf die Kontrolle der Infektion und führte zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen.

Die Transfusion pilzspezifischer CD4⁺ T-Zellen wurde ebenfalls bereits klinisch untersucht und lieferte vielversprechende Ergebnisse (Perruccio et al., 2005). Dabei wurden 10 Patienten mit invasiver Aspergillose zwischen Tag 17 und 37 nach Transplantation anti-*Aspergillus* T-Zellen ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6 / \text{kg KG}$) verabreicht. Eine nicht randomisierte Kontrollgruppe von 13 Patienten erhielt keine Immuntherapie. Bei allen Patienten mit Immuntherapie fiel die Galactomannan-Konzentration innerhalb von 6 Wochen nach T-Zell-Infusion auf ein normales Niveau, während dies bei der Kontrollgruppe nicht der Fall war. In Folge der Immuntherapie bildete sich die Aspergillose bei 9 von 10 Patienten der Testgruppe zurück, einer von 10 Patienten verstarb. Auch hier wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen, die auf die Transfusion *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen zurückzuführen wären, beobachtet. Bei 7 der 13 Patienten der Kontrollgruppe, die keine Immuntherapie erhielten bildete sich die Aspergillose ebenfalls zurück, 6 der 13 Patienten verstarben. Diese Ergebnisse müssen allerdings in randomisierten Studien bestätigt werden.

1.5.2 *Natürliche Killer Zellen basierte Immuntherapie*

Bei malignen Erkrankungen wurde der adoptive Transfer von allogenen NK-Zellen bereits in mehreren klinischen Studien durchgeführt. In einer Studie erhielten 43 Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen zusätzlich zur SZT allogene NK-Zellen. Keiner der behandelten Patienten entwickelten Symptome einer GvHD, insgesamt 5 von 19 therapierten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie erlangten vollständige Remission nach der Behandlung (Miller et al., 2005). Keine unerwünschten Nebenwirkungen wurden auch in weiteren Studien mit adulten und pädiatrischen Patienten nach Transfer von allogenen NK-Zellen beobachtet (Stern et al., 2012; Frohn

et al., 2000; Koehl et al., 2004; Passweg et al., 2004). Obwohl ein Benefit in keiner der besagten Studien eindeutig mit der Gabe von NK-Zellen assoziiert werden konnte, wurde die Machbarkeit, eine gute Verträglichkeit sowie die Sicherheit diese Therapie demonstriert. Alle bisherigen Untersuchungen fokussierten sich jedoch auf die Anti-Tumor-Wirkung von NK-Zellen. Eine therapeutische Wirksamkeit von NK-Zellen im Zusammenhang mit Pilzinfektionen wurde bisher nicht klinisch getestet. Tiermodelle invasiver Aspergillosen liefern aber Hinweise dafür, dass der adoptiver Transfer von NK-Zellen auch in diesem Zusammenhang eine therapeutische Option darstellen könnte. So führte die Infusion von IL-12 und IL-18 aktivierten murinen NK-Zellen in Mäuse, die mit einer letalen Dosis *A. fumigatus* Konidien infiziert wurden, zu einer signifikant niedrigeren pulmonalen Pilzlast im Vergleich mit infizierten Mäusen ohne NK-Zell-Infusion (Park et al., 2009).

1.6 Ziele der Arbeit

Trotz der derzeit verfügbaren antimykotischen Medikamente liegt die mit invasiven Mykosen nach allogener SZT assoziierte Mortalität je nach Literatur bei 90 %. Aus diesem Grund rücken zelltherapeutische Behandlungen immer mehr in den Fokus der Forschung auf diesem Gebiet.

Im Gegensatz zur Anti-Tumor-Wirkung der NK-Zellen ist die Wirksamkeit humaner NK-Zellen gegenüber den wichtigen humanpathogenen Pilzen *A. fumigatus* und *R. oryzae* bisher nur unzureichend bzw. nicht untersucht. Die Wichtigkeit von T_H-Zellen in der Pilzabwehr wird zunehmend erkannt und es wurde bereits versucht die Prognose von Patienten mit invasiven Aspergillosen nach SZT durch den Transfer von Spender-*Aspergillus*-spezifischen T-Zellen zu verbessern. Die Generierung humaner anti-*R. oryzae* T-Zellen wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit i) das antifungale Potential humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* sowie *R. oryzae* untersucht werden und ii) die Generierung von spezifischen T-Zellen gegen *R. oryzae* aus Zellen des peripheren Blutes gesunder Individuen durchgeführt werden.

Im Vordergrund dieser Arbeiten steht der grundsätzliche Nachweis der direkten antifungalen Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber diesen Pilzen *in vitro*. Des Weiteren soll aber auch die Wirkweise dieser Zellen gegenüber den genannten Pilzen näher charakterisiert und dabei untersucht werden welche Wirkmechanismen dieser Aktivität zugrunde liegen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen generierte anti-*R. oryzae* T-Zellen im Hinblick auf ihre Funktionalität, Sicherheit (in Bezug auf das Risiko eine GvHD hervorzurufen), *in vitro* charakterisiert werden, und das Wirkspektrum der generierten Zellen hinsichtlich möglicher Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen klinisch wichtigen pathogenen Pilzen untersucht werden.

Die Beantwortung dieser Fragestellungen soll Grundlagen für die Entwicklung neuer Immuntherapien gegen invasive Pilzinfektionen mit *A. fumigatus* und *R. oryzae* bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation schaffen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Blutprodukte

Buffy coat (Leukozytenfilm), DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt

Humanes gefrorenes Plasma (*human frozen plasma*; HFP), DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt

Humanes Serum (HS), eigene Herstellung

BSA (Bovines Serumalbumin) Pulver, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim

FCS (Fetales Kälberserum), PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Pilzextrakte

<i>Rhizopus oryzae</i>	zur Verfügung gestellt durch das Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich
<i>Rhizopus microsporus var. microsporus</i>	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	
<i>Mucor circinelloides</i>	
<i>Candida albicans</i>	zur Verfügung gestellt durch das Institut Pasteur, Unité des Aspergillus, Paris, Frankreich
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Aspergillus fumigatus</i> , ATCC #1022	Greer, Lenoir, USA
<i>Mucor racemosus</i> , ATCC #1216A	
<i>Aspergillus flavus</i> , ATCC #9643	
<i>Alternaria alternata</i> , ATCC #11680	
<i>Aspergillus niger</i> , LU1369	

Pilze

Aspergillus fumigatus, ATCC # MYA-1163, American Tissue and Culture Collection, Rockville, USA

Rhizopus oryzae, klinisches Isolat, zur Verfügung gestellt durch das Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich

Zelllinien

T2, ACC 598, Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien GmbH, Braunschweig

Hierbei handelt es sich um eine Fusionszelle einer PEG vermittelten Fusion der B-Lymphoblastoid Zelllinie (B-LCL) LCL 721.174 mit der 8-Azaguanin und Ouabain resistenten Variante von T-LCL CEM (CEMR.3). Die Immunologie der T2-Zelle lautet: CD2⁻, CD3⁻, CD4⁺, CD5⁻, CD6⁻, CD7⁺, CD8⁻, CD10⁻, CD13⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD34⁻, CD37⁺, CD38⁻, cyCD79a⁺, CD80⁺, CD138⁻, HLA-DR⁻, TCR- α/β ⁻, TCR- γ/δ [3].

Zellisolation

Biocoll Separating Solution, Biochrom, Berlin

EasySep® Human NK Enrichment Kit, STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich

EasySep® Magnet, STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich

MACS® CD154 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

MACS® Cytokine Secretion Assay, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

MACS® LS Säulen, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Human IFN- γ Ready-SET-Go! ELISA Kit, eBioscience, San Diego, USA

Human TNF- α Ready-SET-Go! ELISA Kit, eBioscience, San Diego, USA

Human Perforin ELISA Kit, Diaclone, Besançon, Frankreich

Quantikine® Human GM-CSF Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® Human RANTES Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA

Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Antikörper	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
anti-CD3	SK7	IgG ₁	PerCP	BD Biosciences
anti-CD3	SK7	IgG ₁	APC-H7	BD Biosciences
anti-CD4	SK3	IgG ₁	PerCP	BD Biosciences
anti-CD4	RPA-T4	IgG ₁	V500	BD Biosciences
anti-CD8	RPA-T8	IgG ₁	V450	BD Biosciences
anti-CD14	M5E2	IgG _{2a}	PE	BD Biosciences
anti-CD19	SJ25C1	IgG ₁	PE-Cy7	BD Biosciences
anti-CD45	2D1	IgG ₁	FITC	BD Biosciences
anti-CD45	2D1	IgG ₁	PerCP	BD Biosciences
anti-CD56	B159	IgG ₁	APC	BD Biosciences
anti-CD69	FN50	IgG ₁	FITC	BD Biosciences
anti-CD107a	H4A3	IgG ₁	PE-Cy7	BD Biosciences
anti-CD154	TRAP1	IgG ₁	FITC	BD Biosciences
anti-IFN- γ	25723.11	IgG _{2b}	PE	BD Biosciences
anti-TNF- α	MAb11	IgG ₁	APC	BD Biosciences

Antikörper für durchflusszytometrische Analysen - Fortsetzung

Antikörper	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
anti-IL-4	3010.211	IgG ₁	PE	BD Biosciences
anti-IL-10*	JES3-19F1	IgG _{2a}	APC	BD Biosciences

alle Antikörper hergestellt in Maus; *Antikörper hergestellt in Ratte

BD Biosciences, San Jose, USA

Beckman Coulter, Marseilles, Frankreich

sonstige Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
anti-CD28	L293	IgG ₁	pur	BD Biosciences
anti-CD40	HB14	IgG ₁	pur	Miltenyi Biotec
anti-CD49d	HP2/1	IgG ₁	pur	Beckman Coulter

alle Antikörper hergestellt in Maus

BD Biosciences, San Jose, USA

Beckman Coulter, Marseilles, Frankreich

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
7-AAD Viability Dye (7-Amino-Actinomycin D)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
BD GolgiStop™ (includes Monensin)	BD Biosciences, San Jose, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coenzym Q0 (2,3-Dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -benzoquinon)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Glucose wasserfrei,	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO),	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's PBS (1x, Phosphate buffered saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethylendiamintetraessigsäure (0,5 M EDTA pH 8,0), Ambion®	Applied Biosystems, Foster City, USA
FACS™ Clean	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS™ Flow	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS™ Permeabilizing Solution 2 (10x)	BD Biosciences, San Diego, USA
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maismehlagar	Oxoid, Wesel
Muromonab-CD3, Orthoclone OKT3®	Janssen-Cilag, Neuss
PenStrep (Penicillin Streptomycin)	Invitrogen, Paisley, Vereinigtes Königreich
Phagoburst™	ORPEGEN Pharma, Heidelberg
Phorbol-12-myristat-13-acetat-Lösung, PMA	AppliChem, Darmstadt
Proleukin S®, Interleukin-2, human, rekombinant	Novartis, Nürnberg
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I, Gibco®	Invitrogen, Paisley, Vereinigtes Königreich
Sabouraud-Glukose-Agar Platten	Becton Dickinson, Sparks USA
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim

Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien - Fortsetzung

Bezeichnung	Hersteller
Trypanblau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
VersaLyse™ Lysing Solution	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
X-VIVO 10™, ohne Phenolrot und Gentamycin	Lonza, Verviers, Belgien
XTT (2,3-bis-[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB) mit Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim

sonstiges Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
14 ml Rundboden Röhrchen	BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA
15 ml Röhrchen, CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
25 cm ³ Kulturflaschen	Corning, Corning, USA
250 ml Mediumflaschen	Nalgene, Roskilde, Dänemark
5 ml Rundboden FACS Röhrchen	Becton Dickenson Labware, Franklin Lakes, USA
50 ml Röhrchen, CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well-Platten	NUNC, Roskilde, Dänemark
Cryotubes TM.Viales 1,8 ml	NUNC, Roskilde, Dänemark
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Petrischalen 94-16	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzenfilter 0,22 µm	Millipore, Tullagreen, Irland
Spritzenfilter 0,5 µm	Millipore, Tullagreen, Irland
Spritzenfilter 5,0 µm, PharmAssure	PALL, Portsmouth, Vereinigtes Königreich

Proteine

Perforin (human, isoliert aus zytotoxischen Granula von YT Zellen), Alexis Biochemicals, Lörrach

Medien, Puffer und Lösungen

NK-Zellkulturmedium

50 ml HFP

X-VIVO 10 ad 1 l

CTL-Medium

100 ml HS

RPMI 1640 ad 1 l

G-RPMI

20 g D-(+)-Glukose

RPMI 1640 ad 1 l

YNB-Medium, 10x

6,7 g YNB

20 g D-(+)-Glukose

Steriles Wasser ad 100 ml

XTT-Lösung

5 mg XTT-Salz

16 µl Coenzym Q-Lösung

PBS ad 20 ml

Einfriermedium

5 ml FCS

10 ml DMSO

RPMI 1640 ad 50 ml

MACS-Puffer

2,5 ml 10 % BSA

2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

1x PBS ad 500 ml

Coenzym Q-Lösung

5 mg Coenzym Q0

1 ml PBS

SCS-Puffer

10 ml FCS

1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

1x PBS ad 500 ml

10 % BSA-Lösung

10 g BSA

Aqua dest. ad 100 ml

Maismehl-Glukose-Saccharose-Hefeextrakt-Agar

17 g Maismehl

2 g Glukose

3 g Saccharose

1 g Hefeextrakt

Aqua dest. ad 1 l

Software

Microsoft Office Word 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Microsoft PowerPoint 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

GraphPad Prism® 5, GraphPad Software, La Jolla, USA

BD FACSDiva Software 6.1.3 (2009), BD Biosciences, San Jose, USA

Bestrahlung

Nucleotid ^{137}Cs , Aktivität 3400Ci; durchgeführt durch DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Pilze

Zur Herstellung von *Aspergillus fumigatus* Konidien werden Sabouraud-Agar-Platten einer drei Tage alten Kultur (37 °C, 5 % CO₂) des Pilzes mit 3 ml Aqua dest. benetzt und die Konidien vorsichtig abgeschabt. Die erhaltene Konidiensuspension wird mit einer Pipette abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen durch ein Filter mit einem Porendurchmesser von 40 µm, um Hyphenbruchstücke zu entfernen, überführt und durch Zentrifugation (3000 x g, 20 Min, RT) sedimentiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wird verworfen, das Sediment in 1 ml steriles Wasser resuspendiert, und die Konidienzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

Die Kultivierung von *Rhizopus oryzae* erfolgte auf Maismehl-Glukose-Dextrose-Agar-Platten bei 30 °C, 5 % CO₂. Die Herstellung von *Rhizopus oryzae* Konidien erfolgte wie für Konidien von *A. fumigatus* beschrieben.

Zur Herstellung von Hyphen wurden ruhende Konidien von *A. fumigatus* in 1x YNB-Medium bzw. ruhende Konidien von *R. oryzae* in G-RPMI für 17 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit schwollen die ruhenden Konidien an, Keimschläuche bildeten sich aus, wurden länger und verzweigen sich, bis sich nach 17 Stunden ein flächendeckendes Myzel ausgebildet hatte.

Herstellung von Maismehl-Glukose-Saccharose-Hefeextrakt-Agar Platten

Zu den trockenen Zutaten in 100 ml Aqua dest. wurde kochendes Aqua dest. ad 1 l gegeben. Anschließend wurde die Mischung wieder aufgekocht und nach kurzem Abkühlen je 20 ml in Petrischalen gefüllt. Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Petrischalen 10 Minuten bei 120 °C autoklaviert.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen aufgrund der Morphologie und der Antigenzusammensetzung auf der Oberfläche der einzelnen Zellen. Im Durchflusszytometer durchlaufen die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung Lichtstrahlen verschiedener Wellenlängen. Die Lichtbeugung und Lichtstreuung, die durch die Zellen verursacht werden, können detektiert werden, und liefern Informationen bezüglich der Zellgröße und der Innenstruktur der Zelle (z.B. Granularität des Zytoplasmas). Zusätzlich ist es möglich Oberflächenmoleküle (z.B. *cluster of differentiation*, CD) und intrazelluläre Moleküle mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die ihrerseits an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, auf Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion zu markieren. Mittels monochromatischen Lichts (LASER) können Elektronen der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe im Durchflusszytometer in ein höheres Energieniveau gehoben werden. Beim Übergang in das Ausgangsenergieniveau emittieren diese Licht definierter Wellenlänge, welches durch spezifische Photodetektoren nach Verstärkung durch sogenannte Photomultiplier (PMT) registriert wird. Werden verschiedene Antikörper gegen jeweils bestimmte Antigene an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, kann von den detektierten Signalen auf die Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle der analysierten Zelle geschlossen werden. Zusätzlich können DNS bindende Farbstoffe wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) und Propidiumiodid (PI), oder Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) eingesetzt und detektiert werden. 7-AAD und PI können nur in Zellen, die keine intakte Kernmembran besitzen (tote Zellen), in den Kern eindringen und mit der sich dort befindenden DNS interagieren. Somit können lebende von toten Zellen unterschieden werden. CFSE ermöglicht es die Vermehrungsfähigkeit von Zellen durchflusszytometrisch zu untersuchen (siehe unten). Dabei wird der Farbstoff während der Zellteilung von der Mutterzelle auf die zwei entstehenden Tochterzellen verteilt, was mit Verlust der Farbtintensität pro Zelle einhergeht.

Zusammen mit den Informationen der Lichtbeugung und Lichtstreuung ergibt sich so ein mehrdimensionales Bild jeder analysierten Zelle. Die Zusammenfassung der Daten der einzelnen Zellen ähnlichen Profils lässt einerseits verschiedene Populationen der

gesamten Zellmenge erkennen und andererseits Unterschiede bzw. Veränderungen in gleichen Populationen nach diversen Manipulation festzustellen.

Zur Markierung der Zellen mit den Antikörpern wurden 100 µl Zellsuspension, Blut oder Buffy coat-Leukozytenprodukt jeweils 10 µl verschiedener Antikörper zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext, und 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 300 µl PBS zugegeben. Bei Blutproben und Proben aus Buffy coat-Leukozytenprodukt wurde den Proben statt 300 µl PBS, 1 ml VersaLyse™ Lysing Solution (zur Erythrozytenlyse) zugegeben und die Proben für weitere 10 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Durchflusszytometer zur Analyse eingesetzt.

Die Phänotypisierung der isolierten bzw. generierten Zellen erfolgte jeweils mit Hilfe folgender Antikörper bzw. Farbstoffe:

NK-Zellen: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD45, anti-CD56 und 7-AAD

Pilz-spezifische T-Zellen: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD45, anti-CD56, anti-CD154, und 7-AAD

Bei Untersuchungen die Aktivierung und Degranulierung der NK-Zellen betreffend wurden zusätzlich Antikörper gegen CD69 bzw. gegen CD107a eingesetzt.

Bei Untersuchungen die Zytokinproduktion der generierten T-Zellen betreffend wurden zusätzlich Antikörper gegen IFN- γ und gegen TNF- α eingesetzt, und die Zytokine intrazellulär markiert (siehe unten).

Intrazellulärer Zytokinnachweis

Die durchflusszytometrische Messung der von T-Zellen produzierten Zytokine erfolgte durch die intrazelluläre Färbung der gesuchten Moleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern. Die Zytokinsekretion wurde durch Zugabe von Brefeldin A unterbunden, sodass die Zytokine intrazellulär angereichert wurden. Für die interzelluläre Färbung der Zytokine, wurden die Zellen permeabilisiert und die Zytokine so für Antikörper zugänglich gemacht. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 1x FACST™ Permeabilizing Solution 2 (12 Minuten bei RT).

*Proliferationsmessung mittels Carboxyfluorescein
Succinimidyl Ester (CFSE)*

5 x 10⁶ generierte Zellen und 1 x 10⁶ autologe mononukleäre Zellen (MNZ) wurden in jeweils 1 ml CFSE-Färbelösung (gelieferte CFSE-Stammlösung wurde gemäß Herstellerangaben mit DMSO verdünnt) in 15 ml Röhrchen aufgenommen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 10 Minuten wurden den Zellen jeweils 1 ml RPMI-Medium + 15 % HS hinzugefügt und die Suspension weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension ad 15 ml mit CTL-Medium aufgefüllt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (400 x g, 10 Min, RT), und der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die mit CFSE gefärbten Zellen auf verschiedene Ansätze verteilt und sieben Tage (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. An den Tagen 1 und 4 wurden die Ansätze mit 2,5 U/ml rhIL-2 supplementiert. An Tag 1 und an Tag 7 wurde bei allen Ansätzen die CFSE Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. Die Messwerte von Tag 1 dienten als Kontrolle. Die Überstände der Ansätze an Tag 7 wurden nach Sedimentierung der Zellen (400 x g, 10 Min, RT) abgenommen und zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen eingesetzt.

*Messung der Burstaktivität von neutrophilen Granulozyten
und Monozyten*

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Monozyten vernichten phagozytierte Pilze und Bakterien durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen. Zu den sauerstoffabhängigen Mechanismen gehört die Produktion von Sauerstoffradikalen, der sogenannte oxidative Burst (Sawyer et al., 1989). Zur Überprüfung der Funktionalität der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen wurde der Effekt der von ihnen sezernierten Zytokine auf Granulozyten und Monozyten mit Hilfe des Bursttest (Phagoburst®) untersucht. Mit diesem Kit ist es möglich Sauerstoffradikale, die von polymorphkernigen mononukleären Zellen (PMN) nach Aktivierung produziert werden, durchflusszytometrisch nachzuweisen. Hierzu wurden zu 100 µl frischen heparinisierten Blut von freiwilligen gesunden Spendern 100 µl der Überstände der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen, die zuvor 5 Stunden (37 °C, 5 % CO₂) mit unbeladenen autologen APZ, *R. oryzae*-Antigene präsentierenden

autologen APZ, sowie in Abwesenheit von APZ inkubiert wurden, hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden 100 µl Blut mit Puffer, und als Positivkontrollen jeweils 100 µl Blut mit 20 µl einer 8,1 µM Phorbol-12-myristat-13-acetat-Lösung (PMA) oder 20 µl einer 5 µM Lösung des chemotaktischen Peptids N-formyl-MethLeuPhe (fMLP) inkubiert. Nach Zugabe der Stimulanzen wurden die Ansätze exakt 10 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde allen Ansätzen 20 µl der Substratlösung (Dihydrorhodamin-123; DHR) zugegeben, die Proben gemischt und weitere 10 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden durch die Zugabe 2 ml Lyselösung (20 Minuten, RT) die Erythrozyten lysiert und die restlichen Zellen fixiert. Nach einem Waschschrift (250 x g, 5 Min, 4 °C) mit Waschpuffer (nach Herstellerangaben mit Hilfe eines mitgelieferten Reagenz angesetzt) wurde der Überstand dekantiert, die Zellen in 3 ml Waschpuffer resuspendiert und ein weiteres Mal sedimentiert (250 x g, 5 Min, 4 °C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abermals dekantiert, die Zellen nun in 200 µl PBS resuspendiert, 10 Minuten auf Eis lichtgeschützt inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Normwerte bezüglich oxidierender Granulozyten bei Stimulation mit dem physiologischen Stimulanz fMLP liegen laut Hersteller zwischen 1 - 10%, für oxidierende Monozyten sind keine Normwerte angegeben.

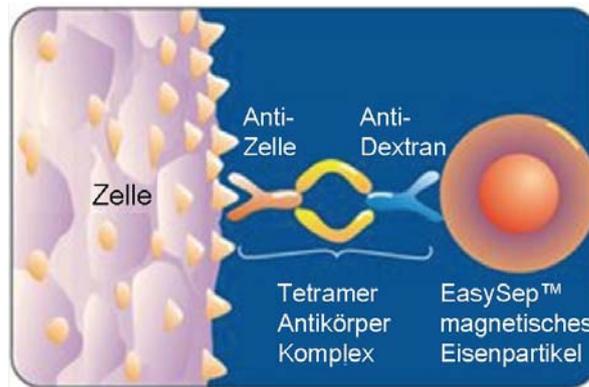
2.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die Herstellung von mononukleären Zellen (MNZ) aus Buffy coat-Leukozytenprodukten gesunder Spender, die in der Vorgeschichte keine invasive Pilzkrankung aufweisen, erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das 1:5 mit PBS verdünnte Buffy coat-Leukozytenprodukt wurde in 50 ml Röhrchen auf jeweils 15 ml Ficoll/Paque-Lösung geschichtet und zentrifugiert (700 x g, 30 Min, RT, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation bildete sich jeweils eine MNZ-Schicht zwischen der Ficoll-Phase und der Serum-PBS-Phase, welche abgenommen und in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt wurde. Die MNZ wurden zweimal in PBS gewaschen und jeweils sedimentiert (400 x g, 10 Min, RT), und im Anschluss im Medium oder Puffer resuspendiert. Die Zellzahl der isolierten MNZ wird mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt.

2.2.4 *Isolierung und Kultivierung primärer humaner NK-Zellen*

Die Isolierung primärer humaner NK-Zellen erfolgt mit Hilfe der immunomagnetischen Zellseparation EasySep® der Firma STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich). Hierbei werden alle Nicht-NK-Zellen mit Hilfe von bispezifische Tetramer-Antikörper-Komplexen (TAK; StemCell NK Enrichment Cocktail) markiert, die einerseits spezifisch für die humanen Blutzellen-Oberflächenantigene CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD 36, CD66b, CD123, HLA-DR und Glycophorin A, und andererseits spezifisch für Dextran sind. Nach Markierung der Zielzellen mit den TAK werden Dextran beschichtete Eisenpartikel der Mischung hinzugefügt, so dass sich Komplexe aus Zielzelle, TAK und Eisenpartikel bilden (Abbildung 2.1 A). Diese Komplexe können mit Hilfe eines Magnetfeldes fixiert und die unmarkierten NK-Zellen separiert werden (Abbildung 2.1 B). Da die NK-Zellen bei diesem Verfahren nicht mit Antikörpern markiert werden, bezeichnet man es als negative Selektion.

A



B

zu einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen werden bispezifische Tetramer-Antikörper-Komplexe zugefügt

①



alle nicht NK-Zellen werden mit Antikörpern markiert

zu der markierten Zellsuspension werden Dextran beschichtete Eisenpartikel zugefügt

②



mit bispezifische Tetramer-Antikörper-Komplexen markierte Zellen binden an Dextran beschichtete Eisenpartikel

Zellsuspension wird in einem Magnetfeld platziert

③



unmarkierte NK-Zellen werden durch Dekantieren gewonnen (negative Selektion), während markierte Zellen zurückbleiben

Abbildung 2.1: Isolierung primärer humaner NK-Zellen mittels STEMCELL EasySep® immunomagnetischen Zellseparation. Nicht-NK-Zellen werden mit Hilfe von bispezifischen Tetramer-Antikörper-Komplexen (TAK), die spezifisch für verschiedene Oberflächenantigene und für Dextran sind, markiert. Nach Markierung der Zielzellen werden Dextran beschichtete Eisenpartikel der Mischung hinzugefügt, so dass Komplexe aus Zielzelle, TAK und Eisenpartikel entstehen, welche mit Hilfe eines Magnetfeldes zurückgehalten werden können. Durch Dekantieren können die unmarkierten NK-Zellen aus der Zellsuspension isoliert werden. Abbildungen wurden der Arbeitsanweisung des Herstellers zu EasySep® Human NK Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich) entnommen und modifiziert.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von primären humanen NK-Zellen dienten aus 50 ml Buffy coat-Leukozytenprodukt isolierte mononukleäre Zellen (MNZ; Kapitel 2.2.3). Die MNZ wurden auf eine Konzentration von $5 \times 10^7/\text{ml}$ mit SCS-Puffer eingestellt. Nach Überführung der Zellen in ein 14 ml Rundbodenröhrchen wurden 50 μl TAK in TRIS-Puffer pro 1 ml Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Dextran beschichtete Eisenpartikel (*magnetic beads*) pro 1 ml Zellsuspension hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde das Röhrchen im Magneten platziert und nach weiteren 2,5 Minuten die unmarkierten NK-Zellen durch Dekantieren in ein neues Röhrchen überführt. Die NK-Zellen wurden anschließend sedimentiert (400 x g, 10 Min, RT), der Überstand verworfen, und die Zellen im NK-Zellmedium resuspendiert. Die Qualitätskontrolle im Hinblick auf Reinheit und Vitalität der NK-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt.

Für Versuche mit unstimulierten NK-Zellen wurden die Zellen direkt nach der Isolierung verwendet. Die Kultivierung und Expansion der NK-Zellen erfolgte bei einer anfänglichen Dichte von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in NK-Zellkulturmedium mit 1000 U/ml rekombinantem humanem Interleukin-2 (rhIL-2) in 25 cm^2 Zellkulturflaschen. Alle zwei bis drei Tage wurde die Zelldichte mikroskopisch überprüft, die Kultur mit frischem NK-Zellkulturmedium mit 1000 U/ml rhIL2 versorgt, und gegebenenfalls verdünnt, sodass die anfängliche Zelldichte erhalten blieb. Nach etwa 7-10 Tagen, abhängig vom Proliferationszustand und der erreichten Zellzahl, wurden vor den geplanten Versuchen erneut Reinheit und Vitalität der NK-Zellen durchflusszytometrisch und die Zellzahlen mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt.

2.2.5 *Isolierung und Kultivierung anti-Rhizopus oryzae T-Zellen*

Die Isolierung von anti-*Rhizopus oryzae* T-Zellen erfolgt mit Hilfe des immunomagnetischen Zelleseparationsverfahrens (MACS[®]) der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach). Zellen einer Einzelzellsuspension werden dabei mittels antikörperbeschichteten MACS[®] MicroBeads magnetisch markiert und die Zellsuspension auf eine MACS[®] Säule gegeben. Anschließend wird die MACS[®] Säule

in einem Magnetfeld (MACS® Separator) platziert. Während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert durchlaufen, werden die mit MACS® MicroBeads markierten Zellen in der Säule durch das anliegende Magnetfeld zurückgehalten. Nach der Entfernung der MACS® Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen eluiert werden (Abbildung 2.2). Da die gesuchten Zellen bei diesem Verfahren mittels Antikörper markiert werden, bezeichnet man diese Art der Selektion als positive Selektion.

