

# **Interaktion von humanen Granulozyten mit den Pilzen**

## ***Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus***

von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
**Iwona Maria Wozniok**  
aus Königshütte

Hauptberichter: Professor Dr. P. Scheurich  
Mitberichter: Professor Dr. H. Einsele

Tag der mündlichen Prüfung: 18. August. 2008

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart  
und  
Medizinische Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg

Stuttgart  
2008

Der Großteil der vorliegenden Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Hermann Einsele und PD Dr. Jürgen Löffler in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig erstellt wurde. Dazu wurden ausschließlich angegebene Hilfsmittel und Ratschläge namentlich aufgeführter Personen zur Unterstützung verwendet.

Stuttgart, den 05. April 2008

Iwona Maria Wozniok

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Abkürzungen .....	6
2. Summary .....	9
3. Zusammenfassung .....	11
4. Einleitung .....	13
4.1 <i>Candida albicans</i> .....	13
4.1.1 Allgemeines .....	13
4.1.2 Infektionen durch <i>Candida albicans</i> .....	13
4.1.3 Aufbau der Zellwand .....	14
4.1.4 Virulenzfaktoren .....	15
4.1.5 Polymorphismus .....	16
4.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	18
4.2.1 Allgemeines .....	18
4.2.2 Infektionen durch <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	18
4.2.3 Virulenzfaktoren .....	18
4.3 Das angeborene Immunsystem .....	19
4.3.1 Humane neutrophile Granulozyten .....	20
4.3.2 Chemotaxis und Phagozytose .....	21
4.3.3 Oxidativer Burst .....	22
4.3.4 NETs .....	23
4.4 Interaktion von Granulozyten mit <i>Candida albicans</i> und <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	23
4.4.1 <i>Candida albicans</i> .....	23
4.4.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	24
4.5 Zielsetzungen .....	25
5. Material .....	26
5.1 Medien .....	26
5.2 Puffer .....	27
5.3 Farbstoffe .....	29
5.4 Zellwandbestandteile .....	29
5.5 Inhibitoren, Modulatoren und Enzyme .....	29
5.6 Antikörper .....	30
5.7 Zytokine .....	30
5.8 Computerprogramme und Datenbanken .....	31
6. Methoden .....	32
6.1 Kultivierung von <i>Candida albicans</i> .....	32
6.2 Induktion der jeweiligen Morphotypen .....	32
6.3 Kultivierung von <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	34
6.4 Generierung von humanen Granulozyten .....	35
6.5 Durchflusszytometrische Untersuchung von Granulozyten .....	36
6.5.1 CD66b Färbung .....	36
6.5.2 AnnexinV / Propidiumjodid-Färbung .....	37
6.6 Mikroskopische Untersuchungen .....	38
6.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	38
FITC Wachstumsassay .....	38
Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskopie .....	39
Fluoreszenzmarkierungen von Koinkubationen .....	40
Fluoreszenzmarkierung mit einem spezifischem <i>A.fumigatus</i> -Antikörper .....	41
6.6.2 Transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	42

6.7 Proteinanalyse.....	42
6.7.1 ELISA.....	42
6.7.2 Luminex.....	43
6.7.3 Western Blot.....	44
Probenvorbereitung.....	44
Aktinabgleich.....	44
ERK-Phosphorylierung.....	45
6.7.4 Biotrockenmassebestimmung.....	46
6.8 Konfrontationsuntersuchungen.....	47
6.8.1 Oxidativer Burst.....	47
6.8.2 Nachweis von extrazellulärer DNA (NETs) mit Sytox Green.....	48
6.8.3 Chemotaxis.....	48
6.8.4 Inaktivierungs-Experiment.....	49
6.8.5 XTT-Experiment.....	49
7. Ergebnisse.....	51
7.1 Die Morphologie von <i>Candida albicans</i> beeinflusst die Interaktion mit humanen Granulozyten.....	51
7.2 Keimschläuche induzieren in humanen Granulozyten eine zielgerichtete Mobilität.....	55
7.3 Sowohl Keimschläuche als auch Hefen von <i>Candida albicans</i> werden durch PMN beeinflusst und geschädigt.....	60
7.4 Eine auf Aktin-Umorganisation basierende Mobilität ist entscheidend für die Bekämpfung von <i>Candida albicans</i> -Keimschläuchen.....	64
7.5 Die Erkennung und Abtötung von Keimschläuchen wird über die MEK/ERK-MAP-Kinase-Kaskade vermittelt.....	67
7.6 Unterschiedliche Effektormechanismen von humanen PMN bei der Abwehr gegen <i>Candida albicans</i> .....	74
7.6.1 NET-Bildung trägt nicht nachweisbar zur Schädigung von <i>Candida albicans</i> bei.....	74
7.6.2 Humane Granulozyten produzieren Sauerstoffradikale in Gegenwart des Pilzes.....	76
Die Sauerstoffradikalproduktion wird von der Morphologie des Pilzes beeinflusst.....	76
Modulationsmöglichkeiten des Oxidativen Bursts.....	80
Sauerstoffradikale sind nur von begrenzter Bedeutung für die Bekämpfung von <i>Candida albicans</i> .....	84
7.7 Verhalten von humanen Granulozyten in Gegenwart von <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	91
7.8 Granulozyten produzieren NETs in Gegenwart von <i>A. fumigatus</i> -Keimschläuchen.....	92
7.9 Chemotaktisches Potential von <i>A. fumigatus</i> -Keimschläuchen für humane Granulozyten.....	93
7.10 Granulozyten produzieren Sauerstoffradikale in Gegenwart von <i>A. fumigatus</i> -Keimschläuchen.....	94
7.11 Granulozyten bewirken eine Wachstumsinhibierung bei <i>A. fumigatus</i> .....	95
7.12 Granulozyten schädigen <i>A. fumigatus</i> -Keimschläuche effektiv.....	96
8. Diskussion und Ausblick.....	100
8.1 Relevanz von Granulozyten bei Pilzinfektionen.....	100
8.2 Verhalten von humanen PMN in Gegenwart von <i>C. albicans</i> .....	102
8.2.1 <i>C. albicans</i> gibt chemotaktische Signale an die Umgebung ab.....	103



8.2.2 Granulozyten gehen einen engen Kontakt zu den Keimschläuchen von <i>C. albicans</i> ein.....	106
8.3 Die Bedeutung des MEK/ERK-Signalwegs von humanen PMN bei Interaktionen mit <i>C. albicans</i> .....	106
8.3.1 Morphotypische Eigenschaften des Pilzes legen die Aktivierungsmechanismen bei humanen PMN fest .....	108
8.4 NET-Bildung von humanen PMN in Gegenwart von <i>C. albicans</i> .....	110
8.5 Relevanz des Oxidativen Bursts bei humanen PMN für Abwehr gegen <i>C. albicans</i> .....	111
8.6 Das Immunsystem unterscheidet zwischen den hyphalen und Hefeformen bei <i>C. albicans</i> .....	113
8.7 Die Immunabwehr gegen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Infektionen.....	115
8.8 Die Interaktion von Granulozyten mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -Keimschläuchen.....	116
8.9 Oxidativer Burst zur Schädigung von <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	116
8.10 Vergleich der Granulozytenabwehr gegen <i>Candida albicans</i> und <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	119
9. Literaturverzeichnis.....	120
10. Eigene Veröffentlichungen .....	133
11. Danksagung.....	134
12. Lebenslauf.....	136

## 1. Abkürzungen

Abb.	=	Abbildung
<i>A.f.</i>	=	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. fumigatus</i>	=	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	=	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	=	Antikörper
Ampuwa	=	destilliertes Reinstwasser für Injektionszwecke
APS	=	Ammoniumpersulfat
Aqua demin.	=	demineralisiertes Wasser
ATCC	=	American Type Culture Collection
BCECF-AM	=	2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester
bp	=	Basenpaare
BSA	=	Albumin Fraktion V
bzw.	=	beziehungsweise
ca.	=	circa
<i>C.a.</i>	=	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	=	<i>Candida albicans</i>
CGD	=	chronische Granulomatose
DAPI	=	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DCF	=	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
DNase	=	Desoxyribonuklease
DPI	=	Diphenyleniodonium
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EM	=	Elektronenmikroskop
ERK	=	extracellular regulatory kinase
EtOH	=	Ethanol
FACS	=	Fluorescence activated cell sorting
FCS	=	Fötale Kälberserum
FITC	=	Fluoreszeinisothiocyanat

f-MLP	=	N-Formyl-Met-Leu-Phe
g	=	Gramm
GM-CSF	=	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	=	Stunde
H <sub>2</sub> O	=	Wasser
HEPES	=	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IL	=	Interleukin
JNK	=	c-Jun N-terminal protein kinase
k	=	Kilo- (= 10 <sup>3</sup> )
kb	=	Kilobasen
L	=	Liter
LB	=	Luria Broth-Medium
m	=	Milli- (= 10 <sup>-3</sup> )
M	=	mol/L
mA	=	milli Ampere
MAPK	=	mitogen activated protein kinases
MEK	=	MAP kinase kinase
min	=	Minute
MOI	=	multiplicity of infection
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure
μ	=	Mikro- (= 10 <sup>-6</sup> )
n	=	Nano- (= 10 <sup>-9</sup> )
NADPH	=	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NETs	=	neutrophil extracellular traps
PAMPs	=	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
pH	=	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMN	=	polymorphonuclear neutrophils
PMA	=	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RFU	=	Relative Fluoreszenz Units
RNA	=	Ribonukleinsäure
rpm	=	Umdrehungen pro Minute

---

ROI	=	reactive oxygen intermediates
RT	=	Raumtemperatur
s	=	Sekunde
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
sec	=	Sekunde
t	=	Zeit
Tab.	=	Tabelle
TEMED	=	N,N,N',N',-Tetramethylenbisacrylamid
TNF- $\alpha$	=	Tumornekrosefaktor $\alpha$
U	=	Enzymeinheit in $\mu\text{mol}/\text{min}$
XTT	=	2,3-bis-(2-,ethoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
z.B.	=	zum Beispiel

## 2. Summary

In our environment contact with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* is unavoidable. For this reason the immune system must possess effective defence mechanisms to antagonise infections by these microbes. Therefore the aim of this work was to identify relevant defence mechanisms of immune effector cells against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. In human beings a huge fraction of circulating blood cells is formed by granulocytes. Granulocytes are also one of the first host cells recruited to the source of an infection. So these phagocytic cells and their regulation were analysed in defence to the yeast *Candida albicans* and in comparison to the mould *Aspergillus fumigatus*. Results of this work show, that human granulocytes create an intensive reaction in the presence of germ tubes of *Candida albicans* as well as of *Aspergillus fumigatus*. This was verified by monitoring an increased reactive oxygen intermediate production and a tight and intensive contact of the granulocytes with the germ tubes of the fungi. On closer examination of the interaction with *Candida albicans*, human granulocytes varied considerably in their reaction depending on the present morphotype of the fungus. Although human granulocytes achieved a comparable killing efficiency for both morphotypes of *Candida albicans*, they showed only a weak chemotactic reaction in the presence of yeast cells but a strong one in the presence of germ tubes. The activation of effector mechanisms for abatement also seemed to be controlled completely independently for yeast cells and germ tubes. The MEK/ERK-signalling pathway in human granulocytes was solely activated by the filamentous cells of *Candida albicans* associated with tissue invasion. Activation of this cascade resulted in a targeted mobility based on actin rearrangement. This was followed by an intensive contact between granulocytes and filaments of *Candida albicans* and finally by killing of the filaments. By contrast, the killing of yeast cells was shown to be independent of the targeted mobility of granulocytes and of an activation of the MEK/ERK-signalling pathway. In addition, it was proven that human granulocytes are able to vary their reaction profile by additional stimulation of the environment. For instance the production of reactive oxygen intermediates was only relevant for the killing of yeast cells and germ tubes of *Candida albicans* in the presence of an effective additional stimulation. Based on the generated results it can be reasoned that human

granulocytes react specifically to the different morphotypes of *C. albicans* and *A. fumigatus*. Furthermore signals of the environment may show a modulating effect on the reaction of granulocytes.

### 3. Zusammenfassung

Da in unserer Umgebung der Kontakt sowohl zu *Candida albicans* als auch zu *Aspergillus fumigatus* unvermeidbar ist, muss das Immunsystem über effektive Mechanismen verfügen, um Infektionen durch diese Keime abzuwehren. Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es daher, die relevanten Abwehrmechanismen von Immuneffektorzellen gegen diese Erreger zu identifizieren. Da Granulozyten in humanem Blut in großer Zahl vertreten sind und bei Infektionen zu den ersten Abwehrzellen vor Ort zählen, wurden diese phagozytischen Zellen und deren Regulation bei der Immunabwehr gegen den Hefepilz *Candida albicans* und als Vergleichsstamm gegen den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* untersucht. Die Resultate dieser Arbeiten zeigten, dass humane Granulozyten eine starke Reaktion auf Keimschläuche sowohl von *C. albicans* als auch von *A. fumigatus* aufweisen. Dies konnte anhand einer erhöhten Sauerstoffradikalproduktion und einer engen und intensiven Kontaktaufnahme der Granulozyten zu den Keimschläuchen nachgewiesen werden. Bei näherer Betrachtung der Interaktion mit *C. albicans* zeigte sich, dass humane Granulozyten ein deutlich differenziertes Verhalten in Abhängigkeit von der vorliegenden Pilzmorphologie zeigen. Obwohl Granulozyten bei Hefen und Keimschläuchen eine vergleichbare Abtötungseffizienz erzielten, reagierten sie rein chemotaktisch kaum auf die Hefen, jedoch sehr stark auf Keimschläuche. Auch die Aktivierung der Effektormechanismen zur Bekämpfung von Hefen und Keimschläuchen bei Granulozyten scheint vollkommen unabhängig voneinander reguliert zu werden. Ausschließlich die filamentösen Pilzzellen von *C. albicans*, die mit Gewebsinvasionen assoziiert werden, aktivierten die MEK/ERK-Signalkaskade. Diese Kaskade resultiert in einer gezielten Mobilität, basierend auf Aktinorganisation, in einer intensiven Kontaktaufnahme zwischen Granulozyten und *C. albicans*-Filamenten und schließlich in einer Abtötung der Pilzfilamente. Im Gegensatz dazu konnte eine Abtötung der Hefen unabhängig von der gezielten Granulozytenmobilität und einer Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade nachgewiesen werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass humane Granulozyten ihr Reaktionsprofil in Reaktion auf zusätzliche Stimuli aus der Umgebung variieren können. So erwies sich die Produktion von Sauerstoffradikalen nur bei einer effektiven Zusatzstimulierung der Granulozyten als relevant bei der Abtötung von *C.*

*albicans*-Hefen und -Keimschläuchen. Anhand der erhaltenen Resultate kann geschlussfolgert werden, dass zum einen humane Granulozyten spezifisch auf die jeweilige Morphologie von *C. albicans* und *A. fumigatus* zu reagieren vermögen und dass zum anderen Signale aus der Umgebung modulatorische Wirkung auf die Granulozytenreaktionen ausüben.



## 4. Einleitung

### 4.1 *Candida albicans*

#### 4.1.1 Allgemeines

*Candida albicans* (Erstbeschreibung 1853 von C. Robin) ist ein fakultativ pathogener Sprosspilz aus der Abteilung Ascomycota [Mackinnon & Artagaveytia-Allende, 1945, Hahn et al., 1999].

Klinische Isolate sind überwiegend diploid und heterozygot [Olaiya & Sogin, 1979, Whelan et al., 1980]. Eine meiotische Phase für den sexuellen Zyklus ist bei *C. albicans* nicht bekannt, allerdings wurden unter bestimmten Bedingungen Paarungen beschrieben und ein Mating-Lokus im Genom charakterisiert [Hull et al., 2000, Magee & Magee, 2000, Jones et al., 2004].

Morphologisch handelt es sich bei *C. albicans* um einen polymorphen opportunistischen Pilz, der die gastrointestinale Mukosa und die Mundschleimhaut als Komensale von warmblütigen Tieren und Menschen besiedelt [Hahn et al., 1999, Schaller, 2006]. Der Prozentsatz besiedelter Personen in der Bevölkerung ist sehr hoch. Beispielsweise sind 50% mit *C. albicans* in der Mundschleimhaut besiedelt [Lynch PD, 1994].

#### 4.1.2 Infektionen durch *Candida albicans*

Seit 1970 stieg die Todesrate durch Candida-Infektionen in Verbindung mit einem Anstieg der Risikopatienten deutlich an [Klepser, 2006].

*C. albicans* kann zu hartnäckigen Oberflächenmycosen auf der Haut und auf Schleimhäuten führen. Dabei sind besonders orale und vaginale Infektionen weit verbreitet. *C. albicans* kann des Weiteren lebensbedrohliche systemische Infektionen bei Frühgeborenen, AIDS-Patienten und Patienten mit chronischen pulmonalen Erkrankungen (wie Cystische Fibrose) und bei Neutropenien auslösen. *Candida* Spezies sind für 80% der Pilzinfektionen verantwortlich und *C. albicans* ist wiederum der Hauptverursacher der invasiven Infektionen (= Candidosen) [Odds, 1987, Denning, 1991, Klepser, 2006, Pfaller & Diekema, 2007]. Invasive Candida-

Infektionen enden zu 40% tödlich und in den Vereinigten Staaten sterben jährlich etwa 10000 Patienten daran [Gudlaugsson et al., 2003].

*C. albicans* kann auf unterschiedlichen Wegen in den Blutkreislauf gelangen, zum einen über Penetration von Schleimhautoberflächen und zum anderen direkt über intravaskuläre Katheter [Rex et al., 1994, Velasco et al., 2000, Kullberg & Oude Fradin et al., 2005]. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Kolonisation mit *C. albicans* und intravaskuläre Verweilkatheter Risikofaktoren für die Entwicklung einer invasiven Candidose darstellen.

Sobald der Pilz den Blutstrom erreicht, breitet er sich im Gewebe aus. Dies hat eine sofortige Einwanderung von Immuneffektorzellen (mononucleäre und polymorphnucleäre Leukozyten) zur Folge [Cutler, 1977].

#### 4.1.3 Aufbau der Zellwand

Als äußerste Umhüllung der Pilzzelle vermittelt die Zellwand die initiale Interaktion zwischen dem Mikroorganismus und der Umgebung bzw. dem Wirt. Sie ist rigide genug, um die Erhaltung der Zellmorphologie zu gewährleisten. Gleichzeitig ist die Dynamik der Zellwand Voraussetzung für die morphologische Plastizität des Pilzes [Cassone, 1989].

Die Zellwand von *C. albicans* (siehe Abb. 4.1) besteht zu 80-90% aus Polysacchariden, die sich aus drei Hauptkomponenten zusammensetzen.  $\beta$ -Glucane, verzweigte Glukosepolymere mit  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Verbindungen machen 50-60% davon aus. Des Weiteren kommen verzweigte Polymere von N-acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) mit  $\beta$ -1,4-Bindungen (=Chitin) vor. Mannosepolymere, die mit Proteinen kovalent assoziiert sind, repräsentieren die dritte Hauptkomponente. Zusätzlich enthält die Zellwand 6-25% Proteine und wenige Lipide (1-7%) [Molano et al., 1980, Shepherd, 1987, Cassone, 1989, Chaffin et al., 1998].

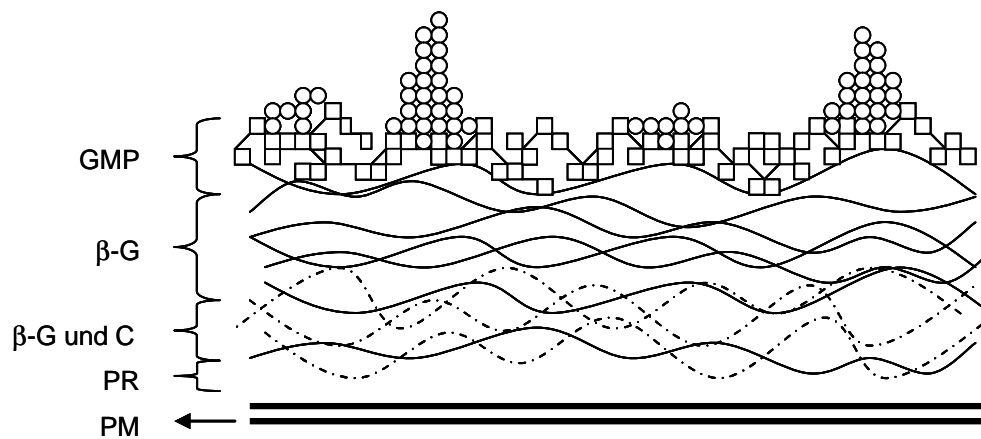


Abb. 4.1: Zellwandschema von *Candida albicans* (Grafik in Anlehnung an Chaffin et al., 1998). PM, Plasmamembran; PR, Periplasmatischer Raum; β-G und C, β-Glucane und Chitin; β-G, β-Glucane; GMP, Glyco(manno)proteine

#### 4.1.4 Virulenzfaktoren

Die vielfältigen Virulenzfaktoren von *C. albicans* unterstützen die Invasion des Pilzes. Dabei hat besonders die Produktion von Adhesinen eine große Bedeutung, da über diese Biomoleküle die Adhärenz zwischen dem Pilz und den Wirtszellen vermittelt wird. Die Morphogenese von *C. albicans* ermöglicht dem Pilz einen reversiblen Wechsel des Wachstums zwischen einzelligen Hefezellen und filamentösen Wachstumsformen. Dabei wird insbesondere das Auskeimen und Wachsen von *C. albicans* mit einer Evasion aus phagozytischen Zellen und dem Durchdringen von Gewebsbarrieren assoziiert. Zwei große Enzymfamilien, die bei *C. albicans* zusätzlich mit der Virulenz in Zusammenhang gebracht werden, sind die sekretierten Aspartylproteasen und die Phospholipasen [Calderone & Braun, 1991, Staib et al., 2000, Calderone & Fonzi, 2001, Soll, 2002, Naglik et al., 2003, Kumamoto & Vices, 2005, Chauhan et al., 2006].

Des Weiteren kann *C. albicans* auf unterschiedliche Stresssituationen mit der Synthese von Enzymen mit Schutzfunktionen reagieren. Thermischer, osmotischer und oxidativer Stress induzieren jeweils ein spezifisches Set an Genen zum Schutz der Zelle. In Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies reguliert *C. albicans* Gene für eine Detoxifizierung, wie die Superoxiddismutase, die Katalase, den Glutathion-Peroxidase/Glutathion-Reduktase-Komplex oder den Thioredoxin-

Peroxidase/Thioredoxin-Reductase-Komplex deutlich hoch [Enjalbert et al., 2003, Fradin et al., 2003, Martchenko et al., 2004, Fradin et al., 2005, Enjalbert et al., 2007].

#### 4.1.5 Polymorphismus

Der Erfolg von *C. albicans* basiert auf der Fähigkeit als unschädlicher Kommensale in unterschiedlichen Körperregionen wie der Mundhöhle, den Genitalien und dem Gastrointestinaltrakt durch Anpassung der Zellphysiologie und Morphologie, überleben zu können [Soll, 2002]. Der Pilz kann bei seinem Wachstum flexibel zwischen der einzelligen Hefeform und mehrzelligen invasiven filamentösen Wachstumsformen variieren [Sudbery et al., 2004]. Einzelzellen in Form von knospenden Hefezellen werden Blastosporen genannt. Bei filamentösem Wachstum wird zwischen Pseudohyphen und echten Hyphen unterschieden [Berman, 2006]. Pseudohyphen werden gebildet, wenn bei der polarisierten Zellteilung der Blastospore die Tochterzelle nach der Knospung auswächst und ein Septum bildet, aber an der Mutterzelle befestigt bleibt. Auf diese Weise entstehen Filamente aus elongierten Zellen mit Einschnürungen an den Septen. Unter Wachstumsbedingungen, wie neutralem pH-Wert und Temperaturen um 37°C, bilden Blastosporen längliche Auswüchse, die sich zu Keimschläuchen entwickeln. Aber auch Serum, N-Acetylglukosamin oder Nährstoffmangel im Kultivierungsmedium und Kohlenstoffdioxid oder Adhärenz können den Wechsel der Wachstumsform hervorrufen. Das Ausbilden dieser Keimschläuche resultiert in einem Wechsel in die filamentöse Wachstumsphase, auch echte Hyphen oder myceliale Form genannt. Dabei werden die nicht eingeschnürten Filamente der echten Hyphen durch Septen unterteilt, die innerhalb der Keimschläuche gebildet werden und nicht an der Trennfläche zwischen Tochter und Mutterzelle, wie es bei Hefen und Pseudohyphen der Fall ist. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen, wie nährstoff- und sauerstoffarmem Medium oder niedrigen Temperaturen, kann *C. albicans* auf filamentösen Zellen runde Sporen mit einer dicken Zellwand, Chlamydosporen genannt, ausbilden [Gow, 1997, Sonneborn, 1999, Noblie et al., 2003, Barelle et al., 2003, Sudbery et al., 2004, Biswas et al., 2007].

Obwohl Hefen und hyphale Zellen von *C. albicans* in infiziertem Wirtsgewebe nachgewiesen werden können, wird davon ausgegangen, dass die Hyphenbildung

entscheidend für die invasiven Eigenschaften des Pilzes ist [Felk et al., 2002]. Zum Beispiel ist bekannt, dass die Oberfläche von hyphalen Zellen spezifische Adhäsionsmoleküle aufweist, die in Hefenoberflächen nicht enthalten sind [Gale et al., 1998]. Mit Hilfe von physikalischen Kräften können hyphale Zellen von *C. albicans* das Epithel durchdringen [Sherwood et al., 1992]. Des Weiteren kann die Hyphenbildung dem Pilz ein Auswachsen aus Makrophagen oder Endothelzellen nach einer Phagozytose ermöglichen [Zink et al., 1996, Phan et al., 2000]. Hyphen-assoziierte Faktoren wie sekretierte Hydrolasen scheinen ebenso einen großen Beitrag zur Virulenz zu leisten [Hube et al., 1994, White & Agabian, 1995].

Bei *C. albicans* wurden mehrere Gene identifiziert, die entscheidenden Einfluss auf das filamentöse Wachstum nehmen. Dabei sind besonders die Gene *efg1* [Stoldt et al., 1997], *tup1* [Braun & Johnson, 1997] und *chp1* [Liu et al., 1994] zu nennen. Zusätzlich wurden Gene in Verbindung mit *chp1* gesetzt, die an MAP-Kinase-Signalwegen beteiligt sind, wie *ras1* [Feng et al., 1999, Mitchell, 1998, Brown & Gow, 1999].

Wird der Regulator Ras1 deletiert, kann bei der *C. albicans*-Mutante keine Filamentbildung mehr induziert werden [Feng et al., 1999]. Der Transkriptionsfaktor Efg1 spielt bei der Morphogenese ebenfalls eine zentrale Rolle. Das Efg1p Protein besitzt ein Helix-Loop-Helix DNA-Bindemotiv und kann sowohl aktivierende als auch reprimierende Aktivitäten aufweisen [Stoldt et al., 1997]. Wird bei *C. albicans* Efg1 deletiert, besitzt der Pilz trotz dessen, abhängig von den Kultivierungsbedingungen, immer noch die Fähigkeit zu hyphalem Wachstum. Wird allerdings des Weiteren der Transkriptionsaktivator mit homeodomain Chp1 deletiert, dann besitzt die Doppelmutante (*efg1/chp1*) einen starken Defekt im filamentösen Wachstum, so dass keine Kultivierungsbedingungen bekannt sind, die eine Hyphenbildung induzieren könnten. Bei der beschriebenen Doppelmutante wurde im Mausmodell einer systemischen Infektion eine Avirulenz festgestellt [Lo et al., 1997, Csank et al., 1998].

Der Transkriptionsrepressor Tup1 von *C. albicans* besitzt eine WD-Bindedomäne über die eine Interaktion mit unterschiedlichen DNA-Bindeproteinen stattfinden kann [Komachi & Johnson, 1997]. Tup1 reprimiert in *C. albicans*-Gene, die für die Initiierung von filamentösem Wachstum verantwortlich sind. Diese Repression wird unter Filament-induzierenden Umweltbedingungen aufgehoben. *C. albicans*-

Mutanten, in denen *tup1* deletiert wurde, wachsen unter allen bekannten Kultivierungsbedingungen in filamentöser Form. Auch für diese Mutante ist eine geminderte Virulenz bekannt [Braun & Johnson, 1997, Braun et al., 2000].

## **4.2 *Aspergillus fumigatus***

### **4.2.1 Allgemeines**

*Aspergillus fumigatus* ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz mit septiertem Myzel aus der Abteilung Ascomycota [Hahn et al., 1999]. Sein natürliches Habitat ist Erde, in der er sich von organischen Komponenten ernährt. Die Verbreitung des Pilzes mit der Luft (jahreszeitenabhängig, etwa 12 Konidien pro m<sup>3</sup>) und dem Leitungswasser erfolgt über Konidien (Aspergillussporen), die in großen Mengen in Fruchtkörpern gebildet werden. Aufgrund der geringen Größe der Konidien von 2-3 µm können sie durch Inhalation bis in die Alveolen eindringen [Raper & Fenenell, 1965, Mullins et al., 1976, Mullins, et al., 1984, Latgé, 1999]. Sexuelle Fortpflanzung ist für diese Spezies nicht bekannt. *A. fumigatus* ist ein thermophiler Pilz mit einer maximalen Wachstumstemperatur von 55°C [Raper & Fenenell, 1965, Haines, 1995].

### **4.2.2 Infektionen durch *Aspergillus fumigatus***

Die invasive Aspergillose äußert sich in einer Einwanderung des Pilzes aus der Lunge ins Gewebe mit anschließender Besiedlung weiterer Organe. Für die Therapie der invasiven Infektion steht keine optimale Behandlungsmöglichkeit zur Verfügung, so dass die Erkrankung immer noch in etwa 90% der Fälle zum Tode führt. Entscheidend für eine Genesung des Patienten ist eine schnelle Diagnose [von Eiff et al., 1995, Verweij et al., 1996, Caillot et al., 1997, Chauhan et al., 2006].

### **4.2.3 Virulenzfaktoren**

Aufgrund seiner Virulenzfaktoren ist *A. fumigatus* bei immunsupprimierten Patienten befähigt durch das humane respiratorische Epithel zu gelangen und Abwehrzellen zu töten. Über Adhesine wird die Interaktion zwischen Wirtszellen und Pilzzellen

vermittelt [Sturevant & Latge, 1992, Tronchin et al., 1997]. Mit Hilfe von Phospholipasen zerstört *A. fumigatus* das Epithel [Birch et al., 1996]. Durch die Produktion von Proteasen wird die Kolonisation vermittelt und es werden humorale Faktoren degradiert [Monod et al., 1991, Monod et al., 1993]. Die Pigmente der Konidien inhibieren die Phagozytose, indem sie die Opsonisierung beeinflussen [Tsai et al., 1997]. Catalasen und Superoxiddismutasen haben eine antioxidative Wirkung während der Phagozytose [Calera et al., 1997, Holdom et al., 1996]. *A. fumigatus* produziert des Weiteren toxische sekundäre Metabolite, wie Gliotoxin, die zusätzlich eine Immunsuppression hervorrufen können [Sutton et al., 1994]. Des Weiteren werden Zellwandkomponenten wie  $\beta(1-3)$ -Glukane, Galaktomannan und Galaktomannanproteine mit der Virulenz assoziiert. *A. fumigatus* verfügt zusätzlich über Detoxifizierungssysteme für reaktive Sauerstoffspezies [Paris et al., 2003, Ishibashi et al., 2004].

### 4.3 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen und eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar [Luster, 2002]. Die Komponenten der angeborenen Immunität reagieren sehr zügig auf Mikroorganismen und sind meist im Stande, diese effektiv zu eliminieren [Janeway, 1989]. Dabei werden Strukturen erkannt, die charakteristisch für mikrobielle Pathogene sind (Pathogen-assoziierte molekulare Muster = PAMPs) jedoch nicht in Säugerzellen vorkommen [Janeway & Medzhitov, 1998, Medzhitov & Janeway, 2002].  $\beta$ -Glucane der Pilzzellwand agieren zum Beispiel als PAMPs, die Leukozyten eine Erkennung über den Dectin-1 Rezeptor und eine Reaktion in Form von Phagozytose und der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. IL-8 oder TNF- $\alpha$ ) ermöglichen, ohne dass der Pilz opsonisiert sein muss [Czop, 1986, Janeway, 1992, Brown & Gordon, 2001, Brown & Gordon, 2005].

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus Epithelbarrieren, zirkulierenden Zellen (Neutrophile, mononukleäre Phagozyten und andere Leukozyten) und Proteinen (Komplementsystem) zusammen, die Mikroorganismen oder Infektionsmediatoren erkennen [Basset et al., 2003]. Phagozytierende Zellen sind essentiell für das angeborene Immunsystem. Dabei treten Makrophagen sehr früh in Aktion und lösen, falls notwendig, zur Verstärkung eine Rekrutierung von Neutrophilen aus dem

Blutkreislauf aus [Kazmierowski et al., 1977, Sibille et al., 1987, Goodman et al., 1991].

#### **4.3.1 Humane neutrophile Granulozyten**

Polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) sind phagozytierende Zellen der angeborenen Immunabwehr, die innerhalb von wenigen Stunden an den Infektionsherd gelangen können. PMN haben einen Durchmesser von 12-15  $\mu\text{m}$  und machen den überwiegenden Anteil zirkulierender Leukozyten im Blut aus. Im Blutkreislauf zirkulierende PMN überleben nur ca. 6 bis 8 h. Wenn sie jedoch aktiviert werden und in das Gewebe einwandern, verlängert sich ihre Lebenserwartung auf bis zu zwei Tage. Erwachsene produzieren im Schnitt  $1 \times 10^{11}$  PMN am Tag. Diese Zellen sind terminal differenziert und entscheidend für die akute inflammatorische Phase von Bakterien- und Pilzinfektionen [Page & Good, 1958, Keel et al., 1997, Radsak et al., 2000, Segal, 2005].

PMN sind durch einen segmentierten Zellkern und zytoplasmatische Granula charakterisiert. Granulozyten besitzen sogenannte spezifische, azurophile und Gelatinase-Granula, die jeweils charakteristische Proteasen, antimikrobielle Proteine und Peptide sowie Enzyme enthalten. Antimikrobielle Proteine wie Defensine und Lysozym zerstören anionische Mikroorganismen-Oberflächen und machen diese durchlässig. Proteasen wie die neutrophile Elastase und Cathepsin G degradieren Proteine und zerstören die Virulenzfaktoren der Mikroorganismen [Cohn & Hirsch, 1960, Root & Cohen, 1981, Mayer-Scholl et al., 2004].

Des Weiteren verfügen PMN über sauerstoffabhängige Abwehrmechanismen, die nach der Phagozytose über die Produktion des sogenannten Oxidativen Burst im Phagosom ausgelöst werden [Iyer et al., 1961, Babior et al., 1973]. Diese können allerdings auch das umgebende Gewebe angreifen. Daher ist ein präziser Regulationsmechanismus für das Gleichgewicht zwischen Abwehr des Pilzpathogens und der Immunpathologie entscheidend [Henson & Johnston, 1987, Weiss, 1989].



### 4.3.2 Chemotaxis und Phagozytose

Humane PMN zeigen, wie auch andere phagozytische Zellen, ein chemotaktisches Verhalten hin zur Quelle einer Infektion. Die Chemotaxis wird durch einen Gradienten von mikrobiellen Molekülen ermöglicht und ist entscheidend für die ersten Schritte der Wirtsabwehr. PMN bewegen sich amöboid mit einer Geschwindigkeit von bis zu 20  $\mu\text{m}$  pro Minute fort. Damit gehören sie zu den schnellsten beweglichen Säugerzellen und können durch eine gerichtete Wanderung sehr effektiv an den Infektionsherd gelangen [Schiffmann et al., 1975, Niggli, 2003, Dürr et al., 2006].

Die relevanten Chemotaxisrezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren. Damit können Leukozyten auf chemotaktische Signale wie bestimmte Pathogen-assoziierte Molekularmuster (= PAMPs) oder Chemokine reagieren. [Prossnitz & Ye, 1997, Mackay, 2001, Schröder et al., 2002]. Chemotaktische Faktoren binden an die Sieben-Transmembranhelix-Rezeptoren und aktivieren heterotrimere G-Proteine. In humanen PMN wird ein komplexes Signalnetzwerk, das diesen Proteinen nachgeschaltet ist, aktiviert. Dazu gehören die Proteinkinase C-Familie, kleine GTP-bindende Proteine, die MAP-Kinase-Kaskade, Tyrosinkinasen und Proteinphosphatasen. Bei den unterschiedlichen Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) können die p38 MAPK, die c-Jun N-terminale Protein-Kinase (JNK) oder die extrazelluläre regulatorische Kinase (ERK) aktiviert werden [Niggli, 2003].

Für das Anlocken der PMN aus dem Blutkreislauf zur Quelle der Infektion im Gewebe sorgen unter anderem Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  oder IL-1, die von aktivierten Makrophagen produziert werden. Durch die Zytokine werden umgebende Endothelzellen animiert, Selektine, Integrin-Liganden, und Chemokine zu produzieren. Dadurch wird den PMN ermöglicht, über die Endothelzellen zu rollen, eine stabile Adhäsion herbeizuführen und schließlich ins Gewebe einzuwandern [Abbas & Lichtman, 2005]. Sobald PMN den Infektionsherd erreichen, nehmen sie über spezifische Rezeptoren (wie Mannoserezeptoren, Scavengerrezeptoren, Toll-like Rezeptoren, Lektine, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Fc-Rezeptoren) Verbindung zu der Mikroorganismenoberfläche auf. Dann folgt die Phagozytose der Mikroorganismen, indem sie diese umfließen und schließlich ins Phagosom aufnehmen. Durch die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom kommt es zur Bildung des sogenannten Phagolysosoms, in dem die Mikroorganismen zersetzt werden [Underhill & Ozinsky 2002; Janeway & Medzhitov 2002, Herrmann et al.,

2007]. Im Zuge der Phagozytose werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zelluläre Prozesse beeinflussen, wie die Umorientierung des Zytoskeletts, Veränderungen im Membrantransport, Aktivierung des Oxidativen Bursts, die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und die Aktivierung von Apoptoseprozessen [Stossel, 1999, Greenberg & Grinstein, 2002, Aderem, 2003].

### 4.3.3 Oxidativer Burst

Sauerstoffradikale (= ROIs), die von der NADPH-Oxidase in der phagolysosomalen Membran erzeugt werden, stellen hoch reaktive Oxidierungsagenzien dar, womit viele Mikroorganismen von phagozytischen Zellen effektiv abgetötet werden können. Dieser Vorgang wird als Oxidativer oder Respiratorischer Burst bezeichnet. Nach der Zellaktivierung wird der NADPH-Oxidase-Komplex durch Translokation von zytoplasmatischen Komponenten mit einem membrangebundenen Flavozytochrom zusammengesetzt [Iverson et al., 1977, Iverson et al., 1978]. Durch Übertragung von Elektronen auf  $O_2$  im Phagolysosomal- oder Extrazellulärraum generiert der NADPH-Oxidase-Komplex Superoxidanionen ( $O_2^-$ ). Superoxidanionen sind instabile Intermediate, die sich spontan oder enzymatisch in weitere antimikrobielle Oxidanzien, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ), Hydroxylanionen ( $OH^-$ ), hypochlorige Säure (HOCl) oder Nitrylchloride ( $NO_2Cl$ ) umwandeln [Jandel et al., 1978, Rossi et al., 1979, Klebanov, 1999, Segal et al., 2000, Enjalbert et al., 2007]. Diese antimikrobiellen Oxidanzien reagieren mit Lipiden, DNA und Proteinen und führen zu einer letalen Schädigung der Mikroorganismen [Enjalbert et al., 2007]. Hypochlorige Säure wird durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Chloridionen durch die Myeloperoxidase synthetisiert. Allerdings haben Untersuchungen ergeben, dass die Produkte der NADPH-Oxidase größere Bedeutung bei der Pilzbekämpfung haben, als jene der Myeloperoxidase [Aratani et al., 2002, Aratani, 2006].

