

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II,
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Invasive Mykosen – Prognose und Diagnose mittels *Aspergillus fumigatus*-
spezifischer CD154⁺/CD4⁺ Zellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johanna Charlotte Helm

aus Würzburg

Würzburg, September 2019

Referent: Prof. Dr. med. Andrew J. Ullmann
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Wagener
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. August 2020

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> und Aspergillose	1
1.1.1	Biologische und pathologische Charakteristika von <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.2	Spektrum <i>Aspergillus</i> -assoziierter Erkrankungen	2
1.1.3	Diagnostik der invasiven (pulmonalen) Aspergillose	6
1.1.4	Therapie	11
1.2	Mechanismen der Immunabwehr gegen <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.2.1	Das humane Immunsystem – ein Überblick	12
1.2.2	Angeborene und adaptive Immunmechanismen gegen <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
1.2.3	Bedeutung der T-Helfer-Zellen für die Immunantwort	16
1.3	Relevanz der T-Zell-Antwort für die Diagnostik in der klinischen Mykologie	18
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Reagenzien	23
2.1.1.1	Reagenzien für die Zellkultur	23
2.1.1.2	Reagenzien für die Aufreinigung von PBMC	23
2.1.1.3	Reagenzien für die Durchflusszytometrie	23
2.1.2	Einmalige Materialvorbereitung für die Zellkultur	24
2.1.3	Antikörper	24
2.1.4	Technisches Equipment	24
2.1.4.1	Biochemisches und molekularbiologisches Equipment	24
2.1.4.2	Zellkultur-Equipment	25
2.1.5	Spezielle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	25
2.1.6	Software	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Präanalytische Methoden	26
2.2.1.1	Studienpopulation	26
2.2.1.2	Blutentnahme	27
2.2.1.3	Gewinnung autologen Serums	27
2.2.1.4	Isolation von PBMC aus Vollblut	27
2.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl	28

2.2.1.6	Ausplattieren der Zellen.....	28
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.2.1	Stimulation von PBMC mit <i>A. fumigatus</i> – Standardprotokoll.....	28
2.2.2.2	Behandlung von PBMC mit Immunsuppressiva	29
2.2.2.3	Ernte von PBMC	30
2.2.3	Präanalytik <i>Time Course</i>	30
2.2.4	Detektion <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Zellen aus Vollblut	31
2.2.5	Analytische Methoden	32
2.2.5.1	Immunfluoreszenz-Färbung	32
2.2.5.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Antigen-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenz	33
2.2.5.3	Qualitätskontrolle	34
2.2.6	Statistik.....	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Agitation und Verdünnung von Blutproben mit RPMI-Medium verlängern das präanalytische Fenster bei der Quantifizierung <i>A. fumigatus</i>-spezifischer T-Zellen...	35
3.2	Optimierung eines Vollblut-basierten Protokolls	37
3.2.1	Kurzzeitige Zwischenlagerung der Proben bei Raumtemperatur ist für den Vollblut-basierten Assay möglich.....	38
3.2.2	Alleinige Stimulation bei Raumtemperatur ist für den Vollblut-basierten Assay nicht möglich	40
3.2.3	Optimierung der Stimulationsperioden führt zu einer Sensitivitätssteigerung der Protokolle	41
3.2.4	Der Konversionsfaktor für das Vollblut-basierte Protokoll ist reproduzierbar	47
3.2.5	Vorbereitete und eingefrorene Testsysteme liefern vergleichbare Werte.....	49
3.2.6	Kostenanalyse.....	50
3.3	Untersuchung des Einflusses von Immunsuppressiva auf die Quantifizierung <i>A. fumigatus</i>-spezifischer T-Zellen	52
4	DISKUSSION	54
4.1	Die Bestimmung <i>A. fumigatus</i>-spezifischer T-Helfer-Zellen unter Verwendung eines PBMC- oder Vollblut-basierten Protokolls	54
4.2	Anwendungsgebiete von Protokollen zur Bestimmung spezifischer	

	T-Helfer-Zellen.....	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	66
6	LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	68
6.1	Literaturverzeichnis	68
6.2	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	85
7	ANHANG.....	87
7.1	Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	87
7.2	Publikationsverzeichnis	89
7.3	Danksagung.....	
7.4	Lebenslauf.....	
7.5	Eidesstattliche Versicherung	

1 EINLEITUNG

1.1 *Aspergillus fumigatus* und Aspergillose

Täglich inhaliert jeder Mensch hunderte Schimmelpilzsporen, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Für den gesunden und immunkompetenten Organismus ist dies jedoch mit keinem Krankheitswert assoziiert. Immunkompetente Individuen besitzen angeborene und adaptive Immunmechanismen, die invasive Infektionen durch Schimmelpilze abwehren und gleichzeitig überschießende inflammatorische Reaktionen verhindern. Veränderungen in diesen Mechanismen können einerseits zu Hypersensitivitätsreaktionen und andererseits zu invasiven Infektionen führen. Der häufigste und wichtigste humanpathogene Schimmelpilz ist *Aspergillus fumigatus* (Latgé, 1999; Park & Mehrad, 2009).

1.1.1 Biologische und pathologische Charakteristika von *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, der zur Klasse der Ascomyzeten (Schlauchpilze) gehört. *Aspergillus* (= Gießkannenschimmel) bezeichnet die Gattung des Pilzes, *fumigatus* leitet sich von dem lateinischen Wort *fumus* (= der Rauch) ab, welches sich auf die rauchgrüne Farbe des Pilzes bezieht, die durch ein Pigment in den Sporen verursacht wird (Denning, 1998).

Die natürliche ökologische Nische für *Aspergillus fumigatus* bildet der Erdboden, wo er sich saprophytisch, d. h. von toter organischer Substanz ernährt. Er ist ein thermostabiler Pilz, für den ein Wachstum bei Temperaturen bis zu 55 °C und ein Überleben sogar bei Temperaturen bis zu 70 °C nachgewiesen wurde (Latgé, 1999). Seiner Widerstandsfähigkeit verdankt er sein weltweites Vorkommen. Man findet ihn z. B. im Kompost, in der Erde von Zimmerpflanzen, auf Nahrungsmitteln und in Klimaanlage (Latgé, 1999; Tillie-Leblond & Tonnel, 2005).

Durch asexuell gebildete Sporen, die als Konidien bezeichnet werden, erfolgt die aerogene Verbreitung von *Aspergillus fumigatus*. Die Konidien keimen unter geeigneten Bedingungen zu Keimschläuchen aus, welche zu Hyphen heranwachsen und unter weiterer Verzweigung ein Myzel (Hyphengeflecht) bilden. Diesem entstammen die

Konidiophoren, welche die Konidien mit einem Durchmesser von 2,5 – 3 µm tragen (Latgé, 1999; McCormick, Loeffler & Ebel, 2010).

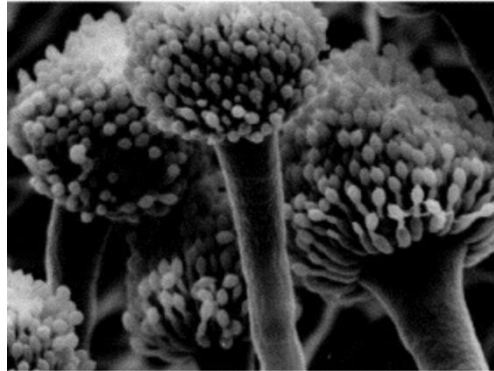


Abbildung 1
Mikroskopische Aufnahme von *A. fumigatus* Konidiophoren mit Konidien.
Abbildung entnommen aus Latgé, 1999.

Durch Erschütterungen und starke Windstöße werden die Sporen freigesetzt. *Aspergillus fumigatus* ist einer der am weitesten verbreitete aerogen übertragenen Erregern unter den Pilzen (Latgé, 1999). Weil die Sporulationskapazität des Pilzes sehr hoch ist, finden sich sowohl in der Innen- als auch in der Außenluft Sporenkonzentrationen von mehr als 100 m⁻³ (Latgé, 2001). Tausende der Konidien gelangen täglich aufgrund ihres geringen Durchmessers bis in die Alveolen der menschlichen Lunge (Rivera, Hohl & Pamer, 2006).

1.1.2 Spektrum *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen

Bei Menschen mit intaktem Immunsystem bleibt das Gelangen der Konidien in die Alveolen der Lunge in der Regel ohne Folgen, da der Erreger durch Mechanismen der angeborenen Immunabwehr sofort beseitigt wird. Wesentlich gravierender sind mögliche Folgen für den in der Immunabwehr eingeschränkten Organismus. In den vergangenen Jahrzehnten ist deshalb durch den verstärkten Einsatz intensiver immunsuppressiver Therapien in den verschiedensten medizinischen Disziplinen ein deutlicher Anstieg der Inzidenz von invasiven, oft tödlich verlaufenden Infektionen, ausgelöst durch *Aspergillus fumigatus* zu verzeichnen (Latgé, 2001).

Aspergillosen sind Erkrankungen, die durch eine Infektion mit Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* verursacht werden. Auftreten und Schweregrad der Krankheiten sind

abhängig vom Zustand des Immunsystems des Patienten. Aufgrund des Aufnahmemechanismus der Sporen über die Atemluft ist für Aspergillosen der Respirationstrakt Eintrittspforte und Primärlokalisierung zugleich. Nicht-respiratorische Infektionen sind wesentlich seltener, auch wenn sie für andere Organe und Organsysteme wie z. B. den Gastrointestinaltrakt, die Haut oder das Auge beschrieben wurden (Latgé, 1999).

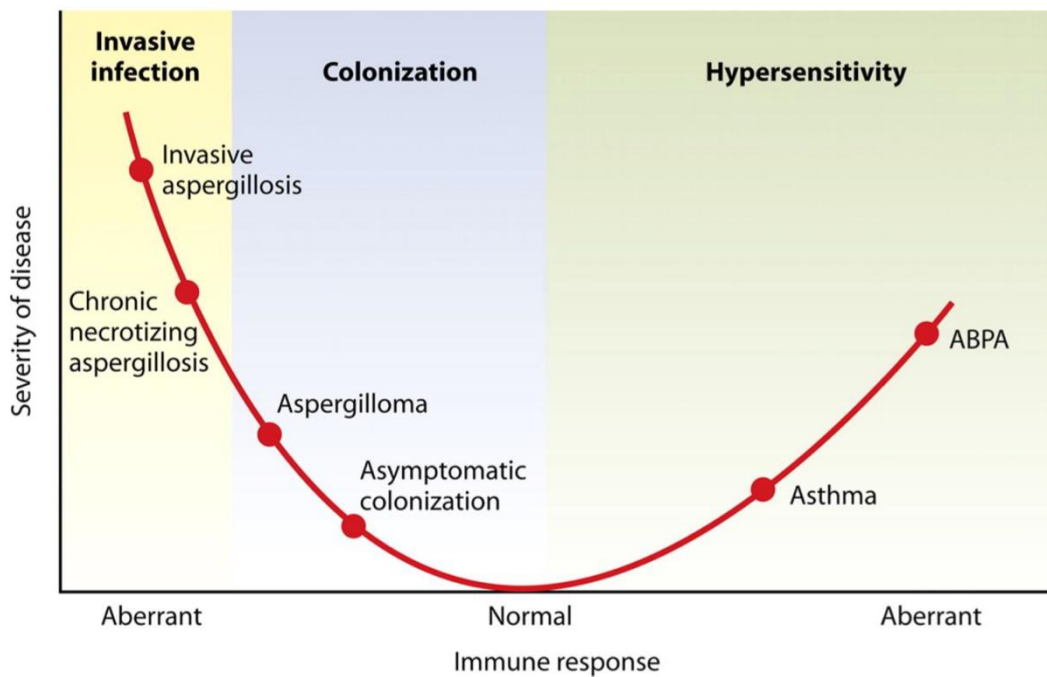


Abbildung 2
Spektrum *Aspergillus fumigatus*-assoziierter Krankheitsbilder in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten.
Abbildung entnommen aus Park & Merhad, 2009.

Eine Einteilung der respiratorischen Infektionen erfolgt zum einen aufgrund der Lokalisation innerhalb des Respirationstrakts, zum anderen werden Erkrankungen, die mit einer Kolonialisierung oder einem invasiven Wachstum innerhalb des Respirationstrakts einhergehen, von solchen ohne Kolonialisierung unterschieden. Letztere sind vor allem allergische Erkrankungen, die durch wiederholte Exposition gegenüber Sporen oder Antigenen von *Aspergillus fumigatus* ausgelöst werden. Dazu gehören z. B. die exogene allergische Alveolitis, auch „Farmerlunge“ genannt, die allergische Sinusitis und das allergische Asthma. Zu einer klinischen Besserung dieser

Krankheiten führt häufig schon eine gezielte Vermeidung des auslösenden Agens (Latgé, 1999).

Einer therapeutischen Intervention bedürfen die Erkrankungen, die mit einem Wachstum von *Aspergillus fumigatus* innerhalb des Respirationstrakts einhergehen. Dazu zählen die Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), die Invasive Aspergillose und das Aspergillom (Latgé, 1999). Bei letzterer, auch „Pilzball“ genannten Erkrankung kommt es zum Wachstum von *Aspergillus fumigatus* in präformierten Höhlen innerhalb des Lungengewebes. Betroffen sind z. B. Patienten mit Sarkoidose, Bronchiektasen oder Tuberkulose (Zmeili & Soubani, 2007).

Die Bronchopulmonale Aspergillose ist eine *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätsreaktion. Sie zählt zu den nicht invasiven Formen der Aspergillose, zeigt jedoch eine persistierende Kolonialisierung der Atemwege mit dem Schimmelpilz. Betroffen sind hauptsächlich Patienten, deren Immunsystem nicht supprimiert ist (Tillie-Leblond & Tonnel, 2005). Als Komplikation wird sie bei 2 % der Patienten mit Asthma bronchiale, mit steigender Tendenz von bis zu 14 % bei Kortison-pflichtigen Patienten mit Asthma bronchiale und bei bis zu 15 % der Patienten mit zystischer Fibrose (CF) beobachtet (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer ABPA gilt für beide Patientenkollektive das begleitende Vorliegen einer Atopie (Patterson & Strek, 2010). Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten einer ABPA und einer erhöhten Exposition gegenüber *Aspergillus* Sporen ist nicht nachgewiesen (Tillie-Leblond & Tonnel, 2005). Zu einer Exazerbation bei bestehender Erkrankung führt laut Radin et al. (1983) jedoch die Exposition gegenüber erhöhten Schimmelpilzsporenkonzentrationen.

Die Pathophysiologie der ABPA ist komplex und noch nicht bis ins letzte Detail verstanden (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Die Persistenz von Konidien innerhalb des Bronchialsekrets, welches das Epithel der Atemwege bedeckt, wirkt als permanenter Stimulus für das Immunsystem. Es kommt zur Aktivierung von T-Helfer-Zellen und innatem Immunzellen, zur Freisetzung von Immunglobulinen und Zytokinen. Die Betroffenen weisen häufig erhöhte Konzentrationen des Gesamt-IgE, der spezifischen IgE- und IgG-Antikörper, sowie hohe Spiegel an IL-4 und IL-5 auf, was für die Relevanz der T_H2-Zell-gesteuerten Immunantwort spricht (Chu et al., 1996; Warris, 2014).

Gleichzeitig deuten hohes IL-2 und INF γ auf eine Immunreaktion hin, die sowohl von T_H1-Zellen, als auch von T_H2-Zellen gesteuert wird (s. 1.2.3) (Wark & Gibson, 2001). Verstärkte Sekretproduktion und ein hyperreagibles Bronchialsystem, sowie Bronchiektasien und Fibrosierung des Lungengewebes im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sind Folge der ausgelösten Entzündungsreaktion (Patterson & Strek, 2010). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit Dyspnoe, Giemen, Brustschmerzen und Fieber. Die Symptome sind unspezifisch, was in Kombination mit der Tatsache, dass viele Betroffene gleichzeitig an Asthma und CF leiden, zu einer erschwerten Diagnosestellung einer ABPA führt. Trotzdem ist es von höchster Priorität die Diagnose so früh wie möglich zu stellen, um die Patienten angemessen zu behandeln und eine irreversible Schädigung der Lunge zu vermeiden (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

Die invasive pulmonale Aspergillose (IPA) ist eine schwerwiegende Erkrankung, von der vornehmlich immunkompromittierte Patienten betroffen sind. Ihre Inzidenz variiert und übersteigt in Hochrisikokollektiven 20 % (Denning, 1998). Es gibt eine Reihe wichtiger Risikofaktoren, die eine Entstehung begünstigen. Zu diesen zählen die hämatologische Stammzelltransplantation, hochdosierte und lange andauernde Therapien mit Glukokortikoiden, zytoablative Therapien und die darunter auftretende Neutropenie, die Transplantation solider Organe, sowie hämatologische Malignome (v. a. akute Leukämien). Die größte Gefahr für die Patienten geht jedoch von der Neutropenie mit einer absoluten Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut von weniger als 500 / mm³ aus (Gerson et al., 1984; Zmeili & Soubani, 2007).

Auf Grund des zunehmenden Einsatzes stark immunsupprimierender Therapien in den verschiedenen medizinischen Disziplinen tritt die Erkrankung besonders in den letzten Jahrzehnten deutlich häufiger auf (Groll et al., 1996; Zmeili & Soubani, 2007). Die Mortalitätsrate der IPA für die beschriebenen Patientenkollektive ist hoch. Über 50 % der neutropenischen Patienten und bis zu 90 % der Patienten die sich einer hämatologischen Stammzelltransplantation unterziehen, überleben eine Infektion nicht (Fukuda et al., 2003; Zmeili & Soubani, 2007).

Im Verlauf der Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen mittels allogener Stammzelltransplantation zeigen Patienten zu zwei Zeitpunkten eine gesteigerte Sensibilität für eine IPA. Im ersten Monat nach erfolgter Transplantation ist die bestehende Neutropenie bei insuffizienter Bildung der Zellen durch das Knochenmark

mit einem erhöhten Infektionsrisiko assoziiert. Durch verschiedene Strategien wie nicht-myeloablative Therapieregime oder die Gabe von G-CSF, einem Kolonie-stimulierenden Faktor, der die Reifung der neutrophilen Granulozyten fördert, konnte die Inzidenz in dieser Phase vermindert werden. Weiterhin kritisch gestaltet sich die post-Transplantationszeit ab Woche acht. Zur Verhinderung einer *Graft-versus-Host*-Reaktion (GvHD) kommen Medikamente wie Kortikosteroide, Ciclosporin A und Mycophenolatmophetil zum Einsatz, die u. a. über T-Zell-inhibitorische Effekte ihre intensiv immunsupprimierende Wirkung entfalten (Marr et al., 2002; Wald et al., 1997; Zmeili & Soubani, 2007).

1.1.3 Diagnostik der invasiven (pulmonalen) Aspergillose

Die frühzeitige Erkennung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen ist essenziell für eine erfolgreiche Therapie. Eine Diagnosefindung gestaltet sich jedoch häufig problematisch. Viele Patienten weisen unspezifische Krankheitssymptome auf, was in der Folge eine genaue Zuordnung derselben erschwert.

Als Hilfestellung, um die Ergebnisse klinischer Studien besser vergleichen zu können, entwickelten die *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) und die *Mycosis Study Group* (MSG) im Jahr 2008 überarbeitete Diagnosekriterien für die Definition invasiver Pilzinfektionen. Anhand der vorliegenden Kriterien kann eine Unterscheidung bezüglich einer nachgewiesenen, wahrscheinlichen oder möglichen invasiven Pilzinfektion bei Patienten mit hämatologischen Stammzelltransplantationen und malignen Neoplasien erfolgen (De Pauw et al., 2008). Auch wenn die Diagnosekriterien der EORTC primär in Bezug auf klinische Studien entwickelt wurden, dienen sie ebenso als Hilfe in der sicheren, klinischen Diagnosestellung (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

Erwiesene IPA	
Histo- oder zytopathologischer Nachweis ODER Nachweis von Aspergillus aus einer steril entnommenen Probe aus der Lunge und radiologisch oder klinisch suspekter Befund, der sich mit einer Pilzinfektion vereinbaren lässt	
Wahrscheinliche IPA	Mögliche IPA
definiert durch:	
einen patientenbezogenen Risikofaktor	einen patientenbezogenen Risikofaktor
UND	UND
ein klinisches Kriterium	ein klinisches Kriterium
UND	ABER
ein mykologisches Kriterium	kein mykologisches Kriterium
Patientenbezogene Risikofaktoren:	
Anhaltende Neutropenie für > 10 d, Transplantation solider Organe oder hämatologischer Stammzellen, hochdosierte oder lange andauernde (> 3 Wochen) Kortisontherapie, Hämatologische Malignome, schwere Immundefizienz, zytoablativ Therapien	
Klinische Kriterien:	
neu aufgetretene, charakteristische Infiltrate in der CT-Bildgebung, klinische Symptome einer Infektion der unteren Atemwege, Pleuraerguss	
Mykologische Kriterien:	
Zytologie, Mikroskopie, Kultur von BAL, positiver Antigen-Assay	

Tabelle 1

IPA Diagnosekriterien der EORTC und MSG (De Pauw et al., 2008).

Verändert nach Jatros, 2010; Zmeili & Soubani, 2007.

Essentiell sind zuverlässige Nachweisverfahren zur Diagnostik von Aspergillosen. Unterschiedliche apparative Verfahren kommen dabei zum Einsatz (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Bildgebende Verfahren, wie CT- und Röntgendiagnostik sind besonders in der Frühdiagnostik nicht aussagekräftig. Ebenso sind viele der sichtbaren

pathologischen Befunde nicht spezifisch für das Vorliegen einer IPA (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

Die Diagnosestellung einer IPA aufgrund der kulturellen Anzucht oder des mikroskopischen Nachweises von *Aspergillus fumigatus* aus dem Sputum von Patienten ist schwierig, da das Ergebnis im Zusammenhang mit dem Immunstatus des Patienten bewertet werden muss (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Positiv getestetes Sputum des immunkompetenten Organismus hat in fast allen Fällen keine klinische Konsequenz, da die häufigste Ursache lediglich eine Kolonisierung mit dem Pilz ist (Soubani, Khanchandani & Ahmed, 2004). Bei immunsupprimierten Patienten geht der positive kulturelle Nachweis aus dem Sputum dagegen mit einer hohen prädiktiven Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer invasiven Infektion mit *Aspergillus fumigatus* einher. Studien zeigen, dass positiv auf *Aspergillus fumigatus* getestetes Sputum von Patienten, die eine hämatologische Stammzelltransplantation erhalten haben oder an Leukämie leiden eine 80-90 % positive Vorhersagewahrscheinlichkeit hat (Horvath & Dummer, 1996; Kousha, Tadi & Soubani, 2011; Yu, Muder & Poorsattar, 1986).

Die Bronchiallavage kann durch die Isolation des Pilzes besonders bei Hochrisikopatienten oder bei Patienten, die an einem diffusen Befall der Lunge leiden, eine Pilz-Besiedlung nachweisen (Kousha, Tadi & Soubani, 2011; Levy et al., 1992; McWhinney et al., 1993). Jedoch ist insbesondere bei hämatologischen Patienten eine invasive Diagnostik zur Entnahme von Probenmaterial und Biopsaten häufig kontraindiziert. Grund hierfür ist die klinische und hämatologische (Neutropenie, Thrombozytopenie) Konstitution der Patienten, die mit einer erhöhten Komplikationsrate im Rahmen der Probenentnahme einhergeht (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Insgesamt ist die kulturelle Anzucht von *Aspergillus fumigatus* aus Sekreten des Respirationstrakts, wie Sputum oder der Bronchiallavage nicht zufriedenstellend. Negative Testergebnisse schließen das Vorliegen einer Erkrankung besonders bei lokal begrenzten Formen der IPA nicht ausreichend aus. Bei zu vielen Patienten deren Proben im Labor steril getestet wurden, konnte *post mortem* der Nachweis einer IPA erbracht werden (McWhinney et al., 1993; Yeghen et al., 2000).

