

**Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen zur  
Untersuchung des Einflusses von *Aspergillus fumigatus*  
auf die Hämostase**

**Analysis of host-pathogen interactions to investigate the influence of  
*Aspergillus fumigatus* on haemostasis**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von  
Anette Schedler  
aus  
Frankenthal (Pfalz)

Würzburg, 2017

Eingereicht am: .....

(Bürostempel)

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Sven Krappmann

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. Gabriele Pradel

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunden ausgehändigt am: .....

Für Markus  
und meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>V</b>
<b>Summary</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Thrombozyten und die Hämostase	1
1.2. Thrombozyten als Zellen des Immunsystems	8
1.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> – Lebenszyklus und Habitat	10
1.4. <i>Aspergillus fumigatus</i> als Krankheitserreger	11
1.5. Pathogenitätsfaktoren von <i>A. fumigatus</i>	13
1.5.1. Sezernierte Proteasen von <i>A. fumigatus</i>	17
1.5.2. Mykotoxine von <i>A. fumigatus</i>	19
1.6. <i>Aspergillus fumigatus</i> und die Hämostase	22
1.7. Ziel dieser Arbeit	25
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1. Materialien	27
2.1.1. Materialien	27
2.1.2. Stämme	28
2.2. Methoden	28
2.2.1. Kultivierung von <i>A. fumigatus</i> und Überstand-Generierung	28
2.2.2. Generierung von Plättchen-reichem Plasma (PRP)	29
2.2.3. Analyse der Koagulationsparameter	30
2.2.4. Aggregometrie nach Born	31
2.2.5. Durchflusszytometrie	33
2.2.5.1. Detektion von CD62P und CD63	33
2.2.5.1.1. Morphologien und Überstände	33
2.2.5.1.2. Gliotoxin	34
2.2.5.2. Detektion von PAC-1	35
2.2.6. Herstellung von Proteinextrakten aus mit Gliotoxin behandelten humanen Thrombozyten	35
2.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.2.8. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	36
2.2.9. Westernblot-Hybridisierung	37
2.2.10. Coomassie-Färbung	38
2.2.11. Gel Trocknung	38
2.2.12. TXB <sub>2</sub> -ELISA	38

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1. Analyse der primären Hämostase	39
3.1.1. Einfluss von Morphologien von <i>A. fumigatus</i> und ihrer Kulturfiltrate auf die Thrombozytenaggregation	39
3.1.2. Einfluss von proteolytisch-aktiven Überständen auf die Aggregation von Thrombozyten.	41
3.1.2.1. Herstellung und Vergleich der Überstände	41
3.1.2.2. Prüfung der Filtrate auf proteolytische Aktivität	42
3.1.2.3. Einfluss proteolytischer Aktivität auf die Thrombozyten-Aggregation	42
3.1.3. Einfluss von Mykotoxinen auf die Thrombozyten-Aggregation	46
3.2. Analyse der sekundären Hämostase	51
3.2.1. Einfluss verschiedener Morphologien von <i>A. fumigatus</i> und ihrer Überstände	52
3.2.2. Einfluss von Filtraten mit proteolytischer Aktivität auf die sekundäre Hämostase	53
3.2.3. Effekt von Mykotoxinen auf die sekundäre Hämostase	54
3.3. Analyse der Thrombozytenaktivität	55
3.3.1. Einfluss der Morphologien von <i>A. fumigatus</i> auf die Thrombozytenaktivierung	55
3.3.2. Einfluss von Überständen mit proteolytischer Aktivität auf die Plättchenaktivierung	57
3.3.3. Einfluss von Gliotoxin auf die Thrombozytenaktivierung	59
3.3.4. Inhibierung der Wirkung von Gliotoxin	63
3.3.5. Einfluss von Gliotoxin auf die Bindung von PAC-1 an Thrombozyten	68
3.3.6. Analyse der möglichen Bindung von Gliotoxin an den ADP-Rezeptor P2Y <sub>12</sub>	69
3.3.7. Einfluss von Gliotoxin auf die Thromboxan A <sub>2</sub> -Synthese in Thrombozyten	71
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1. Hyphen von <i>A. fumigatus</i> sowie ihr Kultur-Überstand führen zu einer verstärkten Aggregation von humanen Thrombozyten	74
4.2. Proteolytisch aktiver Überstand von <i>A. fumigatus</i> aktiviert humane Thrombozyten	76
4.3. Gliotoxin inhibiert die Aktivität humaner Thrombozyten	79
4.4. Fazit und Ausblick	83
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>99</b>
Förderung	99
Eidesstattliche Erklärung	100
Danksagung	101
Curriculum Vitae	102
Publikationen und Konferenzbeiträge	103

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AP	antimikrobielle Peptide (siehe auch PMP)
APC	Allophycocyanin
AS	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CNPA	chronisch nekrotisierende pulmonale Aspergillose
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Δ	Deletion
d	Tage
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DHN-Melanin	Dehydroxynaphtalen-Melanin
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
gr	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAG	β-Galactosaminogalactan
GM	Galactomannan
h	Stunde
HGF	haematopoietic growth factor (hämatopoietischer Wachstumsfaktor)
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxidase von Meerrettich)
HSP	Hitzeschock-Protein
HSZT	Hämatopoietische Stammzelltransplantation
IA	Invasive Aspergillose
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
l	Liter

## Abkürzungsverzeichnis

---

MetAP2	Methionin-Aminopeptidase 2
min	Minute
MM	Minimalmedium
MM B/P	Minimalmedium mit BSA und Pepton
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
NaCl-Tween	Natriumchlorid-Lösung mit Tween 80
N-terminal	Aminoterminal
N-Quelle	Stickstoffquelle
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (Pathogen-assoziiertes molekulares Muster)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor (Proteolysis Activated Receptor)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PGE1	Prostaglandine Enhancer 1
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (Prostazyklin)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMP	platelet microbicidal peptides (antimikrobielle Peptide)
(P)VASP	(phosphorylated) Vasodilator-stimulated phosphoprotein (Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein, (phosphoryliert))
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Rotierung pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide 6 (Thrombin-Rezeptor Aktivator Peptid 6)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
vWF	vonWillebrand-Faktor
V	Volt

### Zusammenfassung

Als Hämostase bezeichnet man die Gesamtheit der Reaktionen, die zu einer effektiven Blutgerinnung beitragen. Sie lässt sich in die primäre (thrombozytäre) Hämostase, in die sekundäre (plasmatische) Hämostase und in das Fibrinolysesystem einteilen. Thrombozyten, oder auch Plättchen genannt, spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Sie binden an die durch eine Verletzung einer Blutgefäßwand freigelegten Faktoren, werden so aktiviert und aggregieren mit weiteren Thrombozyten, wodurch ein Thrombus entsteht, der die Verletzung verschließt. Zudem besitzen Thrombozyten Immunkompetenz und können mit anderen Immunzellen interagieren, über Rezeptoren Pathogene erkennen und sie direkt angreifen. Einer dieser Pathogene ist der opportunistische Pilz *Aspergillus fumigatus*. Dieser bildet im Verlauf seines Lebenszyklus 2,5 -3 µm kleine Konidien aus, die mit dem Wind verbreitet werden und bis tief in die Alveolen der menschlichen Lunge eingeatmet werden können. Während diese Konidien im gesunden Menschen durch das Immunsystem und andere Abwehrmechanismen eliminiert werden, können sie im immunsupprimierten Patienten, z. B. bei Patienten nach einer hämatopoietischen Stammzelltransplantation, auskeimen und verschiedene Krankheiten, sogenannte Aspergillosen, auslösen mit der Invasiven Aspergillose (IA) als schwerwiegendste Form. Diese ist assoziiert mit Gewebeerstörungen, Blutungen und Thrombenbildung am Ort der Infektion. Diese Komplikationen könnten auf einer überhöhten Immunantwort des Wirtes, auf dem mechanischen Eindringen des Pilzes in das Gewebe und die Blutgefäße oder auf einer Änderung der lokalen Hämostase durch sezernierte hydrolytische Enzyme (Proteasen) oder Sekundärmetabolite von *A. fumigatus* beruhen.

Um diese Änderung der Hämostase im Verlauf einer IA zu analysieren, wurde der Einfluss von Morphologien (Konidien, geschwollene Konidien, Keimschläuche und Hyphen), deren Überstände, sowie von proteolytisch aktivem Überstand und von verschiedenen Sekundärmetaboliten von *A. fumigatus* auf die sekundäre Hämostase und die Aggregation und Aktivität von humanen Thrombozyten untersucht. Bei der Analyse der sekundären Hämostase konnte für keinen dieser eingesetzten Effektoren ein Einfluss festgestellt werden. Bei der Analyse der primären Hämostase und dem Einsatz von Morphologien und ihrer Überstände konnte für Hyphen und ihren ankonzentrierten Überstand eine aggregationssteigernde Wirkung auf Thrombozyten beobachtet werden, die möglicherweise auf Bestandteile der Zellwand von *A. fumigatus*, wie z. B.  $\beta$ -Galactosaminogalactan (GAG) zurückzuführen ist. Proteolytisch aktiver Überstand führte zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die zum Teil auf die PrtT-abhängige proteolytische Spaltung und damit die Aktivierung der Thrombinrezeptoren PAR1



und/oder PAR4 auf der Thrombozytenoberfläche, zum Teil aber auch auf GAG zurückzuführen sein kann. Von den hier verwendeten Mykotoxinen Gliotoxin, Fumagillin, Citrinin, Verruculogen und Deoxynivalenol konnte für Gliotoxin ein negativer Einfluss auf die Thrombozytenaktivität nachgewiesen werden. Dieses Toxin inhibierte die Aggregation und die Aktivität der Thrombozyten, möglicherweise durch die Bildung von Disulfid-Brückenbindungen oder auch durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Zudem wurde im Verlauf dieser Arbeit eine direkte Interaktion von Gliotoxin mit den ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> sowie mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  postuliert, die so zwar nicht bestätigt, aber auch nicht vollständig widerlegt werden konnte.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich zwei Wirkungen von *A. fumigatus* auf humane Thrombozyten: zum einen eine Aktivierung oder auch verstärkte Aggregation durch sezernierte Proteasen oder Zellwandbestandteile, zum anderen eine Hemmung durch Gliotoxin, was die bei einer IA beobachtete Thrombenbildung sowie die Blutungen erklären kann. Die Interaktion der aktivierten Thrombozyten mit den Zellen des Immunsystems sowie die zytotoxischen Eigenschaften von Gliotoxin könnten zudem für die beobachtete Gewebeerstörung verantwortlich sein. Dennoch ist weitere Forschung in diesem Gebiet unabdingbar, um die pathophysiologische Änderung der lokalen Hämostase durch *A. fumigatus* und seine Wirkung auf humane Thrombozyten besser zu verstehen und so eine schnellere Erkennung und Behandlung von Aspergillosen zu ermöglichen.

## Summary

The term haemostasis summarises the reactions that contribute to stop bleeding effectively. It can be divided into primary (thrombotic) haemostasis, secondary (plasmatic) haemostasis and fibrinolysis. Hereby platelets play an important role. Upon vascular injury platelets bind to released factors, get activated and aggregate with other platelets thereby forming a thrombus that seals the injury. Additionally, platelets possess immunocompetence: they can interact with other cells of the immune system, are able to recognise pathogens *via* receptors and to attack pathogens directly. One of those pathogens is the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. During its life cycle *A. fumigatus* produces 2.5 – 3  $\mu\text{m}$  small conidia that are distributed by the air and that can be inhaled deep into the alveoli of the human lung. In healthy humans these conidia are eliminated by the immune system as well as other defence mechanisms. In the immunocompromised patient, e. g. patients that had a hematopoietic stem cell transplantation, the conidia can germinate and cause different diseases, named aspergilloses, with Invasive Aspergillosis (IA) as the most severe form. It is associated with tissue damages, bleedings and thrombus formations at the site of infection. These complications could be due to an over exaggerated immune response, to the mechanical infiltration into the tissue and the blood vessel by the fungus or to an alteration of the local haemostasis caused by secreted hydrolytic enzymes (proteases) or secondary metabolites of *A. fumigatus*.

To characterise the alterations of the local haemostasis during an IA, the effect of different morphologies (conidia, swollen conidia, germ tubes and hyphae), their supernatants, as well as proteolytic active supernatant and secondary metabolites of *A. fumigatus* on the secondary haemostasis and the activity of human platelets was investigated. During the course of the analysis of the secondary haemostasis no influence of these effectors could be observed. In the course of the investigation of the effects of *A. fumigatus* on primary haemostasis using different morphologies and their supernatants, hyphae and their concentrated supernatant induced an increase of platelet aggregation. This increase might be caused by components of the cell wall of *A. fumigatus*, e. g. by  $\beta$ -Galactosaminogalactan (GAG). Proteolytic active supernatant led to an activation of thrombocytes which might be in part due to a PrtT-dependent cleavage and thereby activation of the thrombin-receptors PAR1 and/or PAR4 at the platelet surface as well as in part due to GAG. Of the secondary metabolites used (gliotoxin, fumagillin, citrinin, verruculogen and deoxynivalenol) a negative influence on the activity of the thrombocytes by gliotoxin could be observed. This toxin inhibited the aggregation and activation of thrombocytes maybe by the building of mixed disulphide bridges or by the formation of reactive

oxygen species as well. Moreover a direct interaction of gliotoxin with the ADP-receptors P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> as well as with the integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  was postulated in the course of this study. This interaction could not be confirmed but also not disproved completely.

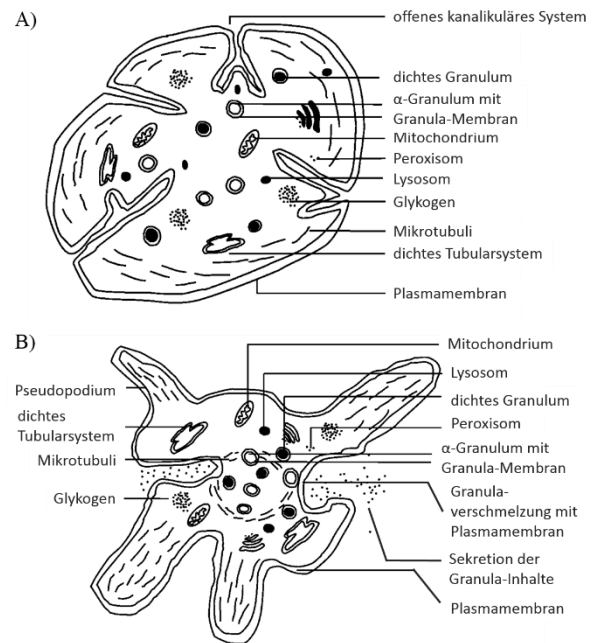
The results presented here clearly show two effects of *A. fumigatus* on human thrombocytes: on one hand the activation or increased aggregation caused by secreted proteases or components of the cell wall, on the other hand the inhibition caused by gliotoxin. Those two effects might explain the bleedings and thrombus formations observed during an IA. The interaction of the activated platelets with immune cells as well as the cytotoxic properties of gliotoxin could be responsible for the tissue damages observed. Nevertheless further investigations are needed for a better understanding of the pathophysiological alteration of the local haemostasis by *A. fumigatus* and its influence on human thrombocytes to enable a faster identification and treatment of aspergilloses.

## 1. Einleitung

### 1.1. Thrombozyten und die Hämostase

Als Hämostase bezeichnet man die Gesamtheit der Reaktionen, die zu einer effektiven Blutstillung beitragen. Hierbei spielen Thrombozyten, auch (Blut-) Plättchen genannt, eine entscheidende Rolle (Li *et al.*, 2010; Madlener & Pötsch, 2010). Diese sind 2-4 µm kleine, im Blut zirkulierende diskoide Zellfragmente ohne Zellkern und wurden 1865 von Max Schulz beschrieben und 1882 von Giulio Bizzozero näher untersucht (Brewer, 2006; Semple *et al.*, 2011). Sie werden über einen komplexen Fragmentierungsprozess aus Megakaryozyten produziert, bei dem eine Megakaryozyte tausende Plättchen entlässt (Thon *et al.*, 2010). Man findet 150 - 35\*10<sup>9</sup> Plättchen pro Liter

Blut, welche nach einer Lebensspanne von 8 - 10 Tagen in Milz und Leber durch Gewebemakrophagen abgebaut werden (Kehrel, 2008; Semple *et al.*, 2011). Abbildung 1 zeigt die Morphologie von humanen Thrombozyten. Sie besitzen eine glatte Oberfläche, die durch Einstülpungen, den Eingängen in das offene kanalikuläre System, unterbrochen wird. Dies ist ein Netzwerk von Tunneln, die das Zytoplasma durchdringen, so die Plättchenoberfläche vergrößern, den Stoffaustausch der Plättchen mit der Umgebung erleichtern und zudem als Membranreservoir dienen (Kehrel, 2008; Semple *et al.*, 2011). Oberhalb der Plasmamembran befindet sich eine Glykokalyx, eine im Transmissionselektronenmikroskop sichtbare Zone mit vielen Glykoproteinen. Sie enthält unter anderem Rezeptoren für Plättchen-Agonisten und -Antagonisten. Die Form von Thrombozyten wird durch Aktinfilamente des Membranzytoskeletts erhalten, die mit der Plasmamembran verbunden sind. Weiter besitzen Plättchen randständige mikrotubuläre Spiralen (marginal microtubule coils) sowie ein Spektrin-basiertes Membranskelett, welches die Form von Plättchen weiter stabilisiert (Kehrel, 2008; Michelson, 2012). Trotz des fehlenden Zellkerns besitzen Thrombozyten ein bestimmtes Set an mRNA und miRNA aus den Megakaryozyten sowie die volle Translationsmaschinerie für die

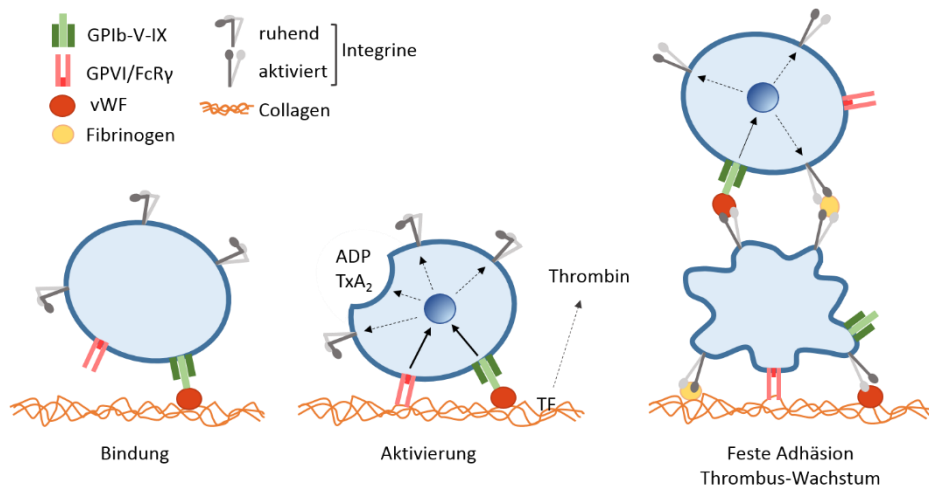


**Abbildung 1:** Thrombozytenmorphologie in Abhängigkeit des Funktionsstatus. **A)** Ruhende Thrombozyten mit diskoider Form. **B)** Aktivierte Thrombozyten mit Pseudopodien (mod. nach Kehrel, 2008).