Patienten mit chronischer Granulomatose (CGD) haben einen Defekt in der Sauerstoffradikalproduktion ihrer Granulozyten und zeigen somit eine große Empfänglichkeit für bestimmte Bakterien und Pilzinfektionen. Dabei sind besonders Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* und *Staphylococcus aureus* zu nennen. Die vier unterschiedlichen Typen der CGD zeichnen sich durch Mutationen in einem

jeweils anderen Abschnitt des NADPH-Oxidase-Komplexes aus [Babior et al., 1973, Jurkowska et al., 2004, Goebel et al., 2005].

#### **4.3.4 NETs**

NETs (Neutrophil Extracellular Traps) sind extrazelluläre Strukturen von PMN, die aus Chromatin und Granula-Proteinen bestehen. Zusätzlich sind auch Histone mit antimikrobieller Aktivität enthalten. Über die klebrige Struktur des Chromatins haften diese an den Mikroorganismen und sorgen somit für eine hohe Konzentration an degradierenden Enzymen auf der Zellwandoberfläche der Pilze. So kommt es zu einer effizienten Minderung der Virulenzfaktoren durch Elastasen und zu einer schnellen Abtötung [Hirsch, 1958, Urban et al., 2006].

Nach der Stimulierung der PMN ändert der Zellkern seine Form, bis es letztendlich durch eine Mischung von Chromatin und Granula-Proteinen zu der typischen NETs-Zusammensetzung kommt. Die NETs werden durch das Aufbrechen der Zellmembran in Richtung der Mikroorganismen abgegeben, was ein Absterben des Granulozyten impliziert. Dieser Zelltod entspricht weder der klassischen Apoptose noch der Nekrose, sondern hängt vielmehr von der Bildung von Sauerstoffradikalen über die NADPH-Oxidase ab [Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Brinkmann et al., 2007].

#### **4.4 Interaktion von Granulozyten mit *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus***

Für die Erkennung und Bekämpfung von *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* spielt das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle [Schaffner, 1994].

##### **4.4.1 *Candida albicans***

Monozyten, Makrophagen und Granulozyten können *Candida albicans*-Hefen intrazellulär innerhalb von wenigen Stunden töten. Dabei scheint bei den Granulozyten die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies einen entscheidenden Einfluss zu haben [Thomson & Wilton, 1992].

Neutrophile können des Weiteren filamentöse Strukturen von *C. albicans* effektiv angreifen und töten. Da die hyphalen Pilzstrukturen zu groß sind, um von einem Granulozyten phagozytiert werden zu können, ist bisher immer noch unklar, wie der exakte Mechanismus bei der Bekämpfung abläuft. Eine mögliche Erklärung wäre die Produktion von NETs, mit denen Granulozyten Mikroorganismen unabhängig von ihrer Größe attackieren können [Urban et al., 2006].

Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem (wie nach einer Chemotherapie, bei einer HIV-Infektion oder bei Neugeborenen) oder wenn die konkurrierende Mikroorganismenflora zum Beispiel nach antibiotischer Behandlung aus dem Gleichgewicht geraten ist, kann Kolonisation und Invasion von *C. albicans* ins Wirtsgewebe beobachtet werden [Berman & Sudbery, 2002].

#### **4.4.2 *Aspergillus fumigatus***

Da weder Makrophagen, noch Monozyten inhalierte Konidien zu 100% eliminieren können, ist das Mitwirken von Neutrophilen bei einer *Aspergillus fumigatus*-Infektion entscheidend. Neutrophile attackieren sowohl ruhende als auch angeschwollene Konidien, aber insbesondere ausgekeimte Pilzzellen [Schaffner et al., 1982, Levitz et al., 1986, Washburn et al., 1988, Richardson et al., 1991, Sturtevant & Latge 1992 Sep, Amitani et al., 1995, Roilides et al., 1998]. Neutrophile adhärieren an die Oberfläche der Hyphen, die zu groß für eine Phagozytose sind. Durch den Kontakt werden der Oxidative Burst und eine Degranulation ausgelöst. Im Gegensatz zur Abtötung der Konidien durch Makrophagen schädigen die Granulozyten die *A. fumigatus*-Hyphen sehr schnell. Nach zwei Stunden Koinkubation sind etwa 50% der Hyphen abgetötet [Schaffner et al., 1986, Sturtevant & Latge, 1992 Sep, Roilides et al., 1993].

In immunsupprimierten Patienten ist die Effizienz der Alveolarmakrophagen teils eingeschränkt und die Anzahl von neutrophilen Granulozyten ist deutlich reduziert. Dadurch kann *A. fumigatus* auskeimen und in das umgebende Gewebe einwachsen [Chauhan et al., 2006]. Ein großes Risiko besteht für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, aber auch für AIDS-Patienten, oder Patienten mit chronischer Granulomatose (eingeschränkte Sauerstoffradikalproduktion) [Weinberg et al., 1992, Wallance et al., 1998, Denning, 1998].

## 4.5 Zielsetzungen

Die Behandlung von Pilzinfektionen bei immungeschwächten Patienten ist sehr problematisch, so dass die Letalität trotz aller Therapieversuche bisher immer noch erschreckend hoch ist. Die Haupterreger dabei sind die humanpathogenen Pilze *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*. Das angeborene Immunsystem ist bei gesunden Menschen im Allgemeinen im Stande, solche Pilzinfektionen zu kontrollieren, wobei besonders die neutrophilen Granulozyten einen effektiven Beitrag dazu leisten.

In der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie die Reaktion von humanen Granulozyten auf die humanpathogenen Pilze *C. albicans* und *A. fumigatus* untersucht werden, um mit Hilfe der gesammelten Informationen die Granulozyten von immungeschwächten Patienten gezielt vorbehandeln zu können.

Gegenstand dieser Arbeit ist:

- die Etablierung eines Protokolls zur Gewinnung von humanen Granulozyten;
- die Etablierung geeigneter Methoden für die Anzucht der jeweiligen Pilze;
- die Untersuchung von visuellen Unterschieden im Verhalten der Granulozyten in Abhängigkeit von der Morphologie des Pilzes;
- die Definierung von entscheidenden Abwehrmechanismen und deren Regulation bei humanen Granulozyten für die jeweiligen Morphologien der Pilze;
- die Untersuchung der Granulozyten-Effekte auf das Wachstum und die Vitalität der Pilze;
- die Frage, ob und in wieweit gängige Medikamente (Immunsuppressiva) oder andere Stimuli aus der Umgebung die Interaktion zwischen Granulozyten und Pilzen beeinflussen;
- die Verifizierung einzelner Beobachtungen durch den Einsatz von speziellen Pilzmutanten.

## 5. Material

### 5.1 Medien

#### Einfriermedium:

65 mL H<sub>2</sub>O

35 mL Glycerin (Merck)

2,5 g Standard I-Nährbouillon (Merck) à autoklaviert

#### FCS (Fetal Calf Serum):

Hitzeinaktivierung von sterilem FCS (Biochrom) à 56°C im Wasserbad für 30 min  
(zur Inaktivierung von Komplementproteinen und eventuell vorhandenen thermolabilen Viren und Mykoplasmen)

à Lagerung von Aliquods (-20°C)

#### Medium 199:

9,8 g M199 (Gibco)

35,7 g HEPES (Roth)

ad 1 L Ampuwa à auf pH 4 bzw. 7 eingestellt à sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße)

#### Sabouraud Agar Platten:

16 g Agar-Agar (Merck)

40 g Glukose (Merck)

10 g Bacton-Pepton (BD)

ad 1000 mL Aqua demin. à autoklaviert

#### YPD Medium:

A) 20 g Bacton Pepton (BD)

10 g Bacton Yeast (BD)

ad 200 mL Ampuwa à autoklaviert

B) 20 g Glukose-Monohydrat (Merck)

35,7 g HEPES (Roth)

ad 800 mL Ampuwa à auf pH7 eingestellt à sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße)

A) und B) vereinigen

## 5.2 Puffer

### 12%iges Acrylamid-Gel:

Trenngel:

3,3 mL H<sub>2</sub>O

4 mL Acrylamid Mix (30%)

(Rotiphorese Gel 30 von Roth)

2,5 mL Tris (1,5 M, pH 8,8)

(Tris Ultra Qualität von Roth)

0,1 mL SDS (10%)

(Natriumdodecylsulfat von MP Biomedicals)

0,1 mL Ammonium Persulfat (10%)

(Ammonium-Peroxidisulfat von Roth)

0,01 mL TEMED (von Roth)

Sammelgel:

1,4 mL H<sub>2</sub>O

0,33 mL Acrylamid Mix (30%)

0,25 mL Tris (1 M, pH 6,8)

0,02 mL SDS (10%)

0,02 mL Ammonium Persulfat (10%)

0,004 mL TEMED

### Blockierungs-Puffer:

1 x TBS

0,1% Tween 20 (Merck-Schuchardt)

5% bzw. 3% Magermilch (Applichem) oder 1% Albumin Fraktion V (Applichem)

### Blockierungs-Puffer für Antikörperfärbung:

1 x PBS Dulbecco (Biochrom)

2,5% FCS

1,5% Magermilch (Applichem)

### FACS-Puffer (pH 7,4):

0,1 M HEPES (Roth)

1,4 M NaCl (Roth)

25 mM CaCl<sub>2</sub> (Roth)

### 10 x Lämmli:

60 g Tris (Roth)

288 g Glycin (Roth)

ad 2000 mL Ampuwa → auf pH 8,7 eingestellt

### 10 x PBS:

100 g PBS Dulbecco (Biochrom)  
1000 mL Ampuwa à autoklaviert

10 x SDS-Elektrophoresepuffer:

60,6 g Tris (Roth)  
287,4 g Glycin (Roth)  
50 mL SDS (20%) (MP Biomedicals)  
ad 2000 mL Ampuwa

2 x Stop-Mix:

14 mL 0,5 M Tris HCL (pH 6,8) (Roth)  
11,2 mL Glycerin (Roth)  
11,2 mL SDS 20% (MP Biomedicals)  
3,43 mL 2-Mercaptoethanol (Roth)  
9,8 mL Ampuwa

10 x TBS:

60,5 g Tris (Roth)  
87,6 g NaCl (Roth)  
ad 1000 mL Ampuwa à auf pH 7,4 eingestellt à autoklaviert

TBS-Tween:

1 x TBS  
0,1% Tween 20 (Merck-Schuchardt) à autoklaviert

1 x Westernblot-Puffer:

1400 mL Ampuwa  
400 mL Methanol (Roth)  
200 mL 10 x Lämmli

XTT-Lösung (täglich frisch ansetzen):

0,5 mg/mL XTT Pulver (Sigma-Aldrich) in 1 x PBS à 30 min bei 55°C  
+ 50 µg/mL Q<sub>0</sub> (Sigma-Aldrich)



### 5.3 Farbstoffe

Annexin V - FITC	BD, Heidelberg
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Invitrogen, Karlsruhe
DCF (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Fluorescein 5(6)-isothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Phalloidin-Alexa-Fluor-546	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Sytox Green	Invitrogen, Karlsruhe

### 5.4 Zellwandbestandteile

Chitin	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Laminarin	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Zyosan	Sigma-Aldrich, Crailsheim

### 5.5 Inhibitoren, Modulatoren und Enzyme

Colchicin (Inhibitor der Microtubulus Polymerisierung)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Cortison (anti-inflammatorisch)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Cyclosporin A (immunsuppressiv)	Novartis, Nürnberg
Cytochalasin D (Inhibitor der Actin Polymerisierung)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Dexamethason (anti-inflammatorisch)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
DNase 1	Worthington, Lakewood
DPI (Inhibitor der NADPH-Oxidase)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
ERK1/2 Inhibitor (3-(2-Aminoethyl)-5- ((4-ethoxyphenyl)methylen)-2,4-thiazolidinedion)	Calbiochem, Darmstadt
Genistin (Inhibitor für Tyrosin-Kinasen)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Jaspakinolide (induziert Actin Polymerisierung und Stabilisierung)	Merck, Darmstadt
Phalloidin (inhibiert F- zu G-Actin Konversion)	Merck, Darmstadt
Latrunculin A (zerstört Microfilament Organisation)	Merck, Darmstadt
L-Glutathion (reduziert, als Antioxidans)	Sigma-Aldrich, Crailsheim

Mycophenolat (immunsuppressiv)	Novartis, Nürnberg
RAD-Everolimus (immunsuppressiv)	Novartis, Nürnberg
SB202190 (Inhibitor der p38 MAPK)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
SP600125 (Inhibitor der JNK1/2 Kinase)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Swinholide A (zerstört Actin Zytoskelett)	Merck, Darmstadt
U0126 (Inhibitor der MEK1/2)	New England Biolabs, Hertfordshire, UK
ZM336372 (Inhibitor für c-Raf)	Calbiochem, Darmstadt

## 5.6 Antikörper

Actin (1-19) (sc-1616) + HRP	Santa Cruz Biotchnology, Heidelberg
Anti-ERK 1&2 (MAPK) (pTpY185/187)	Biomol, Exeter, UK
Anti-pospho-MEK1/2 (pS218/222)	Biomol, Exeter, UK
Aspergillus (Rabbit poyclonal)	Gene Tex, San Antonio, USA
CD66b-Ak-PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Goat $\alpha$ rabbit, FITC markiert	Jackson Research, Suffolk, UK
HRPO- $\alpha$ rabbit IgG (H+L)	Dianova, Hamburg

## 5.7 Zytokine

GM-CSF (Leukine, liquid Sorgramostim)	Barlex (Schering AG), Berlin
TNF- $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
IFN- $\gamma$	BD Biosc. Pharmingen, San Diego, USA
IL-12	BD Biosc. Pharmingen, San Diego, USA
IL-4	Strathmann Biotec, Hannover
IL-3	BD Biosc. Pharmingen, San Diego, USA
IL-2	BD Biosc. Pharmingen, San Diego, USA
IL-1 $\beta$	BD Biosc. Pharmingen, San Diego, USA

## **5.8 Computerprogramme und Datenbanken**

Für Tabellenkalkulationen und graphische Darstellungen wurde mit Excel 2003 (Microsoft, Redmond, USA) gearbeitet. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0 Elements (Adobe Systems, San Jose, USA) und AxioVision Release 4.4 (06-2005) SP1 (Zeiss, Göttingen). Für Literaturrecherchen wurde Google ([www.google.de](http://www.google.de)), Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und ihop ([www.ihop-net.org](http://www.ihop-net.org)) genutzt. Bei der Anwendung der Programme wurden Standard-Einstellungen verwendet.

Die Anwendung spezieller Programme ist an der entsprechenden Stelle der Arbeit vermerkt.

## 6. Methoden

### 6.1 Kultivierung von *Candida albicans*

In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit dem *Candida albicans*-Wildtyp-Hefepilz SC5314 gearbeitet. Des Weiteren kamen auch zur Verfügung gestellte Mutanten von *C. albicans* SC5314 zum Einsatz (siehe Tab).

Tabelle: verwendete *C. albicans*-Stämme

<i>C. albicans</i>	Genotyp	Quelle
SC5314	WT	Gillum et al. 1984
$\Delta$ SOD5	URA3 $\Delta$ :: $\lambda$ imm434/URA3 $\Delta$ :: $\lambda$ imm434 HIS1::hisG/HIS1::hisG sod5 $\Delta$ ::hisG/sod5 $\Delta$ ::HIS1 Superoxiddismutase5 ist deletiert	Martchenko et al., 2004
$\Delta$ cph1/efg1	$\Delta$ cph1::hisG / $\Delta$ cph1::hisG $\Delta$ efg1::hisG / $\Delta$ efg1::hisG-URA3-hisG wächst nur als Hefe	Lo et al. 1997
$\Delta$ ras1	$\Delta$ ras1::hisG / $\Delta$ ras1::hph wächst nur als Hefe	Feng et al. 1999
$\Delta$ tup1	$\Delta$ tup1::hisG / $\Delta$ tup1::hisG wächst nur in filamentöser Form	Braun & Johnson 1997

Der Pilz wurde in einer 35%igen Glycerol-Stock-Lösung bei -80°C gelagert. Am Vorabend eines Experimentes wurde *C. albicans* auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert.

### 6.2 Induktion der jeweiligen Morphotypen

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, um bei *C. albicans* Hefen und Keimschläuche zu generieren. Wurden die jeweiligen Morphologien durch Temperaturunterschiede in den Anzuchtbedingungen gebildet, wurde *C. albicans* ( $10^6$ - $10^7$ /mL) in RPMI-1640-Medium mit 5% FCS (Fetales Kälberserum) aufgenommen und im Schüttler (2 h bei 200 rpm) bei 22°C zur Erzeugung von Hefen und bei 37°C zur Erzeugung von Keimschläuchen inkubiert. Bei einigen Kontrollexperimenten war es notwendig mit opsonisierten Pilzzellen zu arbeiten. Dafür wurden Hefen und Keimschläuchen wie bereits beschrieben über

Temperaturunterschiede generiert und anschließend für 20 Minuten in RPMI-Medium mit 50% humanem Serum (des jeweiligen PMN-Spenders) bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit RPMI wurden die opsonisierten Pilzzellen wieder in RPMI-Medium mit 5% FCS aufgenommen und so in die experimentellen Ansätze eingeführt. Unterschiedliche pH-Werte in der Anzucht von *C. albicans* (Medium 199, 4 h bei 30°C, 200 rpm) führten bei pH 4,0 zu Hefen und bei pH 7,0 zu Keimschläuchen (Evants et al., 1975).

Im Anschluss wurden die Pilzzellen in frischem RPMI-Medium + 5% FCS aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für den überwiegenden Teil der beschriebenen Experimente wurden durch Temperaturunterschiede erzeugte *C. albicans*-Zellen verwendet. Nur in einigen Kontrollexperimenten wurden durch pH-Unterschiede erzeugte Pilze eingesetzt, was an entsprechender Stelle explizit erwähnt wird.

Bei der Generierung der Keimschläuche wurde Wert auf kleine Auswüchse gelegt, was durch mikroskopische Beobachtung festgelegt wurde (siehe Abb. 6.1).

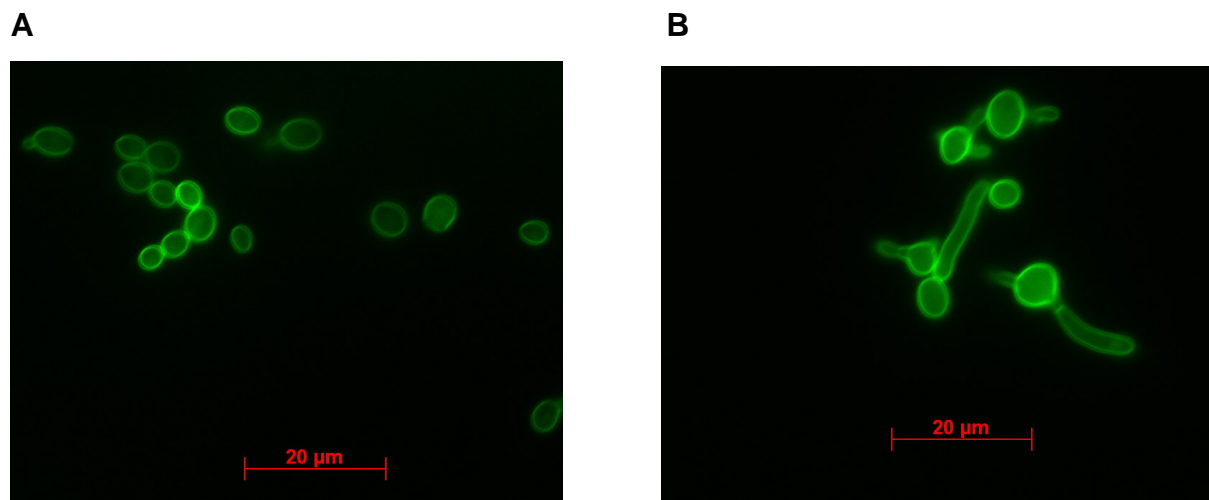


Abb. 6.1: Generierung von *Candida albicans*-Zellen (FITC gefärbt, grün). **A** Hefen. **B** Keimschläuche.

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Proteinmenge der Keimschläuche im Vergleich zu den Hefen unterschied, wurden regelmäßig Biotrockenmassebestimmungen durchgeführt (siehe Kap. 6.7.4).

---

RPMI 1640 Medium (1 x)

Biochrom AG, Berlin

FCS (FBS = Fetales Bovines Serum)

Biochrom AG, Berlin

### 6.3 Kultivierung von *Aspergillus fumigatus*

Für die vorliegende Arbeit wurde mit Wildtypstämmen des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* (ATCC9197 und ATCC46645) gearbeitet. Des Weiteren kam auch eine  $\Delta Afyap1$ -Deletionsmutante von *A. fumigatus* (ATCC46645) zum Einsatz. Bei der Generierung der Mutante  $\Delta Afyap1$  (*Afyap1::hph*, *Hyg<sup>r</sup>*) hat die Arbeitsgruppe um Prof. Brakhage (Hans-Knöll-Institut, Jena) den Transkriptionsregulator AfYap1 aus *A. fumigatus* ATCC46645 funktionell deletiert. AfYap1 reguliert Gene, die für die Neutralisierung von Sauerstoffradikalen verantwortlich sind, wie zum Beispiel die in Pilzmycel vorkommende Katalase Cat2 oder die in Konidien nachweisbare Katalase CatA [Lessing et al., 2007]. In erster Linie fand in der vorliegenden Arbeit der Wildtypstamm ATCC9197 in den beschriebenen Experimenten Anwendung. ATCC46645 und der mutierte Stamm wurden ausschließlich bei Untersuchungen zum Oxidativen Burst (siehe Kap. 6.8.1) eingesetzt, was an entsprechender Stelle aber explizit erwähnt ist.

Zur Erzeugung von *A. fumigatus*-Konidien wurde der Schimmelpilz auf Sabouraud-Agar-Platten ausgestrichen und für 48-72 h bei 37°C inkubiert. Konidien wurden geerntet, indem sie in Wasser resuspendiert und anschließend über ein Zellsieb separiert wurden. Konidien wurden in reinem Wasser bei 4°C bis zu drei Monate gelagert. Keimschläuche von *A. fumigatus* wurden erzeugt, indem Konidien ( $10^7$ /mL) in RPMI Medium + 5% FCS auf einem Schüttler (200 rpm, über Nacht, RT) zum Aufquellen gebracht wurden und anschließend in einer vierstündigen Inkubation bei 37°C im Schüttler (200 rpm) auskeimten. Die Keimschläuche wurden abzentrifugiert (2900 g, 5 min), in frischem RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Aus Patientenpräparaten ist bekannt, dass *A. fumigatus* sehr lange filamentöse Strukturen im Gewebe ausbilden kann (siehe Abb. 6.2).

Bei der Generierung der Keimschläuche wurde allerdings, wie bereits bei *C. albicans* Wert auf kleine Auswüchse gelegt, um mit definierten Pilzmengen arbeiten zu können.



Abb. 6.2: Probe aus humanem Hirnabszess mit *A. fumigatus*-Hyphen

---

RPMI 1640 Medium (1 x)

Biochrom AG, Berlin

FCS (FBS = Fetales Bovines Serum)

Biochrom AG, Berlin

---

Schüttler TH 30

Edmund Bühler GmbH, Tübingen

Zellsieb (40µm Porendurchmesser)

BD Bioscience, Erembodegem, Belgium

---

## 6.4 Generierung von humanen Granulozyten

In der gesamten vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit humanen Granulozyten (polymorphonuclear leucocytes = PMN) gearbeitet. Da Granulozyten eine sehr kurze Lebensspanne haben, wurden die präparierten Effektorzellen noch am Tag der Blutabnahme experimentell eingesetzt.

Für die Isolierung von humanen Granulozyten wurde gesunden freiwilligen Spendern Blut mit EDTA beschichteten S-Monovetten entnommen. Mit der Polymorphprep-Zentrifugationstechnik nach Radsak et al. [2000] wurden polymorphkernige weiße Blutzellen gewonnen.

Dazu wurden 5 mL Polymorphprep vorsichtig mit 5 mL verdünntem Blut (eins zu eins mit HBSS-Puffer) überschichtet und anschließend 30 Minuten zentrifugiert (RT, 460 g, ohne Bremse).

Nach Isolation der entsprechenden Interphase folgte ein Waschschrift (5 min, RT, 520 g) mit HBSS-Puffer. Im Anschluss wurden die verbliebenen roten Blutzellen 5 min mit ACK-Puffer bei RT hypotonisch lysiert. Zuletzt wurden die PMN erneut abzentrifugiert (2 min, RT, 580 g) und in RPMI-Medium mit 5 % FCS aufgenommen. Mit der Trypanblau-Färbung wurde die Anzahl der vitalen PMN in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen und färbt ihr Cytosol tiefblau. Dazu wurden 10 µL einer Verdünnung der Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Fertiglösung vermischt und die ungefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

$$\text{Zellzahl (pro Großquadrat)} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl (pro mL)}$$

---

EDTA-S-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polymorphprep	Nycomed, Oslo, Norway
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
HBSS-Puffer	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
ACK-Puffer	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Trypanblau-Fertiglösung	Seromed/Biochrom KG, Berlin

---

Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Wilovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar

---

## 6.5 Durchflusszytometrische Untersuchung von Granulozyten

### 6.5.1 CD66b Färbung

Die Reinheit der isolierten PMN wurde über eine spezifische Fluoreszenzfärbung mit CD-66b-PE-Antikörpern in einer FACS (Fluorescence activated cell sorting) -Analyse untersucht. CD-66b ist ein typisches Antigen auf polynukleären Zellen.

Dazu wurden  $1 \times 10^6$  frisch isolierte PMN in 1 mL HBSS-Puffer + 10% FCS aufgenommen. 200 µL der PMN-Lösung wurden mit 2,5 µL CD66b-Antikörper in ein FACS-Röhrchen gefüllt und 30 min bei 4°C belassen. Im Anschluss wurden die



Zellen abzentrifugiert (10 min, 300 g) und zweimal mit HBSS-Puffer + 10% FCS gewaschen. Die markierten PMN wurden dann in 500  $\mu$ L HBSS-Puffer + 10% FCS aufgenommen und zusammen mit einer identisch angesetzten Probe mit IgG1-PE-Antikörpern als Isotyp-Kontrolle im FACS analysiert.

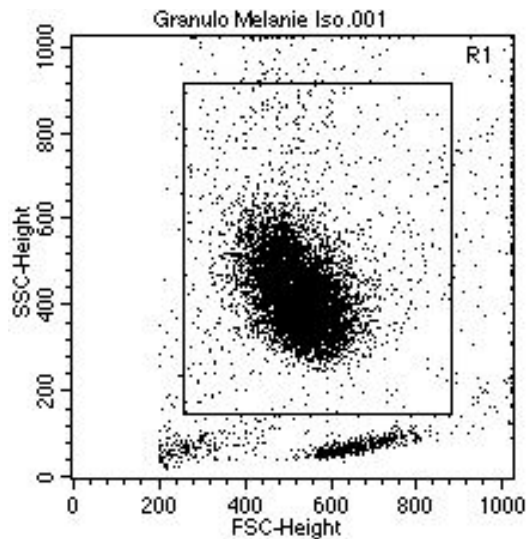


Abb. 6.3: Populationsverteilung einer FACS-Analyse von spezifisch gefärbten Zellen mit CD66b-PE-Antikörpern.

Dabei konnten mit dieser Präparationsmethode von unterschiedlichen Spendern einheitliche Zellpopulationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.3). Im Schnitt wurde eine Granulozytenreinheit von über 90% erzielt.

---

anti-CD66b-PE-Antikörper

Becton Dickinson, Heidelberg

HBSS-Puffer

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

FCS (FBS = Fetales Bovines Serum)

Biochrom AG, Berlin

IgG1-PE-Antikörpern

Becton Dickinson, Heidelberg

---

FACS-Röhrchen (Polystyrol)

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS (BD FACSCalibur)

Becton Dickinson, Heidelberg

---

### 6.5.2 AnnexinV / Propidiumjodid-Färbung

Für die Untersuchung der Toxizität einiger Modulatoren (Cytochalasin D und Mycophenolat) auf humane PMN wurde die apoptotische bzw. nekrotische Wirkung auf PMN nach einer bis zu vierstündigen Koinkubation untersucht. Dazu wurde eine AnnexinV-FITC/Propidiumjodid-Färbung durchgeführt und über eine FACS-Analyse

ausgewertet.  $2 \times 10^6$  PMN wurden nach der Koinkubation (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cytochalasin D bzw. 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Mycophenolat) in RPMI Medium + 5 % FCS zunächst abzentrifugiert (5 min, RT, 310 g) und mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 1 mL FACS-Puffer aufgenommen, nochmals abzentrifugiert (5 min, RT, 310 g) und in 500  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen durch Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC und 175 ng/mL Propidiumjodid gefärbt (15 min, RT, im Dunkeln). Nach einer anschließenden Zentrifugation (5 min, RT, 310 g) wurden die Zellen in 500  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert und im FACS analysiert. Als Vergleichskontrolle wurden Zellen ohne Inhibitor-Koinkubation mit dem gleichen Verfahren angefärbt und im FACS analysiert.

---

Annexin V–FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Mycophenolat	Novartis, Nürnberg

---

FACS (BD FACSCalibur)	Becton Dickinson, Heidelberg
-----------------------	------------------------------

---

## 6.6 Mikroskopische Untersuchungen

### 6.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

#### FITC Wachstumsassay

$1 \times 10^7$  Pilzzellen wurden in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und mit 0,1 mg FITC-Pulver für 15 min bei 37°C gefärbt. Anschließend folgten zwei Waschschriffe (3 min, RT, 10000 g) mit RPMI Medium + 5% FCS. Nach einer einstündigen Koinkubation mit Granulozyten (MOI = multiplicity of infection = 1) wurden die Zellen mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger zentrifugiert (10 min, RT, 150 g), für 15 min mit 3,7% Formaldehyd (in 1 x PBS) fixiert und mit 1 x PBS gewaschen. Die Präparate wurden nach dem Trocknen mit Einbettmedium (Fluoprep) und einem Deckgläschen für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet. Für jeden experimentellen Ansatz wurden ca. 100 zufällig gewählte Pilzzellen vermessen. Das Pilzwachstum während der Koinkubation (nicht fluoreszierender Teil

der Pilzzelle) wurde in Relation [%] zur Pilzgröße vor der Koinkubation (fluoreszierender Teil der Pilzzelle) quantifiziert. Dazu wurde die Axiovision Software und Messtechnologie von Zeiss verwendet.

$$\text{Pilzwachstum [\%]} = \frac{\text{fluoreszierender Abschnitt } (\mu\text{m})}{\text{nicht fluoreszierender Abschnitt } (\mu\text{m})} * 100$$

FITC-Pulver (Fluorescein 5(6)-isothiocyanat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
Fluoprep	bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
Zyotozentrifuge Shandon Cytospin 2	GMI, Minnesota, USA
Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1)	Carl Zeiss AG, Göttingen

### **Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskopie**

Untersuchungen zur Interaktion von PMN und Pilzen mit einem Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop wurden in Zusammenarbeit mit AG-Gunzer im Helmholtz Zentrum Braunschweig durchgeführt.

Dazu wurde ein Gemisch aus Immuneffektorzellen und Pilzen in eine Objektträger-Kammer gefüllt, so dass sich die PMN uneingeschränkt bewegen konnten. Ein automatisch angesteuertes Mikroskop machte mit der integrierten Kamera an festgelegten Stellen der Kammer zu definierten Zeiten Aufnahmen von der Interaktion. Die Aufnahmen eines bestimmten Bereichs wurden dann zu Filmen aneinandergereiht und verdeutlichten so das Verhalten von PMN in Gegenwart bestimmter Pilze im zweidimensionalen Bereich.

Die Objektträger-Kammer wurde aus einem herkömmlichen Objektträger und einem Deckgläschen mit Hilfe einer Wachs–Vaseline-(1/7)-Mischung zusammengesetzt.

$1 \times 10^7$  Pilzzellen wurden in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und mit 0,1 mg FITC-Pulver für 15 min bei 37°C gefärbt, wie unter Kap. 6.6.1 beschrieben.  $2,5 \times 10^6$  gefärbte Pilze wurden mit  $5 \times 10^5$  PMN in 100  $\mu\text{L}$  RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen, in eine Objektträger-Kammer gefüllt und mit der Wachs-Vaseline-Mischung verschlossen. Die Kammer wurde dann für 1-3 h bei 37°C mit einem

Weitfeld-Mikroskop mit 60 x Wasser-Objektiv und 10 x Okular untersucht. Alle 30 s wurde automatisch ein Foto mit der Kamera aufgenommen.

---

FITC-Pulver (Fluorescein 5(6)-isothiocyanat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Bienenwachs weiß	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
weiße Vaseline	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

---

wide-field Mikroskop (Olympus BX61)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Kamera (Olympus U-CMAD3)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

---

### Fluoreszenzmarkierungen von Koinkubationen

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wurde die Interaktion zwischen PMN und Pilzzellen genauer betrachtet. Dazu wurde FITC-Pulver zur Anfärbung der Pilzzellwand und DAPI zur Anfärbung der Nukleinsäuren verwendet. Mit Phalloidin-Alexa-Fluor-546 wurde das Zytoskelett der PMN markiert und mit DCF die ROI (reactive oxygen intermediate) Produktion nachgewiesen.

$1 \times 10^7$  Pilzzellen wurden in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und mit 0,1 mg FITC-Pulver für 15 min bei 37°C gefärbt, wie unter Kap. 6.6.1 beschrieben. Sollte die ROI Produktion untersucht werden, wurden PMN 30 min mit 2,5  $\mu$ M DCF vorinkubiert.  $1 \times 10^5$  Pilzzellen und PMN (MOI=1) wurden in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100  $\mu$ L des Gemisches mit einer Zytozentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert (10 min, RT, 150 g), gefolgt von einer Fixierung mit 3,7% Formaldehyd in 1 x PBS (15 min, RT). Anschließend wurde das Präparat zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die Nukleinsäuren mit DAPI (100 ng/mL in 1 x PBS 30 min, RT) und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-Fluor-546 (5 U/mL in 1 x PBS, 30min, RT) gefärbt. Die Präparate wurden nach einem letzten Waschschrift mit 1 x PBS getrocknet, mit Einbettmedium (Fluoprep) und einem Deckgläschen für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet und die Färbung mikroskopisch beurteilt.

---

FITC-Pulver (Fluorescein 5(6)-isothiocyanat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
DCF (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
DAPI	

(4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid)	Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidin-Alexa-Fluor-546	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoprep	bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 2	GMI, Minnesota, USA
Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1)	Carl Zeiss AG, Göttingen

### Fluoreszenzmarkierung mit einem spezifischem *A.fumigatus*-Antikörper

Mit Hilfe eines spezifischen *Aspergillus*-Antikörpers wurde die Interaktion zwischen PMN und Pilzzellen genauer untersucht.

$1 \times 10^5$  Pilzzellen und PMN (MOI=1) wurden in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100 µL des Gemisches mit einer Zytozentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert (10 min, RT, 150 g), gefolgt von einer Fixierung mit 3,7% Formaldehyd in 1 x PBS (15 min, RT). Nach dem Waschen in 1 x PBS wurde der Primärantikörper gegen *A. fumigatus* in einer Endkonzentration von 4 µg/mL in einem Blockierungs-Puffer für die Antikörperfärbung verdünnt und über Nacht bei 4°C mit den Präparaten inkubiert. Danach wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 5 µg/mL in einem Blockierungs-Puffer für Antikörperfärbung inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit DAPI (100 ng/mL, 30 min, RT) gefärbt. Die Präparate wurden nach einem letzten Waschschrift mit 1 x PBS getrocknet, mit Einbettmedium (Fluoprep) und einem Deckgläschen für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet und ihre Färbung mikroskopisch beurteilt.

Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
Aspergillus-Antikörper (IgG, Rabbit polyclonal)	Gene Tex, Eching
Sekundärantikörper (FITC Goat anti Rabbit)	Jackson Research, Suffolk, UK
DAPI	
(4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoprep	bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 2	GMI, Minnesota, USA

---

Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1)

Carl Zeiss AG, Göttingen

---

## 6.6.2 Transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen

Transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. G. Krohne der Universität Würzburg durchgeführt, um Aufschluss über das Phagozytoseverhalten der PMN zu erhalten.

In einer 24-Behältnisse-Zellkulturplatte wurde pro Behältnis ein rundes Deckgläschen platziert. Dann wurden die Deckgläschen mit je 700 µL RPMI Medium + 5% FCS und  $2,5 \times 10^6$  Pilzen und PMN (MOI=1) überschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Zellkulturplatte zentrifugiert (4 min, RT, 260 g), der Überstand verworfen und die Proben mit 3,7% Formaldehyd in 1 x PBS (30 min, RT) fixiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Platte mit 1 x PBS überschichtet und zur Weiterbearbeitung in das Institut für Elektronenmikroskopie (Würzburg) gebracht.

Dort wurden die Deckgläschen 1 h in 2% Osmiumtetroxid (in 0,05 M Cacodylat-Puffer) inkubiert, kurz in Aqua dest. gewaschen und über Nacht in 0,5% Uranylacetat eingelegt. Dann folgten mehrere Entwässerungsschritte und schließlich wurden die Deckgläschen mit einer Epon-Gelatinekapsel bestückt. Nach der Auspolymerisierung wurden Ultradünnschnitte der Proben hergestellt und diese schließlich mit 2% Uranylacetat und Reynolds Bleicitrat-Lösung kontrastiert. Die Schnitte wurden im Elektronenmikroskop ausgewertet.

---

RPMI 1640 Medium (1 x)

Biochrom AG, Berlin

FCS (FBS = Fetales Bovines Serum)

Biochrom AG, Berlin

Formaldehydlösung (37%)

Merck, Darmstadt

---

Elektronenmikroskop (Zeiss EM10)

Carl Zeiss AG, Göttingen

---

## 6.7 Proteinanalyse

### 6.7.1 ELISA

Bei der Interaktion von PMN mit Pilzzellen geht man davon aus, dass PMN Signale an die umgebenden Immuneffektorzellen aussenden, um sie an den Infektionsherd

zu locken. Für eine erste Abschätzung der Zytokinfreisetzung wurden TNF- $\alpha$ - und IL-12-p40-ELISA (= Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) mit Überständen von Koinkubationen durchgeführt.

Jeweils  $2 \times 10^6$  Pilzzellen und PMN (MOI = 1) wurden in 1,2 mL RPMI Medium + 5% FCS für 18 h koinkubiert. Die Überstände von diesen Koinkubationen wurden gesammelt (10 min, 10000 g, 4°C) und umgehend bei -80°C weggefroren.

Um die TNF- $\alpha$ - und IL-12-p40-Konzentration in den Überständen zu ermitteln, wurden Standard-ELISA-Assays nach Herstellerangaben durchgeführt.

---

Hu TNF- $\alpha$  Cytoset

Biosource/Invitrogen, Karlsruhe

Hu IL-12+p40 Cytoset

Biosource/Invitrogen, Karlsruhe

---

### 6.7.2 Luminex

Die Multiplex-Zytokinuntersuchung (Luminex-Technologie) wurde in Zusammenarbeit mit Prof. A.M. Waaga-Gasser von der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Mit der Luminex-Technologie konnte eine große Bandbreite an Zytokinen in einem geringen Überstandsvolumen aus Koinkubationen bestimmt werden.

Dazu wurden  $2 \times 10^6$  Pilzzellen und PMN (MOI = 1) in 1,2 mL RPMI Medium + 5% FCS für 18 h koinkubiert. Die Überstände von diesen Koinkubationen wurden gesammelt (10 min, 10000 g, 4°C) und umgehend bei -80°C weggefroren. Anschließend wurden die Überstände auf Zytokinfreisetzungen von TNF- $\alpha$ , IL-12p40, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 $\beta$  untersucht.