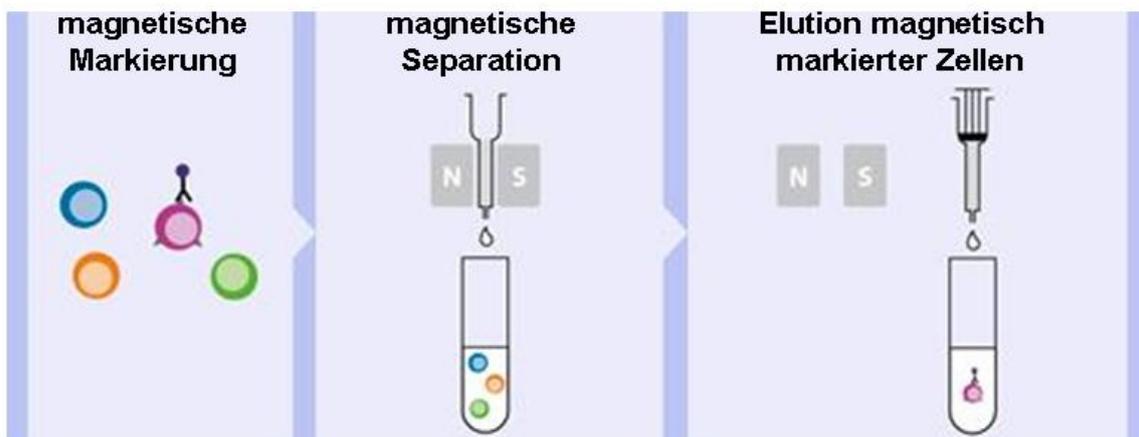


Abbildung 2.2: Isolierung primärer humaner Zellen aus peripherem Blut mittels MACS® immunomagnetischer Zellseparation. Zielzellen werden mit Hilfe von antikörperbeschichteten magnetischen MACS® MicroBeads markiert. Nach Markierung der Zielzellen wird die Zellsuspension auf eine MACS® Säule gegeben und diese einem Magnetfeld ausgesetzt. Das Durchspülen der Säule mit Puffer bewirkt, dass unmarkierte Zellen die Säule durchlaufen, während die Zielzellen in dieser verbleiben. Nach Entfernen des Magnetfeldes können die markierten Zielzellen eluiert werden. Da die gesuchten Zellen bei diesem Verfahren mittels Antikörper markiert werden, bezeichnet man diese Art der Selektion als positive Selektion. Abbildung dem Internetauftritt von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, entnommen und modifiziert.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von anti-*Rhizopus oryzae* T-Zellen dienten 50 ml Buffy coat-Leukozytenprodukt gesunder Spender (DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt), die in der Vorgeschichte keine invasive Pilzerkrankung aufweisen.

Die Isolierung anti-*R. oryzae* T-Zellen aus dem Buffy coat-Leukozytenprodukt erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die aktivierten CD154⁺ T-Zellen aus MNZ nach Antigenstimulation, im zweiten Schritt die nach Antigenstimulation IFN- γ produzierende T-Zellen aus der CD154⁺ Zellpopulation mittels IFN- γ -Sekretions-Tests (*IFN- γ secretion assay*) selektiert. Die Selektionen erfolgten jeweils nach

Herstellerangaben unter Anpassung der Volumina. Ein Schema des Verfahrens zeigt die folgende Abbildung.

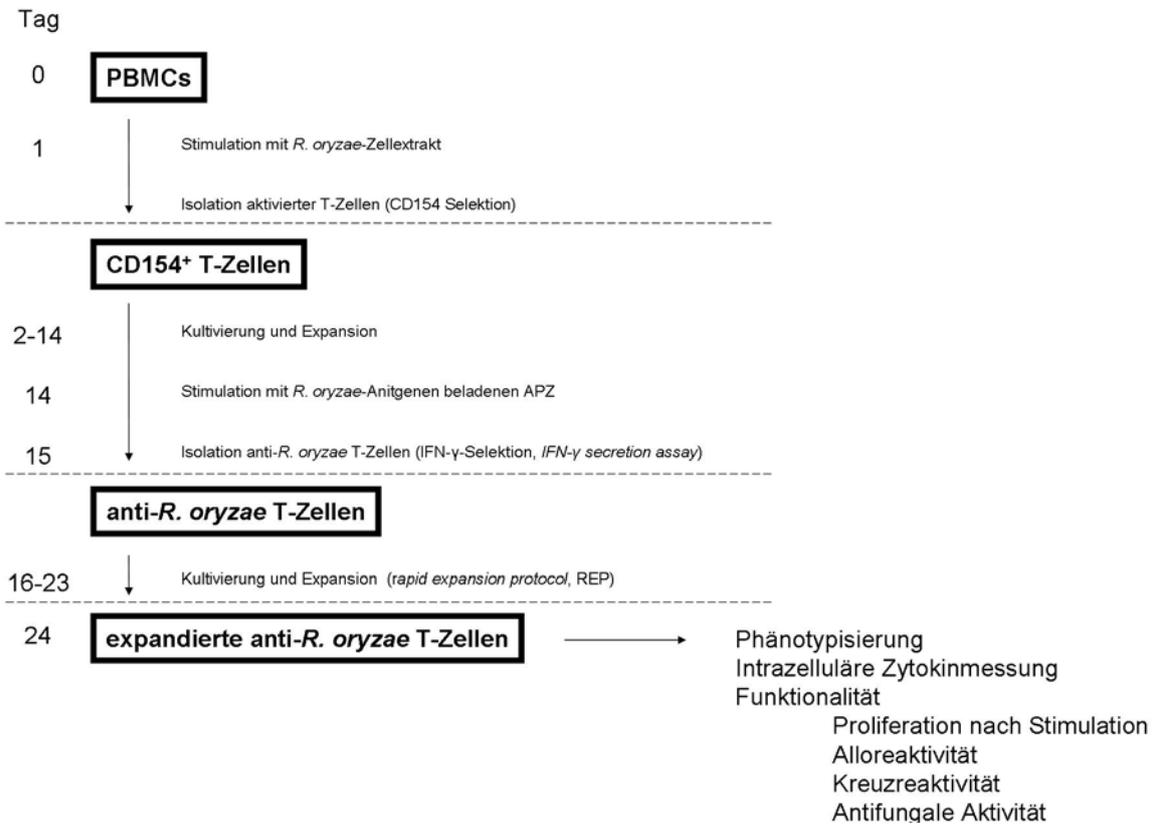


Abbildung 2.3: Schema der Generierung anti-*R. oryzae* T-Zellen aus mononukleären Zellen. Aus dem Blut gesunder Spender wurden zunächst die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und diese über Nacht mit Antigenen von *R. oryzae* inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden aktivierte CD154⁺ Zellen mittels MACS[®] Verfahren selektiert und über zwei Wochen unter Zugabe von rhIL-2 und unter Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen kultiviert. Anschließend wurden IFN- γ produzierende Zellen nach erneuter Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen mittels IFN- γ -Sekretions-Test isoliert. Die selektierten Zellen wurden eine Woche gemäß dem *rapid expansion protocol* (REP) kultiviert, und anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert.

Selektion CD154⁺-Zellen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung anti-*R. oryzae* T-Zellen aus dem dienten aus 50 ml Buffy coat-Leukozytenprodukt isolierte mononukleären Zellen (MNZ; Kapitel 2.2.3). 1×10^8 MNZ wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml platziert. Die restlichen MNZ wurden zur Herstellung von Antigenpräsentierenden Zellen eingesetzt (Kapitel 2.2.6). Zur Stimulation wurde zu den

MNZ 7,5 µg/ml *R. oryzae*-Zellextrakt, 1 µg/ml CD40 und 1 µg/ml CD28 hinzugegeben. Die Stimulation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Suspensionszellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt, adhärente Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst, ebenfalls in ein 50 ml-Röhrchen überführt, und beide Zellfraktionen im 4 °C MACS-Puffer gewaschen und sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C). Anschließend wurden die Suspensionszellen in 400 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert und ihnen 100 µl CD154-Biotin Antikörper pro 1 x 10⁷ Zellen hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen, sedimentiert und anschließend in 800 µl MACS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl anti-Biotin MicroBeads wurden die Zellen 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 20 ml MACS-Puffer gewaschen und sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C). Im Anschluß wurden die Zellen in 500 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert und auf eine sich in einem Magnetfeld befindliche MACS[®]-Säule, die im Vorfeld mit 3 ml kaltem MACS-Puffer equilibriert wurden, gegeben. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde die Säule 3 Mal mit jeweils 3 ml kaltem MACS-Puffer gespült. Das gesamte Eluat wurde aufgefangen und stellte die Negativfraktion mit unmarkierten Zellen dar. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt, mit 5 ml kaltem MACS-Puffer befüllt und dieser mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Das hier gewonnene Eluat stellte die Positivfraktion mit CD154⁺ angereicherten Zellen dar. Die zwei Zellfraktionen wurden sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C), anschließend in jeweils 1 ml CTL-Medium resuspendiert und die Zellzahlen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Negativfraktion wurde zusätzlich mit 30 Gy bestrahlt und diente in der folgenden Kultivierungsphase als Futterzellen (*feeder cells*). Die CD154⁺ angereicherten Zellen der Positivfraktion wurden in einer 25 cm³ Zellkulturflasche in einer Konzentration von ca. 2,5 x 10⁵ Zellen/ml in CTL-Medium platziert, die bestrahlten Zellen der Negativfraktion in 50-facher Menge sowie 50 U/ml rhIL-2 hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ bis zu 14 Tage kultiviert, wobei jeden 2. - 3. Tag 1/3 des Kulturmediums durch frisches CTL-Medium ersetzt und 50 U/ml rhIL-2 hinzugefügt wurden. Abhängig von der Proliferation wurden die Zellen nach 10 - 14 Tagen durchflusszytometrisch phänotypisiert und die erreichte Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Selektion IFN- γ ⁺-Zellen

Als Ausgangszellpopulation dienten 5×10^7 Zellen der CD154⁺ angereicherte und anschließend kultivierten Zellpopulation. Diese Zellen wurden mit 1×10^7 *R. oryzae*-Antigenpräsentierende Zellen, die einen Tag vorher hergestellt wurden (siehe Kapitel 2.2.6), in 10 ml CTL-Medium 2 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Suspensionszellen aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Suspensionszellen sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C), in 400 µl kaltem CTL-Medium resuspendiert und ihnen 100 µl IFN- γ Catch Reagenz hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis wurde die Zellsuspension ad 50 ml mit 37 °C warmem CTL-Medium aufgefüllt und die Zellen für 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C), in 50 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und abermals sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C). Nach Resuspension der Zellen in 400 µl kaltem MACS-Puffer wurden 100 µl IFN- γ Detektionsantikörper-PE (R-Phycoerythrin) hinzugegeben, die Zellsuspension 10 Minuten auf Eis inkubiert, in 50 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden in 400 µl kaltem MACS-Puffer aufgenommen, 100 µl Anti-PE MicroBeads zugegeben und die Zellen 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 50 ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 3 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert und auf eine sich im Magnetfeld befindliche MACS[®]-Säule gegeben. Die Säule wurde im Vorfeld drei Mal mit 3 ml kaltem MACS-Puffer equilibriert. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde die Säule drei Mal mit jeweils 3 ml kaltem MACS-Puffer gespült. Das gesamte Eluat wurde aufgefangen und stellte die Negativfraktion mit unmarkierten Zellen dar. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt, mit 5 ml kaltem MACS-Puffer befüllt und dieser mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Das hier gewonnene Eluat stellte die Positivfraktion mit angereicherten IFN- γ ⁺-Zellen dar. Die zwei Zellfraktionen wurden sedimentiert (400 x g, 10 Min, 4 °C), in jeweils 1 ml CTL-Medium resuspendiert und die Zellzahlen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. $1,5 \times 10^6$ der angereicherten IFN- γ ⁺-Zellen der Positivfraktion wurden in eine 25 cm² Zellkulturflasche in CTL-Medium platziert und im *rapid expansion protocol for*

T cells (REP, siehe unten) über 7 Tage expandiert. Die restlichen Zellen wurden bei -80 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Nach 7 Tagen wurden die kultivierten Zellen durchflusszytometrisch phänotypisiert und die erreichte Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Expansion generierter T-Zellen

Eine effiziente Methode zur Generierung großer Mengen von T-Zellen ist das sogenannte *rapid expansion protocol for T cells* (REP) (Dudley et al., 2003). Gemäß dieses Protokolls wurden die durch IFN- γ -Selektion gewonnenen Zellen in einer 25 cm³ Zellkulturflasche in Gegenwart von 5 x 10⁶ bestrahlter (60 Gy) B-LCL Zellen und 2,5 x 10⁷ bestrahlter (30 Gy) allogener PBMZ und unter Stimulation mit 30 ng/ml OKT-3 in 25 ml CTL-Medium 7 Tage kultiviert. An Tag 1 wurden der Kultur 50 U/ml rhIL-2 hinzugegeben, Tag 4 wurden die Zellen gewaschen, indem sie aus der Zellkulturflasche entnommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und durch Zentrifugation sedimentiert wurden (400 x g, 10 Min, RT). Dieser Waschschrift dient der Entfernung von OKT-3, welches bei längerer Einwirkung toxisch auf die Zellen wirkt. Anschließend wurden die Zellen in 25 ml frischem CTL-Medium resuspendiert und ihnen 50 U/ml rhIL-2 hinzugefügt. An Tag 7 wurde die Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen auf ihre Reinheit durchflusszytometrisch überprüft.

Herstellung von Humanserum

Zur Herstellung von humanem Serum wurde frisches Vollblut von 3 freiwilligen gesunden Spendern, das ohne Blutgerinnungshemmern abgenommen wurde, jeweils in 50 ml Röhrchen überführt und über 3 Stunden bei RT stehen lassen. Nach der Gerinnung des Blutes wurden die Röhrchen zentrifugiert (2000 x g, 20 Min, 20 °C) und anschließend das Serum abgenommen. Das Serum wurde weitere zwei Mal zentrifugiert (2000 x g, 10 Min, 20 °C) und der Überstand nach der Zentrifugation jeweils in neue 50 ml Röhrchen überführt. Nach einer Inaktivierung des Komplementsystems durch Hitze (56 °C, 30 Minuten) wurden die Seren der verschiedenen Spendern

zusammengeführt und mit Hilfe von 5 µm und 0,2 µm Filter sterilisiert. Das gewonnene Serum wurde in 15 ml Portionen bei -20 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

2.2.6 Herstellung Antigenpräsentierender Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (APZ) wurden mit Hilfe der sogenannten Adhärenzmethode hergestellt. Hierzu wurden MNZ in Plastik-Zellkulturgefäßen in CTL-Medium ausgesetzt und 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit, in der die adhärennten Zellen (Monozyten, etc.) sich an den Boden der Plastikgefäße geheftet haben, wurden die nicht adhärennten Zellen mit dem Überstand entfernt und die adhärennten Zellen 2 Mal mit je 2 ml 37 °C warmen RPMI-Medium gewaschen. Anschließend wurden frisches CTL-Medium auf die Zellen gegeben und diese mit den entsprechenden Antigenextrakten jeweils in einer Konzentration von 7,5 µg/ml über 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert.

Am darauffolgendem Tag wurde der Überstand verworfen, und die Zellen mit warmem RPMI gewaschen. Zur Ernte der adhärennten Zellen wurde 4 °C kaltes PRMI auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (400 x g, 10 Min, RT), der Überstand verworfen, die Zellen in einem geeignetem Volumen CTL-Medium resuspendiert und die Zellzahl durch Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.7 Bestimmung der Pilzschädigung

XTT-Assay

Die antimykotische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Hyphen der Pilze wurde indirekt über die Bestimmung der Vitalität des Pilzes wie von Moss et al. beschrieben (Moss et al., 2008), untersucht. 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]2H-tetrazolium-5-carboxyanilide (XTT) kann durch mitochondriale Dehydrogenasen in Gegenwart eines Elektronenakzeptors wie z.B. Coenzym Q₀ in metabolisch aktiven Pilzzellen (vitalen Zellen) unter Farbumschlag zu seinem Formazanderivat reduziert werden. Dieser Farbumschlag kann photometrisch analysiert werden.

In einer 96-Well-Platte wurde eine Suspension aus NK-Zellen und Pilzhyphen (Induktion s.o.) in NK-Zellkulturmedium hergestellt und bei 37 °C bebrütet. Nach der Inkubationsphase werden die Überstände nach Zentrifugation (700 x g, 15 Min, RT) abgenommen, allen Ansätzen 150 µl in PBS-Puffer hergestellten XTT-Lösung (0,25 mg/ml) und Coenzym Q₀ (4 µg/ml) zugegeben und die Ansätze eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und photometrisch vermessen. So konnte der prozentuale Anteil vitalen Pilzes in den Proben mit NK-Zellen im Vergleich zu einem Kontrollansatz des Pilzes ohne NK-Zellen nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Hyphenschädigung [\%]} = \left(1 - \frac{OD_{\text{Pilz+NK}} - OD_{\text{XTT-Kontrolle}}}{OD_{\text{Pilz}} - OD_{\text{XTT-Kontrolle}}} \right) \times 100$$

Bestimmung der Konidienvitalität

Die antimykotische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Konidien der Pilze wurde über die Fähigkeit der Konidien zur Kolonienbildung auf Nährmedium-Agar-Platten nach Inkubation mit NK-Zellen bestimmt. Hierbei wurden ruhende Konidien von *A. fumigatus* bzw. *R. oryzae* (jeweils 1×10^6) zusammen mit NK-Zellen (in einem E:T Verhältnis von 1:1) in Wells einer 24-Well-Platte gegeben. Als Kontrolle dienten Konidien, die ohne NK-Zellen inkubiert wurden. Pilz und NK-Zellen wurden über 24 Stunden bei 37 °C in NK-Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden NK-Zellen durch Zugabe von 2 ml Aqua dest. lysiert, die Suspension zentrifugiert und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Konidiensuspension 1:1000 verdünnt und 100 µl der Verdünnung auf Nährmedium-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden 12 - 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und im Anschluss die Zahl der Kolonien bestimmt. Die antimykotische Aktivität der NK-Zellen wurde aus der Differenz der Kolonienzahl der Testansätze und der Kontrollansätze ohne NK-Zellen bestimmt.

Einfluss von Concanamycin A auf die antimykotische Aktivität von NK-Zellen

Zur Untersuchung der Beteiligung des von NK-Zellen sezernierten Perforin an der antimykotische Aktivität gegenüber Pilzhyphen, wurde die Perforinsekretion mittels Concanamycin A (CMA) inhibiert (Kataoka et al., 1996). CMA ist bekannt als ein spezifischer Inhibitor der V-ATPase, welche an sekretorischen Endomembranen eukaryotischer Zellen zu finden ist, und unter ATP-Hydrolyse im Cytosol das Lumen von Endomembranvesikeln ansäuert. Die Inhibierung der V-ATPase durch CMA führt zur Erhöhung des pH in den zytotoxischen Granula der NK-Zellen, wodurch die Degradation von Perforin beschleunigt wird.

Für die Inhibierung der Perforinsekretion wurden IL-2 vorstimulierte NK-Zellen mit 10 nM Concanamycin A in NK-Zellkulturmedium für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend zwei Mal mit NK-Zellkulturmedium gewaschen (400 x g, 10 Min, RT). Anschließend wurden die sedimentierten NK-Zellen in NK-Medium resuspendiert und die Zellzahl durch Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Konzentrationsbestimmung von Perforin, IFN- γ , RANTES und GM-CSF mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstest

Die Konzentrationen von Perforin, IFN- γ , RANTES und GM-CSF wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels kommerziellen enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme linked immunoabsorbent assay*, ELISA) nach Herstellerangaben ermittelt. Zusammengefasst, unstimulierte und IL-2 stimulierte NK-Zellen wurden alleine, mit Hyphen oder Konidien von *A. fumigatus* oder *R. oryzae* 8 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der Ansätze gesammelt, nach Zentrifugation (10000 x g, 10 Minuten, RT) in ein 1,5 ml Gefäß überführt, und bei -80 °C weggefroren. Am Versuchstag wurden 100 μ l der aufgetauten Überstände sowie mitgelieferten Standardlösungen der untersuchten Proteine bekannter Konzentration jeweils auf mit Antikörpern beschichtete 96-well-Platten gegeben. Nach Zugabe von an Biotin gekoppelter und für das jeweilige Protein spezifischer Detektionsantikörper und an Streptavidin gekoppelten Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*; HRP), wurde Tetramethylbenzidin (TMB), ein Substrat der Meerrettichperoxidase, dessen Umsatz mit einer Farbreaktion

einhergeht, zu den Proben hinzugegeben. Die optische Dichte des farbigen Produkts wurde photometrisch gemessen, und die Konzentration der Proteine mit Hilfe einer Standardreihe ermittelt. Die von den Hersteller angegebenen Detektionsuntergrenzen betragen für Perforin 40 pg/ml, für IFN- γ 4 pg/ml, für GM-CSF 7,8 pg/ml, und für RANTES 31,2 pg/ml.

2.2.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der generierten Daten erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism® 5 Software (Version 5.04, GraphPad Software, La Jolla, USA). Wenn nicht anders angegeben wurde zur Bestimmung der Signifikanz der zweiseitige t-Test durchgeführt, wobei p -Werte < 0.05 als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant angesehen wurden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Antimykotische Aktivität humaner Natürlicher Killer Zellen

Als erstes sollte untersucht werden, ob humane NK-Zellen gegen zwei wichtige Erreger invasiver Mykosen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, nämlich *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus oryzae*, eine Aktivität aufweisen. Dazu wurden jeweils Hyphen (die filamentöse Form) und Konidien (Sporen) beider Pilze mit frisch isolierten und unstimulierten humanen NK-Zellen inkubiert. Die antimykotische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Hyphen wurde über die Bestimmung der Vitalität des Pilzes mittels XTT-Assay, gegenüber den Konidien über deren Fähigkeit auf Nährstoff-Agar-Platten Kolonien zu bilden, bestimmt.

Da in vielen klinischen Studien rekombinantes humanes Interleukin-2 (rhIL-2) zur Stimulation humaner NK-Zellen eingesetzt wird, mit dem Ziel die Expansion und die Zytotoxizität der Zellen zu steigern sollten zusätzlich zu unstimulierten NK-Zellen auch über 10 Tage mit rhIL-2 stimulierte humane NK-Zellen hinsichtlich ihres antimykotischen Potentials untersucht werden.

3.1.1 Einfluss Natürlicher Killer Zellen auf Hyphen und Konidien von *Aspergillus fumigatus*

Die Inkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit frisch isolierten humanen NK-Zellen ohne zusätzliche exogene Stimulation führte zu einer deutlichen Abnahme der Vitalität der Pilzhyphen ($\hat{=}$ Hyphenschädigung) von $16,1 \% \pm 3,2 \%$ gegenüber ohne NK-Zellen inkubierten Hyphen. Die Kultivierung der isolierten NK-Zellen in Gegenwart von 1000 U/ml rhIL-2 über einen Zeitraum von 10 Tagen führte zu Steigerung der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen und zu einer signifikant höheren Schädigung der *A. fumigatus* Hyphen im Vergleich zu frisch isolierten NK-Zellen von $26,3 \% \pm 2,8 \%$ (Abbildung 3.1 A; $p = 0,043$). Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation von *A. fumigatus* Konidien weder mit frisch isolierten noch mit IL-2 vorstimulierten NK-Zellen eine signifikante Veränderung der Vitalität der Konidien im Vergleich zu

unbehandelten Konidien zur Folge. Dies wurde aus der Quantifizierung der Fähigkeit der Konidien zur Kolonienbildung sichtbar (Abbildung 3.1 B).

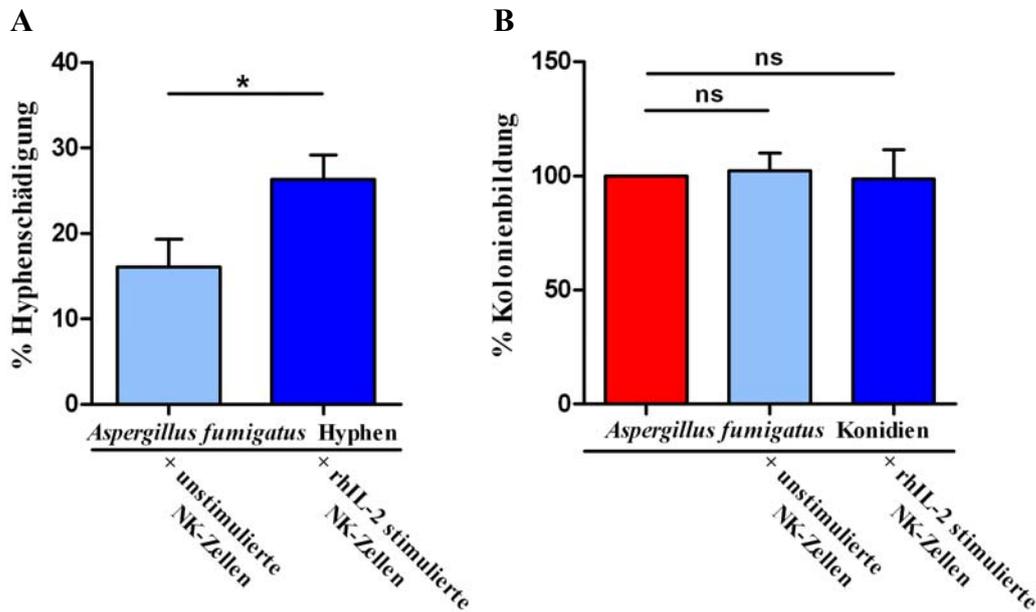


Abbildung 3.1: Antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus*. Sowohl humane unstimulierte NK-Zellen als auch über 10 Tage mit rekombinantem humanem Interleukin-2 (rhIL-2) stimulierte NK-Zellen schädigten *A. fumigatus* Hyphen (A), hatten jedoch keinen Effekt auf die Konidien von *A. fumigatus* (B). A. Die Hyphenschädigung wurde aus Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden bei einem E:T von 20:1 berechnet, wobei die Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. B. Die Schädigung der Konidien wurde über ihre Fähigkeit zur Koloniebildung nach 24 Stunden nach einer vorangegangenen Inkubation mit NK-Zellen bestimmt, wobei die Kolonienbildung der unbehandelten Konidien als 100 % angesehen wurde. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachansätzen (XTT) bzw. Doppelansätzen (Kolonienbildung) gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,043$).

Experimente mit unterschiedlichen Effektorzelle-zu-Zielzelle-Verhältnissen (*effector to target ratio*, E:T) zeigten zudem, dass die Hyphenschädigung durch NK-Zellen von der eingesetzten Zellzahl abhängig ist. So führte eine Erhöhung des E:T-Verhältnisses zugunsten der Effektorzellen zur erhöhten Schädigung des Pilzes (Abbildung 3.2). So betrug die Hyphenschädigung bei E:T von 10:1, 20:1 und 50:1 durch frisch isolierte NK-Zellen jeweils 10,1 % ± 1,6 %, 16,1 % ± 3,2 % und 31,1 % ± 5,2 %, und durch IL-2 stimulierte NK-Zellen jeweils 14,1 % ± 3,7 %, 26,3 % ± 2,8 % und 51,2 % ± 5,5 %.

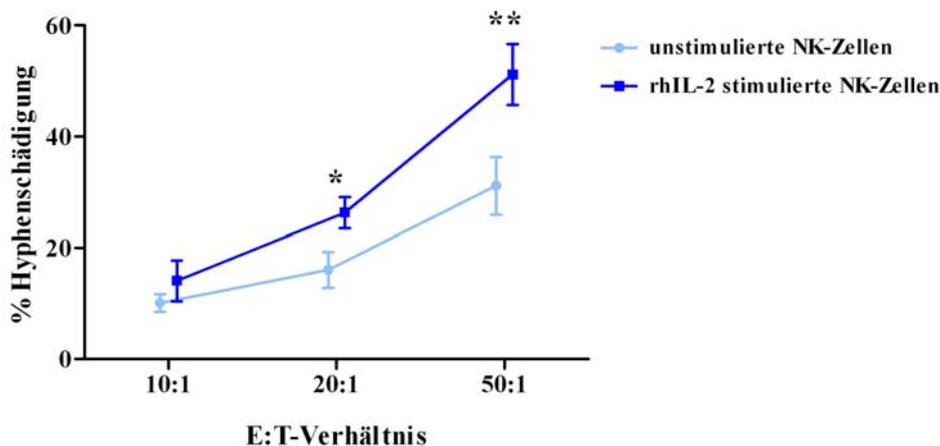


Abbildung 3.2: Schädigung der Hyphen von *A. fumigatus* bei unterschiedlichen Verhältnissen von Pilz zu NK-Zellen. Die Erhöhung des Effektorzelle-zu-Zielzelle-Verhältnisses (*effector to target ratio*, E:T) von 10:1 über 20:1 zu 50:1 führte zu höheren Schädigung der Pilzhyphen durch frisch isolierte NK-Zellen und durch IL-2 stimulierte NK-Zellen. Bei E:T 20:1 und E:T 50:1 war die durch IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelte Schädigung der Hyphen signifikant höher im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen (* $p = 0,043$; ** $p = 0,033$). Die Hyphenschädigung wurde aus Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden berechnet, wobei Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten, die in jeweils Dreifachansätzen gemessen wurden. Punkte stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung.

Darüber hinaus konnte wieder ein signifikanter, die antimykotische Aktivität von NK-Zellen steigernder Effekt von IL-2 bei E:T 20:1 und 50:1 beobachtet werden ($p = 0,043$ bzw. $p = 0,033$).

Eine Aktivität humaner frisch isolierter und IL-2 stimulierter NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* Konidien konnte auch nach verschiedenen Änderungen des experimentellen Aufbaus, wie z.B. eine Erhöhung des E:T-Verhältnisses oder eine Verlängerung der Inkubationsdauer nicht beobachtet werden. Dies legt nahe, dass humane NK-Zellen grundsätzlich keine Aktivität gegenüber *A. fumigatus* Konidien besitzen.

3.1.2 Einfluss Natürlicher Killer Zellen auf Hyphen und Konidien von *Rhizopus oryzae*

Analog zu den Untersuchungen zur antimykotischen Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* wurde die Aktivität von NK-Zellen gegen Hyphen und Konidien von *R. oryzae* untersucht. Auch hier zeigten sowohl frisch isolierte NK-Zellen ohne zusätzliche exogene Stimulation, als auch in Gegenwart von IL-2 kultivierte

NK-Zellen eine deutliche Schädigung der Pilzhypen (Abbildung 3.3 A). Ebenfalls konnte ein die Zytotoxizität steigernder Effekt von IL-2 beobachtet werden, da IL-2 stimulierte NK-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten NK-Zellen eine höhere Hyphenschädigung verursachten ($33,5 \% \pm 2,0 \%$ zu $18,8 \% \pm 5,8 \%$, $p = 0,016$). Wie auch gegenüber *A. fumigatus* Konidien gesehen, zeigten weder frisch isolierte noch IL-2 stimulierte NK-Zellen eine Wirkung gegenüber Konidien von *R. oryzae* (Abbildung 3.3 B). Eine Aktivität humaner frisch isolierter und IL-2 stimulierter NK-Zellen gegenüber *R. oryzae* Konidien konnte auch nach verschiedenen Änderungen des experimentellen Aufbaus, wie z.B. eine Erhöhung des E:T-Verhältnisses oder eine Verlängerung der Inkubationsdauer nicht beobachtet werden. Dies legt nahe, dass humane NK-Zellen grundsätzlich keine Aktivität gegenüber *R. oryzae* Konidien besitzen.