Proteinbiosynthese (Rowley *et al.*, 2012). Zudem besitzen Plättchen verschiedene Speicherkörper, sog. Granula, die in (elektronen-)dichte Granula (dense bodies/granula),  $\alpha$ -Granula und Lysosomen unterschieden werden (Michelson, 2012; Morgenstern, 2010). In den dichten Granula sind unter anderem Nukleotide wie Adenosin-Triphosphat (ATP) und Adenosin-Diphosphat (ADP) sowie auch Serotonin und Kalzium enthalten. In den  $\alpha$ -Granula sind unter anderem Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, vonWillebrand-Faktor (vWF) und Fibronectin sowie Wachstumsfaktoren (z. B. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), Chemokine und Zytokine (u.a. CXCL4, CCL5, IL-1, IL-8), fibrinolytische Faktoren (z.B. Plasminogen) und antimikrobielle Proteine, kurz AP genannt (z. B. Thrombozidine, Kinocidine) zu finden. Lysosomen enthalten Proteasen (Kathepsine, Elastasen) sowie unter anderem auch Phosphatasen und Glykosidasen. Membranglykoproteine sind Bestandteil der Membran von allen drei Granula-Arten, z. B. CD63 in den dichten Granula und Lysosomen und CD62P (P-Selektin) in  $\alpha$ -Granula (Michelson, 2012; Morgenstern, 2010; Nishibori *et al.*, 1993; Nurden, 2011; Speth *et al.*, 2013b).

Eine Funktion von Thrombozyten liegt in der Blutgerinnung (thrombozytäre oder auch primäre Hämostase). Wird ein Blutgefäß verletzt, wird durch die Ruptur des Gefäßendothels die subendotheliale Matrix freigelegt. Sie enthält adhäsive Makromoleküle wie Collagen, Laminin, Fibrinogen und Fibronectin, an die Plättchen über spezifische Glykoproteine (z. B. GPVI für Collagen, GPIb für vWF) in einem koordinierten Prozess binden (siehe Abbildung 2). An das enthaltene Collagen kann nun der frei im Blut zirkulierende vWF binden. Durch die Bindung kommt es zu einer Strukturveränderung des vWF, was die Bindung von Thrombozyten an vWF über den GPIb-IX-Komplex auf ihrer Oberfläche ermöglicht, wodurch die Thrombozyten aktiviert werden. Die Aktivierung beruht auf der Kontraktion des Zytoskeletts der Thrombozyten und führt zu einer Änderung der Morphologie, auch Shape Change genannt. Dieser ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von filamentösen Pseudopodien. Zudem wird während der Aktivierung der Plättchen der Inhalt ihrer Granula in das Plasma freigesetzt und die Zusammensetzung der Membran unter anderem durch die Exposition der granulären Glykoproteine wie CD62P und CD63 und negativ geladener Phospholipide verändert. Durch die freigesetzten Nukleotide und Adhäsionsproteine werden weitere Thrombozyten aktiviert, die an die Pseudopodien der bereits aktivierten Plättchen binden und so zusammen mit quervernetztem Fibrin ein stabiles Gerinnsel bilden und damit den Wundverschluss bewirken. Zudem aktiviert Thrombin, welches durch die Aktivität des aus der subendothelialen Matrix freigelegten Tissue Faktors (Gewebethromboplastin) während der parallel laufenden plasmatischen Gerinnung aus Prothrombin (Gerinnungsfaktor II, FII) gebildet wird, weitere

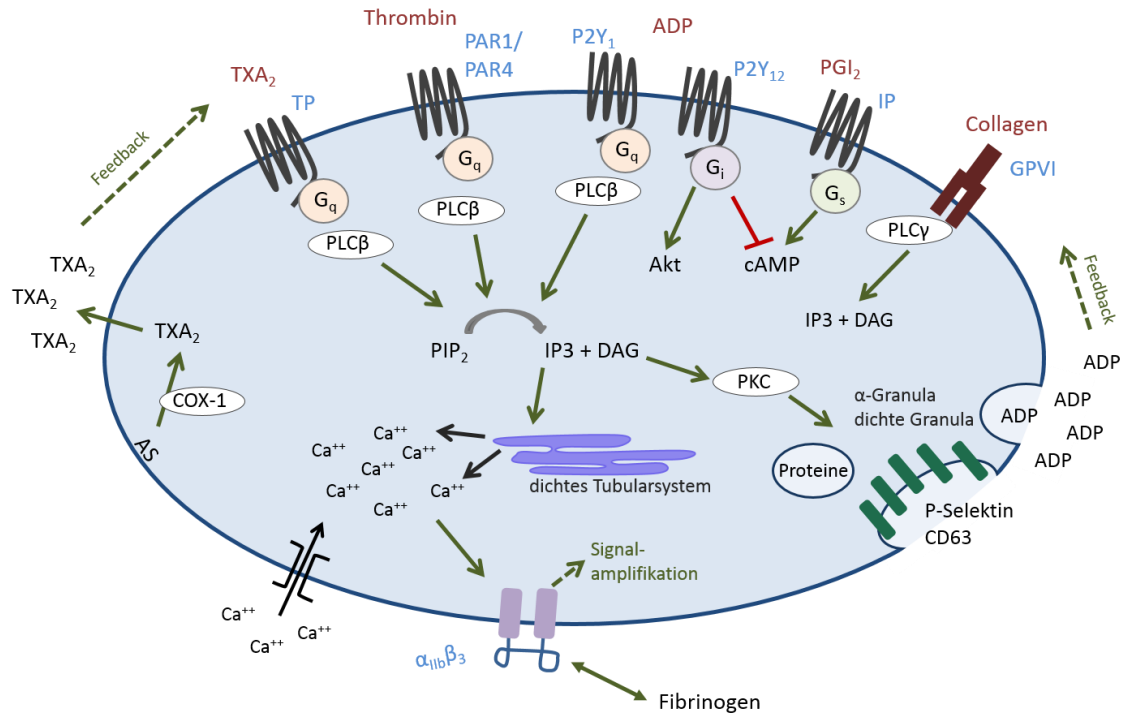
Signalwege in den Thrombozyten (Broos *et al.*, 2011; Jurk K, 2005; Madlener & Pötsch, 2010; Nieswandt *et al.*, 2011).



**Abbildung 2:** Vereinfachtes Modell der Rezeptor-abhängigen Bindung von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix. Die Bindung der Plättchen erfolgt über die Interaktion von GPIb mit vWF, was die Bindung von GPVI an Collagen ermöglicht. Hierdurch werden die Plättchen aktiviert und über die sog. Inside-Out-Regulation dessen Integrine aktiviert. Das aus den Granula ausgeschüttete ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) verstärken die Integrin-Aktivierung auf den adhären Plättchen und vermitteln durch die Aktivierung weiterer Plättchen das Thrombus-Wachstum. Der aus der Matrix freigesetzte Tissue Faktor (TF) führt zudem zur Bildung von Thrombin, was weiter zur Plättchenaktivierung beiträgt. Diese Abbildung schließt die Beteiligung weiterer Rezeptoren nicht aus (mod. nach Nieswandt *et al.*, 2011).

Die hauptsächlich an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligten Rezeptoren sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren für die Serin-Protease Thrombin (PAR1 und PAR4, Protease-aktivierter Rezeptor), für ADP (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>), und für Thromboxan A<sub>2</sub> (TP) sowie das transmembrane Glykoprotein GPVI für Collagen und das Integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ III für Fibrinogen. Generell beginnt die Induktion der Plättchenaktivierung durch Agonisten mit der Aktivierung von verschiedenen Isoformen der Phospholipase C (PLC), welches aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) den second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) bildet. Dies bewirkt die Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch dessen Freisetzung aus dem dichten Tubularsystem, was weiter zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup> durch Kanäle in der Plasmamembran der Zelle führt. Durch den erhöhten Kalziumlevel wird das Integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ III aktiviert („inside-out signaling“) und über dessen reversible Konformationsänderung seine Affinität für Fibrinogen erhöht. Das gebundene Fibrinogen ermöglicht zum einen die Adhäsion der Plättchen untereinander, zum anderen bewirkt das folgende „outside-in signaling“ eine Signalamplifikation. Die Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung erfolgt schnell und einheitlich durch starke Agonisten wie Thrombin, weniger stark durch schwächere Agonisten wie ADP und Collagen, welche für eine maximale Antwort auf die Synthese von TXA<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure der

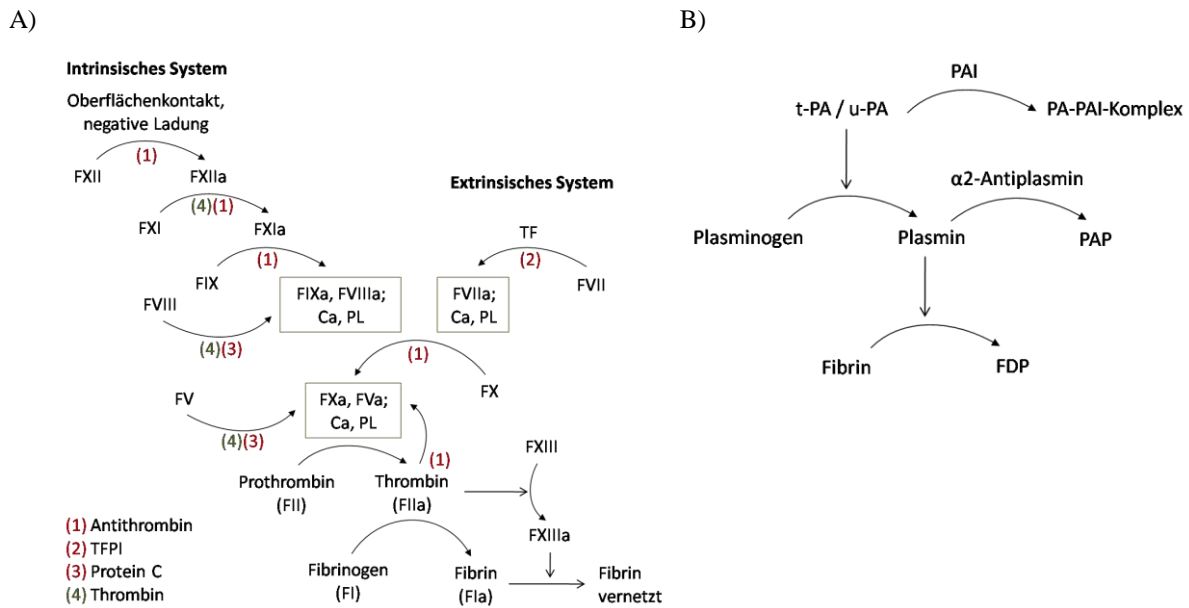
Plasmamembran über die Cyclooxygenase 1 (COX-1) sowie seine Freisetzung angewiesen sind. Neben IP<sub>3</sub> entsteht durch die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> Diacylglycerol (DAG), welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, was wiederum zur Verschmelzung der verschiedenen Granula mit der Plasmamembran und zur Freisetzung von deren Inhalt führt. Das ADP aus den Granula dient als autokriner und parakriner Agonist bei der Rekrutierung weiterer Plättchen und der Stabilisierung des Thrombus. Neben der Plättchenaktivierung über P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, führt die Bindung von ADP an P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> zum einen zur Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt und damit zur Integrin-Aktivierung, zum anderen wird die Bildung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) inhibiert, was sonst zur Inhibierung des Plättchens führen würde. Weiter konnte gezeigt werden, dass zudem alle anderen Plättchen-Agonisten, je nach Agonist und Dosis, für eine maximale Plättchenaggregation von dem freigesetzten ADP abhängig sind. Da allerdings TP und PAR1 bzw. PAR4 eine stabile Aktivierung der PLC bewirken, scheint ADP bei der Anwesenheit von Thrombin oder Thromboxan A<sub>2</sub> weitestgehend über die Aktivierung von G<sub>i</sub> zu der Thrombozytenaktivierung beizutragen (Clemetson, 2012; Li *et al.*, 2010; Michelson, 2012; Swieringa *et al.*, 2014).



**Abbildung 3:** Übersicht über die wesentlichen Rezeptoren und Signalwege der Thrombozytenaktivierung. Die Namen der Rezeptoren sind blau, ihre Agonisten rot beschriftet. Details siehe Text. AS: Arachidonsäure, PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; PAR: Protease-aktivierter Rezeptor; TXA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>: Prostaglandin I<sub>2</sub>; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat (mod. nach Michelson, 2012).

Neben der primären existiert auch eine sekundäre Hämostase, auch plasmatisches Gerinnungssystem genannt. Es ist ein Multienzymsystem, bei dem die einzelnen Enzymreaktionen über Gerinnungsfaktoren (F) miteinander verknüpft sind, die zunächst aktiviert werden müssen. Hierbei bildet das Substrat der ersten Reaktion das aktive Enzym in der darauf folgenden Reaktion. Ein Enzym kann mehrere Substrate umsetzen, bevor es inaktiviert wird und bewirkt somit eine Signalamplifikation, die durch weitere Rückkopplungsmechanismen verstärkt wird (siehe Abbildung 4A). Die Benennung der Faktoren erfolgte nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung in römischen Ziffern. Das plasmatische Gerinnungssystem lässt sich in das intrinsische und das extrinsische System einteilen. Diese Aufteilung hat jedoch nur didaktische Gründe (Kemkes-Matthes *et al.*, 2001; Madlener & Pötsch, 2010).





**Abbildung 4: A)** Vereinfachtes Modell des plasmatischen Gerinnungssystems. Die Aktivierung der Kaskade erfolgt entweder über die Bindung des Gerinnungsfaktors (F) XII an defekte Gefäßstrukturen bzw. an die negativ geladene Plättchenoberfläche, oder über die Aktivierung von FVII durch den Tissue Factor (TF). Die Faktoren Va, VIIa und IXa bilden zusammen mit Kalzium (Ca) und Phospholipid (PL) einen Enzymkomplex. Dem intrinsischem und dem extrinsischem Weg sind die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin gemeinsam, was wiederum Fibrinopeptide (Fragmente X und Y) aus Fibrinogen im Plasma spaltet und so lösliches Fibrin entsteht. Dieses wird anschließend durch den aktivierten Faktor XIII zu der unlöslichen Fibrinmatrix umgesetzt. In der Abbildung sind die Substrate von einigen Inhibitoren (rote Zahlen) und des Amplifikators Thrombin (grüne Zahl) angegeben. a: aktivierter Gerinnungsfaktor; TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor (mod. nach Madlener & Pötsch, 2010). **B)** Vereinfachtes Modell der Fibrinolyse. Die Aktivatoren t-PA und u-PA aktivieren zum einen Plasminogen zu Plasmin, weiter bilden sie mit dem Plasminogenaktivatorinhibitor einen Komplex und inhibieren diesen so. Plasmin spaltet anschließend Fibrin in seine Abbauprodukte und löst so die Quervernetzung. Plasmin wird am Ende durch α2-Antiplasmin inaktiviert. t-PA: tissue-Typ Plasminogenaktivator; u-PA: urokinase-Typ Plasminogenaktivator; PA: Plasminogenaktivator; PAI: Plasminogenaktivatorinhibitor; PAP: Plasmin-α2-Plasmininhibitor-Komplex; FDP: Fibrindegradationsprodukte (mod. nach Madlener & Pötsch, 2010).

Im intrinsischen Teil des plasmatischen Gerinnungssystems nimmt der Faktor XII eine Schlüsselstellung ein, da er die Interaktion mit dem fibrinolytischen System ermöglicht und so zur Regulierung der Gerinnung beiträgt. Mittels dieses Systems bleibt die Gerinnung auf den verletzten Bereich beschränkt, zudem wirkt es dem kompletten Verschluss des Gefäßes entgegen. Auch hier kann man zwischen intravasaler und extravasaler Fibrinolyse unterscheiden, wobei die extravasale nicht unmittelbar an der Gerinnungssystemaktivierung beteiligt ist. Zentrales Enzym der Fibrinolyse ist Plasmin, welches als inaktives Proenzym Plasminogen im Blut zirkuliert. Seine Aktivierung erfolgt durch die Plasminogenaktivatoren (PA, Serinproteasen) Urokinase-Typ PA (u-PA) und tissue-Typ PA (t-PA). Sie werden wie auch die Gerinnungsfaktoren u.a. von Endothelzellen synthetisiert. Das aktive Plasmin spaltet anschließend Fibrin in seine Degradationsprodukte X und Y und diese weiter zu den D-Dimeren D und E. Die Fibrinolyseaktivität wird durch verschiedene Mechanismen reguliert:

die Plasminbildung wird durch die Aktivität des Plasminogenaktivatorinhibitors (PAI) reguliert, die Fibrinolyseaktivität wird durch das  $\alpha$ 2-Antiplasmin inhibiert. Die am Ende der Fibrinolyse entstehenden Fibrindegradationsprodukte besitzen zudem antikoagulatorische Wirkung (Adam *et al.*, 2009; Gillies & Tait, 2002; Kemkes-Matthes *et al.*, 2001; Madlener & Pötsch, 2010).

Einer der Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung ist der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Er inhibiert den Komplex aus TF und dem Faktor VIIa. Ein weiterer Inhibitor ist Antithrombin, das u. a. die Serin-Protease Thrombin inhibiert. Seine relativ langsame Reaktion wird durch Heparin beschleunigt. Ein weiterer Inhibitor, Protein C, wird durch Thrombin aktiviert und inhibiert zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Faktoren Va und VIIIa durch proteolytische Spaltung. Thrombin hingegen kann als zentraler Amplifikator betrachtet werden. Zu seinen Substraten gehören die Faktoren FV, FVIII, FXI, FXIII sowie Fibrinogen, Protein C und die Rezeptorfamilie PAR auf der Thrombozytenoberfläche, was eine Regulation der Thrombinwirkung erforderlich macht. Diese wird durch unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten, der Modulation der Aktivität durch Kofaktoren und eine unterschiedliche räumliche Verteilung der Substrate bewerkstelligt. Darüber hinaus sind die Endothelzellen an der Regulierung der Plättchenaktivität beteiligt. Über das dort gebildete Prostazyklin (Prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) wird die Aktivität von Thrombozyten über Erhöhung des cAMP-Levels bzw. über verminderten intrazellulären Kalziumfluss verringert. Die auf den Endothelzellen gebildete Apyrase, eine ADPase, entfernt zudem freigesetztes ADP aus dem Plasma. Weiter wurde beobachtet, dass Thrombozyten auf der Außenseite eines wachsenden Thrombus weniger stark aktiviert werden, so weniger stark adhären und auch ihre Rezeptoren deaktiviert werden könnten, wodurch sich Plättchen wieder vom Thrombus lösen. Am Ende ist die Verletzung durch eine nicht-thrombogene Schicht von Plättchen bedeckt. Der Mechanismus hierfür ist allerdings noch nicht bekannt (Clemetson, 2012; Daví, 2007; Kemkes-Matthes *et al.*, 2001; Madlener & Pötsch, 2010).