Trotzdem kann bei der Bronchiallavage, genauso wie im Serum der Patienten der Nachweis von *Aspergillus*-spezifischen Antigenen und *Aspergillus fumigatus* DNA erbracht werden (Chabi et al., 2015; Reichenberger et al., 2002). Galaktomannan, ein

Polysaccharid und wichtiger Zellwandbestandteil des Pilzes, kann als *Aspergillus*-Antigen primär im Serum mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Immunoassays (ELISA) detektiert werden. Studien legen nahe, dass der Test bei wiederholter Durchführung zur Überwachung bei Hochrisikopatienten und zur Kontrolle unter Therapie bei bestehender IPA eingesetzt werden kann (Boutboul et al., 2002; Pfeiffer, Fine & Safdar, 2006). Es ist allerdings nicht hinreichend untersucht, inwiefern der Antigentest bei klinischem Verdacht einer IPA eine zuverlässige primäre Diagnosestellung erlaubt (Pfeiffer, Fine & Safdar, 2006). Weiterhin limitierend für die Methode erweist sich der Umstand, dass wiederum die Sensitivität des Tests für einen lokalisierten Pilzbefall niedriger ist, als bei disseminiertem Befall. Außerdem kann die Interaktion einiger Antibiotika aus der Gruppe der β -Laktam-Antibiotika mit Galaktomannan, sowie die Aufnahme desselben über die Nahrung, mit anschließendem Eintritt in den Blutkreislauf durch Überwindung der intestinalen Barrieren bei Patienten mit Mukositis, in falsch positiven Testergebnissen resultieren (Ansorg, van den Boom & Rath, 1997; Kousha, Tadi & Soubani, 2011; Reichenberger et al., 2002). Falsch negative Testergebnisse zeigen sich bei Patienten unter antimykotischer Prophylaxe (Barnes & Marr, 2007). Auch wenn der Nachweis von Galaktomannan für Mucorales in der Regel negativ ausfällt, unterstreicht jedoch die Tatsache, dass Galaktomannan in Pilzen wie Mucorales und *Fusarium* ebenfalls vorkommt, dass der Test nicht als *Aspergillus*-spezifisches Nachweisverfahren proklariert werden kann (Cornely et al., 2014; Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Der Nachweis von Galaktomannan entbindet in der Gesamtschau also nicht von der Notwendigkeit einer sorgfältigen Betrachtung klinischer, radiologischer und mikrobiologischer Befunde.

Pilz-DNA kann aus Serum und Bronchiallavage mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden und stellt eine neuere Methode zur Diagnose invasiver Aspergillosen dar. V. a. der Nachweis der DNA im Serum von Patienten stellt eine vielversprechende Methode in der Diagnostik invasiver Pilzinfektionen dar. Die Methode ist wenig invasiv und kann so auch bei vorliegenden Kontraindikationen für invasive diagnostische Maßnahmen wie ein schlechter Allgemeinzustand oder Thrombozytopenie bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen Anwendung finden. Unterschiedliche Protokolle, Primer und Reagenzien, wie sie an den verschiedenen Zentren verwendet werden machten einen Vergleich der Testergebnisse zunächst schwer

möglich (Barnes & Marr, 2007; Donnelly, 2006; Springer et al., 2016). Durch die *European Aspergillus PCR Initiative* (EAPCRI) wurde die PCR-basierte Diagnostik der Invasiven Aspergillose jedoch soweit standardisiert und evaluiert, dass die *Aspergillus*-PCR inzwischen als „*role model*“ für molekularbiologische Verfahren in der Infektiologie gilt (Springer et al., 2016; White et al., 2011).

Angaben zu Spezifität und Sensitivität der Methode weisen in der Literatur sehr große Schwankungen auf (Springer et al., 2016). Die Spezifität scheint eine starke Abhängigkeit vom nachzuweisenden Ziel-Gen zu haben, weshalb sich in der Literatur Spezifitäten von 77 % bis 96 % finden (Kami et al., 2001; Loeffler et al., 2000 a; Pham et al., 2003; Springer et al., 2016). Eine Beeinflussung der Sensitivität der unterschiedlichen DNA-Nachweismethoden geschieht durch das verwendete Probenmaterial (BAL, Plasma oder Blut (Buchheidt et al., 2002; Loeffler et al., 2000 b; Springer et al., 2013; White, Archer & Barnes, 2005)), das Vorgehen bei der DNA-Extraktion (Loeffler et al., 2002), sowie die vorliegende Erkrankung und die Größe der Studienpopulation (Yamakami et al., 1998). Der einfache Nachweis von *Aspergillus* DNA durch die PCR lässt keine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Infektion oder einfacher Kolonisation zu, weshalb falsch positive Resultate, anhängig vom verwendeten Material häufig sind (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Viele Arbeitsgruppen arbeiten jedoch intensiv an der Lösung der angesprochenen Probleme in der Diagnostik mittels PCR. Da die Methode auf spezialisierte Labore beschränkt und somit nicht flächendeckend verfügbar ist, kann sie bisher nicht zur Routinediagnostik gezählt werden (Barnes & Marr, 2007; Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Eine Aufnahme in die Kriterien der EORTC und MSG von 2008 (s.o.) schaffte die PCR als Nachweismethode invasiver Pilzinfektionen aufgrund der damals bestehenden Problematik im Hinblick auf fehlende Standardisierung trotz guter Ergebnisse in der Diagnostik nicht (White et al., 2006). Die EAPCRI bemüht sich deshalb und bereits seit 2006 um eine Lösung dieses Problems durch Zusammenarbeit unterschiedlichster Expertengruppen.

Den Goldstandard zur Diagnostik der IPA stellt die Lungenbiopsie mit histopathologischer Begutachtung des gewonnenen Probenmaterials dar. Dabei kann *Aspergillus fumigatus* im betroffenen Gewebe zum einen direkt nachgewiesen werden, zum anderen wird eine Abgrenzung zu malignen Prozessen und nicht Pilz-assoziierten Erkrankungen erleichtert (Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Unterschiedliche

Zugangswege, wie die transbronchiale oder die CT-gesteuerte perkutane Biopsie oder die offene Lungenbiopsie können zur Probengewinnung gewählt werden. Sie alle stellen invasive Methoden dar, die mit Komplikationen verbunden sind. Wichtig ist deshalb, dass für Patienten mit Verdacht auf eine invasive Aspergillose sorgfältig evaluiert wird, inwiefern das perioperative Risiko in Zusammenschau mit dem Allgemeinzustand des Patienten einen Eingriff zu diagnostischen Zwecken rechtfertigt (Habicht et al., 1997; Reichenberger et al., 2002).

1.1.4 Therapie

Die Grundlage für eine erfolgreiche Behandlung der invasiven pulmonalen Aspergillose bildet eine Kombination aus Antimykotika, chirurgischer Intervention und der Beseitigung prädisponierender Faktoren. Die Therapie gestaltet sich oftmals schwierig, weshalb die Letalität der Erkrankung immer noch hoch ist, sollte in jedem Fall aber so früh wie möglich angestrebt werden (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

Für die medikamentöse Erstlinien-Therapie ist Voriconazol das Therapeutikum der Wahl (Denning et al., 2002; Herbrecht et al., 2002). Es kann sowohl oral, als auch intravenös verabreicht werden. Die Initialtherapie sieht die zweimalige Gabe von 6 mg/kg KG intravenös am ersten Tag der Behandlung vor und wird ab Tag zwei auf eine Erhaltungsdosis von zwei Mal 4 mg/kg KG pro Tag reduziert. Eine Umstellung der Therapie auf eine zweimalige orale Gabe von 200 mg des Medikaments ab Tag sieben kann in Erwägung gezogen werden. Die meisten Patienten vertragen Voriconazol gut. Verschwommenes Sehen, verändertes Farbsehen und Photophobie sind die häufigsten Symptome einer reversiblen Sehminderung, die als Nebenwirkung bei ca. 30 % der Patienten beobachtet wird (Johnson & Kauffman, 2003; Purkins et al., 2002). Medikamenteninteraktionen mit Immunsuppressiva wie Ciclosporin A, Tacrolimus und Sirolimus, mit Warfarin und einer Reihe anderer Medikamente, sollten aufgrund des inhibitorischen Einflusses von Voriconazol auf das bei der Metabolisierung dieser Substanzen wichtige Cytochrom P₄₅₀ beachtet werden (Johnson & Kauffman, 2003). Das Antimykotikum selbst zeigt keine lineare Pharmakokinetik, was zum einen die Akkumulationsgefahr der Substanz im Blut erhöht und zum anderen eine Ursache für therapierefraktäre Pilzkrankungen darstellen kann. Ein therapeutisches *Drug-*

Monitoring zur Kontrolle der Blutplasmaspiegel und eines damit verbundenen, verbesserten *Outcomes* für die Patienten kann deshalb indiziert sein (Pascual et al., 2008; Purkins et al., 2002).

Als Medikament der zweiten Wahl steht liposomales Amphotericin B zur Verfügung, welches im Gegensatz zu herkömmlichem Amphotericin B weniger unerwünschte Nebenwirkungen zeigt (Walsh et al., 1999). Bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit können Isavuconazol und Posaconazol, die wie Voriconazol zu der Arzneistoffgruppe der Azole gehören, und Echinocandine wie Caspofungin als Reservemedikamente eingesetzt werden (Kartsonis et al., 2005; Maertens et al., 2004; Maertens et al., 2016; Walsh et al., 2007). Letztere kommen in Kombination mit Voriconazol zur erfolgreichen Behandlung therapieresistenter invasiver pulmonaler Aspergillose in Frage, da sie sich bei der Vermittlung ihrer antimykotischen Mechanismen ergänzen (Marr et al., 2004). Im Allgemeinen sollte sich die Behandlungsdauer primär am individuellen Erfolg der Therapie orientieren (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

Die Notwendigkeit der chirurgischen Intervention besteht in Einzelfällen, wie bei dem invasiven Befall von Knochen und dem Auge oder bei lokal begrenzten Befunden innerhalb der Lunge, die aufgrund ihrer Nähe zum Gefäßsystem das Risiko unkontrollierbarer Blutungen mit Hämoptysen bergen (Caillot et al., 2001; Kousha, Tadi & Soubani, 2011). Zuletzt kann versucht werden das therapeutische *Outcome* durch die Reduzierung des Einflusses prädisponierender Faktoren positiv zu beeinflussen. Dabei spielt vor allem der Einsatz immunmodulatorischer Substanzen wie Koloniestimulierender Faktoren, welche die Produktion von neutrophilen Granulozyten anregen, eine Rolle (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

1.2 Mechanismen der Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 Das humane Immunsystem – ein Überblick

Der Mensch ist ständig einer Vielzahl von unterschiedlichsten Pathogenen ausgesetzt. Der Umgang mit diesen birgt die Herausforderung, Pathogene effizient zu eliminieren ohne dabei durch überschießende Abwehrmechanismen dem eigenen Organismus zu schaden. Sorge dafür trägt das Immunsystem, welches aus zwei unterschiedlichen

Hauptkomponenten besteht, der angeborenen (nicht Antigen-spezifischen, innaten) und der erworbenen (Antigen-spezifischen, adaptiven) Immunität. Die angeborene Immunantwort stellt dabei den entwicklungsgeschichtlich älteren Anteil dar. Vertebraten und Invertebraten besitzen sie gleichermaßen. Während die adaptive Immunantwort Tage bis Wochen benötigt um angemessen auf Pathogene zu reagieren und in der Folge Infektionen zu kontrollieren, erfolgt die Antwort des innaten Immunsystems umgehend (Kimbrell & Beutler, 2001).

Ziel der angeborenen Immunabwehr ist es, eindringende Erreger an einer unkontrollierten Ausbreitung zu hindern. Sie ist in der Lage zwischen dem Körpereigenen und Pathogenen zu unterscheiden (Janeway, 1992). Prinzipiell können ihre Abwehrmechanismen in drei Hauptteile gegliedert werden. Eine erste Hürde stellen mechanische und physiologische Barrieren wie Schleimhäute, Epithelien oder die Darmflora dar. Wird diese Abwehr überwunden, kommen humorale (das Komplementsystem) und zelluläre Bestandteile, sowie antimikrobielle Proteine, Lysozym und Defensine zum Einsatz. Die zellulären Bestandteile bestehen aus verschiedenen weißen Blutkörperchen (Leukozyten), wie den Makrophagen, Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen (DCs) und Natürlichen Killerzellen (NKs). Sind diese Mechanismen nicht in der Lage eine Infektion einzudämmen, werden sie zusätzlich durch die Abwehrmechanismen des adaptiven Immunsystems unterstützt (Janeway & Medzhitov, 2002; Tosi, 2005).

Ein wichtiger Bestandteil dieser Abwehr sind T- und B-Lymphozyten. Auf ihrer Oberfläche besitzen die Zellen Antigen-spezifische Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, bestimmte pathogene Strukturen zu erkennen und somit Erreger gezielt zu bekämpfen. Nach einer Infektion bleibt eine Fraktion der Zellen, sogenannte Gedächtniszellen erhalten. Bei wiederholtem Kontakt mit einem Erreger gewährleisten sie seine schnelle und effektive Bekämpfung (Parkin & Cohen, 2001). Die angeborene Immunabwehr kann zusätzlich eine Art Gedächtnis entwickeln, die sogenannte *Trained Immunity* (Netea et al., 2016). Ein balanciertes Zusammenspiel beider Systeme ist notwendig um den Organismus angemessen zu schützen (Kimbrell & Beutler, 2001).

1.2.2 Angeborene und adaptive Immunmechanismen gegen *Aspergillus fumigatus*

Bei der Abwehr von *Aspergillus fumigatus* spielt das angeborene Immunsystem im immunkompetenten Wirt die Hauptrolle. Es fungiert als eine Art erste Instanz, die die Konidien des Pilzes daran hindert innerhalb des Organismus auszukeimen und sich in der Folge ungehindert zu vermehren (Latgé, 1999).

Ein Großteil der über die Atemwege aufgenommenen Sporen wird durch das Flimmerepithel der Lunge eliminiert. Trotzdem gelingt es *Aspergillus fumigatus* diese erste Barriere zu überwinden, was v. a. durch die Sekretion von Gliotoxin und Proteasen vermittelt wird, die die mukozilliäre Clearance vermindern und das Lungenepithel schädigen (Amitani et al., 1995; Robinson et al., 1990).

Die Epithel- und Endothelzellen können Konidien aufnehmen. Zum einen werden sie deshalb zum Primärort von Infektionen, zum anderen tragen sie dadurch möglicherweise zu einer Beseitigung des Schimmelpilzes bei (Latgé, 1999; Paris et al., 1997).

Sind die Sporen bis in die Alveolen der Lunge vorgedrungen, treffen sie dort auf Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten (Schaffner, Douglas & Braude, 1982). Die im Blut zirkulierenden Granulozyten werden dabei durch Zytokine, die von den Makrophagen produziert werden, zu einer vermehrten Anreicherung in der Lunge mobilisiert (Latgé, 1999). Die Aufgabe beider Zellen ist es die Schimmelpilzsporen zu phagozytieren. Dieser Vorgang wird durch die Bindung der im Surfactant der Lunge vorhandenen Proteine A und D an die Konidien von *Aspergillus fumigatus* zusätzlich gefördert (Madan et al., 1997).

Nach Aufnahme der Sporen in die Phagosomen der Alveolarmakrophagen werden sie dort mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies abgetötet (Philippe et al., 2003). Der Anteil an Konidien, der durch die Makrophagen nicht beseitigt wird, trifft auf die neutrophilen Granulozyten, welche ebenfalls in der Lage sind diese zu phagozytieren. Ihr primäres Angriffsziel sind jedoch Pilzhyphen. Weil diese zu groß sind um phagozytiert zu werden, bedienen sich die Granulozyten zweier unterschiedlicher antifungaler Mechanismen. Durch die Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Pilzhyphen kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen und zur Entleerung von Granula, sowie dem *Respiratory Burst*, der zu Proteinmodifikationen, Schäden an der DNA und zur Peroxidation von Lipiden in der Membran der Pilze führt (Latgé, 1999; Mansour & Levitz, 2002). Zum

anderen bilden die Neutrophilen sogenannte *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Die aus Chromatin-Material und anti-mikrobiellen Proteinen bestehenden Fasern formen außerhalb der Zellen Netzwerke, hindern die Hyphen so am Wachstum und begünstigen die Phagozytose (McCormick et al., 2010).

Auch Natürliche Killerzellen sind Teil der angeborenen Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*. Diese Zellen sind in der Lage durch die Freisetzung von $\text{INF}\gamma$ die Differenzierung von aktivierten CD4^+ T-Zellen zu $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen zu fördern und somit die Immunantwort der erworbenen Abwehr zu beeinflussen (Robertson, 2002). Gleichzeitig wirkt das Zytokin toxisch auf den Pilz (Bouzani et al., 2011).

Das Komplementsystem stellt die wichtigste humorale Komponente der Verteidigungsmechanismen des innaten Immunsystems dar. Abhängig von den unterschiedlichen Germinationsstadien des Pilzes wird die Kaskade des aus Plasmaproteinen bestehenden Systems aktiviert und vermittelt die Bindung und Elimination von *Aspergillus fumigatus* durch Phagozyten (Latgé, 1999; Parkin & Cohen, 2001). Viele Abwehrmechanismen der erworbenen Immunität werden erst aktiviert, wenn eine Infektion erfolgt ist. Eine wichtige Rolle spielen dabei neben den beschriebenen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten andere professionelle Phagozyten wie die Monozyten und Dendritischen Zellen (Romani, 2004).

Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen, die *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) können körperfremde Strukturen erkennen (Braedel et al., 2004). Diese sogenannten *Pattern Associated Molecular Patterns* (PAMPs) sind konservierte molekulare Bestandteile, die eine Vielzahl an Pathogenen gemeinsam haben, im Wirtsorganismus aber nicht vorkommen (Romani, 2004). Zellwandbestandteile und DNA sind typische PAMPs von Pilzen, sie binden an PRRs wie C-Typ-Lektinrezeptoren und *Toll-Like*-Rezeptoren von Phagozyten und Dendritischen Zellen (Romani, 2004; Romani, 2011).

Eine Vielzahl unterschiedlicher PRRs zur Erkennung von *Aspergillus* Konidien und Hyphen, zusammen mit der Fähigkeit diese Pathogene zu phagozytieren, sie zu prozessieren und deren Antigene naiven T-Zellen zu präsentieren, machen Dendritische Zellen zum wichtigsten Bindeglied zwischen den beiden Komponenten des Immunsystems. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn das angeborene Immunsystem in seiner Funktion eingeschränkt ist oder seine Mechanismen nicht ausreichen um eine

erfolgreiche Elimination des Schimmelpilzes zu gewährleisten (Romani, 2004; Romani, 2011).

1.2.3 Bedeutung der T-Helfer-Zellen für die Immunantwort

T-Zellen sind Teil der erworbenen Immunabwehr. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche Antigen-spezifische Rezeptoren, die pathogene Strukturen (Antigene) erkennen und in der Folge eine gezielte Abwehr von Erregern leisten können. Naive T-Zellen können zu unterschiedlichen Effektorzellen differenzieren. Dieser Vorgang ist im Wesentlichen von drei unterschiedlichen Signalen abhängig (Murphy & Weaver, 2017).

Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie den Dendritischen Zellen über *Major Histocompatibility Complex*-Oberflächenmoleküle (MHC-Moleküle) dargeboten werden, binden zuerst an den CD4 oder den CD8 Korezeptor der T-Zellen. Dabei beeinflusst die Art des MHC-Moleküls, welche der Subpopulationen aktiviert wird. CD4⁺ T-Zellen binden an Pathogene, die über MHC II-Moleküle, CD8⁺ T-Zellen an solche, die über MHC I-Moleküle präsentiert werden. Überleben, Vermehrung und Differenzierung der T-Zellen werden im Folgenden von zwei weiteren Mechanismen gesteuert. Dazu zählen die Sekretion von Zytokinen und kostimulatorische Signale, bei denen es zur Bindung eines Liganden, der sich ebenfalls auf der Oberfläche der APCs befindet, mit einem akzessorischen Rezeptor der T-Zellen (z. B. CD28, CD40 etc.) kommt. Das Zusammenspiel aller drei Mechanismen ist im Weiteren notwendig um eine gerichtete Reifung der T-Zellen zu gewährleisten (Murphy & Weaver, 2017).

Die CD8⁺ T-Zellen gehören zu den zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie tragen zur Erregerelimination bei, indem sie Peptide freisetzen, die antimikrobiell wirken oder infizierte Zellen schädigen, und direkt oder indirekt eine Apoptose induzieren (Murphy & Weaver, 2017).

CD4⁺ T-Zellen (T-Helfer-Zellen, T_H-Zellen) differenzieren zu spezialisierten Effektorzellen, die protektive, inflammatorische und anti-inflammatorische Aufgaben bei der Abwehr von Pilzen wahrnehmen. Zu den wichtigsten dieser Zellen gehören T_{H1}-Zellen, T_{H2}-Zellen, T_{H17}-Zellen und T_{reg}-Zellen. Sie gewährleisten ein Gleichgewicht der entzündlichen und anti-entzündlichen Komponenten der erworbenen Immunabwehr (Romani, 2011). Zur Vermittlung ihrer Immunantwort sezernieren diese Zellen Zytokine,

lösliche Proteine, die fremde Zellen (parakrin) oder die produzierende Zelle selbst (autokrin) aktivieren (Murphy & Weaver, 2017).

T_H1-Zellen koordinieren eine protektive antifungale Reaktion. Sie setzen INF γ frei, welches den Entzündungsprozess fördert, indem es Phagozyten vermehrt aktiviert und damit zu einer effizienteren Erregerelimination beiträgt (Murphy & Weaver, 2017; Romani, 2011).

T_H2-Zellen fördern durch IL-4 einen Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen und damit die Bildung von Antikörpern (IgE und IgG) durch die Zellen. Sie unterstützen damit die humorale Komponente der erworbenen Immunantwort. Andererseits vermitteln sie durch die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 die Unterdrückung der T_H1-Antwort des Immunsystems. Dieser Umstand ist zum einen wichtig um die Balance der Mechanismen beider Zellpopulationen in Bezug auf Toleranz und Resistenz gegenüber Pilzen aufrechtzuerhalten und eine Limitation von Gewebedestruktion zu gewährleisten, zum anderen begünstigt es die Entstehung von Infektionen, Allergien und Rezidivkrankungen, die durch diese Pathogene ausgelöst werden (Murphy & Weaver, 2017; Romani, 2011).

T_H17-Zellen ergänzen die protektive Immunantwort der T_H1-Zellen durch die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten und die Freisetzung von Defensinen zur Abwehr mikrobieller Erreger (Murphy & Weaver, 2017). T_H17-Zellen verhindern durch die Sekretion von TGF β und IL-10 eine Differenzierung der naiven T-Zellen zu T-Helfer-Zellen der Subpopulationen 1 und 2. Gleichzeitig verhält sich die Produktion von IL-10 konträr zu der von INF γ durch T_H1-Zellen. Eine hohe Konzentration an IL-10 unterdrückt die Freisetzung von INF γ , führt dadurch zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung eines Gleichgewichts der T-Zell-basierten, antifungalen Mechanismen (Romani, 2011).

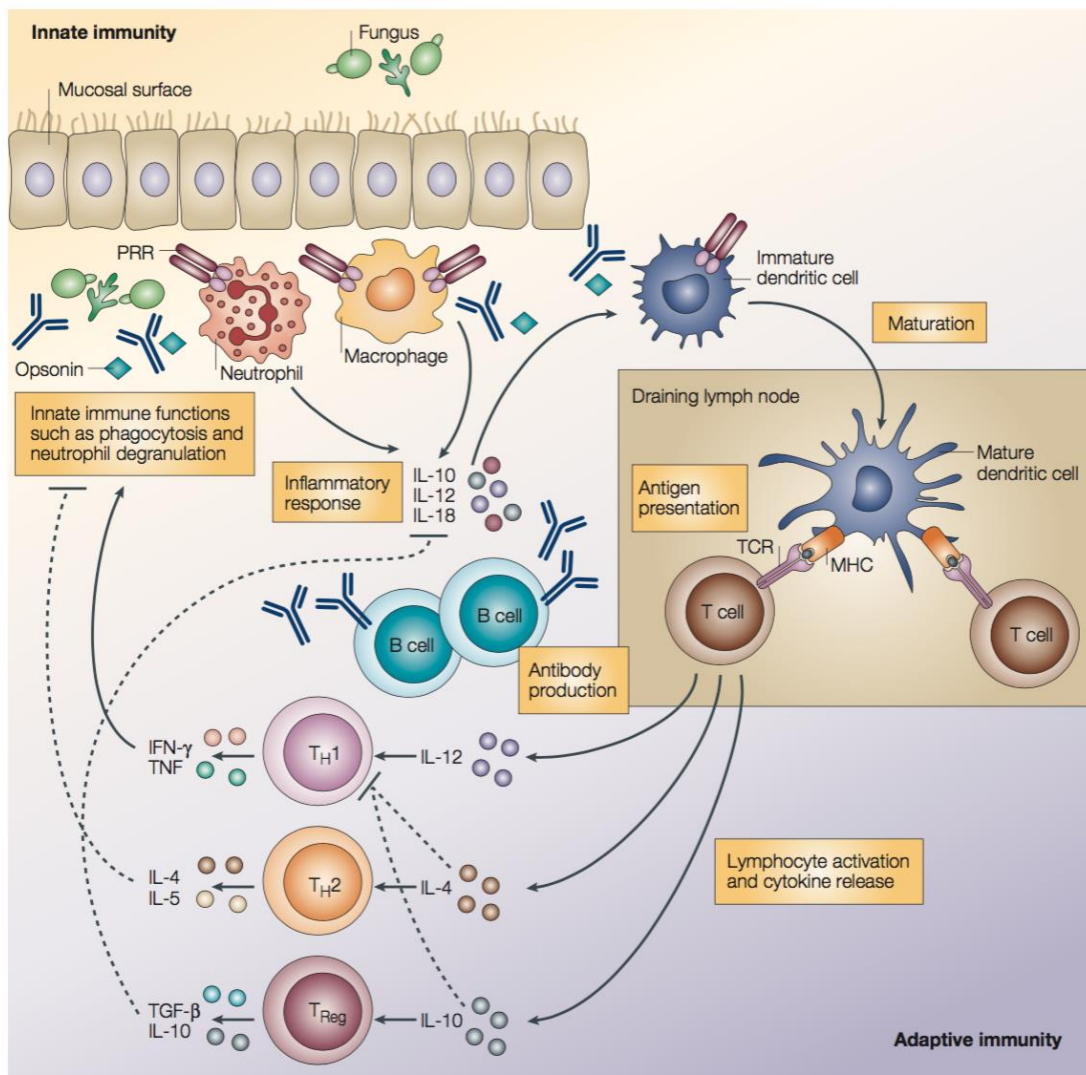


Abbildung 3
 Überblick über angeborene und adaptive Immunmechanismen bei der Abwehr von Pilzen.
 Abbildung entnommen aus Romani, 2004.