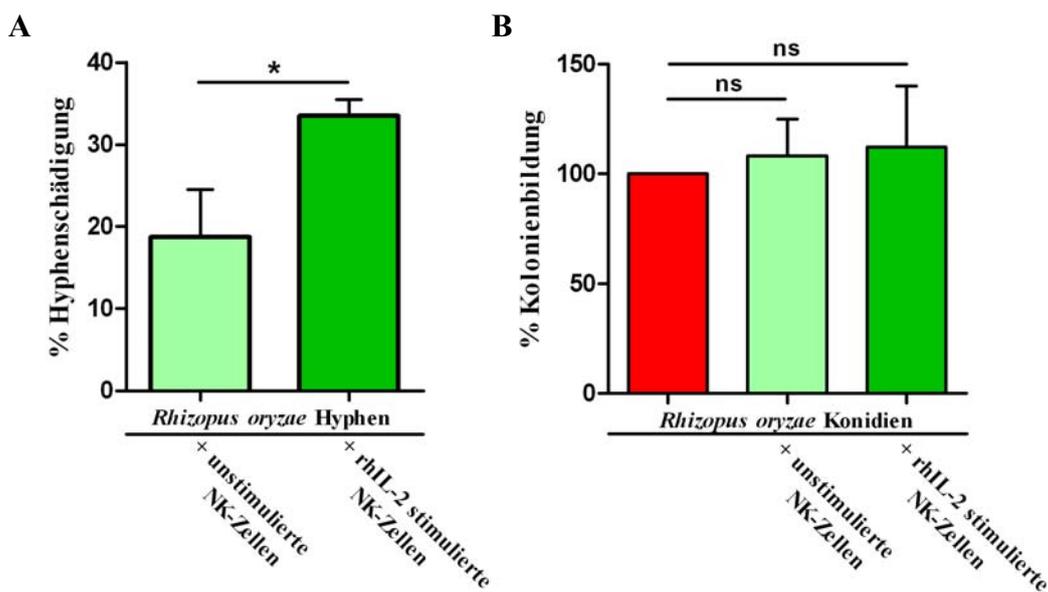


Abbildung 3.3: Antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber *R. oryzae*. Humane unstimulierte und über 10 Tage mit rekombinantem humanen Interleukin-2 (rhIL-2) stimulierte NK-Zellen schädigten direkt Hyphen von *R. oryzae* (A). Im Gegensatz dazu hatten weder unstimulierte noch rhIL-2 stimulierte NK-Zellen einen antimykotischen Effekt gegenüber den Konidien von *R. oryzae* (B). A. Die Hyphenschädigung wurde aus der Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden bei einem E:T von 20:1 berechnet, wobei Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. B. Die Schädigung der Konidien wurde über ihre Fähigkeit zur Kolonienbildung nach 24 Stunden nach einer vorangegangenen Inkubation mit NK-Zellen bestimmt, wobei die die Kolonienbildung der unbehandelten Konidien als 100 % angesehen wird. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachansätzen (XTT) bzw. Doppelansätzen (Kolonienbildung) gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,016$).

3.1.3 *Aktivierung frisch isolierter humaner NK-Zellen durch *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus oryzae**

Die Ergebnisse hinsichtlich der antimykotischen Aktivität humaner NK-Zellen zeigen eine Aktivität der NK-Zellen gegenüber den beiden eingesetzten Pilzen *A. fumigatus* und *R. oryzae* in Abhängigkeit von deren Morphologie. Während die Hyphen der Pilze sowohl durch unstimulierte als durch mit IL-2 stimulierte NK-Zellen geschädigt werden, zeigt sich keine schädigende Wirkung der NK-Zellen gegenüber den Konidien der beiden Pilze. Deswegen sollte in weiteren Experimenten geprüft werden, ob die morphologischen Unterschiede der verschiedenen Entwicklungsstadien sich auch unterschiedlich auf die Aktivierung der humanen NK-Zellen auswirken.

Die Aktivierung frisch isolierter humaner NK-Zellen in Abhängigkeit von der Morphologie des Pilzes

Die durchflusszytometrische Analyse der Expression des frühen Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche von frisch isolierten humanen NK-Zellen zeigte, dass die Aktivierung der NK-Zellen von der Morphologie des Pilzes abhängt. Während in Hyphenform vorliegende *A. fumigatus* und *R. oryzae* die Expression von CD69 auf frisch isolierten NK-Zellen induzierten, blieb diese nach Inkubation der NK-Zellen mit den Konidien der beiden Pilze im Vergleich zu ohne den Pilz inkubierten NK-Zellen unverändert (Abbildung 3.4 A und B). Der Anteil von CD69⁺ NK-Zellen erhöhte sich nach Inkubation mit Hyphen von *A. fumigatus* in allen drei Experimenten von jeweils 4,9 % auf 10,9 %, von 24,3 % auf 37,1 % und von 22,3 % auf 26,7 %. Nach Inkubation mit Konidien von *A. fumigatus* veränderte sich der Anteil CD69⁺ NK-Zellen in zwei von drei Experimenten nur unwesentlich (4,9 % zu 4,1 % und 22,3 % zu 21,6 %) und verminderte sich in einem Experiment deutlich (24,3 % zu 19,5 %, Abbildung 3.4 A, mittlere Reihe). Die Inkubation frisch isolierten NK-Zellen mit Hyphen von *R. oryzae* erhöhte ebenfalls den Anteil von CD69⁺ NK-Zellen in drei von drei Experimenten von 24,9 % auf 34,7,9 %, von 23,7 % auf 31,4 % und von 4,9 % auf 9 %. Die Inkubation der Zellen mit Konidien von *R. oryzae* hatte in zwei von drei Experimenten keine Veränderung des Anteils CD69⁺ NK-Zellen zur Folge (von 24,9 % auf 23,3 % und von 23,7 % auf 22,5 %), in einem Experiment

konnte jedoch eine deutliche Steigerung der CD69-Expression beobachtet werden (4,9 % zu 9 %, Abbildung 3.4 B, untere Reihe).

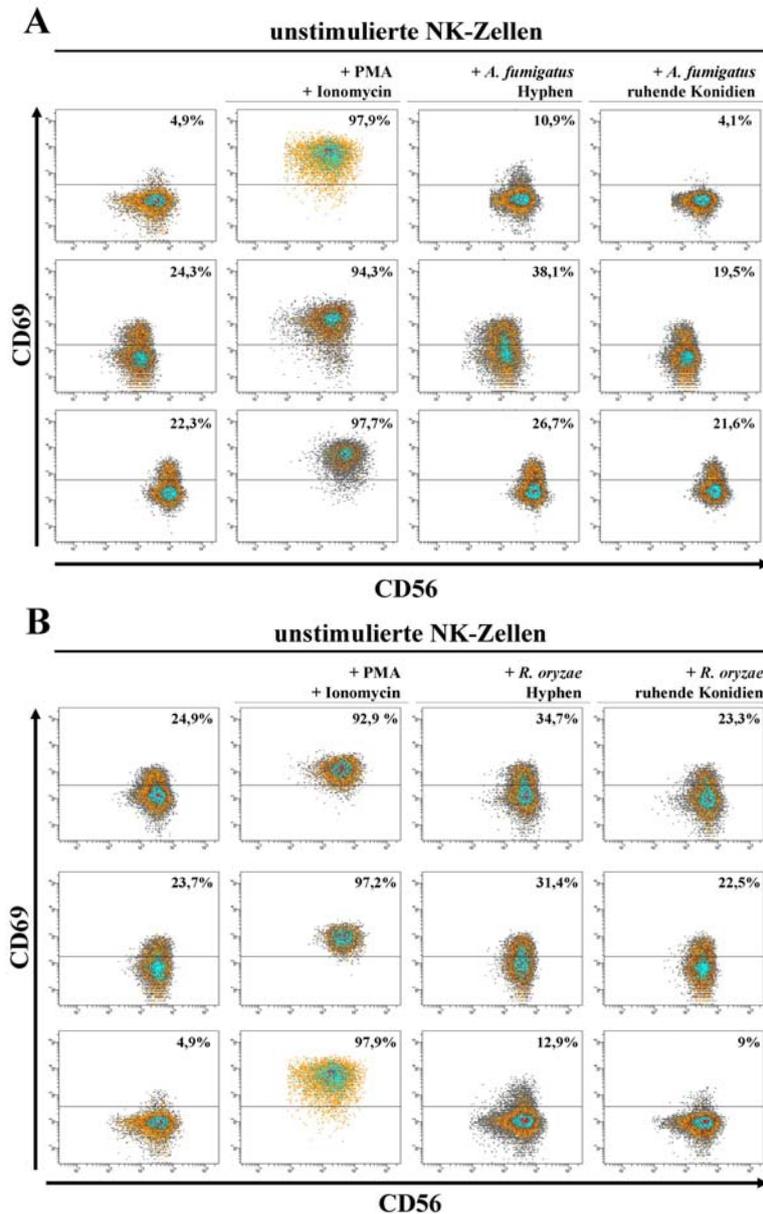


Abbildung 3.4: Aktivierung primärer humaner NK-Zellen durch *A. fumigatus* und *R. oryzae*. *A. fumigatus* und *R. oryzae* induzierten in Abhängigkeit von ihrer Morphologie die Expression des frühen Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 auf frisch isolierten NK-Zellen. Während nach Inkubation von frisch isolierten NK-Zellen drei verschiedener gesunder Spender mit Hyphen von *A. fumigatus* (A) und *R. oryzae* (B) der prozentuale Anteil CD69⁺ NK-Zellen in der Gesamtpopulation in allen Versuchen stieg, nahm dieser nach Inkubation der Zellen mit ruhenden Konidien der Pilze jeweils im Vergleich zu NK-Zellen, die ohne Pilze inkubiert wurden, mit einer Ausnahme nicht zu. Dargestellt sind Dichtediagramme durchflusszytometrischer Messungen der CD69 Expression auf CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen von jeweils drei Individuen.

Diese Ergebnisse korrelieren weitgehend mit den Ergebnissen der Experimente zur antimykotischen Aktivität humaner NK-Zellen gegen *A. fumigatus* und *R. oryzae*, und lassen den Schluss zu, dass NK-Zellen nur Hyphen und nicht die Konidien dieser Pilze erkennen.

Konidien von *A. fumigatus* werden von einer aus Hydrophobinen bestehenden und als Rodlet bezeichnete Proteinschicht umschlossen. Diese Struktur wird in der Literatur im Zusammenhang mit der Inhibierung der Aufnahme von Konidien durch Phagozyten beschrieben (siehe Kapitel 1.2.3). Da frisch isolierte NK-Zellen nicht durch Konidien von *A. fumigatus* aktiviert werden, wie oben gezeigte Ergebnisse belegen, könnte angenommen werden, dass diese Struktur ebenfalls die Aktivierung der NK-Zellen verhindert. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung von unstimulierten NK-Zellen nach Koinkubation mit Konidien eines mutierten *A. fumigatus*-Stammes ($\Delta rodA$), welcher der Synthese von Hydrophobin A nicht fähig ist, analysiert. Eine Induktion der CD69 Expression auf unstimulierten NK-Zellen nach Inkubation mit Konidien der Mutante konnte, wie schon zuvor mit Konidien des Wildtyps, nicht beobachtet werden (Abbildung 3.5). Dies deutet darauf hin, dass die fehlende Aktivierung der NK-Zellen durch Konidien nicht auf Hydrophobin A zurückzuführen ist, sondern andere Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

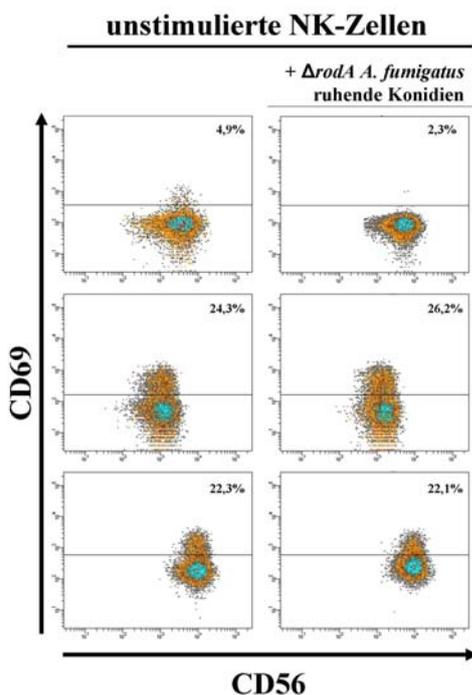


Abbildung 3.5: Einfluss von Hydrophobin A auf die Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen durch *A. fumigatus* Konidien. Konidien der *rodA*-Mutante von *A. fumigatus* induzierten ebenso wie Konidien des Wildtyps keine Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen. Dargestellt sind Dichtediagramme durchflusszytometrischer Messungen der CD69 Expression auf $CD56^+CD3^-$ NK-Zellen von drei Individuen.

3.1.4 *Mechanismus der antimykotischer Aktivität humaner NK-Zellen*

Degranulierung IL-2 stimulierter NK-Zellen nach Pilzkontakt

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* schädigen. NK-Zellen stehen für ihre zytotoxische Aktivität zwei Mechanismen zur Verfügung, nämlich Apoptose induzierende Rezeptoren und lösliche zytotoxische Moleküle (siehe Kapitel 1.4.4.).

Die mögliche Beteiligung zytotoxischer Moleküle an der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Expression von CD107a, welches Bestandteil der Membran zytotoxischer Granula der NK-Zellen ist und während des Degranulierungsprozesses an der Zelloberfläche von NK-Zellen detektiert werden kann, untersucht.

Dabei zeigte sich, dass *R. oryzae* Hyphen die Degranulierung der NK-Zellen induzierten, was an einer signifikanten Zunahme CD107a⁺ NK-Zellen in Anwesenheit des Pilzes sichtbar war (Abbildung 3.6; $p = 0,033$).

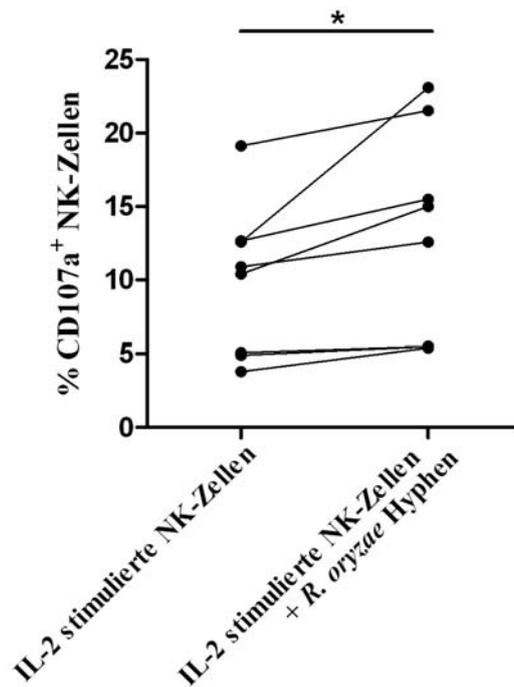


Abbildung 3.6: Degranulierung IL-2 stimulierter NK-Zellen in Gegenwart von *R. oryzae* Hyphen. Die Inkubation IL-2 stimulierter NK-Zellen mit Hyphen von *R. oryzae* induzierte in allen Versuchen die Degranulierung der NK-Zellen, was an der erhöhten Expression von CD107a, welches als Bestandteil der Membran zytotoxischer Granula während des Degranulierungsprozesses an der Zelloberfläche von NK-Zellen präsentiert wird, sichtbar war. Dargestellt sind durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anteile CD107a⁺ NK-Zellen an der gesamten NK-Zellpopulation aus 8 Experimenten mit Zellen 8 verschiedener Individuen. (* $p = 0,033$, gepaarter t-Test)

Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung der in den Granula gespeicherten und nach Stimulation abgegebener löslicher Moleküle an der antimykotischen Aktivität der humanen NK-Zellen gegenüber Hyphen von *R. oryzae* hin.

*Lösliche Faktoren und die antimykotische Aktivität von NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen*

Die Inkubation IL-2 stimulierter NK-Zellen mit Hyphen von *R. oryzae* induziert die Degranulierung der NK-Zellen, was darauf hindeutet, dass lösliche Faktoren an der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen beteiligt sind. Um dies näher zu untersuchen, wurden jeweils Hyphen von *A. fumigatus* und Hyphen von *R. oryzae* im zellfreien Kulturüberstand IL-2 stimulierter NK-Zellen inkubiert und anschließend die Vitalität der Pilze mittels XTT-Assay bestimmt. Die dabei beobachtete Schädigung der Hyphen von *A. fumigatus* (19,9 % \pm 8,1 %) und *R. oryzae* (23,6 % \pm 5,6 %) durch den

Kulturüberstand unterschied sich nicht signifikant von der durch IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelten Schädigung der Hyphen von *A. fumigatus* (26,3 % ± 2,8 %, $p = 0,48$) und *R. oryzae* (35,5 % ± 2,1 %, $p = 0,086$). Dies deutet darauf hin, dass NK-Zellen lösliche Moleküle mit antimykotischer Wirkung produzieren und sezernieren, und diese die Schädigung der Pilze vermitteln (Abbildung 3.7).

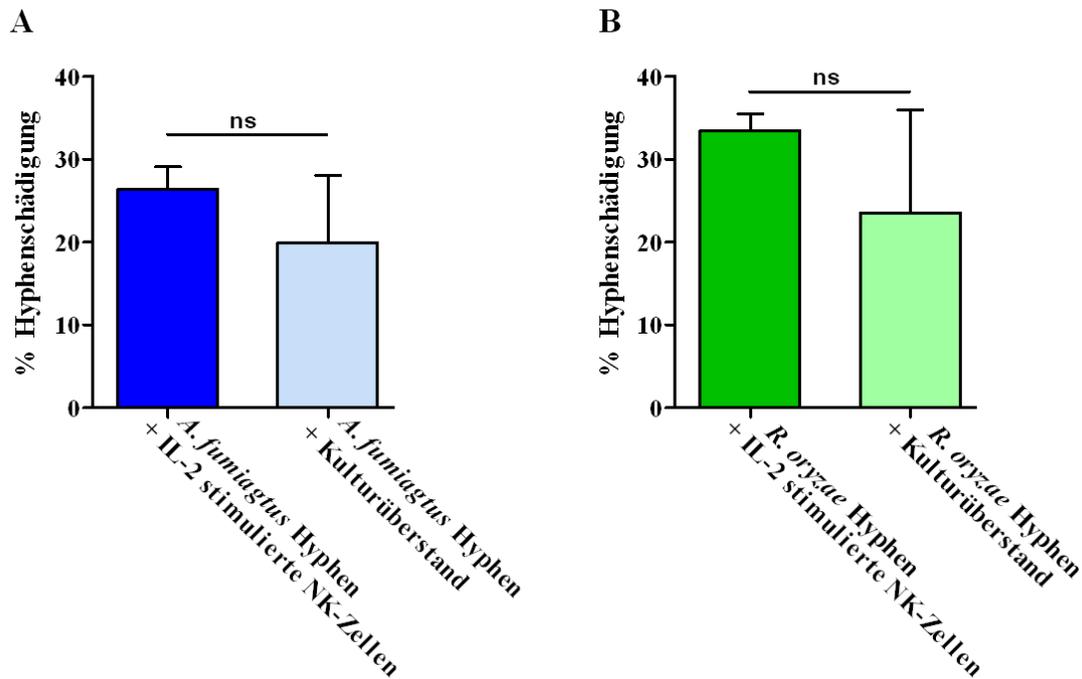


Abbildung 3.7: Schädigung von *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen durch Kulturüberstand IL-2 stimulierter NK-Zellen. Zellfreier Kulturüberstand IL-2 stimulierter NK-Zellen schädigte Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* in Abwesenheit von NK-Zellen. Dies deutet auf lösliche Moleküle mit antimykotischer Aktivität im Überstand hin. Die Hyphenschädigung wurde aus Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden berechnet, wobei die Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen oder Überstand gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. Dargestellt sind Ergebnissen von jeweils 5 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachansätzen gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (ns = nicht signifikant).

*Zytotoxisches Potential von Perforin gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen*

Die antifungale Wirkung des Kulturüberstandes von IL-2 stimulierten NK-Zellen lässt in Verbindung mit der in Gegenwart von *R. oryzae* Hyphen verstärkten Degranulierung der NK-Zellen darauf schließen, dass die antimykotische Wirkung von NK-Zellen durch lösliche, in den Granula gespeicherte und nach Aktivierung sezernierte Moleküle

vermittelt wird. Eines der wichtigsten zytotoxischen Moleküle der NK-Zellen, welches mit der antitumoralen und antibakteriellen Aktivität der NK-Zellen assoziiert wird, ist Perforin. Eine antimykotische Wirkung dieses Moleküls ist ebenfalls im Zusammenhang mit *Cryptococcus neoformans* beschrieben.

Die Inkubation von *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen mit isoliertem Perforin, welches aus den zytotoxischen Granula der NK-Zelllinie YT gewonnen wurde, führte in Abwesenheit von NK-Zellen zu deutlichen Schädigung der Pilzhyphen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration (Abbildung 3.8). Diese Ergebnisse belegen die zytotoxische Aktivität von Perforin gegenüber Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae*.

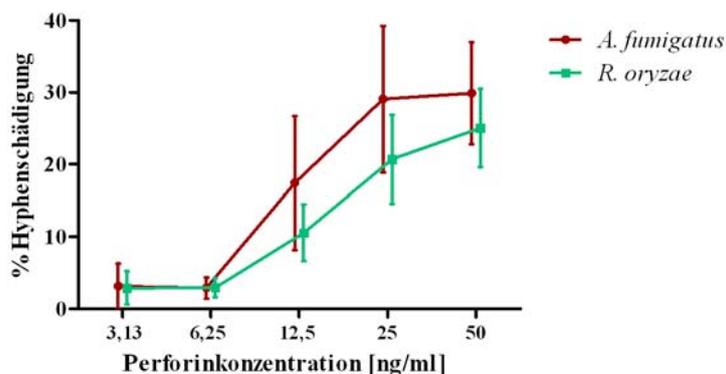


Abbildung 3.8: Isoliertes Perforin schädigt Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae*. Inkubation von *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen mit isoliertem humanen Perforin verschiedener Konzentrationen führte zur konzentrationsabhängigen Schädigung des Pilzes. Die Hyphenschädigung wurde aus der Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden berechnet, wobei die Vitalität der in Abwesenheit von Perforin gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils vier unabhängigen Experimenten, die in jeweils Dreifachansätzen (XTT) gemessen wurden. Punkte stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung.

Perforinsekretion IL-2 stimulierter NK-Zellen nach Pilzkontakt

Die Bestimmung der Perforinkonzentration in den Kulturüberständen IL-2 stimulierter NK-Zellen jeweils in An- und Abwesenheit von Pilzhyphen mittels ELISA zeigte eine Induktion der Perforinsekretion der NK-Zellen durch beide Pilze (Abbildung 3.9). So stieg die Perforinkonzentration in Überständen von ohne Pilz kultivierten NK-Zellen von 17 ng/ml \pm 3 ng/ml auf 32,6 ng/ml \pm 18,7 ng/ml bzw. auf 25,5 ng/ml \pm 5,3 ng/ml

an, wenn die NK-Zellen mit *A. fumigatus* Hyphen bzw. *R. oryzae* Hyphen koinkubiert wurden. Allerdings war dieser Anstieg nicht signifikant.

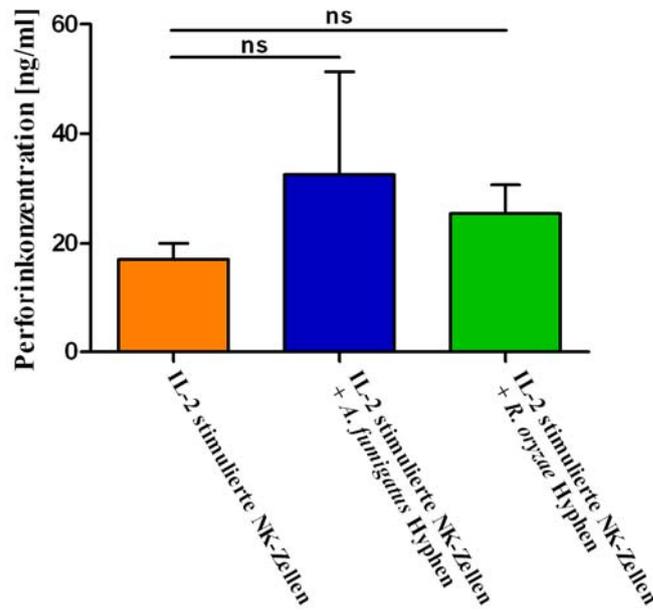


Abbildung 3.9: Perforinkonzentration in Überständen IL-2 stimulierter NK-Zellen in An- und Abwesenheit von *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen. Die Anwesenheit von *A. fumigatus* und *R. oryzae* in Hyphenform induzierte die Sekretion von Perforin durch IL-2 stimulierte NK-Zellen. Dargestellt sind Ergebnissen der Bestimmung der Perforinkonzentration in ng/ml im Überstand von NK-Zellen mittels ELISA von jeweils sechs unabhängigen Experimenten, die in jeweils Doppelansätzen gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (ns = nicht signifikant). Detektionsuntergrenze Perforin: 40 pg/ml.

Perforin und die antimykotische Aktivität humaner NK-Zellen

Die Gegenüberstellung der oben beschriebenen höheren Hyphenschädigung durch IL-2 stimulierte NK-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten NK-Zellen und der jeweiligen Perforinkonzentration im Kulturüberstand dieser Zellen lässt auf einen Zusammenhang zwischen der durch Perforin vermittelten Zytotoxizität und der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen schließen (Abbildung 3.10).

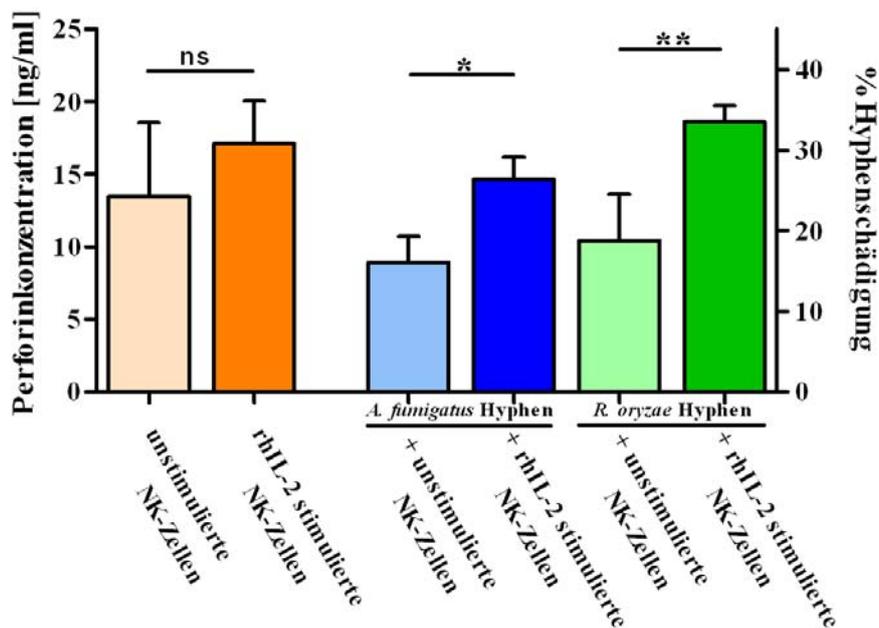


Abbildung 3.10: Zusammenhang zwischen der Sekretion von Perforin durch NK-Zellen und ihrer antimykotischer Aktivität. IL-2 stimulierte NK-Zellen sezernieren im Vergleich zu frisch isolierten und unstimulierten NK-Zellen im gleichen Zeitraum mehr Perforin (linke y-Achse). Gleichzeitig vermitteln IL-2 stimulierte NK-Zellen höhere Schäden gegenüber Hyphen (rechte y-Achse) von *A. fumigatus* (blaue Säulen) und *R. oryzae* (grüne Säulen) verglichen mit frisch isolierten NK-Zellen. Die Bestimmung der Perforinkonzentration im Überstand von NK-Zellen erfolgte mittels ELISA. Die Hyphenschädigung wurde aus Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden bei einem E:T von 20:1 berechnet, wobei die Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens vier unabhängigen Experimenten, die in jeweils Dreifachansätzen (XTT) bzw. jeweils Doppelansätzen (ELISA) gemessen wurden. Die linke y-Achse stellt die Konzentration von Perforin in ng/ml, die rechte y-Achse die Schädigung der Hyphen in % dar. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,043$, ** $p = 0,016$, ns = nicht signifikant). Detektionsuntergrenze Perforin: 40 pg/ml.

Die signifikant höhere antimykotischen Aktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen korreliert mit einer höheren Perforinkonzentration in den Kulturüberständen der mit IL-2 stimulierten NK-Zellen (17 ng/ml \pm 3 ng/ml gegenüber 13,5 ng/ml \pm 5,1 ng/ml, linke Y-Achse). Dies konnte sowohl für *A. fumigatus* (26,3 % \pm 2,8 % gegenüber 16,1 % \pm 3,2 %, rechte Y-Achse; $p = 0,043$) als auch für *R. oryzae* (33,5 % \pm 2,0 % gegenüber 18,8 % \pm 5,8 %, rechte Y-Achse; $p = 0,016$) gezeigt werden.

Gleichzeitig führte die Inhibierung der durch Perforin vermittelten Zytotoxizität von IL-2 stimulierten NK-Zellen mittels Concanamycin A zu einer signifikanten Reduktion der durch NK-Zellen vermittelten Hyphenschädigung von *A. fumigatus* und *R. oryzae* (Abbildung 3.11). Die Vorbehandlung der NK-Zellen mit Concanamycin A reduzierte die Menge des durch IL-2 stimulierten NK-Zellen sezernierten Perforin um etwa 30 % (17 ng/ml \pm 3 ng/ml zu 11,9 ng/ml \pm 2,5 ng/ml, Abbildung 3.11, linke y-Achse). Wenn

auch die Reduktion der Perforinkonzentration keine statistische Signifikanz erreichte, verminderte sich die Schädigung der *A. fumigatus* Hyphen durch die vorbehandelten NK-Zellen um etwa 50 % (26,3 % ± 2,8 % gegenüber 11,2 % ± 2,3 %; $p = 0,002$) und die der *R. oryzae* Hyphen um etwa 30 % (33,5 % ± 2,0 % zu 23,9 % ± 1,9 %; $p = 0,007$) (Abbildung 3.11, rechte Y-Achse) signifikant.