Dazu wurden die Kulturüberstände 1:5 mit sterilem 1 x PBS verdünnt und 50  $\mu$ L davon, entsprechend den Herstellerangaben, für die Untersuchung eingesetzt. Die vorhandenen Zytokine haben an spezifische, unterschiedlich farbige Beads gebunden. Biotinylierte Antikörper detektierten die spezifischen Analyte und wurden schließlich mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert. Die beladenen Beads wurden in einem Luminex 100 spezifisch detektiert und quantifiziert. Die erhaltenen Daten wurden mit der MasterPlex QT Software evaluiert.

Cytoset	Biosource/Invitrogen, Karlsruhe
Luminex 100	Luminex, Austin, USA
MasterPlex QT Software	MiraiBio Group, San Francisco, USA

### 6.7.3 Western Blot

#### Probenvorbereitung

Mit dem Western Blot wurde untersucht, ob auch auf Proteinebene unterschiedliche Regulierungsmechanismen bei PMN nachgewiesen werden können, je nachdem welche Pilzmorphologie bekämpft wird.

Frisch isolierte humane PMN ruhten unbehandelt für 30 min bei RT, um einen unphosphorylierten Grundzustand der Zellen hervorzurufen. Jeweils  $3 \times 10^6$  Pilzzellen und PMN (MOI = 1) wurden in 150  $\mu$ L RPMI Medium + 5% FCS für 20 min bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort für einige Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden die Proben abzentrifugiert (1 min, 4°C, 340 g) und in einer Mischung aus 100  $\mu$ L kaltem 1 x PBS und 90  $\mu$ L 2 x Stop-Mix auf Eis resuspendiert. Zuletzt wurden die Proben 5 min aufgeköcht. Die Proben wurden auf ein 12%iges Acrylamidgel geladen und zusammen mit einem Proteinmarker elektrophoretisch bei 20 mA aufgetrennt. Dann wurde das Gel in einer Blottingkammer mit 1 x Western Blot-Puffer bei 300 mA für 1 h auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Prestained Protein Marker (P77085)	New England BioLabs, Ipswich, UK
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrocellulose –Transfer-Membran	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel

#### Aktinabgleich

Für eine Proteinuntersuchung im Western Blot ist es wichtig, eine Ladekontrolle durchzuführen, um Gewissheit über identische Proteinmengen in den einzelnen Proben zu haben.



Für den Aktinabgleich als Ladekontrolle wurde die Nitrocellulose-Membran (siehe Kap. 6.7.3) 1 h bei RT in Blockier-Puffer mit 5% Magermilch inkubiert, um unspezifische Bindungen abzublocken. Für die Antikörperfärbung wurde die Membran in Blockier-Puffer in 5% Magermilch + 200 ng/mL (=1:1000) Aktin-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit TBS-Tween und schließlich eine einminütige Luminolfärbung. Zuletzt wurde die Membran für einige Minuten auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser dann in einer Entwicklermaschine entwickelt. Das Resultat des Aktinabgleichs wurde benutzt, um identische Proteinmengen bei der Untersuchung der ERK-Phosphorylierung einsetzen zu können.

---

Aktin-Antikörper + HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Luminolfärbung (Westernblotting Luminol Reagent, sc-2048)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

---

Film (x-Ray Film)	Fuji Medical, Düsseldorf
Entwicklermaschine (AGFA Curix 60)	Siemens AG, München

---

## ERK-Phosphorylierung

Da Voruntersuchungen Hinweise ergeben hatten, dass der ERK-Signalweg bei PMN besonders bei der Bekämpfung von *C.albicans*-Keimschläuchen induziert wird, wurde dies auch auf Proteinebene untersucht.

Für die Untersuchung der ERK-Phosphorylierung wurde die Nitrocellulose-Membran (siehe Kap. 6.7.3) 1 h bei RT in Blockierungs-Puffer mit 3% BSA (Bovines Serum Albumin) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzublocken. Die Membran wurde in Blockierungs-Puffer mit 1% BSA mit 0,5 µg/mL (= 1:1000) Anti-ERK-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Blockierungs-Puffer und die Färbung mit einem sekundären Antikörper. Dazu wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierungs-Puffer + 3 µg/mL (= 1:5000) Anti-Rabbit-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween folgte eine einminütige Luminolfärbung. Zuletzt wurde die Membran für einige Minuten auf einen Film gelegt und dieser dann in der Entwicklermaschine entwickelt.

---

BSA (Albumin Fraktion V)	Applichem, Darmstadt
Anti-ERK1&2 (MAPK), Kaninchen-Antikörper	Biomol GmbH, Hamburg
HRPO-anti Kaninchen-Antikörper	Dianova, Hamburg
Luminolfärbung (Westernblotting Luminol Reagent, sc-2048)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

---

Film (x Ray Film)	Fuji Medical, Düsseldorf
Entwicklermaschine (AGFA Curix 60)	Siemens AG, München

---

#### 6.7.4 Biotrockenmassebestimmung

Da unterschiedliche Effekte bei den PMN beobachtet wurden, je nachdem welcher Morphotyp des Pilzes eingesetzt wurde, war es wichtig auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf den größeren Proteinmengen der Keimschläuche basierten. Aus diesem Grund wurden Oxidative Burst-Messungen (siehe Kap. 6.8.1) nicht nur mit identischen Pilzzellzahlen, sondern auch mit identischen Biotrockenmassen durchgeführt.

Dazu wurden  $1 \times 10^7$  Pilzzellen in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS unter Vakuum auf einen Membranfilter, dessen Gewicht vorher exakt bestimmt wurde, gesogen. Als Kontrolle wurden Ansätze ausschließlich mit 1 mL RPMI Medium + 5% FCS durchgeführt. Jeder Ansatz wurde in Doppelbestimmung getestet. Die Filter wurden für ca. 12 h bei 50°C in einem Hybridisierungsofen getrocknet und im Anschluss nochmals gewogen. Aus der Differenz zwischen beladenem Filter und frischem Filter konnte unter Berücksichtigung der Kontrollen auf die exakte Biotrockenmasse von  $1 \times 10^7$  Pilzzellen geschlossen werden.

$$\text{Mittelwert der Masse}_{\text{Pilz}} - \text{Mittelwert der Masse}_{\text{Medium}} = \text{Biotrockenmasse}_{\text{Pilz}}$$

Die Untersuchung der Biotrockenmasse ergab, dass bei identischer Zellzahl eine Keimschlauchprobe ca. 120% der Biotrockenmasse einer Hefeprobe entspricht.

---

Membranfilter (Polyamid, 50 mm Durchmesser,  
0,2 µm Porengröße)

Schleicher & Schuell, Dassel

---

## 6.8 Konfrontationsuntersuchungen

### 6.8.1 Oxidativer Burst

Humane PMN haben unterschiedliche Möglichkeiten auf Mikroorganismen zu reagieren. Eine sehr effektive Methode ist die Produktion von Sauerstoffradikalen nach dem Kontakt mit Mikroorganismen. Bei der Messung des Oxidativen Bursts werden Sauerstoffradikale nachgewiesen, die von PMN während einer Aktivierung produziert werden. Die angewendete Messung basiert auf der Konvertierung von Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) durch Sauerstoffradikale in grün fluoreszierendes Dichlorfluorescein (DCF) [Radsak et al. 2004]. Das nichtionische und unpolare DCFH-DA kann die Zellmembran der Granulozyten überqueren und wird von intrazellulären Esterasen zu dem nichtfluoreszierenden DCFH deacetyliert. In Gegenwart von Sauerstoffradikalen wird DCFH dann zu stark fluoreszierendem DCF oxidiert [Wang & Joseph, 1999]. Die emittierte Fluoreszenz kann direkt proportional zur Konzentration der produzierten Sauerstoffradikale gesetzt werden.

$2 \times 10^5$  PMN wurden mit  $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Pilzzellen (oder mit 50 ng/mL PMA als positive Kontrolle) und 25  $\mu$ M DCF-DA in 100  $\mu$ L RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und in 96-Behältnisse-Platten gefüllt. Als negative Kontrolle wurden  $2 \times 10^5$  PMN mit 25  $\mu$ M DCF-DA in 100  $\mu$ L RPMI Medium + 5% FCS eingesetzt. Die Vermessung (Extinktion = 485 nm / Emission = 520 nm) erfolgte umgehend in einem Fluoreszenzmessgerät bei 37°C für 145 min. Gemessen wurden relative Fluoreszenzeinheiten (= RFU) in Fünf-Minuten-Intervallen. Die Nachweisgrenze des Messgerätes befand sich bei 70000 RFU. Jeder Ansatz wurde in Vierfachbestimmung vermessen.

---

Dichlorfluorescein Diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, Crailsheim
PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim

---

Fluoreszenzmessgerät (GENios)	Tecan, Crailsheim
-------------------------------	-------------------

---

### 6.8.2 Nachweis von extrazellulärer DNA (NETs) mit Sytox Green

Innerhalb der ersten 30 Minuten nach Aktivierung sollen humane PMN laut Brinkmann et al. 2004 extrazelluläre DNA, gemischt mit Histonen und lysosomalen Enzymen, NETs genannt, zur Abwehr von Mikroorganismen ausstoßen können. Zur Quantifizierung dieser NETs beschreibt Brinkmann einen fluorometrischen Nachweis. Bei dieser Methode werden extrazelluläre Nukleinsäurestrukturen mit Sytox Green markiert und mit Hilfe eines Fluorometers (485 nm Extinktion / 527 nm Emission) nachgewiesen.

Dazu wurden  $2 \times 10^5$  PMN und Pilzzellen in 100  $\mu$ m RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und in Gegenwart von 5  $\mu$ M Sytox Green inkubiert. Teils wurde 10 bis 50 ng/mL PMA als Stimulus zugegeben. Die Vermessung erfolgte in einem Fluoreszenzmessgerät mit entsprechenden Filtern bei 37°C in Fünf-Minuten-Intervallen über zwei Stunden. Jeder Ansatz wurde in Vierfachbestimmung vermessen.

---

Sytox Green	Invitrogen, Karlsruhe
PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	Sigma-Aldrich, Crailsheim

---

Fluoreszenzmessgerät (GENios)	Tecan, Crailsheim
-------------------------------	-------------------

---

### 6.8.3 Chemotaxis

Für die Bestimmung der chemotaktischen Aktivität der jeweiligen Pilzzellen für PMN wurde die Wanderung von fluoreszenz-markierten PMN durch die Membran eines Transwell-Systems zu den Pilzzellen hin bestimmt [nach der Vorgabe von Dürr et al., 2006]. Für die Fluoreszenzmarkierung der PMN wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS mit 3,3  $\mu$ M BCECF-AM für 30 min bei RT gefärbt, zweimal mit 1 x PBS gewaschen (2 min, 340 g, RT) und in 1 mL RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen. Die Transwell-Einsätze wurden mit 100  $\mu$ L der gefärbten PMN befüllt. Anschließend wurden sie in eine 24-Behältnisse-Platte gestellt, die mit jeweils 600  $\mu$ L RPMI Medium + 5% FCS mit oder ohne Pilzzellen ( $5 \times 10^5$ ) bzw. mit oder ohne f-MLP (1 ng/mL) als positive Kontrolle befüllt war. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Einsätze entfernt und die Fluoreszenz der Behältnisse wurde in einem

Fluoreszenzmessgerät (485 nm / 530 nm) bestimmt. Für jeden Ansatz mit Transwell-Membran wurde ein identischer Ansatz ohne Membran mitgeführt, der eine 100%ige Wanderung durch die Membran simulierte und als Referenz galt. Um die prozentuale PMN-Wanderung zu berechnen, wurde folgende Formel eingesetzt:

$$Wanderung (pro Ansatz)[\%] = \frac{Fluoreszenz\ mit\ Filter}{Fluoreszenz\ ohne\ Filter} * 100$$

---

BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)

-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester)

Invitrogen, Karlsruhe

f-MLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe)

Sigma-Aldrich, Crailsheim

---

Transwell-System

(3 µm Porengröße, Polyester, für 24-well Platten)

Costar/ Corning, NY, USA

Fluoreszenzmessgerät (GENios)

Tecan, Crailsheim

---

#### 6.8.4 Inaktivierungs-Experiment

Mittels eines Inaktivierungs-Experiments wurde untersucht, inwieweit Pilzzellen nach Kontakt mit humanen PMN Schaden nehmen bzw. noch im Stande sind, auf Nährmedium-Agar-Platten anzuwachsen. Dazu wurden Pilzverdünnungen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit humanen PMN und eventuell weiteren Zusätzen ausplattiert. Durch einen Vergleich mit Pilzverdünnungen ohne PMN-Zugabe wurde die Schädigungseffizienz von humanen PMN bestimmt.

Dazu wurden  $8 \times 10^4$  PMN und  $8 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  Pilzzellen ( $MOI = 1 - 2.5$ ) in 40 µL RPMI Medium + 5% FCS für bis zu drei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die PMN durch Zugabe von 2 mL kaltem Aqua demin. lysiert. Die Pilzsuspension wurde resuspendiert, mit 1 x PBS weiter verdünnt ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) und dreimal je 90 µl auf Sabouraud-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden 12-24 h bei 37°C inkubiert und dann ausgezählt.

#### 6.8.5 XTT-Experiment

Da die jeweiligen Morphologien der Pilze eventuell ein unterschiedliches Verhalten beim Aneinanderheften aufzeigen, was ein Problem bei den Inaktivierungs-

Experimenten (siehe Kap. 6.8.4) darstellen könnte, wurden zur Kontrolle auf Farbumschlag-basierende XTT-Experimente, wie bei Vonk et al. [2005] beschrieben, durchgeführt. Anders als beim Inaktivierungs-Experiment wird beim XTT-Experiment nur der Prozentsatz metabolisch aktiver Zellen nachgewiesen, unabhängig von der tatsächlichen Lebensfähigkeit des Pilzes. XTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, das durch mitochondriale Dehydrogenasen in Gegenwart von einem Elektronenakzeptor ( $Q_0 = 2,3\text{-Dimethoxy-5-methyl-p-benzochinon}$ ) in ein orangenes wasserlösliches Formazan-Produkt umgewandelt werden kann. Bei der Durchführung wurden Angaben aus Meshulam et al. [1995] und Gaviria & van Burik [1999] herangezogen. Die XTT-Lösung wurde jeweils frisch vor dem Experiment angesetzt. Dazu wurden 0,5 mg/mL XTT-Pulver in 1 x PBS bei 55°C für 30 min gelöst. Nach dem Abkühlen wurde 50 µg/mL  $Q_0$  hinzu gegeben.  $1 \times 10^6$  Pilzzellen und humane PMN (MOI = 1) wurden in 200 µL RPMI Medium + 5% FCS aufgenommen und 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die PMN durch Zugabe von 800 µL kaltem destilliertem Wasser (4°C) lysiert. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser (3000 g, 7 min, 2°C) wurden 150 µL XTT-Lösung zum Pellet gegeben, gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (3000 g, 7 min), 100 µL vom Überstand in eine 96-Behältnisse-Platte überführt und die Verfärbung bestimmt (Absorption = 450 nm).

Neben den Ansätzen, in denen Pilze und PMN enthalten waren ( $A_{450\text{fungi+PMN}}$ ), wurden auch Kontrollen mitgeführt, in denen nur PMN ( $A_{450\text{PMN}}$ ) oder nur Pilzzellen ( $A_{450\text{fungi}}$ ) vorlagen. Der prozentuale Pilzschaden wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Pilzschädigung [\%]} = \left( 1 - \frac{A_{450\text{nm fungi+PMN}} - A_{450\text{nm PMN}}}{A_{450\text{nm fungi}}} \right) * 100$$

---

2,3-bis-(2-,ethoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)

-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT)

Sigma-Aldrich, Crailsheim

PBS Dulbecco

Biochrom AG, Berlin

Coenzym Q

(2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone)

Sigma-Aldrich, Crailsheim

---

Fluoreszenzmessgerät (GENios)

Tecan, Crailsheim

---

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Die Morphologie von *Candida albicans* beeinflusst die Interaktion mit humanen Granulozyten

*Candida albicans* besiedelt als Komensale einen großen Teil der Weltbevölkerung, führt in den meisten Fällen allerdings zu keinen ernsthaften Krankheitsbildern, da der gesunde humane Organismus befähigt ist den Hefepilz effektiv unter Kontrolle zu halten. Seit langem ist bereits bekannt, dass beispielsweise humane Granulozyten *C. albicans*-Zellen effektiv abtöten können [Lehrer & Cline, 1969]. Diese Arbeit ergänzt den bestehenden Forschungsbestand, indem analysiert wurde, inwieweit die vorliegende Morphologie des Hefepilzes die eingesetzten Abtötungsmechanismen der Granulozyten zu variieren vermag. Um bei dieser vielschichtigen Fragestellung einen ersten Ansatzpunkt über die Interaktion der Immuneffektorzellen mit *C. albicans* zu erhalten, wurde mit einer detaillierten mikroskopischen Untersuchung von Koinkubationen begonnen. In Zusammenarbeit mit dem Helmholtzzentrum in Braunschweig bestand die Möglichkeit zu diesem Zweck die innovative Technik eines Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskops zu nutzen. Damit konnte auch über längere Zeiträume die Art und das Ausmaß des Verhaltens humaner Granulozyten in Gegenwart unterschiedlicher Pilzzellen verfolgt werden. Für die Untersuchungen im Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop wurden frisch isolierte humane Granulozyten mit lebenden Pilzzellen einer definierten Morphologie in eine Glaskammer gefüllt, bei 37°C mikroskopiert und in festgelegten Zeitabständen fotografiert. Im Anschluss wurden die Aufnahmen aneinander gereiht und als Filme im Zeitraffer ausgewertet. Somit entstand ein Einblick in das realistische Verhalten humaner PMN in Gegenwart von Pilzen bei 37°C über mehrere Stunden (siehe Kap. 6.6.1).

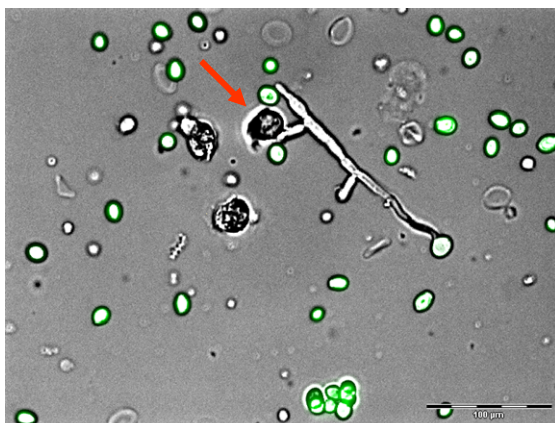
Diesen Filmen wurde entnommen, dass humane PMN unter den gegebenen Bedingungen keine gezielte Interaktion mit Hefezellen von *C. albicans* aufwiesen. Die geringe, dokumentierte Mobilität der Granulozyten war vergleichbar zu jener in den Kontrollansätzen ohne Pilzzugabe.

Ein gänzlich abweichendes Verhalten zeigten die Granulozyten hingegen in Gegenwart von kleinen Keimschläuchen von *C. albicans*. PMN schienen die Keimschläuche direkt anzusteuern und nahmen engen Kontakt zu den Pilzstrukturen

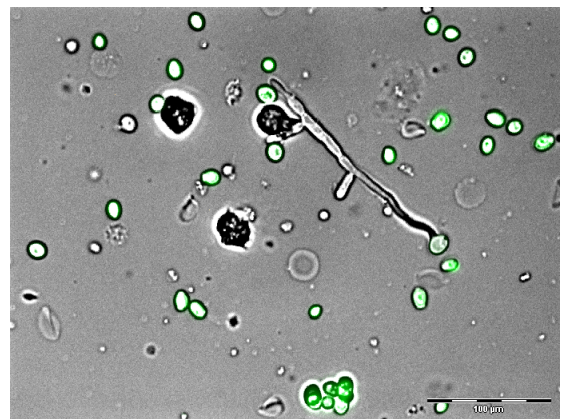
auf. Bei den eingesetzten Keimschläuchen handelte es sich zwar überwiegend um relativ kleine Filamente (siehe Abb. 6.1 B), allerdings waren die Pilzstrukturen bereits zu groß für eine Zellschädigung über eine klassische Phagozytose. Es entstand der Eindruck, dass die Granulozyten durch die dichte Kontaktaufnahme versuchten, die fehlende Möglichkeit der Phagozytose zu kompensieren (siehe Abb. 7.1). Wiederholt versammelten sich auch mehrere PMN um einen einzigen Keimschlauch und bedeckten diesen vollständig. Die dokumentierten drastischen Zellverformungen der Granulozyten (siehe Abb. 7.1 nach 33,5 min) führten in den untersuchten Zeiträumen allerdings nicht zu einem vorzeitigen Absterben der Immuneffektorzellen. Vielmehr verblieben diese sehr aktiv und hielten den engen Kontakt zu den filamentösen Pilzzellen aufrecht.

Somit wurde bereits mit Hilfe des beschriebenen mikroskopischen Verfahrens nachgewiesen, dass humane Granulozyten unter den untersuchten Bedingungen ein differenziertes Verhalten aufzeigten, je nachdem, welcher Morphotyp von *C. albicans* vorlag.

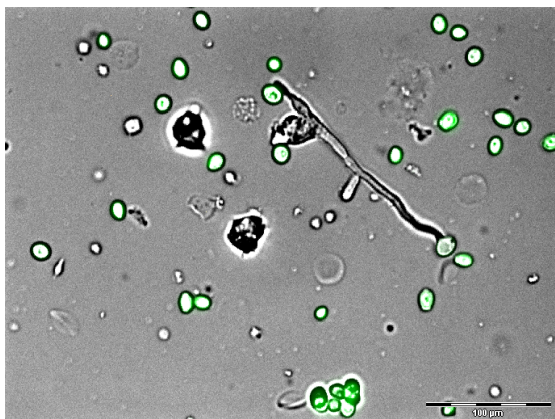
nach 10 min



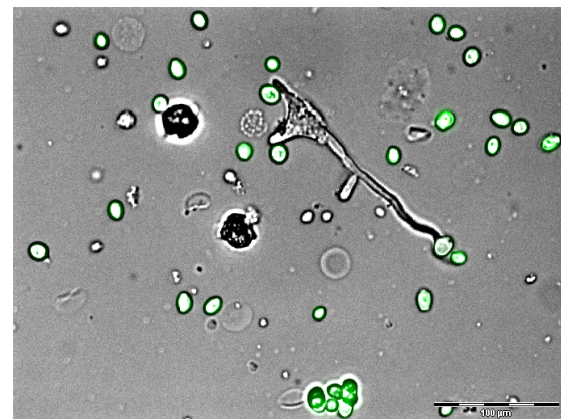
nach 16,5 min



nach 17 min

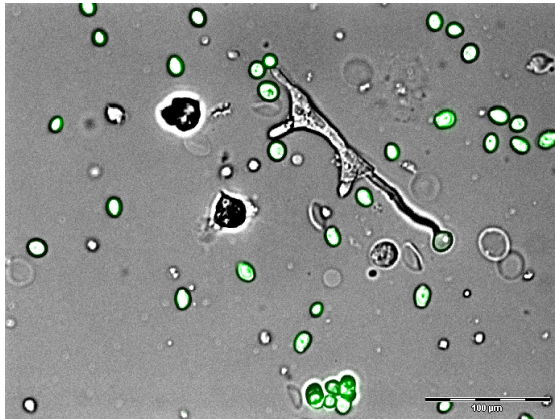


nach 17,5 min





nach 33,5min



nach 37 min

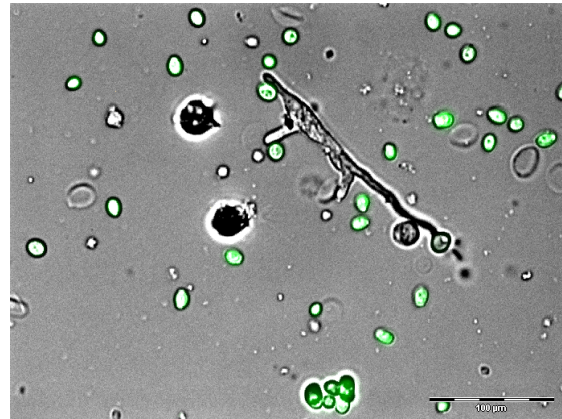


Abb. 7.1: Aufnahmen mit einem Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop von einer Koinkubation humaner Granulozyten (siehe roten Pfeil in Abb. nach 10 min) mit *C.albicans*-Hefezellen und einem etwas größeren Keimschlauch (grün, FITC gefärbt) bei 37°C nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Zur Bestätigung der beschriebenen Beobachtungen über die möglichen unterschiedlichen Interaktionsformen von humanen PMN mit *C. albicans* wurden mikroskopische Präparate mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (siehe Kap. 6.6.2) untersucht.

Dazu wurden einstündige Koinkubationen von frisch präparierten humanen Granulozyten mit frisch angezogenen Hefen oder Keimschläuchen von *C. albicans* betrachtet. Das bereits bekannte Verhalten, einer engen Kontaktaufnahme der PMN zu den Keimschläuchen von *C. albicans* konnte abermals dokumentiert werden (siehe Abb. 7.2 A). Zusätzlich wurde dabei erstmals auch eine detaillierte Darstellung von der engen Kontaktaufnahme besonders im Bereich des filamentösen Auswuchses des Pilzes erlangt.

Bei Koinkubationen von Granulozyten mit Hefezellen konnte erneut nur selten ein Kontakt zwischen dem Pilz und den PMN beobachtet werden, allerdings wurden vereinzelt Granulozyten detektiert, die Hefezellen bereits innerhalb der ersten Stunde einer Koinkubation phagozytiert hatten (siehe Abb. 7.2 B).

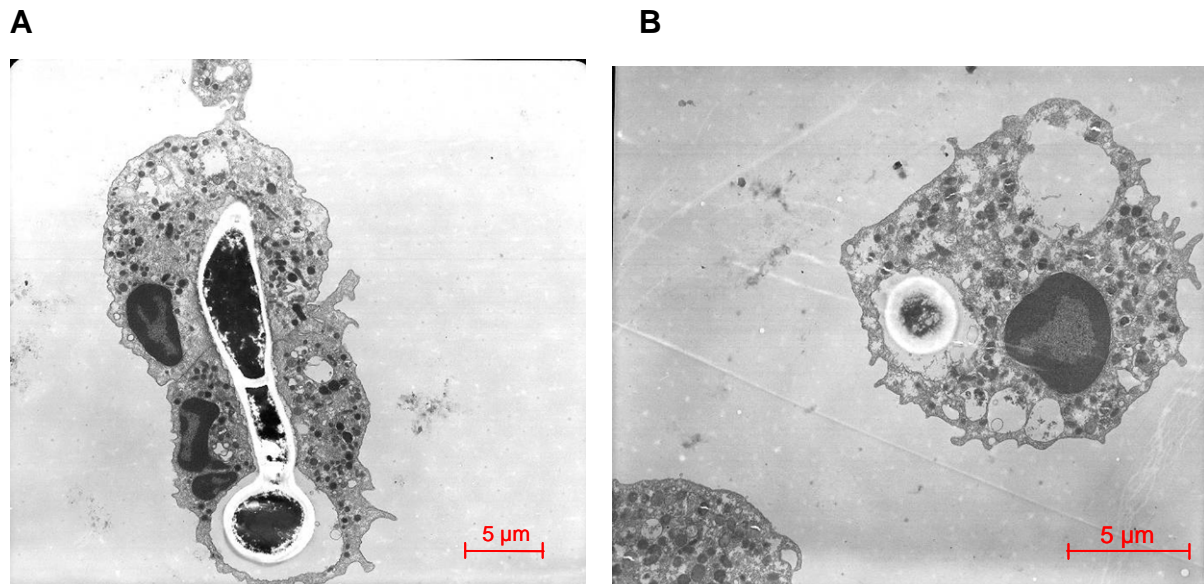


Abb. 7.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer Stunde Koinkubation humaner Granulozyten mit *C. albicans*-Zellen.

**A** zwei Granulozyten in engem Kontakt mit einem Keimschlauch. **B** Granulozyt mit phagozytierter Hefezelle.

Über fluoreszenzmikroskopische Färbungen von Koinkubationen (siehe Kap. 6.6.1) sollten konkretere Informationen über die intensive Interaktion zwischen humanen PMN und *C. albicans*-Keimschläuchen gewonnen werden. Dazu wurden humane PMN zunächst mit FITC gefärbten *C. albicans*-Zellen koinkubiert (1h, 37°C) und mikroskopische Präparate erstellt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren im Präparat mit DAPI (100 ng/mL) angefärbt und eine Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Erneut wurden Gruppierungen humaner Granulozyten um die Pilzfilamente nachgewiesen (siehe Abb. 7.3 A). Allerdings konnte bei diesen Präparaten zusätzlich eindrucksvoll gezeigt werden, dass nach einer Stunde Koinkubation bereits vereinzelt Schädigungen der Pilzzellen durch PMN auftraten. Die Granulozyten standen in engem Kontakt zu den Pilzstrukturen und schienen die Pilzzellwand aufzulösen (siehe Abb. 7.3 B).

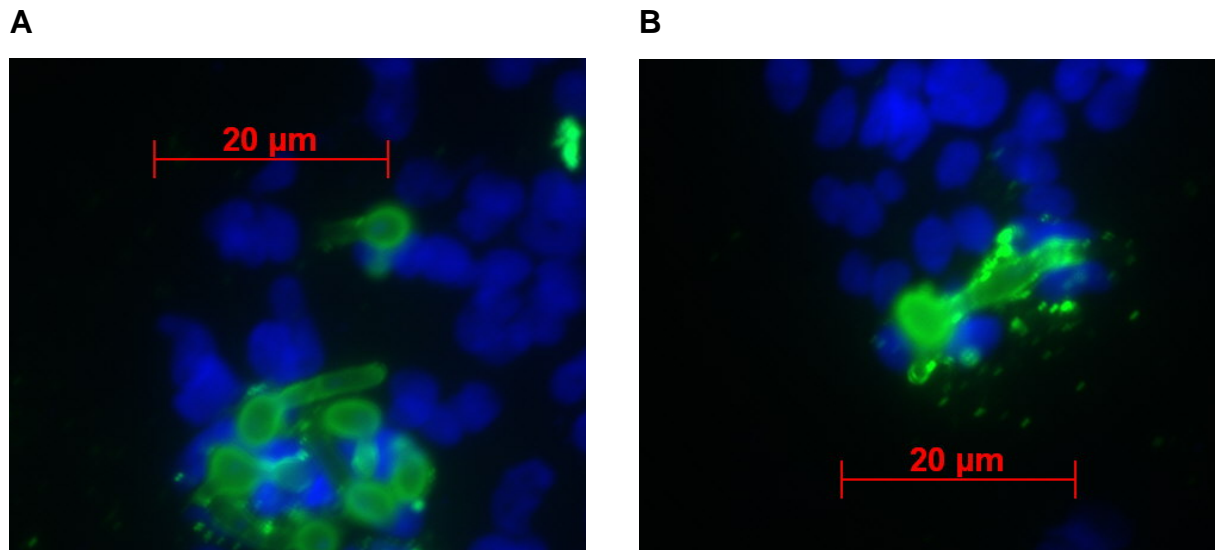


Abb. 7.3: Zerstörung der Zellstruktur von FITC gefärbten *C. albicans*-Keimschläuchen (grün) durch frische humane Granulozyten nach einer Stunde Koinkubation (DAPI gefärbte Zellkerne von Neutrophilen; in blau). **A** Hefen und Keimschläuche mit PMN. **B** ein Keimschlauch mit PMN.

Somit konnte mit Hilfe mikroskopischer Nachweismethoden ein erster Eindruck von den Interaktionsformen humaner Granulozyten mit *C. albicans* erlangt werden. Es wurde gezeigt, dass humane Granulozyten mit Keimschläuchen, allerdings nicht mit Hefezellen von *C. albicans*, sehr rasch einen intensiven Zellkontakt aufnehmen.

## 7.2 Keimschläuche induzieren in humanen Granulozyten eine zielgerichtete Mobilität

Nachdem in unterschiedlichen mikroskopischen Präparaten (siehe Kap. 7.1) ein differenziertes Verhalten humaner PMN gegenüber Keimschläuchen und Hefen nachgewiesen wurde, wurde nach den auslösenden Faktoren dafür gesucht. Mit Transwell-Experimenten (siehe Kap. 6.8.3) wurden Untersuchungen zur chemotaktischen Anziehung der beiden Morphotypen auf humane PMN durchgeführt. Humane PMN mit einem Zelldurchmesser von etwa 15 µm durchqueren den Filter des Transwell-Systems mit einer Porengröße von 3 µm nur dann aktiv, wenn sie chemotaktisch wirkende Signale, beispielsweise von Pilzzellen unterhalb des Filters, empfangen. Mit diesem experimentellen Ansatz wurde nach einer Stunde bei 37°C festgestellt, dass in den negativen Kontrollen ohne

zugewetzten chemotaktischen Stimulus, in denen die ungerichtete Beweglichkeit untersucht wurde, 13 +/- 3% der PMN durch den Filter gelangt sind (siehe Abb. 7.4). In den Proben, in denen *C. albicans*-Keimschläuche vorhanden waren, sind 66 +/- 19% der PMN durch den Filter gewandert, was einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zur negativen Kontrolle darstellt. In den Proben mit Hefezellen konnte lediglich eine Wanderung von 19 +/- 8% der PMN und somit kein signifikanter Unterschied zur ungerichteten Beweglichkeit nachgewiesen werden.

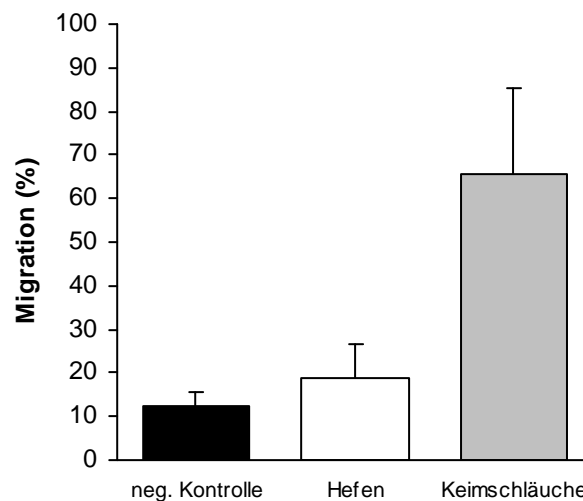


Abb. 7.4: Chemotaktisches Verhalten von  $5 \times 10^5$  PMN in Anwesenheit von Medium (neg. Kontrolle), von jeweils  $5 \times 10^5$  *C. albicans*-Hefen bzw.-Keimschläuchen. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die im Vergleich zu Hefezellen nachgewiesene, signifikant stärkere chemotaktische Anziehung der humanen PMN durch *C. albicans*-Keimschläuche wurde mit nachfolgenden Untersuchungen näher charakterisiert. Zur Kontrolle, inwieweit die geringere chemotaktische Wirkung der Hefen in Zusammenhang mit ihrer geringeren Biotrockenmasse (siehe Kap. 6.7.4) stand, wurden Chemotaxis-Transwell-Experimente mit einer großen Menge an Hefezellen (MOI = 4) durchgeführt. Dabei konnte durch die Gegenwart der Hefen erstmals eine nachweisbare chemotaktische Wirkung auf die Granulozyten festgestellt werden. Durch die große Anzahl an Hefen (MOI = 4) wurden 37 +/- 5% der PMN angelockt. Damit wurde gezeigt, dass humane Granulozyten auf eine Erhöhung der Hefenzahl signifikant reagierten, wodurch auf chemotaktische Signale ausgehend von Hefen geschlossen werden konnte.

Allerdings blieb die chemotaktische Wirkung der großen Anzahl von Hefezellen (MOI = 4) niedriger als jene von Keimschläuchen bei einer MOI von eins. Da die Biotrockenmasse der Keimschläuche aber nur in etwa das 1,2-fache der Hefen ausmachte (siehe Kap. 6.7.4), konnte es sich bei der stärkeren chemotaktischen Wirkung der Keimschläuche folglich nicht ausschließlich um einen Masseneffekt handeln. Keimschläuche von *C. albicans* schienen somit eine stärkere chemotaktische Wirkung auf humane PMN auszuüben als Hefen.

Die beobachteten Effekte konnten auch in Zusammenhang mit Spezifitäten der Anzuchtbedingungen (über Temperaturunterschiede) für die jeweiligen Pilzmorphologien (siehe Kap. 6.2) stehen. Um den Effekt der jeweiligen Anzuchtbedingungen auf die chemotaktische Wirkung der unterschiedlichen Pilzmorphologien beurteilen zu können, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurden Chemotaxis-Transwellexperimente (siehe Kap. 6.8.3) mit Hefen und Keimschläuchen durchgeführt, die über pH-Unterschiede generiert wurden. Des Weiteren wurden aber auch Hefen und Keimschläuche eingesetzt, die über Temperaturunterschiede erzeugt wurden und für kurze Zeit mit humanem Serum des jeweiligen PMN-Spenders markiert wurden (siehe Abb. 7.5). Die Auswertung dieser Kontrollexperimente zeigte, dass die stärkere chemotaktische Wirkung der Keimschläuche auch bei Anzucht durch pH-Unterschiede nachweisbar war und somit die jeweiligen Anzuchtbedingungen als Ursache hierfür ausgeschlossen werden konnten. Durch die stärkere chemotaktische Wirkung der Keimschläuche auch bei den opsonisierten Pilzzellen wurde zusätzlich gezeigt, dass selbst ein vorhandenes, aktives Komplementsystem keine Änderung der bisher beobachteten Unterschiede in der chemotaktischen Wirkung der jeweiligen Pilzmorphologien bewirkte.

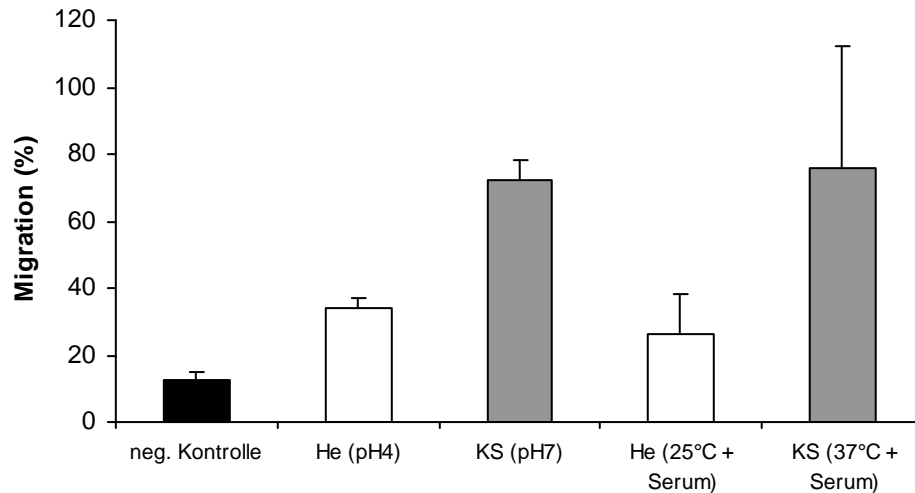


Abb. 7.5: Chemotaktische Migration von humanen PMN in Richtung unterschiedlich generierter *C. albicans*-Keimschläuche und -Hefen. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

pH4 = Medium 199 bei pH4, pH7 = Medium 199 bei pH7, 25°C + Serum = RPMI Medium + 5% FCS bei 25°C, (anschließend 20 min Opsonisierung mit 50% humanem Serum), 37°C + Serum = RPMI Medium + 5% FCS bei 37°C, (anschließend 20 min Opsonisierung mit humanem Serum), KS = *C. albicans*-Keimschläuche, He = *C. albicans*-Hefen.