1.3 Relevanz der T-Zell-Antwort für die Diagnostik in der klinischen Mykologie

Die angeborene und adaptive Immunantwort auf Pathogene, sowie die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses werden maßgeblich von der Funktion Antigen-spezifischer T-Zellen beeinflusst. Obwohl sich weniger als 1 % dieser Zellen im peripheren Blut finden lassen, liefert die Bestimmung ihrer genauen Frequenz, ihrer Zusammensetzung aus den einzelnen Subpopulationen und der von diesen Effektorzellen

sezernierten Zytokine wichtige Informationen über den Immunstatus eines Organismus (Bacher & Scheffold, 2013).

Dieser Umstand kann in der Diagnostik infektiologischer Erkrankungen genutzt werden. Gängige Verfahren stellen zum Beispiel *Interferon-Gamma Release Assays* (IGRA) wie der QuantiFERON-Test, zum Nachweis einer latenten oder manifesten Tuberkuloseinfektion dar. Dabei wird $\text{INF-}\gamma$, welches von T-Zellen, die mit Tuberkulose-Antigenen stimulierten wurden, gebildet wird, *in-vitro* quantifiziert (Darby, Black & Buising, 2014; Pai, Riley & Colford, 2004).

Innerhalb der letzten 15 Jahre wurde eine Reihe unterschiedlicher Verfahren zur Detektion, Quantifizierung und Bestimmung der Eigenschaften Antigen-spezifischer T-Zellen entwickelt (Bacher & Scheffold, 2013; Phetsouphanh, Zaunders & Kelleher, 2015). Zu diesen Methoden zählen der *Enzyme Linked Immuno Spot* (ELISpot), die u. a. auf der Detektion von MHC-Multimeren basierende Durchflusszytometrie oder der ELISA. MHC-Multimere sind fluoreszenzmarkierte MHC-Peptide. Sie werden genutzt um T-Zell-Rezeptoren Antigen-spezifischer T-Zellen zu markieren und anschließend die Gesamtheit der CD4^+ und CD8^+ Zellen zu bestimmen, die eine erhöhte Affinität zu dem durch die MHC-Multimere repräsentierten Antigen besitzen. Die Methode zeichnet sich zum einen dadurch aus, dass sich die gesuchten Zellen mit einer großen Spezifität direkt detektieren lassen, zum anderen wird dadurch das mögliche Einsatzspektrum limitiert, da die immunogenen Epitope im Vorfeld genau charakterisiert werden müssen und ihre Bindung an einen bestimmten MHC-Proteinkomplex beschränkt ist (Bacher & Scheffold, 2013; Hackett & Sharma, 2002).

Eine andere Herangehensweise zur Quantifizierung spezifischer T-Zellen basiert auf der Reaktivität der Zellen gegenüber bestimmten Antigenen. Dabei werden einzelne oder mehrere Peptide, Proteine oder Lysate eines Pathogens zur *invitro* Stimulation benutzt. Die Bestimmung der genauen Zellfrequenz und die Zuordnung zu den einzelnen Effektorzellgruppen kann dann anhand der Sekretion bestimmter Zytokine und aufgrund der vorübergehenden Expression von Oberflächenmolekülen erfolgen. Selbst komplexe Antigene können dabei durch die Verwendung von Lysaten und kompletten Proteinen hinsichtlich der T-Zell Antwort untersucht werden (Bacher & Scheffold, 2013).

Die verschiedenen T_H -Zellen zeichnen sich dabei durch die Sekretion unterschiedlicher Zytokine innerhalb eines Zeitfensters von 4 - 12 h aus. Die genaue Zusammensetzung der

Botenstoffe kann währenddessen innerhalb der Zellen durchflusszytometrisch nach Inkubation mit sekretionshemmenden Substanzen wie Brefeldin A oder extrazellulär mit Hilfe des ELISpot Assays oder des (Multiplex) ELISA bestimmt werden. Da insbesondere naive T-Zellen ein sehr begrenztes Spektrum an Zytokinen sezernieren und eine Detektion der übrigen Zytokine abhängig von der Aktivierung ihrer zugehörigen T_H-Zellen ist, muss in Erwägung gezogen werden, dass auch mit dieser Methode nicht alle spezifischen T-Zellen erfasst werden können (Bacher & Scheffold, 2013; Phetsouphanh, Zaunders & Kelleher, 2015; Suni, Picker & Maino, 1998).

Einen einfachen und zuverlässigen Zugang zur Quantifizierung aller reaktiven T-Zellen stellen Oberflächenmoleküle dar, deren Expression durch die Aktivierung des Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors reguliert wird. CD154, auch als CD40-Ligand bezeichnet, vermittelt durch seine Bindung an CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen und Antigen-präsentierenden Zellen deren Aktivierung (van Kooten & Banchereau, 2000). Weil das Protein von allen T_H-Zellen, die durch ein spezifisches Antigen aktiviert werden, exprimiert wird, gilt es zur Bestimmung der Gesamtheit dieser Zellen als zuverlässiger *Marker* (Bacher & Scheffold, 2013; Chattopadhyay, Yu & Roederer, 2005; Frentsch et al., 2005; Kirchhoff et al., 2007). Er zeichnet sich dadurch aus, dass er bei geringer Hintergrundexpression rasch nach dem Antigenkontakt exprimiert wird (4 - 12 h). Dies bedeutet, dass der *Marker* sehr spezifisch ist, da er nur auf sehr wenigen Zellen zu finden ist, die das Antigen nicht binden (Bacher et al., 2013; Bacher & Scheffold, 2013; Frentsch et al., 2005). Auch für Proteine oder Lysat von Pilzen wurde in den letzten Jahren die Detektion und Anreicherung sehr geringer Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von CD154 beschrieben (Bacher et al., 2013; Bacher et al., 2014; Stühler et al., 2014).

Bacher et al. (2013) zeigten, dass T-Zellen nach der Stimulation mit einem *A. fumigatus* Lysat über den Aktivierungsmarker CD154 mittels magnetischer Zellseparation aus Blutproben angereichert werden können. Eine Charakterisierung und *in-vitro* Expansion sehr kleiner Mengen Antigen-spezifischer T-Zellen wird so erleichtert. In einer Folgearbeit detektierte dieselbe Gruppe unter Verwendung verschiedener Oberflächenmarker wie CD154 immundominante Antigene unterschiedlicher Morphotypen von *A. fumigatus* und untersuchte die mit ihnen verbundene T-Zell-Antwort (Bacher et al., 2014).

Eine Anreicherung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen aus PBMCs oder Leukozytenapheresaten zum adoptiven Transfer unter Verwendung von CD137 und CD154 wurde in Protokollen sowohl von Bacher et al. (2015 a) als auch von Stühler et al. (2015) beschrieben. Der von Bacher et al. (2015 b) beschriebene Assay, ermöglicht es unter Verwendung von CD154 spezifische T-Zellen gegen *A. fumigatus* aus venösen Blutproben zu quantifizieren. In ihrer Studie konnten die Autoren die spezifischen T-Zell-Frequenzen bei 59 von 69 Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose oder Mucormykose zuverlässig detektieren. Bei 90 % der Patienten mit nachgewiesener invasiver Schimmelpilzinfektion und bei 31 % der Patienten, bei denen ein nicht nachgewiesener Verdacht auf eine Infektion bestand, konnten erhöhte Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen bestimmt werden. Eine Spezifität des *Markers* von 80 % wurde in der Studie erhoben. Bei den Patienten mit pulmonaler Mukormykose, die einer chirurgischen Intervention mit Resektion befallener Lungenabschnitte zugeführt wurden, zeigte sich ein schneller Abfall der spezifischen T-Zell-Frequenzen im Verlauf. Aufgrund dieser Ergebnisse beschrieben Bacher et al. (2015 b) den Test als schnelle, wenig invasive und gleichzeitig sensitive Methode, die bei unkomplizierter Anwendung zur Primärdiagnostik invasiver Mykosen eingesetzt werden und darüber hinaus auch zur Verlaufskontrolle unter Therapie verwendet werden kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Inzidenz invasiver Mykosen bei immunsupprimierten Patienten hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Für die Behandlung der Erkrankungen ist eine frühzeitige Diagnosestellung unabdingbar. Da invasive diagnostische Maßnahmen bei den betroffenen Patienten jedoch häufig kontraindiziert sind, werden neue Biomarker und nicht invasive Diagnoseverfahren intensiv beforscht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Prüfung und Optimierung der klinischen Verwendbarkeit eines Testverfahrens zum Nachweis *Aspergillus fumigatus*-spezifischer T-Zellen.

Bacher et al. (2015 b) hatten die Quantifizierung spezifischer T-Zellen aus venösen Blutproben als Ansatz zur Primär- und Verlaufsdiagnostik bei Patienten mit invasiven pulmonalen Aspergillosen und Mukormykosen beschrieben. Das von den Autoren entwickelte Protokoll zur Detektion dieser Zellen basiert, wie in 1.3. ausführlich beschrieben auf dem Prinzip der Isolation von PBMC aus Vollblutproben, deren Stimulation mit *Aspergillus* oder Mucorales Lysaten und anschließend der Quantifizierung Pilz-spezifischer Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Da diese Methode ausschließlich in spezialisierten Laboratorien großer Zentren, wie Universitätskliniken zur Verfügung steht, besteht die Notwendigkeit des Probenverkehrs zu diesen Laboren. Wurster et al. (2017 a) hatten gezeigt, dass die präanalytische Lagerung solcher Proben einen limitierenden Faktor für die klinische Verwendbarkeit des von Bacher et al. (2015 b) beschriebenen Assays darstellte.

Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsschrift war es, das Protokoll von Bacher et al. (2015 b) zur Detektion *Aspergillus fumigatus*-spezifischer T-Zellen, hinsichtlich seiner Präanalytik und klinischen Anwendbarkeit eingehender zu evaluieren und zu optimieren.

Insbesondere bestanden folgende Einzelziele:

- 1.) Verwendung eines Vollblut-basierten Protokolls, das auf die Isolation von PBMCs verzichtet
- 2.) Einfluss T-Zell-inhibitorischer Substanzen auf die Sensitivität des PBMC-basierten Assays

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

2.1.1.1 Reagenzien für die Zellkultur

RMPI-Medium 1640 + Glutamax	Gibco®
Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz	Mibe
Mycophenolat-Mofetil	Roche
Ciclosporin A	Novartis
Brefeldin A from Penicillium brefeldianum	Sigma-Aldrich
Aspergillus fumigatus Lysat	Miltenyi Biotec
Glucose 5 % Infusionslösung	B. Braun
Ethanol	Sigma-Aldrich
NaCl 0,9 %	B. Braun

2.1.1.2 Reagenzien für die Aufreinigung von PBMC

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml	Biochrom
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Buffer EL	Qiagen
Trypan Blue Solution 0,4 % (Trypanblau)	Sigma-Aldrich

2.1.1.3 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

FACS Clean	BD Biosciences
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec

2.1.2 Einmalige Materialvorbereitung für die Zellkultur

A. fumigatus Lysat	0,5 mg <i>A. fumigatus</i> Lysat in 500 µl steriles H ₂ O
Brefeldin A	5 mg Brefeldin A in 1 ml Ethanol
Ciclosporin A	50 mg Ciclosporin A in 25 ml NaCl 0,9 %
Mycophenolatmofetil	500 mg Mycophenolatmofetil in 15 ml Glucose 5 % Infusionslösung
Prednisolon	250 mg Prednisolon in 5 ml H ₂ O
Waschpuffer	HBSS + 5 % allogenes AB-Serum
Kultur-Medium	RPMI 1640 + 5 % autologes Serum (sterilfiltriert und hitzeinaktiviert)

2.1.3 Antikörper

anti-CD28 pure – functional grade, human	Miltenyi Biotec
anti-CD49d pure, human	Miltenyi Biotec
anti-CD4-VIT4-FITC, human	Miltenyi Biotec
anti-CD154-APC, human	Miltenyi Biotec

2.1.4 Technisches Equipment

2.1.4.1 Biochemisches und molekularbiologisches Equipment

FACS Calibur	Becton Dickinson
Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
Mixer Uzusio VTX-3000L (Vortex)	LMS®
Mikroliterpipetten Research Plus	Eppendorf
Accu-Jet Pro	Brand
Pasteur Pipette 3 ml	Biosigma

Serologische Pipetten Cellstar	Greiner bio-one
BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson SA
BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson SA
Biosphere Filter Tips	Sarsted
Cellstar Tubes 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one
SafeSeal Gefäße	Sarsted
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Falcon

2.1.4.2 Zellkultur-Equipment

Inkubator Heratherm IGS60	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Hertherm Heracell 150i	Thermo Scientific
Eclipse TS100	Nikon
Heizblock, neoBLOCK 1	neoLab
Sterilwerkbank Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr

2.1.5 Spezielle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Multiwell 6 Well Platte (#353046)	Falcon
96 Well Platte (#353072)	Falcon
S-Monovette® 2,7 ml	Sarstedt
S-Monovette® 2,7 ml K3E	Sarstedt
S-Monovette® 7,5 ml Z	Sarstedt
S-Monovette® 9 ml AH	Sarstedt
S-Monovette® 9 ml K3E	Sarstedt
Filtropur S 0,2	Sarstedt
Zählkammer Neubauer Improved	Assistent

2.1.6 Software

FlowJo Version 10
CellQuest Pro Version 0.3.9f7B
P Value from Pearson (R) Calculator, Social Science Statistics
Microsoft Office 2015
Mendeley

2.2 Methoden

2.2.1 Präanalytische Methoden

2.2.1.1 Studienpopulation

Die Gewinnung von PBMC erfolgte aus Vollblutproben von gesunden Probanden. Sie wurden unter Berücksichtigung folgender Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt:

Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 40 Jahren
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien

- Schwangerschaft oder stillende Mütter
- Einnahme von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren in den letzten 12 Wochen
- Vakzinierung oder Einnahme von Antiinfektiva in den letzten 4 Wochen
- Akuter Infekt
- Chronische Infektionserkrankung
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- Bereits an derselben Versuchsserie dieser Studie teilgenommen
- Abhängigkeitsverhältnis zum Investigatorenteam oder vulnerable Personengruppe

Die Probanden wurden vor Einschluss in die Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung. Ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät hatte im Vorfeld bestätigt, dass weder ethische noch rechtliche Bedenken gegen das Durchführen der Studie bestanden.

2.2.1.2 Blutentnahme

Nach gründlicher Hautdesinfektion erfolgte die Entnahme von Vollblut, unter Verwendung einer 19G Safety-Kanüle, aus einer Cubitalvene. Entsprechend der jeweiligen experimentellen Anforderungen wurde den Probanden eine wechselnde Anzahl an Heparin- und EDTA-Monovetten, sowie Serum-Monovetten zur Gewinnung autologen Serums abgenommen.

2.2.1.3 Gewinnung autologen Serums

7,5 ml Serum-Monovetten wurden für 10 min bei 3000 g und RT (Beschleunigung und Bremse auf Stufe 9) zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde mit einer Mikroliterpipette abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Aufnahme des gesammelten Serums mit einer 19G Kanüle in eine 10 ml oder 20 ml Spritze, wurde das Serum durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter passiert. Das Filtrat wurde in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und diese zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min in einen auf 56 °C erhitzten Heizblock verbracht. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das gewonnene Serum bei -20 °C gelagert.

2.2.1.4 Isolation von PBMC aus Vollblut

7,5 ml Heparin- oder EDTA-Vollblut wurden vorsichtig auf 5 ml einer in 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegten Biocoll-Lösung (1,077 g/ml) überschichtet. Die Anzahl der präparierten Zentrifugenröhrchen variierte entsprechend des Versuchsaufbaus. Nach Zentrifugation für 25 min bei 2000 rpm und RT (Beschleunigung und Bremse auf Stufe 5) wurde die Interphase mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dieses wurde mit sterilem HBSS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, die Zellsuspension mehrfach invertiert und für 15 min bei 900 rpm und RT (Beschleunigung und Bremse auf Stufe 5) zentrifugiert ($\hat{=}$ 1. Waschschrift). Nach

Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert, das Zentrifugenröhrchen erneut mit HBSS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, invertiert und wiederum bei 900 rpm für 15 min zentrifugiert (\cong 2. Waschschrift). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Medium (RPMI 1640 + 5 % autologes Serum oder AB Serum) resuspendiert.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

10 μ l der Zellsuspension wurden mit 40 μ l Medium und 50 μ l Trypanblau, welches zur Vitalitätskontrolle verwendet wurde, versetzt. Um die Zellzahl in der vorliegenden Zellsuspension zu quantifizieren wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt. Mehrere Großquadrate wurden gezählt, um dann die Zellzahl der Suspension pro ml mit folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Zellzahl / ml} = 10^4 \times \text{Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.1.6 Ausplattieren der Zellen

Nach dem Einstellen der in der Neubauer-Kammer bestimmten Zellzahl mit Medium auf 1×10^7 PBMCs / ml wurden jeweils 100 μ l der Zellsuspension ($\cong 1 \times 10^6$ PBMCs) pro Vertiefung in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausplattiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Stimulation von PBMC mit *A. fumigatus* – Standardprotokoll

Die Zellen wurden nach einer Ruhezeit von mindestens 15 min nach dem Ausplattieren stimuliert. Standardmäßig wurde hierzu 1 μ l (\cong 0,1 μ g) CD28-Antikörper (kostimulatorisches Molekül) in die als Hintergrundkontrolle fungierende Vertiefung gegeben. Zur Reduktion des stochastischen Fehlers bei der Messung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen wurden Zellen in Duplikaten mit Lysat stimuliert. Hierzu wurden je 1 μ l CD28-Antikörper und 5 μ l (\cong 5 μ g) des *A. fumigatus* Lysats in beide Vertiefungen pipettiert. Eine vierte Vertiefung ohne Zusatz kostimulatorischer Faktoren zur

Zellsuspension fungierte als Negativkontrolle. Die Zellen wurden dann für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der 2-stündigen Inkubation wurden 10 µg/ml Brefeldin A zu jeder Vertiefung hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend erneut für mindestens 16 h und maximal 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2.2 Behandlung von PBMC mit Immunsuppressiva

Die Isolation von PBMCs erfolgte wie in 2.2.1.4 beschrieben. Während des 2. Waschschrilles wurden 15 ml Medium (RPMI 1640 + 5 % autologes Serum) angesetzt und die Stammlösungen der Immunsuppressiva (s. 2.1.2) so vorverdünnt, dass bei einem späteren Einsatz von 1 : 100 folgende Zielkonzentrationen erreicht wurden:

Ciclosporin A	Zielkonzentration: 200 ng / ml
Mycophenolatmofetil	Zielkonzentration: 2 µg / ml
Prednisolon	Zielkonzentration: 200 ng / ml

Nach Beendigung des Waschschrilles wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 10 ml des angesetzten Mediums resuspendiert, die Zellzahl wie in 2.2.1.5 beschrieben bestimmt und die Suspension durch Verdünnung mit dem Medium auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen / ml eingestellt. 2 ml dieser Zellsuspension wurden pro *Well* in eine 6-*Well*-Platte gegeben und im Verhältnis von 1 : 100 mit den vorverdünnten Immunsuppressiva für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der 3-stündigen Kokultur mit den Immunsuppressiva wurden die Zellen geerntet. Hierbei wurde zunächst 1 ml aus dem entsprechenden *Well* in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch vorsichtiges Spülen mit dem zweiten Milliliter vom Boden des *Wells* gelöst. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand aus den Reaktionsgefäßen wurde abgenommen und die Zellpellets in 600 µl Medium resuspendiert. Das weitere Prozedere gestaltete sich wie in 2.2.1.5 und 2.2.1.6 beschrieben. Nach einer Ruhezeit von 1 h erfolgte die Stimulation (2.2.2.1).

2.2.2.3 Ernte von PBMC

Nach der vorgesehenen Kokulturdauer von 16-18 h wurden die Kulturüberstände abgenommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und die übrigen Zellen durch Resuspendieren in 200 µl Waschpuffer, sowie mechanischer Einwirkung (Kratzen) vom Boden der Kulturplatte abgelöst und ebenfalls in die Reaktionsgefäße überführt.

2.2.3 Präanalytik *Time Course*

Zum ersten Blutentnahmezeitpunkt erfolgte die Abnahme insgesamt 36 ml Vollblut in vier 9 ml Heparin-Blutentnahmeröhrchen für die spätere Aufarbeitung nach einer Lagerungszeit von 4 h und 6 h. 4,5 ml von den 9 enthaltenen ml der Röhrchen wurden in leere Heparin-Blutentnahmeröhrchen überführt und anschließend mit 4,5 ml RPMI 1640 verdünnt. Zur Lagerung für 4 h bzw. 6 h wurden die Blutproben auf einem Taumler bei 15 rpm verbracht. Zum zweiten Entnahmezeitpunkt, 4 h nach der ersten Blutentnahme, erfolgte die Gewinnung von 36 ml Vollblut in vier 9 ml Heparin-Blutentnahmeröhrchen für die Aufarbeitung nach einer Lagerungszeit von 2 h sowie zur sofortigen Weiterverarbeitung. Ebenso wurden zweimal 9 ml EDTA-Blut zur direkten Weiterverarbeitung entnommen. Zweimal 4,5 ml des Heparin-Blutes zur 2-stündigen Lagerung wurden in leere Heparin-Blutentnahmeröhrchen überführt und alle 4 Röhrchen dann mit 4,5 ml RPMI 1640 verdünnt und zu den anderen Proben auf den Taumler verbracht. Es folgte die direkte Verarbeitung des gerade abgenommenen Heparin- und EDTA-Blutes, sowie des bereits 4 h lang auf dem Taumler gelagerten Heparin-Blutes. Hierzu wurden je 5 ml Biocoll in sechs 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit je 7,5 ml des Blutes aus den Blutentnahmeröhrchen vorsichtig überschichtet. Der weitere Arbeitsablauf verlief gemäß der Isolation von PBMC aus Vollblut (s. 2.2.1.4). 2 h nach der 2. Blutentnahme erfolgte die Verarbeitung der zuvor für 2 h bzw. 6 h auf dem Taumler gelagerten Proben, gemäß des oben beschriebenen Prozederes für die 4 h gelagerten Proben.

2.2.4 Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen aus Vollblut

Als erster vorzubereitender Arbeitsschritt erfolgte die Vorbereitung einer Hintergrund-Kontrolle und einer Lysat-Probe.