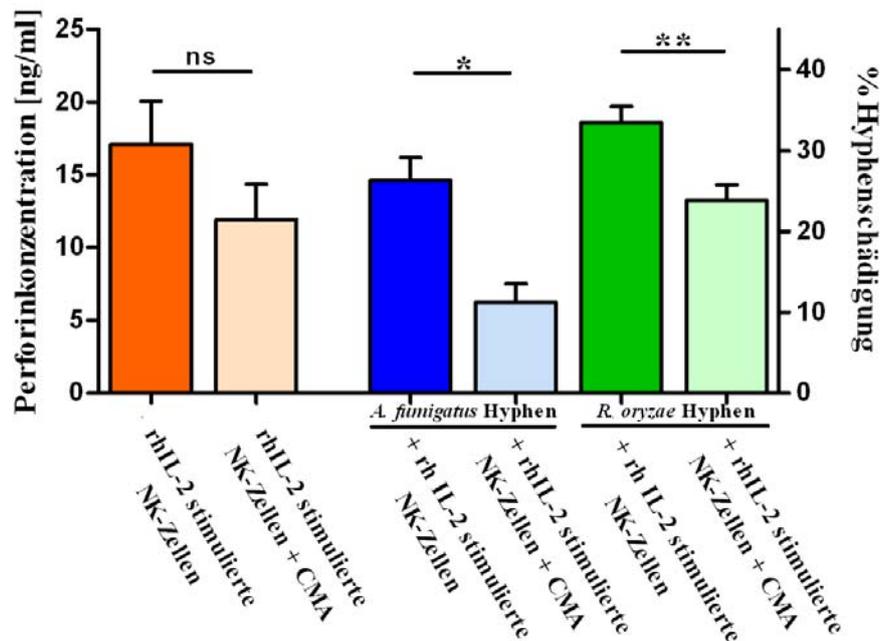


Abbildung 3.11: Concanamycin A vermindert die Sekretion von Perforin und die antimykotische Wirkung IL-2 stimulierter NK-Zellen. Die Inkubation von IL-2 stimulierten NK-Zellen mit Concanamycin A (CMA, 10 nM) führte zu einer reduzierten Konzentration von Perforin in den Überständen der NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten IL-2 stimulierten NK-Zellen (linke y-Achse). Gleichzeitig vermittelten die mit Concanamycin A inkubierten NK-Zellen weniger Hyphenschäden (rechte y-Achse) gegenüber *A. fumigatus* (blaue Säulen) und *R. oryzae* (grüne Säulen). Die Bestimmung der Perforinkonzentration im Überstand von NK-Zellen erfolgte mittels ELISA. Die Hyphenschädigung wurde aus der Bestimmung der Vitalität mittels XTT-Assay nach 6 Stunden bei einem E:T von 20:1 berechnet, wobei Vitalität der in Abwesenheit von NK-Zellen gewachsenen Hyphen als Kontrolle diente. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens vier unabhängigen Experimenten, die in jeweils Dreifachansätzen (XTT) bzw. jeweils Doppelansätzen (ELISA) gemessen wurden. Die linke y-Achse stellt die Konzentration von Perforin in ng/ml, die rechte y-Achse die Schädigung der Hyphen in % dar. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,002$, ** $p = 0,007$, ns = nicht signifikant). Detektionsuntergrenze Perforin: 40 pg/ml.

3.1.5 Einfluss von *A. fumigatus* und *R. oryzae* auf die Zytokinsekretion durch IL-2 stimulierte NK-Zellen

Neben der direkten Eliminierung bösartiger Zellen und verschiedener Pathogene besitzen humane NK-Zellen eine wichtige immunregulatorische Aktivität. So produzieren NK-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen, welche die Regulierung des Immunsystems auf unterschiedlichen Wegen bewirken. Eines der wichtigsten inflammatorischen Zytokine ist IFN- γ , welches vor allem in der frühen Phase einer Infektion durch NK-Zellen zur Verfügung gestellt wird. Des Weiteren produzieren NK-Zellen GM-CSF und RANTES, die die Differenzierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks in Granulozyten und Makrophagen regulieren bzw. der Chemotaxis von T-Zellen dienen.

Zur Untersuchung einer möglichen Wirkung der Pilze auf humane NK-Zellen wurde die Sekretion der genannten Moleküle durch NK-Zellen analysiert. Dabei wurden die NK-Zellen entweder in Ab- oder Anwesenheit von *A. fumigatus* und *R. oryzae* verschiedener Morphologie (Konidien und Hyphen) kultiviert. Es zeigte sich, dass die Konzentration von IFN- γ von 2023 pg/ml \pm 419 pg/ml im Überstand von NK-Zellen, die ohne Pilz inkubiert wurden, durch die Anwesenheit von *A. fumigatus* Hyphen auf 826 pg/ml \pm 207 pg/ml signifikant erniedrigt wurde ($p = 0,01$, Abbildung 3.12 A). Nicht signifikant, aber dennoch deutlich wurde auch die Konzentration von GM-CSF in den Überständen von NK-Zellen, die in Gegenwart von *A. fumigatus* Hyphen inkubiert wurden, gegenüber den ohne Pilz inkubierten NK-Zellen von 1520 pg/ml \pm 144 pg/ml auf 1018 pg/ml \pm 426 pg/ml erniedrigt ($p = 0,31$; Abbildung 3.12 B). Die Konidien von *A. fumigatus* erniedrigten die Konzentration von IFN- γ von 2023 pg/ml \pm 419 pg/ml auf 1437 pg/ml \pm 384 pg/ml diskret, jedoch nicht signifikant ($p = 0,47$; Abbildung 3.12 A), und bewirkten keine nennenswerte Änderung der GM-CSF Konzentration in den Überständen von NK-Zellen (1520 pg/ml \pm 144 pg/ml auf 1767 pg/ml \pm 278 pg/ml, $p = 0,46$; Abbildung 3.12 B). Die Konzentration von RANTES in den Überständen von NK-Zellen, die in Abwesenheit des Pilzes inkubiert wurden (3631 pg/ml \pm 281 pg/ml), wurde weder durch Hyphen (3404 pg/ml \pm 84 pg/ml, $p = 0,84$) noch durch Konidien (3563 pg/ml \pm 178 pg/ml, $p = 0,48$) von *A. fumigatus* beeinflusst (Abbildung 3.12 C).

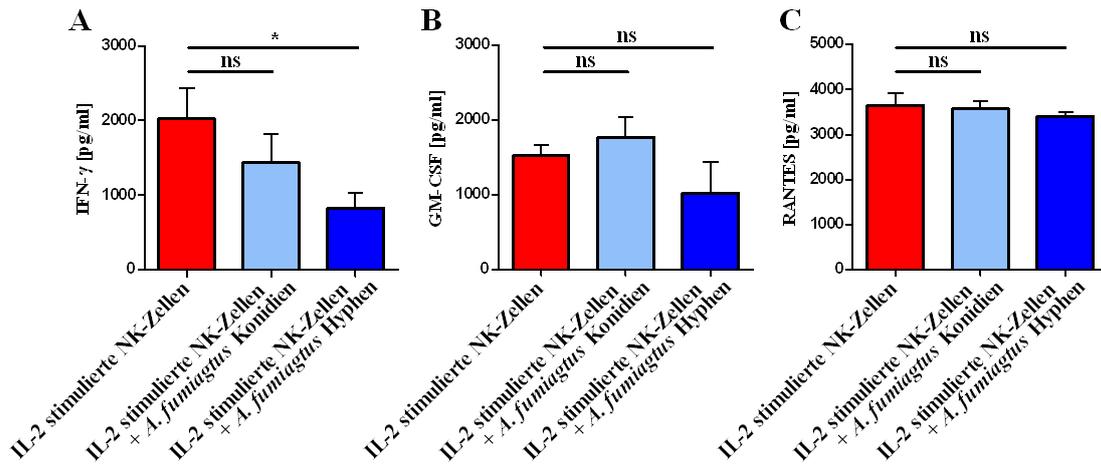


Abbildung 3.12: Einfluss von *A. fumigatus* auf die Zytokinkonzentration in Überständen von IL-2 stimulierten NK-Zellen. Während Hyphen von *A. fumigatus* die Konzentration von IFN- γ signifikant reduzierten (A), wurde die Konzentration von GM-CSF von ihrer Anwesenheit nur diskret beeinflusst (B). Konidien von *A. fumigatus* erniedrigten leicht die Konzentration von IFN- γ (A) und erhöhten marginal die Konzentration von GM-CSF, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren (B). Die Konzentration von RANTES wurde weder von Konidien noch von Hyphen des Pilzes nennenswert beeinflusst (C). Dargestellt sind Ergebnisse der Zytokinkonzentration in pg/ml im Überstand von fünf Experimenten mit NK-Zellen fünf verschiedener Individuen, die mittels ELISA bestimmt wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,01$, ns = nicht signifikant). Detektionsuntergrenzen: IFN- γ 4 pg/ml, GM-CSF 7,8 pg/ml, RANTES 31,2 pg/ml.

Analog zu den Effekten von *A. fumigatus* konnte ebenfalls ein negativer Einfluss von *R. oryzae* auf die die Zytokinsekretion von IL-2 stimulierten NK-Zellen beobachtet werden. Die Inkubation mit *R. oryzae* Hyphen hatte eine Erniedrigung der Konzentration von IFN- γ im Überstand von IL-2 stimulierten NK-Zellen um mehr als 50 % zur Folge, was jedoch statistisch nicht signifikant war. So betrug die Konzentration des von NK-Zellen in Abwesenheit des Pilzes sezernierten IFN- γ 258 pg/ml \pm 142 pg/ml, während diese in Anwesenheit des Pilzes 86 pg/ml \pm 64 pg/ml betrug ($p = 0,32$; Abbildung 3.13 A). Deutlich, jedoch nicht signifikant wurde ebenfalls die Konzentration von RANTES um fast 50 % von 2930 pg/ml \pm 400 pg/ml auf 1637 pg/ml \pm 455 pg/ml in den Überständen von NK-Zellen durch *R. oryzae* Hyphen erniedrigt ($p = 0,07$; Abbildung 3.13 C). Konidien von *R. oryzae* erniedrigten die Konzentration von IFN- γ im Überstand leicht von 258 pg/ml \pm 142 pg/ml auf 213 pg/ml \pm 102 pg/ml ($p = 0,81$; Abbildung 3.13 A). Die Konzentration von RANTES wurde durch die Konidien nicht beeinflusst (2930 pg/ml \pm 400 pg/ml zu 2681 pg/ml \pm 595 pg/ml; $p = 0,74$; Abbildung 3.13 C). Die Konzentration von GM-CSF

von 693 pg/ml \pm 355 pg/ml in den Überständen der NK-Zellen, die in Abwesenheit von *R. oryzae* inkubiert wurden, erhöhte sich nicht nennenswert durch die Anwesenheit von *R. oryzae* Konidien auf 856 pg/ml \pm 438 pg/ml ($p = 0,77$), und wurde durch die Gegenwart von *R. oryzae* Hyphen nicht beeinflusst (693 pg/ml \pm 355 pg/ml zu 626 pg/ml \pm 393 pg/ml, $p = 0,92$; Abbildung 3.13 B).

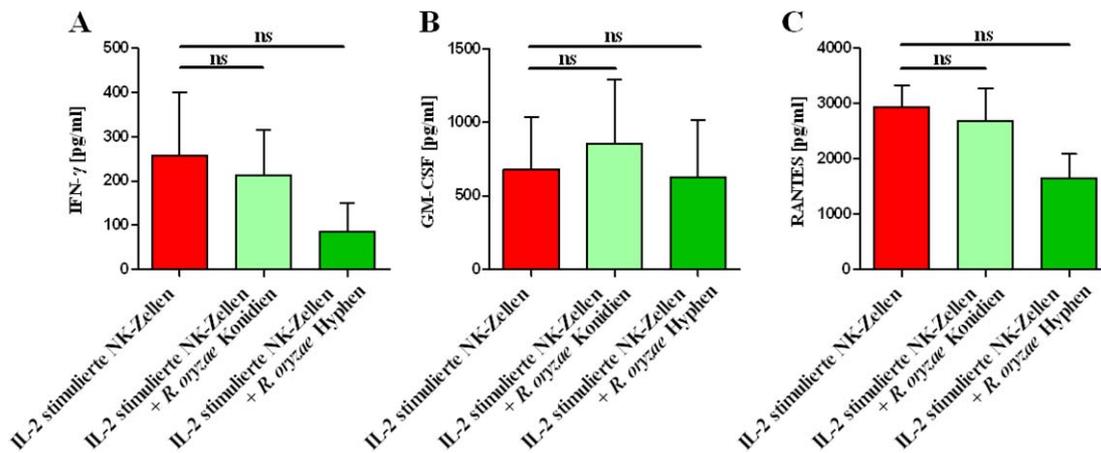


Abbildung 3.13: Einfluss von *R. oryzae* auf die Zytokinkonzentration in Überständen von IL-2 stimulierten NK-Zellen. Hyphen von *R. oryzae* hatten einen deutlichen negativen Effekt auf die Konzentration von IFN- γ (A) und RANTES (C) im Überstand von IL-2 stimulierten NK-Zellen, auch wenn diese Effekte statistisch nicht signifikant waren. Konidien von *R. oryzae* erniedrigten leicht die Konzentration von IFN- γ (A) und erhöhten marginal die Konzentration von GM-CSF (B). Die Konzentration von GM-CSF wurde durch Hyphen von *R. oryzae* (B), die Konzentration von RANTES durch Konidien von *R. oryzae* (C) nicht beeinflusst. Dargestellt sind Ergebnisse der Zytokinkonzentration in pg/ml im Überstand von fünf Experimenten mit NK-Zellen fünf verschiedener Individuen, die mittels ELISA bestimmt wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (ns = nicht signifikant). Detektionsuntergrenzen: IFN- γ 4 pg/ml, GM-CSF 7,8 pg/ml, RANTES 31,2 pg/ml.

Die Untersuchung der Zytokinsekretion durch IL-2 stimulierte NK-Zellen in Gegenwart von *A. fumigatus* und *R. oryzae* deuten auf einen möglichen immunsupprimierenden Effekt der Hyphen beider Pilze hin. So wird die IFN- γ -Sekretion durch die NK-Zellen in Anwesenheit von Hyphen beider Pilze reduziert, während die GM-CSF-Sekretion nur durch *A. fumigatus* Hyphen, und die Sekretion von RANTES nur durch Hyphen von *R. oryzae* negativ beeinflusst wird.

3.1.6 Einfluss von *A. fumigatus* und *R. oryzae* auf die Vitalität humaner IL-2 stimulierter NK-Zellen

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der Pilze auf die Zytokinproduktion der NK-Zellen auf eine mögliche Reduktion der Vitalität der NK-Zellen zurückzuführen sind, wurde diese durchflusszytometrisch mittels 7-Aminoactinomycin (7-AAD) Färbung der NK-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt hat die Anwesenheit von *A. fumigatus* und *R. oryzae* keinen Einfluss auf die Vitalität der NK-Zellen, unabhängig von der Morphologie der Pilze (Hyphen, Konidien). So betrug die Vitalität der ohne Pilz inkubierten NK-Zellen $91 \% \pm 1,5 \%$, der NK-Zellen inkubiert in Gegenwart von *A. fumigatus* Hyphen bzw. Konidien $91,2 \% \pm 1,2 \%$ bzw. $90 \% \pm 1,5 \%$, und der NK-Zellen inkubiert in Gegenwart von *R. oryzae* Hyphen bzw. Konidien $90,2 \% \pm 1,4 \%$ bzw. $90,9 \% \pm 1,2 \%$.

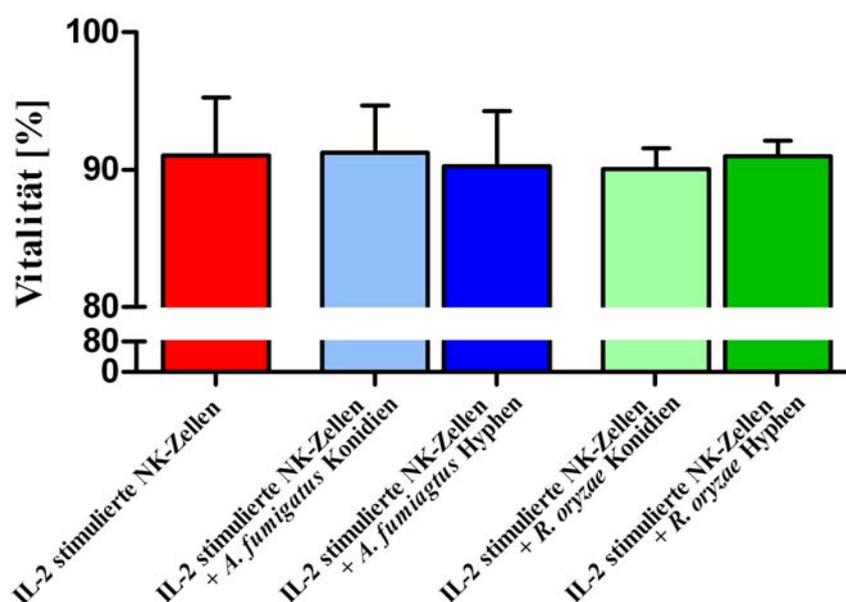


Abbildung 3.14: Einfluss von *A. fumigatus* und *R. oryzae* auf die Vitalität IL-2 stimulierter NK-Zellen. Weder *A. fumigatus* noch *R. oryzae* Hyphen oder Konidien hatten einen Einfluss auf die Vitalität IL-2 stimulierter NK-Zellen. Dargestellt sind Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Vitalität IL-2 stimulierter NK-Zellen mittels 7-Aminoactinomycin (7-AAD) Färbung aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten mit Zellen 6 verschiedener Spender. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf den prozentualen Anteil 7-AAD⁻ Zellen in der gesamten CD56⁺CD3⁻ NK-Zellpopulation, der den vitalen Zellen entspricht. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* auf die NK-Zellen nicht auf eine verminderte Vitalität der NK-Zellen zurückzuführen ist, sondern auf anderen Mechanismen basiert.

3.2 Generierung und Charakterisierung von anti-*R. oryzae* T-Zellen

3.2.1 Isolierung und Expansion von anti-*R. oryzae* T-Zellen

Die Therapie invasiver Pilzkrankungen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit pilzspezifischen Spender-T-Zellen setzt voraus, dass der Spender in seinem peripheren Blut T-Zellen gegen den spezifischen Erreger hat.

Um das Vorhandensein von gegen *R. oryzae* gerichteten T-Zellen im peripheren Blut zu analysieren, wurde die Produktion von IFN- γ als Antwort von CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten auf die Stimulation mit *R. oryzae* Antigenen sowie die Aktivierung dieser Zellen anhand des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD154 durchflusszytometrisch untersucht. Bei allen untersuchten Spendern konnten aktivierte und IFN- γ produzierende anti-*R. oryzae* T-Zellen nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich, war der prozentuale Anteil der auf die Stimulation mit Antigenen von *R. oryzae* reagierenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen gering, wobei der Anteil CD154⁺ Zellen im Median mit 0,33 % (Intervall 0,13 % - 3,76 %) geringfügig höher als der der IFN- γ produzierenden Zellen mit 0,21 % (Intervall 0,1 % - 1,22 %) war.

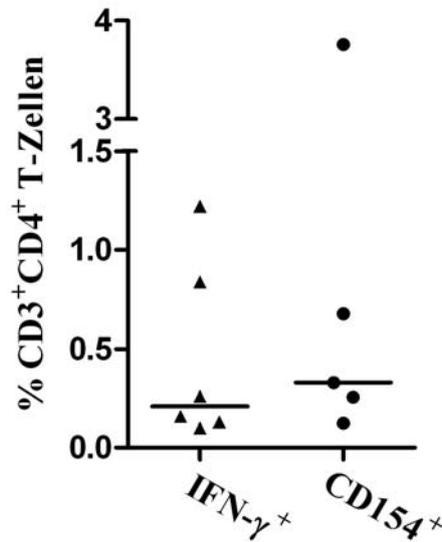


Abbildung 3.15: Frequenz anti-*R. oryzae* T-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen. In allen untersuchten Spendern ohne vorherige Pilzinfektion konnten anhand der Ausschüttung von IFN- γ und der Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD154 *R. oryzae*-spezifische CD3 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit Antigenen des Pilzes nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil IFN- γ^+ und CD154 $^+$ Zellen an der CD3 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellpopulation, der durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Der Nachweis IFN- γ^+ Zellen erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (*intracellular cytokine staining*, ICC). Als Referenzwert dienten unstimulierte CD3 $^+$ CD4 $^+$ Lymphozyten des peripheren Blutes. Die Punkte stellen einzelne Messwerte, die Querbalken den Median aller Messungen dar. n = 6 für IFN- γ ; n = 5 für CD154.

Trotz der niedrigen Frequenz der auf die Antigene antwortenden Zellen konnten mit Hilfe der in Kapitel 2.2.5 beschriebenen zweistufigen Herstellungsmethode im Durchschnitt aus 1×10^8 eingesetzten PBMZ letztendlich 5×10^7 (Intervall $2,8 - 7 \times 10^7$) *R. oryzae*-spezifischer T-Zellen generiert werden. Die nach dem jeweiligen Schritt erhaltenen Zellzahlen können der Tabelle 3.1 entnommen werden.

	Gesamtzellzahl [$\times 10^6$]	
	Median	Intervall
nach CD154-Selektion	1,65	1-2,16
nach 1. Expansion	25	21-70
nach IFN-γ-Selektion	1,05	0,3-3,6
nach 2. Expansion (REP)	50,7	28-70

Tabelle 3.1: Expansion der isolierten anti-*R. oryzae* Zellen. Die im peripheren Blut in geringer Zahl vorliegende *R. oryzae*-spezifische Zellen wurden mittels zweier Selektionsverfahren, denen jeweils eine Expansionsphase folgten, isoliert und auf $28-70 \times 10^6$ Zellen expandiert. Im ersten Schritt, der CD154-Selektion wurden alle nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenen aktivierten Zellen, die CD154 auf ihrer Oberfläche präsentierten, isoliert und diese anschließend expandiert. In einem zweiten Isolationsschritt wurden die nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenen IFN- γ sezernierende Zellen isoliert und anschließend mit Hilfe des schnellen Expansionsprotokolls für T-Zellen (*rapid expansion protocol for T cells*, REP) expandiert. Die Tabelle fasst die durchschnittlichen Zellzahlen (Median), die nach dem jeweiligen Schritt bestimmt wurden, sowie das Intervall der Zellzahlen (*range*) zusammen. $n = 3$.

3.2.2 Phänotyp der generierten Zellpopulation

Die durchflusszytometrische Analyse der generierten Zellpopulation zeigte, dass es sich bei der generierten Zellpopulation dem Phänotyp nach hauptsächlich um CD3⁺CD4⁺ T_{Helfer}-Zellen handelt (Tabelle 3.2). Im Durchschnitt enthielt die nach der zweiten Expansion erhaltene Zellpopulation 94,4 % CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (90,1 % - 96,7 %). Zytotoxische CD3⁺CD8⁺ T-Zellen mit durchschnittlich 2,5 % (0,2 % - 4,8 %) fanden sich kaum. Der Anteil Natürlicher Killer Zellen (CD56⁺CD3⁻) betrug durchschnittlich 1 % (0 % - 2 %), der Natürlichen Killer Zellen ähnlichen T-Zellen (*Natural Killer-like T cells*; CD56⁺CD3⁺) durchschnittlich 0,6 % (0,2 % - 1,2 %). Der prozentuale Anteil von CD3⁻CD19⁺ B-Zellen an der generierten Zellpopulation lag in allen 3 Läufen unter 0,1 %. Somit stellten die generierten Zellen eine hoch angereicherte T_{Helfer}-Population dar.

	% CD45 ⁺ Lymphozyten				
	<i>T_{Helfer}</i> -Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	<i>T_{Zytotoxisch}</i> -Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	B-Zellen (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	NKT-Zellen (CD56 ⁺ CD3 ⁺)	NK-Zellen (CD56 ⁺ CD3 ⁻)
#1	96,7	0,2	> 0,1	0,5	0,9
#2	96,3	2,4	> 0,1	1,2	2
#3	90,1	4,8	> 0,1	0,2	> 0,1
<i>o</i>	94,4	2,5	> 0,1	0,6	1

Tabelle 3.2: Phänotypische Charakterisierung der generierten Zellpopulation. Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der generierten Zellen zeigte, dass durchschnittlich 94,4 % (Intervall 90,1 % - 96,7 %) der Lymphozyten der T_{Helfer}-Population zugeordnet werden können. Die generierte Zellpopulation enthielt zudem durchschnittlich 2,5 % zytotoxische T-Zellen (Intervall 0,2 % - 4,8 %), 0,6 % NKT-Zellen (Intervall 0,2 % - 1,2 %) und 1 % NK-Zellen (Intervall 0 % - 2 %). Der prozentuale Anteil von B-Zellen an der generierten Zellpopulation lag in allen 3 Läufen unter 0,1 %.

3.2.3 Zytokinproduktion nach Restimulierung durch die generierte Zellpopulation

Es ist bekannt, dass bei der Abwehr von Pilzen insbesondere T_{H1}-Zellen, die durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α charakterisiert sind, eine entscheidende Rolle spielen. Dahingegen haben T_{H2}-Zellen, charakterisiert durch die Produktion von IL-4 und IL-10, einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer Pilzinfektion (Kapitel 1.3.3).

Die hoch angereicherte T_{Helfer}-Population produzierte unter Stimulation mit autologen *R. oryzae*-Antigene präsentierenden APZ die Zytokine IFN- γ und TNF- α . Die in Abbildung 3.16 dargestellten Werte zeigen den prozentualen Anteil der jeweils IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ Zellen an der generierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellpopulation. So produzierten zum Zeitpunkt der Analyse im Durchschnitt 10,5 % (1,5 % - 26,6 %) der Zellen IFN- γ und 15,2 % (3,4 % - 34,5 %) TNF- α . Der Anteil IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ Zellen nach Koinkubation mit unbeladenen autologen APZ wurde bei den dargestellten Werten bereits als Negativkontrolle berücksichtigt (n = 6, alle < 0,2 %).

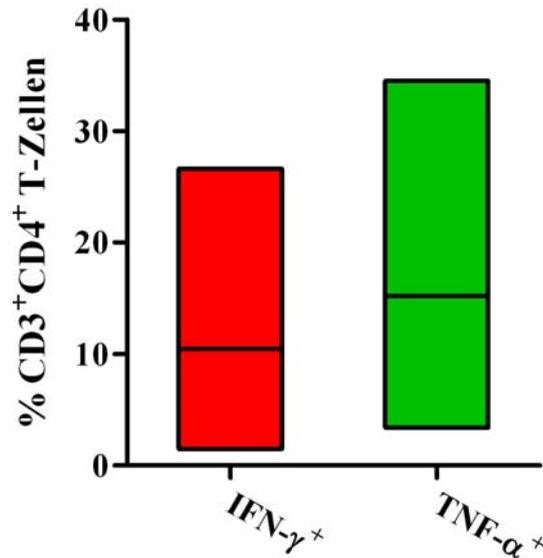


Abbildung 3.16: Anteil von IFN- γ und TNF- α produzierender CD3⁺CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenen. Nach Antigenkontakt produzierten die generierten Zellen die wichtigen proinflammatorischen Zytokine IFN- γ (rot) und TNF- α (grün). Dargestellt sind Ergebnisse der intrazellulären Bestimmung der zum Zeitpunkt der Analyse IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie in jeweils 6 unabhängigen Experimenten mit Zellen dreier verschiedener Spender. Die Säulen stellen das Intervall aller Messungen dar, die Balken den Mittelwert.

Zu beachten ist, dass in Abbildung 3.16 dargestellte Werte wahrscheinlich nicht dem tatsächlichen Anteil IFN- γ und TNF- α produzierender Zellen widerspiegeln. Da die Stimulation der Zellen sowie die Induktion der Akkumulation der Zytokine in den Zellen zeitlich begrenzt ist, lassen sich mit dieser Methode nur die Zellen detektieren, die in der Dauer des Experiments die gesuchten Zytokine produzierten und sie zudem in einer bestimmten Mindestkonzentration beinhalten. Zellen, die zum Zeitpunkt der Messung zwar aktiviert sind, aber nicht eine für die Detektion ausreichende Menge an Zytokinen akkumuliert haben, können mittels dieser Methode nicht detektiert werden. Eine nicht physiologische Stimulation mit Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) in Kombination mit Ionomycin induzierte in über 99 % der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen der generierten Zellpopulation die Produktion von IFN- γ und TNF- α .

Neben dem Anteil IFN- γ und TNF- α produzierender Zellen wurde weiterhin die Sekretion von IFN- γ und TNF- α durch die generierten T-Zellen nach Restimulation durch die Bestimmung der jeweiligen Zytokinkonzentration in den Überständen untersucht (Abbildung 3.17).

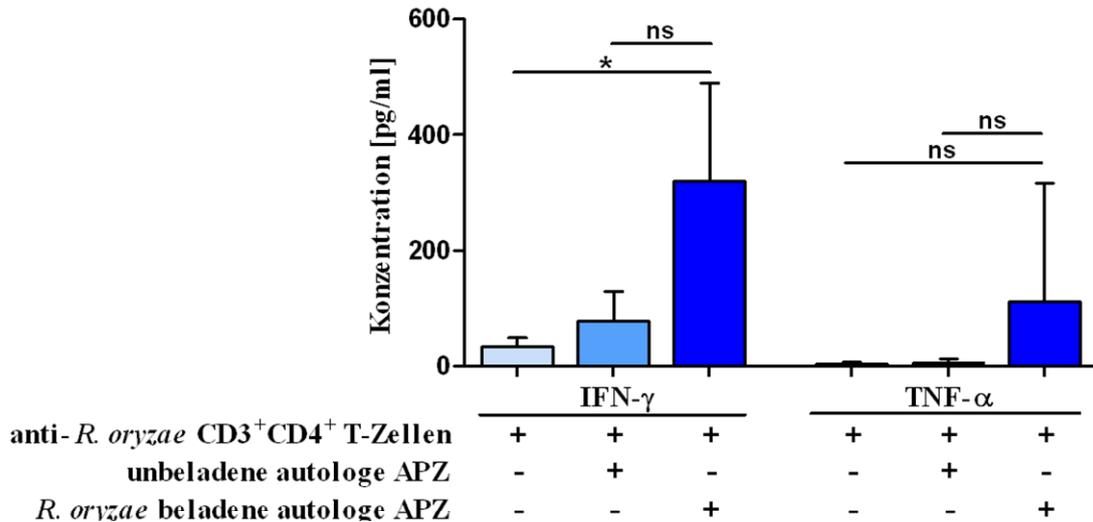


Abbildung 3.17: Sekretion von IFN- γ und TNF- α durch die generierten T-Zellen nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen. Die generierten T-Zellen sezernierten in Abwesenheit eines spezifischen Stimulus nur geringe Mengen IFN- γ und TNF- α . Die Inkubation der Zellen mit unbeladenen autologen APZ beeinflusste kaum die Sekretion von IFN- γ oder TNF- α . Wurden die generierten T-Zellen jedoch durch *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden APZ stimuliert, führte es zu einer deutlichen Sekretion der beiden Zytokine. Dargestellt sind Ergebnissen von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus 3 verschiedenen Selektionsläufen, die in jeweils Doppelbestimmung (ELISA) gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,043$, ns = nicht signifikant). APZ = Antigenpräsentierende Zelle. Detektionsuntergrenzen: IFN- γ und TNF- α 4 pg/ml.