## 1.2. Thrombozyten als Zellen des Immunsystems

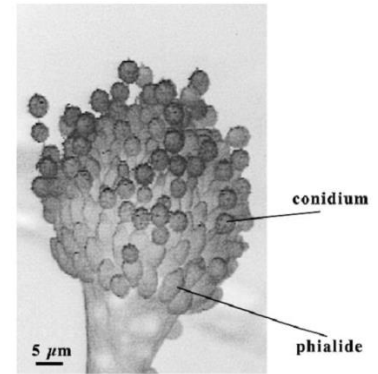
Neben ihrer Rolle bei der Blutgerinnung besitzen Thrombozyten zudem Immunkompetenz und wirken dabei auf mehreren Wegen auf Pathogene: I) Thrombozyten können über verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche Pathogene erkennen, wodurch sie an diese binden und aktiviert werden. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrin) und GPIb $\alpha$ , die über an Pathogene gebundenes Fibrinogen oder Fibronectin bzw. von Willenbrand-Faktor aktiviert werden und so zur Aktivierung und Aggregation von Plättchen führen können. Weiter findet man auf der Thrombozytenoberfläche die Toll like Rezeptoren (TLR), Mitglieder der Proteinfamilie mit Leucin-reichen Repeats (leucin rich repeat, LRR). Thrombozyten exprimieren kontinuierlich geringe Mengen der Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR9. Ihre Expression sowie die Expression anderer TLRs kann während der Plättchenaktivierung hochreguliert werden. Die Rezeptorfamilie der TLRs spielt eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von konservierten sog. pathogen-associated molecular pattern (PAMP) und wird auch von neutrophilen Granulozyten - kurz Neutrophilen -, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) exprimiert. Bei Thrombozyten vermitteln sie die Aktivierung, die Freisetzung von immunmodulatorischen Stoffen, die Aktivierung weiterer Thrombozyten sowie die Pathogenpräsentation für die Phagozytose durch Neutrophile oder Makrophagen. Über Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren werden Pathogen-induzierte Entzündungsreaktionen erkannt, die zur Plättchenaktivierung mit deren Aggregation und Granulafreisetzung führen. Durch die Exposition von CD62P bei stimulierten Plättchen sowie der auf der Oberfläche zu findenden Complement-Rezeptoren kann die Aktivierung des Complement-Systems vermittelt werden (Andrews *et al.*, 2014; Cox *et al.*, 2011; Peerschke *et al.*, 2006; Semple *et al.*, 2011; Speth *et al.*, 2013a; Yeaman, 2014). II) Über APs auch „platelet microbicidal peptides“ (PMP) genannt, die bei der Aktivierung von Plättchen ausgeschüttet werden, können Thrombozyten Pathogene direkt angreifen. Diese kationischen amphipatischen Polypeptide greifen hauptsächlich die mikrobielle Zellmembran an, können aber auch auf intrazelluläre Moleküle und die Zellwand wirken. Zu ihnen zählen Kinozidine (z.B. CXCL4, CCL5), Defensine, Thymosin  $\beta_4$  sowie abgeleitete antimikrobielle Peptide (z.B. Fibrinopeptid A) und Thrombozidine (proteolytische Derivate von CXCL7). Zudem setzen aktivierte Plättchen Serotonin frei, welches das Hyphenwachstum und die Integrität der Zellmembran von Pilzen angreift (Perkhofer *et al.*, 2007; Speth *et al.*, 2013a; Tang *et al.*, 2002; Yeaman, 2014). III) Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der Aktivierung von Plättchen sowie Endozytose durch aktivierte Plättchen können Pathogene direkt angegriffen werden (Speth *et al.*, 2013a; Yeaman, 2010). IV) Des Weiteren können Thrombozyten die

Entzündungsreaktion modulieren und mit anderen Immunzellen interagieren. Die von Plättchen freigesetzten Chemokine und Zytokine locken Leukozyten an. Zusammen mit Mikropartikeln, Oberflächenmoleküle wie P-Selektin und CD40L, sowie IL-1 und Wachstumsfaktoren, die den Crosstalk mit Endothelzellen und Leukozyten vermitteln, werden Leukozyten und Endothelzellen aktiviert und es kommt zur Migration der Leukozyten an den Infektionsort. P-Selektin vermittelt darüber hinaus die Adhäsion von Plättchen an Neutrophile und induziert ihre Degranulation. Zudem wurde eine TLR-4-abhängige Interaktion von Thrombozyten mit Neutrophilen beschrieben, bei dem LPS-bindende Plättchen an Neutrophile adhärirten und neben der Degranulation auch die Freisetzung von DNA stimulierten und so zur Bildung von sog. „neutrophil extracellular traps“ (NETs) und zum Einfangen („trapping“) von Bakterien beitragen. Weiter interagieren Thrombozyten mit B- und T-Zellen: über die Bindung von CD40L von Thrombozyten an CD40 auf B-Zellen werden diese getriggert, T-Zellen werden entweder durch direkten Kontakt über Adhäsionsmoleküle oder durch Chemokine oder CD40L von Plättchen stimuliert (Andrews *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 2007; Semple *et al.*, 2011; Speth *et al.*, 2013a).

Neben Bakterien, Parasiten und Viren, werden Thrombozyten auch mit pathogenen Pilzen konfrontiert, wie z. B. *Aspergillus fumigatus*, der folgend näher beschrieben wird (Christin *et al.*, 1998; Lass-Flörl *et al.*, 2013; Speth *et al.*, 2013a).

### 1.3. *Aspergillus fumigatus* – Lebenszyklus und Habitat

*Aspergillus fumigatus* ist ein filamentöser haploider Schimmelpilz und zählt zum Stamm der Ascomyceten. (Brakhage & Langfelder, 2002; Dyer & O’Gorman, 2012; Horn *et al.*, 2012). *A. fumigatus*, der zum ersten mal 1863 von Fresenius beschrieben wurde, bildet im Laufe seines Lebenszyklus asexuelle Konidien mit einem Durchmesser von 2,5 - 3  $\mu\text{m}$  aus, welche durch Erschütterungen oder starke Luftströme freigelassen und durch die Luft verbreitet werden (Latgé, 1999; Speth *et al.*, 2013c). Treffen diese Konidien auf einen geeigneten Untergrund, keimen sie aus. Hierbei schwillt



**Abbildung 5:** Konidiophore von *Aspergillus fumigatus*. (Brakhage & Langfelder, 2002)

die Konidie zunächst durch isotropes Wachstum an, bevor sie in polares Wachstum und der Ausbildung eines Keimschlauches übergeht. Während des vegetativen Wachstums bildet sich ein Mycel aus vielkernigen und septierten, apikal-wachsenden Hyphen aus. Nach einer gewissen Zeit bilden sich Lufthyphen, die sich zu sogenannten Konidiophoren differenzieren, an deren Ende sich ein Vesikel ausbildet. Von dem Vesikel bilden sich flaschenförmige Phialiden aus, an denen sich basipetal die grünen Konidien in Ketten abschnüren. Anders als bei anderen Aspergilli sind bei *A. fumigatus* zwischen Vesikel und Phialide keine Metulae vorhanden (Brakhage & Langfelder, 2002; Krijgsheld *et al.*, 2013; Latgé, 1999; Rhodes, 2006). Bis 2009 wurde *A. fumigatus* zu den „fungi imperfecti“ gezählt, da bis dahin kein sexueller Lebenszyklus nachgewiesen wurde (Große & Krappmann, 2008; Nierman *et al.*, 2005; Paoletti *et al.*, 2005). Inzwischen konnte unter definierten Bedingungen ein sexueller Zyklus von *A. fumigatus* mit der Bildung von Cleistothecien mit gelb-weißen bis grün-weißen lenticularen vegetativen Ascosporen gezeigt werden. Das entsprechende Teleomorph wurde als *Neosartorya fumigata* benannt (O’Gorman *et al.*, 2009; Samson *et al.*, 2009; Szewczyk & Krappmann, 2010).

Als saprophytischer ubiquitärer Pilz ist *A. fumigatus* besonders auf sich zersetzendem organischem und pflanzlichem Material zu finden, wie im Boden und Kompost. Das Genom von *A. fumigatus* codiert für Glycosylhydrolasen wie Xylanasen und Glucanasen, die in der Lage sind Zellwandpolymere von Pflanzenzellen, wie Hemicellulose und Pectin, abzubauen (Tekaia & Latgé, 2005). Somit spielt dieser Pilz eine essentielle Rolle im Recycling von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (Brakhage & Langfelder, 2002; Latgé, 1999; Tekaia & Latgé, 2005).

#### **1.4. *Aspergillus fumigatus* als Krankheitserreger**

Als ubiquitärer Schimmelpilz ist *A. fumigatus* weit verbreitet. Jeder Mensch atmet täglich mehrere hundert seiner Konidien ein, wobei diese bis tief in die Alveolen gelangen können (Dagenais & Keller, 2009; Latgé, 1999). Bei immunkompetenten Personen werden die Konidien von dem angeborenen Immunsystem und anderer Abwehrmechanismen eliminiert, bei Personen mit zu starkem oder zu schwachem Immunsystem können sie dagegen zu Erkrankungen, den sog. Aspergillosen führen. Der primäre Infektionsort bei Infektionen mit *A. fumigatus* stellt der Respirationstrakt dar, aber auch Infektionen über die Nebenhöhlen oder die Haut, z. B. bei einem Katheter oder nach einer Verbrennung, sind möglich. Bei Aspergillosen wird zwischen verschiedenen Formen unterschieden. Je nach Ort der Krankheit innerhalb des Respirationstraktes und Ausmaß der Kolonisierung und Invasion spricht man unter anderem von Allergischer Bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA), Aspergillom, Chronischer Nekrotisierender Pulmonaler Aspergillose (CNPA) und Invasiver Aspergillose (IA) (Dagenais & Keller, 2009; Kousha *et al.*, 2011; Latgé, 1999).

Die Allergische Bronchopulmonale Aspergillose ist eine pulmonale Krankheit ausgelöst durch eine Hypersensitivität gegen Antigene von *A. fumigatus*, meist bei Patienten mit Asthma (0,7-3,5 % der Patienten) oder cystischer Fibrose (1-15 % der Patienten). Hierbei wächst der Pilz saprophytisch in der Lunge, was zu einer andauernden bronchialen Entzündung führt. Die Konidien triggern hier eine allergische Entzündungsreaktion in den Atemwegen, die bis zur bronchialen Hemmung gehen kann. Die Symptome sind Stenoseatmung, Auswurf von Sputum, Schmerzen im Brustkorb und Fieber. Die Therapie besteht hier aus der Kombination von Kortikosteroiden zur Bekämpfung der Entzündung sowie Antimykotika (Denning *et al.*, 2013; Kousha *et al.*, 2011; Latgé, 1999; Rüchel & Reichard, 1999; Steinbach, 2008).

Das Aspergillom wird auch als Pilzball bezeichnet. Es bildet sich in Hohlräumen in der Lunge, die durch vorangegangene Krankheiten entstanden sind wie z. B. bei einer Tuberkulose oder Sarkoidose. Ein Aspergillom besteht aus einer spheroiden Masse von Hyphen, eingebettet in eine proteinhaltige Matrix mit sporulierenden Strukturen am äußeren Rand. Der Pilzball kann sich in dem Hohlraum bewegen, aber dringt nicht in das umgebende Lungengewebe oder die Blutgefäße ein. Während einige Patienten asymptomatisch sein können, zeigen sich bei vielen Symptome wie Gewichtsverlust und das Abhusten von bluthaltigem Sputum auf Grund von Verletzungen der Blutgefäße in der Nähe des Aspergilloms durch Endotoxine oder mechanische Irritation. Da antifungale Therapien hier oft nicht erfolgreich sind, ist die Entfernung des betroffenen Bereichs die bevorzugte Behandlung (Denning, 2001; Kousha *et al.*, 2011; Latgé, 1999; Rüchel & Reichard, 1999; Steinbach, 2008).

Die chronische nekrotisierende pulmonale Aspergillose (CNPA), auch bekannt als semi-invasive Aspergillose, ist ein nicht schmerzhafter infektiöser Prozess im Lungengewebe sekundär zu einer lokalen Invasion mit *A. fumigatus*. Diese Krankheit verläuft langsam, über Wochen oder Monate. Sie betrifft Patienten mit chronischen Lungenkrankheiten, vorangegangener Tuberkulose, Cystischer Fibrose oder auch Sarkoidose, aber auch Personen mit leicht abgeschwächtem Immunsystem z. B. durch Alkoholismus, Diabetes mellitus oder Mangelernährung können betroffen sein. Im Gegensatz zum Aspergillom ist kein bereits vorhandener Hohlraum nötig, zudem kann es hier zu einer lokalen Invasion des Lungengewebes kommen. Die Symptome sind Fieber, Unwohlsein, Ermüdung, Gewichtsverlust und chronischer blutiger Husten. Eine CNPA ist charakterisiert durch eine Nekrose des Lungengewebes, akuter oder chronischer Entzündung der Wandung sowie das Vorhandensein von Hyphen (Denning, 2001; Dupont *et al.*, 2000; Ellis, 1999; Kousha *et al.*, 2011).

Eine weitere Form der Aspergillose ist die sogenannte Invasive Aspergillose (IA). Man unterscheidet hier vier Typen: I) akute oder chronische pulmonale Aspergillose; II) Tracheobronchitis und hemmende bronchiale Krankheiten; III) akute invasive Rhinosinusitis; IV) disseminierte invasive Aspergillose, bei der auch andere Organe wie das Gehirn betroffen sind. Die Symptome einer IA sind mit Fieber, Schmerzen im Brustkorb, Husten, Unwohlsein, Gewichtsverlust und Atemnot relativ unspezifisch. Die Mortalitätsrate einer IA liegt zwischen 50 % bei neutropenen Patienten und 95 % bei Empfängern hämatopoietischer Stammzelltransplantationen (HSZT). Die Hauptrisikofaktoren für eine IA sind Immundefizienz mit Neutropenie, HSZT und Organtransplantation, sowie verlängerte Kortikosteroid-Therapie, Chemotherapie, AIDS, Leukämie, auch in Verbindung mit einer Infektion des Cytomegalovirus, was die Bedeutung des Immunstatus des Patienten bei einer IA verdeutlicht (Dagenais & Keller, 2009; Kousha *et al.*, 2011; Latgé, 1999; Steinbach, 2008).

Zur Therapie von Aspergillosen werden drei verschiedene Klassen von Antimykotika verwendet. Amphotericin B z. B. gehört wie auch Nystatin zu den Polyenen. Sie binden an das Ergosterol der Zellmembran im Pilz, was zur Bildung von Poren in der Zellmembran und zum Efflux von intrazellulären Molekülen und schließlich zum Tod des Pilzes führt. Als eine der Nebenwirkung weist Amphotericin B eine hohe Nephrotoxizität auf, die z. T durch die Bindung des Therapeutikums an das Cholesterin der menschlichen Zellwand erklärt werden kann (Cornely & Ullmann, 2005; Thompson *et al.*, 2009). Itraconazol und Voriconazol gehören zur Klasse der Triazole. Sie inhibieren den Ergosterol-Biosyntheseweg im endoplasmatischen Retikulum des Pilzes, was die Permeabilität und Fluidität der Zellmembran beeinflusst (Odds *et al.*, 2003). Caspofungin gehört der Klasse der Echinocandine an, welche die Synthese von  $\beta$ -

(1,3)-Glucan hemmen und so die Zellwand des Pilzes schädigen (Cornely & Ullmann, 2005; Denning, 2003). Diese und andere Therapeutika haben auf Grund von späten Diagnosen von Pilzinfektionen, ihrem Aktivitätsspektrum und ihrer biologischen Verfügbarkeit im Zielorgan nur mäßigen Erfolg. Zudem kann ihre Wirkung durch gleichzeitige Gabe anderer Medikamente, wie Kortikosteroide zur Reduktion von Entzündungsreaktionen, vermindert werden. Darüber hinaus sind ihre Toxizität und die Schwankungen in der Absorption problematisch, was eine regelmäßige Überwachung der Medikamentenkonzentration im Blut des Patienten („drug monitoring“) nötig macht. Des Weiteren sind auch Resistenzen von *A. fumigatus* gegen Azole wie Itraconazol bekannt. Die weitere Suche nach neuen Antimykotika mit höherer Effizienz und geringeren Nebenwirkungen ist damit unerlässlich (Brown *et al.*, 2012; Latgé, 1999; Patterson & Streck, 2010; Paul & Moye-Rowley, 2014; Steinbach, 2008; Vermeulen *et al.*, 2013).

### 1.5. Pathogenitätsfaktoren von *A. fumigatus*

Als ubiquitärer Schimmelpilz besitzt *A. fumigatus* verschiedene Merkmale, die es ihm ermöglichen sich auf eine sich rasch ändernden Umwelt anzupassen und sich von den komplexen Substraten in der Umgebung zu ernähren. *A. fumigatus* besitzt keine spezifischen Virulenzfaktoren - Determinanten, die den Wirt schädigen. Es scheinen vielmehr die nachfolgenden Pathogenitätsfaktoren zu sein, die es ihm ermöglichen als opportunistisches Pathogen in immunsupprimierten Patienten zu überleben (Hohl & Feldmesser, 2007; Tekaia & Latgé, 2005).

Als ein im Kompost lebender thermotoleranter Pilz ist *A. fumigatus* in der Lage sich den fluktuierenden Temperaturen in dieser ökologischen Nische anzupassen und auch noch bei Temperaturen über 55 °C zu wachsen. Diese Thermotoleranz mit einem Wachstumsoptimum bei 37 °C erlaubt es ihm auch innerhalb des Wirtskörpers zu wachsen (Abad *et al.*, 2010; Askew, 2008; Tekaia & Latgé, 2005). Neben seiner Thermotoleranz stellt auch die Zellwand von *A. fumigatus* einen wichtigen Faktor dar. Sie sorgt nicht nur für die strukturelle Integrität, sondern auch für den physikalischen Schutz der Zelle und ist der Ort der Interaktion zwischen Pilz und Umwelt bzw. Wirt. Die Zellwand besteht hauptsächlich aus linearen und verzweigten Polysacchariden wie  $\beta$ -(1,3)-Glucan,  $\beta$ -(1,4)-Glucan, Chitin, Galactomannan (GM) und  $\beta$ -Galactosaminogalactan (GAG), sowie aus Proteinen (Abad *et al.*, 2010; Askew, 2008; Latgé & Beauvais, 2014).  $\beta$ -(1,3)-Glucan zählt wie auch Galactomannan zu den pathogen-associated molecular pattern (PAMP), die mit dem Immunsystem des Wirtes interagieren und es aktivieren



und vermittelt die Bindung des Pilzes an Fibronectin und Laminin (Abad *et al.*, 2010; Fontaine *et al.*, 2011). Das in der Zellwand enthaltene GAG wurde bereits 1976 in *A. niger* beschrieben und später auch in *A. fumigatus* identifiziert und charakterisiert (Bardalaye & Nordin, 1976; Fontaine *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2011). Es besteht aus  $\alpha$ -(1,4)-verbundener Galaktose und  $\alpha$ -(1,4)-verbundenem N-Acetylglucosamin und wird vom Myzel von *A. fumigatus* sekretiert. Im Wirt inhibiert es die Th-(Helferzelle)1 und Th-17 Zytokin-Ausschüttung und induziert die Apoptose von Neutrophilen. Zudem fungiert es als Adhesin von *A. fumigatus*, gezeigt für Plastik, Fibronectin und Epithelzellen, und maskiert das  $\beta$ -Glucan der Zellwand vor der Erkennung durch Dektin-1, was eine Entzündungsreaktion verhindert. GAG trägt somit zu der Virulenz von *A. fumigatus* bei (Bardalaye & Nordin, 1976; Fontaine *et al.*, 2011; Gravelat *et al.*, 2013; Latgé & Beauvais, 2014).

Während die Zusammensetzung der Polysaccharide der inneren Schicht der Zellwand bei Hyphen und Konidien ähnlich ist, unterscheidet sich die Zusammensetzung der äußeren Schicht. Konidien enthalten hier Pigmente wie Dihydroxynaphtalen-Melanin (DHN-Melanin), sowie Hydrophobine - sog. Rodlets - geclustert in Mikrofibrillen. Melanin schützt die Zelle vor Schädigung durch UV-Strahlung und reaktiven Sauerstoff-Spezies (Reactive Oxygen Species, ROS) sowie vor enzymatischer Lyse und maskiert zusätzlich das  $\beta$ -Glucan der Zellwand. Die Synthese von DHN-Melanin ist maßgeblich Abhängig von der Aktivität der Polyketid-Synthase PksP. Die Deletion des hierfür codierenden Genes *pksP* führte zu weißen Konidien, die eine attenuierte Virulenz und eine höhere Suszeptibilität gegen Monozyten aufwiesen. Zudem waren die Konidien anfälliger für ROS (Abad *et al.*, 2010; Heinekamp *et al.*, 2013; Jahn *et al.*, 2002; Sales-Campos *et al.*, 2013). Die auf der Oberfläche von Konidien zu findenden Rodlets besitzen hydrophobe Eigenschaften. Sie werden bei der Verbreitung der Konidien sowie bei deren Anheftung an das respiratorische Epithelium benötigt und vermindern die Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Der Deletionsstamm von *rodA*, verantwortlich für die Rodlet-Produktion, wies eine höhere Sensitivität gegen alveolare Makrophagen auf und führte zu kleineren Läsionen und einer verminderten Immunantwort (Abad *et al.*, 2010; Amanianda *et al.*, 2009; Dagenais & Keller, 2009; Latgé & Beauvais, 2014).