Hintergrund-Kontrolle	5 µl (\cong 0,5 µg) CD28-Antikörper 5 µl (\cong 0,5 µg) CD49d-Antikörper 40 µl RPMI 1640
Lysat-Probe	5 µl (\cong 0,5 µg) CD28-Antikörper 5 µl (\cong 0,5 µg) CD49d-Antikörper 25 µl (\cong 25 µg) <i>A. fumigatus</i> Lysat 15 µl RPMI 1640

Jeder Mastermix wurde anschließend in ein handelsübliches 2,7 ml Blutentnahmegefäß ohne Antikoagulans vorgelegt. Nach Desinfektion der Membran des Blutentnahmegefäßes wurden 0,5 ml Heparin-Blut mit einer graduierten Insulinspritze aus dem Blutentnahmeröhrchen in die vorbereiteten Blutentnahmegefäße überführt. Die Blutentnahmegefäße wurden dann in 15 ml Zentrifugenröhrchen verbracht, durch Invertieren gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A. Nach erneuter Durchmischung der Proben durch Invertieren wurde eine Inkubation bei 37 °C für 4 h abgeschlossen. 4 h nach der Brefeldin A-Zugabe wurden jeweils 0,5 ml EDTA in die Blutentnahmegefäße gegeben, die Suspensionen durch Pipettieren durchmischt und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Suspensionen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die entsprechenden Blutentnahmegefäße mit 1 ml Erythrolyse-Puffer nachgespült, dieser ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 7 min bei 600 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und das Zellpellet in 3 ml Erythrolyse-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation der Proben bis zum Aufklaren der Suspension bzw. für max. 6 min wurden die Proben erneut für 7 min bei 600 g und RT zentrifugiert. Nach

Abgießen des Überstandes und Resuspension der Zellen in 1 ml HBSS wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Das weitere Vorgehen gestaltete sich wie in 2.2.5.1 beschrieben. Hierbei wurde im Gegensatz zum dort beschriebenen Protokoll zur Färbung der Vollblutproben die doppelte Menge der Antikörper (10 µl) pro Probe verwendet. Des Weiteren wurde für die Oberflächenantigenfärbung HBSS anstelle von Waschpuffer verwendet.

2.2.5 Analytische Methoden

2.2.5.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Zum Pelletieren der Zellen wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Herstellung eines *Mastermixes* zur Färbung mit dem CD4-Antikörper. Hierzu wurden 100 µl Waschpuffer und 5 µl CD4-FITC-Antikörper pro Probe angesetzt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand durch vorsichtiges Abklopfen abgenommen und das Pellet in 95 µl der CD4-Antikörper-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Reaktionsgefäße mit 900 µl Waschpuffer aufgefüllt und abermals für 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Beendigung der Zentrifugation abgenommen und das Zellpellet in 400 µl Fixierlösung (HBSS und *Inside Fix* im Verhältnis 1:1) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und die Proben erneut zentrifugiert. Pro Probe wurden 100 µl *Inside Perm* und 5 µl CD154-APC-Antikörper vorbereitet und die Zellpellets nach Beendigung der Zentrifugation und Abnahme des Überstandes in 95 µl der Antikörper-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT im Dunkeln wurden die Proben mit 900 µl *Inside Perm* gewaschen und anschließend für 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abklopfen des Überstandes wurden die Proben in 200 µl HBSS aufgenommen und in vorbereitete FACS-Röhrchen überführt.

2.2.5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Antigen-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenz

Die Quantifizierung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zellen erfolgte mit Hilfe des FACS Calibur Durchflusszytometers (Becton Dickinson). Das Gerät wurde auf eine möglichst niedrige Flussrate (15 µl / min) eingestellt und die erfassten Messwerte mit Hilfe der *CellQuestPro* Software verarbeitet.

In einem FSC (Größe)/SSC (Granularität) Plot wurde für jede Probe die Lymphozyten-Population approximiert und mindestens 50.000 Lymphozyten akquiriert. Der Anteil der CD4⁺ Zellen sowie der CD4⁺ und CD154⁺ Zellen, wurde mit Hilfe eines CD4/CD154-Plots quantifiziert (Abbildung 4 A). Gemäß der untenstehenden Formel (Abbildung 4 B) wurde die *A. fumigatus*-spezifische T-Helfer-Zell-Frequenz berechnet.

Um den stochastischen Fehler zu reduzieren wurden die mit Lysat stimulierten Zellen standartmäßig im Duplikat gemessen. In diesem Fall wurde zuerst der Quotient für jede der Lysat-Proben ermittelt, der Mittelwert aus den beiden Ergebnissen gebildet und dann mit der unten aufgeführten Formel (Abbildung 4 B) die Differenz zum unspezifischen Hintergrund bestimmt.

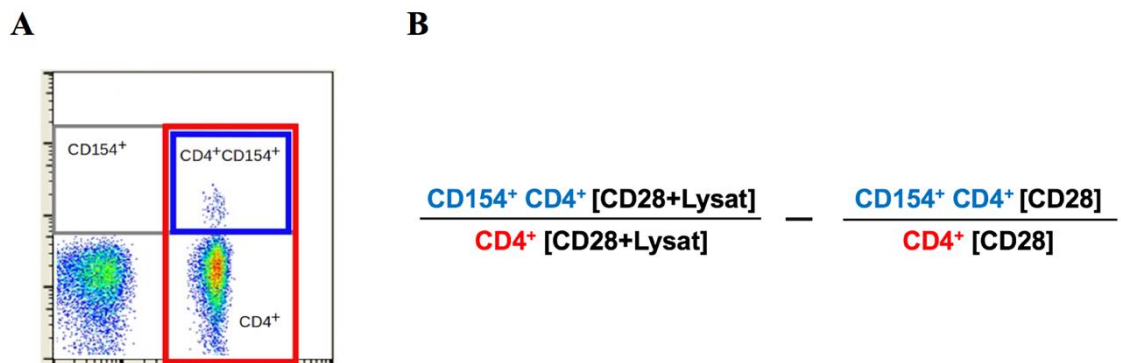


Abbildung 4
Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen aus einem durchflusszytometrischen Datensatz. A) Eingezeichnete *Gates* in einem Beispielplot. x-Wert = Fluoreszenzintensität für CD4-FITC, y-Wert = Fluoreszenzintensität für CD154-APC. B) Formel zur Berechnung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenz. Der unspezifische Hintergrund der Probe, d. h. der Anteil der reaktiven T-Zellen, der nur mit dem kostimulatorischen Molekül CD28 (+ CD49d im Vollblut-Assay) behandelt wurde, wird von dem Anteil der reaktiven T-Zellen in der Lysat-Probe subtrahiert.

2.2.5.3 Qualitätskontrolle

Der Anteil der wie in 2.2.5.2 beschrieben, ermittelten *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen wird in Prozent angegeben. Für jede Analyse wurde die Einhaltung folgender Grenzwerte festgelegt:

- 0,07 % (ab 0,05 % als grenzwertig interpretiert) maximale Abweichung der Ergebnisse der Hintergrundprobe (CD28) zu denen der mit Lysat stimulierten Probe sowohl bei Verwendung von Vollblut als auch bei PBMCs
- 0,07 % (ab 0,05 % als grenzwertig interpretiert) maximale Abweichung zwischen den einzelnen Ergebnissen der mit Lysat stimulierten Duplikat-Proben

2.2.6 Statistik

Mit Hilfe des Pearson Korrelationskoeffizienten (r) wurden die verschiedenen Korrelationen bewertet. Die zugehörige Signifikanztestung ($p[r]$) wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der Probanden mittels eines *Online Tools*, dem *P Value from Pearson (R) Calculator (Social Science Statistics)*, durchgeführt. Die Signifikanzwerte wurden mit Hilfe des zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Zur Durchführung der Regressionsanalysen mittels linearer Regression durch den Ursprung wurde Microsoft Excel (Version 2015) verwendet. Alle gemessenen und angegebenen Werte, die eine Abweichung von maximal 0,05 % aufweisen liegen innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls, Werte mit einer Abweichung von weniger als 0,07 % innerhalb des 99 % Konfidenzintervalls. Für eine einfachere Darstellung der Signifikanzniveaus des *p-Value* wurde folgende Symbolik festgelegt: ns (nicht signifikant) $p > 0,1$; ■ $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Agitation und Verdünnung von Blutproben mit RPMI-Medium verlängern das präanalytische Fenster bei der Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen

Eine wichtige Voraussetzung für eine zuverlässige Messung der spezifischen T-Zell-Frequenz stellt die präanalytische Lagerung der venösen Blutproben vor der Zellisolation (PBMC-Isolation) dar. Vorausgegangene Untersuchungen in unserem Labor hatten gezeigt, dass die Detektion *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen nach 2 h präanalytischer Lagerzeit deutlich vermindert war und nach 6 h präanalytischer Lagerzeit fast keine spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar waren (Wurster et al., 2017 a).

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern durch Agitation und Vorverdünnung der verwendeten Blutproben eine Verlängerung des vertretbaren präanalytischen Zeitfensters erzielt werden kann. Grundlage der Vorgehensweise war ein Review-Artikel von Mallone et al. (2011), der sich u. a. mit den präanalytischen Lagerungsbedingungen von Blutproben beschäftigt, die zur Gewinnung von PBMCs verwendet werden. In Anlehnung an die dort beschriebenen Vorgehensweisen wurden die Blutproben 10 gesunder Probanden wie in 2.2.3 beschrieben im Verhältnis 1:1 mit RPMI-Medium vorverdünnt und zur Agitation auf einen Taumler verbracht. Nach präanalytischer Lagerungszeit von 2 h, 4 h oder 6 h wurden die PBMCs isoliert und die *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zellen gemäß des in 2.2.5.2 beschriebenen Standardprotokolls quantifiziert. Gleichzeitig wurde evaluiert, ob bei sofortiger Aufbereitung der Proben (0 h) ein Unterschied in der Verwendung von EDTA-Blut oder Heparin-Blut besteht.

Bei sofortiger Isolation der PBMCs fand sich unter der Verwendung von EDTA-Blut ein durchschnittlicher Anteil von $0,089 \% \pm 0,041 \%$ CD154⁺/CD4⁺ Zellen, im Vergleich zu $0,083 \% \pm 0,052 \%$ in den Heparin-Blutproben (Abbildung 5). Eine Verwendung von Heparin-Blut oder EDTA-Blut zur sofortigen Isolation der PBMCs resultiert demnach in einer vergleichbaren Detektionsleistung.

Kein von diesen Ergebnissen signifikant abweichender Wert fand sich für PBMCs die nach 2 h (Mittelwert $0,088 \% \pm 0,035 \%$; $p < 0,001$) und 4 h (Mittelwert $0,083 \% \pm 0,052 \%$; $p < 0,001$) aus den zuvor verdünnten und agitierten Heparin-Blutproben isoliert wurden. Nach 6 h präanalytischer Lagerungszeit war dieser Mittelwert auf $0,062 \% \pm$

0,030 % ($p < 0,05$) gesunken. Des Weiteren wurde ein um $> 0,07$ % vom Ergebnis sofort aufgereinigter PBMCs abweichender Wert detektiert (Abbildung 6). Es ist folglich möglich durch Vorverdünnung und stetige Agitation der Blutproben das präanalytische Zeitfenster vor der PBMC-Isolation auf bis zu 4 h auszuweiten, ohne dass dies mit einem Verlust der Sensitivität einhergeht.

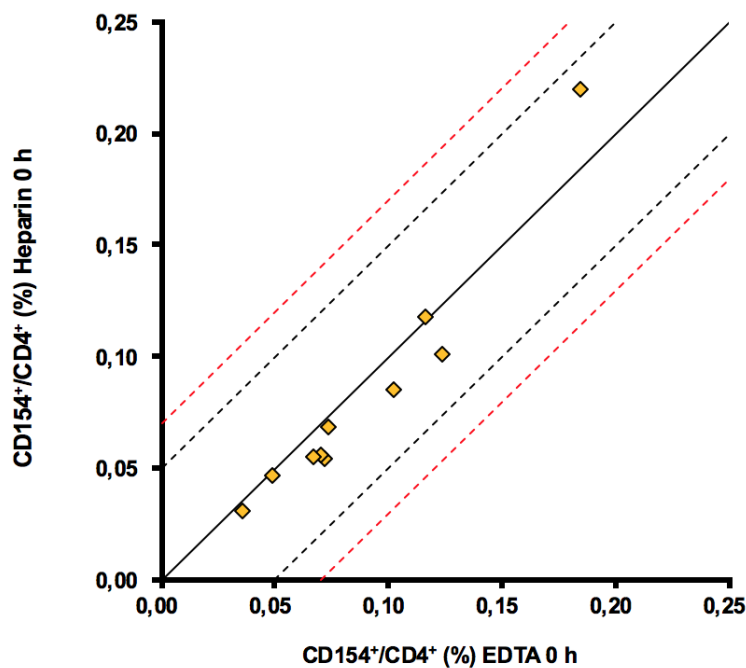


Abbildung 5

Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden nach sofortiger Aufreinigung der PBMCs aus EDTA-Blutproben (EDTA 0 h, x-Wert) im Vergleich zu sofortiger Aufreinigung der PBMCs aus Heparin-Blutproben (Heparin 0 h, y-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % der gemessenen T-Zell-Frequenzen, bei Verwendung von EDTA- und Heparin-Blut desselben Spenders.

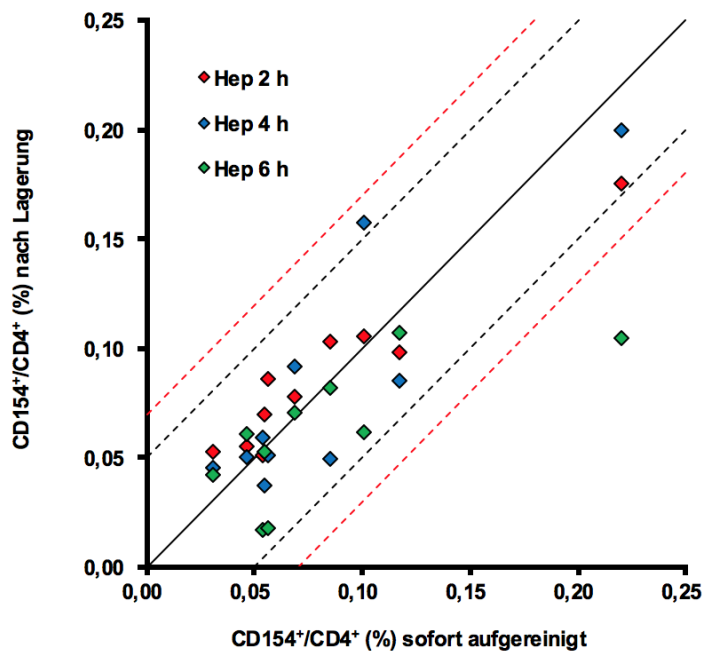


Abbildung 6

Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden nach sofortiger Aufreinigung der PBMCs aus Heparin-Blutproben (Hep) (x-Wert) und unter Verwendung von vor der Gewinnung der PBMCs gelagerten Heparin-Blutproben (y-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine Abweichung von 0,05 % und 0,07 % der gemessenen T-Zell-Frequenzen in den gelagerten Heparin-Blutproben im Vergleich zu den sofort aufgereinigten Heparin-Blutproben.

3.2 Optimierung eines Vollblut-basierten Protokolls

Die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes zur Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen ist aufwendig und zeitkritisch (s. 3.1). Die Basis der folgenden Versuche bildete deshalb ein in unserem Labor bereits zuvor verwendeter Vollblut-basierter *Assay* zum Nachweis der Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen. In Vorversuchen hatte unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass das in 2.2.4 beschriebene Vollblut-basierte Protokoll zuverlässige Ergebnisse im Vergleich zu dem auf isolierten PBMCs basierenden Standard-*Assays* liefert. Ziel der folgenden Experimente war die Evaluation und Optimierung des Vollblut-basierten *Assays*, hinsichtlich der präanalytischen Handhabung und der Stimulations-Schemata.

3.2.1 Kurzzeitige Zwischenlagerung der Proben bei Raumtemperatur ist für den Vollblut-basierten Assay möglich

In diesem Experiment wurde evaluiert, inwiefern es möglich ist die Testsysteme nach der Beimpfung mit Vollblut über einen kurzen Zeitraum bei Raumtemperatur zu lagern (s. 2.2.4).

Aus dem Vollblut 10 gesunder Probanden wurden PBMCs sofort isoliert und die *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bestimmt. Beimpfte Testsysteme derselben Spender wurden für 2 h bei 37 °C gelagert, bevor die Zugabe von Brefeldin A erfolgte und die Proben für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert wurden (2 + 4). Gleichzeitig wurden beimpfte Testsysteme für 2 h bei Raumtemperatur (RT) und dann für weitere 2 h bei 37 °C gelagert, bevor die Zugabe von Brefeldin A erfolgte und die Proben für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert wurden (2 RT + 2 + 4). In beiden Fällen wurde nach Abschluss der Inkubationszeiten die *A. fumigatus*-spezifische T-Helfer-Zell-Frequenz bestimmt.

Protokoll	vor Brefeldin A	nach Brefeldin A
2 + 4	2 h 37 °C	4 h 37 °C
2 RT + 2 + 4	2 h RT + 2 h 37 °C	4 h 37 °C

Tabelle 2
Stimulationsschemata Vollblutprotokolle bei kurzzeitiger Lagerung der Proben bei Raumtemperatur

Sowohl das Vollblutprotokoll 2 + 4, als auch das Vollblutprotokoll 2 RT + 2 + 4 detektierten mit dem PBMC-Standardprotokoll vergleichbare *A. fumigatus*-spezifische T-Helfer-Zell-Frequenzen (Mittelwert 0,096 % und 0,090 % vs. 0,087 %, Abbildung 7).

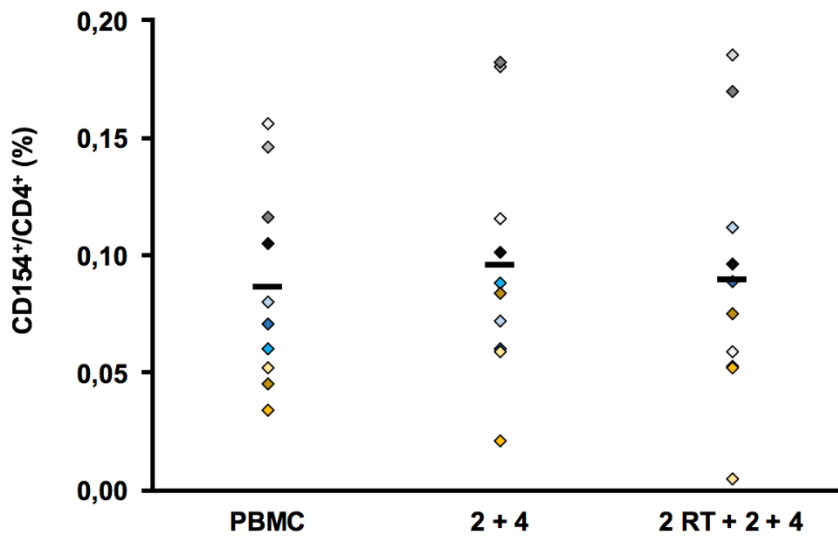


Abbildung 4
 Vergleichende Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls (PBMC) und des Vollblut-basierten Protokolls mit unterschiedlichen Lagerungsbedingungen vor der Zugabe von Brefeldin A. Die spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen sind für die einzelnen Spender in unterschiedlichen Farben angegeben. Der arithmetische Mittelwert wird durch einen horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet.

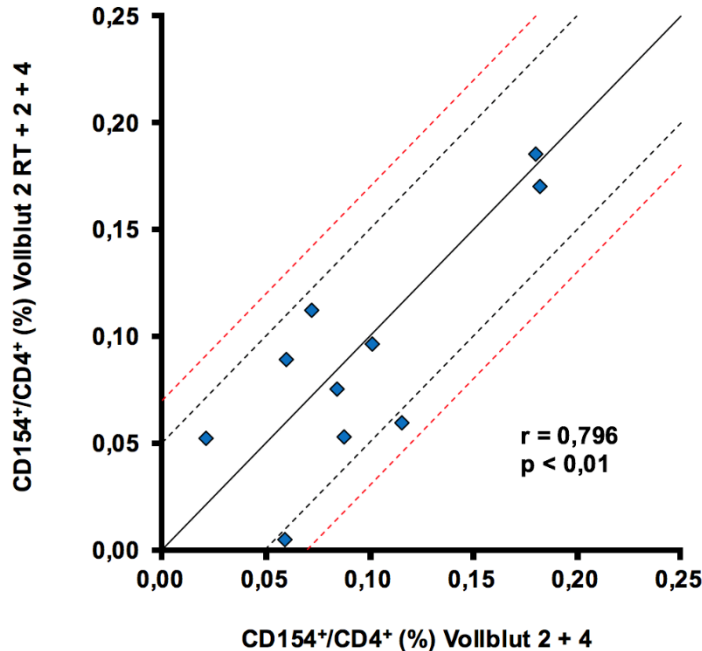


Abbildung 5
 Vergleichende Bestimmung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden unter Verwendung des Vollblut-basierten Protokolls 2 RT + 2 + 4 (y-Wert) im Vergleich zum Vollblut Protokoll 2 + 4 (x-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % bzw. 0,07 % der gemessenen T-Helfer-Zell-Frequenzen.

3.2.2 Alleinige Stimulation bei Raumtemperatur ist für den Vollblut-basierten Assay nicht möglich

In der folgenden Testreihe sollte evaluiert werden, ob eine suffiziente Stimulation der Vollblutproben bei Raumtemperatur möglich ist. Dies wurde an Vollblutproben von sechs gesunden Spendern analysiert. Bei allen Spendern wurde die *A. fumigatus*-spezifische T-Helfer-Zell-Frequenz unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und aus drei unterschiedlichen Vollblut-Konditionen bei Raumtemperatur bestimmt. Alle Vollblutproben wurden nach Brefeldin A-Zugabe für 16 h bei Raumtemperatur gelagert (... + 16 RT) und vor der Zugabe von Brefeldin A für 2 h, 4 h oder 8 h bei Raumtemperatur stimuliert (2 RT + 16 RT, 4 RT + 16 RT bzw. 8 RT + 16 RT).

Protokoll	vor Brefeldin A	nach Brefeldin A
2 RT + 16 RT	2 h RT	16 h RT
4 RT + 16 RT	4 h RT	16 h RT
8 RT + 16 RT	8 h RT	16 h RT

Tabelle 3
Stimulationsschemata Vollblutprotokolle bei ausschließlicher Lagerung der Proben bei Raumtemperatur

Die detektierten Frequenzen der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zellen blieben bei den bei Raumtemperatur stimulierten Vollblutproben deutlich hinter den Ergebnissen des PBMC-Protokolls zurück (Abbildung 9). Des Weiteren wurden mehrere um > 0,05 % und > 0,07 % von den Ergebnissen bei sofort aufgereinigten PBMCs abweichende Werte detektiert (Abbildung 9). Der Mittelwert für die CD154⁺/CD4⁺ Zell-Frequenz beträgt im PBMC-Protokoll 0,091 %, im Vollblutprotokoll 2 RT + 16 RT: 0,015 %, 4 RT + 16 RT: 0,027 % und 8 RT + 16 RT: 0,016 %. In der Gesamtschau zeigen die Resultate, dass eine gleichwertige Stimulation der Vollblutproben bei Raumtemperatur unter diesen Bedingungen nicht möglich ist.

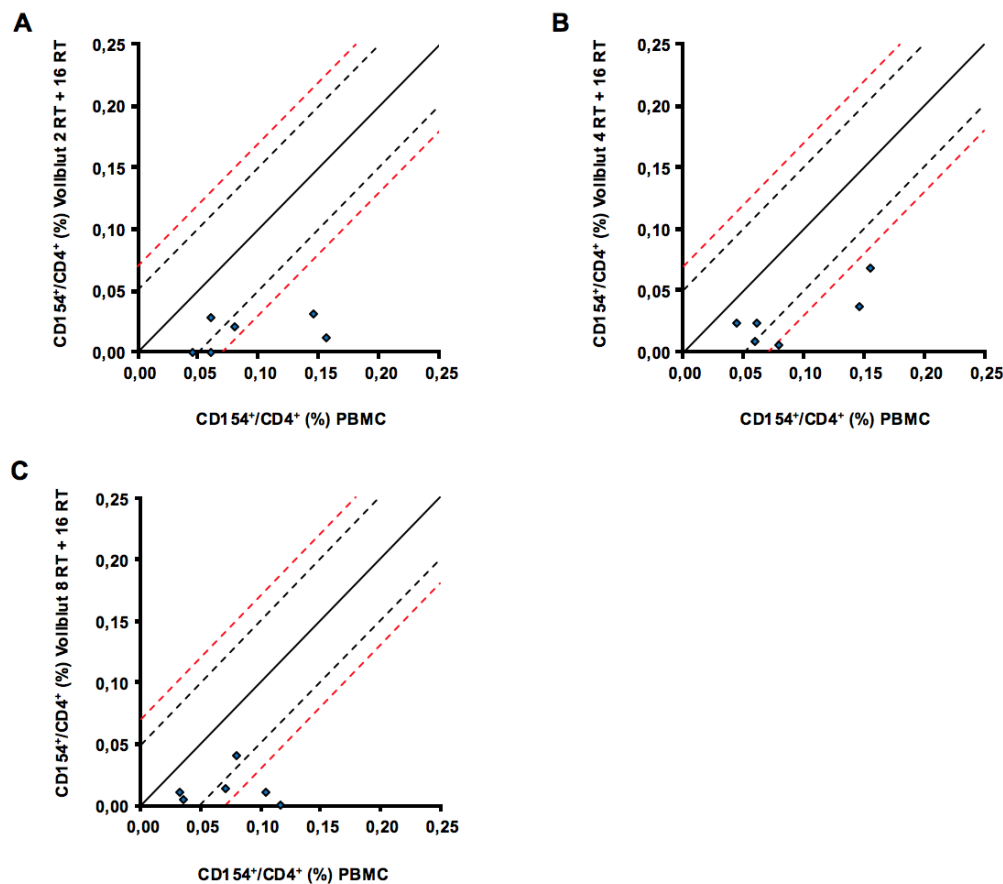


Abbildung 6

A-C) Vergleichende Bestimmung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Frequenzen bei jeweils 6 gesunden Probanden unter Verwendung des PBMC-basierten Protokolls (x-Wert) und des Vollblut-basierten Protokolls mit Stimulation bei Raumtemperatur vor und nach Zugabe von Brefeldin A (A: 2 RT + 16 RT, B: 4 RT + 16 RT, C: 8 RT + 16 RT, y-Wert).

Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % der gemessenen T-Zell Frequenzen beim jeweiligen Vollblut-basierten Protokoll im Vergleich zum PBMC-Protokoll.

3.2.3 Optimierung der Stimulationsperioden führt zu einer Sensitivitätssteigerung der Protokolle

Ziel dieser Versuchsreihe war es, einen systematischen Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Es wurde untersucht, wie sich längere Inkubationszeiten vor bzw. nach Brefeldin A-Zugabe auf die Sensitivität der PBMC- und Vollblut-basierten Protokolle auswirken.

Zur Evaluation dieser Fragestellung wurden aus dem Vollblut von zehn gesunden Probanden PBMCs wie in 2.2.1.4 beschrieben isoliert und mit $0,1 \mu\text{g}$ Anti-CD28 $\pm 5 \mu\text{g}$ *A. fumigatus* Lysat stimuliert. Die Zellen wurden dann für 2 h bzw. 4 h bei 37 °C und

5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie mit Brefeldin A behandelt und für weitere 4 h bzw. 18 h unter gleichen Bedingungen abermals inkubiert. Vollblutproben derselben zehn Spender wurden ebenfalls für 2 h bzw. 4 h ohne Brefeldin A und dann für 4 h bzw. 18 h mit Brefeldin A bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Frequenzen in allen Proben quantifiziert (Abbildung 10).

Vollblut-Protokoll	37 °C	Brefeldin A, 37 °C
2 + 4	2 h	4-5 h
4 + 4	4 h	4-5 h
2 + 18	2 h	16-18 h
4 + 18	4 h	16-18 h

Tabelle 4
Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden bei Anwendung des Vollblut-basierten Protokolls

PBMC-Protokoll	37 °C, 5 % CO₂	Brefeldin A, 37 °C, 5 % CO₂
2 + 4	2 h	4-5 h
4 + 4	4 h	4-5 h
2 + 18	2 h	16-18 h
4 + 18	4 h	16-18 h

Tabelle 5
Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden bei Anwendung des PBMC-basierten Protokolls

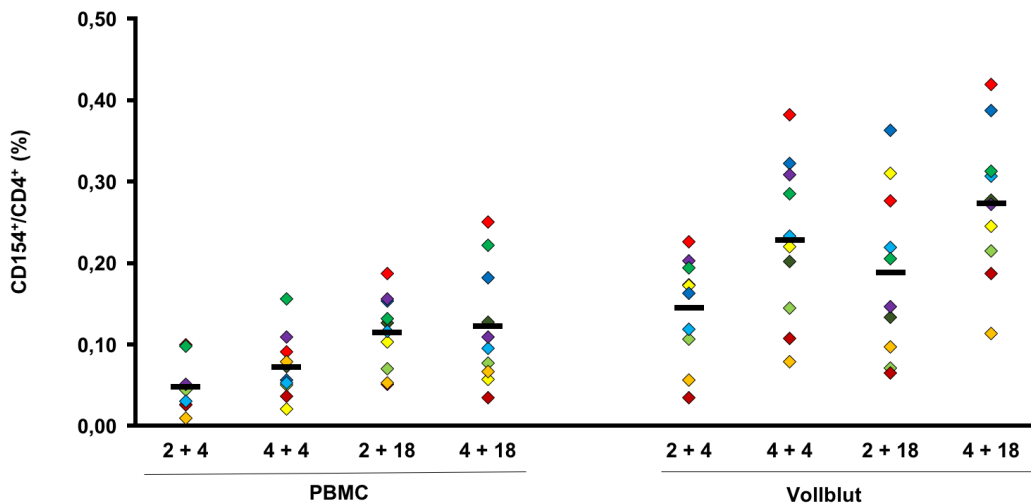


Abbildung 7

Vergleichende Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und des Vollblut-basierten Protokolls mit unterschiedlichen Stimulationsperioden vor und nach Zugabe von Brefeldin A. Die CD154⁺/CD4⁺ Zellfrequenzen sind für jeden Spender in unterschiedlichen Farben angegeben. Der arithmetische Mittelwert wird durch einen horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet.

Die 2 + 4 h Vollblut-Protokoll-Variante detektierte mit dem PBMC-Standardprotokoll vergleichbare Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen (Mittelwert: 0,145 % vs. 0,115 %). Die Mittelwerte aller anderen untersuchten Vollblut-Protokoll-Varianten lagen deutlich höher. Es zeigte sich, dass bezüglich der Vollblut-Protokolle eine 4-stündige Stimulationsperiode vor Brefeldin A-Zugabe die Basis für eine deutlich gesteigerte Detektionsrate spezifischer T-Zellen bildet und die Sensitivität in Kombination mit einer Übernachtinkubation der Zellen nach Zugabe von Brefeldin A nochmals gesteigert werden kann (Abbildung 10, Tabelle 6).

Bei den PBMC-basierten Protokollen wurde beobachtet, dass eine Übernacht-Stimulation der Proben im Vergleich zu den kurzzeitigen Stimulations-Schemata in einer gesteigerten Detektionsleistung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Frequenzen resultierte (Mittelwerte für 2 + 4: 0,048 %; 4 + 4: 0,072 % vs. 2 + 18: 0,115 %; 4 + 18: 0,122 %). Weniger entscheidend war bei den PBMC-basierten Protokollen die Stimulationsdauer vor Zugabe von Brefeldin A (Abbildung 10, Tabelle 6).

Ziel der Auswertung aller getesteten Protokoll-Varianten war es, die Kombination aus bester Detektionsleistung und Korrelation zwischen PBMC- und Vollblut-Protokoll zu ermitteln. Die Vollblutprotokolle 4 + 4 h und 4 + 18 h zeigten im Vergleich mit dem

PBMC-Protokoll 2 + 18 h die besten Ergebnisse bezüglich der Detektionsleistung in Kombination mit den größten Korrelationskoeffizienten (Tabelle 6).

			PBMC			
			2 + 4	4 + 4	2 + 18	4 + 18
		CD4 ⁺ /CD154 ⁺ Mean	0.048	0.072	0.115	0.122
Vollblut	2 + 4	0.145	r = 0.75	r = 0.48	r = 0.92	r = 0.74
	4 + 4	0.228	r = 0.77	r = 0.42	r = 0.98	r = 0.82
	2 + 18	0.189	r = 0.33	r = - 0.05	r = 0.66	r = 0.53
	4 + 18	0.274	r = 0.74	r = 0.26	r = 0.91	r = 0.83
Pearson Koeffizient			r ≥ 0.873 p < 0.001	r ≥ 0.765 p < 0.01	r ≥ 0.632 p < 0.05	r < 0.632 p > 0.05

Tabelle 6

Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden für PBMC- und Vollblut-basierte Protokolle.

Vergleichende Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und des Vollblut-basierten Protokolls mit unterschiedlichen Stimulationsperioden vor und nach Zugabe von Brefeldin A. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und die *Pearson*-Korrelationskoeffizienten für die Vergleiche der unterschiedlichen Protokolle. Durch die unterschiedlichen Farbtöne werden die Signifikanzniveaus der Korrelationskoeffizienten gekennzeichnet.

Für die Ergebnisse dieser Protokolle wurden Korrelationsanalysen mit linearer Regression durch den Ursprung durchgeführt. Für die Vollblut-Protokollvarianten mit 4-stündiger Stimulationsperiode vor der Zugabe von Brefeldin A wurden so Steigungen von 2,00 (4 + 4 h) und 2,31 (4 + 18 h) bestimmt (Abbildung 11 A+B). Bei Anwendung der errechneten Werte für die Steigung auf die Vollblut-basierten Werte im Sinne eines Konversionsfaktors und Vergleich der Ergebnisse mit den PBMC-basierten Messwerten, ergab sich keine Abweichung > 0,05 % (Abbildung 11 C+D).

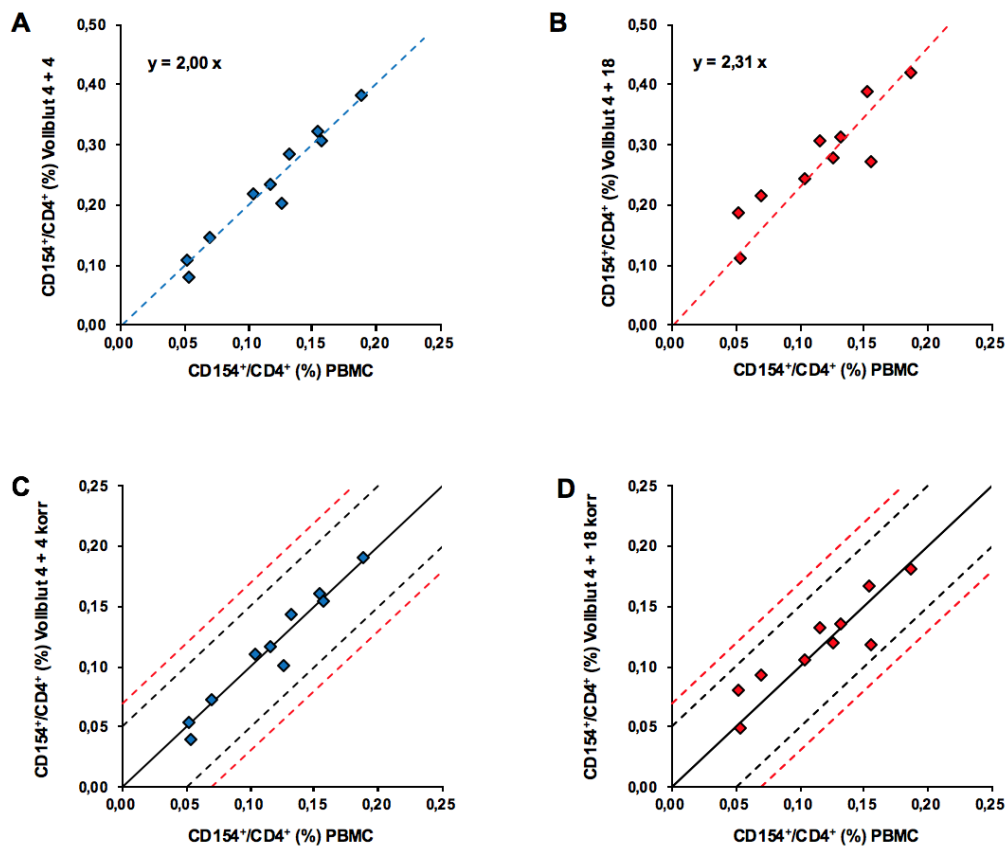


Abbildung 8

A+B) Lineare Regression durch den Ursprung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Frequenzen der Vollblut-basierten Protokollvarianten A: 4 + 4 h und B: 4 + 18 h (y-Wert) im Vergleich zum PBMC-Standardprotokoll (PBMC, x-Wert) bei 10 gesunden Probanden. Die ermittelte Formel mit dem Konversionsfaktor ist im Diagramm angegeben. Die Rohdaten entsprechen denen von Abbildung 10.

C+D) Vergleich der konvertierten Vollblutergebnisse, die mit Hilfe des in Abb. A bzw. B ermittelten Konversionsfaktors berechnet wurden (y-Wert) mit den entsprechenden PBMC-basierten Ergebnissen (x-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % der gemessenen T-Zell-Frequenzen bei den PBMC Ergebnissen im Vergleich zu den konvertierten Vollblut Ergebnissen.

Die Ergebnisse in Abbildung 10 zeigen, dass die Mittelwerte für beide PBMC-Übernacht-Protokolle ähnlich sind. Betrachtet man jedoch die Korrelationskoeffizienten der PBMC-Protokolle 2 + 18 h und 4 + 18 h mit den Vollblutprotokollen 4 + 4 h und 4 + 18 h, so zeigt sich eine Überlegenheit der Korrelation zwischen dem PBMC-Protokoll 2 + 18 h und den Vollblutprotokollen (Tabelle 6). Ein weiterer Hinweis auf diese Überlegenheit ergibt sich im Vergleich der Vollblutergebnisse, die unter Anwendung der Konversionsfaktoren umgerechnet wurden, mit den PBMC-Protokollen. Hier finden sich, anders als beim oben beschriebenen Vergleich zum 2 + 18 h PBMC-Protokoll, mehrere Abweichungen der konvertierten Vollblutwerte um mehr als 0,05 % und 0,07 %

verglichen mit dem 4 + 18 h PBMC Protokoll (Abbildung 12 B+D). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe legen nahe, dass durch das Vollblutprotokoll im Vergleich zum PBMC-Protokoll eine konstant überlegene Detektionsleistung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen erzielt wird.

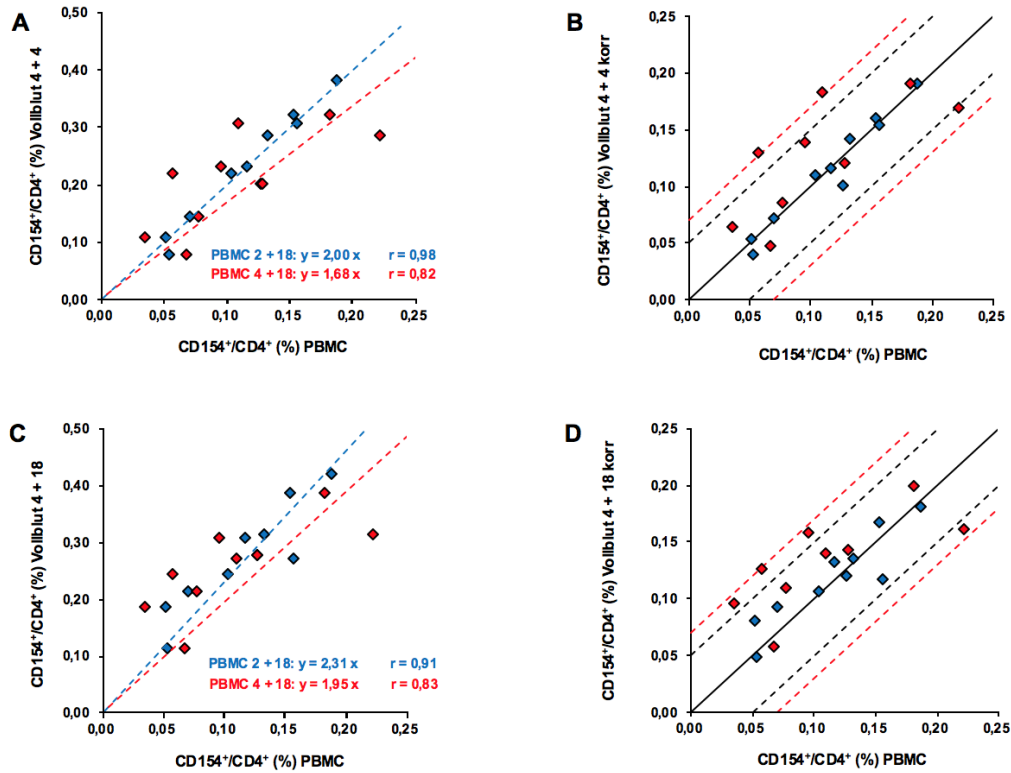


Abbildung 12

A) + C) Vergleich der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden unter Verwendung unterschiedlicher Stimulationsschemata vor und nach Zugabe von Brefeldin A. Lineare Regression durch den Ursprung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen in den Vollblut-basierten Protokollen A: 4 + 4 h und C: 4 + 18 h (y-Wert) im Vergleich zu den PBMC-basierten Übernacht-Protokollen (PBMC, x-Wert) 2 + 18 h (blau) und 4 + 18 h (rot).

B + D) Vergleich der konvertierten Vollblut-Ergebnisse (y-Wert), die unter Verwendung der in A) und C) ermittelten Konversionsfaktoren berechnet wurden, mit den entsprechenden PBMC-basierten Werten (x-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % der gemessenen T-Zell-Frequenzen bei den PBMC Ergebnissen im Vergleich zu den konvertierten Vollblut Ergebnissen.

3.2.4 Der Konversionsfaktor für das Vollblut-basierte Protokoll ist reproduzierbar

In einer 2. Versuchsserie wurde untersucht inwiefern der in 3.2.3 bestimmte Konversionsfaktor von 2,00 für das Vollblutprotokoll 4 + 4 h reproduzierbar ist. Hierfür wurden Blutproben von zehn weiteren, gesunden Probanden getestet und die *A. fumigatus*-spezifische T_H-Zell-Frequenz unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und des 4 + 4 h Vollblutprotokolls bestimmt. Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse der Ergebnisse mit linearer Regression durch den Ursprung wurde ein Konversionsfaktor von 2,15 ($r = 0,90$, $p[r] < 0,001$, Abbildung 13 A) ermittelt, welcher sich nur unwesentlich von dem zuvor bestimmten Faktor von 2,00 unterschied (Abbildung 11 A). Unter Anwendung beider Faktoren zur Konversion der Vollblut-basierten Ergebnisse des 4 + 4 h Protokolls in Abbildung 13 A (2. Serie) zeigte sich für keinen der errechneten Werte eine Abweichung um mehr als 0,05 % von den korrespondierenden PBMC Ergebnissen (Abbildung 13 B). Ebenso zeigte sich unter Anwendung beider Faktoren zur Konversion der Ergebnisse des 4 + 4 h Vollblutprotokolls in Abbildung 11 A (1. Serie) für keinen der errechneten Werte eine Abweichung um mehr als 0,05 % von den PBMC Ergebnissen (Abbildung 13 C). Die größte detektierte Abweichung zwischen den konvertierten Ergebnissen unter Verwendung von Vollblutproben und dem zugehörigen PBMC-Messwert betrug 0,032 % (Abbildung 13 C).

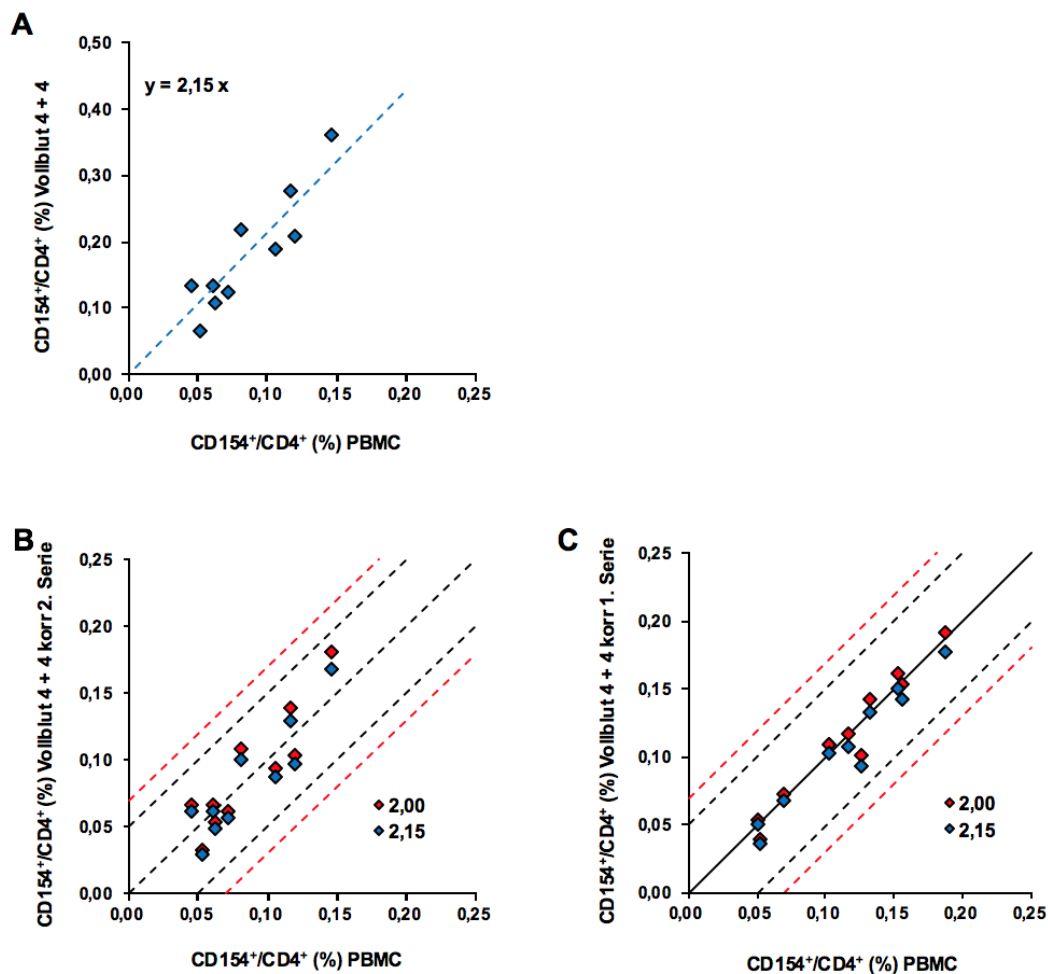


Abbildung 13

A) Lineare Regression durch den Ursprung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen im PBMC Standardprotokoll (x-Wert) im Vergleich zu dem Vollblut-basierten Protokollen 4 + 4 der 2. Serie (y-Wert). B + C) Vergleich der Vollblut-Ergebnisse aus der 1. und 2. Versuchsserie (y-Wert), die unter Verwendung der in A) (blau) und Abbildung 11A) (rot) ermittelten Faktoren konvertiert wurden, mit den entsprechenden PBMC-basierten Werten (x-Wert). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % bezüglich der gemessenen T-Zell-Frequenzen bei den PBMC Ergebnissen im Vergleich zu den konvertierten Vollblut Ergebnissen.

Diese 2. Versuchsreihe bestätigt, dass das Vollblutprotokoll in der Lage ist höhere Frequenzen spezifischer T-Zellen zu detektieren. Zugleich dokumentiert die Versuchsserie, dass die beobachteten Konversionsfaktoren über verschiedene Spenderkollektive hinweg reproduzierbar sind.

3.2.5 Vorbereitete und eingefrorene Testsysteme liefern vergleichbare Werte

Zur Vorbereitung der Blutentnahmeröhrchen mit dem Pilz-Lysat und den kostimulatorischen Faktoren ist eine sterile Werkbank notwendig. Muss die Präparation unmittelbar vor der Blutentnahme erfolgen, stellt dieser Umstand einen limitierenden Faktor für die mögliche Praktikabilität des Vollblut-basierten *Assays* im klinischen Alltag dar. Die folgenden Versuche sollten daher evaluieren, inwiefern Röhrchen vorbereitet und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert werden können.

Die *A. fumigatus*-spezifische T-Helfer-Zell-Frequenz wurde hierzu aus Vollblutproben von 10 gesunden Probanden mit der Protokollvariante 4 + 4 h bestimmt. Dabei wurde für jeden Probanden die Analyse sowohl mit frisch vorbereiteten als auch mit eingefrorenen Blutentnahmeröhrchen durchgeführt. Verwendetes Lysat und Antikörper stammten für eingefrorene und frische Röhrchen aus derselben Charge.

Die Ergebnisse zeigten nahezu identische Mittelwerte *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen für frisch zubereitete und eingefrorene Blutentnahmeröhrchen (0,124 % vs. 0,115 %). Bei keinem der Probanden fanden sich Abweichungen > 0,05 % zwischen den mittels frischer und eingefrorener Blutentnahmeröhrchen gemessenen, spezifischen T-Zell-Frequenzen (Abbildung 14).