Die generierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellen sekretierten in Abwesenheit eines Stimulus durch APZ relativ geringe Mengen IFN- γ (32,5 pg/ml \pm 9,6 pg/ml) und TNF- α (2,8 pg/ml \pm 2,2 pg/ml). Die Koinkubation mit autologen, jedoch unbeladenen APZ erhöhte die Sekretion von IFN- γ auf 77,9 pg/ml \pm 29,8 pg/ml ($p = 0,22$) und TNF- α auf 5,8 pg/ml \pm 3,7 pg/ml ($p = 0,5$) nicht signifikant. Stimulierte man dagegen die generierten Zellen mit autologen APZ, die *R. oryzae*-Antigene präsentieren, stieg die Sekretion von IFN- γ auf ein signifikant höheres Niveau von 319,7 pg/ml \pm 97,9 pg/ml ($p = 0,043$). Auch die Sekretion von TNF- α wurde durch die Anwesenheit von autologen *R. oryzae*-Antigene präsentierenden APZ auf 111,9 pg/ml \pm 102,2 pg/ml deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht ($p = 0,34$). Diese Steigerung der Sekretion beider Zytokine steht im Einklang mit der durchflusszytometrischen Erfassung IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ Zellen in der generierten T-Zellpopulation (siehe Abbildung 3.16).

Weder durchflusszytometrisch noch mittels ELISA konnte eine Produktion von IL-4 oder IL-10 nachgewiesen werden, was auf einen T_H1-Typ der generierten T-Zellen, nicht jedoch auf einen T_H2-Typ, hinweist.

3.2.4 Proliferation der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen

Neben der durch einen spezifischen Stimulus induzierten Produktion von Zytokinen ist die Proliferationsfähigkeit der generierten Zellen nach deren Infusion in einen Patienten wichtig. Durch die natürliche Expansion der infundierten Zellen nach Antigenkontakt im Patienten ließe sich der Effekt der Therapie steigern, ohne die Notwendigkeit eine höhere Zellzahl gleich zum Therapiebeginn einzusetzen. Wie die folgende Abbildung 3.18 zeigt, vermehrten sich die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen *in vitro* zwar auch in Abwesenheit eines Stimulus, die Proliferation nahm jedoch nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen sichtlich zu, erkennbar an der Abnahme des CFSE-Signals. So war der Anteil CFSE⁻CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt im Vergleich zu unstimulierten Zellen um bis zu 90 % (44 %, 88 %, 92 %) erhöht. Im Gegensatz dazu induzierte die Inkubation der generierten Zellen mit autologen und unbeladenen Antigenpräsentierenden Zellen die Proliferation nicht, beziehungsweise nur geringfügig. Hier nahm der Anteil CFSE⁻CD3⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 20 % (0 %, 14 %, 20 %) zu.

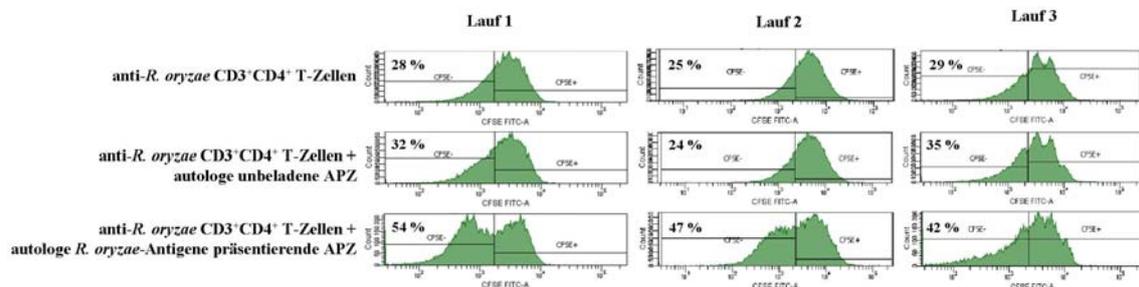


Abbildung 3.18: Proliferation der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen nach Restimulation. Während die Stimulation mit unbeladenen APZ nicht nennenswert die Proliferation der anti-*R. oryzae* T-Zellen induzierte (mittlere Reihe), nahm diese nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigene präsentierenden APZ (untere Reihe) deutlich gegenüber der Kontrolle (obere Reihe) zu. Dargestellt sind Ergebnisse der durchflusszytometrischen Auswertung des CFSE-Proliferationsassay. Die Prozentangaben beziehen sich auf CFSE⁻ Zellen, welche die Proliferation anzeigen. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus 3 verschiedenen Selektionsläufen. APZ = Antigenpräsentierende Zelle

3.2.5 Alloreaktives Potential der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen

Da zwei der wesentlichen Merkmale der GvHD die Proliferation von T-Zellen und die Zytokinausschüttung (z.B. IFN- γ) sind, wurden diese Merkmale bei der *in vitro* Analyse des alloreaktiven Potentials der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Proliferation sowie die IFN- γ -Sekretion der generierten T-Zellpopulation nach Stimulation mit allogenen Zellen (Fremdzellen) getestet. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, zeigten die generierten T-Zellen bei Kontakt mit allogenen APZ zwar eine geringe Proliferationsantwort (Steigerungsfaktor 1,1, 0,9 und 1,2), der Anteil CFSE⁻ CD3⁺CD4⁺ T-Zellen entsprach jedoch dem mit autologen, unbeladenen APZ stimulierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (vgl. Abbildung 3.18 oben und Abbildung 3.18 unten). Im Gegensatz dazu reagierten unselektionierte CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit allogenen APZ deutlich stärker. Hier stieg der Anteil CFSE⁻CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in der Gesamtpopulation auf über das 10-fache der unstimulierten Kontrolle (Faktor 13,5, 7,5 und 4,3), was auf eine hohe Alloreaktivität dieser Zellen schließen lässt.

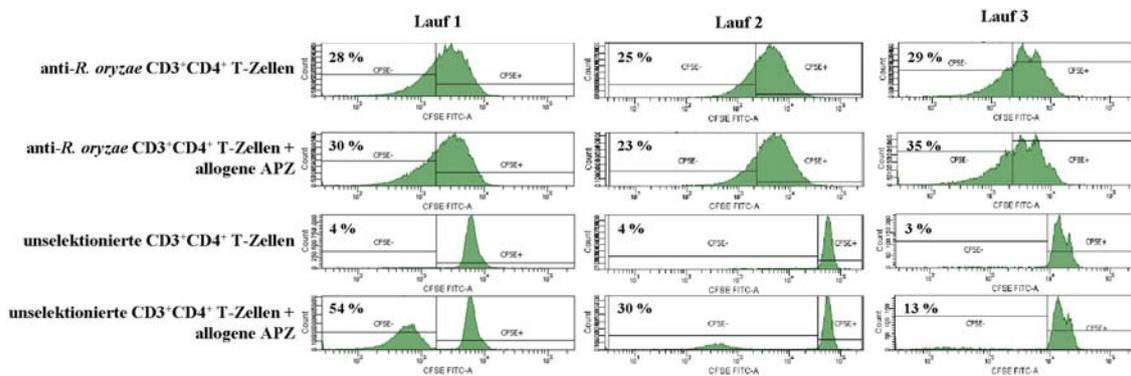


Abbildung 3.19: Alloreaktives Potential der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen. Während unselektionierte CD3⁺CD4⁺ T-Zellen deutlich auf unspezifische Stimulation durch allogene Zellen mit Proliferation reagieren (untere zwei Reihen), unterscheidet sich die Proliferation der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen in Ab- und Anwesenheit allogener Antigenpräsentierende Zelle (APZ) kaum (obere zwei Reihen). Lediglich die Zellen des dritten Laufes weisen eine leicht erhöhte Proliferation in Anwesenheit allogener APZ auf, während gleichzeitig die unselektionierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellen eine nur geringe Reaktion auf den allogenen Stimulus zeigen. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Auswertung des CFSE-Proliferationsassays. Die Prozentangaben beziehen sich auf CFSE⁻ Zellen, welche die Proliferation anzeigen. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus 3 verschiedenen Selektionsläufen. APZ = Antigenpräsentierende Zelle

Entsprechende Resultate zeigten sich bei Betrachtung der IFN- γ Sekretion der jeweiligen Population mittels ELISA (Abbildung 3.20). Die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen sezernierten in Abwesenheit eines Stimulus 21 pg/ml \pm 3,4 pg/ml IFN- γ in den Überstand. Die Stimulation mit Fremdspender-APZ beeinflusste dies kaum; die Menge des IFN- γ im Überstand der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen in Anwesenheit von allogenen APZ stieg unsignifikant auf 34,6 pg/ml \pm 5,5 pg/ml ($p = 0,058$). Unselektionierte CD3⁺CD4⁺ T-Zellen reagierten dagegen sehr stark auf einen unspezifischen allogenen Stimulus durch Fremdspender-APZ; hier stieg die Menge von IFN- γ im Überstand von 37,4 pg/ml \pm 54,6 pg/ml in Abwesenheit von allogenen Zellen signifikant auf 206,8 pg/ml \pm 32,9 pg/ml in Anwesenheit von Fremdspender-APZ ($p = 0,031$).

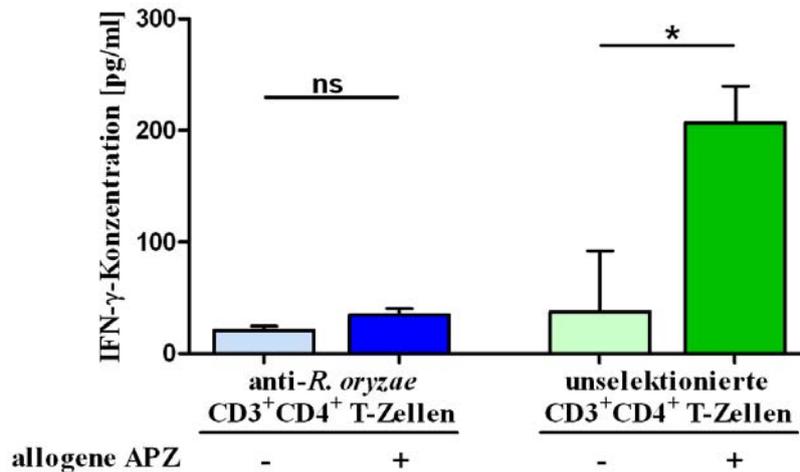


Abbildung 3.20: Sekretion von IFN- γ durch die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen und durch unselektionierte T-Zellen nach Stimulation mit allogenen APZ. Die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen sezernierten in Anwesenheit allogenen APZ nur geringe Mengen IFN- γ , was auf ein geringes allogen Potential dieser Zellen hinweist. Unselektionierte T-Zellen dagegen sezernierten nach Koinkubation mit allogenen APZ große Mengen IFN- γ , und zeigten ein großes allogen Potential. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus 3 verschiedenen Selektionsläufen, die jeweils in Doppelbestimmungen (ELISA) gemessen wurden. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,031$, ns = nicht signifikant). APZ = Antigenpräsentierende Zelle. Detektionsuntergrenzen: IFN- γ 4 pg/ml.

Die Ergebnisse der Proliferation und der Zytokinausschüttung zeigen, dass die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen zumindest *in vitro* ein deutlich geringeres alloreaktives Potential als unselektionierte T-Zellen haben.

3.2.6 Einfluss von anti-*R. oryzae* T-Zellen auf die Aktivität von Phagozyten

Bei invasiven Pilzinfektionen spielen Zellen des angeborenen Immunsystems, die zur Phagozytose der Erreger fähig sind, eine entscheidende Rolle. Diese werden durch verschiedene Zytokine, die zum einem großen Teil durch T-Zellen zur Verfügung gestellt werden, aktiviert und so die antimykotische Aktivität wie Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle (oxidativer Burst) stimuliert.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass die generierten T-Zellen nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenen pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Um zu überprüfen, ob die produzierten Zytokine auch einen tatsächlich stimulierenden Einfluss auf die Funktion von Phagozyten haben, wurden Granulozyten und Monozyten mit den Überständen der generierten T-Zellen stimuliert, die zuvor entweder mit unbeladenen APZ, mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen, oder aber in Abwesenheit von Antigenpräsentierenden Zellen inkubiert wurden. Anschließend wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle durch die eingesetzten Granulozyten und Monozyten durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.21). Dabei zeigte sich, dass der prozentuale Anteil oxidierender Granulozyten und Monozyten nach Stimulation mit Überständen der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen, die ihrerseits mit Antigenen von *R. oryzae* stimuliert wurden, sich im Vergleich zu unstimulierten Granulozyten und Monozyten von $1,57 \% \pm 1,28 \%$ auf $7,83 \% \pm 3,04 \%$ ($p = 0,001$; Abbildung 3.21 A), beziehungsweise von $0,97 \% \pm 0,53 \%$ auf $5,73 \% \pm 1,76 \%$ ($p < 0,001$; Abbildung 3.21 B) signifikant erhöhte.

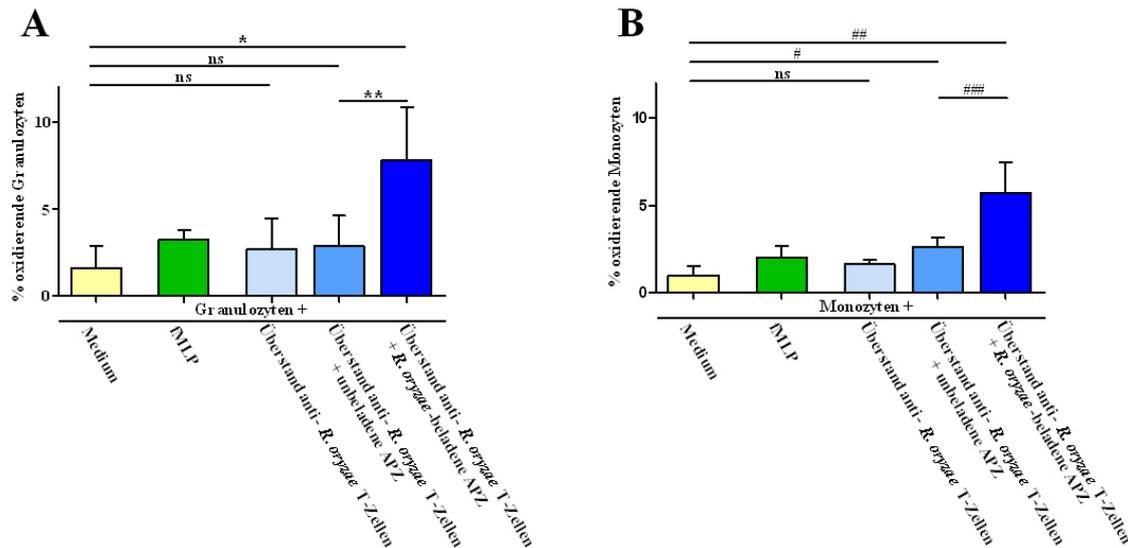


Abbildung 3.21: Einfluss der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen auf Phagozyten. Der Überstand der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen, die zuvor mit *R. oryzae*-Antigene präsentierenden APZ stimuliert wurden, erhöhte signifikant die oxidative Burst-Aktivität von Granulozyten (A) und Monozyten (B). Gleichzeitig bewirkten Überstände der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen, die nicht stimuliert wurden, eine nicht nennenswerte Steigerung des prozentualen Anteils oxidierender Granulozyten und Monozyten im Vergleich zur deren Grundaktivität (Mediumkontrolle). Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) stimuliert, einem physiologischen chemotaktischen Stimulus für Phagozyten. Als Negativkontrolle dienten jeweils unstimulierte Granulozyten und Monozyten, denen nur Medium zugegeben wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit Zellen vier verschiedener Spender. Säulen stellen Mittelwerte aller Messungen dar, Balken die Standardabweichung. (* $p = 0,002$, ** $p = 0,04$, # $p = 0,001$, ### $p < 0,001$, #### $p = 0,015$, ns = nicht signifikant).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen nach Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenen durch APZ Zytokine produzieren und sezernieren, die ihrerseits die Aktivität von für die Pilzabwehr wichtigen Phagozyten wie Granulozyten oder Monozyten, effektiv steigern. Dies belegt die Funktionalität der generierten Zellen *in vitro*.

3.2.7 Kreuzreaktivität der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen gegenüber anderen Pilzen

Da eine Identifizierung des Erregers bei einer invasiven Pilzinfektion in vielen Fällen nicht möglich ist, wäre es von Vorteil, wenn die applizierten T-Zellen auf verschiedene Pilze reagierten und somit eine breite Kreuzreaktivität aufwiesen.

Hierzu wurden die mit Antigenen von *R. oryzae* generierten T-Zellen mit APZ inkubiert, die zuvor jeweils mit Zellextrakten von *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus*, *Rhizomucor pusillus*, *Alternaria alternata*,

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* sowie *Candida glabrata* stimuliert wurden. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ Produktion zeigte, dass die generierte anti-*R. oryzae* CD3⁺CD4⁺ T-Zellpopulation auch durch Antigene von *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* und *Candida glabrata* stimuliert werden konnte und IFN- γ produzierte. Antigene von *Mucor racemosus*, *Rhizomucor pusillus*, *Alternaria alternata* und *Aspergillus flavus* waren dagegen nicht in der Lage die anti-*R. oryzae* T-Zellen zu stimulieren (Abbildung 3.22).

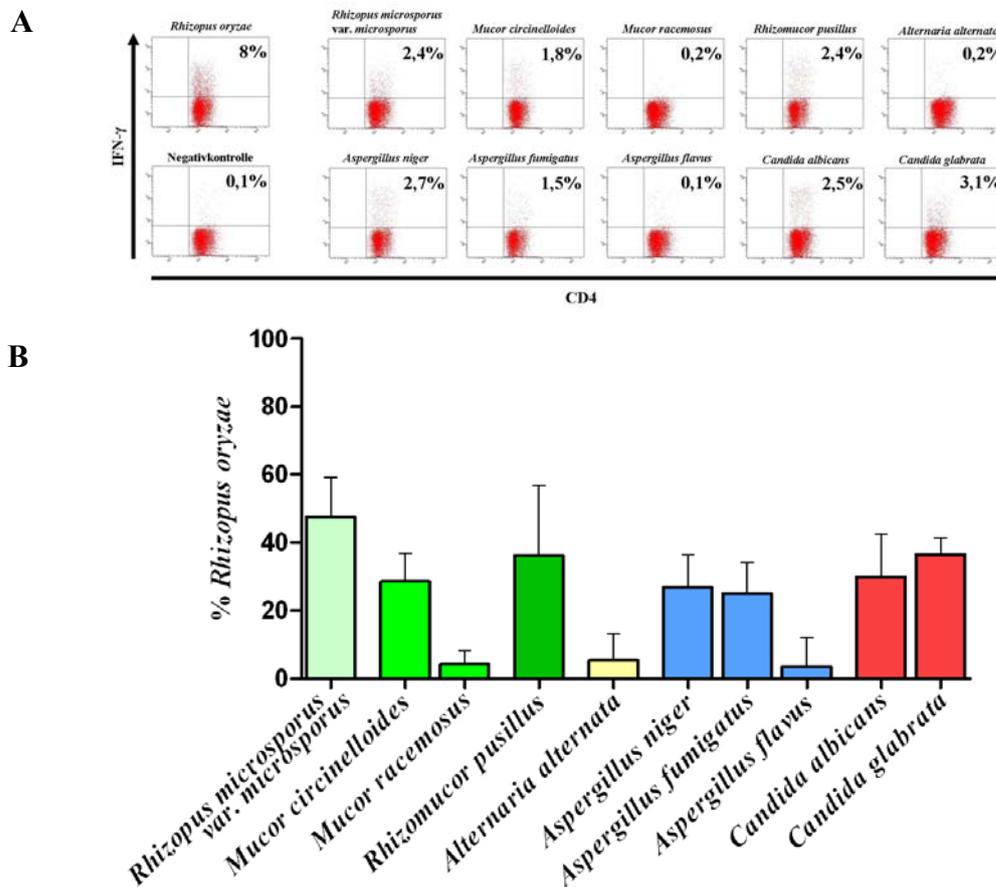


Abbildung 3.22: Kreuzreaktivitäten der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen gegenüber anderen Pilzen. Die mit Hilfe von Antigenen von *R. oryzae* generierten T-Zellen wurden auch durch Antigene von *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* und *Candida glabrata* zur Produktion von IFN- γ stimuliert. A. Dot Plot Darstellungen der durchflusszytometrischen Analyse der IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺ T-Zellen eines typischen Experimentes nach Stimulation der Zellen mit Antigenen unterschiedlicher Pilze durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ). B. IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigenen unterschiedlicher Pilze durch APZ im Verhältnis zur IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigenen von *R. oryzae*, welche 100 % darstellen. (n = 3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die generierte Zellpopulation nicht auf Antigene von *R. oryzae* reagiert, sondern auch auf Antigene anderer Erreger invasiver Mykosen. Eine breite Aktivität gegenüber verschiedenen Erregern könnte von speziellem klinischem Interesse sein.

4 DISKUSSION

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist eine wichtige Therapieoption für Patienten mit Leukämie. Nach einer myeloablativen Therapie zur Eliminierung der malignen Zellen werden dem Patienten pluripotente Stammzellen transfundiert, aus denen sich in der Folge die verschiedenen Zellen des Blutes, unter ihnen auch verschiedene Abwehrzellen, entwickeln. In der Zeit bis zur vollständigen Erholung des Immunsystems ist der abwehrgeschwächte Patient von verschiedenen opportunistischen Keimen bedroht. Bei allogenen Stammzelltransplantation (SZT), bei denen dem Patienten Spenderzellen einer anderen Person transplantiert werden, sind die Patienten zudem von wie *graft-versus-host disease* (GvHD) bedroht. Hierbei erkennen die T-Zellen des Transplantats Zellen des Patientengewebes aufgrund unterschiedlicher Histokompatibilitätsantigene als fremd und lösen Immunantworten gegen diese Zellen aus. Um dem entgegenzuwirken, muss bei Patienten nach allogener SZT oft prophylaktisch oder therapeutisch eine medikamentöse Immunsuppression durchgeführt werden. Dies hat aber eine Verlängerung der Immundefizienz der Patienten zur Folge, welche mit einem noch höheren Infektionsrisiko einhergeht. Ein großer Teil der Infektionen wird durch pathogene Pilze verursacht. Bis zu 13 % der Patienten nach allogener SZT entwickeln eine invasive Pilzinfektion (Mykosen). Die häufigsten Verursacher dieser invasiver Mykosen sind Pilze der Spezies *Aspergillus* (43 % - 59,2 %), *Candida* (24,8 % - 28 %) und *Rhizopus* (7,2 % - 8 %). Die mit invasiven Mykosen assoziierte Mortalitätsrate bei diesen Patienten erreicht trotz der heutzutage verfügbaren antimykotischen Medikamente bis zu 90% (Kontoyiannis et al., 2010; Neofytos et al., 2009; Pagano et al., 2007; Trenchel et al., 2000). Opportunistische Pilze werden in erster Linie durch das angeborene Immunsystem, wie Monozyten und Granulozyten, erkannt und eliminiert (Romani 2004). Diese Zellen reagieren bereits relativ früh nach der SZT (Tag 0 – 100). Da sich invasive Aspergillosen und Mukormykosen aber auch häufig erst nach der Regeneration dieser Zellen entwickeln (Median: 82 Tage für Aspergillosen und 173 Tage für Mukormykosen; (Neofytos et al., 2009), scheint auch das adaptive Immunsystem eine große Rolle bei der Pilzabwehr zu spielen. Dieses regeneriert sich jedoch wesentlich später nach SZT (Tag > 100). T-Helfer (T_H)-Zellen, die zu dem adaptiven Arm des

Immunsystems zählen, werden durch Antigenpräsentierende Zellen aktiviert, und produzieren anschließend eine Vielzahl an Zytokinen wie IFN- γ , die die Immunantwort des Organismus steuern und die Aktivität der Zellen des angeborenen Immunsystems steigern. Natürliche Killer (NK) Zellen, die bisher meist dem angeborenen Immunsystem zugeordnet wurden, stellen ebenfalls während einer Infektion IFN- γ zu Verfügung (Morrison et al., 2003; Park et al., 2009). Zusätzlich produzieren NK-Zellen Zytokine und Chemokine, wie RANTES oder GM-CSF, die immunregulatorisch und aktivierend auf viele an der Abwehr von Pilzen beteiligte Zellen wirken. Auch wurde eine direkte antimykotische Aktivität von NK-Zellen *in vitro* mehrfach gezeigt (Jimenez et al., 1984; Ma et al., 2004; Marr et al., 2009; Murphy et al., 1982; Scaringi et al., 1991). Um das geschwächte Immunsystem von Patienten nach allogener SZT zu stärken, können Spender-Immunzellen verabreicht werden. Dies wurde bereits für Spender-T-Zellen, die gegen *Aspergillus* gerichtet sind, gezeigt. Unklar ist, ob sich auch T-Zellen gegen andere Pilzerreger wie Mukormyzetten isolieren und generieren lassen und wie die Funktion dieser Zellen ist. Da jede T-Zellgabe mit dem Risiko für eine GvHD einhergeht, wäre prinzipiell auch der Einsatz anderer Immunzellen wie z.B. NK-Zellen für die adoptive Immuntherapie möglich. Allerdings ist die antimykotische Funktion der NK-Zellen bisher nur ungenügend charakterisiert.

4.1 Antimykotisches Potential humaner Natürlicher Killer Zellen

Eine Therapie zur Bekämpfung invasiver Pilzkrankungen sollte mehrere Voraussetzungen erfüllen. Sie muss effektiv und im klinischen Alltag machbar sein, ein möglichst breites Wirkspektrum in Bezug auf mögliche Erreger aufweisen, und allem voran sicher sein, sodass die Patienten nicht gefährdet werden.

In den letzten Jahren rückten humane NK-Zellen aufgrund ihrer antitumoralen Aktivität zunehmend in den Fokus der Transplantationsmedizin. Aspekte der Sicherheit und Machbarkeit der adoptiven NK-Gabe wurden in mehreren großangelegten klinischen Studien untersucht und Protokolle zur Gewinnung und Kultivierung dieser Zellen entsprechend den Richtlinien der *good manufacturing practice* (GMP) entwickelt und etabliert (Passweg et al., 2004; Sutlu et al., 2009). Studien zum adoptiven Transfer allogener NK-Zellen nach allogener SZT bei adulten und pädiatrischen Patienten

zeigten keine wesentlichen unerwünschten Nebenwirkungen. Dahingegen konnten positive Einflüsse der adoptiv transferierten NK-Zellen in Bezug auf das Anwachsen der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen, dem sogenannten *engraftment*, auf eine schnellere Immunrekonstitution sowie auf den erwünschten *graft-versus-leukemia* (GvL-) Effekt festgestellt werden (Frohn et al., 2000; Koehl et al., 2004; Lang et al., 2005; Miller et al., 2005; Passweg et al., 2004; Ruggeri et al., 1999). Im Hinblick auf einen möglichen Benefit im Zusammenhang mit Pilzinfektionen wurde der adoptiven Transfer von NK-Zellen im humanen System bisher allerdings nicht untersucht. Dabei ist die Bedeutung von NK-Zellen bei Pilzinfektionen mit Hilfe von Tiermodellen mehrfach gezeigt worden. Mit *Aspergillus fumigatus* infizierte Mäuse, bei denen zuvor durch Antikörper die NK-Zellen depletiert wurden, zeigten eine deutlich höhere Pilzlast in den Lungen und eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu mit *Aspergillus* infizierten Mäusen, die NK-Zellen hatten (Morrison et al., 2003). Ein ähnliches Modell mit neutropenen Mäusen zeigte, dass der Transfer von *ex vivo* kultivierten NK-Zellen in Tiere, die zuvor einer NK-Zell-Depletion unterzogen und anschließend mit einer letalen Dosis *A. fumigatus* Konidien infiziert wurden, die Immunität gegenüber dem Pilz wiederherstellen und das Tier schützen kann (Park et al., 2009). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass der adoptiven Transfer von NK-Zellen ebenfalls bei der Bekämpfung invasiver Mykosen bei Patienten nach alloSZT eine Therapieoption darstellen könnte. Allerdings ist die antimykotische Wirkung primärer humaner NK-Zellen gegen zwei der wichtigsten Erreger invasiver Mykosen in stammzelltransplantierten Patienten, nämlich *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus oryzae*, bisher unzureichend untersucht, was jedoch eine notwendige Voraussetzung für einen klinischen Einsatz darstellt.

4.1.1 *Antimykotische Aktivität humaner NK-Zellen und Wirkmechanismen*

Frühere *in vitro* Untersuchungen belegen die antimykotischen Aktivität muriner NK-Zellen gegenüber *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Cryptococcus neoformans* (Jimenez et al., 1984; Murphy et al., 1982; Scaringi et al., 1991) sowie humaner NK-Zellen gegenüber *C. neoformans* (Ma et al., 2004; Marr et al., 2009). Das Spektrum der antifungalen Aktivität humaner NK-Zellen wird durch die Ergebnisse

dieser Arbeit um zwei weitere klinisch äußerst wichtige Pilze erweitert. So konnte eine direkte antimykotische Wirkung frisch isolierter humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* nachgewiesen werden, die durch eine vorhergehende Kultivierung mit rekombinantem Interleukin (IL)-2 deutlich gesteigert werden kann (Kapitel 3.1.1 & 3.1.2, Abbildungen 3.1 A, 3.2, 3.3).

NK-Zellen verfügen über mehrere Mechanismen ihre zytotoxische Aktivität zu entfalten. Hierbei kann grundsätzlich zwischen der Rezeptor-vermittelten und der über lösliche Faktoren vermittelten Aktivität unterschieden werden. Die Induktion von Apoptose in Zielzellen mittels TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ist ein Beispiel für die Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen, welche einen direkten Kontakt zwischen NK-Zellen und Zielzellen erfordert (Trapani 1998). Zu den löslichen Faktoren, die von NK-Zellen zur Elimination von Zielzellen eingesetzt werden, gehören Granzyme, Granulysin und Perforin, welche potentiell auch über längere Distanz und ohne einen direkten Kontakt wirken können.