Neben Melanin und Rodlets exprimiert *A. fumigatus* Glutathion sowie verschiedene Katalasen und Superoxid-Dismutasen (SOD) zur Detoxifikation von ROS produziert von Makrophagen und Neutrophilen. Allerdings wurde gezeigt, dass die Doppelmutante der Gene *cat1* und *cat2* (beide codierend für Katalasen), bei der keine Katalase-Aktivität nachweisbar war, nur eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber  $H_2O_2$  aufwies und vergleichbar sensitiv gegen Neutrophile wie der Wildtyp war, was die Wichtigkeit von ROS und ihrer Detoxifikation

in Frage stellt (Askew, 2008; Paris *et al.*, 2003; Sales-Campos *et al.*, 2013; Tekaiia & Latgé, 2005).

Um weiterhin im Wirt überleben und wachsen zu können, muss *A. fumigatus* Nährstoffe und Spurenelemente wie Eisen und Zink aufnehmen. Eisen wird von *A. fumigatus* entweder als reduziertes Eisen oder über Siderophore aufgenommen. Die Inaktivierung der Eisen-Permease FtrA, die für die Aufnahme von Eisen benötigt wird, zeigte keine Änderung der Virulenz des Pilzes in einem neutropenen murinen Infektionsmodell, bei dem die Mäuse mit Cyclophosphamid immunsupprimiert wurden. Der Deletionsstamm des Genes *sidA*, welches für eine Monooxygenase nötig für die Siderophor-Biosynthese codiert, wies attenuierte Virulenz auf. Demnach scheint eher die Siderophor-Biosynthese denn die Assimilation von reduziertem Eisen nötig für die Virulenz von *A. fumigatus* zu sein (Hissen *et al.*, 2005; Schrettl *et al.*, 2004). Für die Aufnahme von Zink besitzt *A. fumigatus* verschiedene Zink-Transporter (ZrfA, B, C). ZafA als Transkriptionsregulator induziert die Expression dieser Transporter und ist essentiell für die Virulenz von *A. fumigatus*. Zudem konnte für ZrfC ebenfalls eine essentielle Rolle für die Virulenz festgestellt werden. Als hauptsächlicher Zink-Transporter führte seine Deletion zu einer attenuierten Virulenz (Amich *et al.*, 2014; Amich & Calera, 2014).

Neben Spurenelementen sind auch Stickstoff und Kohlenstoff essentiell für das Wachstum von *A. fumigatus* sowohl im Kompost als auch im Wirt. Durch die Fähigkeit von *A. fumigatus* Kohlenstoff und Stickstoff wahrzunehmen und zu verwerten, kann er sich in der Umwelt gegen andere Mikroorganismen durchsetzen und auch den immunkompromierten Wirt kolonisieren (Rhodes, 2006). Für die Aufnahme von Stickstoff spielen vor allem die Gene *areA*, *rhbA*, *cpcC* und *cpcA* eine wichtige Rolle (Rhodes, 2006).

*A. fumigatus* kann eine große Auswahl an Stickstoffquellen nutzen. Das im Verlauf der Nitratassimilation aufgenommene Nitrat wird hierbei zu Ammonium und weiter zu Glutamine und Glutamate umgesetzt. Die für die Aufnahme und Verarbeitung benötigten Proteine werden durch den Transkriptionsfaktor AreA reguliert. Eine  $\Delta$ *areA*-Deletionsmutante zeigte keine veränderte Virulenz in einem neutropenen Mausmodell einer IA, wies aber ein verzögertes Wachstum im Lungengewebe auf, woraus geschlossen werden kann, dass *areA* zwar zum Wachstum von *A. fumigatus* in Lungengewebe beiträgt, aber nicht essentiell dafür ist (Abad *et al.*, 2010; Dagenais & Keller, 2009; Hensel *et al.*, 1998). Die Expression des Gens *rhbA*, welches für ein Ras-verwandtes Protein codiert, wird bei Stickstoffmangel induziert. Die Deletion von *rhbA* führte zu einer Mutante mit verringertem Wachstum auf schlechten

Stickstoffquellen sowie einer verringerten Virulenz in einem murinen Infektionsmodell (Abad *et al.*, 2010; Panepinto *et al.*, 2003; Rhodes, 2006).

Neben Nitrat können auch Aminosäuren als Stickstoffquelle dienen, wobei nicht alle Aminosäuren im Wirt bei einer Infektion frei verfügbar sind. Bei Aminosäuremangel wird das Gen *cpcA* verstärkt exprimiert. CpcA ist ein Teil des sog. „Cross Pathway Control-Systems“ (CPC). Bei Aminosäuremangel kommt es zu einer Akkumulation von ungeladener tRNA, welche von der eIF2 $\alpha$ -Kinase CpcC gebunden wird, wodurch seine intrinsische Proteinkinase-Aktivität eine Untereinheit von eIF2 $\alpha$  phosphoryliert, was zu einer erhöhten Expression des Transkriptionsaktivators CpcA führt. Während die Deletion von *cpcC* die Virulenz von *A. fumigatus* in einem leukopenen Mausmodell nicht beeinflusste, zeigte der  $\Delta$ *cpcA*-Deletionsstamm eine attenuierte Virulenz. Demnach scheint die Aminosäure-Homeostase während einer pulmonalen Aspergillose nicht gestört zu sein und schon eine basale Expression von *cpcA* für eine volle Virulenz auszureichen (Abad *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2011; Krappmann & Braus, 2005; Sasse *et al.*, 2008).

Bei der Wahrnehmung von Kohlenstoffquellen (C-Quellen) spielt der cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA-)Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle. *A. fumigatus* verfügt über zwei Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA codiert von *pkaC1* (Klasse I) und *pkaC2* (Klasse II, ist nur in filamentösen Pilzen zu finden). Die Deletion von *pkaC1* resultierte in einer attenuierten Virulenz von *A. fumigatus*, die zusätzliche Deletion von *pkaC2* eliminierte die restliche Virulenz. Die Überexpression von *pkaC2* wiederum stellte die volle Virulenz der  $\Delta$ *pkaC1*-Mutante wieder her. Darüber hinaus arbeiten beide Isoformen bei der Regulation von Keimung, Zellwand-Homeostase und Wachstum auf fermentierbaren C-Quellen zusammen. Der PKA-Signalweg spielt demnach auch bei der Pathogenität von *A. fumigatus* eine wichtige Rolle (Fuller *et al.*, 2011; Liebmann *et al.*, 2004b; Rhodes, 2006).

Neben Deletionsmutanten von Genen aus Signalwegen wurden auch auxotrophe Mutanten hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht, da auch die Fähigkeit vom *A. fumigatus* als prototropher Organismus Nukleotide, Aminosäuren und Vitamine aus einfachen Ausgangsstoffen herzustellen für seine Pathogenität von Vorteil sein kann. Auxotrophe Mutanten für Uracil (*pyrG*), Folat (*pabaA*) und Lysin (*lysF*) zeigten verringerte Virulenz bis hin zum vollständigen Verlust der Virulenz in murinen Infektionsmodellen. Die Gabe von Uridin im Falle des *pyrG*-Mutationsstammes und *para*-Aminobenzoessäure im Falle des *pabaA*-Deletionsstammes über das Trinkwasser konnte die Virulenz dieser Mutanten wieder herstellen (Brown *et al.*, 2000; D'Enfert *et al.*, 1996; Liebmann *et al.*, 2004a; Rhodes, 2006; Sandhu *et al.*, 1976). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Lysin-auxotrophe Deletionsmutante der Homocitrat-Synthase

HcsA eine attenuierte Virulenz in einem Mausmodell von bronchopulmonaler Aspergillose aufwies. Auch hier konnte die Virulenz durch die Gabe von Lysin im Trinkwasser teilweise wieder hergestellt werden. Bei intravenöser Injektion blieb der Stamm voll virulent. Demnach scheint der Lysin-Biosyntheseweg zumindest bei disseminierter Invasiver Aspergillose kein geeignetes Ziel für Antimykotika zu sein (Abad *et al.*, 2010; Schöbel *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu scheint der Methylcitrat-Zyklus eben ein solches Ziel darzustellen. Das während des invasiven Wachstums von *A. fumigatus* entstehende toxische Propionyl-CoA wird über den Methylcitrat-Zyklus metabolisiert und so entgiftet. Die Deletion des Gens *mcsA* codierend für die Methylcitrat-Synthase, dem ersten Enzym im Methylcitrat-Zyklus, führte zu einer Akkumulation von Propionyl-CoA und zu einer attenuierten Virulenz bei einem Infektionsmodell in *Galleria mellonella* und auch im immunsupprimierten Mausmodell (Abad *et al.*, 2010; Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; Maerker *et al.*, 2005).

### 1.5.1. Sezernierte Proteasen von *A. fumigatus*

Die Aufnahme von Kohlenstoff und Stickstoff ist eine Voraussetzung für das Wachstum von *A. fumigatus*. Aminosäuren können hier sowohl als C- als auch als N-Quelle dienen. Jedoch ist der Großteil der Aminosäuren im Wirt in seinen Proteinen fixiert, was die Produktion von proteolytischen Enzymen durch den Pilz nötig macht (Fleck *et al.*, 2011) Diese Enzyme, im folgenden Proteasen genannt, mit zum Teil collagenolytischer und elastinolytischer Aktivität, werden vom Pilz sezerniert und erlauben die Assimilation von proteinösen Substraten und können so auch während der Infektion zur Nährstoffgewinnung dienen (Abad *et al.*, 2010; Bergmann *et al.*, 2009; Hohl & Feldmesser, 2007). Das Genom von *A. fumigatus* codiert für über 100 Proteasen, von denen 47 eine Signalsequenz zur Sekretion besitzen (Nierman *et al.*, 2005; Sharon *et al.*, 2009). Die Expression von extrazellulären Proteasen erfolgt über den Transkriptionsregulator PrtT, der auch schon bei *A. niger* als Regulator identifiziert worden ist. Seine Regulation scheint posttranskriptionell, möglicherweise über den eIF2 $\alpha$ -Kinase-Signalweg, zu erfolgen (Bergmann *et al.*, 2009). *A. fumigatus* sezerniert hauptsächlich drei Endoproteasen bei Wachstum auf Proteinen als alleinige N-Quelle: die Aspartatproteasen Pep1 und CtsD, die Metalloprotease Mep sowie die alkalische Serinprotease Alp1. Ihre Expression wird durch freie Aminosäuren oder kleine Peptide vollständig inhibiert. Zudem wurden bislang zwei Exoproteasen näher charakterisiert: DppIV und DppV, Dipeptidyl-Peptidasen mit Serinprotease-Aktivität (Beauvais *et al.*, 1997a; Beauvais *et al.*, 1997b; Bouchara *et al.*, 1993; Monod *et al.*, 2009; Vickers *et al.*, 2007). Die Rolle von Proteasen bei der Virulenz ist

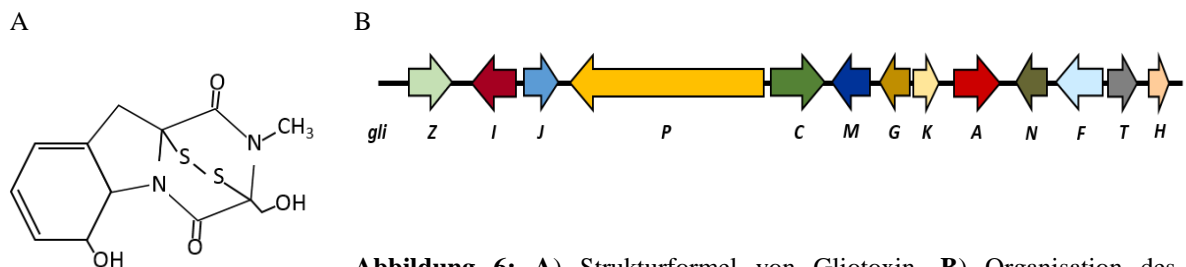
umstritten. Einige Punkte sprechen für eine solche Rolle (Bergmann *et al.*, 2009): I) Die Sekretion von Endo- und Exopeptidasen *in vivo* konnte nachgewiesen werden (Lee & Kolattukudy, 1995; Markaryan *et al.*, 1994; Reichard *et al.*, 1990; Reichard *et al.*, 1994; Vickers *et al.*, 2007). II) Die elastinolytische Aktivität der sezerniert Proteasen von *A. fumigatus* konnte mit der Fähigkeit eine IA auszulösen in Verbindung gebracht werden (Kothary *et al.*, 1984). III) Alp von *A. fumigatus* konnte das Aktinskelett von kultivierten Pneumozyten aus der Lunge strukturell ändern (Kogan *et al.*, 2004). IV) Des Weiteren konnte eine Serinprotease-abhängige Ausschüttungen von proinflammatorischen Zytokinen von humanen pulmonalen Epithelzellen sowie ihre Zelltrennung nachgewiesen werden (Tomee *et al.*, 1997). V) Zudem konnte gezeigt werden, dass Alp1 in der Lage ist, Proteine des Komplement-Systems abzubauen und so zu der Umgehung der Opsonisierung durch das Komplement-System beizutragen (Behnsen *et al.*, 2010; Rambach *et al.*, 2010). Allerdings konnte in einer Studie mit von IA-Pateinten isoliertem Gewebe keine Elastinolyse der Gefäßwände beobachtet werden (Denning *et al.*, 1992). Auch die Analyse der Enzymaktivität von insgesamt 73 Stämmen von *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* wies keine statistische Korrelation zwischen Elastase- bzw. Proteinaseaktivität und der Entwicklung einer IA auf (Alp & Arikan, 2008). Darüber hinaus führte die Deletion von *prtT* zwar zu einer verminderten Expression von proteolytischen Enzymen, allerdings wies der Deletionsstamm keine attenuierte Virulenz im neutropenen Mausmodell auf (Bergmann *et al.*, 2009; Sharon *et al.*, 2009). Weiter zeigten die verschiedenen Deletionsmutanten von *alp*, *mep*, *pep* sowie einer Doppelmutante von *alp* und *mep* keine Veränderung in der Pathogenität verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp (Jaton-Ogay *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1993; Reichard *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1993).

Auch wenn einzelne Proteasen nicht essentiell für die Invasion von *A. fumigatus* in das Gewebe sind, kann eine generelle Beteiligung von Proteasen bei der Entwicklung einer IA nicht ausgeschlossen werden. Die Aktivität von mehreren Proteasen ist redundant, der Defekt einer einzelnen Protease kann durch eine andere kompensiert werden. Zudem könnten bisher nicht charakterisierte Proteasen während einer Infektion exprimiert werden (Monod *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Mykotoxine von *A. fumigatus*

Neben Proteasen sezerniert *A. fumigatus* auch Mykotoxine. Die meisten Toxine von Pilzen zählen zu den Sekundärmetaboliten - Verbindungen mit geringem Molekulargewicht entbehrlich für den Pilz. Sie werden während der Keimung oder während des Wachstums in den Hyphen gebildet und entweder aktiv sezerniert oder nach dem Tod der Hyphe freigesetzt. Sie schützen den Pilz vor Feinden und Konkurrenten in seiner ökologischen Nische, können aber auch durch direkte Interaktion mit dem Wirt zur Pathogenität von *A. fumigatus* beitragen (Abad *et al.*, 2010; Gardiner *et al.*, 2005).

Mykotoxine werden in mehrere Klassen gruppiert, u. a. in Polyketide, zyklische Peptide, Alkaloide, Sesquiterpene und Epipolythiodioxopiperazine, zu der auch Gliotoxin zählt (Gardiner *et al.*, 2005). Gliotoxin wird neben *A. fumigatus* auch von *A. niger*, *A. flavus* und *A. terreus* gebildet und ist charakterisiert durch eine Disulfid-Brücke über dem Piperazin-Ring (Gardiner *et al.*, 2005; Kwon-Chung & Sugui, 2009). Es wird über mehrere Schritte aus L-Serin und L-Phenylalanin synthetisiert (Scharf, 2013). Die 13 Gene, die in die Biosynthese von Gliotoxin involviert sind, sind in einem Cluster organisiert, dessen Expression hauptsächlich durch den Zn<sup>2</sup> Cys<sup>6</sup>-Transkriptionsfaktor GliZ reguliert wird. Zudem codiert *gliP* für eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase, die den ersten Schritt der Biosynthese katalysiert (Bok *et al.*, 2006; Scharf *et al.*, 2012; Scharf, 2013).



**Abbildung 6:** A) Strukturformel von Gliotoxin. B) Organisation des *gli* Biosynthese-Genclusters (modifiziert nach Scharf *et al.*, 2011 und Gardiner *et al.*, 2005).

McDonagh *et al.* konnten eine erhöhte Transkription des Gliotoxin Genclusters während einer beginnenden IA nachweisen. Zudem wurde das Toxin in Serum und Gewebe von mit *A. fumigatus* infizierten Mäusen und Patienten gefunden (Bok *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2005; McDonagh *et al.*, 2008; Stanzani *et al.*, 2005). Gliotoxin weist unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem auf: es inhibiert die Funktion von Makrophagen und Polymorphonuklearen Leukozyten (PMNL) in Mausmodellen, inklusive deren Phagozytose und bakterizide Aktivität, und bewirkt eine Reorganisation des Aktinzytoskelets von Neutrophilen. Zudem inhibiert es den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, ein

zentraler Regulator der Immunantwort, und damit die NF- $\kappa$ B-induzierte Transkription von Zytokinen, hämatopoietischen Wachstumsfaktoren (HGF) und Zelladhäsionsmolekülen. Darüber hinaus wirkt Gliotoxin apoptotisch auf Monozyten und Makrophagen, sowie auf Thymoma-Zellen und embryonische Fibroblasten aus Mäusen (Coméra *et al.*, 2007; Kwon-Chung & Sugui, 2009; Stanzani *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wurde eine Resistenz von Neutrophilen aus gesunden Spender gegenüber Gliotoxin-induzierter Apoptose beobachtet, allerdings mit verringerter ROS-Produktion und Phagozytose. Gliotoxin scheint demnach wichtige Funktionen von Neutrophilen in gesunden Individuen zu inhibieren, wohingegen die PMN-vermittelte Entzündung in immunsupprimierten Patienten ansteigt, was zu der beobachteten Gewebeerstörung in Patienten mit IA beitragen könnte (Kwon-Chung & Sugui, 2009; Orciuolo *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte eine Internalisierung von *A. fumigatus* in Lungenepithelzellen in Abhängigkeit von Gliotoxin über die Phospholipase D1-Aktivität sowie einer Änderung des Aktinzytoskeletts beobachtet werden (Jia *et al.*, 2014). Neben dem immunsuppressiven Einfluss hat Gliotoxin auch einen antiangiogenen Effekt (Ben-Ami *et al.*, 2009) und detoxifiziert freigesetztes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Aktivierung des Thioredoxin-Redoxsystems (Choi *et al.*, 2007). Darüber hinaus reduziert es die ziliare Beweglichkeit von Epithelzellen und führt zu deren Schädigung (Amitani *et al.*, 1995). Die Toxizität von Gliotoxin wird über zwei Wege vermittelt: I) Konjugation mit Proteinen mit anfälligen Thiolgruppen mit anschließender Inaktivierung. II) Generierung von ROS über den Gliotoxin-eigenen Redox-Zyklus (Gardiner *et al.*, 2005). Die Ziele von Gliotoxin sind keine spezifischen Proteine. Vielmehr bilden Cysteingruppen Disulfid-Brücken mit Gliotoxin, was durch reduzierende Agenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder Glutathion revidiert werden kann (Gardiner *et al.*, 2005; Kroll *et al.*, 1999). Trotz der Toxizität von Gliotoxin konnten durch die Verwendung von Deletionsmutanten keine kongruenten Ergebnisse im Mausmodell erhalten werden: im neutropenen Mausmodell, in dem die Mäuse durch Cyclophosphamid und Kortisonazetat immunsupprimiert werden, zeigten sowohl  $\Delta$ gliZ- als auch  $\Delta$ gliP-Deletionsstämme keine Änderung in der Virulenz (Bok *et al.*, 2006; Cramer *et al.*, 2006; Kupfahl *et al.*, 2006). Im nicht-neutropenen Modellen hingegen, in dem die Mäuse durch Kortisonazetat allein immunsupprimiert werden, wiesen *gliP* $\Delta$ -Deletionsstämme eine verringerte Virulenz auf (Scharf *et al.*, 2012; Sugui *et al.*, 2007b). Demnach scheint Gliotoxin durch seine Wirkung auf Neutrophile oder Phagozyten zu der Pathogenität von *A. fumigatus* beizutragen. Offenbar spielt die Art der Immunsuppression eine entscheidende Rolle bei der Beteiligung von Gliotoxin zur Etablierung einer Infektion mit *A. fumigatus* (Scharf *et al.*, 2012).