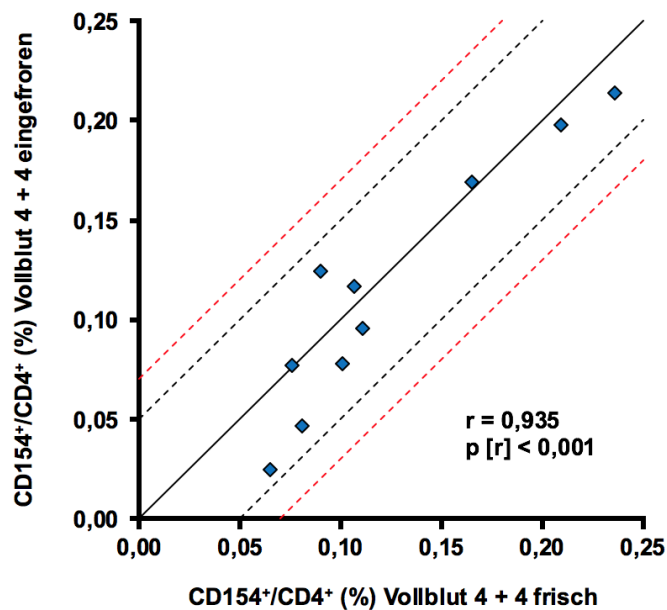


Abbildung 14

Vergleichende Bestimmung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen bei 10 gesunden Probanden in der Vollblut-basierten Protokollvariante 4 + 4 h unter Verwendung von frisch vorbereiteten Blutentnahmeröhrchen (x-Werte) und für maximal vier Wochen eingefrorene Blutentnahmeröhrchen (y-Werte). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % zwischen den gemessenen T-Zell-Frequenzen in den frisch vorbereiteten Blutentnahmeröhrchen im Vergleich zu den eingefrorenen Blutentnahmeröhrchen.

3.2.6 Kostenanalyse

Im Folgenden wurde eine orientierende Kostenanalyse für das Vollblut-basierte Protokoll im Vergleich zum PBMC-basierten Standardprotokoll erstellt. Berücksichtigung fanden dabei die Bearbeitungszeiten technischer Assistenten und erfahrener wissenschaftlicher Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe. Für die Arbeitskosten dieser Mitarbeiter wurde der ungefähre Arbeitgeberbruttosatz nach TV-L E9/2 (24 € / h) berechnet. Die angegebenen Materialkosten orientieren sich an den Rabatten, die im Februar 2016 bei einem Bezug der Artikel über die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg gewährt wurden. Diese Kosten wurden anschließend mit dem Materialverbrauch für die einzelnen Arbeitsschritte verrechnet (Tabelle 7). Ebenso sollte für beiden Protokolle berechnet werden, inwiefern sich der Probandendurchsatz auf die Gesamtkosten auswirkt.

	PBMC		Vollblut	
	1 Patient / Tag	8 Patienten / Tag	1 Patient / Tag	8 Patienten / Tag
Materialien				
Zellisolation	1,50 €	1,50 €	n/a	n/a
Zellkultur & Stimulation	5,80 €	4,30 €	8,60 €	8,30 €
Färbung	12,60 €	9,80 €	11,50 €	11,40 €
Verbrauchsmaterialien	4,80 €	2,40 €	5,30 €	2,70 €
Gesamt	24,70 €	18,00 €	25,40 €	22,40 €
Zeitaufwand				
Vorbereitung der Materialien	5 min	12 min	12 min	26 min
Zellisolation und Stimulation	90 min	195 min	n/a	n/a
Brefeldin A Behandlung	4 min	11 min	4 min	11 min
Vorbereitung für die Färbung	9 min	30 min	40 min	75 min
Färbung	85 min	190 min	80 min	150 min
Messung der Proben	42 min	126 min	36 min	78 min
Analyse	8 min	29 min	7 min	21 min
Dokumentation & Validation	10 min	80 min	10 min	80 min
Gesamt	04:13	11:13 / 1:24	03:09	7:21 / 0:55
0.40 € / Minute (E9/2)	101,20 €	33,60 €	75,60 €	22,00 €
Gesamte Kosten pro Patient	125,90 €	51,60 €	101,00 €	44,40 €
Ersparnis im Vergleich zu PBMC			24,90 €	7,20 €
Ersparnis (%)			19,8 %	14,0 %

Tabelle 7

Kostenaufstellung für die Bestimmung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen aus PBMCs und Vollblut. Verglichen werden Material- und Arbeitskosten unter Berücksichtigung der Bearbeitungsdauer wesentlicher Arbeitsschritte in Abhängigkeit von der Anzahl der pro Tag/ pro Durchgang zu bearbeitenden Patientenproben. Die Bearbeitungsdauer beinhaltet die Gesamtdauer des einzelnen Arbeitsschrittes für alle Proben und wird nach Addition aller Arbeitsschritte durch die Anzahl der verarbeiteten Proben geteilt. Keine Berücksichtigung finden in der Tabelle Geräte-, Miet- oder Gebäudekosten, sowie Reparatur oder Energiekosten, da die Protokolle bisher nur im Labor der Arbeitsgruppe Ullmann an der Universitätsklinik Würzburg unter Verwendung deren vorhandener Ressourcen angewandt wurden. Die Tabelle soll demnach in vereinfachter Form einen Überblick über den finanziellen Aufwand abhängig von der Art des verwendeten Protokolls (PBMC oder Vollblut) geben und erhebt keinesfalls Anspruch auf eine vollständige Darstellung der Gesamtkosten.

Es zeigt sich bei beiden Protokollvarianten eine starke Abhängigkeit der Arbeitszeit und -kosten vom Durchsatz der bearbeiteten Proben. Auch für die verwendeten Materialien ergibt sich unter Berücksichtigung eines erhöhten Probendurchsatzes für jede einzelne Probe eine erhebliche Verringerung der Kosten. Für das Vollblutprotokoll liegen die Materialkosten im Vergleich zum PBMC-basierten Protokoll, v. a. durch den erhöhten Verbrauch an Lysat und kostimulatorischen Faktoren, geringfügig höher. Bei vergleichbaren Materialkosten zeigt sich, dass die Arbeitskosten für das Vollblut-basierte Protokoll deutlich geringer sind. Diese Beobachtung zeigt sich unabhängig von der Anzahl der anfallenden Proben, v. a. aufgrund der kürzeren Bearbeitungszeit durch den

Wegfall der PBMC Isolation. Die Gesamtkosten des Vollblut-basierten Protokolls sind pro Probe, abhängig vom Probendurchsatz, um 18 bis 22 % niedriger.

3.3 Untersuchung des Einflusses von Immunsuppressiva auf die Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen

In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob T-Zell-inhibitorische Substanzen, welche zur GvHD-Prophylaxe und Therapie eingesetzt werden, die Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen beeinflussen. Gesunden Probanden wurde in 16 Durchgängen jeweils 54 ml Heparin-Blut abgenommen und die PBMCs sofort isoliert. In einer 6-Well-Platte wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml ausplattiert und mit therapeutischen Konzentrationen von Mycophenolatmofetil (2 $\mu\text{g/ml}$), Ciclosporin A (200 ng/ml) und/oder Prednisolon (200 ng/ml) für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das weitere Prozedere gestaltete sich gemäß des Standardprotokolls nach Isolation von PBMCs (s. 2.2.2.2). In Abwesenheit immunsuppressiver Substanzen zeigte sich ein mittlerer Anteil *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen von 0,096 % \pm 0,054 %.

Bei Koinkubation der PBMCs für 3 h mit therapeutischen Konzentrationen von Ciclosporin A und Prednisolon reduzierte sich die Frequenz der gemessenen spezifischen Zellen auf 0,013 % \pm 0,017 %, für die Kombination von Mycophenolatmofetil und Ciclosporin A auf 0,040 % \pm 0,030 % und für die Kombination von Mycophenolatmofetil, Ciclosporin A und Prednisolon auf 0,045% \pm 0,032 % (Abbildung 15 D/E/F). Die Behandlung der PBMCs mit den Einzelsubstanzen zeigte ebenso eine Reduktion der detektierten *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen. Die Mittelwerte lagen für Mycophenolatmofetil bei 0,054 % \pm 0,029 %, für Ciclosporin A bei 0,032 % \pm 0,045 % und für Prednisolon bei 0,079 % \pm 0,040 % (Abbildung 15 A/B/C).

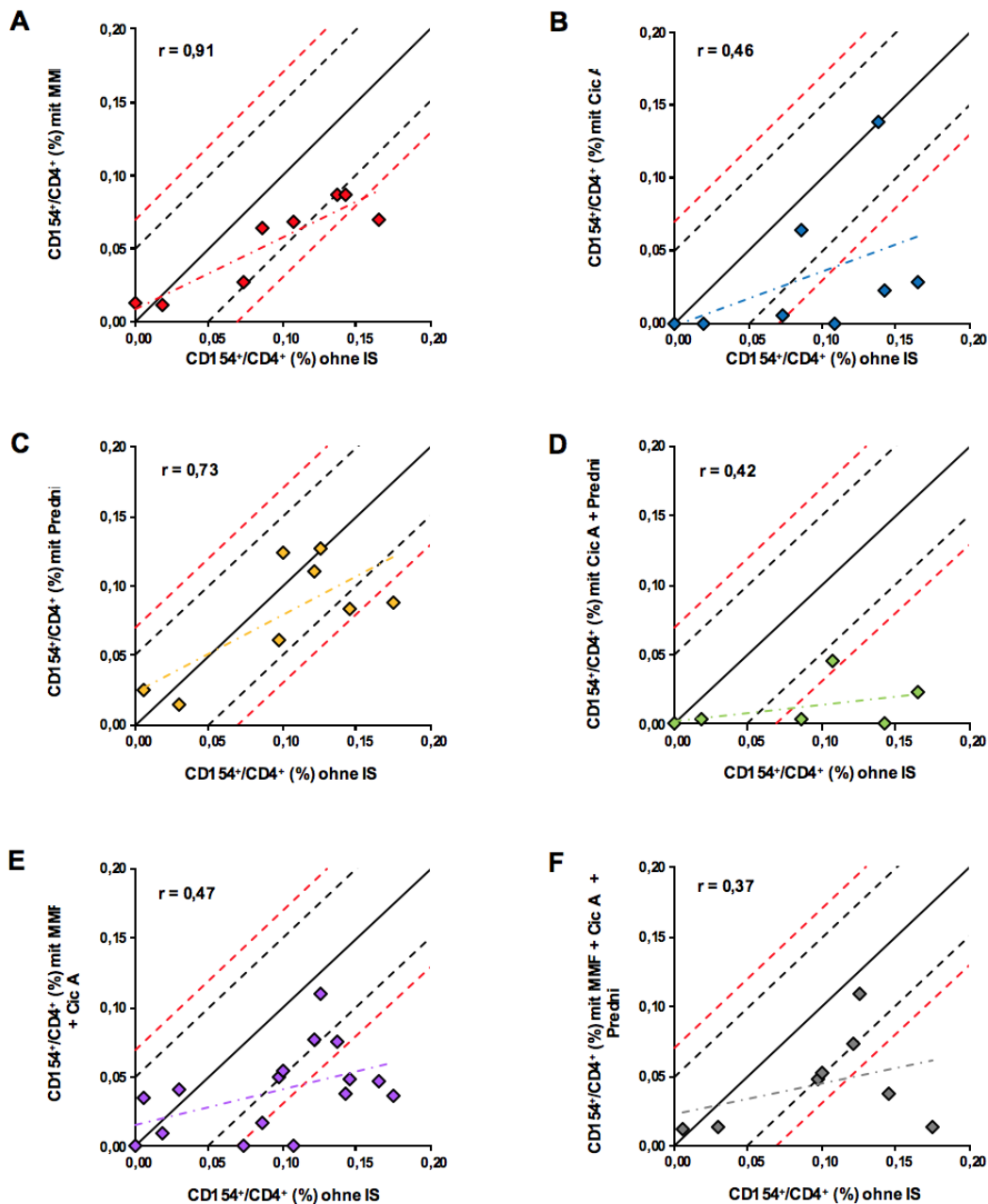


Abbildung 15

Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helfer-Zell-Frequenzen nach 3-stündiger Behandlung mit Immunsuppressiva (IS) (y-Wert) im Verhältnis zu der gemessenen T-Helfer-Zell-Frequenz in Abwesenheit der immunsuppressiven Substanzen (x-Wert). Angegeben ist der Pearson-Korrelationskoeffizient (r). Der innere und der äußere Korridor dokumentieren eine maximale Abweichung von 0,05 % und 0,07 % bezüglich der gemessenen T-Zell-Frequenzen der PBMC zu den mit Immunsuppressiva behandelten PBMC-Werten.

A) Behandlung mit Mycophenolatmofetil (MMF) (y-Wert) bei 8 gesunden Probanden.

B) Behandlung mit Ciclosporin A (Cic A) (y-Wert) bei 8 gesunden Probanden.

C) Behandlung mit Prednisolon (Predni) (y-Wert) bei 8 gesunden Probanden.

D) Behandlung mit einer Kombination der Immunsuppressiva Ciclosporin A (Cic A) und Prednisolon (Predni) (y-Wert) bei 6 gesunden Probanden.

E) Behandlung mit einer Kombination der Immunsuppressiva Mycophenolatmofetil (MMF) und Ciclosporin A (Cic A) (y-Wert) bei 16 gesunden Probanden.

F) Behandlung mit einer Kombination der Immunsuppressiva Mycophenolatmofetil (MMF), Ciclosporin A (Cic A) und Prednisolon (Predni) (y-Wert) bei 8 gesunden Probanden.

4 DISKUSSION

4.1 Die Bestimmung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen unter Verwendung eines PBMC- oder Vollblut-basierten Protokolls

Die Fortschritte in der modernen Medizin bieten vielfältige Möglichkeiten, wie die Transplantation solider Organe oder die Behandlung von Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen, wie hämatologischen Malignomen. Immer häufiger wird dabei der Einsatz von immunsuppressiven Therapien notwendig. Aufgrund der eingeschränkten Immunabwehr der Patienten stellen invasive Mykosen deshalb ein zunehmendes Problem dar. Eine frühzeitige Diagnostik dieser Erkrankungen und die Einleitung einer zielgerichteten Therapie ist von herausragender Bedeutung und entscheidend für den therapeutischen *Outcome* der Patienten (Chamilos, Lewis & Kontoyiannis, 2008; Cornely et al., 2011). Da es aber an verlässlichen, nicht invasiven Methoden mangelt, stellt die Diagnosestellung invasiver Mykosen weiterhin eine Herausforderung dar (s. 1.1.3).

T-Helfer-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pilzen und koordinieren die Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Romani, 2011). Über den Aktivierungsmarker CD154, der nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch ein entsprechendes Antigen exprimiert wird, ist es möglich aktivierte Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen zuverlässig nachzuweisen (Frentsch et al., 2005).

Bacher et al. (2015 b) beschrieben den Nachweis solcher Pilz-spezifischen T-Helfer-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Risikokonstellationen (z. B. nach Stammzelltransplantation) als supportiven Biomarker in der Primärdiagnostik von Mukormykosen und invasiven Aspergillosen. Das dabei von den Autoren verwendete Protokoll basiert auf der Isolation von PBMCs, die mit Pilzantigenen oder Lysat stimuliert werden. Die Quantifizierung der in diesen Proben enthaltenen Population an Pilz-spezifischen T_H-Zellen erfolgte anschließend durchflusszytometrisch.

Der publizierte Test zeichnet sich dabei als einfaches, schnelles, wenig invasives, sowie sensitives Verfahren aus. Ein Nachteil bei derartigen funktionellen Analysen ist die Tatsache, dass Messergebnisse durch verminderte Zellviabilität oder –Funktionalität beeinträchtigt werden können. Die Probenqualität und damit verbundene Sensitivität der *Assays* wird u. a. von den Antikoagulantien in den verwendeten Blutentnahmeröhrchen, den Stimulationsschemata und den präanalytischen Lagerungs- und

Transportbedingungen der Proben beeinflusst. Diese Faktoren wirken sich auf Funktion, Regenerationsfähigkeit und Viabilität der Zellen aus (Bull et al., 2007; Jeurink et al., 2008; Mallone et al., 2011; McKenna et al., 2009).

In der Literatur wird umfassend dokumentiert, dass insbesondere das Zeitfenster zwischen Blutentnahme und Aufbereitung der Proben zur PBMC-Isolation kritisch und limitierend für den Erhalt der Zellfunktionalität ist (Afonso et al., 2010; Bull et al., 2007; Jeurink et al., 2008; McKenna et al., 2009; Wurster et al., 2017 a). Ursächlich dafür ist die verminderte Immunantwort der T-Zellen im Sinne einer verminderten Zytokinexpression, sowie die Inhibition ihrer Proliferation durch Metabolite von Granulozyten, die aufgrund von verlängerten präanalytischen Lagerungsbedingungen aktiviert werden (Schmielau & Finn, 2001). Die Gefahr einer Kontamination von PBMC Proben durch Granulozyten und die von ihnen gebildeten Granulozytenaggregate steigt mit zunehmender Lagerungsdauer vor der Isolation (Afonso et al., 2010; Mallone et al., 2011; McKenna et al., 2009). Bedingt wird diese Kontamination u. a. durch eine veränderte Dichte der aktivierten Granulozyten, sodass sich nach der Dichtegradientenzentrifugation Granulozyten mit ähnlicher Dichte in derselben Zentrifugationsschicht wie PBMCs finden können (Schmielau & Finn, 2001).

Eine unmittelbare Isolation von PBMCs ist somit für die erfolgreiche Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen unerlässlich. Wurster et al. (2017 a) zeigten, dass bereits eine 2-stündige präanalytische Lagerung der Proben mit einer deutlich reduzierten Sensitivität des Assays zur Detektion spezifischer T-Helfer-Zellen einhergingen.

Da die Einhaltung dieses Zeitfensters in der klinischen Routinediagnostik kaum praktikabel ist, beschäftigte sich eine erste Versuchsreihe dieser Arbeit mit der Frage inwieweit eine Verlängerung der präanalytischen Lagerung der Blutproben ohne Einschränkung der Assay-Sensitivität möglich ist (s. 3.1). Getestet wurden unterschiedlich lange Lagerungszeiten vor der Weiterverarbeitung unter optimierten Lagerungsbedingungen der Blutproben. Die Blutproben wurden hierzu mit RPMI 1640 im Verhältnis 1:1 verdünnt und bei Agitation auf einem Taumler (15/min) gelagert. Die Ergebnisse in Abb. 6 (s. 3.1.) zeigen, dass unter den beschriebenen Bedingungen eine Verlängerung des präanalytischen Zeitfensters auf bis zu 4 h möglich ist, ohne dass dabei die Sensitivität des CD154-basierten T-Zell-Assays beeinträchtigt wird. Ein Transport der Proben zur weiteren Verarbeitung in einem geeigneten Labor kann unter diesen

Bedingungen ermöglicht werden. Eine wahrscheinliche Ursache dieses verlängerten präanalytischen Zeitfensters ist eine verminderte Aktivierung von Granulozyten durch die Verdünnung und Agitation der Blutproben, in deren Folge es zu einer geringeren Beeinträchtigung von T-Zellen kommt (Afonso et al., 2010; McKenna et al., 2009).

Trotzdem bleibt das auf der Isolation von PBMCs basierte Protokoll anfällig für Fehler in der präanalytischen Behandlung der Proben. Es ist zudem zeitaufwendig, arbeitsintensiv und erfordert bereits kurze Zeit nach der Blutentnahme die Weiterverarbeitung der Proben unter einer sterilen Werkbank (Wurster et al., 2017 a). Ziel war es deshalb den von Bacher et al. (2015 b) beschriebenen *Assay* in eine klinisch besser anwendbare Form zu überführen und ein Vollblut-basiertes Protokoll zur Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen zu entwickeln (s. 3.2). Grundlage hierfür bildeten Vollblut-basierte Tests zur Quantifizierung spezifischer T-Zellen, wie sie in der Literatur z. B. zur Detektion und Identifikation reaktiver T-Zellen nach Inkubation mit CMV-Antigen beschrieben werden (Meier et al., 2008; Suni, Picker & Maino, 1998). Ziel war es eine Anwendung am *Point-of-Care* zu ermöglichen und die präanalytische Behandlung der Proben, bei gleichzeitig guter Sensitivität des *Assays*, so unkompliziert wie möglich zu gestalten.

Im Gegensatz zum dem von Bacher et al. (2015 b) beschriebenen *Assay* verzichtet das verwendete Protokoll auf die Isolation von PBMCs. Weiterhin verwendet der Test Vollblut-eigene Puffersysteme, weshalb keine Notwendigkeit für eine CO₂-Begasung während der Inkubation besteht und er gewährleistet eine optimale T-Zell Stimulation durch die Benutzung eines marktüblichen Blutentnahmesystems mit passender Geometrie.

Essentiell für eine angemessene Aktivierung und konstante Detektion der spezifischen T-Zellen war im Vollblut-basierten System die Hinzunahme eines zweiten kostimulatorischen Antikörpers, α -CD49d (Gauduin, 2006; Kaur et al., 2002; Nomura, Walker & Maecker, 2000; Waldrop et al., 1998). Grund hierfür ist eine bei manchen Spendern offensichtlich unzureichende T-Zell Antwort im Rahmen einer alleinigen Stimulation der T-Zell Rezeptoren mit α -CD28 bei Vollblutproben (Duffy et al., 2014). Selbst bei Stimulation von Vollblutproben mit α -CD3 und α -CD28 beobachteten Duffy et al. (2014) bei 6 von 25 getesteten Probanden eine unzureichende Zytokinantwort. Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld hatten bestätigt, dass eine alleinige

Stimulation von Vollblutproben mit Pilz-Lysat und α -CD28 bei acht von zehn getesteten Spendern zu einer unzureichenden Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen führte. Unter Hinzunahme des kostimulatorischen Antikörpers α -CD49d zeigten sich hingegen suffiziente und konstante Detektionsraten *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen in Vollblutproben. Das Protein CD49d ist eine Integrinkette, die in Anwesenheit anderer Integrine Heterodimere bildet. Insbesondere hämatopoetische Zellen Erwachsener exprimieren CD49d. CD49d vermittelt die Bindung von Zellen an Extrazellulärmatrix, es ist beteiligt an der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, der Migration von Lymphozyten und dient als kostimulatorisches Molekül der rezeptorvermittelten T-Zell Antwort (Nguyen, Sylvain & Bunnell, 2008; Udagawa, Woodside & McIntyre, 1996). Vorversuche hatten gezeigt, dass das in 2.2.4 beschriebene Vollblut-basierte Protokoll unter Verwendung eines Stimulationsschemas (2 h ohne Brefeldin A und 4 h mit Brefeldin A), welches sich an den von Bacher et al. (2015 b) beschriebenen Zeiten orientiert hatte, dem PBMC-Protokoll gleichwertige Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen detektierte. Die Lagerung der Proben während der Inkubationszeiten fand hierbei bei 37 °C und ohne CO₂-Begasung statt (Wurster et al., 2015).

Auf der Basis dieses Protokolls (s. 2.2.4) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit präanalytische Handhabung und Stimulationsschemata für den Vollblut-basierten Assay optimiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Zwischenlagerung der mit Vollblut beimpften Testsysteme bei Raumtemperatur möglich ist (s. 3.2.1). Beimpfte Testsysteme, die für 2 h bei RT und dann für weitere 2 h bei 37 °C gelagert wurden, bevor die Zugabe von Brefeldin A erfolgte und die Proben für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert wurden, detektierten vergleichbare Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zell gegenüber einem Vollblutprotokoll, bei dem die Proben 2 h vor und 4 h nach Brefeldin A Zugabe bei 37 °C gelagert wurden. Auch zeigte sich keine signifikante Abweichung zum PBMC-Standardprotokoll. Beim klinischen Einsatz ist folglich eine verbesserte präanalytische Handhabung der Testsysteme möglich. Im Rahmen der Stimulationsperiode des Vollblut-basierten Protokolls ist vor Behandlung der Proben mit Brefeldin A kein Arbeiten unter sterilen Bedingungen nötig. Der Zeitraum vor der Zugabe von Brefeldin A kann so bei

vergleichbaren Detektionsraten der oben evaluierten Protokolle auf bis zu vier Stunden verlängert werden und zum Probenversand und -transport genutzt werden. Auch nach kurzzeitiger Lagerung der Vollblutproben bei RT ist eine anschließende zweistündige Transportzeit möglich, bei der durch den Einsatz eines Heizblockes oder eines temperierten Containers eine Temperatur von 37 °C gewährleistet wird, ohne dass es zu einer reduzierten Detektionsrate spezifischer T-Zellen kommt.