Die Frage, ob für die Schädigung des Pilzes durch NK-Zellen ein direkter Kontakt zwischen Pilz und NK-Zelle notwendig ist, wurde bisher nicht gänzlich geklärt. Ma et al. zeigten, dass ein direkter Kontakt zwischen unstimulierten NK-Zellen und Zellen von *C. neoformans* essenziell ist, da das Wachstum des Pilzes in Abwesenheit der NK-Zellen durch lösliche Faktoren nicht beeinträchtigt wird (Ma et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dahingegen zeigen, dass der Kulturüberstand IL-2 stimulierter NK-Zellen auch in Abwesenheit der NK-Zellen Hyphen von *A. fumigatus* schädigen kann (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.7). Eine Erklärung hierfür können möglicherweise die Beobachtungen von Bouzani et al. liefern. Hier wurde eine Aktivierung der Produktion von IFN- γ durch unstimulierte NK-Zellen nur bei direktem Kontakt zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus* Keimlingen gesehen, aber gleichzeitig konnte eine Schädigung der Keimlinge durch zellfreien Kulturüberstand kurzzeitig (24 h) mit IL-2 stimulierter NK-Zellen auch in Abwesenheit der Zellen gezeigt werden (Bouzani et al., 2011). Da sowohl in den Untersuchungen von Bouzani et al. als auch in der vorliegenden Arbeit Kulturüberstände von IL-2 stimulierten NK-Zellen eingesetzt wurden, ist es möglich, dass durch die Stimulation mit IL-2 ein direkter Pilz-NK-Zell-Kontakt zur Stimulierung der Zellen nicht nötig war. Allerdings können die unterschiedlichen Ergebnisse auch auf unterschiedliche Mechanismen der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen in Abhängigkeit des zu schädigenden Pilzes

hindeuten. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bleibt aber festzuhalten, dass die antifungale Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* durch lösliche Faktoren und kontaktunabhängig vermittelt werden kann.

Wie oben bereits erwähnt lässt sich die antimykotische Wirkung frisch isolierter NK-Zellen durch eine Kultivierung in Gegenwart von rekombinantem humanen IL-2 deutlich steigern. Kultivierung humaner NK-Zellen in Gegenwart von IL-2 führt zu enormen Veränderungen in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion. So bewirkt die Stimulation mit IL-2 die Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen mit erhöhter Expression der Aktivierungsmarker CD69 und HLA-DR, eine erhöhte Produktion verschiedener immunregulatorischer Zytokine wie IFN- γ , GM-CSF, TNF- α/β , IL-8 und IL-1, sowie die erhöhte Expression der für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wichtigen Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46. Letzteres spiegelt sich in einer gesteigerten Zytotoxizität der NK-Zellen wider (Fehniger et al., 2002; Huenecke et al., 2010; Sivori et al., 2000; Sivori et al., 2000; Trinchieri et al., 1984). Die beschriebenen Effekte von IL-2 auf NK-Zellen führen letztlich auch zu einer erhöhten Produktion zytotoxischer Proteine wie Granzymen, Granulysin und Perforin.

Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Sekretion von Perforin durch IL-2 stimulierte NK-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten und unstimulierten NK-Zellen gezeigt werden (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.10). Des Weiteren konnte die Induktion der Perforinsekretion der IL-2 stimulierten NK-Zellen durch Hyphen beider Pilze beobachtet werden (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.9). Eine frühere Arbeit beschrieb zudem die Induktion der Produktion von Perforin durch frisch isolierte NK-Zellen mittels Gabe von IL-2 (Marr et al., 2009). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Perforin im Hinblick auf die antimykotische Aktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen näher untersucht. Es konnte eine direkte Schädigung der Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* durch isoliertes Perforin beobachtet werden, was das fungizide Potential dieses Proteins beweist (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.8). Ferner zeigte die Inhibierung der Perforin-vermittelten Aktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen mittels Concanamycin A (CMA) eine Reduktion der pilzschädigenden Wirkung (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.11). CMA, ein spezifischer Inhibitor der V-ATPase, bewirkt eine Erhöhung des pH in den zytotoxischen Granula der NK-Zellen, was zur Degradation von Perforin führt. Zwar konnte das Perforin in den NK-Zellen mittels CMA nicht vollständig eliminiert werden, da CMA in höherer

Dosierung zytotoxisch auf die NK-Zellen wirkt, doch hatte bereits eine nicht signifikante Erniedrigung der Perforinsekretion eine signifikante Minderung der antimykotischen Aktivität zur Folge. Ähnliche Beobachtungen wurden im Zusammenhang mit der anti-*Cryptococcus* Aktivität von humanen NK-Zellen durch Ma et al. gemacht. Sie stellten fest, dass die Inhibierung der Perforin-vermittelten Aktivität von NK-Zellen mittels CMA oder siRNA (*small interfering RNA*) die direkte schädigende Wirkung der NK-Zellen gegenüber *C. neoformans* verminderte (Ma et al., 2004). Die Autoren schlossen daraus, dass Perforin ein Schlüsselmolekül der anti-*Cryptococcus* Aktivität humaner NK-Zellen ist. Allerdings wird in einer Arbeit die Beteiligung von Perforin sowie allgemein der in der zytotoxischen Granula gespeicherten Molekülen bei der Pilzschädigung bestritten (Bouzani et al., 2011). Als Begründung wird die fehlende Degranulierung von NK-Zellen in Anwesenheit von *A. fumigatus* Keimlingen angeführt. Dem entgegen stehen jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit, die klar eine Induktion der Degranulierung in IL-2 stimulierten NK-Zellen nach Inkubation mit *R. oryzae* Hyphen zeigen (Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.6). Dies entspricht auch Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Degranulierung im Zusammenhang mit *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* beobachtet haben (Voigt et al., 2011; Wiseman et al., 2007). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte mit der Wahl verschiedener Pilzstämme (Bouzani et al. verwendeten den Stamm ATCC 46645, in der vorliegenden Arbeit wurde ATCC MYA-1163 verwendet) erklärt werden. Entsprechend einem Bericht von Marr et al. wird die Expression von Perforin durch verschiedene Stämme von *Cryptococcus neoformans* unterschiedlich stark induziert (Marr et al., 2009). Darüber hinaus zeigte sich auch die Abhängigkeit der antimykotischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Stämmen desselben Pilzes ebenfalls in Untersuchungen mit *C. albicans* und *C. neoformans* (Jimenez et al., 1984; Murphy et al., 1982). Andererseits können die gegensätzlichen Ergebnisse auch auf der Wahl der eingesetzten NK-Zellen beruhen. Während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Untersuchungen von mit einer relativ hohen Dosis IL-2 stimulierten NK-Zellen basieren (1000 U/ml IL-2, 7 - 10 Tage), wurden in der von Bouzani et al. präsentierenden Arbeit NK-Zellen nur kurzzeitig mit einer niedrigeren Dosis IL-2 stimuliert (*IL-2 pulsed NK cells*; 500 U/ml IL-2, 24 Stunden). Wie oben bereits beschrieben, geht die Stimulation von NK-Zellen mittels IL-2 mit enormen Veränderungen des Phänotyps sowie Änderungen der Aktivität der Zellen einher.

Deswegen lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der Arbeit von Bouzani et al. nicht unmittelbar vergleichen.

Zusammenfassend führen die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse zu der Erkenntnis, dass Perforin ein wichtiges Effektormolekül der antimykotischen Aktivität von humanen NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen ist. Dennoch kann die Beteiligung anderer Faktoren und Moleküle nicht ausgeschlossen werden. Hier zu erwähnen sei Granulysin, welches wie Perforin als ein wichtiger Faktor der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen beschrieben wird. Granulysin wurde bereits früher im Zusammenhang mit der antimykotischen Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen gegenüber *Cryptococcus neoformans* untersucht. Obwohl Granulysin die anti-*Cryptococcus* Aktivität zytotoxischer T-Zellen vermittelt, spielt es in der Aktivität von NK-Zellen gegenüber *C. neoformans* keine Rolle, da eine Inhibierung von Granulysin mittels siRNA keinen Effekt auf die anti-*Cryptococcus* Aktivität humaner NK-Zellen hatte (Ma et al., 2004). Im Zusammenhang mit anderen Pilzen ist dieses Molekül jedoch bisher nicht untersucht worden, soll aber einen Teil zukünftiger Untersuchungen zur antimykotischen Aktivität von humanen NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* darstellen.

Eine kürzlich erschienene Publikation schlägt zudem IFN- γ als direkten Vermittler der antimykotischen Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* vor (Bouzani et al., 2011). Es ist jedoch der bisher einzige Bericht, der IFN- γ ein direktes fungizides Potential zuschreibt, und der genaue Mechanismus bleibt ungeklärt.

4.1.2 Einfluss von *A. fumigatus* und *R. oryzae* auf die Zytokinproduktion von NK-Zellen

Die Bedeutung des durch NK-Zellen bereitgestellten IFN- γ in der Immunantwort gegenüber Pilzen ist seit langem bekannt. So konnte in einem Modell mit neutropenen Mäusen gezeigt werden, dass NK-Zellen in der frühen Phase einer invasiven Aspergillose eine entscheidende Rolle bei der Produktion von IFN- γ spielen (Park et al., 2009). Die Depletion der NK-Zellen und somit die Entfernung dieser IFN- γ -Quelle reduzierte die IFN- γ -Konzentration in den Lungen der betroffenen Mäuse signifikant und führte zu einer höheren Pilzlast in den Lungen und zur erhöhten Mortalität der mit *A. fumigatus* infizierten Tiere. Von vielen Autoren wird deshalb die protektive Wirkung

von NK-Zellen *in vivo* auch eher mit der IFN- γ -Produktion und der so induzierten der Aktivitätssteigerung von Makrophagen und anderen Zellen assoziiert, während der direkte antimykotische Effekt der NK-Zellen eher untergeordnet scheint (Algarra et al., 2002; Hidore et al., 1986). Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass in Mäusen, die einer NK-Zell-Depletion unterzogen und anschließend mit einer letalen Dosis *A. fumigatus* Konidien infiziert wurden, nur der Transfer von NK-Zellen von Mäusen des Wildtyps, nicht jedoch von IFN- γ -defizienten Mäusen zur Wiederherstellung der antifungalen Immunität führte (Park et al., 2009).

In diesem Zusammenhang ist die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung eines gewissen immunsupprimierenden Effektes durch *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen auf humane IL-2 stimulierte NK-Zellen von großem Interesse. Zytokine und Chemokine spielen bei Infektionen und der nachfolgenden Immunantwort des Wirtes eine große Rolle. Sie dienen der Regulation der immunologischen Wirtsantwort und der Feinabstimmung zwischen den einzelnen Populationen der Immunzellen. Hinsichtlich Pilzerregern erhöhen beispielsweise IFN- γ und GM-CSF die Aktivität polymorphonukleärer Leukozyten gegenüber *Rhizopus oryzae* und *Rhizopus microsporus* (Gil-Lamagnere et al., 2005). NK-Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- β , IL-10, IL-13 und GM-CSF und Chemokinen wie CCL4, RANTES (CCL5), and CCL22 (Cooper et al., 2001; Robertson 2002). Durch diese Eigenschaften gehören NK-Zellen zu wichtigen Initiatoren und Regulatoren der inflammatorischen Antwort des Organismus auf Infektionen, auch hinsichtlich Pilzinfektionen.

Die Interaktion zwischen humanen NK-Zellen und *A. fumigatus* bzw. *R. oryzae* zeigt auf einer Seite die antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber diesen Pilzen, auf der anderen Seite auch einen reziproken Effekt der Pilze auf die NK-Zellen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass *A. fumigatus* als auch *R. oryzae* inhibierend in die immunregulatorische Aktivität der NK-Zellen eingreifen (Kapitel 3.1.5, Abbildung 3.12 f). So wird die Ausschüttung des wichtigen pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ durch IL-2 stimulierte NK-Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* sehr stark reduziert. Zudem haben Hyphen von *A. fumigatus* einen negativen Effekt auf die Sekretion von GM-CSF. Hyphen von *R. oryzae* vermindern währenddessen die RANTES-Ausschüttung durch IL-2 stimulierte NK-Zellen. Diese uneinheitlichen Muster der supprimierenden Effekte

beider Pilze deuten auf eine selektive Inhibition bestimmter Zytokine durch einzelne Pilze hin. Ähnliche Beobachtungen wurden auch durch andere Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit anderen Pilzen beschrieben. So werden humane NK-Zellen durch *C. neoformans* in ihrer Produktion von GM-CSF und TNF- α gehemmt (Murphy et al., 1997), und mittels Hitze abgetötete Hyphen und Hefen von *C. albicans* vermindern die durch Zymosan, Lipopolysaccharid oder IL-2 induzierte Produktion von IFN- γ murinen NK-Zellen (Murciano et al., 2006). Die Mechanismen hinter diesen Effekten sind jedoch noch völlig ungeklärt, könnten aber durch verschiedene vom Pilz sezernierte Toxine bedingt sein. Da die Inkubation von *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen keine Auswirkung auf die Vitalität der IL-2 stimulierten NK-Zellen hatte, kann eine von den Pilzhypen ausgehende zytotoxische Wirkung auf die NK-Zellen als Ursache ausgeschlossen werden. Aufgrund der relativ kurzen Inkubationsdauer von 8 Stunden scheint ein Zusammenhang zwischen einem möglichen Einfluss der Pilze auf die Proliferation der NK-Zellen und der beobachteten Immunsuppression ebenfalls unwahrscheinlich, und konnte auch hinsichtlich des immunsupprimierenden Effekts von *C. albicans* auf NK-Zellen nicht hergestellt werden (Murciano et al., 2006).

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit beobachtete Immunsuppression der NK-Zellen nur durch *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen, nicht jedoch durch Konidien vermittelt wurde, deutet auf ein Molekül hin, welches ausschließlich durch Hyphen produziert wird, bzw. auf einen den Hyphen eigenen Mechanismus. Eine kürzlich erschienene Publikation berichtete von der im Mausmodell immunsupprimierenden Wirkung von Galactosaminogalactan, einem Zellwandbestandteil von *A. fumigatus*, welches ausschließlich in Hyphen und nicht in Konidien des Pilzes nachgewiesen werden kann (Fontaine et al., 2011). Die Injektion dieses Moleküls inhibierte bei einer anschließenden Infektion mit *A. fumigatus* signifikant die Produktion von IFN- γ und GM-CSF in den infizierten Mäusen, was dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten *in vitro* Effekt der *A. fumigatus* Hyphen auf NK-Zellen entspricht. Allerdings ist die Wirkung dieses Moleküls auf einzelne Zellreihen des Immunsystems mit Ausnahme der Induktion von Apoptose neutrophiler Granulozyten nicht untersucht worden. Daher wäre es von Interesse Galactosaminogalactan auf eine mögliche immunsuppressive Wirkung gegenüber humanen NK-Zellen in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen.

Pilze produzieren eine Reihe Mykotoxine, die unterschiedliche Wirkungen auf Zellen des Immunsystems haben. So wurde gezeigt, dass Aflatoxin, ein durch *Aspergillus*

Spezies produziertes Mykotoxin, die Funktion von Phagozyten inhibieren kann (Cusumano et al., 1996). Des Weiteren können Gliotoxin und Patulin, welche auch, jedoch nicht ausschließlich, von *A. fumigatus* produziert werden, die IFN- γ Produktion von Lymphozyten sowie ihre Proliferation hemmen (Wichmann et al., 2002). Zusätzlich induziert Gliotoxin Apoptose von Monozyten und inhibiert auf diese Weise eine Immunreaktion (Stanzani et al., 2005). *R. oryzae* produziert unter anderem Agroclavin, ein Ergotalkaloid, welches auf den Menschen toxisch wirkt (Ribes et al., 2000). Da im Zusammenhang mit NK-Zellen bisher keines der beschriebenen Toxine untersucht worden ist, lässt sich über ihre Rolle bei der beobachteten Immunsuppression durch *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen nur spekulieren. Die Beteiligung von Toxinen mit einer Apoptose-induzierenden Wirkung scheint aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch unwahrscheinlich, da keine Änderung der Vitalität der NK-Zellen nach Inkubation mit den Pilzen beobachtet wurde.

Zusammengefasst sprechen viele Daten dafür, dass Pilze die Zytokinproduktion von NK-Zellen *in vitro* negativ beeinflussen und so ihre immunregulatorische Aktivität unterdrücken. Dies würde bedeuten, dass die therapeutische Wirkung adoptiv transferierter NK-Zellen eingeschränkt wäre, da die durch NK-Zellen bereitgestellten Zytokine für die Immunantwort im Allgemeinen von großer Bedeutung sind. Allerdings ist unklar, ob und in welchem Maße verschiedene Pilze die direkte antimykotische Wirkung von NK-Zellen hemmen. Dies muss in zukünftigen Studien untersucht werden, bevor der adoptive Transfer von NK-Zellen zur Therapie invasiver Mykosen klinisch evaluiert wird.

4.1.3 *Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen durch verschiedene Morphotypen von A. fumigatus und R. oryzae*

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass *A. fumigatus* und andere Pilze das Immunsystem in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium auf unterschiedliche Weise aktivieren oder nicht. Die morphologischen Veränderungen, die beim Auskeimen der Konidien und der Ausbildung hyphaler Fortsätze stattfinden, sowie die Änderungen in der Zusammensetzung der Pilzwand haben einen großen Einfluss auf die Immunantwort des Wirtes, da die Erkennung der verschiedenen Morphologien der Pilze

durch unterschiedliche Rezeptoren der Immunzellen vermittelt wird (Hohl et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen nur gegenüber der filamentösen Form (Hyphen) von *A. fumigatus* und *R. oryzae*, während Konidien beider Pilze weder durch frisch isolierte noch durch IL-2 stimulierte NK-Zellen in ihrer Vitalität beeinflusst werden (Kapitel 3.1.1 f). Deswegen war es im nächsten Schritt wichtig, die Aktivierung der NK-Zellen durch die verschiedenen Morphotypen zu untersuchen, was zum besseren Verständnis der (Patho-)Physiologie der NK-Zell-Pilz Interaktion beitragen und der besseren Evaluierung des immuntherapeutischen Einsatzes humaner NK-Zellen bei invasiven Pilzerkrankungen dienen kann.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zur Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen zeigen, werden die NK-Zellen ausschließlich durch Hyphen und nicht durch Konidien von *A. fumigatus* und *R. oryzae* aktiviert, was in der Induktion der Expression des früher Aktivierungsmarker CD69 auf der Oberfläche der NK-Zellen sichtbar wird (Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.4). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bezüglich der Induktion der IFN- γ - und TNF- α -Produktion gemacht (Bouzani et al., 2011). So wurde diskutiert, ob die fehlende antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber Konidien möglicherweise aus der fehlenden Aktivierung der NK-Zellen resultiert. Wie Hyphen von *Aspergillus* die NK-Zellen aktivieren ist derzeit noch unklar. Bislang sind eine Reihe Rezeptoren der Immunzellen der angeborenen Immunabwehr beschrieben, die für die Erkennung von Pilzen verantwortlich sind, wie auch die Strukturen der Pilze, die durch diese Rezeptoren erkannt werden, bekannt. Die Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*; TLR) TLR-2, TLR-4 und TLR-9 sind die wichtigsten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems für die Erkennung von pathogenen Pilzen (Romani 2004; van de Veerdonk et al., 2008). Sie detektieren unter anderem Zymosan, Phospholipomannan, O-verknüpfte-Mannane und von Pilzen stammende DNS (Braedel et al., 2004; Netea et al., 2006; van de Veerdonk et al., 2008). Die Expression von funktionalen TLR-2, 4 und 9 auf NK-Zellen wurde bereits beschrieben. So konnte die direkte Aktivierung von NK-Zellen durch das bakterielle *Leishmania major* Lipophosphoglykan (LPG), *Klebsiella pneumoniae* Außenmembranprotein A und Zymosan (Becker et al., 2003; Chalifour et al., 2004; Murciano et al., 2006), welche über TLR-2 wirken, das bakterielle Protein FimH und *Escherichia coli*

Lipopolysaccharid (LPS), welche über TLR-4 detektiert wird (Mian et al., 2010; Murciano et al., 2006) und unmethylierter CpG DNS, die über TLR-9 erkannt wird (Sivori et al., 2004), gezeigt werden. Obwohl eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Aktivierung humaner NK-Zellen durch Pilze wahrscheinlich ist, fehlen bislang Daten hierzu.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch keimende Konidien von *A. fumigatus* wird vor allem über die Stimulation von TLR-2 und TLR-4 durch β -(1,3)-Glukan vermittelt (Braedel et al., 2004; Luther et al., 2007). *A. fumigatus* Konidien werden von einem sogenannten Rodlet bedeckt, einer aus Hydrophobin A (RodA) bestehenden Hülle, welches nach Auskeimung abgebaut wird und anschließend nicht mehr auf Hyphen vorhanden ist (Dague et al., 2008; Ibrahim-Granet et al., 2003). Es ist bekannt, dass diese über der Konidienwand liegende Struktur die Erkennung ruhender *A. fumigatus* Konidien durch dendritische Zellen und Makrophagen verhindert (Aimanianda et al., 2009). Es wird vermutet, dass RodA das β -(1,3)-Glukan der Konidienwand für TLRs unzugänglich macht (Dagenais et al., 2010). Das extrahierte RodA-Protein, welches kovalent über Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker/Reste mit der Zellwand der Konidien verbunden ist, zeigt sich immunologisch inert. Isoliertes RodA induziert weder die Reifung noch die Aktivierung dendritischer Zellen und Makrophagen *in vitro*, und ist nicht in der Lage eine T_H-Zell-vermittelte Immunantwort in Mäusen zu induzieren. Die chemische Entfernung der Hydrophobinhülle indes befähigt ruhende Konidien eine Immunreaktion auszulösen (Aimanianda et al., 2009; Dagenais et al., 2010).

Zur Untersuchung, ob RodA ebenfalls die Aktivierung der NK-Zellen durch Konidien verhindert wurde die Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69 auf frisch isolierten NK-Zellen in Gegenwart von Konidien der RodA-Mutante von *A. fumigatus* analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Aktivierung der NK-Zellen durch *A. fumigatus* Konidien nicht von RodA beeinflusst wird. So führte die Inkubation frisch isolierter NK-Zellen mit den Konidien der RodA-Mutante, wie auch mit den Konidien des Wildtyps, nicht zur Aktivierung der NK-Zellen (Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.5). Es müssen demnach andere Strukturen seitens der Konidien für die Aktivierung der NK-Zellen entscheidend sein, was der Mittelpunkt derzeitiger Forschung ist.

Hinsichtlich der Interaktion von humanen NK-Zellen und *R. oryzae* kann weit weniger spekuliert werden, da das Zusammenwirken dieses Pilzes mit dem Immunsystem bisher weitgehend ungeklärt ist. Es ist jedoch bekannt, dass beispielsweise TLR-2 bei der Immunantwort neutrophiler Granulozyten auch gegenüber Mukormyzetten eine wichtige Rolle spielt (Chamilos et al., 2008). Da Pilze im Allgemeinen viele gleiche Bausteine (Zucker, Proteine, Lipide) für den Aufbau ihrer Zellwand verwenden, ist jedoch anzunehmen, dass die Erkennung von *R. oryzae* und *A. fumigatus* durch NK-Zellen über ähnliche Wege bzw. Rezeptoren stattfindet.

4.2 **Anti-*R. oryzae* T-Zellen als potentielle Therapieoption zur Bekämpfung invasiver Mukormykosen**

Wie Eingangs ausgeführt muss eine adoptive zelluläre Therapie unter klinischen Bedingungen machbar, effektiv und allem voran sicher sein. In Bezug auf T-Zellen und Pilzinfektionen bedeutet das, dass eine Isolation und Generierung entsprechender antifungaler T-Zellen aus dem peripheren Blut eines jeden Spenders möglich sein muss, die generierten T-Zellen funktionell aktiv sind und keine gefährlichen Nebenwirkungen beim Empfänger zu erwarten sind. Im Zusammenhang mit T-Zellen ist die Alloreaktivität, d.h. die Gefahr der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung, eine mögliche und ernstzunehmende Nebenwirkung.

Die zelluläre Therapie hinsichtlich des adoptiven Transfers antigenspezifischer T-Zellen ist bereits in mehreren Studien untersucht worden. So wurden z.B. zur Bekämpfung von CMV-Erkrankungen bereits spezifische CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen klinisch getestet (Einsele et al., 2002; Riddell et al., 1994; Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Auch zeigte ein kleine nicht randomisierte Studie zum adoptiven Transfer von anti-*Aspergillus* T-Zellen auf Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, die an einer invasiven Aspergillose litten, ermutigende Ergebnisse. Da die adoptive T-Zell-Gabe prinzipiell auch bei Mukormykosen als eine attraktive Therapieoption erscheint, müssen zunächst Vorarbeiten wie Isolierung und Charakterisierung dieser Zellen durchgeführt werden.

4.2.1 *Isolierung und Charakterisierung anti-*R. oryzae* T-Zellen*

In der vorliegenden Arbeit konnten im peripheren Blut aller getesteten Spender, die im Vorfeld keine invasive Pilzerkrankung aufwiesen anti-*R. oryzae* T-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist einerseits nicht überraschend, da *R. oryzae* ein ubiquitär vorkommender Pilz ist und daher davon ausgegangen werden kann, dass jeder Mensch im Laufe seines Lebens mit ihm in Kontakt kommt. Andererseits konnte damit gezeigt werden, dass anti-*R. oryzae* T-Zellen im Allgemeinen zum Repertoire eines gesunden Menschen gehören und diese in detektierbaren Mengen im peripheren Blut vorkommen,

was für die Isolierung dieser Zellen enorm wichtig ist. Die Frequenz der nachgewiesenen anti-*R. oryzae* T-Zellen war zwar sehr niedrig, aber mit den bereits dokumentierten Frequenzen der anti-*Aspergillus* T-Zellen (Beck et al., 2008) oder anti-Adenovirus T-Zellen (1,1 % ± 1 %) (Feuchtinger et al., 2006) in gesunden Individuen vergleichbar.

Die anti-*R. oryzae* T-Zellen des peripheren Blutes konnten durch Stimulation mit *R. oryzae* Antigenen aktiviert werden, was sowohl an der Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD154 als auch an der Produktion von IFN- γ demonstriert werden konnte, das mittels intrazellulärer Messung durch Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.15). Die in sehr geringen Mengen vorliegenden anti-*R. oryzae* T-Zellen konnten aus Buffy coat-Leukozytenprodukten gesunder Spender mittels zwei aufeinanderfolgenden immunomagnetischen Selektionsschritten, denen jeweils eine Expansionsphase folgte, isoliert und auf durchschnittlich das 30-fache der Zellmenge nach IFN- γ -Selektion expandiert werden [Median $1,65 \times 10^6$ (Intervall $1 - 2 \times 10^6$) zu $50,7 \times 10^6$ ($28 - 70 \times 10^6$)] (Kapitel 3.2.1, Tabelle 3.1). Die generierte Zellpopulation war sehr homogen und enthielt über 90 % CD3⁺CD4⁺ T-Zellen [Durchschnitt 94,4 % CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (Intervall 90,1 % – 96,7 %)], während nur geringe Menge residuärer NKT-Zellen (*natural killer-like T cells*) und NK-Zellen sowie keine B-Zellen nachgewiesen werden konnten. Auch der Anteil verbliebener CD3⁺CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen war mit durchschnittlich 2,5 % (Intervall 0,2 % - 4,8 %) sehr niedrig (Kapitel 3.2.2, Tabelle 3.2). Zu beachten ist jedoch, dass das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Generierung von anti-*R. oryzae* T-Zellen derzeit nicht für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Ein Protokoll für die Gewinnung von *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen im klinischen Maßstab wurde bereits publiziert (Tramsen et al., 2009) und kann wahrscheinlich auch auf die Gewinnung anti-*R. oryzae* T-Zellen übertragen werden.

4.2.2 Zytokinproduktion durch die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen nach Restimulierung

Pilze bzw. einzelne Pilzantigene können prinzipiell alle Subpopulationen der T-Lymphozyten aktivieren und folglich eine T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} sowie T_{Reg} gerichtete T-Zell-Antwort induzieren (Bozza et al., 2009; Murdock et al., 2011; Romani 2011).

Doch nur eine T_H1 -gerichtete Antwort des Immunsystems kann zu einem effizienten Schutz des Wirtes führen (Chai et al., 2009). In Mausmodellen der invasiven pulmonalen Aspergillose wurde gezeigt, dass eine Resistenz gegenüber dem Erreger vor allem mit der Produktion von T_H1 -Zytokinen IFN- γ und TNF- α assoziiert ist, während die Produktion von T_H2 -Zytokinen wie IL-4 und IL-10 die Infektion unterhält (Cenci et al., 1999; Cenci et al., 1998; Mehrad et al., 1999). IL-4 defiziente Mäuse zeigen sich beispielsweise gegenüber einer invasiven pulmonalen Aspergillose im hohen Maße resistent, was auf die fehlende Suppression von IFN- γ produzierenden T_H1 -Zellen durch das IL-4 zurückgeführt werden kann (Cenci et al., 1998). Eine erhöhte Produktion von IL-4 geht dagegen mit einer höheren Pilzlast einher, wie in mit *Histoplasma capsulatum* infizierten Mäusen gezeigt werden konnte (Szymczak et al., 2009; Zhang et al., 2009). Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, induziert IFN- γ vor allem die Aktivierung von Phagozyten und vermittelt auf diese Weise einen Schutz gegenüber Pilzen (Chai et al., 2010; Zhang et al., 2009). Die Wirkung einer adaptiven Immuntherapie invasiver Mykosen mit T-Zellen basiert zum großen Teil wohl auf der Bereitstellung dieser proinflammatorischen Zytokine durch pilz-spezifische T-Zellen des T_H1 Typs. Daher ist es wichtig, dass die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen dem T_H1 -Phänotyp entsprechen, und möglichst keine T_H2 -Zellen in dem hergestellten Präparat enthalten sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten anti-*R. oryzae* T-Zellen lassen sich nach Kultivierung und Expansion durch erneute Stimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen zur Produktion von IFN- γ und TNF- α anregen, was auf einen T_H1 -Phänotyp dieser Zellen hindeutet (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.16 f). Im Gegensatz dazu konnte keine Produktion der T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden, weder intrazellulär mittels Durchflusszytometrie, noch in der Analyse des Kulturüberstandes mittels ELISA. Unter Betrachtung des verwendeten Selektionsverfahrens, welches auf der Isolierung IFN- γ sekretierender Zellen basiert, ist das Ergebnis prinzipiell nicht überraschend, da davon ausgegangen werden kann, dass eben nur die IFN- γ produzierenden Zellen isoliert werden. Wie aus Abbildung 3.16 ersichtlich, ist die Produktion von IFN- γ und TNF- α nicht in allen generierten Zellen nachweisbar, was auf einen signifikanten Anteil unspezifischer T-Zellen in der Gesamtpopulation schließen lassen könnte. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Zahl der detektierten IFN- γ sezernierenden Zellen nicht dem tatsächlichen Anteil IFN- γ und TNF- α produzierender Zellen widerspiegeln. Da die Stimulation der Zellen sowie die

Induktion der Akkumulation der Zytokine in den Zellen zeitlich begrenzt ist, lassen sich mit dieser Methode nur die Zellen detektieren, die in der Dauer des Experiments die gesuchten Zytokine produzierten und sie zudem in einer bestimmten Mindestkonzentration beinhalten. Zellen, die zum Zeitpunkt der Messung zwar aktiviert sind, aber nicht eine für die Detektion ausreichende Menge an Zytokinen akkumuliert haben, können mittels dieser Methode nicht detektiert werden. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach nicht physiologischer Stimulation mit Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) in Kombination mit Ionomycin in über 99 % der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen der generierten Zellpopulation die Produktion von IFN- γ und TNF- α induziert werden konnte.