Neben Gliotoxin sezerniert *A. fumigatus* weitere Toxine wie Fumagillin und Verruculogen. Fumagillin gehört zur Familie der Sesquiterpene und ist toxisch für Pflanzen und Tiere (Frisvad *et al.*, 2009). Es wurde 1949 aus *A. fumigatus* isoliert und besitzt immunsuppressive sowie auch zytotoxische und genotoxische Effekte auf humane Zelllinien (Bünger *et al.*, 2004; Kamei & Watanabe, 2005; Lefkove *et al.*, 2007) und unterdrückt die Immunantwort in *Galleria mellonella* durch Inhibierung der Hämozyten (Fallon *et al.*, 2011). Es inhibiert *in vitro* die Zellproliferation von Endothelzellen und die ziliäre Bewegung im respiratorischen Epithelium, inhibiert die Angiogenese und wirkt als Anti-Tumor-Antibiotikum (Abad *et al.*, 2010; Kamei & Watanabe, 2005; Rementeria *et al.*, 2005). Auf Grund seiner anti-infektiven Eigenschaften wird es bei Microsporidien-Infektionen und Amöbiose eingesetzt (Dhingra *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2002). Sein Wirkmechanismus beruht auf der selektiven Inhibierung der Metallopeptidase Methionin-Amino-peptidase 2 (MetAP2), welche verantwortlich für die Hydrolyse des N-terminalen Methionins bei der Proteinsynthese ist (Lefkove *et al.*, 2007; Sin *et al.*, 1997). Trotz allem ist noch nicht klar, welche Rolle Fumagillin bei der Pathogenität von *A. fumigatus* spielt (Rementeria *et al.*, 2005). Verruculogen gehört zur Gruppe der Indol-Diketopiperazin-Alkaloide und wird neben *A. fumigatus* auch von verschiedenen anderen *Aspergilli*- und *Penicillium*-Spezies gebildet (Patterson *et al.*, 1981; van Loevezijn *et al.*, 1998). Es wirkt durch die vermehrte Freisetzung von Neurotransmittern in zerebralen Synaptosomen tremorgen (Bünger *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist es genotoxisch, wirkt als M-Phase-Inhibitor im Zellzyklus von Säugetieren, verändert die transepitheliale Resistenz, Hyperpolarisation und zytoplasmatische Vakuolisierung von humanen nasalen Epithelzellen und verändert *in vitro* ihre elektrophysiologischen Eigenschaften (Botterel *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 1996; Khoufache *et al.*, 2007; Sabater-Vilar *et al.*, 2003). Verruculogen wird während des Wachstums in den Hyphen gebildet und ist auch in den Sporen zu finden und könnte während einer Infektion auf das Epithel der Atemwege einwirken. Seine Bildung während einer Infektion muss allerdings noch nachgewiesen werden (Dagenais & Keller, 2009; Kosalec *et al.*, 2005).

*A. fumigatus* sezerniert des weiteren Ergot-Alkaloide, wie z. B. Fumigaclavin A. Sie beeinflussen das Nerven- sowie auch das Reproduktionssystem durch die Interaktion mit Monoaminrezeptoren. Ribotoxine von *A. fumigatus*, wie Restrictocin, wirken spezifisch gegen die Sarcin/Ricin-Domäne in 28S rRNA, was die Protein-Biosynthese inhibiert. Eine diffusionsfähige, hitzelabile, 14 kDa große Substanz, die von der Oberfläche von *A. fumigatus* extrahiert werden konnte, kann Makrophagen beeinflussen und dadurch die Phagozytose sowie die Freisetzung von ROS und Zytokinen reversibel inhibieren (Abad *et al.*, 2010).

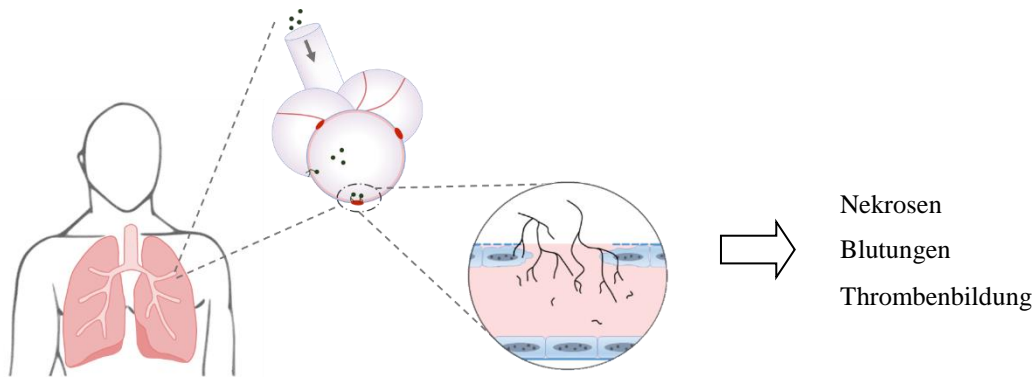


Die Expression von Sekundärmetaboliten wird in *A. fumigatus* durch die beiden Velvet-Komplex-Komponenten LaeA und VeA reguliert. LaeA ist ein Transkriptionsregulator. Seine Deletion blockierte die Produktion von nahezu allen Sekundärmetaboliten und Pigmenten. Zudem zeigte der  $\Delta laeA$ -Deletionsstamm eine verringerte Virulenz im neutropenen Mausmodell (Abad *et al.*, 2010; Bok & Keller, 2004; Bok *et al.*, 2005; Dhingra *et al.*, 2013; Sugui *et al.*, 2007a). Für VeA konnte ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von Sekundärmetaboliten und Proteasen nachgewiesen werden. Die Deletion von *veA* führte zu einer verringerten Gliotoxin-Produktion mit verminderter Expression von *gliZ* und *gliP*, sowie zu einer Verringerung der Proteaseaktivität von *A. fumigatus*. Zudem reguliert VeA das Biosynthese-Gencluster von Fumagillin. Allerdings konnte für VeA noch kein Einfluss bei der Pathogenität von *A. fumigatus* im Mausmodell nachgewiesen werden (Dhingra *et al.*, 2012; Dhingra *et al.*, 2013).

### **1.6. *Aspergillus fumigatus* und die Hämostase**

Eine Beeinflussung der Hämostase durch *Aspergillus* ist schon seit den 1960er Jahren bekannt. 1966 beschrieben Jürgens *et al.* Enzyme von *A. oryzae*, die bei einer intravenösen Injektion in Patienten zu einer reduzierten spontanen Aggregation von Thrombozyten führte. Die antikoagulatorische Wirkung wurde von deNicola, Bygdemann und Klöckling bestätigt (Bygdeman, 1967; de Nicola *et al.*, 1967; Jürgens, 1966; Klöckling & Markwardt, 1975). Weiter wurde für Antigene von *A. fumigatus* ein aggregativer Effekt auf Kaninchen-Thrombozyten nachgewiesen (Sheth *et al.*, 1980). Zudem beschrieben McClellan *et al.* in einer Studie von 1985 bei acht Patienten mit disseminierter Aspergillose nach einer Nierentransplantation einen ungewöhnlichen Hang zu Blutungen, eine sog. hämorrhagische Diathesis. In sieben von acht Fällen wurden die aus den Patienten isolierten Stämme als *A. fumigatus* identifiziert (McClellan *et al.*, 1985).

Inzwischen gelten Angioinvasion und Invasion des Gewebes durch Hyphen sowie Gewebeschädigungen (Nekrosen), Aktivierung der Koagulationskaskade, intravaskuläre Thrombosen und blutige Infarzierungen als Kennzeichen einer invasiven pulmonalen Aspergillose, allerdings sind die pathophysiologischen Mechanismen noch nicht ausreichend untersucht (Abbildung 7) (Balloy *et al.*, 2005; Ben-Ami *et al.*, 2010; Berenguer *et al.*, 1995).



**Abbildung 7:** Vereinfachte Darstellung der Schritte einer Invasiven Pulmonalen Aspergillose mit den auftretenden Komplikationen. Die Sporen von *A. fumigatus* werden bis in die Alveolen der Lunge eingeatmet und können dort im immunsupprimierten Patienten auskeimen und in das umliegende Gewebe sowie in die Blutgefäße eindringen und dort zu Nekrosen, Blutungen und Thrombenbildung führen.

Eine Hypothese für diese Komplikationen wäre das mechanische Eindringen des Pilzes in das Lungenparenchym und in Blutgefäße mit der Folge von Blutungen am Invasionsort. Auch eine Aktivierung des Endothels durch in Gefäße eindringende Hyphen wäre möglich, wie schon von Kamai *et al.* und Chiang *et al.* gezeigt (Chiang *et al.*, 2008; Kamai *et al.*, 2006; Kamai *et al.*, 2009). Aktivierte Endothelzellen sezernieren Tissue Faktor, der zur Aktivierung der Koagulationskaskade beiträgt und so über Thrombenbildung zu venöser Stase (verminderter Blutrückfluss) und Infarkten führen kann (Greten *et al.*, 2010; Kamai *et al.*, 2009). Berenguer *et al.* konnten zudem in einem Kaninchen-Modell Angioinvasionen und Thrombenbildung durch Hyphen nachweisen, die zu pulmonalen Infarkten und intraalveolaren Blutungen führten (Berenguer *et al.*, 1995).

Neben einer Endothel-Aktivierung ist auch eine direkte Aktivierung von Thrombozyten durch *Aspergillus* denkbar. Eine Aktivierung von Plättchen durch Konidien und Hyphen von *A. fumigatus* konnte bereits beobachtet werden. Zudem wurde eine Schädigung von Hyphen und Konidien durch von Plättchen sezerniertes Serotonin beschrieben (Christin *et al.*, 1998; Perkhofer *et al.*, 2008; Rødland *et al.*, 2010). Der genaue Mechanismus der Plättchenaktivierung durch *Aspergillus* ist allerdings noch nicht vollständig untersucht. Eine mögliche Ursache könnte die Aktivierung durch PAR1 über von *A. fumigatus* sezernierte Proteasen sein. PAR1 wird wie oben beschrieben (Kapitel 1.1) über die Aktivität der Serin-Protease Thrombin aktiviert und leitet so die Signalkaskade zur Plättchenaktivierung ein. Dass *A. fumigatus* Thrombozyten im gleichen Maße aktivieren kann wie Thrombin wurde bereits gezeigt (Rødland *et al.*, 2010). Inzwischen wurden Hinweise für die Beteiligung von einer oder mehreren Serin-Proteasen von *A. fumigatus* bei der Aktivierung von Thrombozyten gefunden

(Speth *et al.*, 2013b). Darüber hinaus ist die Rolle von sezernierten Proteasen von *A. fumigatus* auf die Hämostase weitestgehend ungeklärt. Gillies und Tait postulierten eine Inhibierung der Fibringerinnung bzw. den beschleunigten Abbau eines Fibringerinnsels durch die fibrinolytische und plasminogenolytischen Aktivität von sezernierten Proteasen (Gillies & Tait, 2002). Tatsächlich konnte für verschiedene *Aspergillus*-Spezies eine koagulative und fibrinolytische Aktivität nachgewiesen werden (Cherdyntseva & Egorov, 1988; Klechkovskaia & Egorov, 1983; McClellan *et al.*, 1985). Allerdings wurde bisher nur ein proteolytisches Enzym mit fibrinogenolytischer Aktivität biochemisch charakterisiert (Bouchara *et al.*, 1993). Zudem konnte die Bindung von Fibrinogen-Fragmenten an einen bestimmten Rezeptor auf der Oberfläche von Konidien von *A. fumigatus* nachgewiesen werden (Annaix *et al.*, 1992; Bouchara *et al.*, 1997).

Neben den oben beschriebenen Enzymen könnte auch das von *A. fumigatus* sezernierte Sekundärmetabolit Gliotoxin (siehe Kapitel 1.5.2) einen direkten Einfluss auf die Aktivität von Thrombozyten besitzen. Bertling *et al.* konnten eine Aggregation-inhibierende Wirkung von Gliotoxin auf Thrombozyten sowie eine Inhibierung der Fibrinogenbindung an aktivierten Plättchen nachweisen. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von reduziertem Glutathion vermindert werden. Die Wirkung von Gliotoxin über eine Blockierung der Interaktion von Fibrinogen mit seinem Integrin-Rezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bzw. über eine direkte Bindung von Gliotoxin an Cystein-Reste von Fibrinogen wurden diskutiert (Bertling *et al.*, 2010). Neben der inhibitorischen Wirkung beschrieben Speth *et al.* eine Aktivierung von Thrombozyten durch Gliotoxin (Speth *et al.*, 2013b).

Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass der genaue pathophysiologische Wirkmechanismus von *A. fumigatus* sowie seiner sezernierten Enzyme und Sekundärmetabolite auf humane Thrombozyten und die Hämostase noch weitestgehend ungeklärt ist und demnach weiterer Analysen bedarf.

### 1.7. Ziel dieser Arbeit

Seit den 1960er Jahren häufen sich die Hinweise eines Einflusses von *Aspergillus fumigatus* auf die lokale Hämostase im humanen Wirt im Zuge einer Aspergillose. Hierbei wurden Komplikationen wie Zerstörung von Gewebe sowie Blutungen und Thrombenbildung am Infektionsort beobachtet. Als mögliche Ursachen wurden eine direkte Interaktion des Pilzes mit den Thrombozyten, eine indirekte Wirkung über von *A. fumigatus* sezernierte Mykotoxine und proteolytischen Enzyme auf diese oder auch ein Einfluss über die fibrinolytische und plasminogenolytische Aktivität dieser Enzyme auf die lokale Hämostase in Betracht gezogen. Sie wurden allerdings bisher nicht ausreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war aus diesem Grund die Beleuchtung der pathophysiologischen Änderungen der lokalen Hämostase durch den direkten oder indirekten Einfluss von *A. fumigatus* im humanen Wirt. Hierfür wurden verschiedene Morphologien des klinischen Isolats ATCC46645 als Wildtyp sowie seine Kulturüberstände aus unterschiedlichen Nährmedien zusammen mit Überständen der Deletionsstammes AfS61 (*prrTΔ*) und des rekonstituierten Stammes AfS62 (*RprrT*) verwendet. Das Gen *prrT* codiert für einen Regulator der sezernierten proteolytischen Aktivität von *A. fumigatus*. Durch die Verwendung der Morphologien sollte der Einfluss von direktem Kontakt von *A. fumigatus* untersucht werden. Der Pilz könnte über eine direkte Interaktion mit Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche zu einer Aktivierung der Plättchen und so zu Thrombenbildungen führen. Durch den Einsatz der verschiedenen Überstände sollte die Wirkung von unter anderem im Laufe des Wachstums freigesetzten Zellwandbestandteilen und PrtT-regulierten proteolytischen Enzymen auf die Aktivität humaner Thrombozyten und die lokale Hämostase analysiert werden. Da Thrombozyten auf ihrer Oberfläche sogenannte Protease activated receptors (PAR1 und PAR4) besitzen, die über die proteolytische Spaltung durch Lysozym aktiviert werden, könnte eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch die Aktivität der sezernierten Proteasen von *A. fumigatus* zu der während einer Aspergillose beobachteten Thrombenbildung beitragen. Zum anderen könnten diese proteolytischen Enzyme aber auch das für die plasmatische Gerinnung benötigte Prothrombin und Fibrinogen spalten und so eine antikoagulatorische Wirkung auf die Blutgerinnung haben. Um zudem die Wirkung von Mykotoxinen von *Aspergillus* zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit verschiedene Mykotoxine in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Diese könnten über eine Inhibierung von Oberflächenrezeptoren der Plättchen, beispielsweise über die Bildung von Disulfid-Brückenbindungen, zu einer verringerten Aktivität der Plättchen und so zu Blutungen führen.

Der Einfluss der Morphologien, Überstände und Toxine auf die plasmatische Gerinnung sollte über die Analyse verschiedener Koagulationsparameter, der Einfluss auf die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten über Aggregometrie, Durchflusszytometrie und TXB<sub>2</sub>-ELISA untersucht werden. Im Laufe dieser Arbeit kristallisierte sich eine mögliche direkte Interaktion von Gliotoxin mit dem Fibrinogen-Rezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  sowie mit den ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> heraus. Eine Beeinträchtigung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch Gliotoxin sollte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie, eine Beeinträchtigung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> sollte über eine Westernblot-Analyse untersucht werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Änderungen der Hämostase durch *A. fumigatus* und damit zu einer besseren Erkennung und Behandlung von Aspergillosen beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Materialien

Die Chemikalien zu Herstellung von Medien, Puffer und Lösungen wurden von der Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Fluka (Sigma-Aldrich), der Merck KGaA (Darmstadt) und Invitrogen (Thermo Fischer Scientific GmbH, Karlsruhe) bezogen. Zur Trennung des im Medium gewachsenen Myzels von *A. fumigatus* vom Überstand wurde Miracloth Filtergewebe von Merck verwendet. Zur Inhibition von Protease-Aktivität wurden der Protease-Inhibitor Mix der Roche GmbH (Mannheim) und Pepstatin A der AppliChem GmbH (Darmstadt) verwendet.

Vollblut wurde mit Hilfe von Butterfly-Nadeln in Citratmonovetten von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) aufgenommen. Das aus Vollblut gewonnene Plättchen-reiche Plasma wurde mittels Collagen-Reagenz Horm (kurz Collagen) von Nycomed (Takeda Pharma Vertrieb GmbH & Co. KG, Berlin) sowie ADP der Sigma-Aldrich Chemie GmbH und TRAP-6 der Bachem AG (Weil am Rhein) aktiviert. Prostaglandin Enhancer 1 (PGE-1), reduziertes L-Glutathion und Dithiothreitol (DTT) stammten ebenfalls von Sigma-Aldrich. Gliotoxin wurde von Merck KGaA bezogen und in DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst. Citrinin, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Fumagillin und Verruculogen wurden über VWR bezogen und in Wasser bzw. Ethanol aufgenommen.

Die Antikörper für die Durchflusszytometrie (anti-human CD41-FITC, CD41-APC, CD62P-APC, CD63-APC) sowie die entsprechenden IgG- und IgM-Isotypen wurden über BioLegend (Fell), der FITC-markierte Antikörper anti-human PAC-1 über Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die Antikörper für die Western-Hybridisierung stammten von Cell Signaling Technology (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und wurden mittels Fuji medical X-Ray film (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) und ECL Western Blot detection-Kit (Thermo Fischer Scientific) detektiert. Der verwendete Größenstandard „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ stammte von Fermentas (Thermo Fischer Scientific). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde das RC DC™ Protein Assay von BioRad und der ELISA Reader (TECAN Trading AG) verwendet.

Die Thromboxan-Konzentration in Plasma wurde mit Hilfe des Thromboxan B2 ELISA Kit von Abnova Germany (Paderborn) bestimmt.