Mit den durchgeführten Kontrollexperimenten konnten die bisherigen Beobachtungen uneingeschränkt bestätigt werden. Der Unterschied in der chemotaktischen Wirkung von Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* auf humane Granulozyten beruhte somit vermutlich auf Spezifitäten der Pilzmorphologien.

Die gezielte Mobilität der PMN in Richtung der Keimschläuche wurde detaillierter analysiert, indem nach weiteren Einfluss-nehmenden Signalen gesucht wurde. Die autokrine Zytokrinproduktion von Granulozyten wurde an Überständen von PMN-Koinkubationen mit den jeweiligen Pilzzellen untersucht. Durch Zytokinmessungen wurde die Einflussnahme ausgewählter Zytokine auf die umgebenden PMN analysiert. Da PMN als erste Immuneffektorzellen vor Ort gelten, sollte in diesem Zusammenhang zusätzlich herausgefunden werden, ob aktivierte PMN über ihre Zytokinausschüttung Einfluss auf andere Immuneffektorzellen nehmen. Dazu wurden PMN entweder mit Hefen bzw. Keimschläuchen oder mit Medium als negative Kontrolle inkubiert (18 h bei 37°C). Im Anschluss wurden die Überstände im ELISA (siehe Kap. 6.7.1) und mit der Luminex-Methode (siehe Kap. 6.7.2) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass humane PMN unabhängig von der Morphologie des

Pilzes auf *C. albicans* grundsätzlich nur mit einer schwachen Zytokinproduktion reagierten. Der überwiegende Teil der untersuchten Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 und IL-1 $\beta$  war selbst bei Pilzzugabe kaum nachweisbar. Allerdings wurde die Produktion des stark chemotaktisch wirkenden Zytokins IL-8, die bei der negativen Kontrolle bei 8,8 +/- 2,8 pg/mL lag, durch Pilzkontakt signifikant hoch geregelt. In Gegenwart von Hefen produzierten PMN 190 +/- 26 pg/mL und in Gegenwart von Keimschläuchen 581 +/- 145 pg/mL IL-8 (siehe Abb. 7.6). Diese Untersuchung hat gezeigt, dass humane Granulozyten auf beide Morphologien von *C. albicans* mit einer starken IL-8 Produktion reagierten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die IL-8 Produktion von humanen PMN als Reaktion auf *C. albicans*-Keimschläuche lag in etwa dreimal höher im Vergleich zur Reaktion auf Hefen. Dieses Resultat weist selbst im Hinblick auf die etwas höhere Biotrockenmasse (1,2 fach) der Keimschläuche (siehe Kap. 6.7.4) auf eine Pilzmorphologie-abhängige Regulation der Zytokinproduktion bei humanen PMN hin.

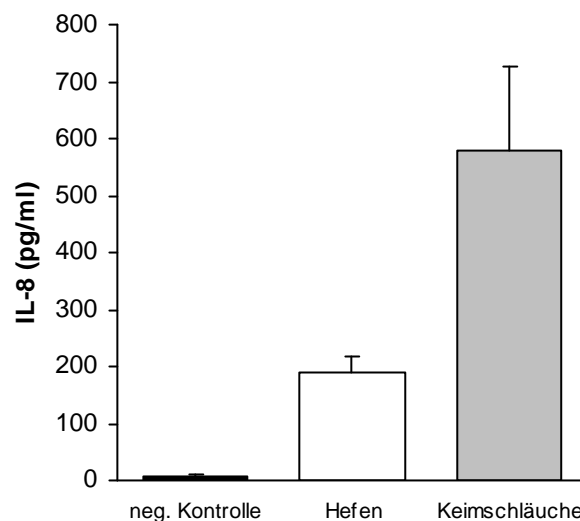


Abb. 7.6: Interleukin-8-Produktion von humanen PMN nach 18 h Koinkubation mit *C. albicans* (MOI = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. neg. Kontrolle = Medium (RPMI + 5% FCS).

Somit konnte anhand der durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass *C. albicans*-Keimschläuche eine messbare chemotaktische Wirkung auf Granulozyten ausüben, wogegen ein solcher Effekt bei Hefen in vergleichbarem Ausmaß nicht nachweisbar war. Dabei wird der chemotaktische Effekt der Keimschläuche

zusätzlich durch eine primär Keimschlauch-induzierte autologe Produktion des chemotaktisch wirkenden Zytokins IL-8 in den humanen PMN verstärkt. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass das mikroskopisch beobachtbare, deutlich abweichende Verhalten der Granulozyten gegenüber Keimschläuchen und Hefen von *C. albicans* (siehe Kap. 7.1) zumindest zum Teil auf dieser unterschiedlichen Chemotaxis beruht.

### **7.3 Sowohl Keimschläuche als auch Hefen von *Candida albicans* werden durch PMN beeinflusst und geschädigt**

Anhand der bisher beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass humane PMN in ihrem Verhalten zwischen Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* zu differenzieren vermögen. Mit weiteren Untersuchungen, die sich auf die Beeinflussung und Schädigung der jeweiligen Pilzmorphologien durch humane PMN fokussierten, wurde der Zusammenhang zwischen dem differenzierten Verhalten und der Effizienz in der Bekämpfung der jeweiligen Pilzmorphologien betrachtet.

In einem ersten Ansatz wurde die metabolische Aktivität von *C. albicans* nach zwei Stunden in RPMI-Medium mit 5% FCS bei 37°C bestimmt. Dazu wurde eine XTT-Untersuchung (siehe Kap. 6.8.5) angewendet, bei der ein Tetrazoliumsalz von mitochondrialen Dehydrogenasen des Pilzes in Gegenwart von einem Elektronenakzeptor in ein optisch nachweisbares Formazan-Produkt umgewandelt wird. Der Einfluss von PMN auf die Stoffwechselaktivität der Pilzzellen wurde erfasst, indem Granulozyten mit Keimschläuchen oder Hefen koinkubiert und im Anschluss lysiert wurden. Die Resultate der XTT-Umwandlung von Pilzzellen mit und ohne PMN wurden in Verhältnis zueinander gesetzt, so dass eine Aussage über die veränderte Stoffwechselaktivität der Pilzzellen, bewirkt durch das Vorhandensein von humanen Granulozyten, getroffen werden konnte. Mit dieser Methode wurde durch die Gegenwart von Granulozyten ein nachweisbarer Rückgang der Stoffwechselaktivität



sowohl bei *C. albicans*-Hefen als auch Keimschläuchen festgestellt. Eine Koinkubation von zwei Stunden bewirkte einen starken Rückgang der Stoffwechselaktivität, so dass eine Schädigung bei Hefen im Bereich von 59 +/- 12% und bei Keimschläuchen im Bereich von 58 +/- 27% beobachtbar war. Somit wurde eine nachweisbare Sensitivität des Pilzes gegenüber humanen Granulozyten im Bezug auf die Stoffwechselaktivität dokumentiert.

Diese Daten ließen darauf schließen, dass beide Morphotypen von *C. albicans* in ähnlichem Ausmaß sensibel auf Granulozyten reagierten, obwohl humane PMN den jeweiligen Morphotypen des Pilzes gegenüber unterschiedliche Verhaltensweisen aufzeigten.

Es ist bekannt, dass insbesondere der Vorgang des Auskeimens und Wachsens des Pilzes einen wichtigen Virulenzfaktor bei *C. albicans* darstellt [Calderone & Fonzi, 2001]. Daher wurde mit Wachstumsinhibierungs-Experimenten (siehe Kap. 6.6.1) der Einfluss der PMN auf das Pilzwachstum analysiert. Dafür wurden FITC gefärbte Hefen und Keimschläuche gemeinsam für eine Stunde bei 37°C mit Granulozyten (MOI=1) koinkubiert. In mikroskopischen Präparaten wurde von mindestens 100 Pilzzellen die ursprüngliche Größe (FITC gefärbt) vermessen und diese mit dem nachgewachsenen Zellabschnitt (ungefärbter Teil) (siehe Abb. 7.7) in Korrelation gesetzt.

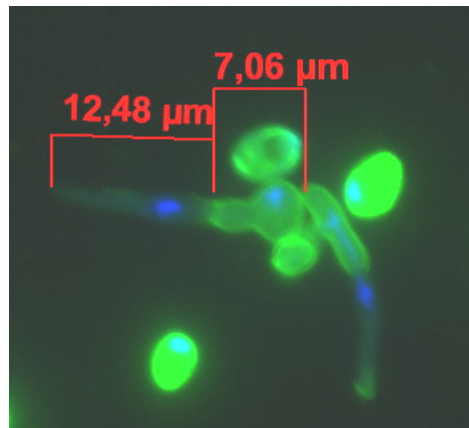


Abb. 7.7: Wachstum von FITC gefärbten *C. albicans*-Zellen (grün) ohne PMN-Zugabe, nach einer Stunde bei 37°C. leuchtend grün: Pilzlänge zum Zeitpunkt der Färbung. blassgrün: Pilzwachstum nach Färbung.

Die verwendete mikroskopische Messmethode ergab, dass *C. albicans*-Zellen nach einer Stunde bei 37°C ein Wachstum von 99 +/- 17% aufzeigten und sich somit im Schnitt in ihrer Größe verdoppelten. Dieses Wachstum äußerte sich in einem Auskeimen fast aller Hefezellen und einer starken Längenzunahme der Keimschläuche. Wurden allerdings PMN zugegeben, war ein signifikant eingeschränktes Wachstum zu beobachten. Es konnte nur noch ein Zellwachstum von 23 +/- 5% detektiert werden. Dabei wurden die Hefen überwiegend in ihrem morphologischen Zustand arretiert und die Keimschläuche zeigten nur geringe Längenzunahmen.

Mit diesen mikroskopischen Untersuchungen konnte somit veranschaulicht werden, dass beide Morphotypen von *C. albicans* auch in ihrem Wachstumsverhalten auf die Gegenwart von humanen Granulozyten reagierten.

Mit Hilfe der bisher beschriebenen Experimente wurde belegt, dass humane Granulozyten einerseits ein differenziertes Verhaltensmuster gegenüber den jeweiligen Morphologien von *C. albicans* aufzeigten, andererseits jedoch sowohl auf Hefen als auch auf Keimschläuche einen inhibierenden Einfluss ausüben konnten.

Hierauf wurde in Konfrontationsexperimenten mit anschließenden Ausplattierungen untersucht, inwieweit sich diese Einflussnahme auf eine Pilzschädigung, die ein Anwachsen auf Vollmedium verhindert, auswirkte. Dazu wurden humane PMN für 90-210 Minuten mit den jeweiligen Morphotypen von *C. albicans* bei 37°C koinkubiert. Verdünnungsreihen wurden auf Sabourou-Agar-Platten ausgestrichen, bei 37°C bebrütet und nach etwa 18 h die angewachsenen Pilzkolonien ausgezählt (siehe Kap. 6.8.4). Dabei wurde festgestellt, dass die maximale Schädigungseffizienz sowohl für Hefen als auch für Keimschläuche nach 3 bis 4 h erreicht war. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass nach einer dreieinhalb-stündigen Koinkubation nur noch 47 +/- 7% der Hefezellen und 47 +/- 13% der Keimschläuche lebensfähig, d.h. zur Koloniebildung in der Lage waren (siehe Abb. 7.8). Somit bestand ein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung von *C. albicans* mit und ohne PMN-Zugabe.

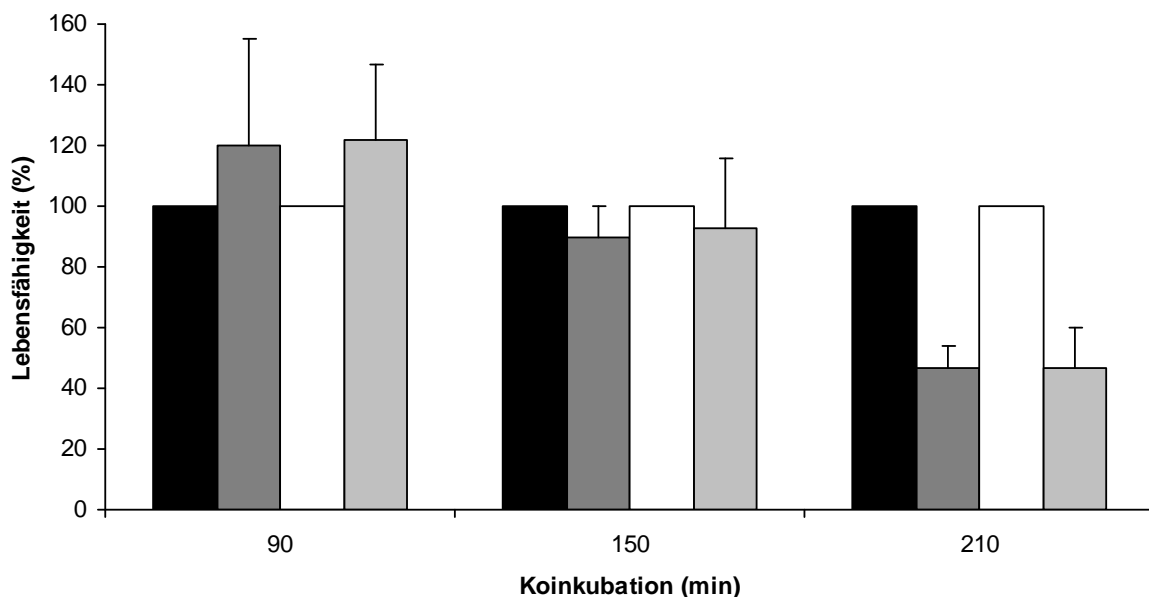


Abb. 7.8: Schädigungseffizienz von humanen Granulozyten gegenüber Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* nach unterschiedlichen Zeiten der Koinkubation (MOI=1). Schwarze Balken = *C. albicans*-Hefen. Dunkelgraue Balken = *C. albicans*-Hefen mit Granulozyten. Weiße Balken = *C. albicans*-Keimschläuche. Hellgraue Balken = *C. albicans*-Keimschläuche mit Granulozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen.

Dieses Experiment zur Schädigungseffizienz ergab, dass humane Granulozyten trotz unterschiedlicher Verhaltensweisen nicht nur beide Morphotypen von *C. albicans* im Hinblick auf das Wachstum oder die Stoffwechselaktivität beeinflussen konnten, sondern diese auch gleichermaßen effektiv soweit schädigten, dass sie nicht mehr auf Nähragar anwachsen konnten.

#### **7.4 Eine auf Aktin-Umorganisation basierende Mobilität ist entscheidend für die Bekämpfung von *Candida albicans*-Keimschläuchen**

Mit den Aufnahmen des Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskops (siehe Abb. 6.6.1) wurde ersichtlich, dass die gezielte Mobilität ein entscheidender Faktor bei der Abwehr gegen Keimschläuche von *C. albicans* sein muss.

Um die Bedeutung der Granulozyten-Mobilität auf die bereits nachgewiesene Wachstumsinhibierung des Pilzes (siehe Kap. 7.3) weiter zu bestätigen, wurden Experimente mit Modulatoren des Zytoskeletts durchgeführt. Dafür wurde Koinkubationen beispielsweise Colchicin (10 µg/mL) zugesetzt, welches die Depolymerisation von Mikrotubuli fördert. Allerdings konnte mit Colchicin die Wachstumsinhibierung von *C. albicans* durch PMN nicht nachweisbar beeinflusst werden, was auf keine größere Bedeutung der Mikrotubuli bei dieser Funktion der Granulozyten hindeutete.

Nachfolgend wurden Wachstumsinhibierungsexperimente mit Cytochalasin D (10 µg/mL), welches die Aktinpolymerisierung inhibiert, durchgeführt. Zuvor wurde allerdings in detaillierten Voruntersuchungen überprüft, ob die gewählte Konzentration von Cytochalasin D nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen führte. Die gewählte Inhibitorkonzentration erwies sich durch Beobachtungen im Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop als geeignet, um die PMN-Beweglichkeit auf ein Minimum zu reduzieren, diese aber dennoch vital zu belassen. Es wurden Apoptose/Nekrose-Untersuchungen mit einer FACS-Analyse (siehe Kap. 6.5.2) durchgeführt um auszuschließen, dass die eingesetzte Inhibitorkonzentration zu einer Schädigung der PMN führte. Eine dreistündige Koinkubation von 10 µg/mL Cytochalasin D mit humanen PMN zeigte keinen Effekt auf die Nekrose. Es wurde jedoch eine geringe Erhöhung der Apoptose von 17 +/-5% auf 34 +/-3% durch die Gegenwart von

Cytochalasin D festgestellt. In weiteren Kontrollen erwies sich die gewählte Inhibitorkonzentration auch für das Wachstumsverhalten von *C. albicans* als unbedenklich.

Nach Abschluss aller Kontrollen wurde untersucht, inwieweit die Zugabe von Cytochalasin D den wachstumsinhibierenden Effekt der Granulozyten auf *C. albicans* beeinflusste. Dabei wurde gezeigt, dass humane PMN durch die Arretierung des Aktin-Zytoskeletts signifikant ihre Fähigkeit der Wachstumsinhibierung bei *C. albicans* verloren (siehe Abb. 7.9). Bei Koinkubationen in Gegenwart von 10 µg/mL Cytochalasin D zeigten *C. albicans*-Zellen ein Wachstum vergleichbar zur negativen Kontrolle, in der sich keine Granulozyten befanden.

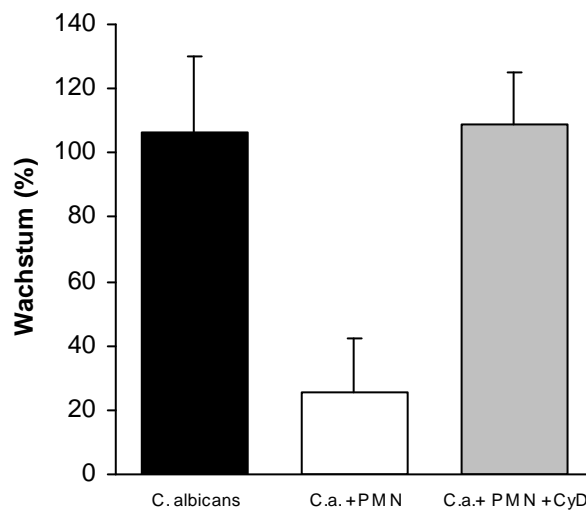


Abb. 7.9: Wachstum von FITC gefärbten *C. albicans*-Zellen nach einer Stunde bei 37°C ohne Zusätze (schwarzer Balken), mit PMN (MOI=1) (weißer Balken) und mit PMN sowie 10 µg/mL Cytochalasin D (grauer Balken). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Resultate der Untersuchungen mit Cytochalasin D bestärkten die Bedeutung der PMN-Beweglichkeit bei der *C. albicans*-Abwehr und hoben des Weiteren die Relevanz des Aktin-Zytoskeletts bei der wachstumsinhibierenden Wirkung der PMN hervor.

In weiteren Untersuchungen wurde anschließend durch die Zugabe von 10 µg/mL Cytochalasin D zu Koinkubationen untersucht, inwieweit die Mobilität der PMN an der Abtötung bzw. grundlegenden Schädigungen (siehe Kap. 6.8.4) von *C. albicans*-Hefen und -Keimschläuchen beteiligt war.

Eine Zugabe von 10 µg/mL Cytochalasin D zu Koinkubationen von Granulozyten mit Hefezellen führte zu keinem signifikanten Effekt bei der Schädigungseffizienz (siehe Abb. 7.10). Das Experiment wurde mit 100 µg/mL Cytochalasin D identisch wiederholt, um auszuschließen, dass der fehlende Einfluss von Cytochalasin D auf die Hefenschädigung auf eine zu niedrige Konzentration des Inhibitors zurückzuführen war. Allerdings wurde auch bei höheren Konzentrationen durch die Inhibierung der PMN-Mobilität kein nachweisbarer Effekt auf die Hefenschädigung erzielt.

Bei Koinkubationen von humanen Granulozyten mit Keimschläuchen in Gegenwart von Cytochalasin D zeigte sich hingegen, dass die Mobilität der PMN für die Bekämpfung der Keimschläuche von signifikanter Bedeutung ist. Die Zugabe des Inhibitors Cytochalasin D (10 µg/mL) führte zu einer vollständigen Neutralisierung (siehe Abb. 7.10) der Schädigungseffizienz der PMN gegenüber den Keimschläuchen.

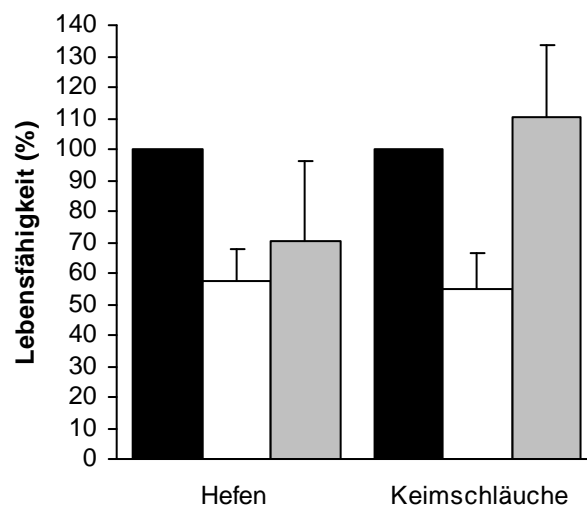


Abb. 7.10: Schädigungseffizienz von humanen Granulozyten nach dreieinhalb Stunden Koinkubation (MOI=1). Schwarze Balken = *C. albicans* ohne PMN. Weiße Balken = *C. albicans* mit PMN. Hellgraue Balken = *C. albicans* mit PMN und 10 µg/mL Cytochalasin D. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Resultate der durchgeführten Experimente mit Cytochalasin D waren übereinstimmend mit den geschilderten Beobachtungen der Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskopie (siehe Kap. 7.1). Somit konnte mit den bisherigen Untersuchungen gezeigt werden, dass humane PMN für die Bekämpfung von *C.albicans*-Keimschläuchen eine gezielte und intensive Beweglichkeit einsetzten und dass diese

Beweglichkeit überwiegend vom Aktin-Zytoskelett abhing. Für die Bekämpfung der Hefen allerdings schienen humane Granulozyten keiner gesteigerten Mobilität zu bedürfen und die Inhibierung des Aktin-Zytoskeletts hatte keinen Einfluss auf die Schädigungseffizienz gegenüber den Hefezellen.

### **7.5 Die Erkennung und Abtötung von Keimschläuchen wird über die MEK/ERK-MAP-Kinase-Kaskade vermittelt**

Die soweit durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass humane Granulozyten bei ihrer Abwehrstrategie gegen Keimschläuche von *C. albicans* eine gerichtete Mobilität einsetzen. Wie in Kap. 7.2 bereits beschrieben, schien das chemotaktische Potential der Keimschläuche von *Candida albicans* einen wichtigen Stimulus für diese zielgerichtete Mobilität humaner PMN bei der Interaktion mit Pilzfilamenten darzustellen. Um nun herauszufinden, welche Signalkaskaden der Granulozyten beim Auslösen ihrer gerichteten Mobilität auf die Keimschläuche von Bedeutung sind, wurden Chemotaxis-Experimente (siehe Kap. 6.8.3) in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitoren durchgeführt (siehe Tab. 7.1).

Bevor die Inhibitoren in den Chemotaxis-Experimenten getestet wurden, wurden sie in den eingesetzten Konzentrationen in Vorexperimenten auf einen wachstumsinhibierenden Effekt für *C. albicans* untersucht. Allerdings wurde dabei festgestellt, dass alle Inhibitoren bis auf den ERK-Inhibitor, der eine geringe Wachstumsinhibierung bewirkte, in dieser Hinsicht keine signifikante Wirkung zeigten.

Tab. 7.1: Chemotaktische Migration von humanen PMN, verursacht durch *C. albicans*-Keimschläuche, in Gegenwart unterschiedlicher MAP-Kinase-Inhibitoren. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

$p < 0,05$  = hoch signifikant im T-Test. n.s. = nicht signifikant im T-Test, KS = *C. albicans*-Keimschläuche

Probe	Funktion	Mittelwert migrierter Zellen +/- SD (%)	p-Wert, Vergleich zu C.a.-KS
C.a.-KS	positive Kontrolle	53 +/- 10	
Medium	negative Kontrolle	25 +/- 10	$p < 0,05$
KS + SB20219 2 $\mu$ M	p38 MAPK Inhibierung	46 +/- 6	n.s.
KS + SP600125 2 $\mu$ M	JNK1/2 Kinase Inhibierung	67 +/- 20	n.s.
KS + ERK-Inh. 25 $\mu$ M	ERK1/2 Inhibierung	28 +/- 11	$p < 0,05$
KS + U0126 2 $\mu$ M	MEK1/2 Inhibierung	28 +/- 13	$p < 0,05$
KS + Genistin 10 $\mu$ M	Tyrosinkinasen Inhibierung	24 +/- 6	$p < 0,05$

Als die jeweiligen Inhibitoren in Chemotaxis-Transwell-Experimenten (siehe Kap. 6.8.3) eingesetzt wurden, konnten Unterschiede bei der Beeinflussung der chemotaktischen Wanderung von PMN beobachtet werden. So blieb die Zugabe des Inhibitors für die p38 MAPK und des Inhibitors für die JNK 1/2 Kinasen ohne signifikanten Effekt bei der chemotaktischen Reaktion der PMN auf die Keimschläuche.

Allerdings wurde in Gegenwart von Inhibitoren für Zielproteine der MEK/ERK-Signalkaskade ein signifikant verringertes Migrationsverhalten der Granulozyten auf Keimschläuche beobachtet. Die Mobilität der Granulozyten war vergleichbar zur negativen Kontrolle und entsprach somit einer willkürlichen Beweglichkeit.

So wurde gezeigt, dass Inhibitoren der MEK/ERK-Signalkaskade zu einer annähernd vollständigen Blockierung der Mobilität humaner Granulozyten, ausgelöst durch chemotaktische Reize von *C.albicans* -Keimschläuchen, führen konnten.

Der Inhibitor U0126, der zu Inhibierung der MEK1/2-Kinasen eingesetzt wurde, zeigte einen starken Effekt in den Transmigrationsversuchen. In Wachstumskontrollen schien er den Pilz allerdings nicht zu beeinflussen. Daher wurden mit U0126



Konfrontationsexperimente (siehe Kap. 6.8.4) durchgeführt und somit die Bedeutung der MEK1/2-Kinasen von Granulozyten bei der Schädigung von *C. albicans*-Hefen und -Keimschläuchen beurteilt. Dazu wurden Experimente mit U0126 in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Bei der Festlegung der Konzentration wurden Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt und zusätzlich Verdünnungsreihen in Chemotaxis-Experimenten (siehe Kap. 6.8.3) zur Kontrolle herangezogen.

Die Zugabe des Inhibitors U0126 zu Koinkubationen zeigte keine signifikante Einflussnahme auf die Schädigung von *C. albicans*-Hefen durch Granulozyten. Allerdings führte eine Inhibierung der MEK1/2-Kinasen durch U0126 zu einem signifikanten Effekt bei der Schädigung von *C. albicans*-Keimschläuchen (siehe Abb. 7.11). Der Inhibitor bewirkte eine fast vollständige Aufhebung der zytotoxischen Wirkung der PMN auf die Keimschläuche.

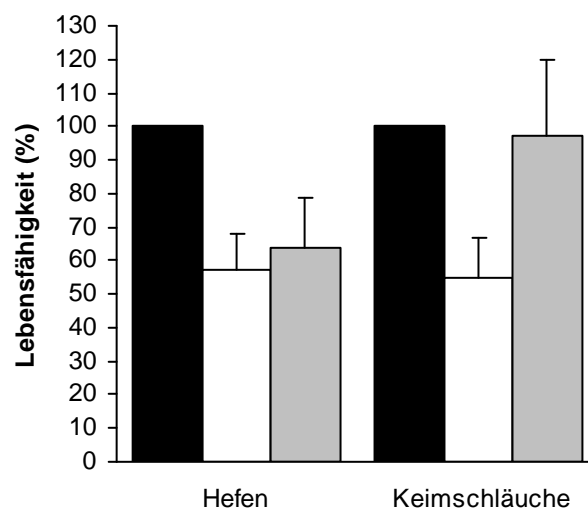


Abb. 7.11: Schädigungseffizienz von humanen Granulozyten nach dreieinhalb Stunden Koinkubation (MOI=1). Schwarze Balken = *C. albicans* ohne PMN. Weiße Balken = *C. albicans* mit PMN. Hellgraue Balken = *C. albicans* mit PMN und 2  $\mu\text{M}$  U0126. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Sowohl durchgeführte Chemotaxis- (siehe Kap. 6.8.3) als auch Konfrontationsexperimente (siehe Kap. 6.8.4) deuteten auf einen starken Einfluss der MEK/ERK-Kaskade bei der PMN-Bekämpfung der *C. albicans*-Keimschläuche hin. Allerdings schien diese Kaskade bei humanen Granulozyten keinen nachweisbaren Beitrag zur Bekämpfung der Hefen von *C. albicans* zu leisten. Um diesen grundlegenden Unterschied bei der Granulozyten-Abwehr gegen die beiden

Morphotypen von *C. albicans* zu untermauern, wurde zusätzlich ein Nachweis auf Proteinebene herangezogen.

Mit Western Blots (siehe Kap. 6.7.3) wurde die Aktivierung von ERK1/2 bei humanen PMN in Gegenwart von Hefen, Keimschläuchen und reinem Medium (als negative Kontrolle) untersucht. Dazu wurden humane PMN mit Hefen oder Keimschläuchen (MOI=1) für 15 Minuten koinkubiert. Die eingesetzten Proteinmengen der einzelnen Ansätze wurden über einen Aktinabgleich in einem Western Blot (siehe Kap. 6.7.3) abgeglichen. Schließlich wurde der Nachweis der Phosphorylierung von ERK1/2 bei humanen PMN mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in einem nachfolgenden Western Blot durchgeführt.

In Kontrollansätzen, in denen nur Pilze enthalten waren, wurde vorab untersucht, ob die verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktivität zu den Pilzproteinen aufwiesen. Als eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden konnte, wurden Proteinproben von unterschiedlichen PMN Koinkubationen analysiert.

Die Auswertung der Western Blot-Untersuchungen zeigte, dass in den Ansätzen ohne Pilzzugabe (1.Tasche in Abb. 7.12) und jenen mit Hefen (2.Tasche in Abb. 7.12) nur ein geringes Maß an ERK1/2 Aktivierung bei humanen PMN nachweisbar war. Wurden die PMN hingegen mit *C. albicans*-Keimschläuchen (3.Tasche in Abb. 7.12) koinkubiert, wurde eine starke Aktivierung von ERK1/2 detektiert.

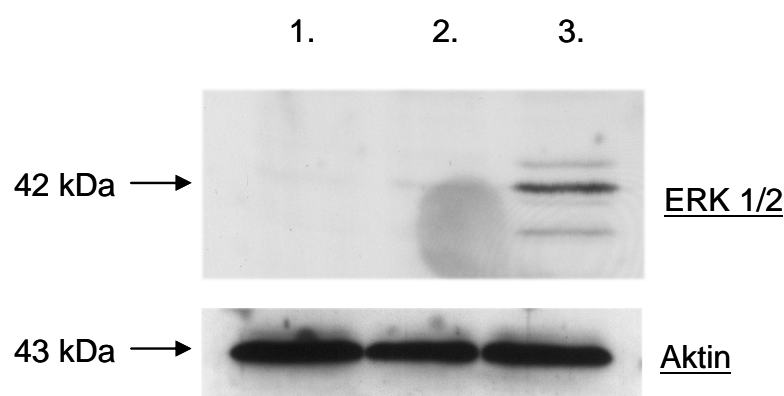


Abb. 7.12: Western-Blots zur Ermittlung der ERK1/2-Phosphorylierung bei humanen PMN: 15 Minuten Koinkubationen (MOI = 1) mit *C. albicans*-Wildtyp-Pilzzellen, die über Temperaturunterschiede generiert wurden. 1.Tasche = PMN ohne Pilze. 2.Tasche = PMN mit Hefen. 3.Tasche = PMN mit Keimschläuchen. Das vorliegende Resultat konnte mit mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Der deutliche Unterschied in der Banden-Stärke der ERK1/2-Phosphorylierung wurde im Western Blot in Gegenwart von Hefen und Keimschläuchen, die über Temperaturunterschiede generiert wurden (siehe Kap. 6.2), nachgewiesen. Für eine Abschätzung der Relevanz verwendeter Anzuchtbedingungen des Pilzes für die unterschiedliche Aktivierung humaner PMN wurden die Experimente mit Pilzen, die über pH-Unterschiede angezogen wurden (siehe Kap. 6.2), wiederholt (siehe Abb.7.13).

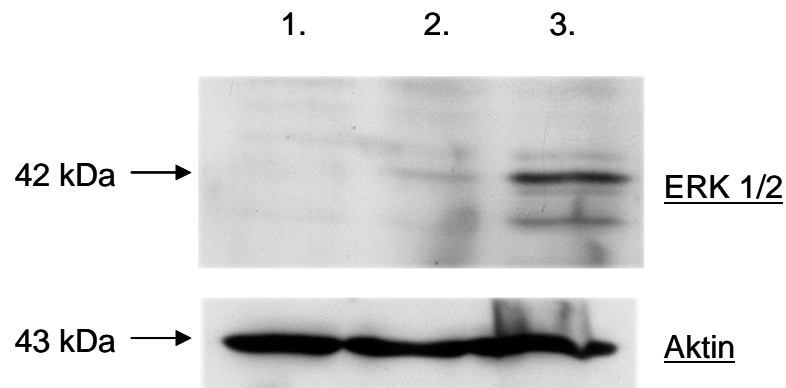


Abb. 7.13: Western-Blots zur Ermittlung der ERK1/2-Phosphorylierung bei humanen PMN: 15 Minuten Koinkubationen (MOI = 1) mit Wildtyp-Pilzzellen, die über pH-Unterschiede generiert wurden. 1.Tasche = PMN ohne Pilze. 2.Tasche = PMN mit Hefen. 3.Tasche = PMN mit Keimschläuchen. Das vorliegende Resultat konnte mit mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Erneut wurde im Vergleich zur negativen Kontrolle eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 bei humanen PMN, ausgelöst durch die Gegenwart von Keimschläuchen, nachgewiesen. Hefen hingegen bewirkten bei humanen PMN lediglich eine geringe Aktivierung von ERK1/2, vergleichbar mit der negativen Kontrolle.

Damit wurde mit Hilfe der durchgeführten Kontrollen die Bedeutung der MEK/ERK-Signalkaskade bei der Abwehr gegen Keimschläuche von *C. albicans* abermals belegt.

Die bisher erhobenen Daten deuten an, dass die MEK/ERK-Signalkaskade eine große Bedeutung bei der Aktivierung von humanen PMN in der Abwehr gegen *C. albicans* haben könnte. Allerdings lies sich der Einbezug dieser Kaskade bisher ausschließlich bei der Abwehr gegen Keimschläuche nachweisen. In der Abwehrleistung gegenüber Hefen konnte dagegen kein Hinweis auf eine Bedeutung der MEK/ERK-Signalkaskade gefunden werden.

Untersuchungen an Deletions-Mutanten des Pilzes sollten nachfolgend die Relevanz einer bestimmten Pilzmorphologie für die Aktivierung humaner Granulozyten über die MEK/ERK-Signalkaskade stützen. Bei den verwendeten Deletions-Mutanten handelte es sich um *C. albicans*-Stämme, die entweder nur als Hefen oder nur als Keimschläuche wachsen konnten, unabhängig von den eingesetzten Kultivierungsbedingungen.

Die Mutanten von *C. albicans*  $\Delta chp1/efg1$  und  $\Delta ras1$ , die beide nur in Hefeform wachsen konnten, lösten wie auch schon die Wildtyp-Hefen, bei einer Koinkubation mit humanen PMN eine kaum nachweisbare Phosphorylierung von ERK1/2 (siehe Kap. 6.7.3) aus. Dabei schienen die unterschiedlichen verwendeten Kultivierungsbedingungen (4h bei 30°C in M199 pH4 oder pH7 bzw. 2,5 h in RPMI Medium + 5% FCS bei 22°C oder 37°C) für die Generierung der Hefen hierbei nicht von Relevanz (siehe Abb. 7.14) zu sein.

Mit der  $\Delta tup$ -Mutante, die ausschließlich in filamentöser Form wachsen konnte, wurde ebenso die Phosphorylierung von ERK1/2 bei humanen PMN im Western-Blot untersucht. Erstaunlicherweise konnte mit der Keimschlauch-Mutante, anders als mit den Filamenten vom *C. albicans*-Wildtyp-Stamm (siehe Abb. 7.13), keine Phosphorylierung von ERK1/2 bei humanen Granulozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 7.14).

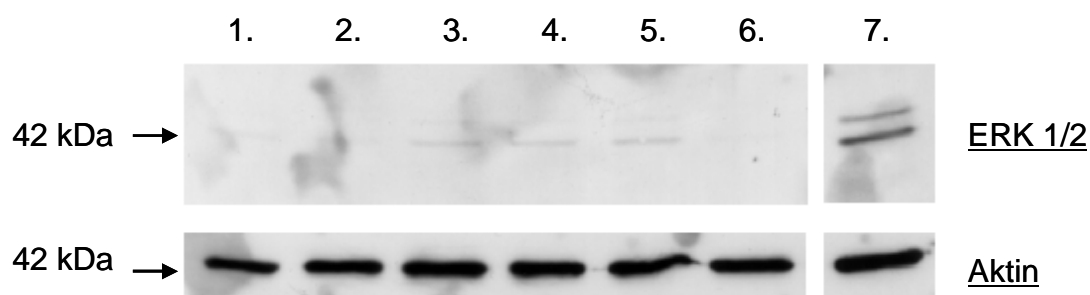


Abb. 7.14: Western-Blots zur Ermittlung der ERK1/2-Phosphorylierung bei humanen PMN: 15 Minuten Koinkubationen (MOI = 1) mit Mutanten-Pilzzellen, die über pH-Unterschiede generiert wurden. 1. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta tup$ -Pilzzellen (in Hefe-induzierendem pH4 Medium angezogen). 2. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta tup$ -Pilzzellen (in Filament-induzierendem pH7 Medium angezogen). 3. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta ras$ -Pilzzellen (pH4). 4. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta ras$ -Pilzzellen (pH7). 5. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta chp1/efg1$ -Pilzzellen (pH4). 6. Tasche = PMN mit *C. albicans*- $\Delta chp1/efg1$ -Pilzzellen (pH7). 7. Tasche = PMN mit *C. albicans*-Wildtyp-Pilzzellen SC5314 (pH7). Das vorliegende Resultat konnte in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Die Untersuchung von humanen PMN nach Kontakt zu den Mutanten von *C. albicans* zeigte im Western Blot erneut, dass eine Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade für die PMN-Abwehr gegen Hefen von *C. albicans* nicht zwingend notwendig ist. Allerdings schien diese Kaskade auch für die Abwehr gegen die hier eingesetzte filamentöse Mutante von *C. albicans* nicht von Bedeutung zu sein, was sich bei den Wildtyp-Filamenten anders dargestellt hatte.

Mit mikroskopischen Untersuchungen sollte das unstimulierende Resultat der fehlenden ERK1/2-Aktivierung von humanen PMN in Gegenwart der Keimschlauch-Mutanten von *C. albicans* näher betrachtet werden.

Dazu wurden Koinkubationen aller drei bisher verwendeten *C. albicans*-Mutanten mit humanen PMN bei einer MOI von 1 (1h, 37°C) durchgeführt. Mit dem Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop (siehe Kap. 6.6.1) wurden im Anschluss Einzelaufnahmen von den Koinkubationen gemacht. Dabei wurde festgestellt, dass humane Granulozyten zu beiden Hefe-Mutanten, wie auch schon bei den Hefen vom *C. albicans*-Wildtyp-Stamm beobachtet (siehe Kap. 7.1), keinen engen Kontakt suchten (siehe Abb. 7.15 A). Ein identisches Verhalten wie bei den Hefen wurde allerdings auch für die Keimschlauch-Mutante dokumentiert (siehe Abb. 7.15 B). Somit konnte, anders als bei den Keimschläuchen vom *C. albicans*-Wildtyp-Stamm (siehe Abb. 7.15 C), kein enges Umfließen der Granulozyten um die Filamente beobachtet werden. Folglich musste von bedeutenden Unterschieden zwischen den Keimschläuchen vom *C. albicans*-Wildtyp-Stamm und der  $\Delta tup1$ -Mutante ausgegangen werden.