4.2.3 *Verstärkung der Phagozytose durch die generierten anti-R. oryzae T-Zellen*

Die wohl wichtigste Rolle bei der Eliminierung von Pilzen aus den Körper spielen Granulozyten und Makrophagen (Romani 2004). Diese Zellen sind in der Lage die Erreger unter anderem in einem von Sauerstoff abhängigem Prozess (oxidativen Burst) bei dem reaktive Sauerstoffmetabolite produziert werden, zu vernichten. Aufgrund des großen antimykotischen Potentials der Granulozyten, wurden Granulozytentransfusionen klinisch bei Patienten mit invasiver Aspergillose evaluiert. Trotz vielversprechender Ergebnisse in kleinen Fallserien konnte ein Effekt dieser Therapieoption bisher nicht in randomisierten Studien nachgewiesen werden (Seidel et al., 2008). Die Effektivität der Granulozyten wird durch Zytokine, die vor Allem durch T_H1-Zellen geliefert werden, verstärkt (Romani 2011). Dies könnte einer der Rationale für eine Transfusion pilzspezifischer Spender-T_H1-Zellen in Patienten mit invasiver Mukormykose sein.

Tatsächlich waren die in dieser Arbeit generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen in der Lage, die Aktivität von Granulozyten und Monozyten *in vitro* deutlich zu steigern. So führte die Stimulation von Granulozyten und Monozyten mit Überständen von anti-*R. oryzae* T-Zellen, die ihrerseits zuvor mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen stimuliert wurden, zu einer signifikanten Zunahme der Burst-Aktivität der eingesetzten Granulozyten und Monozyten (Kapitel 3.2.6, Abbildung 3.21). Verantwortlich für diese Aktivitätssteigerung ist wahrscheinlich das durch die T_H1-Zellen produzierte IFN- γ .

Prinzipiell ist es denkbar, die Phagozytoseaktivität der im Patienten vorhandenen Phagozyten mittels intravenöser Applikation von IFN- γ zu erhöhen. Tatsächlich gab es bereits klinische Studien zur Bekämpfung invasiver Pilzkrankungen durch den therapeutischen Einsatz von IFN- γ . Allerdings konnte diese Studien keinen positiven Effekt in Bezug auf die Prognose der behandelten Patienten zeigen (Safdar et al., 2005; Safdar et al., 2006). Dies könnte mit der diffusen Verteilung des applizierten IFN- γ und somit relativ niedrigen Konzentration des Zytokins am Ort der Infektion, zusammenhängen. Die Zytokinproduktion durch die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen wird nur durch eine spezifische Stimulation durch autologe, *R. oryzae*-Antigene präsentierende APZ induziert (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.17 und Kapitel 3.2.5, Abbildung 3.20). Nach Applikation würden die anti-*R. oryzae* T-Zellen am Ort der Infektion durch Antigenpräsentierende Zellen aktiviert und zur Produktion und Sekretion von IFN- γ angeregt. Dies hätte eine lokale Erhöhung der IFN- γ -Konzentration und eine gezielten Steigerung der Phagozytenaktivität am Ort der Infektion zur Folge. Unklar ist jedoch, welche lokale Konzentration der entsprechenden Zytokine *in vivo* die Immunantwort optimiert. Auch muss die Wirksamkeit der Therapie mittels der adoptiven Gabe anti-*R. oryzae* T-Zellen im Mausmodell überprüft werden.

4.2.4 Proliferationsvermögen der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen

Wie oben ausgeführt, konnten die isolierten anti-*R. oryzae* T-Zellen stark expandiert werden. Weitaus wichtiger jedoch als die Möglichkeit die generierten Zellen *in vitro* zu expandieren ist die Tatsache, dass die generierte Zellpopulation durch erneute Stimulation mit *Rhizopus*-Antigenen zur Proliferation angeregt werden kann (Kapitel 3.2.4). Bisher ist es nicht bekannt wie viele antigenspezifische T-Zellen notwendig sind, um eine effektive Immunantwort gegen einen bestimmten Erreger zu induzieren. In einer Studie mit zur Infusion Cytomegalovirus (CMV)-spezifischen T-Zellen zur Behandlung von CMV- Infektionen nach Stammzelltransplantation wurden 8 Patienten $10^7/m^2$ CMV-spezifische T-Zellen verabreicht (Einsele et al., 2002). In 7 auswertbaren Patienten fiel anschließend die CMV-Last signifikant ab, trotz der Einstellung der antiviralen Medikation. In einer anderen Studie mit Adenovirus-spezifischen T-Zellen wurden bei pädiatrischen Patienten $1,2 - 50 \times 10^3$ Zellen/kg Körpergewicht eingesetzt

(Feuchtinger et al., 2006). Trotz der vergleichsweise geringen Mengen applizierter Zellen konnte in 5 von 6 Patienten eine Adenovirus-spezifische Immunität induziert werden, was unter anderem auf die Vermehrung der transferierten Zellen im Empfänger zurückgeführt werden konnte.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass die Restimulation mit *R. oryzae*-Antigenpräsentierenden Zellen die Expansion der generierten Zellpopulation *in vitro* induziert (Abbildung 3.18). Es ist daher gut vorstellbar, dass die Transfusion geringer Mengen antifungaler T-Zellen mit ihrer Fähigkeit zu expandieren bei einer Infektion zu einer großen Zahl der T-Zellen führt. Ferner stellt die Fähigkeit zur Vermehrung einen enormen Vorteil des adoptiven Transfers von T-Zellen gegenüber dem bereits beschriebenen Einsatz von Granulozyten zur Bekämpfung invasiver Mykosen dar. Granulozyten fehlt die Fähigkeit zur Proliferation, was eine wiederholte und häufige Applikation dieser Zellen notwendig macht. Jede Applikation geht jedoch jeweils mit dem Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen einher.

4.2.5 *Alloreaktives Potential der generierten anti-R. oryzae T-Zellen*

Die Proliferationsfähigkeit der generierten Zellen scheint es zu ermöglichen die Menge der für eine erfolgreiche Therapie eingesetzter Zellen gering zu halten. Hierdurch ergeben sich mehrere Vorteile. Ein Teil der generierten Zellen könnte eingefroren und eventuell für eine zweite Gabe verwendet werden. Dies ist für anti-*Aspergillus* T-Zellen bereits gezeigt worden (Tramsen et al., 2009). Auch könnte das Risiko einer lebensgefährlichen GvHD durch residuale alloreaktive Zellen minimiert werden.

Allgemein nimmt das Risiko eine GvHD zu induzieren, sowie der Schweregrad der GvHD, mit der Menge der transferierten T-Zellen zu. In einer Studie, in der Patienten HLA-identische Spender-Lymphozyten-Infusionen (*donor lymphocyte infusion*; DLI) mit 1×10^6 , 1×10^7 bzw. 1×10^8 unselektionierter $CD3^+$ Zellen pro kg Körpergewicht erhielten, entwickelten 1 %, 6 % bzw. 23 % der Empfänger eine GvHD der Grade II-IV ($p < 0,0001$) (Raiola et al., 2003). Es ist jedoch zu erwarten, dass die Alloreaktivität selektionierter und spezifischer T-Zellen weit niedriger als die von unaufgereinigten T-Zellen ist, worauf sowohl *in vitro* Untersuchungen als auch klinische Studien zu virus-spezifischen (Einsele et al., 2002; Rauser et al., 2004) und

Aspergillus-spezifischen T-Zellen (Perruccio et al., 2005) deuten. In den genannten Studien erwickelte kein Empfänger von *in vitro* nicht alloreaktiven gegen CMV gerichteten T-Zellen bei einer Menge von $1 - 5 \times 10^6$ (Einsele et al., 2002), bzw. 1×10^6 selektionierter anti-*Aspergillus* T-Zellen pro kg Körpergewicht eine GvHD (Perruccio et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde das alloreaktive Potential der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen mit Hilfe von zwei Tests bestimmt: Proliferation und IFN- γ -Sekretion nach Koinkubation mit allogenen APZ. Beide Tests adressieren die wesentlichen Eigenschaften der GvHD. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen nach Stimulation mit Fremdzellen (allogene APZ) nur geringfügig mehr IFN- γ sekretieren im Vergleich zu unstimulierten anti-*R. oryzae* T-Zellen (Kapitel 3.2.5, Abbildung 3.20). Des Weiteren zeigen die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen keine erhöhte Proliferation nach Stimulation mit allogenen APZ (Kapitel 3.2.5, Abbildung 3.19). Im Gegensatz dazu nehmen die IFN- γ -Sekretion sowie die Proliferation von unselektionierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach Koinkubation mit allogenen APZ stark zu. Diese Ergebnisse zeigen ein wesentlich geringes alloreaktives Potential der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen im Vergleich zu unselektionierten T-Zellen.

Prinzipiell können auch andere *in vitro* Tests für die Untersuchung des alloreaktiven Potentials von T-Zellen wie z.B. ³H-Thymidin-Proliferations-Assay verwendet werden. Bisher gibt es keine Einigung darüber, welcher *in vitro* Test am besten die *in vivo* Ergebnisse reflektiert. Daher ist es bisher nicht möglich eine sichere Vorhersage aufgrund von *in vitro* Daten zu treffen. Deshalb müssen in klinische Studien zum adoptiven Transfer von anti-*R. oryzae* T-Zellen zunächst nur geringe Zellmengen eingesetzt werden, die gewonnenen klinischen sowie immunologischen Daten sorgfältig ausgewertet werden. Im Falle, dass sich keine Anzeichen von unerwünschten Nebenwirkungen ergeben, kann dann die Zahl der transferierten Zellen erhöht werden.

4.2.6 Kreuzreaktivität der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen gegenüber anderen klinisch relevanten Pilzen

Die Diagnose einer invasiven Pilzinfektion ist im klinischen Alltag oft nicht möglich. Klinische Symptome sowie radiologische Befunde der Mykosen gleichen oft anderen Erkrankungen. So können Mukormykosen oft nicht von bakteriellen Pneumonien (Ribes et al., 2000) oder invasiven Aspergillosen unterschieden werden. So werden die Hälfte bis ein Viertel der Infektionen mit Mukormyketen bei hämatologischen Patienten erst post mortem identifiziert (Nosari et al., 2000). Die Erregeridentifizierung ist umgekehrt aber für den klinischen Alltag wichtig, da viele Antimykotika keine Wirkung gegenüber einzelnen Pilzen aufweisen (Hof et al., 2010). So ist das vielfach verwendete Voriconazol nicht gegen Mukormyketen wirksam. Die Kenntnis des Erregers ist aber auch für eine adoptive Immuntherapie mit T-Zellen entscheidend, da jeder T-Zellklon spezifisch auf ein Antigen reagiert. Umgekehrt wurden die anti-*R. oryzae* T-Zellen in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Antigengemisches hergestellt, weswegen eine breite Reaktivität gegenüber verschiedenen Pilzantigenen zu erwarten war.

Tatsächlich zeigen die in dieser Arbeit generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen Kreuzreaktivität gegenüber anderen klinisch bedeutenden Pilzen wie *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* und *Candida glabrata*, die alle als Erreger invasiver Mykosen bei immunsupprimierten Patienten bekannt sind. Die Stimulation mit Antigenen dieser Pilze mittels Antigenpräsentierenden Zellen führte zu einer deutlichen IFN- γ Produktion durch die generierten Zellen, wie in den durchflusszytometrischen Untersuchungen demonstriert (Kapitel 3.2.7, Abbildung 3.22). Gewisse Kreuzreaktivitäten wurden auch für anti-*C. albicans* T-Zellen beschrieben, beschränkten sich allerdings hier auf *Candida tropicalis*, und zeigten sich nicht gegenüber *Candida glabrata* oder *A. fumigatus* (Tramsen et al., 2007).

Da Pilze allgemein viele gleiche Bausteine wie bestimmte Zucker, Proteine und Lipide für den Aufbau ihrer Zellwand verwenden, ist es wahrscheinlich, dass für bestimmte Antigene spezifische T-Zellen im Blut eines Individuums auf die Stimulation mit verschiedenen Pilzen reagieren können. Bozza et al. konnten zeigen, dass verschiedene Proteine und Polysaccharide von *A. fumigatus* in der Lage sind eine protektive

Immunantwort durch T_H1-Antwort in Mäusen zu induzieren (Bozza et al., 2009). Zu diesen gehörten unter anderem das in der Zellwand verankerte Protein Crf1. Stuehler et al. ist es gelungen mit Hilfe eines Peptids des genannten Proteins, nämlich Crf1p41, anti-*Aspergillus* T-Zellen zu generieren, die ebenfalls gegen *C. albicans* aktiv sind (Stuehler et al., 2011). Allerdings zeigten die in der genannten Arbeit generierten anti-*Aspergillus* T-Zellen nur die genannte Aktivität gegenüber *A. fumigatus* und *C. albicans*, und konnten andere Pilzen wie *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus terreus*, sowie andere Peptide von *A. fumigatus* Crf1 (Crf1p1, Crf1p59) nicht stimuliert werden (Stuehler et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Pilzextrakten, die Antigengemische darstellen, generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen eine breite Kreuzreaktivität gegenüber vielen klinisch wichtigen Pilzen, was auf eine protektive, spezies- und gattungsübergreifende Wirkung dieser Zellen deutet. Diese Eigenschaft der in dieser Arbeit hergestellten Zellen kann für die klinische Anwendung von enormer Bedeutung sein, da sie die problematische Identifikation des in Patienten vorliegenden Erregers teilweise egalisiert. Auch im Falle einer Mehrfachinfektion mit zwei oder mehr Pilzen könnten die in dieser Arbeit generierten T-Zellen eine gute Behandlungsmöglichkeit bieten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nach allogenen Stammzelltransplantation und der damit einhergehenden lang andauernden Immuninkompetenz bzw. Immunsuppression sind die betroffenen Patienten stark für lebensgefährliche invasive Pilzinfektionen empfänglich. Trotz der derzeit verfügbaren antimykotischen Medikamente liegt die mit diesen Infektionen assoziierte Mortalität je nach Literatur bei 90 %. Aus diesem Grund rücken zelltherapeutische Behandlungen, die die Immunität der Patienten mit Pilzinfektionen verbessern und so die Sterblichkeit verringern könnten, immer mehr in den Fokus der Forschung auf diesem Gebiet. Leider ist die Interaktion von humanen Natürlichen Killer Zellen mit den wichtigen Verursachern invasiver Mykosen *A. fumigatus* und *R. oryzae* bisher nicht untersucht. Die Wichtigkeit von T_H-Zellen in der Pilzabwehr wird zunehmend erkannt. Daher wurde bereits versucht die Prognose von Patienten mit invasiven Aspergillosen nach SZT durch den Transfer von Spender-*Aspergillus*-spezifischen T-Zellen zu verbessern. Die Generierung anti-*R. oryzae* T-Zellen sowie die Charakterisierung dieser Zellen ist bisher nicht durchgeführt worden.

Deshalb sollte im ersten Teil dieser Arbeit sollte die antifungale Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* sowie *R. oryzae* untersucht und charakterisiert werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Generierung von spezifischen T-Zellen gegen *R. oryzae* aus Zellen des peripheren Blutes gesunder Individuen durchgeführt werden und die generierten Zellen im Hinblick auf ihre Funktionalität, Sicherheit und Wirkspektrum *in vitro* charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die direkte antimykotische Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* gezeigt werden und ein Mechanismus dieser Aktivität identifiziert werden. So induzierte der Kontakt von IL-2 stimulierten NK-Zellen mit Pilzhyphen die Degranulierung der NK-Zellen und die Ausschüttung von Perforin, welches zumindest partiell, die antimykotische Aktivität humaner NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* und *R. oryzae* Hyphen vermittelte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings auch, dass der therapeutische Nutzen adoptiv transferierter NK-Zellen durch einige Faktoren begrenzt werden könnte. Einerseits hatten NK-Zellen keinen zytotoxischen Effekt auf Konidien beider getesteten Pilze, andererseits deutet die beobachtete Immunsuppression darauf hin, dass ein

stimulierender Effekt durch die transferierten NK-Zellen auf andere Zellen des Immunsystems durch die Hyphen der beiden Pilze inhibiert werden könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich T-Zellen gegen *R. oryzae* in allen getesteten gesunden Individuen nachweisen lassen und diese isoliert und kultiviert werden können. Das deutet darauf hin, dass hinsichtlich anti-*R. oryzae* T-Zellen keine Restriktionen bei der Spenderauswahl zu erwarten sind. Die hergestellten Zellen konnten anhand der Expression ihrer Oberflächenantigene sowie des Profils der ausgeschütteten Zytokine dem T_H1-Typ zugeordnet werden, welcher mit der protektive Immunantwort bei Pilzinfektionen assoziiert wird. Nach spezifischer Stimulation produzierten die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen die bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen eine wichtige Rolle spielenden pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α und erhöhten die Aktivität der für die Abwehr von Pilzen wichtigen Granulozyten und Monozyten *in vitro*.

Zwar zeigten die generierten T-Zellen bei Kontakt mit allogenen APZ eine geringe Proliferationsantwort, diese war jedoch mit der nach Stimulation mit autologen, unbeladenen APZ gesehenen Proliferation vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen zumindest *in vitro* ein deutlich geringeres alloreaktives Potential als unselektionierte T-Zellen haben. Entsprechende Resultate zeigten sich auch bei Betrachtung der IFN- γ Sekretion der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen. Die Stimulation mit Fremdsponder-APZ beeinflusste die Sekretion von IFN- γ durch die anti-*R. oryzae* T-Zellen im Vergleich zu der IFN- γ -Sekretion durch anti-*R. oryzae* T-Zellen, mit autologen, unbeladenen APZ stimulierten wurden, kaum.

Des Weiteren wiesen die hergestellten anti-*R. oryzae* T-Zellen zahlreiche Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen Pilzspezies, auch Genera übergreifend, auf. So zeigten sie Kreuzreaktivität gegenüber klinisch bedeutenden Pilzen wie *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* und *Candida glabrata*, die alle als Erreger invasiver Mykosen bei immunsupprimierten Patienten bekannt sind. Die Stimulation mit Antigenen dieser Pilze mittels Antigenpräsentierenden Zellen führte zur einen deutlichen IFN- γ -Produktion durch die generierten Zellen.

6 AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humane NK-Zellen eine antimykotische Aktivität gegenüber Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* besitzen. Der adoptive Transfer dieser Zellen könnte somit prinzipiell eine Option zur Bekämpfung invasiver Mykosen in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation darstellen. Zwar fehlen bislang *in vivo* Untersuchungen beim Menschen, Untersuchungen in Mausmodellen konnten jedoch bereits einen positiven Effekt des adoptiven Transfers von murinen NK-Zellen bei *Aspergillus*-Infektionen zeigen. Dieser Effekt kommt zum einen durch die Bereitstellung von IFN- γ durch die NK-Zellen zustande, könnte aber auch auf die direkte antimykotische Aktivität der NK-Zellen zurückgehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem ein Mechanismus der direkten antimykotischen Aktivität humaner NK-Zellen, an dem lösliche Faktoren bzw. Perforin beteiligt sind, identifiziert werden. Ob zusätzlich Liganden/Rezeptoren an der antimykotischen Aktivität beteiligt sind, ist unklar. Sollte sich in zukünftigen Studien herausstellen, dass eventuell CD16 der NK-Zellen und somit der Wirkmechanismus der ADCC an der antimykotischen Aktivität der NK-Zellen beteiligt ist, wäre eine Kombinationstherapie mit bispezifischen Pilzantikörpern in Kombination mit der NK-Zell-Immuntherapie denkbar. Dies wurde bereits bei Infektionen mit *Cryptococcus neoformans* gezeigt, da die NK-Zell-Aktivität gegenüber dem Erreger mit Zugabe von anti-*Cryptococcus* Antikörpern erhöht werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings auch, dass der therapeutische Nutzen adoptiv transferierter NK-Zellen unter anderem durch die beobachtete Immunsuppression inhibiert werden könnte. Es muss deshalb in zukünftigen Studien auch untersucht werden, in welchem Ausmaß die *in vitro* beobachtete Immunsuppression durch Hyphen von *A. fumigatus* und *R. oryzae* *in vivo* die Funktionalität von NK-Zellen beeinflusst.

Zudem ist bisher nicht geklärt, welche der beiden Eigenschaften der NK-Zellen, immunregulatorisch oder zytotoxisch, *in vivo* für die Abwehr des Wirtes gegen Pilze von größerer Bedeutung ist. Dies muss in entsprechenden Modellen geklärt werden. In diesem Zusammenhang muss ebenfalls geprüft werden, ob und in welchem Maße eine aufgrund einer auftretenden GvHD benötigte medikamentöse Immunsuppression die Effektivität der applizierten NK-Zellen beeinflussen würde. Da die adoptive

Immuntherapie mit NK-Zellen in Kombination mit antimykotischen Medikamenten durchgeführt würde, muss im Vorfeld die Wirkung verschiedener Antimykotika auf die Funktionalität der NK-Zellen überprüft werden.

Wie auch eine Therapie mit NK-Zellen würde die adoptive Immuntherapie mit anti-*R. oryzae* T-Zellen in Kombination mit antimykotischen Medikamenten durchgeführt. Daher muss auch hier die Wirkung verschiedener Antimykotika und Immunsuppressiva auf die Funktionalität der generierten anti-*R. oryzae* T-Zellen überprüft werden.

In jüngster Zeit steht die Herstellung multi-spezifischer T-Zellen im Fokus des Interesses, da dies klinisch von großem Vorteil wäre. Eine Arbeitsgruppe stellte mit Hilfe verschiedener Peptide eine Population von multipathogen-spezifischen T-Zellen her, die Aktivität gegen Adenovirus (AdV), Epstein-Barr-Virus (EBV), *A. fumigatus* und *C. albicans* zeigte (Khanna et al., 2011). Allerdings reagierte letztendlich nur ein sehr geringer Teil der generierten T-Zellen auf die Stimulation mit Pilzantigenen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten anti-*R. oryzae* T-Zellen weisen zahlreiche Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen Pilzspezies, auch Genera übergreifend, auf. Um das Wirkspektrum pilz-spezifischer T-Zellen jedoch noch mehr zu erweitern, sollen in weiteren Arbeiten Kombinationen aus Antigenextrakten verschiedener Pilze zur Isolierung spezifischer T-Zellen analysiert werden z.B. *A. fumigatus*, *C. albicans*, *R. oryzae*. Hierdurch könnte eine multi-spezifische T-Zellpopulation mit dem größten kreuzreaktiven Potential hergestellt werden, was einen entscheidenden medizinischen Fortschritt bedeuten würde.

7 QUELLENVERZEICHNIS

[1] http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/Datenbankabfrage/c00_c97_krebs_gesamt.xls?__blob=publicationFile

[2] http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/Datenbankabfrage/c91_95_leukaemien.xls?__blob=publicationFile

[3] www.DSMZ.de

[4] http://www.pfdb.net/photo/mirhendi_h/box020909/standard/a_fumigatus_s.jpg

[5] <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/zygomycetes/#>, Copyright in this website and its contents is owned by, or licensed to, the University of Adelaide

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009; **460** (7259): 1117.

Akiba H, Motoki Y, Satoh M, Iwatsuki K, Kaneko F. Recalcitrant trichophytic granuloma associated with NK-cell deficiency in a SLE patient treated with corticosteroid. *Eur J Dermatol* 2001; **11** (1): 58.

Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J Vet Pharmacol Ther* 2006; **29** (2): 79.

Alderson KL, Sondel PM. Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011:379123** 1.

Algarrá I, Ortega E, Serrano MJ, Alvarez de Cienfuegos G, Gaforio JJ. Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of

natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; **33** (3): 159.

Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, et al. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 2005; **6** (5): 515.

Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 2001; **31** (9): 2680.

Balish E, Jensen J, Warner T, Brekke J, Leonard B. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *J Med Vet Mycol* 1993; **31** (2): 143.

Balish E, Warner T, Pierson CJ, Bock DM, Wagner RD. Oroesophageal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. *Med Mycol* 2001; **39** (3): 261.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; **285** (5428): 727.

Beck O, Koehl U, Tramsen L, Mousset S, Latge JP, Muller K, et al. Enumeration of functionally active anti-*Aspergillus* T-cells in human peripheral blood. *J Immunol Methods* 2008; **335** (1-2): 41.

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **130** (2): 65.

Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood* 2009; **114** (26): 5393.

Biassoni R. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol* 2009; **Chapter 14** 14.10.1.

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; **17** 189.

Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *J Immunol* 2011; **187** (3): 1369.

Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, et al. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J Immunol* 2009; **183** (4): 2407.

Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latge JP, Michan A, Loeffler J, et al. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol* 2004; **125** (3): 392.

Brill KJ, Li Q, Larkin R, Canaday DH, Kaplan DR, Boom WH, et al. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun* 2001; **69** (3): 1755.

Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 2011; **29** 1.

Busca A, Saroglia EM, Giacchino M, Vai S, Vassallo E, Fagioli F, et al. Analysis of early infectious complications in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Support Care Cancer* 1999; **7** (4): 253.

Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 1999; **189** (5): 787.

Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, d'Ostiani CF, et al. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis* 1999; **180** (6): 1957.

Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Fe d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, et al. Induction of protective T_h1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J Chemother* 1998; **10** (2): 160.

Cerwenka A, Lanier LL. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 2003; **61** (5): 335.

Chai LY, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WW, Warris A, et al. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology* 2010; **215** (11): 915.

Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg BJ. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol* 2009; **47** (3): 227.

Chai LY, van de Veerdonk F, Marijnissen RJ, Cheng SC, Khoo AL, Hectors M, et al. Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (T_h1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology* 2010; **130** (1): 46.

Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen T, et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 2004; **104** (6): 1778.

Chamilos G, Lewis RE, Lamarin G, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Zygomycetes hyphae trigger an early, robust proinflammatory response in human polymorphonuclear neutrophils through toll-like receptor 2 induction but display relative resistance to oxidative damage. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52** (2): 722.

Chamilos G, Marom EM, Lewis RE, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Predictors of pulmonary zygomycosis versus invasive pulmonary aspergillosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2005; **41** (1): 60.

Chaudhary N, Staab JF, Marr KA. Healthy human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PLoS One* 2010; **5** (2): e9036.

Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; **206** (2): 299.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22** (11): 633.

Cusumano V, Rossano F, Merendino RA, Arena A, Costa GB, Mancuso G, et al. Immunobiological activities of mould products: functional impairment of human monocytes exposed to aflatoxin B1. *Res Microbiol* 1996; **147** (5): 385.

Dagenais TR, Giles SS, Amanianda V, Latge JP, Hull CM, Keller NP. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect Immun* 2010; **78** (2): 823.

Dague E, Alsteens D, Latge JP, Dufrene YF. High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys J* 2008; **94** (2): 656.

Davison GM, Novitzky N, Kline A, Thomas V, Abrahams L, Hale G, et al. Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells. *Transplantation* 2000; **69** (7): 1341.

De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* 2010; **3** (4): 361.

Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005; **174** (9): 5243.

Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; **26** (4): 781.

Diamond RD. Fungal surfaces: effects of interactions with phagocytic cells. *Rev Infect Dis* 1988; **10 Suppl 2** S428.

Diamond RD, Krzesicki R, Epstein B, Jao W. Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes *in vitro*. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol* 1978; **91** (2): 313.

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 2003; **26** (4): 332.

Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J Exp Med* 1989; **170** (4): 1451.

Dykewicz CA. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: focus on community respiratory virus infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7 Suppl** 19S.

Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Loffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; **99** (11): 3916.

Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, Colone M, et al. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* 2008; **76** (4): 1719.

Farag SS, Fehniger T, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 2002; **4** (5): 445.

Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13** (2): 169.

Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 2010; **78** (10): 4392.

Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006; **134** (1): 64.

Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, et al. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 2011; **7** (11): e1002372.

Frohn C, Doehn C, Durek C, Bohle A, Schlenke P, Jocham D, et al. Feasibility of the adoptive transfusion of allogenic human leukocyte antigen-matched natural killer cells in patients with renal cell carcinoma. *J Immunother* 2000; **23** (4): 499.

Gamen S, Hanson DA, Kaspar A, Naval J, Krensky AM, Anel A. Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* 1998; **161** (4): 1758.

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; **195** (3): 327.

Gil-Lamaignere C, Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon- gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. *Journal of Infectious Diseases* 2005; **191** (7): 1180.

Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI, et al. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* 2004; **114** (11): 1612.

Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005; **175** (3): 1636.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 2007; **111** (Pt 5): 509.

Hidore MR, Murphy JW. Correlation of natural killer cell activity and clearance of *Cryptococcus neoformans* from mice after adoptive transfer of splenic nylon wool-nonadherent cells. *Infect Immun* 1986; **51** (2): 547.

Ho JW, Hershkovitz O, Peiris M, Zilka A, Bar-Ilan A, Nal B, et al. H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44. *J Virol* 2008; **82** (4): 2028.

Hof H, Heinz W, (HRSG.). Kompendium Medizinische Mykologie. *Aesopus Verlag e.K., Linkenheim-Hochstetten*, 2010

Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol* 2006; **18** (4): 465.

Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Esser R, Brinkmann A, Tramsen L, et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and *in vivo* influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother* 2010; **33** (2): 200.

Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* 2003; **71** (2): 891.

Jimenez BE, Murphy JW. *In vitro* effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun* 1984; **46** (2): 552.

Johansson SE, Rollman E, Chung AW, Center RJ, Hejdeman B, Stratov I, et al. NK cell function and antibodies mediating ADCC in HIV-1-infected viremic and controller patients. *Viral Immunol* 2011; **24** (5): 359.

Kalwak K, Moson I, Cwian J, Gorczynska E, Toporski J, Turkiewicz D, et al. A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of t-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors. *Transplant Proc* 2003; **35** (4): 1551.

Kalwak K, Turkiewicz D, Ussowicz M, Gorczynska E, Toporski J, Ryczan R, et al. Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. *Transplant Proc* 2003; **35** (4): 1559.

Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; **319** (6055): 675.

Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A, et al. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 2001; **167** (1): 350.

Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, Takaku K, Kondo S, Yonehara S, et al. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1996; **156** (10): 3678.