## 2.1.2. Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *A. fumigatus* sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Verwendete Stämme von *A. fumigatus*

Stamm	Beschreibung	Referenz
D141	<i>A. fumigatus</i> Wildtyp, klinisches Isolat	(Reichard <i>et al.</i> , 1990)
ATCC46645	<i>A. fumigatus</i> Wildtyp, klinisches Isolat	(Hearn & Mackenzie, 1980)
AfS61	<i>prtT</i> -Deletionsmutante ( <i>prtT::loxP</i> -Phleo <sup>r</sup> - <i>loxP</i> ), ( <i>prtTΔ</i> )	(Bergmann <i>et al.</i> , 2009)
AfS62	rekonstituierter Stamm ( <i>prtT</i> < <i>ptrA</i> >), ( <i>RprtT</i> )	(Bergmann <i>et al.</i> , 2009)
B5233	<i>A. fumigatus</i> Wildtyp, klinisches Isolat	(Tsai <i>et al.</i> , 1998)
<i>gliPΔ</i>	<i>gliPΔ</i> Deletionsmutante ( <i>gliP::hph</i> )	(Sugui <i>et al.</i> , 2007b)
<i>gliP<sub>R</sub></i>	rekonstituierter Stamm ( <i>gliP</i> < <i>ble</i> >)	(Sugui <i>et al.</i> , 2007b)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von *A. fumigatus* und Überstand-Generierung

Die hier verwendeten Stämme von *A. fumigatus* wurden bei 37°C in Minimalmedium mit Glukose (1% w/v), Salzlösung (7 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit Spurenelementen (18 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 34,2 µM EDTA, 76,5 µM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 178 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 25,2 µM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 7,1 µM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 6,8 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,89 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4 H<sub>2</sub>O) und Ammoniumtartrat (5 mM) mit 10<sup>7</sup> Sporen /ml Medium kultiviert. Je nach gewünschter Morphologie erfolgte die Anzucht für geschwollene Konidien für 4 h, für Keimschläuche für 8 h und für vegetatives Myzel für 18 h bei 150-200 rpm im Schüttler (KS15, Edmund Bühler GmbH) mit Thermohaube (TH15, Edmund Bühler GmbH). Zur Gewinnung des Überstandes wurde das Myzel über steriles Miracloth Filtergewebe vom Medium abgetrennt und der Durchfluss (Überstand) nochmals bei 3500 x g für 8 min zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus Instruments), um eventuell ungefiltertes Myzel zu entfernen. Die Herstellung von 10-fach konzentriertem Überstand erfolgte über die Reduzierung des Volumens durch Zentrifugation in einer Vakuum-Zentrifuge. Zum Erhalt von Sporensuspensionen wurde dem Medium 2% Agar (Difco) zugesetzt und auf diesem Sporen ausgebracht. Die Platten wurden anschließend für 5 d bei 37 °C im Brutschrank (HeraCell,

Heraeus Instruments) inkubiert. Die sich auf dem gewachsenen Myzel bildenden Sporen wurden folgend unter der Sterilbank (Microflow biological safety cabinet, Nunc GmbH) mit Hilfe von sterilen Wattestäbchen in NaCl-Tween-Lösung (0,5 % NaCl, 0,002 % Tween-20) aufgenommen, über ein Zellsieb (Cell strainer BD Falcon<sup>TM</sup>, 40 µm) von Myzel befreit und mittels C-Chip Neubauer improved Einweg-Zählkammer (Carl Roth GmbH & Co. KG) unter dem Mikroskop (Axiolab, Zeiss) ausgezählt.

Zur Induktion der Sekretion von proteolytischen Enzymen wurde dem Medium die proteinhaltigen Supplemente BSA (0,4%) und Pepton (0,1%) als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (C- und N-Quelle) zugesetzt und die Kultur für 48 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Der Überstand mit proteolytischer Aktivität (folgend auch Protease-Überstand genannt) wurde wie oben beschrieben gewonnen und anschließend entweder bis zur Verwendung am gleichen Tag auf Eis gelagert oder aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert. Einzelne Aliquots wurden für die baldige Benutzung bei -20 °C gelagert. Zur Prüfung der proteolytischen Aktivität wurden 15 µl des Überstandes 1:10 verdünnt und eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Gel Trocknung durchgeführt. Als Kontrolle dienen 15 µl von 1:10-verdünntem Medium. Die Abwesenheit bzw. die Degradationsprodukte von BSA bei einer Probe dienen als positiver Nachweis der vollen proteolytischen Aktivität.

Zur Anreicherung von Gliotoxin im Medium wurden die Stämme B5233, *gliPA* und *gliPR* für 72 h bei 175 rpm in Minimalmedium inkubiert und der Überstand wie oben beschrieben gewonnen und gelagert.

### **2.2.2. Generierung von Plättchen-reichem Plasma (PRP)**

Zur Generierung von Plättchen-reichem Plasma (PRP) wurde 50 ml Vollblut von gesunden freiwilligen Spendern mittels Butterfly-Nadel in Citratröhrchen entnommen. Das erste Citratröhrchen wurde verworfen, um das Risiko einer Voraktivierung der Plättchen im PRP zu vermeiden. Bei den Spendern wurde darauf geachtet, dass die letzte Einnahme von Ibuprofen mind. 10 Tage, die von Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) und Zwiebelsaft mind. 14 Tage zurücklag. Die Citratröhrchen wurden bei RT mit 300g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand, das Plättchen-reiche Plasma (ca. 3-4 ml), in einem 15 ml-Röhrchen vereint. Die Zählung der Thrombozyten erfolgte in einer 1:2-Verdünnung in PBS am KX21 hematology analyzer (Sysmex) der AG Nieswandt. Zur Verwendung wurde das PRP in Aliquots frisch mit Tyrode's Puffer (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,43 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30



mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,36 % BSA, 0,1 % Glukose) auf 150 000 Plättchen / µl verdünnt. Bei Bedarf wurde der Puffer mit 2mM CaCl<sub>2</sub> ergänzt.

### 2.2.3. Analyse der Koagulationsparameter

Das PRP wurde wie oben hergestellt und unverdünnt verwendet, um die Konzentration der im Plasma vorhandenen Koagulationsparameter nicht zu verfälschen. Anschließend wurde das PRP für 15 min bei RT oder 37°C und 125 rpm zusammen mit dem Effektor rotierend inkubiert, die Thrombozyten durch Zentrifugation mit 16 300 x g (Biofuge fresco 21, Heraeus Instruments) bei RT für 10 min vom Plasma abgetrennt, dieses in neue 2 ml-Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel überführt und zur Analyse in das Zentrallabor des Universitätsklinikum Würzburg gebracht. Hier wurden die Parameter Thromboplastinzeit (TPZ, auch Quick-Wert genannt) mit seinem International Normalized Ratio (INR), die partielle Thromboplastinzeit (PTT) sowie die Konzentrationen von Fibrinogen koagulometrisch gemessen und die Konzentration der Fibrinogen-Abbauprodukte (D-Dimere) mittels ELISA bestimmt. Mit Hilfe des TPZ wurden die Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X und somit das extrinsische System überprüft. Der INR ermöglichte hier den Vergleich von mit unterschiedlichen Thromboplastinreagenzien gemessenen Thromboplastinzeiten und verhält sich umgekehrt proportional zum TPZ (Chee, 2014; Kemkes-Matthes *et al.*, 2001).

$$\text{INR} = \left[ \frac{\text{Thromboplastinzeit}_{(\text{Test})}}{\text{Thromboplastinzeit}_{(\text{Standard})}} \right] \text{ISI}$$

INR: International Normalized Ratio; ISI: Internationaler Standardisierungsindex (WHO-Standardthromboplastin)

Mittels PTT wurden die Faktoren II, V, VIII, IX, X, XI und XII des intrinsischen Systems geprüft (Chee, 2014; Kemkes-Matthes *et al.*, 2001). Eine Abweichung von den jeweiligen Referenzwerten sollte Rückschlüsse auf eine mögliche Störung der Koagulationskaskade durch die zugesetzten Effektoren zulassen. Als Effektoren wurden verschiedene Überstände von *A. fumigatus* sowie Konidien, geschwollene Konidien, Keimschläuche und Hyphen jeweils 1:10 in PRP eingesetzt. Zusätzlich wurde das PRP unter Absprache mit dem Zentrallabor mit den Toxinen Gliotoxin (300 ng/ml), Citrinin (5 µg/ml), Verruculogen (100 µg/ml), Fumagillin (100 µg/ml) und Deoxynivalenol (100 µg/ml) versetzt. Als Kontrolle diente jeweils eine unbehandelte Probe sowie PRP behandelt mit Nährmedium von *A. fumigatus* bzw. dem jeweiligen Lösungsmittel des Toxins (H<sub>2</sub>O 1%, DMSO 1%, Ethanol 0,1 %).

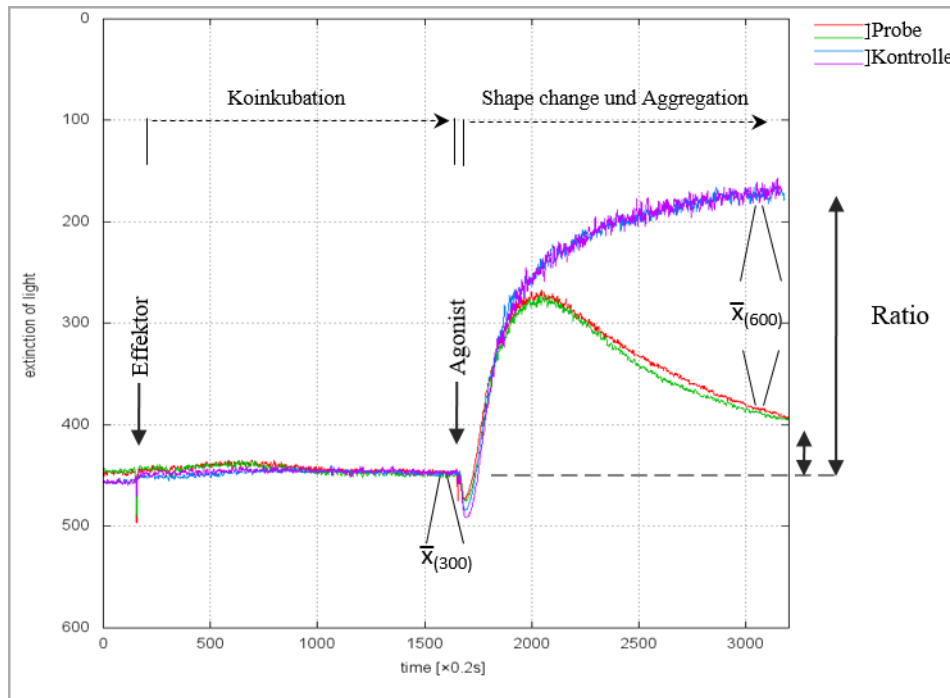
#### 2.2.4. Aggregometrie nach Born

Die Aggregometrie ist ein Mittel zur visuellen Darstellung der Aggregation von Thrombozyten in PRP über die Messung der Lichttransmission. Hierfür wurde PRP für jede Probe frisch in Tyrode's Puffer mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> auf 150 000 Plättchen/μl verdünnt. Zur Messung der Aggregation wurden 160 μl der Probe jeweils in Duplikaten im 4-Kanal Aggregometer APACT-4 (APACT, Hamburg) bei 37 °C in einer Küvette mit Magnetrührer inkubiert. Nach 30 s wurde der Effektor zugegeben, die Probe für 5 min gemessen, bevor anschließend der Aktivator zugegeben und für weitere 5 min gemessen wurde, wobei das Aggregometer alle 0,2 s die Lichttransmission bestimmte.

Als Effektoren wurden je 10 μl von Überständen von *A. fumigatus* aus Minimalmedium mit Glukose und Ammoniumtartrat als C- bzw. N-Quelle sowie aus Minimalmedium mit BSA (0,4 %) und Pepton (0,1 %) als C- und N-Quelle (Protease-Überstand) verwendet. Einzelne Aliquots des Protease-Überstandes wurden vor der Aggregometrie für 60 min bei 98 °C inaktiviert oder mit den Protease-Inhibitoren „Protease-Inhibitor Mix“ (1x) und Pepstatin A (1 μM, gelöst in DMSO:Essigsäure 9:1, in PBS verdünnt) versetzt. Weiter wurden 10 μl ruhende und geschwollene Konidien sowie Keimschläuche und Hyphen von *A. fumigatus* aus einer Kultur angesetzt mit 10<sup>7</sup> Sporen/ml Medium eingesetzt. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium. Die eingesetzten Volumina ergaben ein Verhältnis von 1:17 von Effektor zu PRP.

Darüber hinaus wurden verschiedene Konzentrationen der Toxine Gliotoxin (300 ng/ml, 30 ng/ml, 3 ng/ml, 0,3 ng/ml), Citrinin (50 μg/ml, 5 μg/ml, 0,5 μg/ml, 0,05 μg/ml, 0,005 μg/ml), Verruculogen (100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml, 0,1 μg/ml, 0,01 μg/ml), Fumagillin (10 μg/ml, 5 μg/ml, 2 μg/ml, 1 μg/ml, 0,1 μg/ml) und Deoxynivalenol (100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml, 0,1 μg/ml) eingesetzt. Zum Vergleich wurde PRP mit dem entsprechenden Lösungsmittel versetzt. Um dem Effekt von Gliotoxin entgegenzuwirken, wurde das Toxin sowie sein Lösungsmittel DMSO (je 100-fach) vor der Aggregometrie für 30 min bei RT mit DTT inkubiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Um einen Effekt von DTT auf Thrombozyten auszuschließen, wurde DTT ohne Gliotoxin oder DMSO in der Aggregometrie eingesetzt.

Als Aktivatoren dienten Collagenreagenz Horm (1 μg/ml, Nycomed), ADP (10 μM, Sigma-Aldrich) und TRAP-6 (30 μM, Bachem), die ebenfalls als Positiv-Kontrolle zur Bestätigung des Aggregationsvermögens der Plättchen verwendet wurden. Als Null-Wert wurde Plasma ohne Plättchen (Platelet-poor plasma, PPP) eingesetzt, welches durch Zentrifugation von 500 μl PRP bei 14 000 rpm hergestellt wurde.



**Abbildung 8:** Darstellung einer Aggregometrie. Die Plättchen wurden zunächst 30 s inkubiert, bevor anschließend der Effektor zugegeben wurde. Nach der 5 minütigen Koinkubation wurden die Thrombozyten durch Zugabe des Agonisten aktiviert und weitere 5 min inkubiert. Nach Zugabe des Agonisten kam es zu einem shape change der Plättchen mit anschließender Aggregation, welche im Verlauf der Inkubation ein Plateau erreichte. Auf der x-Achse ist die Zeit  $t$  aufgetragen, auf der y-Achse die Extinktion des PRP.  $\bar{x}$  bezeichnet jeweils den Mittelwert der zehn Messungen, die zur Bestimmung der Ratio verwendet wurden (siehe Text).

Um diese Darstellung in Zahlen ausdrücken zu können, wurden von der angehenden Bioinformatikerin Nicole Schnell und meinem Kooperationspartner Michael Ok Routinen mit Pearl programmiert, die zum einen die erhaltenen Daten aus der Aggregometrie graphisch darstellten und zum anderen eine Ratio aus technischen Duplikaten eines Laufes kreierte, an Hand derer sich die Wiederholungen mit unterschiedlichen Blutspendern zusammenfassen und sich so die Auswirkungen der einzelnen Effektoren auf die Aktivität der Thrombozyten vergleichen ließen. Hierbei handelte es sich stets um Endpunktbestimmungen.

Zur Bestimmung der normalisierten Ratio wurden die Duplikate zunächst bei 300 s rechnerisch von der Routine auf denselben Wert gebracht, um eine einheitliche Basis für die anschließende Berechnung zu erreichen. Folgend wurde jeweils der Mittelwert von 10 Werten um 300 s ( $\bar{x}_{(300)}$ ) und um 600 s ( $\bar{x}_{(600)}$ ) verwendet, um den normalisierten Ratio der Duplikate zusammengefasst zu ermitteln.

$$\text{normalisierter Ratio} = \frac{\bar{X}_{(600)}}{\bar{X}_{(300)}}$$

Die Ratios der einzelnen Proben wurden durch eine weitere Routine zusammengefasst und für jeden Blutspender als CSV-Datei exportiert. Aus den Ratios von Probe und Kontrolle wurde weiter die Änderung der Aggregation [%] in Microsoft Excel<sup>®</sup> berechnet. Diese konnte nun verwendet werden, um die Änderungen der Aggregation der Proben bei verschiedenen Spendern zu vergleichen und zusammenzufassen (Ok, 2011).

$$\text{Änderung der Aggregation [\%]} = \left[ \frac{\text{Ratio}_{(\text{Kontrolle})} - \text{Ratio}_{(\text{Probe})}}{\text{Ratio}_{(\text{Kontrolle})} - 1} \right] * 100$$

### 2.2.5. Durchflusszytometrie

Im Zuge der Aktivierung von Thrombozyten werden Glykoproteine von der Granula-Membran an der Oberfläche der Plättchen exponiert. Diese können mittels Durchflusszytometrie mit entsprechenden gelabelten Antikörpern detektiert werden. Ist ein Unterschied zur negativen Kontrolle mit ruhenden bzw. aktivierten Thrombozyten zu beobachten, lässt dies Rückschlüsse auf eine veränderte Aktivität der Thrombozyten zu.

#### 2.2.5.1. Detektion von CD62P und CD63

##### 2.2.5.1.1. Morphologien und Überstände

Hierfür wurde PRP wie oben beschrieben generiert und für jede Probe frisch mit Tyrode's Puffer mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> auf 150 000 Plättchen/μl Plasma verdünnt. Überstände und Morphologien wurden analog zur Aggregometrie 1:17 in PRP eingesetzt, die Probe 5 min bei 37 °C rotierend mit 125 rpm inkubiert und anschließend wie in der Aggregometrie mit Collagen oder ADP für 5 min bei 37 °C rotierend aktiviert bzw. als ruhende Plättchen für 5 min inkubiert. Für proteasehaltige Überstände wurde zusätzlich der Aktivator TRAP-6 verwendet. Anschließend wurden ca. 900 000 Thrombozyten entnommen und in einem Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) mit sättigender Konzentration der Antikörper anti-human CD41 (FITC) und anti-human CD62P bzw. CD63 (jeweils APC) oder mit entsprechenden IgG-Isotypkontrollen für FITC und APC in 100 μl PBS für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte aktive und ruhende Plättchen ohne sowie mit Antikörper. Anschließend wurde mit PBS auf 500 μl aufgefüllt und die Durchflusszytometrie

durchgeführt. Da die Plättchen nach dem Färben direkt verwendet wurden, konnte auf eine Fixierung mit Formaldehyd verzichtet werden. Die sättigende Antikörperkonzentration wurde für jede Charge neu titriert. Die Durchflusszytometrie erfolgte am MACSQuant<sup>®</sup> Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) bzw. am FACSCalibur Analyzer mit der Software Cell Quest Pro (BD Biosciences, Heidelberg) und wurde mit der MACSQuant Software bzw. mit FlowJo<sup>®</sup>(FlowJo Enterprises) für 5000 CD41-positive Events auf CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten hin ausgewertet. Die statistische Auswertung für alle durchflusszytometrischen Analysen erfolgte mit SEM und Student's T-Test.

### 2.2.5.1.2. Gliotoxin

Zur Analyse des Einflusses von Gliotoxin auf die Thrombozytenaktivität wurde das verdünnte PRP wie bei der Aggregometrie mit verschiedenen Konzentrationen (300 ng/ml, 30 ng/ml, 3ng/ml und 0,3 ng/ml) für 5 min bei 37 °C und 125 rpm rotierend inkubiert und anschließend mit Collagen oder ADP, teilweise auch mit TRAP-6 wie oben aktiviert. Die Plättchen wurden folgend wie oben gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Neben einer Dosis-abhängigen Analyse wurde weiter eine Zeit-abhängige Analyse durchgeführt, bei der die Thrombozyten für 5 min, 15 min und 30 min mit 300 ng/ml Gliotoxin behandelt, und als ruhende bzw. aktivierte Thrombozyten gefärbt und analysiert wurden.

Um der Wirkung von Gliotoxin entgegen zu wirken, wurden bei einem Teil der Experimente das Toxin, DMSO sowie PBS mit verschiedenen Konzentrationen reduziertem L-Glutathion oder DTT für 30 min bei RT inkubiert. Die Inkubation mit PBS diente zur Analyse eines direkten Einflusses von DTT auf die Plättchen. Folgend wurden die Lösungen 1:100 in eingestelltem PRP verdünnt und dieses für 15 min bei 37 °C inkubiert und als ruhende oder aktivierte Thrombozyten wie oben gefärbt und analysiert.