Aus praktischen Gründen wäre die Möglichkeit einer Stimulation der Vollblutproben ausschließlich bei Raumtemperatur wünschenswert. Aufgrund der Beobachtung, dass eine kurzzeitige Lagerung der beimpften Testsysteme bei Raumtemperatur vor der Zugabe von Brefeldin A möglich ist, sollte evaluiert werden, inwieweit die alleinige Lagerung der Proben bei Raumtemperatur vor und nach Zugabe von Brefeldin A möglich ist (s. 3.2.2). Die Ergebnisse (Abb. 9) zeigen allerdings, dass dieses Vorgehen zu einer deutlichen Reduktion der detektierten Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen führt.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen führten zu der Annahme, dass die Temperatur von 37 °C für eine erfolgreiche Stimulation der T-Zellen benötigt wird. Daher wurde ein systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden bei 37 °C durchgeführt. Es wurde untersucht, wie sich längere Inkubationszeiten vor bzw. nach der Brefeldin A-Zugabe auf die Sensitivität der PBMC- und Vollblut-basierten Protokolle auswirken (s. 3.2.3).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass Vollblutprotokolle mit einer vierstündigen Stimulationsperiode vor Zugabe von Brefeldin A (4 + 4 h und 4 + 18 h) im Vergleich mit dem PBMC Standardprotokoll (2 + 18 h) in einer konstant überlegenen Detektionsleistung resultierten. Alle Vollblut-basierten Stimulationsschemata zeigten zudem einen durchweg niedrigen Anteil reaktiver T-Zellen, in der nur mit den kostimulatorischen Molekülen α -CD28 und α -CD49d behandelten unspezifischen Hintergrundkontrolle. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Meier et al. (2008), die beschrieben, dass nach der Stimulation von Vollblut- und PBMC-Proben mit dem HAdV-3 Hexonprotein des humanen Adenovirus Serotyp 3, ebenfalls keine erhöhten Hintergrundfrequenzen aktivierter, Antigen-spezifischer T-Zellen in den

PBMC-Proben im Vergleich zu den Vollblutproben gemessen worden waren. Für Detektionsraten von Vollblut- und PBMC-basierten Assays finden sich in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen. Im Vergleich zu Hoffmeister et al. (2003), die eine verminderte Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen bei der Verwendung von Vollblutproben im Vergleich zur PBMC-Isolation beobachtet hatten, bestätigten Suni, Picker & Maino (1998) deutlich erhöhte Detektionsraten spezifischer T-Zellen in Vollblutproben. Ein Vergleich dieser unterschiedlichen Detektionsraten ist jedoch aufgrund von Unterschieden in verwendeten Antigenen, Kulturperioden oder der Zusammensetzung kostimulatorischer Antikörper nur eingeschränkt möglich.

Die durchflusszytometrische Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen erfolgt durch die intrazelluläre Färbung von CD154 (Meier et al., 2008). Brefeldin A, ein Inhibitor des Golgi-Apparats verhindert sowohl die Exozytose des Markers auf die Zelloberfläche, als auch seine intrazelluläre Degradation nach erfolgter Endozytose (Miller, Carnell & Moore, 1992). CD154 bleibt so für die intrazelluläre Färbung zugänglich. Gleichzeitig nimmt Brefeldin A Einfluss auf T-Zellen, indem es deren zytokinvermittelte auto- und parakrine Aktivierung inhibiert (Adorini et al., 1990). Folglich führt eine zu kurze Inkubation der Zellen mit dem Antigen vor Brefeldin A-Behandlung zu einer insuffizienten Aktivierung der T-Zellen, während bei zu langen Inkubationsperioden vor Brefeldin A-Zugabe ein nicht unerheblicher Anteil von CD154 auf die Oberfläche der Zellen gelangt und der Färbung nach Reinternalisierung und Degradierung nicht mehr zugänglich ist. In der Literatur finden sich unterschiedliche Beobachtung hinsichtlich optimierter Stimulationsperioden. Höchstwerte CD154-positiver, Antigen-spezifischer T-Zellen konnten nach einer mindestens sechs- und bis zu 24-stündigen Stimulationsperiode unter Verwendung des Golgi-Apparat-Inhibitors Monensin (Chattopadhyay, Yu & Roederer, 2005) bzw. nach einer sechs- und 16-stündigen Stimulationsperiode detektiert werden (Meier et al., 2008). Kaveh, Whelan & Hogarth (2012) hatten beobachtet, dass längere Inkubationszeiträume bei der Stimulation von T-Zellen mit komplexen Antigenen zu einer erhöhten Detektionsrate spezifischer T-Zellen führten. Auf zellbiologischer Ebene bestehe hierbei genug Zeit zur endosomalen Verarbeitung der komplexen Antigene, ihrem intrazellulären Transport und der folgenden Exprimierung von Aktivierungsmarkern. Es scheint also von Vorteil bei der Stimulation von T-Zellen mit komplexen Antigenen längere Inkubationszeiträume zu wählen.

Das verwendete *A. fumigatus* Lysat kann als ein solches, komplexes Antigen betrachtet werden. Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, dass der entwickelte *Assay* mit jedem Peptid-Antigen durchführbar ist, das in konstanter Qualität bezogen oder generiert werden kann und einen immunogenen Effekt aufweist, ohne dabei mit anderen verwendeten Reagenzien zu interagieren. Unter Berücksichtigung der Komplexität des verwendeten Antigens muss im Rahmen der Verwendung eine individuelle Anpassung der Stimulationsperiode erfolgen.

Für beide Vollblutprotokolle, 4 + 4 h und 4 + 18 h, konnte ein gegenüber dem PBMC Standardprotokoll reproduzierbarer Konversionsfaktor ermittelt werden (s. 3.2.4). Durch diesen Faktor wird es möglich PBMC- und Vollblut-*Assay* bei den selben Patienten alternierend durchzuführen und beide Ergebnisse dennoch vergleichen zu können. Von besonderer Relevanz könnte diese Option für Patienten sein, bei denen eine Leukopenie (< 500 Leukozyten/ μ l) besteht, was häufig unter myelotoxischen Chemotherapien und Stammzelltransplantation zur Behandlung hämatologischer Malignome vorkommt. Um eine statistisch belastbare Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen gewährleisten zu können, müssen in der Durchflusszytometrie mindestens 50.000 CD4⁺ Zellen detektiert werden. Beim PBMC-basierten *Assay* werden die T-Zellen während der Isolation konzentriert, sodass das PBMC-basierte Protokoll auch bei sehr geringen Lymphozytenzahlen (\approx 150 – 200 Lymphozyten / μ l) noch durchgeführt werden kann. Bei einer ausgeprägten Leukozytopenie sollte daher dem PBMC-basierten Protokoll der Vorzug gegeben werden. Im Verlauf ist aufgrund der besseren Detektionsleistung, bei steigenden Zellzahlen der Wechsel auf ein Vollblut-basiertes Protokoll denkbar. Es bietet zusätzlich den Vorteil geringer Blutentnahmemengen von nur 1 ml im Gegensatz zu 18 ml, die für den PBMC-basierten *Assay* benötigt werden. Dies ist von besonderer Relevanz bei hämato-onkologischen und pädiatrischen Patienten, da diese durch die regelmäßige Abnahme hoher Blutvolumina ohnehin belastet werden. Weiterhin sind die Vollblut-basierten Protokolle dem PBMC-Standardprotokoll in Sensitivität und logistischer Handhabbarkeit überlegen.

Die Vorbereitung der Blutentnahmeröhrchen für den Vollblut-basierten *Assay* mit den kostimulatorischen Faktoren und dem Lysat muss unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Von entscheidender Bedeutung für seine klinische Verwendbarkeit am *Point-of-Care* ist es daher, Blutentnahmeröhrchen im Vorfeld präparieren und lagern zu können (sog. *Ready-to-use-Kits*). Dass das Einfrieren solcher Kultursysteme bei -20 °C bis zu 4 Wochen möglich ist, konnte gezeigt werden (s. 3.2.5). Bei Verwendung von unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetauten Kultursystemen fand sich eine vergleichbare Detektionsleistung spezifischer T-Zellen gegenüber frisch vorbereiteten Stimulationsmischungen. Unter Verwendung der *Ready-to-use-Kits* ist ein bettseitiges Beimpfen der Blutentnahmeröhrchen analog zum Befüllen eines Blutkultursystems möglich, wodurch ein hohes Maß an Benutzerfreundlichkeit durch bekannte Abläufe erzielt werden kann.

Durch die Verwendung des Kurzzeitprotokolls (4 + 4 h) oder des in seiner Detektionsleistung leicht überlegenen Übernachtprotokolls (4 + 18 h) stehen zwei Varianten zur Verfügung, die eine Anpassung an den Probenversand und die Gegebenheiten des verarbeitenden Labors ermöglichen. Zusätzlich kann durch den Wegfall der PBMC Isolation der Arbeitsaufwand bei der Verarbeitung der Proben verringert werden. Bei einer vergleichenden Analyse von Material- und Arbeitskosten konnte so eine Reduktion der Gesamtkosten für die Verwendung des Vollblut-basierten Protokolls von bis zu 22 % pro Probe errechnet werden (s. 3.2.6). Trotz der bereits deutlich vereinfachten Handhabung im Vergleich zu PBMC-basierten Protokollen wäre eine Entwicklung von Protokollen, die auf die Zugabe von Brefeldin A verzichtet, wünschenswert.

4.2 Anwendungsgebiete von Protokollen zur Bestimmung spezifischer T-Helfer-Zellen

Den Nachweis *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen als supportiven Marker in der Primärdiagnostik invasiver Mykosen bei Patienten mit Hochrisikokonstellationen hatten Bacher et al. (2015 b) beschrieben. In der Studie dokumentierten sie eine hohe Spezifität und Sensitivität des von ihnen verwendeten *Assays*, auch im Vergleich zu etablierten diagnostischen Verfahren. Unter Bezugnahme auf diese Daten ergibt sich die Frage der Verwendbarkeit des Tests in der Primärdiagnostik nach hämatopoetischer

Stammzelltransplantation. Diese Frage ist kritisch zu betrachten. Zum einen war die Patientengruppe in der Studie unterrepräsentiert, zum anderen sind viele immunologische Einflussfaktoren wie Spenderimmunsystem, Immunrekonstruktion und Pharmakotherapie bisher wenig charakterisiert worden.

Besonders hervorzuheben ist hierbei die Relevanz T-Zell-inhibitorischer Medikamente, welche zur GvHD-Prophylaxe eingesetzt werden. Es finden sich in der Literatur bisher nur wenige Studien, die sich explizit mit der Aussagekraft durchflusszytometrischer T-Zell Assays unter dem Einfluss solcher Medikamente beschäftigen. Im Gegensatz dazu wird eine grundsätzliche Einschränkung der T-Zell-Funktion im Rahmen funktioneller T-Zell Assays in *in vitro* Experimenten unter Anwesenheit T-Zell-inhibitorischer Substanzen beschrieben. Insbesondere die Therapie mit Prednisolon und Ciclosporin A führt zu einer erhöhten Anzahl falsch negativer oder unklarer Testergebnisse bei Durchführung des *Interferon-Gamma Release Assays* (IGRA) zum Nachweis von Tuberkulose (Bélard et al., 2011; Helwig et al., 2012; Sester et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung des PBMC-basierten Protokolls eine nicht unwesentliche Anzahl signifikant verminderter Detektionsleistungen *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen dokumentiert werden, wenn die Proben mit therapeutischen Konzentrationen von Mycophenolatmofetil, Ciclosporin A und Prednisolon inkubiert worden waren (s. 3.3).

Der Calcineurininhibitor Ciclosporin A verhindert eine Expression von CD154 an der Oberfläche aktivierter T-Zellen (Fuleihan et al., 1994). Außerdem verhindert es den Calcineurin-abhängigen Eintritt des Proteins NF-AT in den Zellkern der T-Zellen, welches dort über die Aktivierung des CD154 Promotors dessen Transkription induziert (Schubert et al., 1995). Auch Glukokortikoide können die Expression von CD154 auf aktivierten T-Zellen beeinflussen. Sowohl eine verminderte, als auch eine gesteigerte Expression von CD154 wurde in der Literatur dokumentiert (Bischof & Melms, 1998; Jabara, Brodeur & Geha, 2001). Mycophenolatmofetil vermittelt eine verminderte Expression von CD154, indem es in die Acetylierung der Histone H3 und H4 des Promotors von CD154 herabreguliert (Yang et al., 2015).

Um unter Berücksichtigung T-Zell-inhibitorischer Medikamente eine fundierte Aussage zur Eignung des Nachweises Pilz-spezifischer T-Zellen in der Primärdiagnostik invasiver

Mykosen tätigen zu können, wären weiterführende Studien an entsprechenden Patientenkollektiven dringend indiziert.

Erheblich größer als für invasive Mykosen ist die Inzidenz der Schimmelpilz-assoziierten Hypersensitivitätssyndrome. Weltweit leiden etwa 200 Mio. Menschen an Asthma und ca. 4,8 Mio. Patienten sind von der Bronchopulmonalen Aspergillose betroffen (Denning, Pleuvry & Cole, 2013). Kriterien für die Diagnosestellung der ABPA wurden in der Literatur beschrieben und beinhalten immunologische Marker als wichtigen Bestandteil in Diagnostik und Verlaufskontrolle der Erkrankung. Zu ihnen gehören u. a. der Nachweis von Serum-IgE und der Nachweis von Antikörpern gegen *A. fumigatus* (Greenberger, 2002; Rosenberg et al., 1977). Die Möglichkeit weitere immunologische Marker in den Prozess der Diagnosefindung zu integrieren ist durchaus denkbar, auch vor dem Hintergrund der Notwendigkeit einer frühestmöglichen Therapieeinleitung (s. 1.1.2).

Wurster et al. (2017 b) konnten zeigen, dass Risikofaktoren für eine Schimmelpilzexposition (z. B. Topfpflanzen, intensiver Umgang mit organischen Abfällen etc.) im häuslichen oder beruflichen Umfeld mit erhöhten Frequenzen *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen bei gesunden Probanden assoziiert waren. Bei langfristiger Exposition konnte zudem eine erhöhte Anzahl an T-Memory-Zellen (Gedächtniszellen) nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen legen die Verwendung erhöhter Frequenzen von spezifischen T-Zellen als Expositionsmarker nahe. Von besonderer Relevanz könnte dieser Umstand bei umwelt- und arbeitsmedizinischen Fragestellungen sein. Eine Reihe von umwelt- und arbeitsmedizinischen Erkrankungen, wie z. B. das *Sick Building Syndrome*, äußern sich durch unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Ausschläge oder Müdigkeit. In den letzten 40 Jahren wurde eine steigende Anzahl an Patienten beobachtet, die an den genannten Symptomen leiden, welche in Zusammenhang mit unterschiedlichen Noxen in Wohn- und Bürogebäuden gebracht werden (Abdel-Hamid et al., 2013; Blasco, 2011; Redlich, Sparer & Cullen, 1997). Für die Entstehung des *Sick Building Syndrome* wurde u. a. die Belastung mit verschiedenen Schimmelpilzen als ursächlich beschrieben. Da jedoch viele Umweltfaktoren zu seiner Entwicklung beitragen, gestaltet sich die

Diagnosestellung der Erkrankung schwierig (Redlich, Sparer & Cullen, 1997; Sahlberg et al., 2013). Ein Ansatz ist die Beurteilung der Raumluftqualität mit Hilfe von Bioindikatoren wie Sporenkonzentrationen, Mykoflora oder Mykotoxinen (Cabral, 2010). Dabei ist es allerdings schwierig einen definitiven Zusammenhang zwischen subjektiven Symptome von Patienten mit der detektierten Schimmelpilzexposition herzustellen. Der Nachweis spezifischer T-Zellen, die eine Auseinandersetzung des Immunsystems der betroffenen Patienten mit Pilzerregern dokumentieren, könnte ein möglicher neuer Ansatz in der Diagnostik dieser Syndrome sein. Eine Notwendigkeit für die Entwicklung zuverlässiger Testprotokolle ergibt sich auch in Anbetracht der Tatsache, dass Prozesse und Versicherungsfragen, die sich mit der Problematik beschäftigen deutlich zugenommen haben (Portnoy, Barnes & Kennedy, 2004). Das Vollblutprotokoll könnte ein benutzerfreundliches, kostengünstiges und sensitives System im Rahmen solcher umwelt- und arbeitsmedizinischer Anwendungen darstellen.

In diesem Kontext und auch für andere Infektionen wäre eine Ausweitung des zu testenden Erregerspektrums wünschenswert. Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, dass der entwickelte *Assay* mit jedem Peptid-Antigen durchführbar ist, das in konstanter Qualität bezogen oder generiert werden kann und einen immunogenen Effekt aufweist, ohne dabei mit anderen verwendeten Reagenzien zu interagieren. Im Rahmen weiterführender Versuche in unserem Labor konnte beispielsweise der Vollblut-basierte, spezifische T-Zell-Nachweis unter Verwendung von Mucorales-Lysaten, die unter standardisierten Bedingungen für die Erreger *Rhizopus arrhizus*, *Rhizomucor pusillus* und *Cunning hamella bertholletiae* generiert wurden, etabliert werden.

Eine Bestimmung spezifischer T-Zellen und deren Monitoring wird häufig auch im Rahmen klinisch infektiologischer Studien (Vakzinierungsstudien oder klinische Prüfung immuntherapeutischer Verfahren) verwendet. Für die Isolation der PBMCs werden große Blutvolumina von bis zu 60 ml benötigt, die in spezialisierten Laboren analysiert werden. Das Vollblut-basierte Verfahren könnte hier unter Verwendung geringerer Blutentnahmemengen zu einer einfacheren Logistik und verbesserten Standardisierung der Studien beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine suffiziente und sensitive Bestimmung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen im Rahmen eines Vollblut-basierten Protokolls möglich ist. Eine Ausweitung des Assays für andere Infektionserreger wäre wünschenswert und scheint prinzipiell mit jedem standardisiert zur generierenden Lysat möglich. Die benutzerfreundliche Handhabung des beschriebenen Vollblut-Assays scheint dabei Studien an größeren Probandenkollektiven zu ermöglichen. Die Etablierung des Vollblut-basierten Protokolls konnte hierbei zu einer besseren Standardisierung solcher Studien beitragen. Auch multizentrische Studien wie sie bereits für die Standardisierung und Evaluation der *Aspergillus*-PCR angewandt wurden von der Standardisierung profitieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahrzehnten kam es durch den Einsatz massiv immunsupprimierender Therapien zu einer steigenden Inzidenz invasiver Mykosen. Die durch eine Infektion mit *A. fumigatus* ausgelöste invasive Aspergillose stellt eine lebensbedrohliche Erkrankung für Patienten mit hämatologischen Malignomen oder nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation dar. Für die Behandlung solcher Erkrankungen ist eine frühzeitige Diagnosestellung unabdingbar. Da invasive diagnostische Maßnahmen bei den betroffenen Patienten jedoch häufig kontraindiziert sind, werden neue Biomarker und nicht invasive Diagnoseverfahren intensiv beforscht.

Ein kürzlich beschriebener Ansatz zur Primär- und Verlaufsdiagnostik bei Patienten mit invasiven pulmonalen Aspergillosen und Mukormykosen ist die Verwendung des auf aktivierten T-Zellen exprimierten Aktivierungsmarkers CD154 zur durchflusszytometrischen Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helfer-Zellen.

Die Detektion dieser Zellen mit dem in der Literatur beschriebenen Protokoll erfordert die Isolation von PBMCs und duldet vor der Verarbeitung der Proben in einem spezialisierten Labor nur kurze präanalytische Lagerungszeiten. Dies stellt einen limitierenden Faktor für die klinische Verwendbarkeit des beschriebenen Assays dar.

Die vorliegende Dissertationsschrift beschäftigt sich damit, den beschriebenen Assay zur Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen, hinsichtlich seiner Präanalytik und klinischen Anwendbarkeit eingehender zu evaluieren und zu optimieren.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass mittels Verdünnung und Agitation der zur PBMC Isolation verwendeten Blutproben eine Verlängerung des präanalytischen Zeitfensters zwischen Blutentnahme und Aufbereitung auf bis zu 4 h möglich ist, ohne dass dabei die Sensitivität des CD154-basierten T-Zell-Assays beeinträchtigt wird.

Weiterhin konnte die Verwendung eines Vollblut-basierten Protokolls, das auf die zeitaufwendige Isolation von PBMCs verzichtet, etabliert werden. Hinsichtlich seiner Detektionsleistung zeigte sich das Vollblutprotokoll dem PBMC Protokoll grundsätzlich überlegen. Für verschiedene Stimulationsperioden konnte ein gegenüber dem PBMC

Standardprotokoll reproduzierbarer Konversionsfaktor ermittelt werden, welcher einen Vergleich von Ergebnissen bei alternierender Durchführung von PBMC- und Vollblut-*Assay* bei den selben Patienten möglich macht. Das Protokoll erlaubt die Kombination von Stimulations- und Transportzeit unter Verwendung eines auf 37 °C temperierten Transportgefäßes. Eine alleinige Stimulation bei Raumtemperatur zeigte sich hingegen nicht erfolgreich. Die Anwendung des *Assays* am *Point-of-Care* wird durch die Verwendung vorbereiteter, marktüblicher Blutentnahmeröhrchen möglich, welche bis zum Zeitpunkt der Verwendung eingefroren gelagert werden können. Eine Analyse der Material- und Arbeitskosten ergab eine Reduktion der Gesamtkosten für die Verwendung des Vollblut-basierten Protokolls von bis zu 22 % pro Probe. Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, dass der entwickelte *Assay* mit jedem Peptid-Antigen durchführbar ist, das in konstanter Qualität bezogen oder generiert werden kann und einen immunogenen Effekt aufweist, ohne dabei mit anderen verwendeten Reagenzien zu interagieren.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, wie sich T-Zell-inhibitorische Substanzen auf die Testergebnisse auswirken. Hierbei fand sich eine nicht unwesentliche Anzahl falsch-negativer Testergebnisse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift zeigen, dass eine suffiziente und sensitive Bestimmung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen im Rahmen eines Vollblut-basierten Protokolls möglich ist. Eine Ausweitung des *Assays* für andere Infektionserreger, sowie die Entwicklung Brefeldin A-freier Protokolle wären wünschenswert. Ein mögliches Einsatzgebiet stellen klinisch infektiologische Studien oder umwelt- und arbeitsmedizinische Fragestellungen dar.

6 LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

6.1 Literaturverzeichnis

Abdel-Hamid MA, A Hakim S, Elokda EE, Mostafa NS (2013). Prevalence and risk factors of sick building syndrome among office workers. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 88 (2): 109–114.

Adorini L, Ullrich SJ, Appella E, Fuchs S (1990). Inhibition by brefeldin A of presentation of exogenous protein antigens to MHC class II-restricted T cells. *Nature*, 346 (6279): 63–66.

Afonso G, Scotto M, Renand A, Arvastsson J, Vassilieff D, Cilio CM, Mallone R (2010). Critical parameters in blood processing for T-cell assays: validation on ELISpot and tetramer platforms. *Journal of Immunological Methods*, 359 (1-2): 28–36.

Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R (1995). Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 63 (9): 3266–3271.

Ansorg R, van den Boom R & Rath PM (1997). Detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*, 40 (9-10): 353–357.

Bacher P & Scheffold A (2013). Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry Part A*, 83A (8): 692–701.

Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, Scheffold A (2013). Antigen-Reactive T Cell Enrichment for Direct, High-Resolution Analysis of the Human Naive and Memory Th Cell Repertoire. *The Journal of Immunology*, 190 (8): 3967–3976.

Bacher P, Kniemeyer O, Teutschbein J, Thon M, Vodisch M, Wartenberg D, et al. (2014). Identification of Immunogenic Antigens from *Aspergillus fumigatus* by Direct Multiparameter Characterization of Specific Conventional and Regulatory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 193 (7): 3332–3343.

Bacher P, Jochheim-Richter A, Mockel-Tenbrink N, Kniemeyer O, Wingenfeld E, Alex R, et al. (2015 a). Clinical-scale isolation of the total *Aspergillus fumigatus*-reactive T-helper cell repertoire for adoptive transfer. *Cytotherapy*, 17 (10): 1396–1405.

Bacher P, Steinbach A, Kniemeyer O, Hamprecht A, Assenmacher M, Vehreschild MJ GT, et al. (2015 b). Fungus-Specific CD4⁺ T Cells for Rapid Identification of Invasive Pulmonary Mold Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191 (3): 348–352.

Barnes PD & Marr KA (2007). Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*, 139 (4): 519–531.

Bélarard E, Semb S, Ruhwald M, Werlinrud AM, Soborg B, Jensen FK, et al. (2011). Prednisolone treatment affects the performance of the QuantiFERON gold in-tube test and the tuberculin skin test in patients with autoimmune disorders screened for latent tuberculosis infection. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17 (11): 2340–2349.

Bischof F & Melms A (1998). Glucocorticoids Inhibit CD40 Ligand Expression of Peripheral CD4⁺Lymphocytes. *Cellular Immunology*, 187 (1): 38–44.

Blasco L (2011). Sick building syndrome and autoimmunity. *Lupus*, 20 (5): 544–546.

Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, Sulahian A, Gluckman E, Derouin F, Ribaud P (2002). Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34 (7): 939–943.

Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, Einsele H, Loeffler J (2011). Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- γ release. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187 (3): 1369–1376.

Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latgé JP, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schild H, Hebart H (2004). *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *British Journal of Haematology*, 125 (3): 392–399.

Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Bräuninger S, Hehlmann R (2002). Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *British Journal of Haematology*, 116 (4): 803–811.

Bull M, Lee D, Stucky J, Chiu YL, Rubin A, Horton H, McElrath MJ (2007). Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *Journal of Immunological Methods*, 322 (1-2): 57–69.

Cabral JPS (2010). Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Science of The Total Environment*, 408 (20): 4285–4295.

Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF (2001). Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7 Suppl 2: 54–61.

Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP (2015). Pulmonary aspergillosis. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 96 (5): 435–442.

Chamilos G, Lewis RE & Kontoyiannis DP (2008). Delaying Amphotericin B–Based Frontline Therapy Significantly Increases Mortality among Patients with Hematologic Malignancy Who Have Zygomycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 47 (4): 503–509.

Chattopadhyay PK, Yu J & Roederer M (2005). A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nature Medicine*, 11 (10): 1113–1117.

Chu HW, Wang JM, Boutet M, Boulet LP, Laviolette M (1996). Immunohistochemical detection of GM-CSF, IL-4 and IL-5 in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clinical & Experimental Allergy*, 26 (4): 461–468.

Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Dellow E, Herbrecht R, Donnelly JP (2011). Efficacy outcomes in a randomised trial of liposomal amphotericin B based on revised EORTC/MSG 2008 definitions of invasive mould disease. *Mycoses*, 54 (5): e449–e455.

Cornely O A, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll A H, Lagrou K, Chakrabarti A, et al., European Confederation of Medical Mycology (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 3, 5–26.

Darby J, Black J & Buising K (2014). Interferon-gamma release assays and the diagnosis of tuberculosis: have they found their place? *Internal Medicine Journal*, 44 (7): 624–632.

Denning DW (1998). Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 26 (4): 781–803.

Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, et al. (2002). Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (5): 563–571.

Denning DW, Pleuvry A & Cole DC (2013). Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Medical Mycology*, 51 (4): 361–370.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Bennett JE, et al. (2008). Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 46 (12): 1813–1821.

Donnelly JP (2006). Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer but Still a Ways to Go. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (4): 487–489.

Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. (2014). Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli. *Immunity*, 40 (3): 436–450.

Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, et al. (2005). Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature Medicine*, 11 (10): 1118–1124.

Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Martin PJ, Storb RF, Marr KA (2003). Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 102 (3): 827–833.

Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, et al. (1994). Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 93 (3): 1315–1320.

Gauduin M (2006). Intracellular cytokine staining for the characterization and quantitation of antigen-specific T lymphocyte responses. *Methods*, 38 (4): 263–273.

Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA (1984). Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 100 (3): 345–351.

Greenberger PA (2002). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110 (5): 685–692.

Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *The Journal of Infection*, 33 (1): 23–32.

Habicht JM, Gratwohl A, Tamm M, Drewe J, Proske M, Stulz P (1997). Diagnostic and therapeutic thoracic surgery in leukemia and severe aplastic anemia. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 113 (6): 982–988.

Hackett CJ & Sharma OK (2002). Frontiers in peptide–MHC class II multimer technology. *Nature Immunology*, 3 (10): 887–889.

Helwig U, Müller M, Hedderich J, Schreiber S (2012). Corticosteroids and immunosuppressive therapy influence the result of QuantiFERON TB Gold testing in inflammatory bowel disease patients. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6 (4): 419–424.

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. (2002). Voriconazole versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. *New England Journal of Medicine*, 347 (6): 408–415.

Hoffmeister B, Bunde T, Rudawsky IM, Volk HD, Kern F (2003). Detection of antigen-specific T cells by cytokine flow cytometry: the use of whole blood may underestimate frequencies. *European Journal of Immunology*, 33 (12): 3484–3492.

Horvath JA & Dummer S (1996). The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *The American Journal of Medicine*, 100 (2): 171–178.

Jabara HH, Brodeur SR & Geha RS (2001). Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. *Journal of Clinical Investigation*, 107 (3): 371–378.

Janeway CA (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13 (1): 11–16.

Janeway CA & Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197–216.

Jeurink PV, Vissers YM, Rappard B, Savelkoul HFJ (2008). T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. *Cryobiology*, 57 (2): 91–103.

Johnson LB & Kauffman CA (2003). Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (5): 630–637.

Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. (2001). Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (9): 1504–1512.

Kartsonis NA, Saah AJ, Joy Lipka C, Taylor AF, Sable CA (2005). Salvage therapy with caspofungin for invasive aspergillosis: results from the caspofungin compassionate use study. *The Journal of Infection*, 50 (3): 196–205.

Kaur A, Hale CL, Noren B, Kassis N, Simon MA, Johnson RP (2002). Decreased frequency of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4⁺ T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques: inverse relationship with CMV viremia. *Journal of Virology*, 76 (8): 3646–3658.

Kaveh DA, Whelan AO & Hogarth PJ (2012). The duration of antigen-stimulation significantly alters the diversity of multifunctional CD4 T cells measured by intracellular cytokine staining. *PloS One*, 7 (6): e38926.

Kimbrell DA & Beutler B (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews. Genetics*, 2 (4): 256–267.

Kirchhoff D, Frensch M, Leclerk P, Bumann D, Rausch S, Hartmann S, et al. (2007). Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *European Journal of Immunology*, 37 (9): 2370–2377.

Kousha M, Tadi R & Soubani AO (2011). Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*, 20 (121): 156-174.

Latgé JP (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12 (2): 310–350.

Latgé JP (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiology*, 9 (8): 382-389.

Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respiratory Medicine*, 86 (3): 243–248.

Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H (2000 a). Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2): 586–590.

Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H (2000 b). Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10): 3830–3833.

Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H (2002). Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6): 2240–2243.

Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KB (1997). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 65 (8): 3171–3179.

Maertens J, Raad I, Petrikkos G, Boogaerts M, Selleslag D, Petersen FB, et al. (2004). Efficacy and Safety of Caspofungin for Treatment of Invasive Aspergillosis in Patients Refractory to or Intolerant of Conventional Antifungal Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (11): 1563–1571.

Maertens J, Raad I, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. (2016). Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*, 387 (10020): 760–769.

Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al., T-Cell Workshop Committee, Immunology of Diabetes Society (2011). Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and Experimental Immunology*, 163 (1): 33–49.

Mansour MK & Levitz SM (2002). Interactions of fungi with phagocytes. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (4): 359–365.

Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L (2002). Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*, 100 (13): 4358–4366.

Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L (2004). Combination Antifungal Therapy for Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (6): 797–802.

McCormick A, Loeffler J & Ebel F (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology*, 12 (11): 1535–1543.

McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 12 (12-13): 928–936.

McKenna KC, Beatty KM, Vicetti Miguel R, Bilonick RA (2009). Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T cell function. *Journal of Immunological Methods*, 341 (1-2): 68–75.

McWhinney PHM, Kibbler CC, Hamon MD, Smith OP, Gandhi L, Berger LA, Walesby RK, Hoffbrand AV, Prentice HG (1993). Progress in the Diagnosis and Management of Aspergillosis in Bone Marrow Transplantation: 13 Years' Experience. *Clinical Infectious Diseases*, 17 (3): 397–404.

Meier S, Stark R, Frensch M, Thiel A (2008). The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73 (11): 1035–1042.

Miller SG, Carnell L & Moore HH (1992). Post-Golgi membrane traffic: brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling. *The Journal of Cell Biology*, 118 (2): 267–283.

Murphy K & Weaver C (2017). Janeway's Immunobiology, 9th Edition. Garland Science.

Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg H G, et al. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352 (6284): 1098-1098.

Nguyen K, Sylvain NR & Bunnell SC (2008). T Cell Costimulation via the Integrin VLA-4 Inhibits the Actin-Dependent Centralization of Signaling Microclusters Containing the Adaptor SLP-76. *Immunity*, 28 (6): 810–821.

Nomura LE, Walker JM & Maecker HT (2000). Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry*, 40 (1): 60–68.

Ostrosky-Zeichner L (2012). Invasive mycoses: diagnostic challenges. *The American Journal of Medicine*, 125 (1 Suppl): S14-24.

Pai M, Riley LW & Colford JM (2004). Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 4 (12): 761–776.

Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, Houcine O, Taramelli D, Lombardi L, Latgé JP (1997). Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity*, 65 (4): 1510–1514.

Park SJ & Mehrad B (2009). Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (4): 535–551.

Parkin J & Cohen B (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357 (9270): 1777-1789.

Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O (2008). Voriconazole Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Invasive Mycoses Improves Efficacy and Safety Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (2): 201–211.

Patterson K & Strek ME (2010). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc*, 7 (3): 237–244.

Pfeiffer CD, Fine JP & Safdar N (2006). Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (10): 1417–1727.

Pham AS, Tarrand JJ, May GS, Lee MS, Kontoyiannis DP, Han XY (2003). Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *American Journal of Clinical Pathology*, 119 (1): 38–44.

Phetsouphanh C, Zaunders JJ & Kelleher AD (2015). Detecting Antigen-Specific T Cell Responses: From Bulk Populations to Single Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (8): 18878–18893.

Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidal MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and Immunity*, 71 (6): 3034–3042.

Portnoy JM, Barnes CS & Kennedy K (2004). Sampling for indoor fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (2): 189–198.

Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D (2002). Pharmacokinetics and Safety of Voriconazole following Intravenous- to Oral-Dose Escalation Regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (8): 2546–2553.

Radin RC, Greenberger PA, Patterson R, Ghory A (1983). Mould counts and exacerbations of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Allergy*, 13 (3): 271-275.

Redlich CA, Sparer J & Cullen MR (1997). Sick-building syndrome. *The Lancet*, 349 (9057): 1013–1016.

Reichenberger F, Habicht JM, Gratwohl A, Tamm M (2002). Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *The European Respiratory Journal*, 19 (4): 743–55.

Rivera A, Hohl T & Pamer EG (2006). Immune responses to *Aspergillus fumigatus* infections. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 12 (1 Suppl 1): 47–49.

Robertson MJ (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 71 (2): 173–183.

Robinson BW, Venaille TJ, Mendis AH, McAleer R (1990). Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86 (5): 726–731.

Romani L (2004). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunology*, 4 (1): 1–23.

Romani L (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunology*, 11 (4): 275–288.

Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE (1977). Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Annals of Internal Medicine*, 86 (4): 405–414.

Sahlberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Soon A, Jogi R, Gislason T, Wieslander G, et al. (2013). Airborne molds and bacteria, microbial volatile organic compounds (MVOC), plasticizers and formaldehyde in dwellings in three North European cities in relation to sick building syndrome (SBS). *Science of The Total Environment*, 444: 433–440.

Schaffner A, Douglas H & Braude A (1982). 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. *The Journal of Clinical Investigation*, 69 (3): 617–631.

Schmielau J & Finn OJ (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Research*, 61 (12): 4756–4760.

Schubert LA, King G, Cron RQ, Lewis DB, Aruffo A, Hollenbaugh D (1995). The human gp39 promoter. Two distinct nuclear factors of activated T cell protein-binding elements contribute independently to transcriptional activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (50): 29624–29627.

Sester U, Wilkens H, van Bentum K, Singh M, Sybrecht GW, Schafers HJ, Sester M (2009). Impaired detection of *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs. *European Respiratory Journal*, 34 (3): 702–710.

Soubani AO, Khanchandani G & Ahmed HP (2004). Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23 (6): 491–494.

Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, et al. (2013). Multicenter Comparison of Serum and Whole-Blood Specimens for Detection of *Aspergillus* DNA in High-Risk Hematological Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (5): 1445–1450.

Springer J, Lackner M, Nachbaur D, Girschikofsky M, Risslegger B, Mutschlechner W, et al. (2016). Prospective multicentre PCR-based *Aspergillus* DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (1): 80–86.

Stuehler C, Nowakowska J, Bernardini C, Topp MS, Battegay M, Passweg J, Khanna N (2015). Multispecific *Aspergillus* T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 211 (8): 1251–1261.

Suni MA, Picker LJ & Maino VC (1998). Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 212 (1): 89–98.

Tillie-Leblond I & Tonnel AB (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*, 60 (8): 1004–1013.

Tosi MF (2005). Innate immune responses to infection. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116 (2): 241–249.

Udagawa T, Woodside DG & McIntyre BW (1996). Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157 (5): 1965–1972.

van Kooten C & Banchereau J (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*, 67 (1): 2–17.

Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden, RA (1997). Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 175 (6): 1459–1466.

Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ (1998). Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(10): 5284–5295.

Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D, et al. (1999). Liposomal Amphotericin B for Empirical Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia. *New England Journal of Medicine*, 340 (10): 764–771.

Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, Graybill R, et al. (2007). Treatment of Invasive Aspergillosis with Posaconazole in Patients Who Are Refractory to or Intolerant of Conventional Therapy: An Externally Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 44 (1): 2–12.

Wark PA & Gibson PG (2001). Allergic bronchopulmonary aspergillosis: new concepts of pathogenesis and treatment. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 6 (1): 1–7.

Warris A (2014). The biology of pulmonary aspergillus infections. *Journal of Infection*, 69 (Supplement 1): 36–41.

White PL, Archer AE & Barnes RA (2005). Comparison of Non-Culture-Based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections, with an Emphasis on Invasive Candida Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (5): 2181–2187.

White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA (2006). The Evolution and Evaluation of a Whole Blood Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Invasive Aspergillosis in Hematology Patients in a Routine Clinical Setting. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (4): 479–486.

White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, et al., European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI). (2011). Evaluation of Aspergillus PCR Protocols for Testing Serum Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (11): 3842–3848.

Wurster S, Weis P, Helm J, Lazariotou M, Page L, Einsele H, Ullmann AJ (2015). „*Aspergillus*-spezifische T-Zellen – ein neuer Biomarker bei der invasiven Aspergillose.“ Kooperationsforum Drug Development, Würzburg, Deutschland.

Wurster S, Weis P, Page L, Lazariotou M, Einsele H, Ullmann AJ (2017 a). Quantification of *A. fumigatus* -specific CD154⁺ T-cells—preanalytic considerations. *Medical Mycology*, 55 (2): 223–227.

Wurster S, Weis P, Page L, Helm J, Lazariotou M, Einsele H, Ullmann AJ (2017 b). Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses*, 60 (10): 668–675.

Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M (1998). Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (12): 3619–3623.

Yang Y, Tang Q, Zhao M, Liang G, Wu H, Li D, et al. (2015). The effect of mycophenolic acid on epigenetic modifications in lupus CD4⁺T cells. *Clinical Immunology*, 158 (1): 67–76.

Yeghen T, Kibbler CC, Prentice HG, Berger LA, Wallesby RK, McWhinney PHM, Lampe FC, Gillespie S (2000). Management of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hematology Patients: A Review of 87 Consecutive Cases at a Single Institution. *Clinical Infectious Diseases*, 31 (4): 859–868.

Yu VL, Muder RR & Poorsattar A (1986). Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Results from a three-year prospective study. *The American Journal of Medicine*, 81 (2): 249–254.

Zmeili OS & Soubani AO (2007). Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*, 100 (6): 317–334.

Internetseiten

Jatros (2010): Diagnostik invasiver Pilzinfektionen: Probleme und Perspektiven

<http://ch.universimed.com/fachthemen/2917>

Zugegriffen: 18.09.2017

6.2 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle	Beschreibung	Seite
Tab. 1	IPA Diagnosekriterien der EORTC und MSG	10
Tab. 2	Stimulationsschemata Vollblutprotokolle bei kurzzeitiger Lagerung der Proben bei Raumtemperatur	41
Tab. 3	Stimulationsschemata Vollblutprotokolle bei ausschließlicher Lagerung der Proben bei Raumtemperatur	43
Tab. 4	Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden bei Anwendung des Vollblut-basierten Protokolls	45
Tab. 5	Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden bei Anwendung des PBMC-basierten Protokolls	45
Tab. 6	Systematischer Vergleich unterschiedlicher Stimulationsperioden für PBMC- und Vollblut-basierte Protokolle	47
Tab. 7	Vergleichende Kostenaufstellung für die Bestimmung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zellen aus PBMCs und Vollblut	54

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1	Mikroskopische Aufnahme von <i>A. fumigatus</i>	5
Abb. 2	Spektrum <i>Aspergillus fumigatus</i> -assoziierter Krankheitsbilder	6
Abb. 3	Überblick über angeborene und adaptive Immunmechanismen bei der Abwehr von Pilzen	21
Abb. 4	Quantifizierung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zellen aus einem durchflusszytometrischen Datensatz	36
Abb. 5	Analyse <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen nach sofortiger Aufreinigung von PBMCs aus EDTA- und Heparin-Blutproben	39

Abb. 6	Analyse <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen nach sofortiger Aufreinigung von PBMCs und nach Lagerung, aus Heparin-Blutproben	40
Abb. 7	Vergleichende Analyse <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen vor Zugabe von Brefeldin A unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und des Vollblut-basierten Protokolls	42
Abb. 8	Vergleichende Bestimmung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen unter Verwendung der Vollblut-basierten Protokolle 2 RT + 2 + 4 und 2 + 4	42
Abb. 9	Vergleichende Bestimmung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Frequenzen unter Verwendung des PBMC-basierten Protokolls und des Vollblut-basierten Protokolls mit Stimulation bei RT vor und nach Zugabe von Brefeldin A	44
Abb. 10	Vergleichende Analyse <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen unter Verwendung des PBMC-Standardprotokolls und des Vollblut-basierten Protokolls mit unterschiedlichen Stimulationsperioden vor und nach Zugabe von Brefeldin A	46
Abb. 11	Lineare Regression durch den Ursprung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Frequenzen der Vollblut-basierten Protokollvarianten 4 + 4 h und 4 + 18 h im Vergleich zum PBMC-Standardprotokoll sowie Vergleich der konvertierten Vollblutergebnisse mit den entsprechenden PBMC-basierten Ergebnissen	48
Abb. 12	Vergleich <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen unter Verwendung unterschiedlicher Stimulationsschemata vor und nach Zugabe von Brefeldin A. Lineare Regression durch den Ursprung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Zellen in den Vollblut-basierten Protokollen 4 + 4 h und 4 + 18 h im Vergleich zu den PBMC-basierten Übernacht-Protokollen	49
Abb. 13	Lineare Regression durch den Ursprung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Zellen im PBMC Standardprotokoll im Vergleich zu dem Vollblut-basierten Protokollen 4 + 4 h der 2. Serie sowie Vergleich der konvertierten Vollblut-Ergebnisse aus der 1. und 2. Versuchsserie mit den entsprechenden PBMC-basierten Werten	51
Abb. 14	Vergleichende Bestimmung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Frequenzen des Vollblut-basierten Protokolls 4 + 4 h unter Verwendung von mit Lysat frisch vorbereiteten und eingefrorenen Blutentnahmeröhrchen	53
Abb. 15	Vergleichende Analyse <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Helfer-Zell-Frequenzen nach 3-stündiger Behandlung mit Immunsuppressiva und in Abwesenheit der immunsuppressiven Substanzen	56

7 ANHANG

7.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Abb.	Abbildung
ABPA	<i>Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis</i> , Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
Afu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gravitationskraft
G	Gauge
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
h	Stunde
HBSS	<i>HANKS' Balanced Salt Solution</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPA	Invasive pulmonale Aspergillose
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

MMF	Mycophenolatmofetil
NK	Natürliche Killerzellen
ns	Nicht signifikant
p-Value	<i>Probability Value</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRR	Pattern recognition receptor
r	Korrelationskoeffizient
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
VB	Vollblut

7.2 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Wurster S, Weis P, Page L, Helm J, Lazariotou M, Einsele H, Ullmann AJ (2017 b). Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses*, 60 (10): 668–675.

Konferenzbeiträge

Wurster S, Weis P, Helm J, Lazariotou M, Page L, Einsele H, Ullmann AJ (2015). „*Aspergillus*-spezifische T-Zellen – ein neuer Biomarker bei der invasiven Aspergillose.“ Kooperationsforum Drug Development, Würzburg, Deutschland.

Wurster S, Weis P, Lazariotou M, Helm J, Hellmann AM, Page L, Einsele H, Ullmann AJ (2016). "Exposure to *Aspergillus* spores in a scientific laboratory is associated with elevated specific T-cell frequencies in laboratory personnel." Advances against Aspergillosis, Manchester, Großbritannien

Wurster S, Helm J, Weis P, Lazariotou M, Page L, Einsele H, Ullmann AJ (2016). "Ciclosporin A, MMF, and prednisolone lead to reduced sensitivity of the quantification of *Aspergillus*-specific T-cells." 26th ECCMID, Amsterdam, Niederlande

Wurster S, Weis P, Helm J, Lazariotou M, Page L, Ullmann AJ (2016). "*Aspergillus fumigatus*-spezifische T-Zellen in der Diagnostik invasiver Aspergillosen – Möglichkeiten und Grenzen in der klinischen Praxis." PEG Frühjahrstagung, Bonn, Deutschland

Wurster S, Helm J, Weis P, Lazariotou M, Einsele H, Löffler J, Ullmann AJ (2016). "Systematische Evaluation verschiedener Stimulationsperioden bei der Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen aus PBMCs und Vollblut." KIT, Würzburg, Deutschland

Wurster S, Helm J, Weis P, Lazariotou M, Page L, Einsele H, Löffler J, Ullmann AJ (2016). "Etablierung eines hochsensitiven Vollblut-basierten Protokolls für die Quantifizierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen." KIT, Würzburg, Deutschland

Wurster S, Weis P, Helm J, Page L, Lazariotou M, Einsele H, Löffler J, Ullmann AJ (2016). "Agitation und Verdünnung von Blutproben mit RPMI-Medium verlängern das präanalytische Fenster bei der Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen über den Marker CD154." KIT, Würzburg, Deutschland

Wurster S, Page L, Weis P, Helm J, Lazariotou M, Einsele H, Ullmann AJ (2017). "Evaluation of a whole blood based approach for mould reactive T-cell quantification and its susceptibility to pre-analytic delays." TIMM, Belgrad, Serbien

7.3 Danksagung

Von Herzen möchte ich an dieser Stelle all denen Danke sagen, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich auf verschiedene Art und Weise unterstützt haben.

Zuerst danke ich Prof. Dr. Andrew J. Ullmann und Prof. Dr. Jürgen Löffler für die Überlassung meines Promotionsthemas und für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Ein riesiges Dankschön gilt meinem Betreuer Dr. Sebastian Wurster für die sehr gute, kompetente und geduldige Betreuung im Labor, die wertvollen Denkanstöße, seine ständige Erreichbarkeit und alle investierte Zeit. Ich hätte keinen besseren Betreuer finden können. Danke.

Herzlichen Dank auch an den Rest meiner Arbeitsgruppe. Die Arbeit im Labor hat mir nicht zuletzt durch euch sehr viel Spaß gemacht.

Danke an Philipp Weis für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik im Labor und alle geleistete Vorarbeit in Bezug auf mein Promotionsthema.

Danke an Dr. Maria Lazariotou für die vielseitige theoretische und praktische Unterstützung, für die tolle Zusammenarbeit und das entspannte Arbeitsklima.

Danke an Lukas Page für die Hilfe bei der Korrektur der Dissertationsschrift, so wie für die Weiterführung meiner Arbeit im Labor.

Danke an jeden einzelnen meiner Freunde, der sich dazu bereit erklärt hat morgens früh aufzustehen, um im Labor Blut für meine Versuche zu spenden.

Familie ist wo Leben beginnt und Liebe niemals endet.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Ganz besonders meinen Eltern. Ihr habt es mir ermöglicht meinen Traum vom Medizinstudium zu verwirklichen. Eure Motivation, Großzügigkeit und Liebe haben mich mein ganzes Studium über begleitet und Worte können sicher nicht ausdrücken wie dankbar ich für alles bin, was Ihr in mich investiert habt.

7.4 Lebenslauf

Personalien

Name	Helm
Vorname	Johanna
Geburtsdatum	13.04.1989
Geburtsort	Würzburg
Zivilstand	ledig

Ausbildung

10/2015-02/2016	Praktischer Abschnitt der Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II Invasive Mykosen – Prognose und Diagnose mittels <i>Aspergillus fumigatus</i> spezifischer CD154 ⁺ /CD4 ⁺ Zellen
06/2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2014-2015	Praktisches Jahr
03/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/2009-06/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
2008	Allgemeine Hochschulreife Martin-Pollich Gymnasium Mellrichstadt

Ärztliche Tätigkeit

06/2016-06/2018	Assistenzärztin für Chirurgie, Mainklinik Ochsenfurt
10/2018-03/2019	Assistenzärztin für Innere Medizin, Klinik Kitzinger Land
seit 04/2019	Assistenzärztin für Innere Medizin, Spital Wattwil

Würzburg, den 04.09.2019

Johanna Helm