Khanna N, Stuehler C, Conrad B, Lurati S, Krappmann S, Einsele H, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 2011; **118** (4): 1121.

Koehl U, Sorensen J, Esser R, Zimmermann S, Gruttner HP, Tonn T, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **33** (3): 261.

Kontoyiannis DP, Lionakis MS, Lewis RE, Chamilos G, Healy M, Perego C, et al. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *J Infect Dis* 2005; **191** (8): 1350.

Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; **50** (8): 1091.

Krensky AM. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol* 2000; **59** (4): 317.

Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens* 2009; **73** (3): 193.

Krishnaraj R, Svanborg A. Low natural killer cell function in disseminated aspergillosis. *Scand J Infect Dis* 1993; **25** (4): 537.

Kruger WH, Bohlius J, Cornely OA, Einsele H, Hebart H, Massenkeil G, et al. Antimicrobial prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. Guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the german society of haematology and oncology. *Ann Oncol* 2005; **16** (8): 1381.

Lang P, Schumm M, Greil J, Bader P, Klingebiel T, Muller I, et al. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 2005; **217** (6): 334.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; **23** 225.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12** (2): 310.

Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 2010; **468** (7322): 447.

Lee KW, Balish E. Systemic candidosis in germfree, flora-defined and conventional nude and thymus-bearing mice. *J Reticuloendothel Soc* 1981; **29** (1): 71.

Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; **110** (13): 4576.

Lehrnbecher T, (HRSG.). Infektionsmanagement in der pädiatrischen Hämatologie/Onkologie. *UNI-MED Verlag AG, Bremen, 2007*

Lehrnbecher T, Welte K. Haematopoietic growth factors in children with neutropenia. *Br J Haematol* 2002; **116** (1): 28.

Leiden JM, Karpinski BA, Gottschalk L, Kornbluth J. Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression. *J Immunol* 1989; **142** (6): 2140.

Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004; **76** (6): 1171.

Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun* 2004; **72** (12): 6817.

Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; **32** (3): 358.

Lipscomb MF, Alvarellos T, Toews GB, Tompkins R, Evans Z, Koo G, et al. Role of natural killer cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* infections in mice. *Am J Pathol* 1987; **128** (2): 354.

Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 2007; **9** (2): 368.

Ma LL, Wang CL, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. NK cells use perforin rather than granulysin for anticryptococcal activity. *J Immunol* 2004; **173** (5): 3357.

Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; **409** (6823): 1055.

Marr KJ, Jones GJ, Zheng C, Huston SM, Timm-McCann M, Islam A, et al. *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun* 2009; **77** (6): 2436.

Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* 1999; **162** (3): 1633.

Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Mol Ther* 2010; **18** (7): 1379.

Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; **105** (8): 3051.

Molldrem JJ. Vaccinating transplant recipients. *Nat Med* 2005; **11** (11): 1162.

Morrison BE, Park SJ, Mooney JM, Mehrad B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest* 2003; **112** (12): 1862.

Moss BJ, Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. Quantifying metabolic activity of filamentous fungi using a colorimetric XTT assay. *Biotechnol Prog* 2008; **24** (3): 780.

Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol* 2005; **5** (1): 9.

Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 2007; **179** (8): 5367.

Murciano C, Villamon E, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells. *Infect Immun* 2006; **74** (2): 1403.

Murdock BJ, Shreiner AB, McDonald RA, Osterholzer JJ, White ES, Toews GB, et al. Coevolution of Th1, Th2, and Th17 responses during repeated pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 2011; **79** (1): 125.

Murphy JW, McDaniel DO. *In vitro* reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1982; **128** (4): 1577.

Murphy JW, Zhou A, Wong SC. Direct interactions of human natural killer cells with *Cryptococcus neoformans* inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* 1997; **65** (11): 4564.

Nabavi N, Murphy JW. Antibody-dependent natural killer cell-mediated growth inhibition of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986; **51** (2): 556.

Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; **48** (3): 265.

Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des* 2006; **12** (32): 4195.

Nosari A, Oreste P, Montillo M, Carrafiello G, Draisci M, Muti G, et al. Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection. *Haematologica* 2000; **85** (10): 1068.

Ochs L, Shu XO, Miller J, Enright H, Wagner J, Filipovich A, et al. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood* 1995; **86** (10): 3979.

Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis* 2007; **45** (9): 1161.

Paris S, Debeaupuis JP, Cramer R, Carey M, Charles F, Prevost MC, et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69** (3): 1581.

Park SJ, Hughes MA, Burdick M, Strieter RM, Mehrad B. Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* 2009; **182** (7): 4306.

Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kuhne T, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 2004; **18** (11): 1835.

Pena J, Alonso C, Solana R, Serrano R, Carracedo J, Ramirez R. Natural killer susceptibility is independent of HLA class I antigen expression on cell lines obtained from human solid tumors. *Eur J Immunol* 1990; **20** (11): 2445.

Pena SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 1997; **9** (2): 117.

Peppas D, Micco L, Javaid A, Kennedy PT, Schurich A, Dunn C, et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 2010; **6** (12): e1001227.

Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998; **161** (11): 5821.

Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* 2005; **106** (13): 4397.

Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; **188** (5): 953.

Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control* 2011; **18** (4): 268.

Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood* 2004; **104** (13): 4157.

Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 2007; **27** (6): 965.

Przepiora D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15** (6): 825.

Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant* 2003; **31** (8): 687.

Raper KaF, D. I. The Genus *Aspergillus*. *The Williams & Wilkins Company, Baltimore*, 1965

Rauser G, Einsele H, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 2004; **103** (9): 3565.

Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 2005; **22** (1): 1.

Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13** (2): 236.

Riddell SR, Walter BA, Gilbert MJ, Greenberg PD. Selective reconstitution of CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses in immunodeficient bone marrow transplant recipients by the adoptive transfer of T cell clones. *Bone Marrow Transplant* 1994; **14** Suppl 4 S78.

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; **257** (5067): 238.

Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2002; **71** (2): 173.

Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol* 1990; **145** (10): 3194.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; **76** (12): 2421.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 2005; **41** (5): 634.

Roilides E, Holmes A, Blake C, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Antifungal activity of elutriated human monocytes against *Aspergillus fumigatus* hyphae: enhancement by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. *J Infect Dis* 1994; **170** (4): 894.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; **4** (1): 1.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2011; **11** (4): 275.

Romani L, Puccetti P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* 2006; **14** (4): 183.

Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999; **94** (1): 333.

Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; **20** 323.

Safdar A, Rodriguez G, Ohmagari N, Kontoyiannis DP, Rolston KV, Raad, II, et al. The safety of interferon-gamma-1b therapy for invasive fungal infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* 2005; **103** (4): 731.

Safdar A, Rodriguez GH, Lichtiger B, Dickey BF, Kontoyiannis DP, Freireich EJ, et al. Recombinant interferon gamma1b immune enhancement in 20 patients with hematologic malignancies and systemic opportunistic infections treated with donor granulocyte transfusions. *Cancer* 2006; **106** (12): 2664.

Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 1989; **11 Suppl 7** S1532.

Scaringi L, Blasi E, Rosati E, Marconi P, Bistoni F. Fungicidal activity of *Candida albicans*-induced murine lymphokine-activated killer cells against *C. albicans* hyphae *in vitro*. *J Gen Microbiol* 1991; **137** (12): 2851.

Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest* 1982; **69** (3): 617.

Schmidt KN, Leung B, Kwong M, Zarembek KA, Satyal S, Navas TA, et al. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* 2004; **172** (1): 138.

Schneider P, Bodmer JL, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, et al. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* 1997; **272** (30): 18827.

Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997; **416** (3): 329.

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 1997; **7** (6): 831.

Seidel MG, Peters C, Wacker A, Northoff H, Moog R, Boehme A, et al. Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Bone Marrow Transplant* 2008; **42** (10): 679.

Shelton BG, Kirkland KH, Flanders WD, Morris GK. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68** (4): 1743.

Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101** (27): 10116.

Sivori S, Parolini S, Marcenaro E, Castriconi R, Pende D, Millo R, et al. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2000; **107** (2): 220.

Sivori S, Parolini S, Marcenaro E, Millo R, Bottino C, Moretta A. Triggering receptors involved in natural killer cell-mediated cytotoxicity against choriocarcinoma cell lines. *Hum Immunol* 2000; **61** (11): 1055.

Smyth MJ, Street SE, Trapani JA. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J Immunol* 2003; **171** (2): 515.

Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 1999; **162** (11): 6658.

Spreu J, Kuttruff S, Stejfova V, Dennehy KM, Schitteck B, Steinle A. Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107** (11): 5100.

Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* 2005; **105** (6): 2258.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; **282** (5386): 121.

Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, Paulussen M, Gratwohl A, Klingebiel T, Bader P, Tichelli A, Schwabe D, Koehl U. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant* 2012 Sep 3. doi: 10.1038/bmt.2012.162. [Epub ahead of print]

Stuehler C, Khanna N, Bozza S, Zelante T, Moretti S, Kruhm M, et al. Cross-protective TH1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Blood* 2011; **117** (22): 5881.

Sun HY, Singh N. Mucormycosis: its contemporary face and management strategies. *Lancet Infect Dis* 2011; **11** (4): 301.

Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother* 1992; **1** (2): 115.

Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med* 2009; **266** (2): 154.

Szymczak WA, Deepe GS, Jr. The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity. *J Immunol* 2009; **183** (3): 1964.

Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; **292** (16): 832.

Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975; **292** (17): 895.

Tramsen L, Beck O, Schuster FR, Hunfeld KP, Latge JP, Sarfati J, et al. Generation and characterization of anti-Candida T cells as potential immunotherapy in patients with *Candida infection* after allogeneic hematopoietic stem-cell transplant. *J Infect Dis* 2007; **196** (3): 485.

Tramsen L, Koehl U, Tonn T, Latge JP, Schuster FR, Borkhardt A, et al. Clinical-scale generation of human anti-*Aspergillus* T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2009; **43** (1): 13.

Trapani JA. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. *Int Rev Cytol* 1998; **182** 111.

Trapani JA, Jans P, Smyth MJ, Froelich CJ, Williams EA, Sutton VR, et al. Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. *Cell Death Differ* 1998; **5** (6): 488.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; **2** (10): 735.

Trenchel R, Peceny R, Runde V, Elmaagacli A, Dermoumi H, Heintschel von Heinegg E, et al. Fungal colonization and invasive fungal infections following allogeneic BMT using metronidazole, ciprofloxacin and fluconazole or ciprofloxacin and fluconazole as intestinal decontamination. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26** (9): 993.

Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L, Perussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* 1984; **160** (4): 1147.

Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; **44** (4): 531.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; **8** (4): 668.

van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11** (4): 305.

Veugelers K, Motyka B, Goping IS, Shostak I, Sawchuk T, Bleackley RC. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell* 2006; **17** (2): 623.

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9** (5): 503.

Wahba H, Truong MT, Lei X, Kontoyiannis DP, Marom EM. Reversed halo sign in invasive pulmonary fungal infections. *Clin Infect Dis* 2008; **46** (11): 1733.

Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner CA, et al. Perforin enhances the granulysin-induced lysis of *Listeria innocua* in human dendritic cells. *BMC Immunol* 2007; **8** 14.

Wallace ME, Smyth MJ. The role of natural killer cells in tumor control--effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2005; **27** (1): 49.

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; **333** (16): 1038.

Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol* 2002; **17** (3): 211.

Wiseman JC, Ma LL, Marr KJ, Jones GJ, Mody CH. Perforin-dependent cryptococcal microbicidal activity in NK cells requires PI3K-dependent ERK1/2 signaling. *J Immunol* 2007; **178** (10): 6456.

Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; **285** (5428): 730.

Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 1998; **188** (12): 2375.

Zhang R, Zheng X, Li B, Wei H, Tian Z. Human NK cells positively regulate gammadelta T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2006; **176** (4): 2610.

Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore BB, et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* 2009; **175** (6): 2489.

Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 2004; **173** (6): 3716.

8 ANHANG

A. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen.....	1
Abbildung 1.2: Verlauf einer hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	2
Abbildung 1.3: Immunrekonstitution und Infektionsmusters nach allogener Stammzelltransplantation.	8
Abbildung 1.4: Schematischer Darstellung von <i>A. fumigatus</i> und seines Lebenszyklus.	11
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von <i>R. oryzae</i>	12
Abbildung 1.6: Mikroskopische Aufnahmen von <i>Aspergillus fumigatus</i> und <i>Rhizopus oryzae</i>	13
Abbildung 1.7: Übersicht der Zellwandbestandteile und sezernierter Moleküle von Konidien und Hyphen von <i>A. fumigatus</i>	15
Abbildung 1.8: Übersicht der Wirksamkeit einiger gängiger antimykotischer Medikamente gegenüber wichtigen Verursachern von invasiven Pilzinfektionen.....	18
Abbildung 1.9: Immunabwehr von Pilzinfektionen.	21
Abbildung 1.10: Differenzierung zytotoxischer CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen.	23
Abbildung 1.11: Regulation der Immunantwort bei Pilzinfektionen durch die verschiedenen T _H -Subpopulationen.	26
Abbildung 1.12: Subpopulationen der humanen NK-Zellen.....	27
Abbildung 1.13: Regulierung der NK-Zell-Aktivität durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren.	29
Abbildung 1.14: Hypothesen zur Wirkweise von Perforin.	33
Abbildung 2.1: Isolierung primärer humaner NK-Zellen mittels STEMCELL EasySep® immunomagnetischen Zellseparation.	55
Abbildung 2.2: Isolierung primärer humaner Zellen aus peripherem Blut mittels MACS® immunomagnetischen Zellseparation.....	57
Abbildung 2.3: Schema der Generierung anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen aus mononukleären Zellen.	58
Abbildung 3.1: Antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber <i>Aspergillus fumigatus</i>	67
Abbildung 3.2: Schädigung der Hyphen von <i>Aspergillus fumigatus</i> bei unterschiedlichen Verhältnissen von Pilz zu NK-Zellen.....	68
Abbildung 3.3: Antimykotische Wirkung humaner NK-Zellen gegenüber <i>Rhizopus oryzae</i>	69
Abbildung 3.4: Aktivierung primärer humaner NK-Zellen durch <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i>	71
Abbildung 3.5: Einfluss von Hydrophobin A auf die Aktivierung frisch isolierter NK-Zellen durch <i>A. fumigatus</i> Konidien.....	72
Abbildung 3.6: Degranulierung IL-2 stimulierter NK-Zellen in Gegenwart von <i>R. oryzae</i> Hyphen.	74

Abbildung 3.7: Schädigung von <i>A. fumigatus</i> Hyphen durch Kulturüberstand IL-2 stimulierter NK-Zellen.	75
Abbildung 3.8: Isoliertes Perforin schädigt Hyphen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> . 76	
Abbildung 3.9: Perforinkonzentration in Überständen IL-2 stimulierter NK-Zellen in An- und Abwesenheit von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> Hyphen. ..	77
Abbildung 3.10: Zusammenhang zwischen der Sekretion von Perforin durch NK-Zellen und ihrer antimykotischer Aktivität.	78
Abbildung 3.11: Concanamycin A vermindert die Sekretion von Perforin und die antimykotische Wirkung IL-2 stimulierter NK-Zellen.....	79
Abbildung 3.12: Einfluss von <i>A. fumigatus</i> auf die Zytokinkonzentration in Überständen von IL-2 stimulierte NK-Zellen.	81
Abbildung 3.13: Einfluss von <i>R. oryzae</i> auf die Zytokinkonzentration in Überständen von IL-2 stimulierte NK-Zellen.	82
Abbildung 3.14: Einfluss von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. oryzae</i> auf die Vitalität IL-2 stimulierter NK-Zellen.	83
Abbildung 3.15: Frequenz <i>R. oryzae</i> -spezifischer T-Zellen in gesunden Individuen. ...	85
Abbildung 3.16: Produktion von IFN- γ und TNF- α durch die generierte CD3 ⁺ CD4 ⁺ Zellpopulation nach Stimulation mit <i>R. oryzae</i> -Antigenpräsentierende Zellen.	88
Abbildung 3.17: Sekretion von IFN- γ und TNF- α durch die generierten T-Zellen nach Stimulation mit <i>R. oryzae</i> -Antigenpräsentierenden Zellen.....	89
Abbildung 3.18: Proliferation der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen nach Stimulation.	90
Abbildung 3.19: Alloreaktives Potential der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen.....	91
Abbildung 3.20: Sekretion von IFN- γ durch die generierten T-Zellen und unselektionierte T-Zellen nach Stimulation mit allogenen Antigenpräsentierenden Zellen.....	92
Abbildung 3.21: Einfluss der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen auf Phagozyten.....	94
Abbildung 3.22: Kreuzreaktivitäten der generierten anti- <i>R. oryzae</i> T-Zellen gegenüber anderen Pilzen.	95

B. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Einteilung der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (<i>graft-versus-host disease</i> , GvHD) nach Schwere der Symptome	6
Tabelle 1.2: Algorithmen der antimykotischen Chemotherapie.....	17
Tabelle 3.1: Expansion der isolierten anti- <i>R. oryzae</i> Zellen.....	86
Tabelle 3.2: Phänotypische Charakterisierung der generierten Zellpopulation.	87

C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ADCC	<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i> = antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Tandemfluorochrom kombiniert aus Allophycocyanin und einem Cyaninfärbstoff
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
B-LCL	<i>B-lymphoblastoid cell line</i> = B-Lymphoblastoid Zelllinie
BSA	<i>bovine serum albumin</i> = Rinderalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> = Nomenklatur für Oberflächenantigene
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat- <i>N</i> -succinimidyl-ester
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CMA	Concanamycin A
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> = zytotoxischer T Lymphozyt
DZ	Dendritische Zelle
DHR	Dihydrorhodamin 123

DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	<i>double negative</i>
DNS	Desoxiribonukleinsäure
DP	<i>double positive</i>
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
E:T	<i>effector : target ratio</i> = Verhältnis von Effektorzelle zu Zielzelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	chemotaktisches Peptid N-formyl-MetLeuPhe (Methionin, Leucin, Phenylalanin)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i> = Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> = Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GvHD	<i>graft versus host disease</i> = Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung
GvL, -T	<i>graft versus leukemia, -tumor</i> = Spender-gegen-Leukämie, -Tumor Reaktion
Gy	Gray
HFP	<i>human frozen plasma</i> = gefrorenes humanes Plasma
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> = Humanes Leukozytenantigen

HRP	<i>horseshoe-oxidase</i> = Meerrettichperoxidase
HS	humanes Serum
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HvGD	<i>host versus graft disease</i> = Empfänger-gegen-Spender-Erkrankung
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i> = Killer-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KM	Knochenmark
KMÜ	kortiko-medulläre Übergangszone
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNZ	Mononukleäre Zelle (Lymphozyten und Monozyten)
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i> = Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor

NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NKT-Zelle	<i>natural killer-like T cell</i> = Natürliche Killer-ähnliche T-Zelle
OD	Optische Dichte
OKT-3	Muromonab-CD3 (therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen CD3 gerichtet)
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> =
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheres Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat gepufferte Salzlösung
PBSZ	periphere Blutstammzellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PE-Cy7	Tandemfluorochrom kombiniert aus Phytoerythrin und einem Cyaninfarbstoff
PerCP	fluoreszierenden Peridinin-Chlorophyll Komplex aus Dinoflagellaten
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate
PMT	Photomultiplier
PMZ	polymorph mononukleäre Zelle
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> =
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> ; ein Chemokin (CCL5)
REP	<i>rapid expansion protocol for T cells</i> ; Kulturprotokoll zur schnellen Expansion von T-Zellen

rh	rekombinant und human
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium von Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficiency disorders</i> = schwerer kombinierter Immundefekt
SCS	<i>stem cell selection</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> = kleine störende Ribonukleinsäure
SP	<i>single positive</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TAK	Tetramer-Antikörper-Komplexen
TEZ	thymische Epithelzelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T _{Helfer} -Zelle
TLR	<i>toll-like receptor</i> = Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i> = Tumornekrosefaktor zugehöriger Apoptose Induzierender Ligand
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit</i> = Einheit
V450	ein Cumarin-Farbstoff
V500	ein organischer Farbstoff
XTT	2,3-bis-[2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxyanilid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

D. GERÄTEVERZEICHNIS

Geräte

Brutschrank BBD 6220	Heraeus Kendo, Langensfeld
Brutschrank FUNCTION line	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0RS	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Rotina 46	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Hämatologisches Zählgerät Coulter A ^c •T diff Hematology Analyzer	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Durchlichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus, Hamburg
Auflichtmikroskop Olympus IM	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer FACSCantoII™ Flow Cytometer (mit Argonlaser und 525, 575, 620,675, 755 nm Bandpassfilter)	BD Biosciences, San Jose, USA
Bestrahlungsgerät IBL 437C	CIS Bio international, Bagnols, Frankreich
Tiefkühlschrank, Hera freeze (-80 °C)	Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Vortexer IKA® Minishaker MS1	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Autoklav Systec VX-55	Systec GmbH - Labor Systemtechnik, Wettenberg
Photometer Wallac Victor ³ ™ 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer, Waltham, USA
Sterilbank HERAsafe HS15	Kendo Laboratory Products, Hanau
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter inoLab® pH 730	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Waage Sartorius Research R160P-D1	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage SCALTEC spe53	SCALTEC Instruments, Heiligenstadt
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

12-Kanal Pipette, Finnipipette®

Thermo Scientific, Schwerte

MidiMACS™ Separator

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

MiniMACS™ Separator

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

EasySep® Magnet

STEMCELL Technologies SARL,
Grenoble, Frankreich

E. EIDESSTATTLICHER ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnung aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt, den 01.10.2012

.....
Stanislaw Schmidt

F. LEBENS LAUF

Stanislaw Schmidt

Geburtsdatum 1. Juli 1979

Geburtsort Nowosibirsk



PROMOTION

seit 11/2010 an der J.W. Goethe Universität Frankfurt,
Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler bei
Prof. Dr. Rolf Marschalek
und im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Klinik III bei
Prof. Dr. Thomas Klingebiel
im Labor für Infektionsimmunologie bei
Prof. Dr. T. Lehrnbecher

seit 06/2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter
an der Klinik der J.W. Goethe Universität Frankfurt,
im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Klinik III bei
Prof. Dr. Thomas Klingebiel
im Labor für Infektionsimmunologie bei
Prof. Dr. T. Lehrnbecher

HOCHSCHULAUSSCHULUNG

07/2007 Abschluss in Diplom-Biologie an der J.W. Goethe Universität
Frankfurt

07/2006 - 06/2007 Praktische Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut - Bundesamt für
Sera und Impfstoffe, Langen,
in der Abteilung Medizinische Biotechnologie
bei Prof. Dr. K. Cichutek

im Arbeitskreis von PD Dr. C. Münk
mit dem Thema
„Charakterisierung des HIV-1 Δ vif-Bet Virus sowie die
Charakterisierung der Bet-Interaktionsdomäne im humanen
APOBEC3C“

10/2005 - 12/2005 Praktikum am Paul-Ehrlich-Institut - Bundesamt für Sera und
Impfstoffe, Langen,
in der Abteilung Medizinische Biotechnologie
bei Prof. Dr. K. Cichutek
im Arbeitskreis von PD Dr. E. Flory
mit dem Thema
„Interaktion von APOBEC3-Proteinen mit humanen LINE-1“

09/2001 - 06/2007 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
mit den Hauptfächern Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie und
Virologie

SCHULAUSSBILDUNG

08/1996 - 06/2000 Staatliches Heinrich Heine Gymnasium Kaiserslautern
mit dem Abschluss Allgemeine Hochschulreife

08/1996 - 06/1996 Kurpfalz Realschule Kaiserslautern
mit dem Abschluss Mittlere Reife

09/1986 - 06/1990 Mittlere Schule Nr. 19 Nowosibirsk
Grundschule

Frankfurt am Main, den 01.10.2012

G. EIGENE PUBLIKATIONEN

Lehrnbecher T, **Schmidt S**, Tramsen L, and Klingebiel T. Immunotherapy of invasive fungal infection in hematopoietic stem cell transplant recipients.

Front. Oncol. 3:17. doi: 10.3389/fonc.2013.00017

Tramsen L, **Schmidt S**, Koehl U, Huenecke S, Latgé JP, Roeger F, Schubert, R, Klingebiel T, and Lehrnbecher T. Effects of antifungal compounds on functional properties of human antifungal T_H1 cells.

(Manuskript eingereicht)

Schmidt S, Zimmermann SY, Tramsen L, Koehl U, and Lehrnbecher T. Natural Killer Cells and Antifungal Host Response.

Clin Vaccine Immunol. 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]

Tramsen L, **Schmidt S**, Boenig H, Latgé JP, Lass-Flörl C, Roeger F, Seifried E, Klingebiel T, and Lehrnbecher T. Clinical-scale generation of multi-specific antifungal T cells targeting *Candida*, *Aspergillus* and mucormycetes.

Cytotherapy 2013; 15(3):344-351.

Lehrnbecher T, Kalkum M, Champer J, Tramsen L, **Schmidt S**, and Klingebiel T. Immunotherapy in Invasive Fungal Infection-Focus on Invasive Aspergillosis.

Curr Pharm Des. 2012 Dec 26. [Epub ahead of print]

Schmidt S, Tramsen L, Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hanisch M, Röger F, Koehl U, and Lehrnbecher T. *Rhizopus oryzae* hyphae are killed by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity.

Immunobiology 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.10.013>

Schmidt S, Tramsen, L, Perkhofer, S, Lass-Flörl, C, Röger, F, Schubert, R, and Lehrnbecher, T. Characterization of the cellular immune responses to Mucormycetes and impact on immunotherapeutic strategies in hematopoietic stem cell transplantation.

J Infect Dis. 2012; 206(1):135-9.

Lehrnbecher T, Tramsen L, Koehl U, **Schmidt S**, Bochennek K, Klingebiel T. Immunotherapy against invasive fungal diseases in stem cell transplant recipients.

Immunol Invest. 2011; 40(7-8):839-52.

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Latgé JP, Huenecke S, Koehl U, Lehrnbecher T. Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia.

J Infect Dis. 2011; 203(3):430-5.

Lehrnbecher T, **Schmidt S**, Koehl U, Schuster FR, Uharek L, Klingebiel T, Tramsen L. Adoptive antifungal T cell immunotherapy — into the clinic?

Med Mycol. 2011; 49 Suppl 1:S164-S9.

Tramsen L, **Schmidt S**, Roeger F, Koehl U, Lehrnbecher T. Challenges and prospects of adoptive immunotherapy in prevention and treatment of opportunistic mycoses in hematologic transplant recipients. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(6):444-9.

Perkovic M, **Schmidt S**, Marino D, Russell RA, Stauch B, Hofmann H, Kopietz F, Kloke BP, Zielonka J, Strover H, Hermle J, Lindemann D, Pathak VK, Schneider G, Löchelt M, Cichutek K, Münk C. Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J Biol Chem.* 2009; 284(9):5819-26.

H. KONGRESSBEITRÄGE

Lehrnbecher T, Tramsen L, Perkhofer S, Lass-Flörl C, Röger F, Schubert R, and **Schmidt S**. Characterization of the Cellular Immune Responses to *Rhizopus oryzae* and Impact on Immunotherapeutic Strategies in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 52nd ICAAC, September 2012, Chicago, USA

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Koehl U, Lehrnbecher T. The interaction of human natural killer cells with *Aspergillus fumigatus*. *Omics & Aspergillosis: past and future*, Mai 2012, Deshaies, Frankreich

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Koehl U, Lehrnbecher T. Natural Killer cells exhibit direct activity against hyphae, but not against conidia of *Aspergillus fumigatus*. 5th Trends in Medical Mycology (TIMM), Oktober 2011, Valencia, Spanien

Tramsen L, **Schmidt S**, Koehl U, Roeger F, Boenig H, Lehrnbecher T. Clinical-Scale Generation of Functionally Active Multispecific Antifungal T-Cells that Target *Aspergillus*, *Candida*, and *Zygomycetes*. 51st ICAAC, September 2011, Chicago, USA

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Koehl U, Lehrnbecher T. Natural Killer cells exhibit direct activity against hyphae, but not against conidia of *Aspergillus fumigatus*. 6th International Cellular Therapy Symposium, März 2011, Erlangen (Poster)

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch L, Huenecke S, Koehl U, Lehrnbecher L. Natural Killer cells exhibit direct activity against hyphae, but against resting conidia of *Aspergillus fumigatus*. 36. Jahrestagung GNPI / 18. Jahrestagung DGPI, Juni 2010, Saarbrücken

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Huenecke S, Koehl U, Lehrnbecher T (2009) Natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus*. 4th Advances Against Aspergillosis, Februar 2010, Rom, Italien

Lehrnbecher T , Tramsen L, Hanisch M, Huenecke S, Koehl U, **Schmidt S**. Natural killer cells exhibit direct activity against medical important fungi. *International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)*, Mai 2009, Tokyo, Japan

Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Huenecke S, Koehl U, Lehrnbecher T. Natural killer cells exhibit direct activity against medical important fungi. *Kind-Philipp Tagung*, Juni 2009, Wilsede

I. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin - Klinik III der Johann Wolfgang Goethe Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Klingebiel in Frankfurt am Main angefertigt.

Ich möchte mich bei den vielen Menschen, die einen Anteil an dieser Arbeit hatten herzlich bedanken! Insbesondere gilt mein Dank:

Prof. Dr. Thomas Klingebiel für die Möglichkeit am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt am Main promovieren zu dürfen.

Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Bereitschaft diese Arbeit am Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Universität Frankfurt zu betreuen.

Prof. Dr. Thomas Lehrnbecher für die Möglichkeit an sehr interessanten Projekten arbeiten zu können, die Chance mich wissenschaftlich frei entwickeln zu können und die tolle Betreuung in allen Bereichen.

Prof. Dr. Ulrike Köhl für die Bereitstellung ihres umfangreichen Wissens, für die anregenden Diskussionen rund um die NK-Zellen und der Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Lars Tramsen, Frauke Röger, Mitra Hanisch und Roswitha Lehne für die Unterstützung im Alltag und für das freundliche Arbeitsklima.

Dem KMT-Labor (in alphabetischer Reihenfolge): Andrea, Claudia, Melanie, Michael, Olga, Rabiä, Regine, Ruth, Sabine, Sibylle, Sibylle, Stephan, Stephanie, Tanja – für das Beantworten zahlreicher Fragen und für die vielen Tipps und Tricks und sonstige Unterstützung.

Robert J., der seit dem 1. Exkurs mir stets in allen Situationen zur Seite steht.

Einen besonderen Dank an meine Eltern, meine Großeltern und meine Schwester, die mir die meine Ausbildung ermöglichten und mich bei jedem Schritt meines Lebens unterstützen.

Und ein riesiges Dankeschön an Vanessa! Dafür, dass du mir den Rücken freihältst! Dafür, dass du mich zum Lachen bringst! Für die zwei tollen Kinder! Und, und, und...! Tausendfach Danke!!