Die Hieraus erhaltenen Ergebnisse führten zu einem Setup mit 30 µg/ml Gliotoxin, 0,3 % DMSO als Kontrolle mit und ohne DTT (500 µM) mit einer Inkubationszeit von 30 min. bei RT und einer anschließenden 100-fachen Verdünnung mit eingestelltem PRP (Endkonzentrationen: 300 ng/ml Gliotoxin, 0,003 %DMSO, 5 µM DTT) und einer Inkubation von 15 min bei 37 °C rotierend bei 125 rpm für darauf folgende Experimente.

### 2.2.5.2. Detektion von PAC-1

Um eine mögliche direkte Interaktion von Gliotoxin mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu eruieren, wurden die behandelten Thrombozyten mit dem Antikörper anti-human PAC-1 FITC (BD Biosciences, Heidelberg) gefärbt. Dieser Antikörper bindet an ein Epitop an oder in der Nähe des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , das nur bei aktivierten Thrombozyten exponiert wird. Hierfür wurde Gliotoxin und DMSO wie oben mit und ohne DTT für 30 min bei RT inkubiert und die Thrombozyten in Tyrode's Puffer mit Calcium wie oben behandelt. Anschließend wurden  $9 \times 10^5$  ruhende und  $1,8 \times 10^6$  aktivierte Plättchen mit einer vorher austitrierten sättigenden Konzentration von anti-human PAC-1-FITC und anti-human CD41-APC (BioLegend, Fell) bzw. den entsprechenden IgM- und IgG-Isotypkontrollen für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Auffüllen auf 100  $\mu$ l mit PBS entfiel zur besseren Färbung. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml kalten Paraformaldehyd (PFA) (1%) versetzt, für mind. 30 min bei 4 °C inkubiert und im Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert. Die Auswertung von 5000 CD41-positiven Events auf PAC-1-positive Thrombozyten erfolgte mit FlowJo<sup>®</sup>, die statistische Analyse wurde wie oben mit SEM und Student's T-Test durchgeführt.

### 2.2.6. Herstellung von Proteinextrakten aus mit Gliotoxin behandelten humanen Thrombozyten

Bevor das PRP mit Gliotoxin behandelt wurde, wurde das Toxin (30  $\mu$ g/ml) für 30 min bei RT mit und ohne DTT (500  $\mu$ M) inkubiert (Kroll *et al.*, 1999). Die DMSO-Kontrolle (0,3 %) wurde entsprechend behandelt. Als Negativ-Kontrolle diente DTT ohne Gliotoxin oder DMSO. Anschließend erfolgte eine 1:100-Verdünnung in PRP, woraus sich eine Endkonzentration von 300 ng/ml für Gliotoxin, 0,003 % DMSO und 5  $\mu$ M DTT ergab. Als Kontrollen diente unbehandeltes PRP. Wurden die Proteinextrakte für eine Westernblot-Hybridisierung mit Antikörpern gegen PVASP verwendet, wurde als Positiv-Kontrolle PRP mit 10  $\mu$ M PGE1 versetzt. PGE1 erhöht den cAMP-Level in Thrombozyten, was zu einer Phosphorylierung von VASP führt. Das so behandelte PRP wurde für 15 min bei 37 °C und 125 rpm rotierend inkubiert. Es folgte der Zusatz von 2 mM CaCl<sub>2</sub> mit und ohne 10  $\mu$ M ADP mit einer weiteren Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C und 125 rpm. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM EDTA (pH 8) und 500  $\mu$ M ASS gestoppt, das PRP zunächst mit 811 x g (= 2800 rpm) für 10 min und nochmals bei 14910 x g (= 12 000 rpm) für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5451R, Eppendorf) und der Überstand entfernt. Dieser wurde entweder für einen anschließenden ELISA von Thromboxan A<sub>2</sub> bei -80 °C eingefroren oder verworfen. Das Pellet wurde mit

250 µl Lysepuffer (15 mM Tris-HCl, 155 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 1 % IgePal) und 1x Protease-Inhibitor Mix (PIM) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 14910 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß entweder direkt verwendet oder bei - 80 °C gelagert.

### **2.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des RC DC™ Protein Assays von BioRad und dem ELISA-Reader. Es wurde zunächst eine abfallende Standardreihe von BSA (Albumin Fraktion V) mit einer Verdünnung von 1:2 ausgehend von 10 mg/ml in Lysepuffer mit Protease-Inhibitor Mix (Roche) erstellt. Anschließend wurden die Proteinextrakte mit Lysepuffer 1:5 verdünnt. Von der Standardreihe bzw. der verdünnten und unverdünnten Probe wurden je 5 µl in eine 96-Well Platte vorgelegt und weiter nach Herstellerangaben vorgegangen. Die anschließende Messung erfolgte bei einer Extinktion von 620 nm und einer Korrektur von 405 nm im ELISA-Reader (TECAN Trading AG). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve und der polynomischen Regression ( $y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c$ ) in Microsoft Excel® ermittelt.

### **2.2.8. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli**

Zur Auftrennung von Proteinen wurde ein vertikales Polyacrylamidgel verwendet. Dieses bestand aus einem 4 %igen Sammelgel (3,67 ml H<sub>2</sub>O, 0,65 ml Rotiphorese® Gel (Carl Roth GmbH & CO. KG) (30%), 0,625 ml Tris (1 M, pH 6,8), 50 µl SDS (10%), 25 µl APS (10%), 5 µl TEMED) zum Sammeln der Proteine, bevor sie über das 12 %ige Trenngel (2,1 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml Rotiphorese® Gel (30 %), 3,75 ml Tris (1 M, pH 8,8), 100 µl SDS (10 %), 50 µl APS (10%), 10 µl TEMED) der Größe nach aufgetrennt wurden. Zunächst wurde das Trenngel in eine zuvor in einer Gel-Apparatur vorbereiteten Gelform gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels (~ 30 min) wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels (~ 10 min) wurde der Probenkamm entfernt und das Gel verwendet oder eingeschlagen in feuchte Tücher im Kühlschrank bis zu einer Woche aufbewahrt. Währenddessen wurden die auf Eis lagernden Proben vorbereitet. Hierzu wurden diese mit Probenpuffer (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15 % β-Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 7 % SDS, 0,3 % Bromphenolblau) versetzt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden sie

wie auch 3 µl des Größenstandards „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ über das Gel aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra System mit Power Pac 1000 bzw. Mini Protean 3, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gespannt, diese teilweise mit Laemmli-Puffer (25 mM Tris Base, 0,25 M Glycin, 0,1 % SDS) gefüllt und eine Spannung von 100 V für 10 min und anschließend eine Spannung von 200 V je nach Proteingröße für 45 - 60 min angelegt.

### **2.2.9. Westernblot-Hybridisierung**

Die Übertragung der Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte über ein Semi-Dry Elektroblothing bei 350 mA für 60 min mit Transfer-Puffer (25mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol frisch zugeben) in einer Semi-dry Trans-Blot-Apparatur von BioRad. Anschließend wurde die Membran kurz mit Wasser gewaschen, zur Prüfung des Transfers 2 min mit Ponceau S-Lösung (0,2 % Ponceau S, 3 % TCA) gefärbt und zum Entfernen überschüssiger Ponceaus S-Lösung wieder mit Wasser gewaschen. Die transferierten Protein-Banden erschienen rot. Um das unspezifische Binden von Proteinen zu verhindern, wurde die Membran für 60 min bei RT in TBST (10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) mit 5 % Milchpulver inkubiert. Zur Hybridisierung des polyklonalen primären rabbit anti-human Antikörpers wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit den Antikörpern nach Herstellerangaben in TBS (10 Mm Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl) mit 5 % BSA oder 5 % Milchpulver inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran am nächsten Tag 2 mal für 10 min mit TBS gewaschen, bevor die Membran anschließend mit dem sekundären HRP-gekoppelten sekundärem Antikörper (1:2000) für 60 min bei RT inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für je 10 min erfolgte die Detektion der Antikörper auf der Membran mit Hilfe des ECL Western Blot detection-Kits (Thermo Fischer Scientific) nach Herstellerangaben. Hierfür wurden je 1 ml von Lösung 1 und Lösung 2 vereinigt und auf die Membran gegeben. Nach ca. 2 min wurde die Lösung entfernt, ein Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray film) im Dunkeln aufgelegt, je nach Signalstärke für 1-10 min exponiert und anschließend entwickelt.



### **2.2.10. Coomassie-Färbung**

Zur Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese für mind. 1 h bis über Nacht in Coomassie-Lösung (500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (96 %), 2,75 gr Coomassie-Brilliantblau, Endvolumen 1 l) gelegt. Zur Entfernung von überschüssigem Coomassie-Brilliantblau wurde das Gel anschließend in Entfärber-Lösung (100 ml Methanol, 75 ml Essigsäure (96%), 100 ml Ethanol abs., Endvolumen 1 l) für bis zu 1 h inkubiert. Die Proteinbanden blieben blau.

### **2.2.11. Gel Trocknung**

Mit Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe eines Gel Trocknungsrahmens (Carl Roth GmbH & Co. KG) konserviert. Hierfür wurde das Gel für 30 min in Trocknerlösung (50 ml Glycerin, 100 ml Ethanol, 350 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) inkubiert, während 2 Blätter Cellophan in destilliertem Wasser eingeweicht wurden. Ein Blatt wurde anschließend luftblasenfrei auf die Rückseite des Rahmens gelegt, mit 1 ml Trocknerlösung versetzt, das Gel aufgelegt und mit dem zweiten Blatt bedeckt. Der Rahmen wurde aufgelegt, mit Klammern fixiert und das Gel für ca. 2 Tage bei RT getrocknet.

### **2.2.12. TXB<sub>2</sub>-ELISA**

Zur Bestimmung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) in Plasma wurden die Plättchen entsprechend Kapitel 2.2.6 behandelt und das nach der Zentrifugation gewonnene Plasma verwendet. Da TXA<sub>2</sub> mit einer Halbwertszeit von etwa 30 s sehr kurzlebig ist, wurde die Konzentration des stabilen Degradationsproduktes Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) mit Hilfe eines TXB<sub>2</sub>-ELISA-Kits (Abnova, Heidelberg) im Plasma nach Herstellerangaben bestimmt. Als Effektor wurden Gliotoxin (300 ng/ml) und DMSO (0,003%) je mit und ohne DTT (5 µM) verwendet, die Thrombozyten wurden mit ADP (10 µM), Collagen (1µg/ml) oder TRAP-6 (30 µM) aktiviert. Es wurden jeweils Überstände unverdünnt und 1:5-verdünnt von ruhenden und aktivierten Thrombozyten verwendet, jeweils unbehandelt oder mit Gliotoxin bzw. DMSO mit und ohne DTT-Behandlung. Für Collagen-aktivierte Proben wurde zudem zusätzlich eine Verdünnung von 1:20 verwendet. Die Auswertung erfolgte über eine halb-logarithmische 4-Parameter Kurvenanpassung mit Hilfe der Datenanalyse-Software Magellan™ (TECAN Trading AG).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Analyse der primären Hämostase

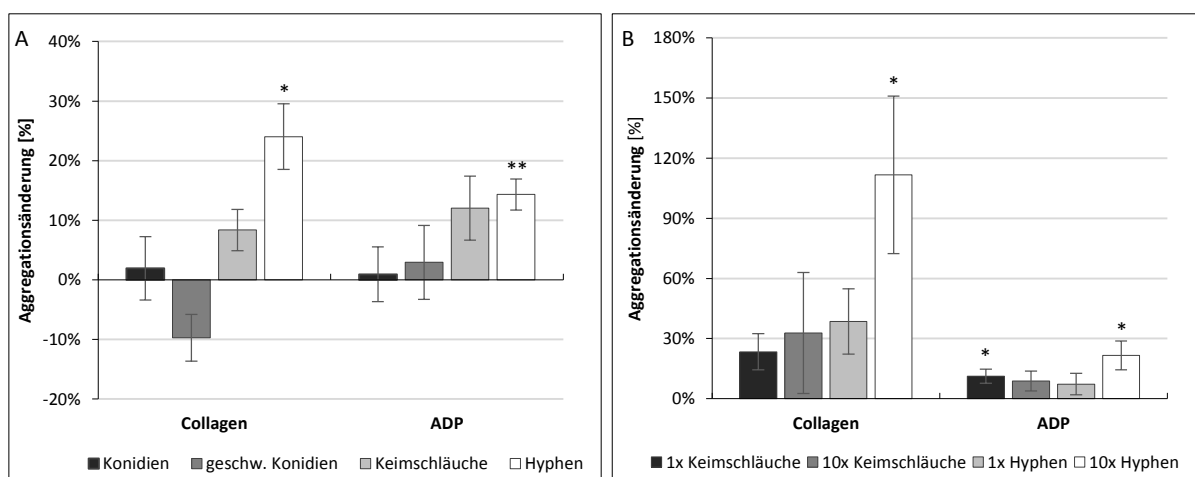
##### 3.1.1. Einfluss von Morphologien von *A. fumigatus* und ihrer Kulturfiltrate auf die Thrombozytenaggregation

Die von *A. fumigatus* ausgelöste IA kann assoziiert sein mit Gewebeschädigungen, Blutungen und Thrombenbildung. Es wird vermutet, dass diese Komplikationen auf einer Störung der primären (thrombozytären) oder sekundären (plasmatischen) lokalen Hämostase durch Faktoren von *A. fumigatus* beruhen.

Um den Einfluss von *A. fumigatus* auf die primäre Hämostase zu evaluieren, wurde die Aggregation von Thrombozyten nach Behandlung mit *A. fumigatus* mittels Aggregometrie untersucht. Hierfür wurden zunächst die einzelnen Morphologien (Konidien, geschwollene Konidien, Keimschläuche und Hyphen) von *A. fumigatus* ATCC46645 in Minimalmedium herangezogen und in der Aggregometrie eingesetzt. Eine Koinkubationszeit von 5 min ist dabei ausreichend, um eine eventuelle Änderung der Lichttransmission der Plättchensuspension im Aggregometer zu beobachten sowie die Durchführbarkeit der Versuchsreihe zu gewährleisten. Frisches PRP ist nur eine begrenzte Zeit lang aktiv, wobei die Aktivierbarkeit mit der Zeit abnimmt. Eine längere Koinkubationszeit der Plättchen mit dem Effektor hätte somit gegen Ende der Versuchsreihe zu verfälschten Ergebnissen führen können.

Die Auswertung erfolgte mittels der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Routine sowie mit Microsoft Excel®. Die Aggregation der Plättchen versetzt mit Medium als Kontrolle wurde als Nullwert (0 % Änderung) gesetzt. Die folgenden Änderungen sind als Änderungen im Vergleich zur Kontrolle zu verstehen.

In Abbildung 9A ist die Änderung der Aggregation der Thrombozyten durch ruhende Konidien, geschwollene Konidien, Keimschläuche und Hyphen auf die Plättchen aktiviert mit Collagen oder ADP zu sehen. Sowohl ruhende, als auch geschwollenen Konidien und Keimschläuche zeigten nur einen geringen Einfluss von -9 % bis 1 % auf die Aggregation. Erst Hyphen führten zu einer signifikanten Erhöhung der durch Collagen oder ADP induzierten Aggregation der Plättchen. Allerdings lag nach Aktivierung mit ADP der Mittelwert bei Hyphen nahe an dem der Keimschläuche.



**Abbildung 9:** Änderung der Aggregation von humanen Thrombozyten nach Koinkubation mit verschiedenen Morphologien (A) oder deren Überständen (B) von *A. fumigatus* ATCC46645. Verdünntes PRP wurde für je 5 min mit verschiedenen Morphologien bzw. nativen oder 10fach konzentrierten Überständen im Aggregometer koinkubiert und anschließend die Aggregation der Plättchen durch Zugabe von Collagen oder ADP eingeleitet. Die Auswertung erfolgte mittels der Routine. Angegeben ist der Mittelwert der Aggregationsänderung der Plättchen im Vergleich zur Kontrolle mit unbehandeltem Medium  $\pm$  SEM. N = 5; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

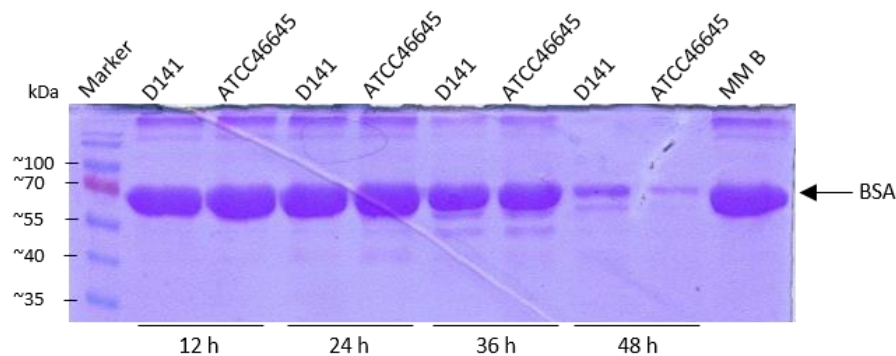
Für die Analyse des Einflusses der Überstände verschiedener Morphologien wurden die Überstände von Keimschläuchen und Hyphen von *A. fumigatus* gewonnen und sowohl nativ als auch als 10faches Konzentrat eingesetzt.

Das PRP wurde wie oben beschrieben mit den Überständen koinkubiert und die Änderung der Aggregation ermittelt. Bei der Collagen-induzierten Aggregation wurde für native und konzentrierte Keimschlauch-Überstände sowie für native Hyphen-Überstände eine nicht signifikante Erhöhung von ca. 30 % festgestellt (Abbildung 9B). Darüber hinaus konnte hier für den konzentrierten Hyphen-Überstand eine signifikante Erhöhung von über 100 % ermittelt werden. Der native Keimschlauch- sowie auch der konzentrierte Hyphen-Überstand zeigten bei ADP-Aktivierung eine signifikante Aggregationserhöhung des Mittelwertes von ~ 11 % bzw. ~ 21 %. Allerdings muss bei den nativen Keimschlauch-Überständen beachtet werden, dass der gefundene Mittelwert nur gering von dem der konzentrierten Keimschlauch- und nativen Hyphen-Überstände abweicht. Der konzentrierte Keimschlauch-Überstand und der native Hyphen-Überstand zeigten hier eine nicht-signifikante Erhöhung der Aggregation von ca. 8 %.

### 3.1.2. Einfluss von proteolytisch-aktiven Überständen auf die Aggregation von Thrombozyten.

#### 3.1.2.1. Herstellung und Vergleich der Überstände

Neben den verschiedenen Morphologien und ihren Überständen wurden zusätzlich Überstände mit proteolytischer Aktivität für die Analyse verwendet. Hierfür wurde zunächst der Wildtyp *A. fumigatus* ATCC46645 für 12 h bis 48 h in Minimalmedium mit BSA (0,4 %) (MM B) als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle inkubiert und der Überstand *via* SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Das hier verwendete Medium führt zu einer erhöhten Expression und Sekretion hydrolytischer Enzyme, unter ihnen auch Proteasen, die für den extrazellulären Abbau der Proteine im Zuge der Nährstoffaufnahme durch Absorption benötigt werden (Bergmann *et al.*, 2009). Zum Vergleich wurde zusätzlich der Überstand des identisch inkubierten Stammes D141 aufgetragen.

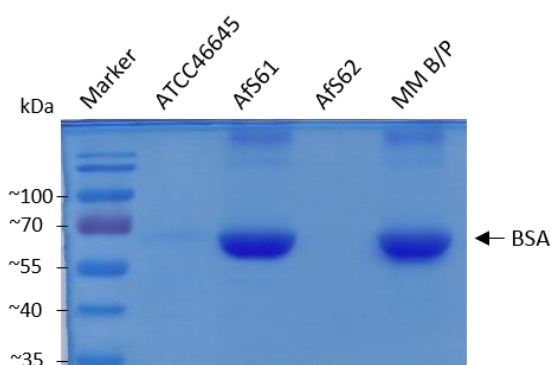


**Abbildung 10:** Vergleich der Überstände von für 12 h, 24 h, 36 h und 48 h lange inkubierten Kulturen der Wildtyp-Stämme D141 und ATCC46645 in Minimalmedium mit BSA als C- und N-Quelle (MM B). Als Kontrolle diente frisches MM B. Es wurden jeweils 15  $\mu$ l einer 1:10-Verdünnung aufgetragen.