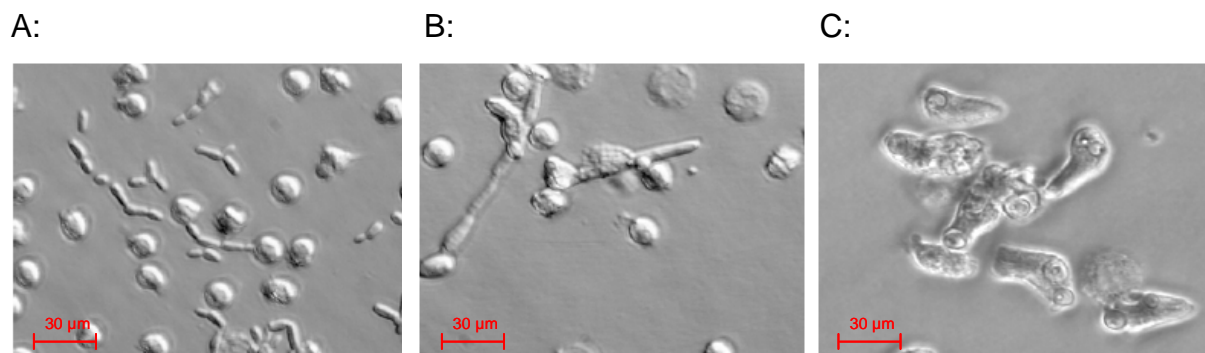


Abb. 7.15: Aufnahmen einer Koinkubation (1h, bei 37°C) von humanen Granulozyten mit *C.albicans*-Zellen (bei 37°C angezogen). A: humane PMN mit  $\Delta chp1/efg1$ -Zellen. B: humane PMN mit  $\Delta tup1$ -Zellen. C: humane PMN mit Wildtyp-Keimschläuchen.

## **7.6 Unterschiedliche Effektormechanismen von humanen PMN bei der Abwehr gegen *Candida albicans***

Die bisher durchgeführten Untersuchungen haben eröffnet, dass humane Granulozyten ein spezifisches Verhaltensmuster für die Abwehr gegen Hefen und Keimschläuche von *C. albicans* aufzeigten. Auch bei der Aktivierung der Granulozyten schien die Morphologie des Pilzes die relevanten Stoffwechselwege festzulegen.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Verhaltensweisen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass humane PMN beide Morphotypen in gleichem Ausmaß eindämmen und schädigen konnten. Nachfolgende Abschnitte befassen sich daher mit der Bedeutung von üblicherweise als relevant betrachteten Abwehrmechanismen humaner PMN bei der Bekämpfung von *C. albicans*-Hefen im Vergleich zu -Keimschläuchen.

### **7.6.1 NET-Bildung trägt nicht nachweisbar zur Schädigung von *Candida albicans* bei**

Bei mikroskopischen Auswertungen von Koinkubationen humaner Granulozyten mit *C. albicans*-Zellen wurden vereinzelt auffällige Nukleinsäurestrukturen beobachtet. In Fluoreszenzpräparaten (siehe Kap. 6.6.1) von einstündigen Koinkubationen konnten fädige Nukleinsäurestrukturen angelagert an die Pilzzellen nachgewiesen werden. Diese fädigen DNA-Strukturen waren teils mit bereits geschädigten Pilzstrukturen assoziiert (siehe Abb. 7.16).

Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei diesen voraussichtlich extrazellulären DNA-Strukturen um die erst kürzlich entdeckten NETs (= neutrophil extracellular traps, von Brinkmann et al., 2004) handelte, die als eine effektive Abwehrstrategie gegen *C. albicans* bei neutrophilen Granulozyten beschrieben sind.

Der Versuch einer Quantifizierung dieser DNA-Fäden im experimentellen Ansatz blieb allerdings ergebnislos, da aufgrund des seltenen Auftretens eine mikroskopische Abschätzung nicht möglich war.

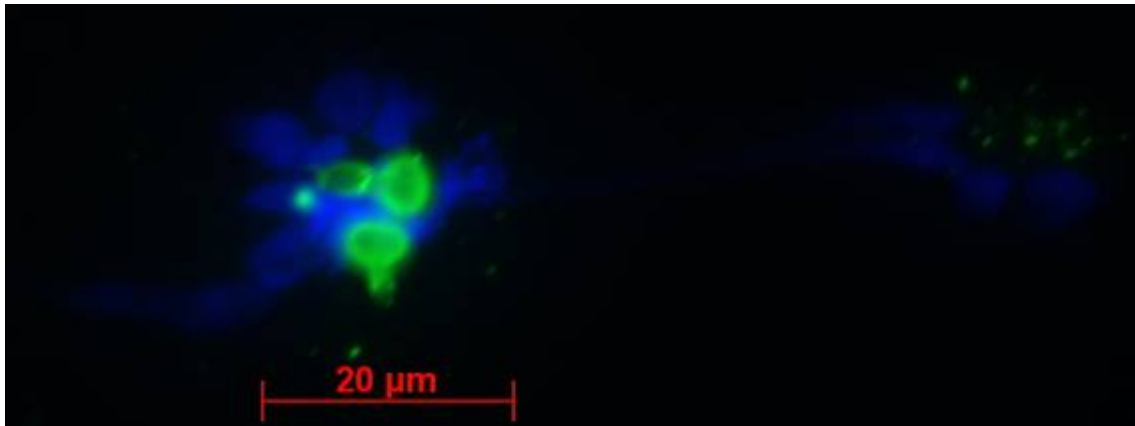


Abb. 7.16: fädige DNA-Strukturen von humanen PMN in Gegenwart von *C. albicans*-Keimschläuchen (FITC-gefärbt) nach einer Stunde Koinkubation. Blau: DAPI-gefärbte Nukleinsäuren. Grün: FITC-gefärbte *C. albicans*-Keimschläuche und Bruchstücke der Pilzzellwand.

Der Versuch, die NET-Bildung in einem fluorometrischen Nachweisverfahren bei dem extrazelluläre Nukleinsäurestrukturen mit Sytox Green markiert werden, wie bei Brinkmann et al. 2004 beschrieben, zu quantifizieren, blieb ebenso erfolglos.

Da es mit zwei unterschiedlichen Nachweisverfahren nicht möglich war, die NET-Bildung zu quantifizieren, wurde angenommen, dass es unter den Bedingungen in den durchgeführten experimentellen Ansätzen eher selten zur Bildung extrazellulärer DNA kam.

Um auszuschließen, dass diese Annahme ausschließlich auf dem Scheitern der Anwendung zweier Nachweismethoden basierte, wurde versucht die Funktionalität von eventuell gebildeten NETs durch Zugabe von DNase zu beeinflussen und dies nachzuweisen.

In Wachstumsinhibierungsuntersuchungen (siehe Kap. 6.6.1) wurde der Einfluss von NETs auf das Pilzwachstum durch Zugabe von 100 U/mL DNase (von Brinkmann et al. 2004 empfohlene Konzentration) zu Koinkubationen untersucht. Dabei wurde allerdings festgestellt, dass die Zugabe von DNase keinen Einfluss auf die Inhibierung des Pilzwachstums durch die PMN zeigte. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch Zugabe von DNase zu Koinkubationen ein Unterschied in der verringerten Stoffwechselaktivität von *C. albicans*-Keimschläuchen (siehe Kap. 6.8.5) festgestellt werden konnte. Abermals konnte jedoch keine Einflussnahme durch die Zugabe von DNase beobachtet werden.

Somit konnte auch bei der Untersuchung der Funktionalität von NETs bei der Abwehr humaner Granulozyten gegen *C. albicans*-Zellen keine nachweisbare Relevanz festgestellt werden. Diese Untersuchungsergebnisse harmonieren mit den bisherigen Resultaten, bei denen keine eindeutige Quantifizierung der NETs vorgenommen werden konnte. Zusätzlich ist aus den Resultaten erneut zu schließen, dass bei den gewählten experimentellen Bedingungen die NET-Bildung bei humanen PMN als Abwehrstrategie gegen *C. albicans* nur selten eingesetzt wurde.

### **7.6.2 Humane Granulozyten produzieren Sauerstoffradikale in Gegenwart des Pilzes**

#### **Die Sauerstoffradikalproduktion wird von der Morphologie des Pilzes beeinflusst**

Die Erzeugung von Sauerstoffradikalen (Oxidativer bzw. Respiratorischer Burst genannt) ist im Allgemeinen eine sehr effektive Abwehrstrategie von humanen Granulozyten bei der Bekämpfung von Mikroorganismen. Die produzierten, reaktiven Sauerstoffprodukte (ROI = reactive oxygen intermediates) können mit einer fluorometrischen Messmethode durch die Umsetzung von Dichloro-Difluorescein-Diazetat in das fluoreszierende Dichloro-Difluorescein nachgewiesen werden (siehe Kap. 6.8.1).

Um zu untersuchen, ob Granulozyten über die Oxidative Burst-Reaktion zwischen Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* differenzieren, wurden ROI-Messungen bei Koinkubationen durchgeführt. Die ROI-Produktion humaner Granulozyten wurde jeweils in Gegenwart identischer Zellzahlen beider Morphotypen von *C. albicans* gemessen. Dabei fiel die Reaktion auf Keimschläuche signifikant stärker aus als auf Hefen, die nur einen relativ schwachen Oxidativen Burst bewirkten.

Es kann angenommen werden, dass bei Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten vorliegen. Daher wurde dieser Einfluss auf die unterschiedliche Bildung von Sauerstoffradikalen bei humanen PMN durch Abtötung der Pilze untersucht. Dazu wurden beide Pilzmorphologien für 15 Minuten mit 70% Ethanol, bzw. für 5 min mit 3,7% Formaldehyd abgetötet, mehrmals mit Medium gewaschen und erneut ausgezählt. Die vollständige Inaktivierung der Pilze



wurde durch Ausplattierungen auf Nährmedien überprüft. Bei der Detektion der ROI-Produktion humaner PMN in Gegenwart der inaktiven Pilzzellen erwiesen sich die Keimschläuche erneut als stärkere Induktoren (siehe Abb. 7.17). Damit konnte die Vitalität des Pilzes als entscheidender Faktor für die differenzierte Oxidative Burst-Reaktion humaner PMN ausgeschlossen werden.

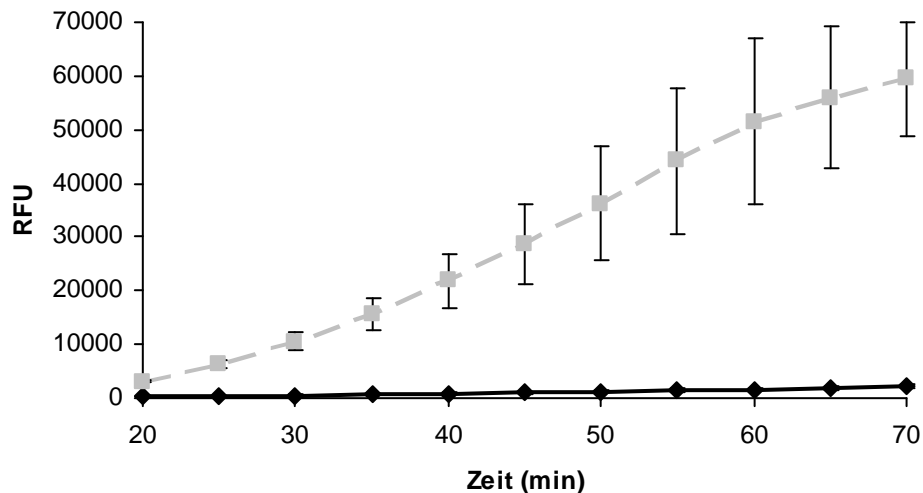


Abb. 7.17: Oxidativer Burst von  $2 \times 10^5$  Granulozyten in Gegenwart von  $1 \times 10^6$  Pilzen (mit 70% EtOH abgetötet) bei 20-70 min Koinkubation. Grau: Reaktion auf Keimschläuche. Schwarz: Reaktion auf Hefen. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. RFU = Relative Fluoreszenz Einheiten.

Da die unterschiedliche Produktion an Sauerstoffradikalen von humanen PMN auch auf die größere Masse der Keimschläuche zurückzuführen sein konnte, wurde das Experiment mit exakt identischer Biotrockenmasse ( $39 \mu\text{g}$ ) für beide Morphotypen wiederholt. Erneut reagierten die Granulozyten mit einem starken Oxidativen Burst auf Keimschläuche und mit einem nur schwachen auf Hefen (siehe Abb. 7.18). Das Resultat dieser Messungen zeigte, dass somit auch die etwas größere Zellmasse der Keimschläuche im Vergleich zu den Hefen nicht den entscheidenden Stimulus für die starke Oxidative Burst-Reaktion der humanen PMN als Reaktion auf Keimschläuche darstellte.

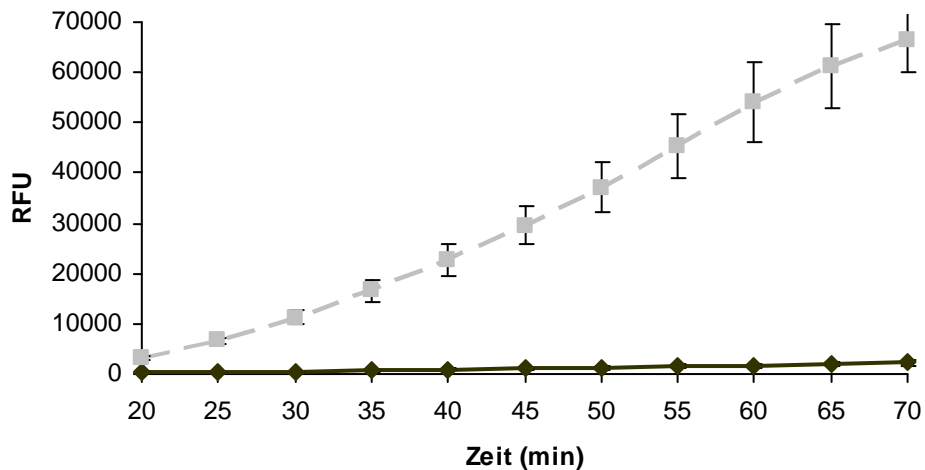


Abb. 7.18: Oxidativer Burst von  $2 \times 10^5$  Granulozyten in Gegenwart von  $39 \mu\text{g}$  Pilzzellen bei 20-70 min Koinkubation. Grau: Reaktion auf Keimschläuche. Schwarz: Reaktion auf Hefen. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die bisher erhaltenen Resultate haben gezeigt, dass PMN bei Reaktion auf Keimschläuche deutlich mehr ROI produzierten als bei Reaktion auf Hefen. Mit Kontrollexperimenten konnte belegt werden, dass dieser Unterschied nicht auf Abweichungen in der Biotrockenmasse oder der Stoffwechselaktivität beider Morphotypen beruhte. Daher wurde nach den Modulatoren für die Unterschiede in der Oxidativen Burst-Reaktion bei humanen Granulozyten gesucht.

Dazu wurden die einzelnen Hauptbestandteile von *C. albicans*-Zellwänden auf ihre Fähigkeit, den Oxidativen Burst bei humanen PMN auslösen zu können, untersucht. Die Pilzzellwand besteht zu 1-10% aus Chitin, zu 10-20% aus Mannan-reichen Polysacchariden und zu 50-60% aus  $\beta$ -Glucan-Polysacchariden. Daher wurden Chitin, Zymosan (als Vertreter für Mannan-reiche Polysaccharide) und Laminarin (als Vertreter für  $\beta$ -Glucan-Polysaccharide) jeweils mit humanen PMN koinkubiert und die produzierten Sauerstoffradikale nachgewiesen. Die Messungen ergaben, dass Laminarin selbst in hohen Konzentrationen von 5 mg/mL keine Produktion von ROI in humanen Granulozyten auslösen konnte. Chitin erwies sich ebenso als sehr schwacher Reiz. Selbst bei einer Konzentration von 12 mg/mL Chitin produzierten PMN als Reaktion darauf nur eine geringe Menge an Sauerstoffradikalen. Zymosan dagegen löste den Oxidativen Burst bei Granulozyten auch in niedrigen Konzentrationen (120  $\mu\text{g/mL}$ ) sehr effektiv aus.

Um die Bedeutung von Mannan-reichen Polysacchariden beurteilen zu können, wurden identische Biotrockenmassen an Zymosan und *C. albicans*-Keimschläuchen als Auslöser für den Oxidativen Burst (siehe Abb. 7.19) verglichen. Dabei konnte für beide Induktoren eine fast identische ROI-Produktion bei humanen Granulozyten nachgewiesen werden.

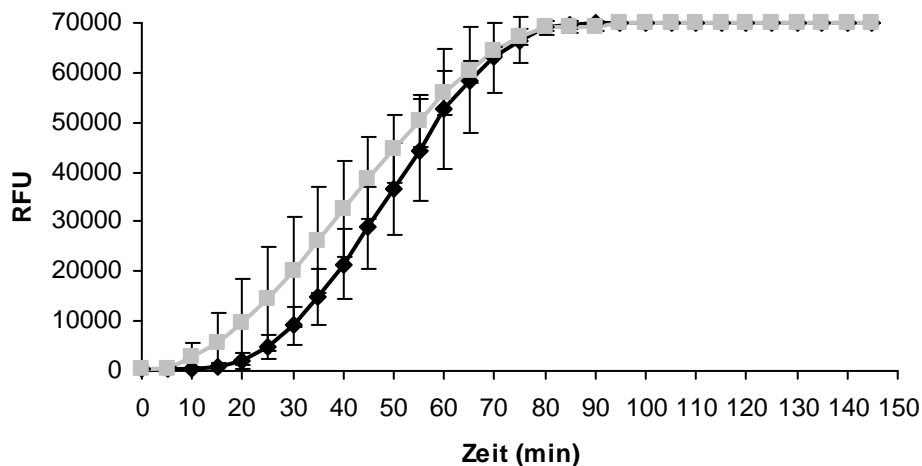


Abb. 7.19: Oxidativer Burst von  $2 \times 10^5$  Granulozyten als Reaktion auf 2,5 mg/mL Zymosan (schwarz) bzw. 2,5 mg/mL (Biotrockenmasse) *C. albicans*-Keimschläuche (grau). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Mit den durchgeführten vergleichenden Messungen konnte gezeigt werden, dass humane PMN eine ähnliche Menge an Sauerstoffradikalen bei Mannan-reichen Polysacchariden erzeugen wie bei *C. albicans*-Keimschläuchen. Somit könnten Mannan-reiche Polysaccharide einen wichtigen Stimulus für das Auslösen der Sauerstoffradikalproduktion bei humanen Granulozyten als Reaktion auf *C. albicans*-Keimschläuche darstellen. Allerdings ist diese Annahme schwer mit der geringen Sauerstoffradikalproduktion in Gegenwart von Hefen in Einklang zu bringen, obgleich auch Hefen über große Mengen an Mannan-reichen Polysacchariden verfügen. Genauere Untersuchungen zu diesem Thema, die aktuell im Labor AG-Löffler durchgeführt werden, sollen Aufschluss über die Relevanz von Mannan-reichen Polysacchariden beim Auslösen der Sauerstoffradikalproduktion als Abwehr gegen *C. albicans* bringen.

## Modulationsmöglichkeiten des Oxidativen Bursts

Das angewendete Kultivierungsprozedere für die jeweiligen Morphologien von *C. albicans* (siehe Kap. 6.2) beinhaltete, dass den mehrstündigen Kultivierungen ein Überführen in frisches Medium folgte. Erst dann wurden die frisch generierten Pilzzellen in Reaktionsansätze zu Granulozyten gegeben. Somit sollte eine Einflussnahme von eventuell angereicherten Sekretionen der Pilzzellen auf die Messungen ausgeschlossen werden.

Um einen Anhaltspunkt zu erlangen, ob die Pilzsekretionen grundsätzlich einen Einfluss auf die Bildung von ROI bei PMN ausüben konnten, wurden Kulturüberstände von *C. albicans*-Keimschläuchen über einen längeren Zeitraum generiert. Dazu wurden *C. albicans*-Zellen ( $2 \times 10^7$  / mL) für 24 h in RPMI-Medium + 5% FCS bei 37°C inkubiert. Der sterilfiltrierte Überstand wurde dann für die Messung der ROI-Produktion eins zu eins verdünnt mit frischem Medium eingesetzt. Dabei konnte in Gegenwart von frischen, kleinen Keimschläuchen weder eine eindeutig stimulierende noch inhibierende Wirkung der produzierten Sekundärmetabolite auf die ROI-Produktion von PMN nachgewiesen werden (siehe Abb. 7.20).

Sofern das Milieu in humanem Blut mit dem verwendeten Kultivierungsmedium vergleichbar ist, könnte man diesen Daten entnehmen, dass *C. albicans* innerhalb der ersten Stunden im Körper bei 37°C keine Sekundärmetabolite produziert, die akut die ROI-Produktion von humanen PMN beeinflussen.

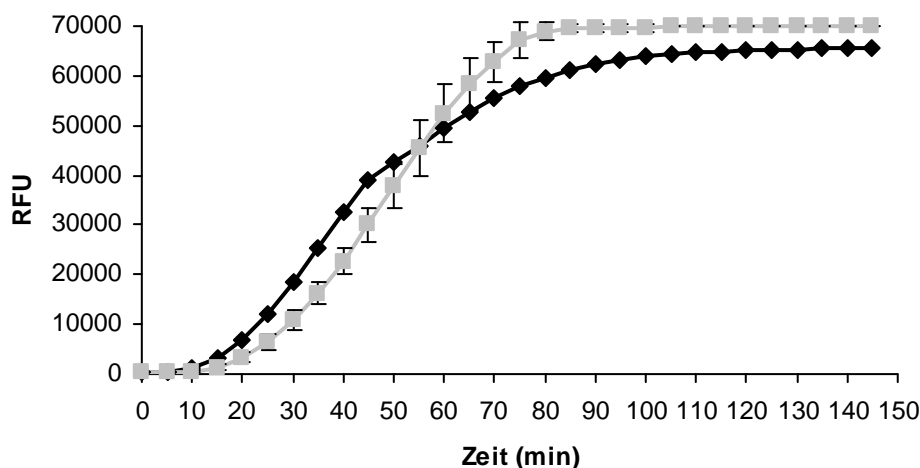


Abb. 7.20: ROI-Produktion von  $2 \times 10^5$  PMN als Reaktion auf  $1 \times 10^6$  *C. albicans*-Keimschläuche. Schwarz: in frischem RPMI Medium + 5% FCS. Grau: in 24 h-Kulturüberstand von *C. albicans*. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Humane PMN können im Blutsystem auch dem Einfluss anderer Immuneffektorzellen ausgesetzt werden. Um diesen Einfluss auf den Oxidativen Burst zu beleuchten, wurden exemplarisch 4 ng/mL einiger typischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-12, IL-4, IL-3, IL-2 and IL-1 $\beta$ ) zu Koinkubationen zugesetzt und die jeweilige ROI-Produktion detektiert. Allerdings zeigten weder regulatorische noch proinflammatorische Zytokine in der eingesetzten Konzentration einen Effekt auf die ROI-Produktion in Gegenwart von *C. albicans*-Hefen oder -Keimschläuchen.

Im Hinblick auf das relevante Patientenkollektiv an der medizinischen Klinik und Poliklinik II am Universitätsklinikum Würzburg wurde des Weiteren untersucht, inwieweit gängige immunsuppressive Medikamente den Oxidativen Burst bei humanen PMN modulieren konnten. Dabei wurden unterschiedliche klinikrelevante Substanzen (Cyclosporin A, Dexamethason, Cortison, RAD und Mycophenolat) in Konzentrationen von 0,1 bis zu 100  $\mu$ g/mL eingesetzt. Obwohl es sich bei den untersuchten Konzentrationen teils um Dosen handelte, die weit über den in der Klinik erreichten lagen, konnte nur durch die Zugabe des Medikamentes Mycophenolat bereits bei 10  $\mu$ g/mL eine deutliche Erhöhung der ROI-Produktion festgestellt werden. Die übrigen Immunsuppressiva zeigten in allen getesteten Konzentrationen keinen nachweisbaren modulatorischen Effekt auf den Oxidativen Burst, weder durch Hefen noch durch Keimschläuche ausgelöst.

Mit weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte von Mycophenolat auf einer direkten Modulation der PMN-Vitalität basieren konnten. Dazu wurden Apoptose/Nekrose-Untersuchungen (siehe Kap. 6.5.2) an Granulozyten in Gegenwart der verwendeten Konzentrationen an Mycophenolat durchgeführt. Allerdings zeigte eine dreistündige Koinkubation mit 10  $\mu$ g/mL Mycophenolat weder einen Effekt auf die Apoptose- noch auf die Nekrose-Entwicklung von humanen PMN.

Der Mycophenolat-Effekt auf den Oxidativen Burst konnte selbst ohne zusätzliche Stimulation der PMN beobachtet werden (siehe Abb. 7.21). Somit verstärkte Mycophenolat den Oxidativen Burst nicht nur, sondern vermochte diesen auch selbständig auszulösen.

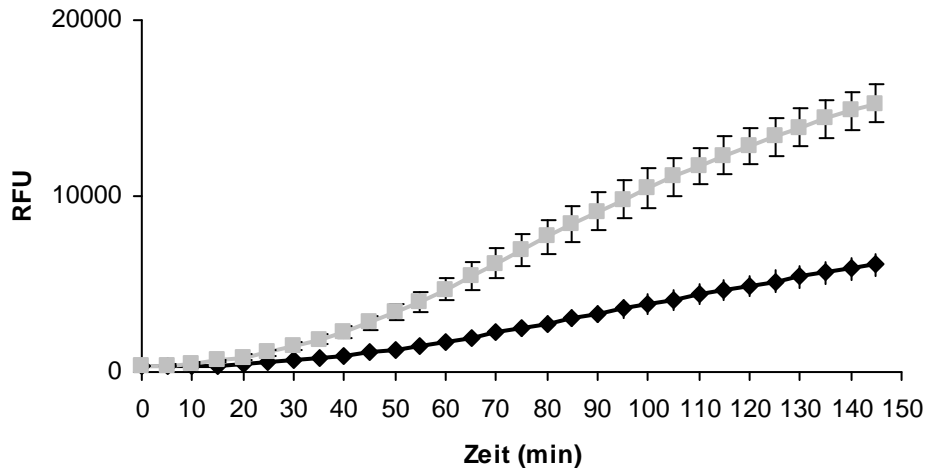


Abb. 7.21: Oxidativer Burst von  $2 \times 10^5$  Granulozyten in Gegenwart von  $10 \mu\text{g/mL}$  Mycophenolat. Schwarz: Reaktion auf Medium. Grau: Reaktion auf Medium mit Mycophenolat. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Da der Oxidative Burst als effektives Mittel humaner Granulozyten bei der Bekämpfung von Mikroorganismen bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit dessen Bedeutung bei der Eindämmung von *C. albicans*-Infektionen untersucht werden. Um den Effekt der ROI dabei aussagekräftig beurteilen zu können, wurde der Oxidative Burst mit Hilfe unterschiedlicher Zusätze künstlich variiert.

Zum einen wurden zur Kontrolle Verdünnungsreihen des antioxidativ wirkenden Glutathion in Messungen des Oxidativen Bursts analysiert. Dabei ergab sich, dass mit  $1,25 \text{ mg/mL}$  Glutathion die ROI-Produktion der PMN nahezu vollständig neutralisiert werden konnte (siehe Abb. 7.22). Mikroskopische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *C. albicans* nachweisbar waren, wenn Glutathion in dieser Konzentration eingesetzt wurde.

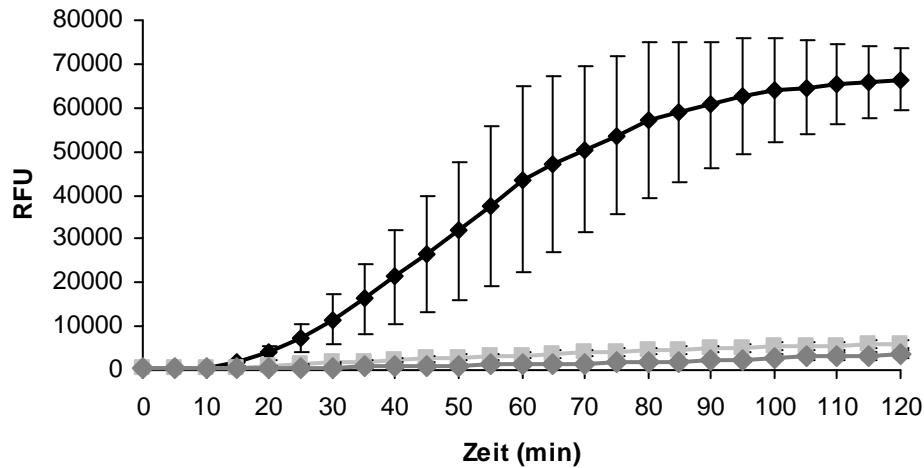


Abb. 7.22: Wirkung von 1,25 mg/mL Glutathion auf die ROI-Produktion von humanen PMN. Schwarz:  $1 \times 10^6$  *C. albicans*-Keimschläuche. Hellgrau:  $1 \times 10^6$  *C. albicans*-Keimschläuche + 1,25 mg/mL Glutathion. Dunkelgrau: negative Kontrolle (= Medium). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Für eine direkte Hemmung der NADPH-Oxidase wurden Messungen mit DPI (Diphenyliodoniumchlorid) in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durchgeführt. Dabei konnte zum einen festgestellt werden, dass der durch *C. albicans* ausgelöste Oxidative Burst größtenteils inhibiert wurde (nach einer Stunde auf etwa 9%) (siehe Abb. 7.23). Zum anderen wurde gezeigt, dass die gewählte Konzentration die Vitalität des Pilzes nicht beeinflusste, was bei höheren Konzentrationen nicht gewährleistet war.

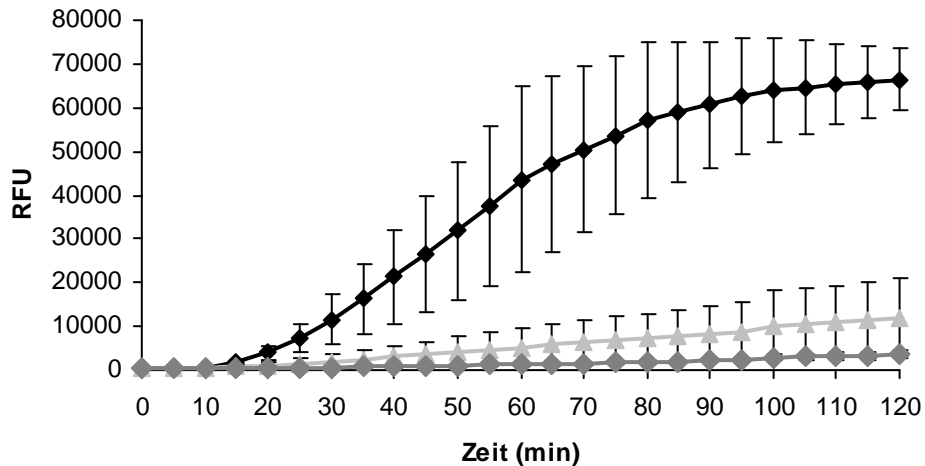


Abb. 7.23: Wirkung von 5 µg/mL DPI auf die ROI-Produktion von humanen PMN. Schwarz:  $1 \times 10^6$  *C. albicans*-Keimschläuche. Hellgrau:  $1 \times 10^6$  *C. albicans*-Keimschläuche + 5 µg/mL DPI. Dunkelgrau: negative Kontrolle (= Medium). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

### **Sauerstoffradikale sind nur von begrenzter Bedeutung für die Bekämpfung von *Candida albicans***

Um die Bedeutung der ROI-Produktion von humanen Granulozyten auf die Wachstumsinhibierung von *C. albicans* zu untersuchen, wurden Experimente (siehe Kap. 6.6.1) in Gegenwart von DPI (Inhibitor der NADPH-Oxidase, 5 µg/mL) und Glutathion (Antioxidans, 2,5 mg/mL) durchgeführt, die jeweils den Oxidativen Burst signifikant zu inhibieren vermochten (siehe Kap. 7.6.2).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass in den Ansätzen mit Granulozyten und DPI ein Pilzwachstum von 21 +/- 12% nachzuweisen war, was somit keinen signifikanten Unterschied zu den Ansätzen ohne Inhibitor darstellte (siehe Abb. 7.24). In den Ansätzen mit Glutathion wurde ein ähnliches Wachstumsverhalten beobachtet. Somit wurde gezeigt, dass der Oxidative Burst nicht entscheidend für den inhibierenden Effekt auf das Wachstum verantwortlich sein konnte.



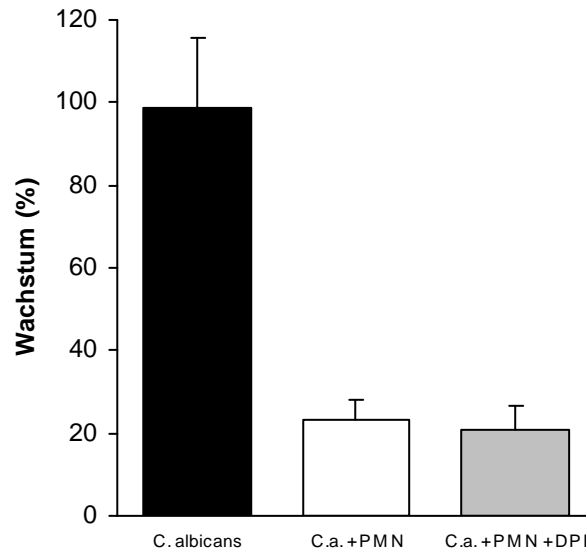


Abb. 7.24: Wachstum von FITC gefärbten *C. albicans*-Zellen nach einer Stunde bei 37°C ohne Zusätze (schwarzer Balken), mit PMN (MOI=1) (weißer Balken) und mit PMN und DPI (5 µg/mL) (grauer Balken). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Schädigungseffizienz von humanen PMN gegenüber Hefen und Keimschläuchen wurde in Gegenwart von DPI und Glutathion untersucht, um daran eine eventuelle Beteiligung von Sauerstoffradikalen zu identifizieren.

Dazu wurden Konfrontationsexperimente (siehe Kap. 6.8.4) über 3,5 h mit humanen PMN und 5 µg/mL DPI bzw. 2,5 mg/mL Glutathion durchgeführt. Die frisch isolierten Granulozyten wurden 30 Minuten vor Pilzzugabe mit den Modulatoren vorinkubiert, so dass zu Versuchsbeginn von einer vollständigen inhibitorischen bzw. neutralisierenden Wirkung ausgegangen werden konnte.

Die Schädigungseffizienz der Granulozyten blieb allerdings durch die Gegenwart der Modulatoren für beide Morphotypen von *C. albicans* unverändert (siehe Abb. 7.25). Somit schienen sowohl frisch produzierte Sauerstoffradikale, die im Experiment durch die Zugabe von DPI fast vollständig inhibiert wurden, als auch bereits vorhandene Sauerstoffradikale aus dem Zellinneren der PMN oder aus der Umgebung, die im Experiment durch Glutathion restlos abgefangen wurden, keinen nachweisbaren Einfluss auf die Schädigung von *C. albicans* zu haben.

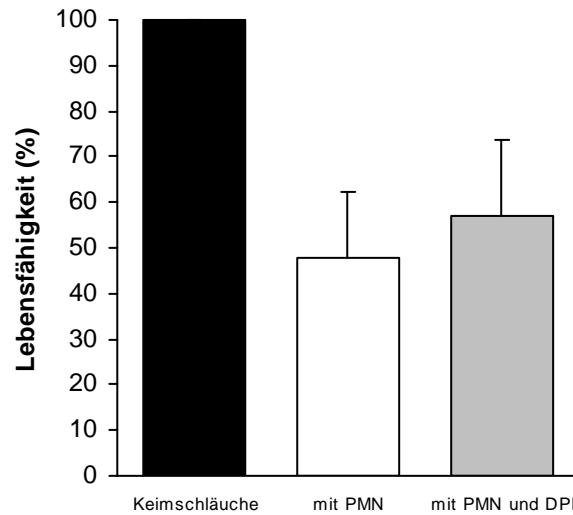


Abb. 7.25: Konfrontationsversuch von PMN mit *C. albicans*-Keimschläuchen nach dreieinhalb Stunden. Schwarzer Balken: Keimschläuche ohne Zusätze. Weißer Balken: Keimschläuche mit PMN. Grauer Balken: Keimschläuche mit PMN und 5 µg/mL DPI. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Ein ähnliches Resultat wurde in Versuchsansätzen erzielt, in denen der Oxidative Burst mit Hilfe der modulierenden Substanz Mycophenolat (siehe Kap. 7.6.2) verstärkt wurde. Wurde die Schädigungseffizienz humaner Granulozyten (siehe Kap. 6.8.4) in Gegenwart von 10 µg/mL Mycophenolat (siehe Abb. 7.26) untersucht, zeigte der Modulator keine signifikante Einflussnahme.

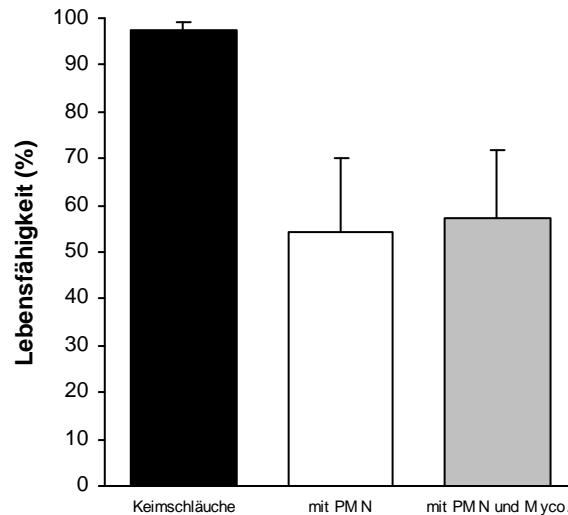


Abb. 7.26: Konfrontationsversuch von PMN mit *C. albicans*-Keimschläuchen nach dreieinhalb Stunden. Schwarzer Balken: Keimschläuche ohne Zusätze. Weißer Balken: Keimschläuche mit PMN. Grauer Balken: Keimschläuche mit PMN und 10 µg/mL Mycophenolat. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Somit führte weder eine Inhibierung noch eine Verstärkung des Oxidativen Bursts zu nachweisbaren Veränderungen bei der Schädigung von *C. albicans*-Zellen durch PMN. Dies konnte darauf zurückzuführen sein, dass die produzierten ROI keinen direkten Beitrag zur Pilzschädigung leisteten oder dass *C. albicans* über geeignete Schutzmechanismen gegen Sauerstoffradikale verfügte.

Die Relevanz von Schutzmechanismen bei *C. albicans* gegen Sauerstoffradikale wurde exemplarisch mit SOD5-Deletions-Mutanten von *C. albicans* in Konfrontationsexperimenten (siehe Kap. 6.8.4) untersucht. SOD5 gehört zu einer Familie von sechs Genen von *C. albicans*, die für Superoxiddismutasen (SOD1-6) kodieren. Bei den Genprodukten von SOD4-6 handelt es sich um Zellwand-assoziierte GPI-verankerte Proteine [Fradin et al., 2005]. Superoxiddismutasen sind zentrale Schutzenzyme vor reaktiven Sauerstoffverbindungen in eukaryotischen Zellen. Analysen der Schädigungseffizienz humaner Granulozyten bei der SOD5-Deletions-Mutante zeigten jedoch, dass kein Unterschied in der Empfindlichkeit dieser Mutante zum Wildtyp-Stamm nachweisbar war, weder bei Hefen noch bei Keimschläuchen (siehe Abb. 7.27).

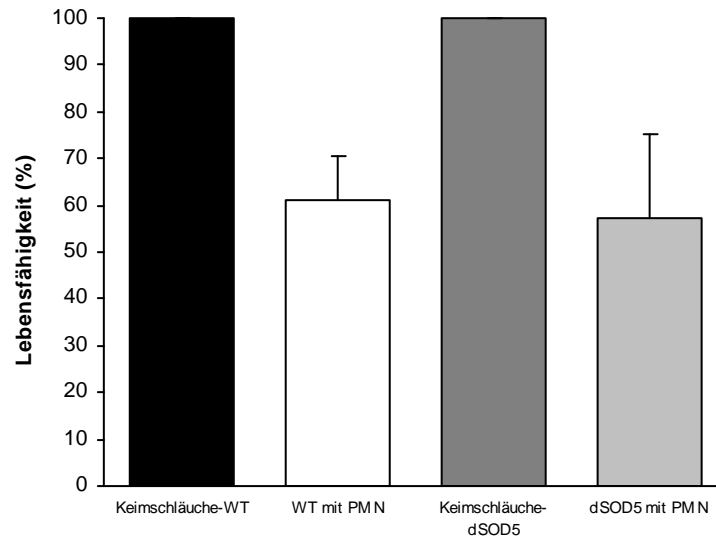


Abb. 7.27: Konfrontationsversuch von PMN mit Keimschläuchen von *C. albicans*-Wildtyp (=WT) und  $\Delta SOD5$ -Mutanten nach dreieinhalb Stunden. Schwarzer Balken: WT-Keimschläuche ohne Zusätze. Weißer Balken: Keimschläuche mit PMN. Dunkelgrauer Balken:  $\Delta SOD5$ -Keimschläuche ohne Zusätze. Hellgrauer Balken:  $\Delta SOD5$ -Keimschläuche mit PMN. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Damit konnte anhand der durchgeführten Experimente weder für Hefen, noch für Keimschläuche von *C. albicans* eine Relevanz von Sauerstoffradikalen bei der Zellschädigung beobachtet werden. Die Ursache für die fehlende Sensibilität des Pilzes gegenüber Sauerstoffradikalen der Granulozyten konnte in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden und wird weitere Untersuchungen bedürfen.

Granulozyten, die sich im Blutkreislauf befinden, sind auch Stimuli der umgebenden Immuneffektorzellen ausgesetzt. Da es allerdings problematisch ist, die vielfältigen Einflüsse auf PMN im humanen Körper im Falle einer Infektion nachzustellen, wurden vorerst Experimente mit PMA-vorstimulierten Granulozyten durchgeführt. PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) ist ein synthetischer, aber effektiver Stimulus für Granulozyten, der eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C herbeiführt [Lopez-Lluch et al., 2001] und so unter anderem die Produktion von Sauerstoffradikalen auslöst. Wurde PMA in einer Konzentration von 23-50 ng/mL zu einer Granulozyten-Lösung zugegeben, konnte bereits nach 30 Minuten (siehe Abb. 7.28) bei allen Zellen eine nachweisbare ROI-Produktion beobachtet werden, die im Laufe der Zeit noch weiter anstieg (siehe Abb. 7.29). Die eingesetzte Konzentration von PMA (23-

50 ng/mL) wurde in Anlehnung an Brinkmann et al. 2004 und eigenen Messungen des Oxidativen Bursts (siehe Kap. 6.8.1) festgelegt.

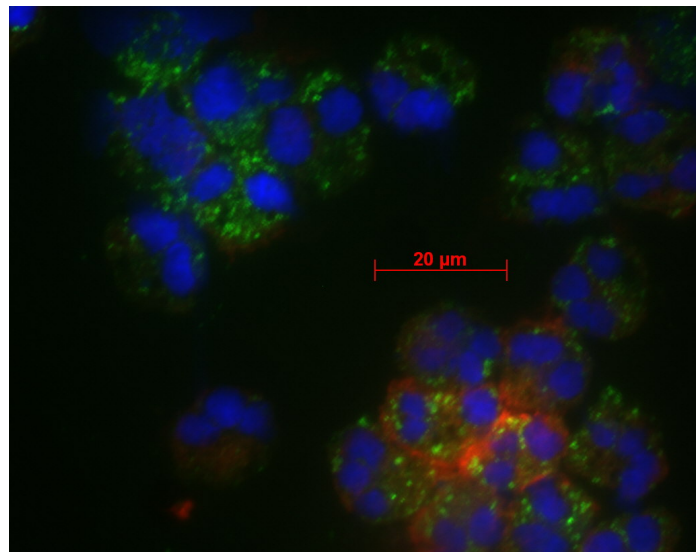


Abb. 7.28: Stimulierung von humanen PMN mit 50 ng/mL PMA nach 30 min bei 37°C. blau: DAPI angefärbte Zellkerne der PMN. Grün: DCF zum Nachweis von intrazellulären ROI. Rot: Phalloidin-Alexa-Fluor-546 angefärbtes Zytoskelett.

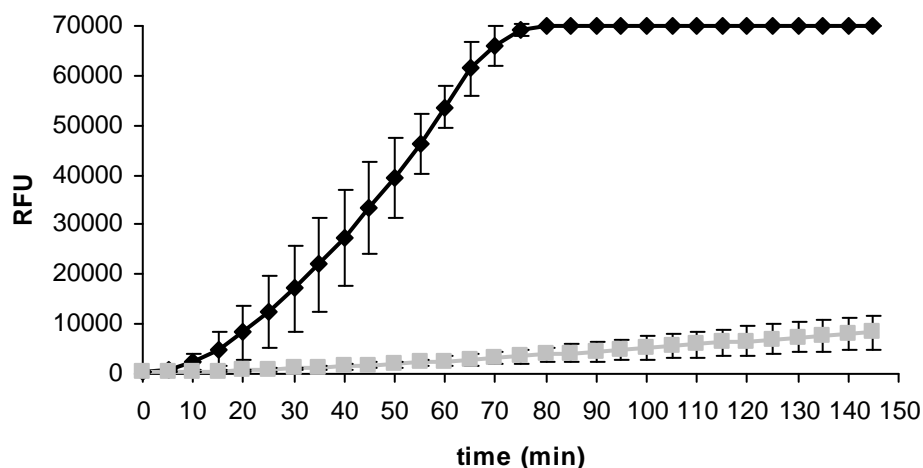


Abb. 7.29: Nachweis des Oxidativen Bursts bei humanen PMN ausgelöst durch PMA. Schwarz: gemessene relative Fluoreszenzeinheiten als Nachweis der ROI-Produktion von  $2 \times 10^5$  PMN in Gegenwart von 50 ng/mL PMA. Grau: gemessene relative Fluoreszenzeinheiten als Nachweis der ROI-Produktion von PMN ohne Stimulus (= negative Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Mit vorstimulierten Granulozyten (23 ng/ml PMA) wurde eine signifikante Verbesserung der Schädigungseffizienz (siehe Kap. 6.8.4) bei *C. albicans*-Hefen und -Keimschläuchen (siehe Abb. 7.30) nachgewiesen. Dabei reduzierten vorstimulierte PMN die Anzahl vitaler *C.albicans*-Keimschläuche nach dreieinhalb Stunden Koinkubation auf 37 +/- 14% und Hefen sogar auf nur 14 +/- 3%.

Nachfolgende Untersuchungen wurden durchgeführt, um herauszufinden auf welchen Mechanismen die verbesserte Schädigungseffizienz beruhte.

Bisher durchgeführte Experimente (siehe Kap. 7.6.2) hatten gezeigt, dass sich eine Veränderung der Sauerstoffradikalproduktion nicht zwingend auf die Schädigungseffizienz von PMN niederschlug. Konfrontationsexperimente in Gegenwart von DPI sollten nun Aufschluss über die Relevanz der ROI zur Pilzbekämpfung bei PMA-vorstimulierten Granulozyten bringen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass im Falle von vorstimulierten PMN ein signifikanter Effekt des NADPH-Oxidase Inhibitors DPI auf die Schädigung beider Morphotypen von *C. albicans* (siehe Abb. 7.30) auftrat.

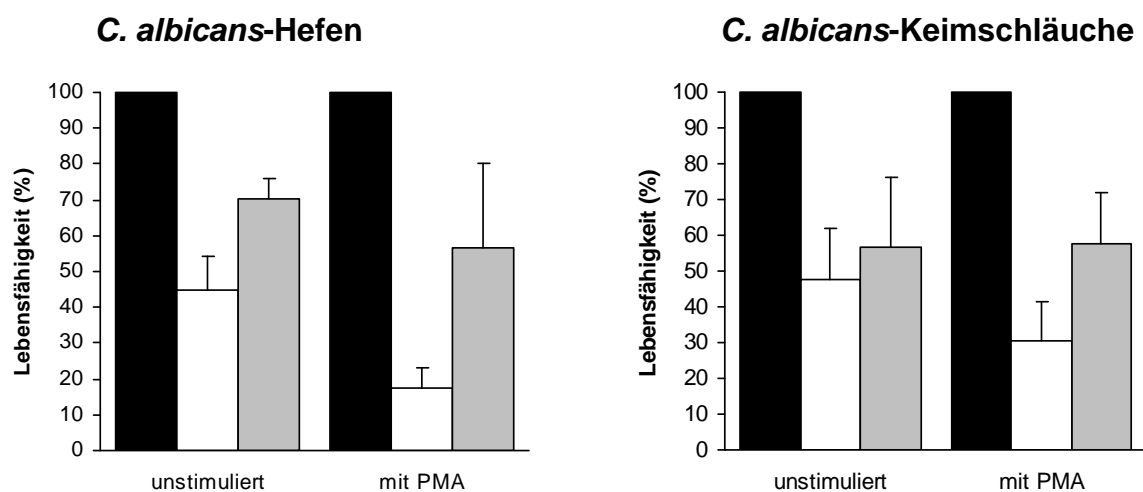


Abb. 7.30: Schädigungseffizienz von unbehandelten und mit 23 ng/ml PMA vorstimulierten humanen Granulozyten nach 3,5 h Koinkubation (MOI=1). Schwarz = *C. albicans* ohne Zusätze. Weiß = *C. albicans* mit Granulozyten. Grau = *C. albicans* mit Granulozyten und 5 µg/ml DPI. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Da es sich bei der Vorstimulation mit PMA um einen synthetischen Stimulus handelte, wird man in Zukunft versuchen müssen, einen ähnlichen Effekt mit physiologisch relevanten, proinflammatorischen Zusätzen nachzustellen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten konnte somit belegt werden, dass effektiv vorstimulierte PMN eine verbesserte und abgewandelte Schädigungseffizienz gegenüber *C. albicans* aufwiesen und dass diese verbesserte Schädigungseffizienz zu einem großen Teil auf der Sauerstoffradikalproduktion beruhte. Wurden humane PMN hingegen nicht vorstimuliert, konnte kein Beitrag des Oxidativen Bursts zur Abtötung von *C.albicans*-Zellen nachgewiesen werden.

### **7.7 Verhalten von humanen Granulozyten in Gegenwart von *Aspergillus fumigatus***

Wie bereits bei den *Candida albicans*-Experimenten lag im vorliegenden Abschnitt der Arbeit das Hauptinteresse der durchgeführten Untersuchungen mit *Aspergillus fumigatus* auf der Fragestellung, ob humane Granulozyten auf unterschiedliche Morphologien des Pilzes mit einem differenzierten Verhalten reagieren können.

Mit mikroskopischen Analysen, wie der Echt-Zeit-Weit-Feld-Mikroskopie, der Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Kap. 6.6.1) und der Elektronen-Mikroskopie (siehe Kap. 6.6.2) konnte gezeigt werden, dass humane Granulozyten in engen Kontakt zu Keimschläuchen und Hyphen von *A. fumigatus* traten. Damit bestanden deutliche Parallelen zum beobachteten Granulozytenverhalten in Gegenwart von *C. albicans*-Keimschläuchen (siehe Kap. 7.1). Granulozyten gruppierten sich um die hyphalen Strukturen (siehe Abb. 7.31 A und B) und konnten dem Pilz innerhalb der ersten Stunde deutliche Schäden zufügen (siehe Abb. 7.31 B). Wie bereits für *C. albicans*-Keimschläuche dokumentiert, versuchten humane PMN unter extremen Zellverformungen große Teile der Pilzzellwand soweit wie möglich zu bedecken (siehe Abb. 7.31 C).

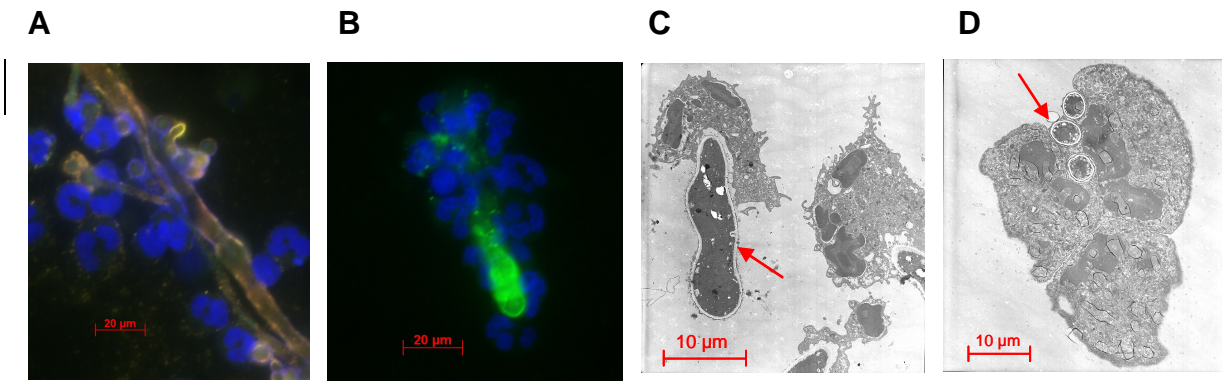


Abb. 7.31: Interaktion von humanen PMN mit *A. fumigatus* Zellen. **A:** Anlagerung von PMN (Zellkerne DAPI gefärbt, blau) an spezifisch gefärbte *A. fumigatus*-Hyphen und -Konidien (orange), im Fluoreszenzpräparat. **B:** Schädigung eines Keimschlauchs (FITC-gefärbt, grün) durch PMN (Zellkerne DAPI-gefärbt, blau), im Fluoreszenzpräparat. **C:** Umfließen eines *A. fumigatus*-Keimschlauchs (siehe Pfeil), im EM-Präparat. **D:** Konidien (siehe Pfeil), angeheftet an drei Granulozyten, im EM-Präparat.

Obwohl anhand von mikroskopischen Untersuchungen das Verhalten von humanen Granulozyten gegenüber Keimschläuchen von *A. fumigatus* und von *C. albicans* große Ähnlichkeiten aufzuweisen schien, zeigten die Granulozyten gegenüber dem Hefe- und dem Schimmelpilz auch abweichende Reaktionen. Die Interaktion der Granulozyten mit Konidien von *A. fumigatus* erwies sich in der visuellen Auswertung intensiver als jene mit Hefen von *C. albicans* (siehe Kap. 7.1).

Sobald Granulozyten auf Konidien stießen, sammelten sie diese ein, so dass einzelne Granulozyten mit mehr als zehn Konidien beladen waren. Allerdings konnte den Aufnahmen nicht eindeutig entnommen werden, ob PMN die Konidien gezielt ansteuerten oder zufällig auf sie trafen. Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde nachgewiesen, dass PMN auch zu mehreren *A. fumigatus*-Konidien attackierten (siehe Abb. 7.31 D).

## 7.8 Granulozyten produzieren NETs in Gegenwart von *A. fumigatus*-Keimschläuchen

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (siehe Kap. 6.6.1) konnte bei Koinkubationen (von einer Stunde) von PMN mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen die Bildung von fädigen Strukturen beobachtet werden. Die Anfärbeeigenschaft dieser Strukturen deutete auf eine Zusammensetzung aus Nukleinsäuren hin, so dass in



dem Zusammenhang die Entstehung von NETs (neutrophil extracellular traps) vermutet wurde (siehe Abb. 7.32). Ähnlich wie bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.6.1) haben allerdings nachfolgende Experimente ergeben, dass die Bildung von NETs in den durchgeführten experimentellen Ansätzen nur selten beobachtet werden konnte und eine Quantifizierung daher nicht möglich war.

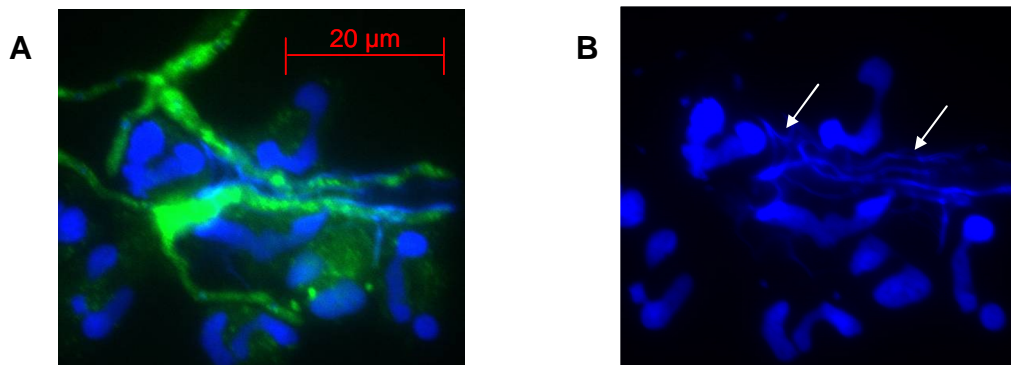


Abb. 7.32: NET-Bildung (DAPI-gefärbt, blau) bei PMN nach einer Stunde Koinkubation mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen (FITC-gefärbt, grün). **A:** Überlagerung der FITC- und DAPI-Aufnahmen. **B:** DAPI-Aufnahme mit fädigen NET-Strukturen (siehe weiße Pfeile).

## 7.9 Chemotaktisches Potential von *A. fumigatus*-Keimschläuchen für humane Granulozyten

Die mikroskopischen Analysen hatten gezeigt, dass humane PMN gegenüber beiden Morphotypen von *A. fumigatus* ein intensives Interaktionsverhalten aufzeigten. Um den Auslöser für dieses Verhalten der PMN ausfindig zu machen, wurden Chemotaxis-Experimente (siehe Kap. 6.8.3) durchgeführt. Damit sollten Anhaltspunkte über das chemotaktische Potential beider Morphotypen gegenüber Granulozyten erlangt werden. Dabei konnte erneut ein relativ ähnliches Verhalten wie bereits bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.2) beobachtet werden. Obwohl in den mikroskopischen Aufnahmen eine deutliche Interaktion von PMN mit beiden Morphotypen von *A. fumigatus* nachgewiesen wurde, schienen *A. fumigatus*-Konidien (15 +/- 1%) im Vergleich zur negativen Kontrolle (15 +/- 3%) keinen chemotaktischen Reiz für humane PMN darzustellen. Kleine Keimschläuche von *A. fumigatus* hingegen schienen signifikant anlockende chemotaktische Signale zu

sezernieren, da sich 44 +/- 14% der Granulozyten aktiv auf sie zu bewegten (siehe Abb. 7.33). Da *A. fumigatus*-Konidien keine aktive gerichtete Bewegung humaner Granulozyten auszulösen schienen, könnte es sich bei dem mikroskopisch beobachteten Einsammeln der Konidien um ein zufälliges Aufeinandertreffen während der ungerichteten Mobilität der PMN handeln. Die Interaktion mit den Keimschläuchen hingegen schien aufgrund einer gezielten Anlockung der PMN zustande zu kommen.

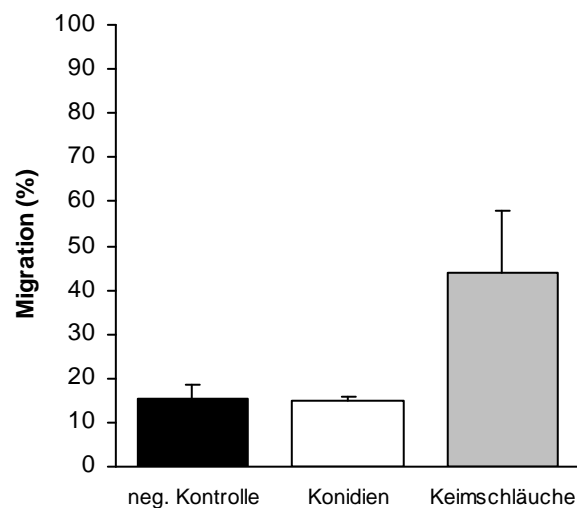


Abb. 7.33: Chemotaktisches Verhalten (Migration durch Filter mit 3  $\mu\text{m}$  Porengröße) von  $5 \times 10^5$  PMN bei einer negativen Kontrolle mit Medium (schwarzer Balken), bei  $5 \times 10^5$  *A. fumigatus*-Konidien (weißer Balken) und bei  $5 \times 10^5$  *A. fumigatus*-Keimschläuchen (grauer Balken). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

### 7.10 Granulozyten produzieren Sauerstoffradikale in Gegenwart von *A. fumigatus*-Keimschläuchen

Humane PMN setzten auch bei der Abwehr gegen *A. fumigatus* Sauerstoffradikale frei. Bei Messungen der Sauerstoffradikalproduktion (siehe Kap. 6.8.1) konnte festgestellt werden, dass der Oxidative Burst wie bereits bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.6.2) abhängig von der Pilzmorphologie im Ausmaß deutlich variiert wurde. Humane PMN produzierten nachweislich mehr ROI (reactive oxygen intermediates) in Gegenwart von Keimschläuchen als in Gegenwart von *A. fumigatus*-Konidien. Anhand von Kontrollexperimenten konnte belegt werden, dass diese Beobachtung, ebenfalls wie bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.6.2), weder auf Unterschieden in der Stoffwechselaktivität noch in der Biotrockenmasse zurückzuführen war.

Um eventuelle Einflüsse aus der Umgebung auf den Oxidativen Burst, ausgelöst durch *A. fumigatus*-Keimschläuche, zu simulieren, wurde der Einfluss unterschiedlicher Zytokinzusätze, wie bereits bei *C. albicans* beschrieben (siehe Kap. 7.6.2), in Koinkubationen getestet. Die Zugabe von bereits 4 ng/mL stimulierender Zytokine wie GM-CSF oder TNF- $\alpha$  zu *A. fumigatus* führte zu einer erhöhten ROI-Produktion der Granulozyten sowohl in Gegenwart von Konidien, als auch von Keimschläuchen (siehe Abb. 7.34 A und B).

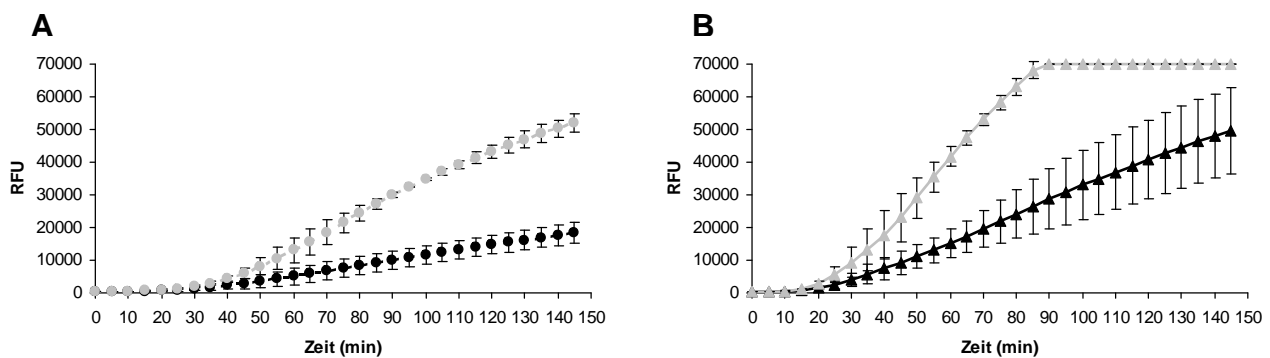


Abb. 7.34: Verlauf des Oxidativen Bursts von  $2 \times 10^5$  PMN in Gegenwart von *A. fumigatus* (MOI = 5). **A**: ROI-Produktion ausgelöst durch Konidien (schwarze Linie) und Konidien mit 4 ng/mL GM-CSF (graue Linie). **B**: ROI-Produktion ausgelöst durch Keimschläuche (schwarze Linie) und Keimschläuche mit 4 ng/mL GM-CSF (graue Linie). Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. RFU = Relative Fluoreszenz Units.

Diese signifikante Verstärkung des Oxidativen Bursts durch Zusätze von stimulierenden Zytokinen konnte bei Untersuchungen an *C. albicans* nicht festgestellt werden. In der Abwehr gegen *A. fumigatus* erzielten bereits geringe proinflammatorische Zusatzreize deutliche Effekte auf den oxidativen Burst, was auf eine Relevanz der Sauerstoffradikalproduktion von humanen PMN bei der Bekämpfung des Schimmelpilzes hindeutet.

### 7.11 Granulozyten bewirken eine Wachstumsinhibierung bei *A. fumigatus*

Um den Einfluss der Granulozyten auf den Pilz bereits nach kurzen Koinkubationszeiten zu bestimmen, wurde die Wirkung von humanen PMN auf das Wachstumsverhalten von *A. fumigatus* nach einer Stunde analysiert.

Wachstumsinhibierungsexperimente (siehe Kap. 6.6.1) zeigten, dass PMN effektiv zu einer fast vollständigen Wachstumsinhibierung bei *A. fumigatus* führten. Nur noch ein sehr geringes Pilzwachstum von 3 +/-5% konnte nachgewiesen werden.

Um herauszufinden, worauf dieser starke Effekt der humanen PMN auf das *A. fumigatus*-Wachstum basierte, wurden Analysen mit Inhibitoren unterschiedlicher Effektormechanismen der Granulozyten durchgeführt. Untersuchungen zum Einfluss des Oxidativen Bursts auf die Wachstumsinhibierung der PMN bei *A. fumigatus* konnten allerdings nicht durchgeführt werden, da sich in Kontrollexperimenten zeigte, dass *A. fumigatus*, anders als *C. albicans* (siehe Kap. 7.6.2), in seinem Wachstum empfindlich auf die zur Verfügung stehenden Inhibitoren Glutathion (1,25 mg/mL) und DPI (5 µg/mL) reagierte. Der Einsatz des Inhibitors der Aktinpolymerisierung Cytochalasin D (10 µg/mL) jedoch war unproblematisch und somit konnte mit dessen Hilfe gezeigt werden, dass die PMN-Mobilität auch bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* entscheidend ist. Durch Cytochalasin D konnte allerdings, anders als bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.4), der wachstumsinhibierende Effekt der PMN auf *A. fumigatus* nicht vollständig aufgehoben werden. In Gegenwart von Cytochalasin D konnte noch ein Pilzwachstum von 47 +/-19% festgestellt werden.

Somit wurde deutlich, dass humane PMN für eine effektive Eindämmung einer *A. fumigatus*-Infektion einerseits einen engen Kontakt zum Pilz aufnehmen müssen, andererseits aber auch Effektormechanismen einsetzen, die vollkommen unabhängig von der Aktinpolymerisierung und damit der Mobilität der PMN ablaufen.

## **7.12 Granulozyten schädigen *A. fumigatus*-Keimschläuche effektiv**

Mit Untersuchungen zur Schädigungseffizienz (siehe Kap. 6.8.4) wurde der Effekt einer längeren Koinkubation mit humanen PMN auf *A. fumigatus* betrachtet. Dabei konnte innerhalb der ersten drei Stunden eine deutliche Schädigung nachgewiesen werden, die durch das Unvermögen auf Nähragar anzuwachsen dokumentiert wurde. Etwa 40% der *A. fumigatus*-Keimschläuche (siehe Abb. 7.35) erfuhren eine signifikante Schädigung. Für Konidien von *A. fumigatus* konnte innerhalb der analysierten Zeiträume allerdings keine nachweisbare Schädigung festgestellt werden. Damit schienen die Konidien resistenter gegen die Granulozyten-Abwehr zu sein als die Keimschläuche von *A. fumigatus* und werden voraussichtlich erst zu späteren Zeitpunkten der Interaktion nachweisbar geschädigt. Um die Relevanz des

Oxidativen Bursts bei der Abtötungseffizienz für die Keimschläuche festzustellen, wurde einerseits mit Inhibitoren und andererseits zusätzlich zum *A. fumigatus*-Wildtypstamm (ATCC 46645) auch mit einer *A. fumigatus*-Mutante ( $\Delta Afyap1$ ) gearbeitet, die durch die funktionelle Deletion des Yap1-Gens in der Neutralisierung von Sauerstoffradikalen beeinträchtigt war.

Das Antioxidans Glutathion (1,25 mg/mL) und der NADPH-Inhibitor DPI (5  $\mu$ g/mL) zeigten in den eingesetzten Konzentrationen, wie bereits beschrieben, zwar einen deutlich reprimierenden Effekt auf das Wachstumsverhalten von *A. fumigatus*, da aber bei den Konfrontations-Experimenten (siehe Kap. 6.8.4) vor dem Ausplattieren sehr starke Verdünnungen durchgeführt wurden, war der reprimierende Effekt von Glutathion und DPI hierbei unproblematisch. Die Experimente wurden mit vorstimulierten PMN (23 ng/mL PMA, 30 min vor Versuchsbeginn) durchgeführt, da sich bei *A. fumigatus* ebenso wie bei *C. albicans* (siehe Kap. 7.6.2) dadurch eine effektivere Schädigungseffizienz nachweisen ließ. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante ( $\Delta Afyap1$ ) wurden für zweieinhalb Stunden mit PMN koinkubiert und teilweise wurde DPI oder Glutathion zugegeben. Die Inhibierung bzw. Neutralisierung der Sauerstoffradikalproduktion durch DPI und Glutathion zum einen, sowie das minimierte Abwehrverhalten der Pilz-Mutante gegen ROI zum anderen zeigten keinen nachweisbaren Effekt auf die Schädigungseffizienz der humanen PMN (siehe Abb. 7.35). Auch die Verstärkung des Oxidativen Bursts durch das Immunsuppressivum Mycophenolat (10  $\mu$ g/mL) zeigte keine Beeinflussung der Schädigungseffizienz der Granulozyten, so dass der Beitrag der Sauerstoffradikale bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* unklar blieb.

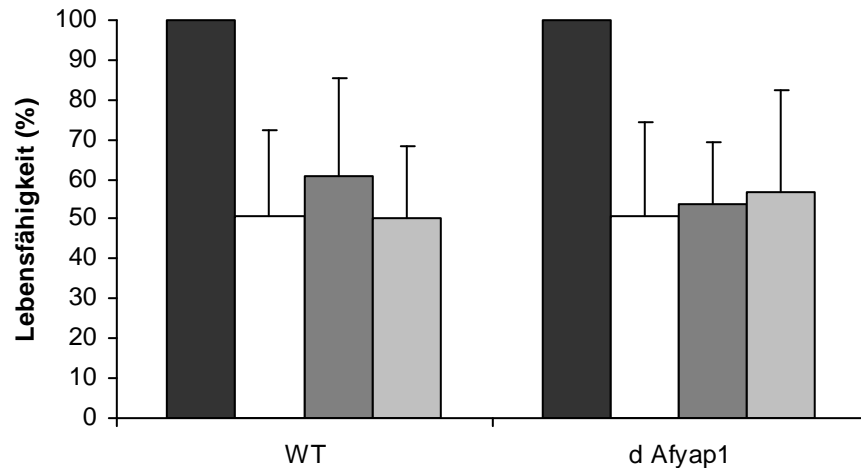


Abb. 7.35: Schädigungseffizienz von humanen Granulozyten bei *A. fumigatus*-Wildtypkeimschläuchen und Keimschläuchen einer Yap1-Mutante (160 min, MOI = 1). Schwarze Balken = *A. fumigatus* ohne PMN. Weiße Balken = *A. fumigatus* mit PMN. Dunkelgraue Balken = *A. fumigatus* mit PMN und 1,25 mg/mL Glutathion. Hellgraue Balken = *A. fumigatus* mit PMN und 5 µg/mL DPI. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Da Granulozyten Mikroorganismen auch durch die Produktion von Stickstoffradikalen bekämpfen können, wurde der Beitrag von Stickstoffradikalen auf die Schädigung der *A. fumigatus*-Keimschläuche untersucht. Dazu wurden Experimente zur Schädigungseffizienz (siehe Kap. 6.8.4) in Gegenwart des NO-Synthetase-Inhibitors L-NAME in einer in der Literatur mehrfach empfohlenen Konzentration (2 mM), durchgeführt. Vorab wurde durch Apoptose/Nekrose-Untersuchungen mit Hilfe einer FACS-Analyse (siehe Kap. 6.5.2) sichergestellt, dass der Inhibitor die Vitalität der humanen PMN nicht beeinflusste. Allerdings zeigten die Resultate, dass der gewählte Inhibitor keine Wirkung auf die Schädigungseffizienz von vorstimulierten PMN auf *A. fumigatus*-Keimschläuche hatte (siehe Abb. 7.36). Somit konnte auch kein entscheidender Beitrag von Stickstoffradikalen bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* nachgewiesen werden.

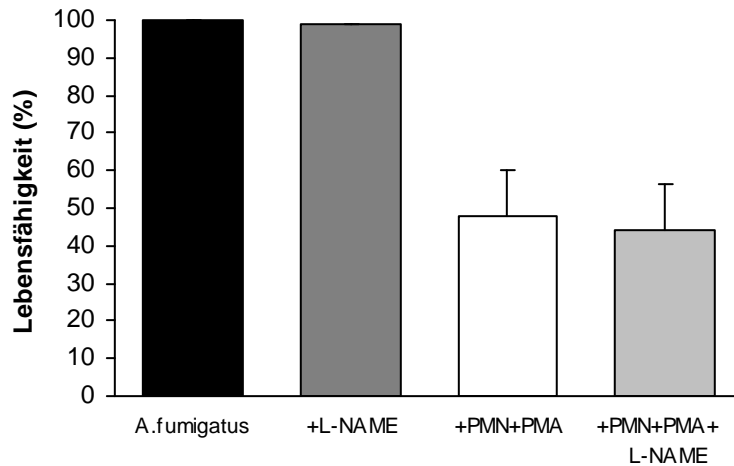


Abb. 7.36: Schädigungseffizienz von humanen Granulozyten bei *A. fumigatus*-Keimschläuchen (160 min, MOI = 1). Schwarze Balken = *A.fumigatus*. Dunkelgraue Balken = *A.fumigatus* mit 2 mM L-NAME. Weiße Balken = *A.fumigatus* mit vorstimulierten PMN. Hellgraue Balken = *A.fumigatus* mit vorstimulierten PMN und 2 mM L-NAME.

Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Zusammenfassend lässt sich anhand der gewonnenen Daten sagen, dass humane Granulozyten Keimschläuche von *A. fumigatus* sehr effektiv innerhalb relativ kurzer Zeit abtöten können. Bezüglich der angewendeten Mechanismen zeigten die durchgeführten Untersuchungen, dass weder die NET-Bildung noch die Produktion von Sauerstoff- oder Stickstoffradikalen einen nachweislichen oder gar entscheidenden Beitrag dazu leisteten. Untersuchungen, die die weiteren vielfältigen Effektormechanismen von humanen Granulozyten bei der Bekämpfung von *A. fumigatus*-Keimschläuchen beleuchten sollen, werden in nächster Zeit in der Arbeitsgruppe AG-Dr. Löffler durchgeführt werden.

## 8. Diskussion und Ausblick

### 8.1 Relevanz von Granulozyten bei Pilzinfektionen

Sowohl *Candida albicans*, als auch *Aspergillus fumigatus* sind in unserer Umgebung allgegenwärtig. Im Allgemeinen kann unser Immunsystem allerdings beide Pilze unter Kontrolle halten. Symptome einer Pilzinfektion treten erst auf, wenn das Immunsystem einzelner Personen durch spezifische Erkrankungen oder Funktionsstörungen geschwächt ist [Pfaller 1994, Sangeorzan et al., 1994]. Unter solchen Umständen können sich Infektionen manifestieren, die in der Schwere und dem Infektionsort stark variieren [Hoyer et al., 1998].

Sowohl die invasive Candidose als auch die invasive Aspergillose treten gehäuft nach Immunsuppressionen, wie nach Organtransplantation oder bei Leukämiepatienten auf. Des Weiteren wurde das Auftreten einer Neutropenie (Mangel an Neutrophilen) als zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung von invasiven Pilzinfektionen beschrieben. Die Relevanz von Granulozyten für die effektive Pilzabwehr wird anhand durchgeführter Untersuchungen ersichtlich, die jeweils gezeigt haben, dass Neutrophile innerhalb von kürzester Zeit eine logarithmischen Abnahme der Pilzbelastung herbeiführen [Pfaller & Diekema, 2007, Hope et al., 2007].

Obwohl die generelle Bedeutung der humanen Granulozyten bei der Abwehr von Pilzinfektionen unbestritten ist, war bisher wenig über die relevanten Abwehrmechanismen bekannt. Kleinere Mikroorganismen, die von Granulozyten phagozytiert werden, können im Phagolysosom mit Hilfe von Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen abgetötet werden. Die Bekämpfung von größeren Mikroorganismen geht vermutlich extrazellulär von statten, genauere Abwehrstrategien sind in dem Zusammenhang allerdings weitgehend ungeklärt [Tsan & Denison, 1980].

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Informationen über relevanten Abwehrmechanismen von humanen PMN und deren Regulation bei der Abwehr hyphaler Pilzstrukturen exemplarisch an dem Hefepilz *Candida albicans* und dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* zu erlangen.

Unter gegebenen Umständen, d.h. typischerweise im Rahmen eines geschwächten Immunsystems, vermag *C. albicans* sehr effektiv Infektionen im Menschen



auszulösen, da es auf unterschiedlicher Weise den Abwehrmechanismen des Wirts entgehen kann. So vermag *C. albicans* beispielsweise spontan, reversibel und in hohen Frequenzen innerhalb desselben Wirts zwischen einer Vielzahl von unterschiedlichen Phänotypen zu wechseln, die anhand der Morphologie unterschieden werden können. Auf diese Weise passt sich *C. albicans* optimal an vorliegende Umweltbedingungen im Wirt an [Slutsky et al., 1985, Hoyer et al., 1998, Calderone & Fonzi, 2001]. Inzwischen ist bekannt, dass dieser Wechsel der Wachstumsformen auch typische, an der Pathogenese beteiligte Charakteristika des Pilzes beeinflusst. Dabei sind besonders die Adhäsionseigenschaften, die Expression von hydrophoben Zelloberflächenmolekülen und die Sekretion von Proteinasen zu nennen [Kennedy et al., 1988]. Der Phänotypenwechsel kann durch unterschiedliche Reize ausgelöst werden. Im Allgemeinen kommen Blastosporen jedoch überwiegend in reichhaltigem Medium vor, während filamentöses Wachstum durch Nährstoffmangel, aber auch durch Serum und weitere spezifische Faktoren ausgelöst werden kann [Braun & Johnson, 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf das Abwehrverhalten von humanen Granulozyten in Abhängigkeit von der vorliegenden Morphologie des Pilzes gelegt. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung bei der effektiven Abwehr von *C. albicans*-Infektionen, da generell die Bekämpfung des hyphalen Phänotyps als komplexer betrachtet wird, als die Bekämpfung von einzelligen Hefezellen [Schuit, 1978]. Obwohl beide Morphotypen von *C. albicans* in infektiösen Läsionen auftreten, wird der morphologische Wachstumswechsel zu den filamentösen Formen sehr stark mit gesteigerter Invasivität assoziiert [Kumamoto and Vines, 2005]. Mehrfach konnte beobachtet werden, dass eine kontinuierliche Elongation der Filamente zu Gewebszerstörung und Invasion führt [Farrell et al., 1983; Zink et al., 1996; Hausauer et al., 2005; Kurzai et al., 2005]. Setzt die Hyphenbildung des Pilzes nach einer Phagozytose durch Makrophagen oder Endothelzellen ein, kann der Pilz durch das Auswachsen aus der Immuneffektorzelle diese töten und so der eigenen Zellyse entgehen [Zink et al., 1996, Phan et al., 2000].

Zusätzlich wurde gezeigt, dass Proteine, die zur Pathogenese von *C. albicans*-Infektionen beitragen, wie sekretierte Asparaginproteasen (SAP4-6) oder Phospholipasen, überwiegend in den filamentösen Formen exprimiert werden [Hube et al., 1994, Hoyer et al., 1998, Staab and Sundstrom, 1998, Staab et al., 1999, Staib

et al., 2000, Naglik et al., 2003, Knechtle et al., 2005]. SAPs sind als lytische Enzyme bekannt, die zum Beispiel eine Invasion in Epithelzellen ermöglichen [Stringaro et al., 1997]. Aktive SAPs können des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Anlagerung, Kolonisation und Penetration von Wirtsgewebe spielen [Hube 1998]. Damit wird die generelle Bedeutung von extrazellulären Proteinasen für die Pathogenese von *C. albicans*-Infektionen deutlich. Aus diesem Grund wurden in unserer Arbeitsgruppe (AG Löffler) wissenschaftliche Untersuchungen zu der Bedeutung von SAPs im Hinblick auf unterschiedliche Pilzmorphologien bei der Interaktion mit humanen PMN aktuell begonnen.

Basierend auf den bisher beschriebenen Beobachtungen stellte sich für die vorliegende Arbeit die grundlegende Frage, ob das Immunsystem zwischen Hefezellen und filamentösen Zellen von *C. albicans* zu differenzieren vermag.

Im Folgenden werden die eigenen Resultate diskutiert, in denen gezeigt werden konnte, dass humane Granulozyten trotz vieler Unterschiede im Abwehrverhalten, beide Morphologien von *C. albicans* mit gleichwertiger Effizienz schädigen können (siehe Kap. 7.3). Des Weiteren zeigten sowohl Hefen als auch Keimschläuche von *C. albicans* eine deutlich eingeschränkte Stoffwechselaktivität in Gegenwart von humanen Granulozyten (siehe Kap. 7.3). Damit wurde gezeigt, dass humane Granulozyten effizient in der Abwehr gegen beide Morphologien von *C. albicans* agieren. Die Beobachtung über die Effizienz der Granulozyten steht in Einklang mit bereits dokumentierten Daten [Baccarini et al., 1985].

## **8.2 Verhalten von humanen PMN in Gegenwart von *C. albicans***

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte mikroskopische Untersuchungen haben eröffnet, dass Hefen und Keimschläuche eines identischen *C. albicans*-Stammes vollkommen unterschiedliche Reaktionen der humanen Granulozyten induzieren. Diese Beobachtung konnte durch Chemotaxis-Experimente und Zytokinmessungen (siehe Kap. 7.2), gestützt werden, die des Weiteren belegten, dass Keimschläuche von *C. albicans* im Vergleich zu Hefen bei humanen Granulozyten zu stärkeren Reaktionen führen.

Untersuchungen der Interaktion zwischen humanen Granulozyten und den beiden Morphotypen von *C. albicans* im Echtzeit-Weitfeld-Mikroskop, sowie im

Transmissions-Elektronen-Mikroskop (siehe Kap. 7.1), haben gezeigt, dass *C. albicans* Filamente gezielte Bewegungen von humanen Granulozyten auslösen. Diese Beweglichkeit der Granulozyten führte, wie schon von Diamond und Kollegen [Diamond et al., 1978 Feb] beschrieben, zur Ausbildung eines engen Kontaktes zu den Pilzfilamenten und schließlich zu einer kompletten Umhüllung der Keimschläuche. In diesem Zusammenhang wurde auch beobachtet, dass zum Teil mehrere Granulozyten gemeinsam einen Keimschlauch attackierten. Während dieser engen Interaktion verblieben die Granulozyten über mehrere Stunden lebensfähig, was durch eine kontinuierliche Bewegung entlang der Keimschläuche nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion der Granulozyten mit *C. albicans* verlief nur im Fall der Keimschläuche mit dieser intensiven Zellverformung der Immuneffektorzelle. Wurden Hefen von *C. albicans* mit Granulozyten kokkubiert, verhielten sich die humanen Granulozyten vergleichsweise passiv. Zwar konnte auch in diesen Versuchen eine Mobilität der Granulozyten beobachtet werden, die die Vitalität der Zellen belegte, jedoch waren diese Bewegungen nicht gezielt auf die Hefen zu gerichtet, wie es bei den Keimschläuchen der Fall zu sein schien. Es konnte keine gezielte Interaktion dokumentiert werden, die Granulozyten schienen von den Hefen nicht angelockt zu werden. Selbst wenn Granulozyten mit Hefen und Keimschläuche gleichzeitig interagieren konnten, attackierten die Granulozyten ausschließlich die filamentösen Formen (siehe Abb. 7.1). Diese Versuche erbrachten erste Belege, dass die Interaktion von Granulozyten und Keimschläuchen zu einer spezifischen Aktivierung der Immunzellen führen musste, da der nachfolgende Angriff auf die Pilzzellen nur gegen die Keimschläuche gerichtet war und die Hefen verschont zu bleiben schienen.

### **8.2.1 *C. albicans* gibt chemotaktische Signale an die Umgebung ab**

Auf der Suche nach den Ursachen für dieses unterschiedliche Verhalten der Granulozyten konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Filamente signifikant stärkere chemotaktische Signale für humane Granulozyten als die entsprechenden Hefeformen produzierten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Filamente eine deutlich stärkere Ausschüttung des chemotaktischen Faktors Interleukin-8 in humanen Granulozyten hervorriefen als die Hefen (siehe Kap. 7.2).

Die Granulozyten Mobilität, abhängig von der Gegenwart der Hefen oder der Filamente von *C. albicans*, könnte somit in erster Linie auf die beobachtete, stärkere chemotaktische Wirkung der Filamente auf die PMN zurückzuführen zu sein.

Entsprechende Folgesignale der Granulozyten, wie die Interleukin-8-Produktion, führen aufgrund ihrer wiederum chemotaktischen Wirkung zu einer Verstärkung der PMN-Rekrutierung in Gegenwart von *C. albicans*-Keimschläuchen.

Es ist bereits bekannt, dass *C. albicans* chemotaktische Faktoren an die Umgebung abgibt. Von anderen Arbeitsgruppen wurden Analysen durchgeführt, die Zellwandbestandteile und Peptide des Pilzes auf chemotaktisch wirkende Substanzen hin untersuchten [Edens et al., 1999; Sato et al., 2006, Cutler, 1977].

Interessante Befunde in diesem Bereich wiesen nach, dass das Integrin  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1, CD11b/CD18) auf der Granulozytenoberfläche für die Interaktion mit *C. albicans* eine wichtige Rolle spielt [Forsyth & Mathews, 1996, Forsyth et al., 1998]. Allgemein ist bisher bekannt, dass  $\alpha_M\beta_2$  an das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) binden kann und damit die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen vermittelt. Des Weiteren vermag  $\alpha_M\beta_2$  allerdings eine Vielzahl weiterer Liganden zu erkennen. Dabei sind besonders Plasmaproteine wie Fibrinogen oder C3bi, die auf opsonierten Mikroorganismen die Erkennung und somit die Phagozytose vermitteln, zu nennen. Aber auch weitere extrazelluläre Matrixproteine, Kohlenhydratstrukturen ( $\beta$ -Glukan ähnliche) und viele weitere mikrobielle Produkte werden von  $\alpha_M\beta_2$  erkannt [Zhou et al., 1994, Issekutz et al., 1999].

Das vielfältige Integrin  $\alpha_M\beta_2$  vermittelt die Wanderung von Leukozyten zum Infektionsherd, die Adhäsion an den Pilz und letztendlich die Phagozytose und Abtötung des Pathogens.  $\alpha_M\beta_2$  wurde als bedeutender Rezeptor bei der *C. albicans*-Erkennung identifiziert, allerdings scheint dies interessanter Weise Morphotypspezifisch zu sein [Edens et al., 1999]. Somit wird erneut das in der vorliegenden Arbeit vielfach beschriebene, differenzierte Verhalten von humanen PMN den jeweiligen Pilzmorphologien gegenüber untermauert. Leukozyten können den  $\alpha_M\beta_2$  Rezeptor für die Adhärenz an filamentöse *C. albicans* Zellen nutzen, wobei der relevante Ligand lange unbekannt war [Soloviev et al., 2007]. Inzwischen wurde Pra1p, ein Fibrinogen-Bindeprotein, das der Pilz als adhäsives Substrat für die Kolonisation produziert und welches mit der Pilzzellwand assoziiert ist, aber vom Pilz auch in das umgebende Medium abgegeben wird, als entscheidender Ligand für das  $\alpha_M\beta_2$  Integrin beschrieben [Cheung et al., 1991, Sepulveda et al., 1998]. Lösliches

Pra1p wird als ein weiterer Schutzmechanismus von *C. albicans* gegenüber der Immunabwehr gesehen, da durch die Absättigung des  $\alpha_M\beta_2$  Integrinrezeptors eine Leukozytenadhäsion erschwert wird. In der zugrunde liegenden Arbeit durchgeführte Analysen zeigten, dass eine enge Kontaktaufnahme zwischen Granulozyten und Keimschläuchen bereits nach wenigen Minuten vorliegt, so dass nicht von einer verringerten Leukozytenadhäsion ausgegangen wird. Da Pra1p allerdings ausschließlich von hyphalen Strukturen produziert und sezerniert wird, könnte dieser lösliche Ligand einen wichtigen, bisher unbekanntem chemotaktischen Reiz für die Granulozyten darstellen [Chaffin et al., 1998, Geiger et al., 2004, Soloviev et al., 2007].

Das hyphen-spezifische Pra1p-Protein könnte somit eine wichtige Rolle bei der chemotaktischen Anziehung der Granulozyten spielen. Allerdings haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass *C. albicans* auch noch weitere Faktoren produzieren muss, die auf Granulozyten chemotaktisch wirken. Diese Feststellung ergab sich aus Chemotaxis-Versuchen mit einer erhöhten Hefen-Zahl von *C. albicans* (siehe Kap. 7.2), in denen ebenfalls eine deutliche Anziehung der Granulozyten beobachtet werden konnte. Da hier als Wirksubstanz nach Literaturdaten Pra1p nicht in Frage kommt, muss es sich entweder um einen chemotaktischen Faktor handeln der von beiden *C. albicans*-Morphotypen produziert wird, oder um einen Faktor der zwar vergleichsweise schwach wirkt, aber nur von Hefen abgegeben wird.

In zukünftigen Untersuchungen wäre es daher interessant herauszufinden, ob Hefen und Keimschläuche von *C. albicans* nur unterschiedliche Konzentrationen oder eine unterschiedliche Zusammensetzung chemotaktischer Substanzen produzieren. Könnte man diese chemotaktischen Substanzen und eventuell ihre Wirkmechanismen näher definieren, könnten damit neue therapeutische Ansätze für die Bekämpfung von *C. albicans*-Infektionen zur Verfügung stehen. Da sowohl Hefen, als auch Hyphen von *C. albicans* bei Infektionen vorkommen [Felk et al., 2002], wäre es von Vorteil, wenn man durch eine gezielte medikamentöse Behandlung bei Risikopatienten die chemotaktische Wirkung von *C. albicans*-Hefen auf Granulozyten deutlich erhöhen könnte. Damit wären PMN schneller vor Ort und könnten die Hefen bereits vor ihrer Auskeimung in die invasive Hyphenform attackieren und eliminieren [Kumamoto & Vines, 2005].

### **8.2.2 Granulozyten gehen einen engen Kontakt zu den Keimschläuchen von *C. albicans* ein**

Bereits Zhong et al., und Fradin et al. haben beschrieben, dass entscheidende Wirkmechanismen der Granulozyten, wie z.B. die Wachstumsinhibierung, von einem direkten Kontakt zu den Pilzzellen abhängen [Zhong et al., 2003, Fradin et al., 2005]. Daher wurde diese, ebenfalls selbst dokumentierte (siehe Abb. 7.1), enge Kontaktaufnahme der PMN mit *C. albicans*-Keimschläuchen gehemmt (siehe Kap. 7.4), um somit die Relevanz der Kontaktaufnahme beurteilen zu können. Durch Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren des Zytoskeletts wurde die Bedeutung der Aktinpolymerisierung, und der davon abhängigen Mobilität der Zellen für die antimikrobielle Effizienz der Granulozyten deutlich. Wurden die Granulozyten mit Cytochalasin D, das die Aktinpolymerisierung verhindert, vorinkubiert, verblieben sie zwar lebensfähig, zeigten allerdings wie erwartet keine gezielte Mobilität in Richtung der Pilzzellen; selbst wenn es sich dabei um Keimschläuche handelte. Diese durch den Inhibitor induzierte, bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebene [Zhong et al., 2003, Brinkmann et al., 2004, Fradin et al., 2005], verminderte Mobilität der Granulozyten resultierte in einem Ausbleiben der wachstumsinhibierenden Wirkung (siehe Kap. 7.4). Eigene Experimente hierzu konnten zusätzlich zeigen, dass durch die Inhibierung der gezielten Mobilität auch die Effizienz der Granulozyten, Keimschläuche von *C. albicans* zu schädigen, vollkommen aufgehoben wurde (siehe Kap. 7.4). Dieser Befund ist besonders interessant, da die Gegenwart von Cytochalasin D keinen Effekt auf die Abtötungseffizienz gegenüber Hefen von *C. albicans* hatte (siehe Kap. 7.4). Eine Interpretation dieser Ergebnisse legt nahe, dass Granulozyten zusätzlich zu den kontaktabhängigen [Zhong et al., 2003, Fradin et al., 2005] auch über antifungale Effektormechanismen verfügen müssen, die eine Bekämpfung von *C. albicans*-Hefen ermöglichen, ohne einen zellulären Kontakt vorauszusetzen.

### **8.3 Die Bedeutung des MEK/ERK-Signalwegs von humanen PMN bei Interaktionen mit *C. albicans***

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege bei der Regulierung der Granulozytenreaktion auf *C. albicans*

untersucht. Dabei lag der Fokus auf einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen, den Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs). Diese Familie beinhaltet die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERK44/42), die p38 MAPK und die c-Jun N-terminalen Kinase/Stress-aktivierten Protein-Kinase (JNK/SAPK). Alle drei MAP-Kinase-Familien werden durch vorgelagerte Proteinkinasen phosphoryliert und somit aktiviert [Dong et al., 2002].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade eine zentrale Rolle bei der Abwehr von humanen Granulozyten gegen *C. albicans* spielt. Untersuchungen zur Bedeutung weiterer MAP-Signal-Kaskaden, wie den p38 MAPK- und den JNK-Signalwegen (siehe Kap. 7.5) ergaben, dass bei humanen Granulozyten keine Notwendigkeit einer Aktivierung für eine effektive Bekämpfung des Pilzes besteht. Wurde der MEK/ERK-Signalweg durch Inhibitoren, die an unterschiedlichen Regulationspunkten der Kaskade wirkten blockiert, konnte keine gezielte Mobilität der Granulozyten in Gegenwart von *C. albicans*-Filamenten mehr beobachtet werden (siehe Tab. 7.1) und die Schädigungseffizienz gegenüber den Filamenten blieb vollständig aus (siehe Abb. 7.11). Ähnliches wurde bereits bei Makrophagen beobachtet, bei denen der MEK/ERK-Signalweg als entscheidend für die Endozytose von *C. albicans* identifiziert wurde [Ibata-Ombetta et al., 2001]. Bei Granulozyten konnte bereits Zhong et al. eine Korrelation zwischen dem MEK/ERK-Signalweg und der Wachstums-inhibierenden Wirkung auf *C. albicans*, der Phagozytose und der gerichteten intrazellulären Granula-Mobilisierung beschreiben [Zhong et al., 2003].

Eine Blockierung der MEK/ERK-Signalkaskade zeigte allerdings keinen Effekt auf die Schädigungseffizienz der Granulozyten gegenüber Hefen (siehe Kap. 7.5). Diese Beobachtung lässt sich wiederum in Einklang mit der Aussage der Arbeitsgruppe um Hii et al. bringen, die der ERK-Signalkaskade nur eine geringe Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität von Granulozyten zuspricht [Hii et al., 1999].

Um die beschriebene Relevanz der MEK/ERK-Signalkaskade zu konkretisieren, wurden Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. Interaktionen von Granulozyten mit unterschiedlich generierten Hefen und Keimschäuchen von *C. albicans* führten innerhalb von wenigen Minuten zu einer nachweisbaren Phosphorylierung von ERK1/2 der humanen PMN, allerdings nur bei Keimschläuchen. Hefen hingegen lösten, vergleichbar mit der negativen Kontrolle, keine nachweisbare Phosphorylierung von ERK1/2 aus (siehe Abb. 7.12). Somit

wurden in der vorliegenden Arbeit deutliche Anhaltspunkte erlangt, dass die MEK/ERK-Signalkaskade ein zentraler Weg für die Induktion der Abwehr gegen filamentösen *C. albicans* Zellen ist; die Abwehrmechanismen gegen Hefen hingegen scheinen weitestgehend unabhängig davon reguliert zu sein.

Die Bedeutung einer Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade ausschließlich bei der Abwehr gegen Keimschläuche ergänzt die Resultate der Inhibierungsexperimente mit Cytochalasin D (siehe Kap. 7.4), aus denen hervorging, dass eine effektive Mobilität der Granulozyten eine unbedingte Voraussetzung für eine effektive Schädigung der *C. albicans* Keimschläuche darstellt. Damit wurde erneut belegt, dass humane Granulozyten über unterschiedliche Aktivierungs- und Abwehrmechanismen für Hefen und Keimschläuche von *C. albicans* verfügen.

### **8.3.1 Morphotypische Eigenschaften des Pilzes legen die Aktivierungsmechanismen bei humanen PMN fest**

Um Hinweise auf relevante Liganden von *C. albicans* für die Aktivierung von humanen Granulozyten zu erhalten, wurden Untersuchungen mit Pilzmutanten durchgeführt, die nur in einer bestimmten morphologischen Form wachsen konnten. Es ist bekannt, dass die zentralen Transkriptionsregulatoren Efg1 und Cph1 die Expression vieler typischer Virulenzfaktoren von *C. albicans* kontrollieren. Die Hefe-Filament Morphogenese wird durch ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen reguliert. In Gegenwart von Serum wird die hyphale Entwicklung durch die Aktivierung des  $\beta$ -helix-loop-helix Transkriptionsfaktors Efg1 induziert. Unter Mangelkonditionen wird die hyphale Entwicklung durch den Transkriptionsfaktor Cph1 ausgelöst. Eine Deletion dieser beiden Regulatoren verhindert filamentöses Wachstum, so dass weder Hyphen noch Pseudohyphen gebildet werden können. Damit kann bei solchen Deletions-Doppel-Mutanten die Bildung von Filamenten durch keinen bekannten Stimulus, eingeschlossen Serum und Makrophagen, induziert werden [Lo et al., 1997; Stoldt et al., 1997].

Wird bei *C. albicans* der Regulator Ras1 des MAP Kinase Signalwegs deletiert, kann bei der Mutante ebenso keine Hyphenbildung mehr induziert werden, allerdings wird eine Bildung von Pseudohyphen beobachtet [Feng et al., 1999].



Der generelle Transkriptionsrepressor TUP1 reprimiert Gene, die filamentöses Wachstum initiieren. Induzierende Umweltbedingungen können diese Repression wiederum aufheben. Wird bei *C. albicans* TUP1 detektiert, dann kann nur noch filamentöses Wachstum nachgewiesen werden [Braun & Johnson, 1997, Braun & Johnson, 2004].

Wie erwartet, induzierten in der vorliegenden Arbeit die *C. albicans*-Mutanten  $\Delta ras1$  [Feng et al., 1999] und  $\Delta cph1/efg1$  [Lo et al., 1997], die jeweils die Keimschlauch-Form nicht ausbilden können, keine ERK abhängige Aktivierung von humanen PMN (siehe Abb. 7.14). Dabei erwies es sich als belanglos, ob die Mutanten unter Hefe- oder Keimschlauch-fördernden Bedingungen generiert worden waren. Diese Befunde bestätigen, dass der beschriebene Aktivierungsprozess über den MEK/ERK-Signalweg einerseits spezifisch für die jeweilige Morphologie des Pilzes ist und nicht von den Kultivierungsbedingungen abhängt und andererseits auch keinen Einfluss auf die Aktivierung der Granulozyten im Rahmen einer Abwehr gegen Hefen oder Pseudohyphen nimmt. Unerwarteterweise zeigte aber auch die *C. albicans*-Mutante  $\Delta tup1$ , die ausschließlich in filamentöser Form wächst [Braun & Johnson, 1997], kein Auslösen einer ERK Phosphorylierung (siehe Abb. 7.14). Des Weiteren konnte kein Umfließen des Pilzes durch humane Granulozyten beobachtet werden (siehe Kap. 7.15 B), wie es bei Wildtypfilamenten der Fall gewesen ist (siehe Kap. 7.15 C). In der Literatur dokumentierte Beobachtungen, von einer deutlich geringeren Infektiosität der *C. albicans*-Mutante  $\Delta tup1$  im Mausmodell [Braun & Johnson, 1997, Braun & Johnson, 2004], korrelieren mit den eigenen Befunden einer abgewandelten Interaktion humaner PMN mit der  $\Delta tup1$ -Mutanten im Vergleich zur Interaktion mit Wildtypfilamenten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der *cph1/cph1 efg1/efg1* Doppelmutante gemacht, bei der eine Avirulenz im Maus-Infektionsmodell festgestellt wurde [Lo et al., 1997; Stoldt et al., 1997]. Diese Resultate bestätigen die Vermutung, dass nicht nur der filamentöse Phänotyp, sondern vielmehr die morphologische Plastizität einen entscheidenden Beitrag für die Virulenz von *C. albicans* darstellt [Liu, 2002]. Eine mögliche detaillierte Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den  $\Delta tup1$ -Keimschläuchen und den Wildtyp-Keimschläuchen liefern bereits publizierte Daten [Braun et al., 2000], die beschreiben, dass Filamente von  $\Delta tup1$ -Deletionsmutanten den Wildtyp-Filamenten nicht exakt ähneln, sondern vielmehr deutliche Unterschiede aufweisen. Dies basiert auf der Beobachtung, dass TUP1 nicht ausschließlich Gene für die Filament-Bildung

reguliert, sondern noch eine Vielzahl weiterer Gene, die unter anderem auch die Virulenz beeinflussen, kontrolliert [Braun et al., 2000].

Der entscheidende Stimulus für die Granulozytenaktivierung scheint im Vergleich zu den Wildtyp-Filamenten auf den  $\Delta tup1$ -Filamenten nicht, oder nicht in ausreichender Menge vorhanden zu sein. Basierend auf den gewonnenen Daten wäre ein Vergleich der Zellwandzusammensetzung und des Proteinexpressionsmusters zwischen dem Wildtypen und der  $\Delta tup1$ -Mutante von großem Interesse, um somit die relevanten Faktoren für die Interaktion von *C. albicans*-Keimschläuchen mit humanen Granulozyten identifizieren zu können. Ein spannender Ansatz hierzu könnte die Untersuchung der beta-Glukan Komponenten der Zellwand von Wildtyp-Hefen, Wildtyp-Keimschläuchen und  $\Delta tup1$ -Keimschläuchen sein, da seit kurzem die Bedeutung des beta-Glukan-Rezeptors Dectin-1 auch bei Granulozyten verstärkt diskutiert wird [Kennedy et al., 2007]. Dabei ist allerdings noch unklar, welche Präsentation und Zusammensetzung von beta-1,3- und beta-1,6-Glukanen in der Zellwand von *C. albicans*-Hefen und -Keimschläuchen eine Aktivierung der Granulozyten über Dectin-1 ermöglichen [Heinsbroek et al., 2005, Rubin-Bejerano et al., 2007].

Bisher wurde das Verhalten von humanen Granulozyten in Abhängigkeit von der Morphologie von *C. albicans* genau betrachtet und diskutiert. Dabei wurde die enge Kontaktaufnahme, basierend auf einer Aktinpolymerisierung und ausgelöst durch den MEK/ERK-Signalweg, zu Keimschläuchen von *C. albicans* als bedeutender Schritt bei der Bekämpfung des Pilzes identifiziert. Um die direkten PMN-Abwehrmechanismen gegen Hefen und Keimschläuche näher zu charakterisieren, wurde die Bedeutung von NETs und die des oxidativen Bursts im Folgenden näher analysiert.

#### **8.4 NET-Bildung von humanen PMN in Gegenwart von *C. albicans***

Neueste Beobachtungen haben gezeigt, dass Granulozyten DNA-Strukturen mit Histonen und lysosomalen Enzymen (NETs genannt) auf Eindringlinge transferieren können und somit auch größere Mikroorganismen erfolgreich und effektiv angegriffen werden [Brinkmann et al., 2004, Urban et al., 2006, Fuchs et al., 2007]. Allerdings werden diese NETs nur von vorstimulierten Granulozyten produziert und selbst dann

nur von einem gewissen Prozentsatz, so dass die physiologische Relevanz nicht unumstritten ist. Experimente in der vorliegenden Arbeit zur Bedeutung der NET-Bildung (siehe Abb. 7.16) bei der Pilz-Bekämpfung blieben ergebnislos, da die Bildung dieser DNA-Strukturen nicht in einem quantifizierbaren Maße induziert werden konnte, weder in Gegenwart von *C. albicans*-Hefen noch von -Keimschläuchen (siehe Kap. 7.6.1). Somit wurde unter den verwendeten Versuchsbedingungen zwar eine Pilzschädigung durch PMN nachgewiesen, allerdings schienen NETs hierzu keinen Beitrag zu leisten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass humane PMN über eine große Bandbreite an effektiven Abwehrstrategien gegen Pilze verfügen, die kontrolliert und zum Teil auch unabhängig von einander eingesetzt werden können [Weiss, 1989].

### **8.5 Relevanz des Oxidativen Bursts bei humanen PMN für Abwehr gegen *C. albicans***

Die Produktion von Sauerstoffradikalen gehört neben der Phagozytose und der Degranulation von antimikrobiellen Peptiden zu den zentralen Effektormechanismen von Granulozyten, die entscheidend zur Bekämpfung von Infektionen beitragen. Sauerstoff-Intermediate werden von dem NADPH-Oxidase-Komplex nach Stimulation der Granulozyten generiert [Quinn & Gaus, 2004]. Die Bedeutung der Sauerstoffradikalproduktion für die Immunabwehr wird besonders durch das Krankheitsbild der chronischen Granulomatose verdeutlicht. Den genetischen Hintergrund dieser Erkrankung bilden Mutationen in den Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes, sodass es zu Funktionsverlusten des Enzyms kommt. Patienten mit dieser Erkrankung sind sehr empfänglich für unterschiedliche Erreger, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* oder *Aspergillus fumigatus* [Marciano 2004, Heyworth et al., 2003, Winkelstein et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Sauerstoffradikalproduktion von humanen PMN in Gegenwart von Hefen und Keimschläuchen von *C. albicans* durchgeführt. Granulozyten wiesen beim Oxidativen Burst ein differenziertes Verhalten auf, indem sie eine starke Reaktion auf Keimschläuche erzeugten, aber nur eine vergleichsweise schwache Reaktion in Kokultur mit Hefen zeigten (siehe Abb. 7.17). Die Unterschiede in der ROI-Produktion waren auf

Oberflächenspezifitäten der jeweiligen Morphologien zurückzuführen und standen nachweislich nicht im Zusammenhang mit der größeren Zellmasse der Keimschläuche (siehe Abb. 7.18) oder unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten von Hefen und Keimschläuchen. Umso erstaunlicher war das Resultat, dass Sauerstoffradikale trotz differenzierter Regulation keinen signifikanten Einfluss auf die Schädigung von Hefen oder aber Keimschläuchen zeigten (siehe Kap. 7.25). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass *C. albicans* über mehrere antioxidative Mechanismen verfügt, die diese mangelnde Sensitivität des Pilzes gegenüber Sauerstoffradikalen erklären könnten. Zum Beispiel exprimiert *C. albicans* eine Katalase, deren Deletion zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber extrazellulären Peroxiden führt [Wysong et al., 1998]. Bei *C. albicans* wurden des Weiteren mehrere Superoxiddismutasen (SOD1-6) charakterisiert [Martchenko et al., 2004, Fradin et al., 2005, Lamarre et al., 2001, Rhie et al., 1999]. Um die Bedeutung dieser Schutzmechanismen zu beurteilen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Schädigungseffizienz der Granulozyten exemplarisch für eine  $\Delta sod5$ -Deletions-Mutante von *C. albicans* untersucht. SOD5 wird bei hyphalem Wachstum hochreguliert, wie auch bei osmotischem oder oxidativem Stress [Martchenko et al., 2003]. Allerdings konnte keine verstärkte Sensitivität dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm beobachtet werden (siehe Abb. 7.27). Da bei der Mutante nicht alle SODs deletiert waren, konnten eventuell die verbliebenen SODs die Sauerstoffradikale in ausreichendem Maß inaktivieren. Eine entsprechende Beobachtung bei der  $\Delta sod5$ -Deletions-Mutante wurde bereits bezüglich der Sensitivität gegenüber Makrophagen beschrieben [Martchenko et al., 2003].

Des Weiteren wird angenommen, dass der Pilz zusätzlich über nicht enzymatische Abwehrstrategien gegen Sauerstoffradikale in Form der Zellwandzusammensetzung verfügt. Für Mannan aus der Zellwand von *C. albicans* konnte nachgewiesen werden, dass es die Kapazität besitzt, Sauerstoffradikale zu neutralisieren [Krizkova et al., 2001].

Die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Beobachtungen, dass humane Granulozyten *C. albicans*-Zellen unabhängig von Sauerstoffradikalen effektiv schädigen (siehe Kap. 7.6.2), ist übereinstimmend mit klinischen Beobachtungen an Patienten mit chronischer Granulomatose [Odel & Segal, 1991, Winkelstein et al., 2000]. Diese Patienten, die keine oder nur eingeschränkt Sauerstoffradikale produzieren können, erkranken nicht gehäuft an *C. albicans*-Infektionen. Um so

überraschender war das Resultat von Experimenten mit vorstimulierten Granulozyten, welches ergab, dass Sauerstoffradikale im Falle einer effektiven Vorstimulation mit dem synthetischen Stimulus PMA durchaus bei der Schädigung von *C. albicans*-Hefen und -Keimschläuchen von Relevanz sein können (siehe Abb. 7.30). Diese Beobachtung konnte allerdings bisher nicht mit Hilfe physiologischer oder medikamentöser Stimuli nachgestellt werden. Daher kann nach dem aktuellen Erkenntnisstand keine endgültige Aussage über die Bedeutung von Sauerstoffradikalen von vorstimulierten Granulozyten bei der Bekämpfung von *C. albicans* getroffen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eindeutig gezeigt, dass die Produktion von Sauerstoffradikalen bei nicht vorstimulierten Granulozyten keine oder nur eine geringe Bedeutung bei der Schädigung von beiden *C. albicans*-Morphotypen hat.

Somit kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen keine abschließende Aussage über die entscheidenden Abwehrstrategien von humanen Granulozyten gegen *C. albicans* getroffen werden. Allerdings wurde gezeigt, dass die Granulozyten Reaktionen nicht nur aufgrund der vorhandenen Pilzmorphologien variierten, sondern auch von Reizen aus der Umgebung moduliert wurden.

## **8.6 Das Immunsystem unterscheidet zwischen den hyphalen und Hefeformen bei *C. albicans***

Basierend auf den beschriebenen Experimenten wurde versucht eine Antwort auf die Frage zu finden, ob das Immunsystem im Stande ist, zwischen Hefezellen und filamentösen Zellen von *C. albicans* zu differenzieren. Dafür sind in der Literatur bereits einige Anzeichen zu finden. So konnte zum Beispiel bei dendritischen Zellen (DCs), die überwiegend regulatorische Funktionen ausüben, unterschiedliche Zytokinproduktionen in Abhängigkeit von der vorliegenden Pilzmorphologie nachgewiesen werden [d'Ostiani et al., 2000, Banchereau et al., 2000, Pulendran et al., 2001, Kurzai et al., 2005]. Des Weiteren ist aber auch beschrieben, dass DCs Hefen und Keimschläuche von *C. albicans* mit einer vergleichbaren Effizienz abtöten können. Beide morphologischen Formen des Pilzes führen zu einer Ausreifung der DCs, was durch Untersuchungen der typischen Reifemarker nachgewiesen wurde. Letztendlich wurde auch eine effektive Stimulierung einer Th1-Reaktion unabhängig von der vorliegenden Pilzmorphologie beobachtet [Romagnoli et al., 2003]. Somit

sind humane DCs sehr effektiv bei der Abwehr beider Morphologien von *C. albicans*, zeigen aber ein differenziertes Verhalten in der Ausführung.

Anhand von Untersuchungen muriner Makrophagen wurde gezeigt, dass der Toll-like-Receptor 4 (TLR4) nach *C. albicans*-Stimulation die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen vermittelt, während eine Erkennung durch den TLR2 überwiegend zu einer Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen führt. Interessanterweise konnten nach dem Auskeimen des Pilzes keine TLR4-vermittelten proinflammatorischen Signale mehr nachgewiesen werden [van der Graaf et al., 2005]. Dieses beobachtete Verhalten von Makrophagen verdeutlicht erneut die Effizienz eines Phänotypenwechsels von *C. albicans* als Schutz gegen die Wirtsabwehr. Weitere Untersuchungen an humanen Monozyten haben gezeigt, dass filamentöse Pilzzellen von *C. albicans* nach einigen Stunden Kultivierung einen löslichen Faktor abgeben, der die Produktion des proinflammatorischen Interleukin-12 verhindert [Tang et al., 2004]. Das Immunsystem reagiert somit in Abhängigkeit von der vorliegenden Pilzmorphologie durchaus spezifisch, wobei die Reaktion auf filamentöse Zellen deutlich intensiver erscheint als auf Hefen. Dieses verstärkte Abwehrverhalten gegen die invasiven *C. albicans* Hyphen erscheint sinnvoll, wenn man die effektiven Schutzmechanismen der Filamente bedenkt.

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse über das differenzierte Verhalten von humanen Granulozyten in Abhängigkeit von der vorliegenden Morphologie von *C. albicans* stehen somit in Einklang zu Aussagen in der Literatur über die Reaktionen anderer Immuneffektorzellen.

Bisher gab es nur wenige Untersuchungen an humanen Granulozyten, die die Fähigkeit dieser terminal differenzierten Zellen auf eine gezielte Reaktion auf die jeweilige Wachstumsform von *C. albicans* konkreter beleuchtet hätten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass humane Granulozyten ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Pilzen in Abhängigkeit von bestimmten Umweltreizen, wie der Dimensionalität der Umgebung, aufzeigen [Behnsen et al., 2007]. Außerdem gibt es Untersuchungen, die sich mit der Reaktion von humanen Granulozyten auf phänotypische Sekretionsproteine befasst haben und dabei bereits deutliche Unterschiede im Granulozytenverhalten gegenüber Hefen und Keimschläuchen ausmachen konnten [Soloviev et al., 2007].

Genauere Betrachtungen des Abwehrverhaltens humaner PMN führten in der vorliegenden Arbeit insbesondere für die Abwehr gegen Keimschläuche von *C.*

*albicans* zu neuen Erkenntnissen über involvierte und relevante Mechanismen. Das konkrete Vorgehen der humanen Granulozyten bei der Abwehr gegen Hefen von *C. albicans* wurde ebenfalls untersucht, jedoch blieben hier noch viele Fragen offen, die weiterer Untersuchungen in Zukunft bedürfen werden.

### **8.7 Die Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*-Infektionen**

Das Auftreten von *Aspergillus fumigatus*-Infektionen stellt besonders bei immungeschwächten Patienten ein großes klinisches Problem dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Immunabwehr gegen diesen ubiquitären Schimmelpilz untersucht, um mit Hilfe neuer Erkenntnisse über das Abwehrverhalten von Granulozyten, betroffenen Patienten schneller und effektiver helfen zu können. Die gegenwärtig zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden für den Nachweis von invasiven pulmonalen Aspergillosen weisen eine geringe Sensitivität auf [Lass-Flörl et al., 2001]. Voraussetzung für eine schnelle Genesung des Patienten ist jedoch eine möglichst frühzeitige Therapie. Eine rechtzeitige Erkennung ist aufgrund der rapiden Entwicklung des Pilzes, einem Mangel an klinischen Symptomen und einer geringen Isolationsrate aus Patientenproben zusätzlich erschwert [McNeil et al., 2001, Shibuya et al., 2004]. Bei immunkompetenten Personen ist das Immunsystem ausreichend für die Abwehr gegen *A. fumigatus* gerüstet. Makrophagen sind hauptsächlich für die Eliminierung der Konidien verantwortlich und Granulozyten für die der hyphalen Formen von *A. fumigatus* [Schaffner et al., 1982]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse harmonieren mit der bisherigen Beschreibung einer Aufgabenteilung zwischen diesen beiden Immuneffektorzellen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Granulozyten als Reaktion auf Keimschläuche von *A. fumigatus* eine stärkere ROI Produktion ausweisen als auf Reaktion auf die entsprechenden Konidien (siehe Abb. 7.34). Auch das chemotaktische Potential der *A. fumigatus*-Keimschläuche erwies sich für die Granulozyten als signifikant stärker als das der Konidien (siehe Abb. 7.33). Interessanterweise konnte aber, ähnlich wie bereits bei Behnsen et al. [2007] beschrieben, beobachtet werden, dass Granulozyten die Konidien von *A. fumigatus* in großen Mengen einsammeln (siehe Kap. 7.7), um sie dann zu phagozytieren. Diese Beobachtung entspricht Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass Granulozyten zwar in erster Linie für die Bekämpfung von

Hyphen zuständig sind, aber durchaus auch ruhende und angeschwollene Konidien von *A. fumigatus* phagozytieren können [Richardson et al., 1991, Sturtevant & Latge, 1992].

### **8.8 Die Interaktion von Granulozyten mit *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen**

Bei der Interaktion von humanen Granulozyten mit Keimschläuchen von *A. fumigatus* konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie bei der Interaktion der Granulozyten mit den Keimschläuchen von *C. albicans* eine deutliche Wachstumsinhibierung des Pilzes bewirkt wird (siehe Kap. 7.11).

Des Weiteren nehmen die Granulozyten, ebenso wie bei *C. albicans* gezeigt, sehr engen Kontakt zu den Keimschläuchen auf (siehe Abb. 7.31). So konnten erste Schäden an den Pilzzellen bereits nach einer Stunde Koinkubation beobachtet werden. Bestätigt wird diese Beobachtung von Schaffner et al., worin gezeigt wurde, dass Granulozyten die Bekämpfung von *A. fumigatus* Hyphen über eine enge Bindung und die Sekretion toxischer Komponenten vermitteln [Schaffner et al., 1982], zu denen auch NETs gehören könnten [Brinkmann et al., 2004]. Die erhaltenen Ergebnisse legen jedoch nahe (siehe Kap. 7.8), dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen, wie das RPMI-Medium mit fetalem Kälberserum oder die relativ geringen Infektionsraten (MOI = 1-3), die Induktion der NET-Bildung zu gering war, um entscheidenden Einfluss auf die Bekämpfung der Keimschläuche nehmen zu können.

### **8.9 Oxidativer Burst zur Schädigung von *Aspergillus fumigatus***

Bei Experimenten in denen die Sauerstoffradikalproduktion der Granulozyten in Gegenwart des Pilzes gemessen wurde, konnte ausschließlich für Keimschläuche von *A. fumigatus* eine deutliche Reaktion nachgewiesen werden (siehe Abb. 7.34). Umso erstaunlicher war das Resultat von Untersuchungen der Pilzschädigung, in denen kein Effekt eines Radikalfängers bzw. NADPH-Oxidase-Hemmers auf die Schädigungseffizienz der Granulozyten festgestellt wurde (siehe Abb. 7.35). Auch eine Verstärkung des Oxidativen Bursts durch Mycophenolat erhöhte die Schädigungseffizienz der Granulozyten nicht nachweisbar (siehe Kap. 7.12). Diese



Befunde lassen vermuten, dass die Produktion von Sauerstoffradikalen nicht der entscheidende Mechanismus für die Bekämpfung von *A. fumigatus*-Keimschläuchen ist. Allerdings wurde bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen publiziert, dass Sauerstoffradikale wichtig für die generelle Bekämpfung von *A. fumigatus* sind und dass *A. fumigatus* über vielfältige Detoxifizierungsmechanismen dafür verfügt [Morgenstern et al., 1997, Philippe et al., 2003, Roos et al., 2003]. In Vitro-Studien haben gezeigt, dass Hyphen von *A. fumigatus* durch Wasserstoffperoxid effektiv abgetötet werden. Andererseits verfügt der Pilz über Katalasen, die Wasserstoffperoxid effektiv neutralisieren können [Diamond et al., 1978, Diamond & Clark, 1982, Hamilton & Holdom, 1999, Shibuya et al., 2006]. *A. fumigatus* besitzt drei aktive Katalasen, wobei eine in Konidien und zwei in Pilzmycel beschrieben wurden [Hearn et al., 1992]. In Vitro-Experimente mit Deletions-Mutanten haben ergeben, dass diese drei Katalasen *A. fumigatus* effektiv gegen Wasserstoffperoxid schützen können. Im Rattenmodell konnte weiter gezeigt werden, dass speziell die mycelialen Katalasen einen wirksamen Schutz des Pilzes vor Sauerstoffradikalen bieten [Paris et al., 2003]. Doch auch gegen weitere Sauerstoffradikale wie Superoxidanionen besitzt *A. fumigatus* Schutzenzyme, wie die Superoxiddismutasen [Holdom et al., 2000, Flückiger et al., 2002]. Vergleichende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Superoxiddismutasen den Pilz noch effektiver vor oxidativen Mechanismen der Phagozyten schützen können als die Katalasen [Rementeria et al., 2005]. Somit stehen die gewonnenen Resultate in Einklang mit Angaben aus der Literatur, dass Keimschläuche von *Aspergillus fumigatus* über effektive Schutzmechanismen gegen Sauerstoffradikale verfügen und daher nur eine geringe Sensibilität gegenüber diesen Agenzien aufzeigen [Lessing et al., 2007]. Analysen, die eine nachweisbare Sensitivität des Pilzes gegenüber Sauerstoffradikalen feststellen konnten [Morgenstern et al., 1997, Philippe et al., 2003, Roos et al., 2003], stehen eventuell im Zusammenhang mit Eigenschaften bestimmter Morphotypen des Pilzes. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings kein konkreter Vergleich der Empfindlichkeit von ruhenden und geschwollenen Konidien von *A. fumigatus* gegenüber Sauerstoffradikalen durchgeführt, so dass eigene Daten hierzu nicht vorliegen. Granulozyten produzieren in Gegenwart von ruhenden Konidien nur sehr geringe Mengen an Sauerstoffradikalen (siehe Abb. 7.34), so dass angenommen werden muss, dass der Oxidative Burst ebenfalls nicht der entscheidende Mechanismus in der Abwehr gegen ruhende Konidien ist.

Aufgrund der umfangreichen Dokumentation von unterschiedlichen Detoxifizierungsmechanismen, über die *A. fumigatus* verfügt, wurde die Relevanz dieser Mechanismen bei der Interaktion mit humanen Granulozyten näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen zur Schädigungseffizienz mit einer *A. fumigatus*-Mutante durchgeführt, bei der der Regulator AfYap1 (reguliert mehrere Enzyme, die für die Detoxifizierung von Sauerstoffradikalen zuständig sind) deletiert war [Lessing et al., 2007]. Diese Experimente zeigten, dass die Sensitivität der  $\Delta Afyap1$ -Mutante gegenüber den Granulozyten, identisch zu der Sensitivität der Wildtyp-Keimschläuche (etwa 50% Schädigung nach dreieinhalb Stunden Koinkubation) war (siehe Abb. 7.35).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Keimschläuche von *A. fumigatus* entweder über sehr vielfältige und effektive Schutzmechanismen gegen Sauerstoffradikale verfügen, oder dass die erzeugte ROI-Produktion der humanen Granulozyten unter den getesteten experimentellen Bedingungen zu gering ist, um entscheidend bei der Schädigung der Keimschläuche einzugreifen. Andererseits könnte es auch sein, dass die Funktion von Sauerstoffradikalen komplexer ist als vermutet. Dazu gibt es neuere Untersuchungen, die über eine primäre Funktion der NADPH-Oxidase bei der Absenkung des pH-Werts in den Vacuolen und einer daraus folgenden Aktivierung von Proteasen spekulieren [Cross & Segal, 2004]. Die NADPH-Oxidase setzt einen Elektronenfluss durch die Membran in Gang, der zu einem Ionentransport führt und letztendlich die Änderung des pH-Werts in der Vacuole bewirkt [Segal, 2006]. Eventuell reicht somit bereits eine geringe Aktivität der Oxidase, die durch die eingesetzten Inhibierungsreagenzien nachweislich nicht komplett verhindert werden konnte (siehe Abb. 7.22 und 7.23), um den entscheidenden Effekt bei der Schädigung von *A. fumigatus* zu bewirken.

Phagozyten besitzen neben der NADPH-Oxidase und der Myeloperoxidase des Weiteren das Enzym Stickstoffoxid-Synthetase, das Stickstoffoxide, Nitrite und Peroxynitrite generiert. Diese Stickstoffradikale zeigten bisher negative, wenn auch geringe Effekte auf das Überleben und Auskeimen von Konidien. Die Mediumzusammensetzung schien dabei einen großen Einfluss auf die Effekte zu nehmen [Nathan, 1992, Kunert, 1995, Kunert, 2000]. Bei eigenen Experimenten mit einem NO-Synthetase-Inhibitor konnte keine nachweisbare Veränderung in der Schädigungseffizienz humaner Granulozyten gegenüber Keimschläuchen erzielt

werden (siehe Abb. 7.36). Somit konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen ein Beitrag von Stickstoffradikalen auf die detektierbare Pilzschädigung ausgeschlossen werden.

### **8.10 Vergleich der Granulozytenabwehr gegen *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus***

Zusammenfassend konnten bei den durchgeführten Experimenten zur Interaktion von humanen PMN mit *Aspergillus fumigatus* einige Parallelen zur Interaktion mit *Candida albicans* festgestellt werden. Keimschläuche von *A. fumigatus* zeigten ebenfalls wie jene von *C. albicans* ein stark chemotaktisches Potential gegenüber humanen PMN und erwiesen sich als deutlicher Auslöser des Oxidativen Bursts. Allerdings konnte bei der Schädigung der Keimschläuche von *A. fumigatus* im Gegensatz zu jenen von *C. albicans* kein Beitrag der Sauerstoffradikale nachgewiesen werden, selbst im vorstimulierten Zustand der PMN nicht. Dieses unerwartete Resultat bei der Abwehr gegen *A. fumigatus* wird in Zukunft noch einiger weiterer Untersuchungen bedürfen, um die Bedeutung der Sauerstoffradikale, besonders im Hinblick auf die Patienten mit chronischer Granulomatose, endgültig verstehen zu können. Diese Patienten weisen Beeinträchtigungen bei der Sauerstoffradikalproduktion auf und sind besonders empfänglich für *A. fumigatus*-Infektionen [Marciano 2004, Heyworth et al., 2003, Winkelstein et al., 2000].

Des Weiteren konnten wir bei den Konidien von *A. fumigatus*, anders als bei den Hefen von *C. albicans*, ein intensives Einsammeln der Pilzzellen durch Granulozyten beobachten, auch wenn die effiziente Schädigung der Konidien für humane PMN langwieriger bzw. schwieriger als bei den Hefen zu sein schien.

Insgesamt betrachtet zeigen die Resultate der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass humane Granulozyten über ein sehr vielfältiges Repertoire an Abwehrmechanismen verfügen. Diese Abwehrmechanismen können spezifisch variiert bzw. angepasst werden, in Abhängigkeit von der vorliegenden Mikroorganismenspezies, von der vorliegenden Morphologie des Erregers und von stimulierenden oder auch inhibierenden Signalen aus der Umgebung der Granulozyten. Humane Granulozyten sind somit nicht nur sehr effektive Immuneffektorzellen, sondern auch hoch spezifisch agierende Spezialisten bei der Abwehr von Pilzinfektionen.

## 9. Literaturverzeichnis

**Abbas** AK & Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Elsevier Saunders. 2005, 12:280-281

**Aderem** A. Phagocytosis and the inflammatory response. J Infect Dis. 2003 Jun 15;187 Suppl 2:S340-5.

**Amitani** R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. Infect Immun. 1995 Sep; 63(9):3266-71.

**Aratani** Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, Koyama H. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2002 Dec; 40(6):557-63.

**Aratani** Y. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2006; 47(3):195-9.

**Babior** BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest. 1973 Mar; 52(3):741-4.

**Baccarini** M, Vecchiarelli A, Cassone A, Bistoni F. Killing of yeast, germ-tube and mycelial forms of *Candida albicans* by murine effectors as measured by a radiolabel release microassay. J Gen Microbiol. 1985 Mar;131(3):505-13.

**Banchereau** J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811.

**Barelle** CJ, Bohula EA, Kron SJ, Wessels D, Soll DR, Schäfer A, Brown AJ, Gow NA. Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2003 Jun;2(3):398-410.

**Basset** C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. Vaccine. 2003 Jun 1;21 Suppl 2:S12-23.

**Behnsen** J, Narang P, Hasenberg M, Gunzer F, Bilitewski U, Klippel N, Rohde M, Brock M, Brakhage AA, Gunzer M. Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2007 Feb;3(2):0138-0151.

**Bellocchio** S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. J Immunol. 2004 Dec 15;173(12):7406-15.

**Berman** J, Sudbery PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat Rev Genet. 2002 Dec;3(12):918-30.

**Berman** J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9(6):595-601. Epub 2006 Oct 20.

**Birch** M, Robson G, Law D, Denning DW. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 1996 Mar;64(3):751-5.

**Biswas** S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. Microbiol Mol Biol Rev. 2007 Jun;71(2):348-76.

- Braun** BR, Johnson AD. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):105-9.
- Braun** BR, Head WS, Wang MX, Johnson AD. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*. 2000 Sep;156(1):31-44.
- Brinkmann** V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
- Brinkmann** V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577-82.
- Brown** AJ, Gow NA. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*. 1999 Aug;7(8):333-8.
- Brown** GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001 Sep 6;413(6851):36-7.
- Brown** GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003 Sep;19(3):311-5.
- Brown** GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):471-9.
- Caillot** D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, Solary E, Piard F, Petrella T, Bonnin A, Couillault G, Dumas M, Guy H. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol*. 1997 Jan;15(1):139-47.
- Calderone** RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 1991 Mar;55(1):1-20.
- Calderone** RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Jul;9(7):327-35.
- Calera** JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeaupuis JP, Diaquin M, López-Medrano R, Leal F, Latgé JP. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4718-24.
- Cassone** A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr Top Med Mycol*. 1989;3:248-314.
- Chaffin** WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):130-80.
- Chauhan** N, Latgé JP, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jun;4(6):435-44.
- Cheung** AL, Krishnan M, Jaffe EA, Fischetti VA. Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1991 Jun;87(6):2236-45.
- Cohn** ZA, Hirsch JG. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1960 Dec 1;112:1015-22.
- Cross** AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jun 28;1657(1):1-22.

- Csank C**, Schröppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY, Whiteway M. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2713-21.
- Cutler JE**. Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):568-73.
- Cutler JE**. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 1991;45:187-218.
- Czop JK**. The role of beta-glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. *Pathol Immunopathol Res*. 1986;5(3-5):286-96.
- d'Ostiani CF**, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2000 May 15;191(10):1661-74.
- Denning DW**. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. *J Antimicrob Chemother*. 1991 Oct;28 Suppl B:1-16.
- Denning DW**. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998 Apr;26(4):781-803; quiz 804-5.
- Diamond RD**, Krzesicki R, Jao W. Damage to pseudohyphal forms of *Candida albicans* by neutrophils in the absence of serum in vitro. *J Clin Invest*. 1978 Feb;61(2):349-59.
- Diamond RD**, Krzesicki R, Epstein B, Jao W. Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol*. 1978 May;91(2):313-28.
- Diamond RD**, Clark RA. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infect Immun*. 1982 Nov;38(2):487-95.
- Dong C**, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72. Epub 2001 Oct 4.
- Dürr MC**, Kristian SA, Otto M, Matteoli G, Margolis PS, Trias J, van Kessel KP, van Strijp JA, Bohn E, Landmann R, Peschel A. Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns--formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol*. 2006 Feb;8(2):207-17.
- Edens HA**, Parkos CA, Liang TW, Jesaitis AJ, Cutler JE, Miettinen HM. Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages. *Infect Immun*. 1999 Mar;67(3):1063-71.
- Enjalbert B**, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell*. 2003 Apr;14(4):1460-7.
- Enjalbert B**, MacCallum DM, Odds FC, Brown AJ. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2143-51.
- Evans EG**, Odds FC, Richardson MD, Holland KT. Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. *Can J Microbiol*. 1975 Mar;21(3):338-42.
- Farrell SM**, Hawkins DF, Ryder TA. Scanning electron microscope study of *Candida albicans* invasion of cultured human cervical epithelial cells. *Sabouraudia*. 1983 Sep;21(3):251-4.
- Felk A**, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3689-700.

- Feng Q**, Summers E, Guo B, Fink G. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6339-46.
- Flückiger S**, Mittl PR, Scapozza L, Fijten H, Folkers G, Grütter MG, Blaser K, Cramer R. Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1267-72.
- Forsyth CB**, Mathews HL. Lymphocytes utilize CD11b/CD18 for adhesion to *Candida albicans*. *Cell Immunol.* 1996 May 25;170(1):91-100.
- Forsyth CB**, Plow EF, Zhang L. Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6198-205.
- Fradin C**, Kretschmar M, Nichterlein T, Gaillardin C, d'Enfert C, Hube B. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* 2003 Mar;47(6):1523-43.
- Fradin C**, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* 2005 Apr;56(2):397-415.
- Fuchs TA**, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007 Jan 15;176(2):231-41. Epub 2007 Jan 8.
- Gale CA**, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science.* 1998 Feb 27;279(5355):1355-8.
- Gaviria JM**, van Burik JA, Dale DC, Root RK, Liles WC. Modulation of neutrophil-mediated activity against the pseudohyphal form of *Candida albicans* by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administered in vivo. *J Infect Dis.* 1999 May;179(5):1301-4.
- Geiger J**, Wessels D, Lockhart SR, Soll DR. Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):667-77.
- Gillum AM**, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet.* 1984;198(1):179-82.
- Goebel WS**, Mark LA, Billings SD, Meyers JL, Pech N, Travers JB, Dinauer MC. Gene correction reduces cutaneous inflammation and granuloma formation in murine X-linked chronic granulomatous disease. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):705-10.
- Goodman RB**, Forstrom JW, Osborn SG, Chi EY, Martin TR. Identification of two neutrophil chemotactic peptides produced by porcine alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 1991 May 5;266(13):8455-63.
- Gow NA**. Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol.* 1997 Dec;8(1-2):43-55.
- Greenberg S**, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):136-45.
- Gudlaugsson O**, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003 Nov 1;37(9):1172-7.
- Hahn H**, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 3. Auflage. Springer. 1999. 711-712
- Haines, J.** *Aspergillus in compost: straw man or fatal flaw.* *Biocycle.* 1995. 6:32–35

- Hamilton** AJ, Holdom MD. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med Mycol.* 1999 Dec;37(6):375-89.
- Hausauer** DL, Gerami-Nejad M, Kistler-Anderson C, Gale CA. Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. *Eukaryot Cell.* 2005 Jul;4(7):1273-86.
- Hearn** VM, Wilson EV, Mackenzie DW. Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity. *J Med Microbiol.* 1992 Jan;36(1):61-7.
- Heinsbroek** SE, Brown GD, Gordon S. Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol.* 2005 Jul;26(7):352-4.
- Henson** PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest.* 1987 Mar;79(3):669-74.
- Herrmann** JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, Van Dyke TE, Simons ER. Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 2007 May 25 [Epub ahead of print]
- Heyworth** PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):578-84.
- Hii** CS, Stacey K, Moghaddami N, Murray AW, Ferrante A. Role of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in human neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration. *Infect Immun.* 1999 Mar;67(3):1297-302.
- Hirsch** JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958 Dec 1;108(6):925-44.
- Hof** H. Pathogene Pilze. *Pharm.Unserer Zeit.* 2003; 32 (2):96-103
- Holdom** MD, Hay RJ, Hamilton AJ. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):3326-32.
- Holdom** MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ, Monod M. Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38(2):558-62.
- Hope** WW, Drusano GL, Moore CB, Sharp A, Louie A, Walsh TJ, Denning DW, Warn PA. Effect of neutropenia and treatment delay on the response to antifungal agents in experimental disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jan;51(1):285-95. Epub 2006 Nov 6.
- Hoyer** LL, Payne TL, Hecht JE. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol.* 1998 Oct;180(20):5334-43.
- Hube** B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 1994 Oct;14(1):87-99.
- Hube** B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol.* 1998 Jun;15(2):65-8.
- Hull** CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 2000 Jul 14;289(5477):307-10.
- Ibata-Ombetta** S, Jouault T, Trinel PA, Poulain D. Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol.* 2001 Jul;70(1):149-54.



- Ishibashi K**, Miura NN, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. The solubilization and biological activities of Aspergillus beta-(1 --> 3)-D-glucan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 Oct 1;42(2):155-66.
- Issekutz AC**, Rowter D, Springer TA. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol.* 1999 Jan;65(1):117-26.
- Iverson D**, DeChatelet LR, Spitznagel JK, Wang P. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. *J Clin Invest.* 1977 Feb;59(2):282-90.
- Iverson DB**, Wang-Iverson P, Spitznagel JK, DeChatelet LR. Subcellular localization of NAD(P)H oxidase(s) in human neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J.* 1978 Oct 15;176(1):175-8.
- Iyer GYN**, Islam DMF, Quastel JH. 1961. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature*192:535–41
- Jandl RC**, André-Schwartz J, Borges-DuBois L, Kipnes RS, McMurrich BJ, Babior BM. Termination of the respiratory burst in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1978 May;61(5):1176-85.
- Janeway CA Jr.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54 Pt 1:1-13.
- Janeway CA Jr.** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today.* 1992 Jan;13(1):11-6.
- Janeway CA Jr**, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):349-50.
- Janeway CA**, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- Jones T**, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11;101(19):7329-34. Epub 2004 May 3.
- Jurkowska M**, Bernatowska E, Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004 Mar-Apr;52(2):113-20.
- Kazmierowski JA**, Gallin JI, Reynolds HY. Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 1977 Feb;59(2):273-81.
- Keel M**, Ungethuem U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. Interleukin 10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997; 90:3356±63.
- Kennedy MJ**, Rogers AL, Hanselmen LR, Soll DR, Yancey RJ Jr. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia.* 1988 Jun;102(3):149-56.
- Kennedy AD**, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2007 Feb;37(2):467-78.
- Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999 Sep-Oct;111(5):383-9.
- Klepser ME.** *Candida* resistance and its clinical relevance. *Pharmacotherapy.* 2006 Jun;26(6 Pt 2):68S-75S.
- Knechtle P**, Goyard S, Brachat S, Ibrahim-Granet O, d'Enfert C. Phosphatidylinositol-dependent phospholipases C Plc2 and Plc3 of *Candida albicans* are dispensable for morphogenesis and host-pathogen interaction. *Res Microbiol.* 2005 Aug;156(7):822-9.

- Komachi** K, Johnson AD. Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10):6023-8.
- Krizková** L, Duracková Z, Sandula J, Sasinková V, Krajcovic J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutat Res.* 2001 Oct 18;497(1-2):213-22.
- Kullberg** BJ, Oude Lashof AM. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res.* 2002 May 31;7(5):183-91.
- Kumamoto** CA, Vinces MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 2005 Nov;7(11):1546-54.
- Kunert** J. Effect of nitric oxide donors on survival of conidia, germination and growth of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Folia Microbiol (Praha).* 1995;40(3):238-44.
- Kunert** J. Effect of peroxyxynitrite on dormant spores and germlings of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Folia Microbiol (Praha).* 2000;45(4):325-9.
- Kurzai** O, Schmitt C, Bröcker E, Frosch M, Kolb-Mäurer A. Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells. *Int J Med Microbiol.* 2005 Jun;295(2):121-7.
- Lamarre** C, LeMay JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):43784-91. Epub 2001 Sep 18.
- Lass-Flörl** C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, Einsele H, Löffler J, Dierich MP, Würzner R. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2001 Apr;113(1):180-4.
- Latgé** JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Apr;12(2):310-50.
- Lehrer** RI, Cline MJ. Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *J Bacteriol.* 1969 Jun;98(3):996-1004.
- Lessing** F, Kniemeyer O, Wozniak I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell.* 2007 Oct 5; [Epub ahead of print]
- Levitz** SM, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI, Diamond RD. In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis.* 1986 Sep;154(3):483-9.
- Liu** H, Köhler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science.* 1994 Dec 9;266(5191):1723-6.
- Lo** HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997 Sep 5;90(5):939-49.
- López-Lluch** G, Bird MM, Canas B, Godovac-Zimmerman J, Ridley A, Segal AW, Dekker LV. Protein kinase C-delta C2-like domain is a binding site for actin and enables actin redistribution in neutrophils. *Biochem J.* 2001 Jul 1;357(Pt 1):39-47.
- Luster** AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):129-35.
- Lynch** DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Aug;78(2):189-93.
- Mackay** CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):95-101.

- Mackinnon** JE, Artagaveytia-Allende RC. The So-Called Genus *Candida* Berkhout, 1923. *J Bacteriol.* 1945 Apr;49(4):317-34.
- Magee** BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science.* 2000 Jul 14;289(5477):310-3.
- Marciano** BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, Anderson VL, Darnell DN, Anaya-O'Brien S, Hilligoss DM, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics.* 2004 Aug;114(2):462-8.
- Martchenko** M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004 Feb;15(2):456-67.
- Mayer-Scholl** A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 2004 Feb;7(1):62-6.
- McNeil** MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 1;33(5):641-7. Epub 2001 Jul 30.
- Medzhitov** R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
- Meshulam** T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J Infect Dis.* 1995 Oct;172(4):1153-6.
- Mitchell** AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 1998 Dec;1(6):687-92.
- Molano** J, Bowers B, Cabib E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol.* 1980 May;85(2):199-212.
- Molero** G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1998 Jun;1(2):95-106.
- Monod** M, Togni G, Rahalison L, Frenk E. Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 1991 Jul;35(1):23-8.
- Monod** M, Paris S, Sanglard D, Jaton-Ogay K, Bille J, Latgé JP. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4099-104.
- Morgenstern** DE, Gifford MA, Li LL, Doerschuk CM, Dinauer MC. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med.* 1997 Jan 20;185(2):207-18.
- Mullins** J, Harvey R, Seaton A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy.* 1976 May;6(3):209-17.
- Mullins** J, Hutcheson PS, Slavin RG. *Aspergillus fumigatus* spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared. *Clin Allergy.* 1984 Jul;14(4):351-4.
- Naglik** JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Sep;67(3):400-28, table of contents.
- Nathan** C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 Sep;6(12):3051-64.
- Niggli** V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Dec;35(12):1619-38.

- Nobile** CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003 Dec;149(Pt 12):3629-37.
- Odds** FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol*. 1987;15(1):1-5.
- Odell** EW, Segal AW. Killing of pathogens associated with chronic granulomatous disease by the non-oxidative microbicidal mechanisms of human neutrophils. *J Med Microbiol*. 1991 Mar;34(3):129-35.
- Olaiya** AF, Sogin SJ. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 1979 Dec;140(3):1043-9.
- Page** AR, Good RA. A clinical and experimental study of the function of neutrophils in the inflammatory response. *Am J Pathol*. 1958 Jul-Aug;34(4):645-69.
- Paris** S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latgé JP. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2003 Jun;71(6):3551-62.
- Pfaller** MA. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis*. 1994 Aug;19 Suppl 1:S8-13.
- Pfaller** MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63.
- Phan** QT, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3485-90.
- Philippe** B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidallo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*. 2003 Jun;71(6):3034-42.
- Prossnitz** ER, Ye RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther*. 1997;74(1):73-102.
- Pulendran** B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):253-6.
- Quinn** MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol*. 2004. 76:760.
- Radsak** M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000 Dec;101(4):521-30.
- Radsak** MP, Salih HR, Rammensee HG, Schild H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4956-63.
- Raper** KB, Fennell DI. *Aspergillus fumigatus* group. In K. B. Raper and D. I. Fennell (ed.), *The genus Aspergillus*. The William & Wilkins Co., Baltimore, Md. 1965. p. 238–268.
- Rementeria** A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Mar;22(1):1-23.
- Rex** JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med*. 1994 Nov 17;331(20):1325-30.
- Rhie** GE, Hwang CS, Brady MJ, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, Lee BH, Lee JS, Kang SO. Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 2;1426(3):409-19.
- Richardson** MD, Shankland GS, Gray CA. Opsonizing activity of C-reactive protein in phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by human neutrophils. *Mycoses*. 1991 Mar-Apr;34(3-4):141-3.

- Roilides E**, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun*. 1993 Apr;61(4):1185-93.
- Roilides E**, Katsifa H, Walsh TJ. Pulmonary host defences against *Aspergillus fumigatus*. *Res Immunol*. 1998 May-Jun;149(4-5):454-65; discussion 523-4.
- Romagnoli G**, Nisini R, Chiani P, Mariotti S, Teloni R, Cassone A, Torosantucci A. The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol*. 2004 Jan;75(1):117-26. Epub 2003 Oct 2.
- Roos D**, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1307-15.
- Root RK**, Cohen MS. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis*. 1981 May-Jun;3(3):565-98.
- Rossi F**, Zabucchi G, Dri P, Bellavite P, Berton G. O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during the respiratory burst in alveolar macrophages. *Adv Exp Med Biol*. 1979;121(A):53-74.
- Rubin-Bejerano I**, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*. 2007 Jul 12;2(1):55-67.
- Sangeorzan JA**, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, Kauffman CA. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med*. 1994 Oct;97(4):339-46.
- Sato T**, Iwabuchi K, Nagaoka I, Adachi Y, Ohno N, Tamura H, Seyama K, Fukuchi Y, Nakayama H, Yoshizaki F, Takamori K, Ogawa H. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol*. 2006 Jul;80(1):204-11. Epub 2006 May 2.
- Schaffner A**, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*. 1982 Mar;69(3):617-31.
- Schaffner A**, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AI. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):511-24.
- Schaffner A**. Macrophage-*Aspergillus* interactions. *Immunol Ser*. 1994;60:545-52.
- Schaller M**. *Candida albicans*--interactions with the mucosa and the immune system. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2006 Apr;4(4):328-36; quiz 337-8.
- Schiffmann E**, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Mar;72(3):1059-62.
- Schiller J**, Benard S, Reichl S, Arnhold J, Arnold K. Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: reactive oxygen species decrease markedly the activity of proteolytic enzymes. *Chem Biol*. 2000 Aug;7(8):557-68.
- Schröder JM**, Häsler R, Grabowsky J, Kahlke B, Mallet AI. Identification of diacylated ureas as a novel family of fungus-specific leukocyte-activating pathogen-associated molecules. *J Biol Chem*. 2002 Aug 2;277(31):27887-95. Epub 2002 May 22.
- Schuit KE**. Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. *Infect Immun*. 1979 Jun;24(3):932-8.

- Segal BH**, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):170-200.
- Segal AW**. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
- Segal AW**. How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. *Novartis Found Symp*. 2006;279:92-8; discussion 98-100, 216-9.
- Sepúlveda P**, López-Ribot JL, Murgui A, Cantón E, Navarro D, Martínez JP. Candida albicans fibrinogen binding mannoprotein: expression in clinical strains and immunogenicity in patients with candidiasis. *Int Microbiol*. 1998 Sep;1(3):209-16.
- Shepherd MG**. Cell envelope of Candida albicans. *Crit Rev Microbiol*. 1987;15(1):7-25.
- Sherwood J**, Gow NA, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D. Contact sensing in Candida albicans: a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol*. 1992; 30(6):461-9.
- Shibuya K**, Ando T, Hasegawa C, Wakayama M, Hamatani S, Hatori T, Nagayama T, Nonaka H. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J Infect Chemother*. 2004 Jun;10(3):138-45.
- Shibuya K**, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, Latgé JP. Catalases of Aspergillus fumigatus and inflammation in aspergillosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47(4):249-55.
- Sibille Y**, Naegel GP, Merrill WW, Young KR Jr, Care SB, Reynolds HY. Neutrophil chemotactic activity produced by normal and activated human bronchoalveolar lavage cells. *J Lab Clin Med*. 1987 Nov;110(5):624-33.
- Slutsky B**, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in Candida albicans. *Science*. 1985 Nov 8;230(4726):666-9.
- Soll DR**. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*. 2002 Feb;81(2):101-10.
- Soloviev DA**, Fonzi WA, Sentandreu R, Pluskota E, Forsyth CB, Yadav S, Plow EF. Identification of pH-regulated antigen 1 released from Candida albicans as the major ligand for leukocyte integrin alphaMbeta2. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2038-46.
- Sonneborn A**, Bockmühl DP, Ernst JF. Chlamyospore formation in Candida albicans requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun*. 1999 Oct;67(10):5514-7.
- Staab JF**, Sundstrom P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of Candida albicans. *Yeast*. 1998 May;14(7):681-6.
- Staab JF**, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1535-8.
- Staib P**, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J. Differential activation of a Candida albicans virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 23;97(11):6102-7.
- Stoldt VR**, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen Candida albicans, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1982-91.
- Stossel TP**. The early history of phagocytosis. In *Phagocytosis: The Host*, ed. S Gordon., Stamford,CT: JAI. 1999.pp. 3–18
- Stringaro A**, Crateri P, Pellegrini G, Arancia G, Cassone A, De Bernardis F. Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in Candida albicans cell wall in vitro and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia*. 1997;137(2):95-105.
- Sturtevant JE**, Latgé JP. Interactions between conidia of Aspergillus fumigatus and human complement component C3. *Infect Immun*. 1992 May;60(5):1913-8.

- Sturtevant J**, Latgé JP. Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis*. 1992 Sep;166(3):580-6.
- Sudbery P**, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004 Jul;12(7):317-24.
- Sutton P**, Newcombe NR, Waring P, Müllbacher A. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun*. 1994 Apr;62(4):1192-8.
- Tang N**, Liu L, Kang K, Mukherjee PK, Takahara M, Chen G, McCormick TS, Cooper KD, Ghannoum M. Inhibition of monocytic interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase. *Infect Immun*. 2004 May;72(5):2513-20.
- Thompson HL**, Wilton JM. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol*. 1992 Feb;87(2):316-21.
- Tronchin G**, Esnault K, Renier G, Filmon R, Chabasse D, Bouchara JP. Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 1997 Jan;65(1):9-15.
- Tsai HF**, Washburn RG, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Aspergillus fumigatus* arp1 modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol Microbiol*. 1997 Oct;26(1):175-83.
- Tsan MF**, Denison RC. Phorbol myristate acetate-induced neutrophil autotoxicity. A comparison with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. *Inflammation*. 1980 Dec;4(4):371-80.
- Underhill DM**, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:825-52.
- Urban CF**, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006 Apr;8(4):668-76.
- Velasco E**, Thuler LC, Martins CA, Nucci M, Dias LM, Gonçalves VM. Epidemiology of bloodstream infections at a cancer center. *Sao Paulo Med J*. 2000 Sep 7;118(5):131-8.
- Verweij PE**, Donnelly JP, De Pauw BE, Meis JF. *Aspergillus* infections: problems in diagnosis and treatment. *Infect Agents Dis*. 1996 Oct;5(4):245-6.
- van der Graaf CA**, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7458-64.
- von Eiff M**, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlendorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62(6):341-7.
- Vonk AG**, Wieland CW, Versteegen M, Verschueren IC, Netea MG, Joostent LA, Verweij PE, Kullberg BJ. Influence of endogenous pro-inflammatory cytokines on neutrophil-mediated damage of *Candida albicans* pseudohyphae, quantified in a modified tetrazolium dye assay. *Med Mycol*. 2005 Sep;43(6):551-7.
- Wallace JM**, Lim R, Browdy BL, Hopewell PC, Glassroth J, Rosen MJ, Reichman LB, Kvale PA. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Chest*. 1998 Jul;114(1):131-7.
- Wang H**, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999 Sep;27(5-6):612-6.
- Washburn RG**, Kennedy DW, Begley MG, Henderson DK, Bennett JE. Chronic fungal sinusitis in apparently normal hosts. *Medicine (Baltimore)*. 1988 Jul;67(4):231-47.

- Weinberger** M, Elattar I, Marshall D, Steinberg SM, Redner RL, Young NS, Pizzo PA. Patterns of infection in patients with aplastic anemia and the emergence of *Aspergillus* as a major cause of death. *Medicine (Baltimore)*. 1992 Jan;71(1):24-43.
- Weiss** SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 Feb 9;320(6):365-76.
- Whelan** WL, Partridge RM, Magee PT. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet*. 1980;180(1):107-13.
- White** TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol*. 1995 Sep;177(18):5215-21.
- Winkelstein** JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):155-69.
- Wysong** DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. 1998 May;66(5):1953-61.
- Zhong** B, Jiang K, Gilvary DL, Epling-Burnette PK, Ritchey C, Liu J, Jackson RJ, Hong-Geller E, Wei S. Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3240-8. Epub 2003 Jan 2.
- Zhou** L, Lee DH, Plescia J, Lau CY, Altieri DC. Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain. *J Biol Chem*. 1994 Jun 24;269(25):17075-9.
- Zink** S, Nass T, Rösen P, Ernst JF. Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. *Infect Immun*. 1996 Dec;64(12):5085-91.



## 10. Eigene Veröffentlichungen

The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model.

Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA.  
Eukaryot Cell. 2007 Oct 5

Proinflammatory Response of Immature Human Dendritic Cells is Mediated by Dectin-1 after Exposure to *Aspergillus fumigatus* Germ Tubes.

Mezger M, Kneitz S, Wozniok I, Kurzai O, Einsele H, Loeffler J.  
J Infect Dis. 2008 Feb 15

Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils.

Wozniok I, Hornbach A, Schmitt C, Frosch M, Einsele H, Hube B, Loeffler J, Kurzai O.  
Cell Microbiol. 2008 Mar;10(3):807-20.

Impact of Mycophenolic Acid on the Functionality of Human Polymorphonuclear Neutrophils and Dendritic Cells during Interaction with *Aspergillus fumigatus*.

Markus Mezger\*, Iwona Wozniok\*, Christian Blockhaus, Oliver Kurzai, Holger Hebart, Hermann Einsele and Jürgen Löffler.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (in revision)

## 11. Danksagung

Viele Menschen haben es mir durch ihren individuellen Beitrag möglich gemacht die vorliegende Arbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Tübingen und Würzburg in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und dem Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart zu erstellen.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele und Herrn PD. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Vergabe eines sehr interessanten und relevanten Themas. Ich durfte in den letzten drei Jahren viele neue Dinge erlernen, unter anderem auch in Labors befreundeter Arbeitsgruppen, so dass ich einen großen Einblick in die aktuellsten wissenschaftlichen Methoden erhalten konnte. Besonders möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit, meine Ergebnisse interessierten Wissenschaftlern in Vorträgen zu präsentieren, bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Scheurich danke ich sehr für die Übernahme der Zweitbetreuung dieser Arbeit. Sein Interesse an meinem Thema und seine Ratschläge haben mir in vielerlei Hinsicht geholfen die Arbeit zügig voranzubringen und insbesondere auch zu Ende zu bringen.

Eine hervorragende wissenschaftliche Unterstützung habe ich bei Herrn Dr. med. Oliver Kurzai aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg erfahren. Sein unerschöpfliches fachliches Wissen in diesem Themenbereich und seine unbedingte Zielstrebigkeit hat viel zum erlangten Erfolg beigetragen. Frau Nina Trzeciak aus der Arbeitsgruppe Kurzai, danke ich für exzellente technische Assistenz.

Für die Einarbeitung in den Umgang mit humanen Granulozyten möchte ich mich besonders bei Herrn Philipp Haselmayer und Herrn Dr. med Markus P. Radsak aus dem Institut für Immunologie der Universität Mainz bedanken.

Große Unterstützung bei Interaktionsuntersuchungen mit dem Echt-Zeit-Weitfeld-Mikroskop habe ich von Frau Priyanka Narang und Herrn Dr. rer. nat. Matthias Gunzer vom Helmholtz-Zentrum in Braunschweig erfahren.

Mit Frau Franziska Lessing und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Brakhage vom Hans Knöll Institut in Jena bestand eine hervorragende Zusammenarbeit beim Aspergillus-Projekt.

Ich war gerne in Würzburg. Hier lernte ich Menschen wie Andrea Villwock, Tessa von Alen, Steffi Schielke und Markus Mezger kennen. Neben vielen wissenschaftlichen Erkenntnissen aus anregenden Gesprächen, verdanke ich ihnen die Erfahrung wunderbarer Freundschaft.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei meinen Eltern Joanna und Roman Wozniok für den Rückhalt, ihre Liebe und die immerwährende Unterstützung bedanken. Mein Bruder Lukas Wozniok war mir in dieser teils auch schweren Zeit eine sehr große Hilfe, indem er mich motiviert und wie selbstverständlich in allen Bereichen unterstützt hat.

Meinem Freund Björn Schenk danke ich für die stets positive Einstellung und die Bereitschaft zu einer Fernbeziehung über drei Jahre. Dank ihm konnte ich den Stress, besonders im letzten Jahr, gut bewältigen.

Ich danke allen, die dazu beigetragen haben, dass ich meine Promotionszeit immer in guter Erinnerung behalten werde.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Iwona Maria Wozniok  
Anschrift: Gerstenhalde 15  
70499 Stuttgart  
Geburtsdatum: 02.02.1979

### Schulbildung:

1985-1989: Wolfbusch-Grundschule, Stuttgart  
1989-1998: Solitude-Gymnasium, Stuttgart

### Studium:

10/1998-09/2004: Diplom-Biologie (technisch orientiert) an der Universität Stuttgart  
(Studienschwerpunkte: Biochemie, Mikrobielle Biotechnologie, Humanphysiologie, Immunologie)  
03/2003-06/2003: Industriepraktikum bei der Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) in Melbourne, Australien  
11/2003-09/2004: Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, bei Prof. Dr. G. Sprenger und PD Dr. A. Stolz. Titel der Diplomarbeit: „Populationsdynamik in einer komplexen Mikroorganismenmatrix und Optimierung einer Langzeitfermentation“

### Promotion:

11/2004-10/2007: Dissertation an der medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Tübingen und Würzburg, bei Prof. Dr. H. Einsele und PD Dr. J. Löffler in Kooperation mit dem Institut für

Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Dr. O. Kurzai. Mitbetreuung durch Prof. Dr. P. Scheurich vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart.

Titel der Dissertation: „Interaktion von humanen Granulozyten mit den Pilzen *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*“

Stuttgart, den 05. April 2008