Wie in Abbildung 10 zu sehen war die BSA-Bande nach 48 h im Vergleich zum unbehandelten Medium deutlich verringert, was auf einen Abbau des BSA schließen lässt. Dieser Zeitpunkt wurde zur Ernte der proteasehaltigen Überstände übernommen. Auf den Stamm D141 wurde anschließend verzichtet, da hiervon keine Deletionsmutanten die Expression oder Sekretion von Proteasen betreffend vorhanden waren.

### 3.1.2.2. Prüfung der Filtrate auf proteolytische Aktivität

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Stämme ATCC46645 sowie seine Derivate AfS61 und AfS62 verwendet. Bei AfS61 handelt es sich um einen Deletionsstamm, bei dem das Gen *prtT*, codierend für den Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität, deletiert wurde. Bei AfS62 handelt es sich um den entsprechend rekonstituierten Stamm (Bergmann *et al.*, 2009). Da AfS61 auf Grund der Deletion BSA nicht abbauen und so in MM B nicht wachsen konnte, wurde das Medium mit Pepton als bereits hydrolytisch gespaltenes Protein versetzt (MM B/P). Zur Prüfung der proteolytischen Aktivität der gewonnenen Filtrate der drei Stämme wurden diese zusammen mit unbehandeltem Medium in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in Coomassie-Lösung gefärbt (Abbildung 11). Hier konnte für ATCC46645 sowie für AfS62 der nahezu vollständige Abbau von BSA und damit eine volle proteolytische Aktivität im Überstand nachgewiesen werden. Auf Grund der Deletion von *prtT* kam es bei AfS61 erwartungsgemäß zu keinem BSA-Abbau.

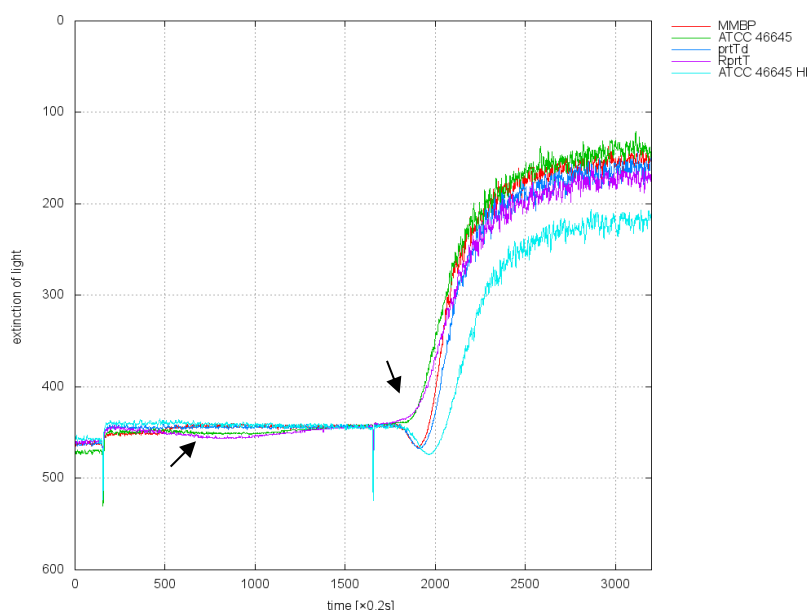


**Abbildung 11:** Nachweis der proteolytischen Aktivität. Aufgetragen wurden Kulturfiltrate der Stämme ATCC46645, AfS61 und AfS62, inkubiert in Minimalmedium mit BSA und Pepton als C- und N-Quelle (MM B/P). Zum Vergleich diente unbehandeltes Medium. Die Filtrate der Kulturen von ATCC46645 und AfS62 wiesen nur eine geringe bis keine Bande auf Höhe von BSA auf, während bei AfS61 und der negativen Kontrolle (MM B/P) diese Bande deutlich zu erkennen waren.

### 3.1.2.3. Einfluss proteolytischer Aktivität auf die Thrombozyten-Aggregation

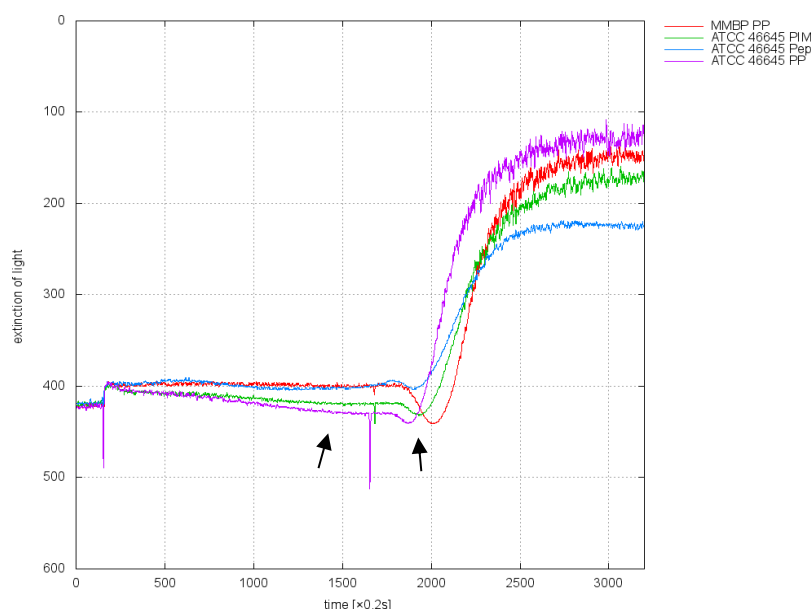
Diese Überstände wurden anschließend mittels der Aggregometrie auf eine eventuelle koagulative Wirkung hin untersucht. Neben den nativen Überständen sowie unbehandeltem Medium als Referenz, wurde je ein Aliquot des Überstandes von ATCC46645 für 60 min bei 98 °C Hitze-inaktiviert (HI) oder mit den Protease-Inhibitoren Protease-Inhibitor Mix (PIM, 1x), Pepstatin A (Pep, 1 µM) oder einer Kombination aus PIM und Pep (PP) behandelt. Diese so behandelten Überstände dienten als Negativ-Kontrolle für eine eventuelle auf Protease-Aktivität basierenden Aktivierung der Thrombozyten. Die Aktivierung der Plättchen erfolgte mit Collagen (Abbildung 12 und Abbildung 13) oder ADP (Abbildung 14 und Abbildung 15). Zur Auswertung der Aggregometrie konnte bei dieser Versuchsreihe die Routine nicht verwendet werden, da hier schon während der Koinkubation des Filtrats mit den

Plättchen eine Änderung der Lichttransmission zu erkennen war. Die Verwendung der Routine hätte hier einen Informationsverlust bedeutet, weswegen die Auswertung mittels einer graphischen Darstellung erfolgte. In Abbildung 12 ist die Aggregometrie von PRP mit den nativen Überständen von *A. fumigatus* ATCC46645, AfS61 (*prtTA*, *prtTd*) und AfS62 (*RprtT*), sowie dem Hitze-inaktivierten Überstand von ATCC46645 im Vergleich mit Medium (MM B/P) an Hand eines Spender beispielhaft dargestellt. Hier zeigten die Linien des Medium MM B/P und des Überstandes des *prtT*-Deletionsstammes (Rot bzw. Dunkelblau) einen nahezu identischen horizontalen Verlauf während der Koinkubation sowie einen typischen Verlauf bei shape change und der Aggregation nach der Aktivierung. Die Linien der Überstände von ATCC46645 und des rekonstituierten Stammes (Grün bzw. Violett) zeigen hingegen schon während der Koinkubation mit den Thrombozyten eine zeitweilige Verringerung der Lichttransmission, die gegen Ende der Koinkubation wieder auf den Ursprungswert zurückging (linker Pfeil). Nach Zugabe des Agonisten Collagen konnte hier allerdings kein shape change beobachtet werden (rechter Pfeil), trotz einer mit der Kontrolle vergleichbaren anschließenden Erhöhung der Lichttransmission. Die Linie des Hitze-inaktivierten Überstandes (Türkis) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolle.



**Abbildung 12:** Koinkubation von humanen Thrombozyten mit Kulturfiltraten vom *A. fumigatus* ATCC46645, AfS61 und AfS62 und anschließender Aktivierung durch Collagen. Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurden die Thrombozyten mit Effektor versetzt (Medium oder Überstand, erste Spitze), anschließend für 5 min koinkubiert, gefolgt von der Zugabe des Agonisten Collagen (zweite Spitze), was zu einer Verringerung der Lichtextinktion (= Erhöhung der Lichttransmission) durch Aggregation der Plättchen führte. MMBP: Minimalmedium mit BSA und Pepton, HI: Hitze-inaktiviert. Daten repräsentativ für N = 3.

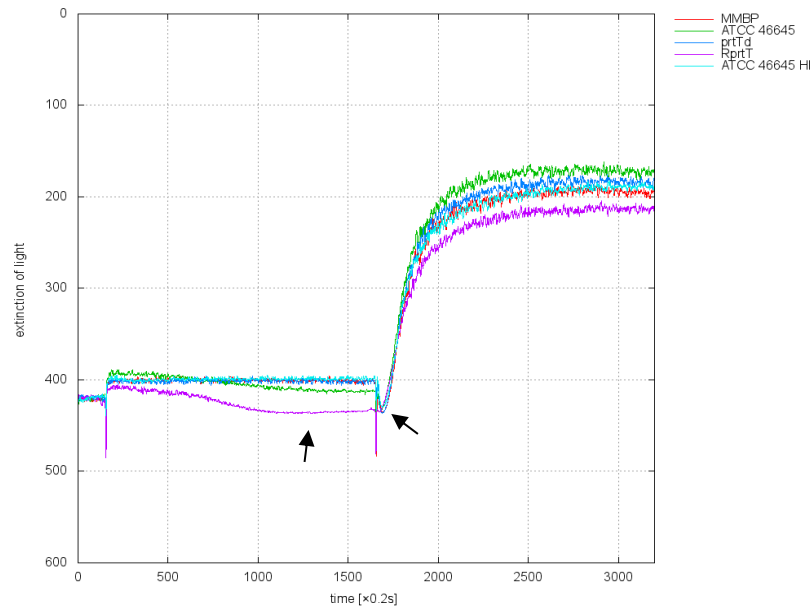
Der Verlauf der Aggregation ließ Rückschlüsse auf eine eventuelle Beteiligung von Proteasen bei diesem Vorgang zu, weswegen der Überstand von *A. fumigatus* ATCC46645 mit Protease-Inhibitoren behandelt und in der Aggregometrie eingesetzt wurde (Abbildung 13). Während die Linie des Mediums versetzt mit PIM und Pep (Rot) einen nahezu geraden Verlauf während der Koinkubation sowie den typischen Verlauf eines shape change mit anschließender Aggregation nach der Aktivierung darstellte, wiesen die Linien von Überstand versetzt mit PIM (Grün) und der Kombination von PIM und Pep (Violett) im Verlauf der Koinkubation einen deutlichen Abfall auf, mit einem geringen shape change und einer trotzdem vergleichbaren Aggregation (Pfeile). Die Linie des Überstandes versetzt mit Pep (Blau) zeigte ebenfalls einen leicht veränderten Verlauf und einen geringen shape change mit niedriger Aggregation.



**Abbildung 13:** Koinkubation von humanen Thrombozyten mit Kulturfiltraten vom *A. fumigatus* ATCC46645 behandelt mit Protease-Inhibitor-Mix (PIM), Pepstain A (Pep) oder einer Kombination aus beiden (PP) und anschließender Aktivierung durch Collagen. Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurden die Thrombozyten mit Effektor versetzt (Medium oder Überstand, erste Spitze), anschließend für 5 min koinkubiert, gefolgt von der Zugabe des Agonisten Collagen (zweite Spitze), was zu einer Verringerung der Lichtextinktion (= Erhöhung der Lichttransmission) durch Aggregation der Plättchen führte. MMBP: Minimalmedium mit BSA und Pepton, PIM: Protease-Inhibitor-Mix, Pep: Pepstain A, PP: Kombination aus PIM und Pep. Daten repräsentativ für N = 3.

Der Verlauf der Koinkubation und Aggregation unter Verwendung von Collagen als Agonist konnte für ADP bestätigt werden (Abbildung 14). Auch hier zeigten die Linien von ATCC46645 (Grün) und des rekonstituierten Stammes (Violett) während der Koinkubation einen Abfall mit entsprechend verringertem shape change nach der Aktivierung mit ADP (Pfeile), wohingegen die Kontrolle mit Medium, dem Überstand von *prtTΔ* sowie dem Hitze-inaktiviertem Überstand von ATCC46645 (Rot, Dunkelblau oder Türkis) keine Veränderung

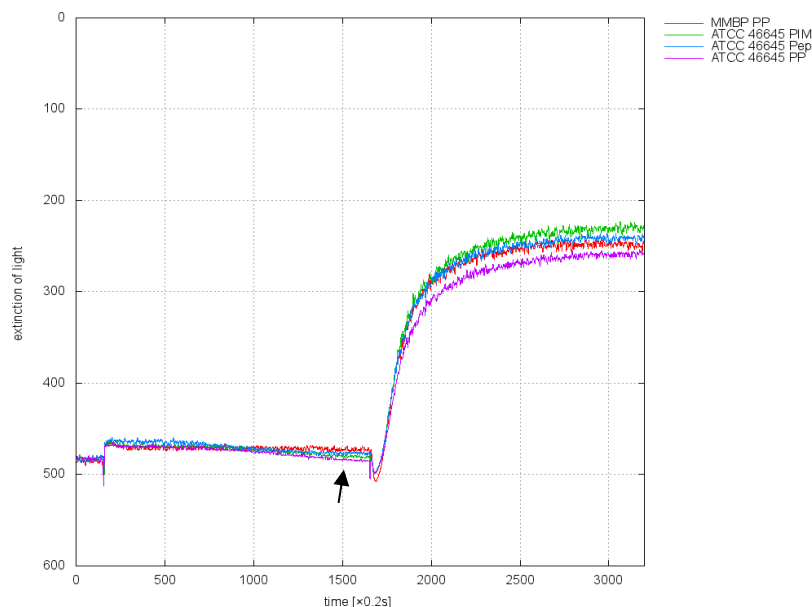
während der Koinkubation sowie den typischen Verlauf von shape change und Aggregation aufwiesen. Dennoch verlief die Lichttransmission aller Proben während der Aggregationsphase im selben Bereich.



**Abbildung 14:** Koinkubation von humanen Thrombozyten mit Kulturfiltraten vom *A. fumigatus* ATCC46645, AfS61 und AfS62 und anschließender Aktivierung durch ADP. Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurden die Thrombozyten mit Effektor versetzt (Medium oder Überstand, erste Spitze), anschließend für 5 min koinkubiert, gefolgt von der Zugabe des Agonisten ADP (zweite Spitze), was zu einer Verringerung der Lichtextinktion (= Erhöhung der Lichttransmission) durch Aggregation der Plättchen führte. MMBP: Minimalmedium mit BSA und Pepton, HI: Hitze-inaktiviert. Daten repräsentativ für N = 3.

Auch der Verlauf der Aggregometrie mit den behandelten Überständen konnte für die ADP-Aktivierung bestätigt werden. Die Linien zeigten hier einen ähnlichen Verlauf wie bei der Aktivierung mit Collagen, allerdings weniger stark ausgeprägt (Abbildung 15, Pfeil). Auch hier wiesen die mit ATCC 46645 PIM und PP behandelte Suspension während der Koinkubation eine leichte Verringerung der Lichttransmission, aber dennoch eine mit der Kontrolle vergleichbare Lichttransmission während der Aggregationsphase auf.





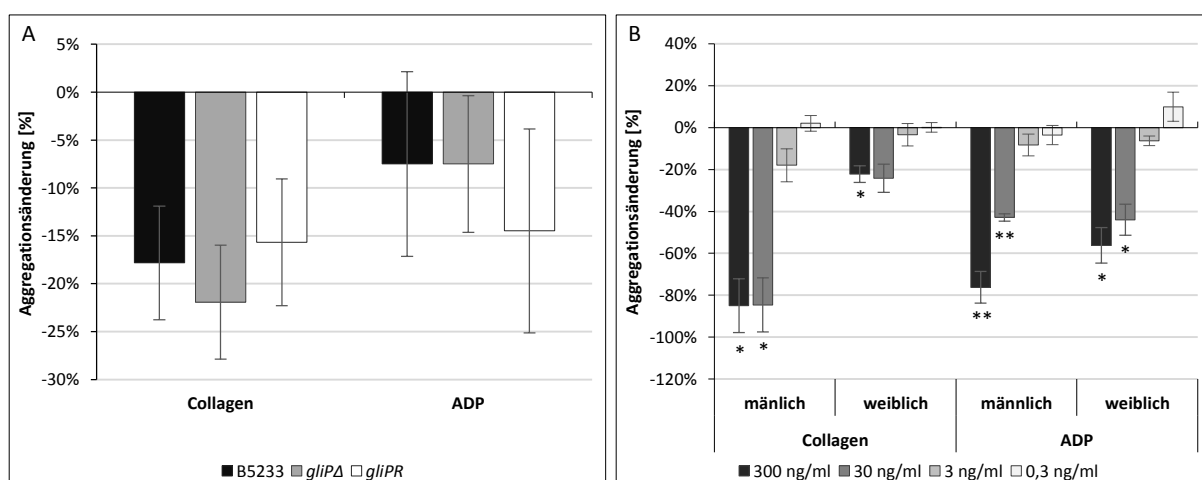
**Abbildung 15:** Koinkubation von humanen Thrombozyten mit Kulturfiltraten vom *A. fumigatus* ATCC46645 behandelt mit Protease-Inhibitor-Mix (PIM), Pepstatin A (Pep) oder einer Kombination aus beiden (PP) und anschließender Aktivierung durch ADP. Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurden die Thrombozyten mit Effektor versetzt (Medium oder Überstand, erste Spitze), anschließend für 5 min koinkubiert, gefolgt von der Zugabe des Agonisten Collagen (zweite Spitze), was zu einer Verringerung der Lichtextinktion (= Erhöhung der Lichttransmission) durch Aggregation der Plättchen führte. MMBP: Minimalmedium mit BSA und Pepton, PIM: Protease-Inhibitor-Mix, Pep: Pepstain A, PP: Kombination aus PIM und Pep. Daten repräsentativ für N = 3.

Diesen Ergebnissen zufolge scheinen proteolytisch-aktive Überstände von *A. fumigatus* eine aktivierende Wirkung auf humane Thrombozyten zu besitzen.

### 3.1.3. Einfluss von Mykotoxinen auf die Thrombozyten-Aggregation

*A. fumigatus* produziert und sezerniert eine Reihe von Toxinen, unter ihnen Gliotoxin. Da es zytotoxische Eigenschaften besitzt, könnte es die Aktivität von humanen Thrombozyten und damit die primäre Hämostase beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Überstände von *A. fumigatus* B5233, des *gliPΔ*- und des *gliP<sub>R</sub>*-Stammes hergestellt und in der Verdünnung 1:17 mit PRP in der Aggregometrie eingesetzt. Das Gen *gliP* codiert für eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase, die den ersten Schritt der Biosynthese von Gliotoxin katalysiert. Entsprechend kann der Deletionsstamm durch die Deletion von *gliP* kein Gliotoxin synthetisieren (Scharf *et al.*, 2011; Scharf, 2013). Als Vektorkontrolle diente wieder das unbehandelte Minimalmedium. In dieser Versuchsreihe konnte die Änderung der Aggregation wieder mittels Routine analysiert werden. Wie in Abbildung 16A zu sehen führte die Koinkubation der Plättchen mit den Überständen von B5233 und *gliP<sub>R</sub>* und anschließender Stimulation mit Collagen zu einer Verringerung der Lichttransmission um ca. -15 %, nach Stimulation mit ADP zu einer Verringerung von -7 bis -15 %. Allerdings wiesen auch die

Plättchen koinkubiert mit Überständen des Deletionsstammes eine verminderte Aggregation von ca. -22 % nach Collagen-Stimulation und von ca. -7 % nach ADP-Stimulation auf.

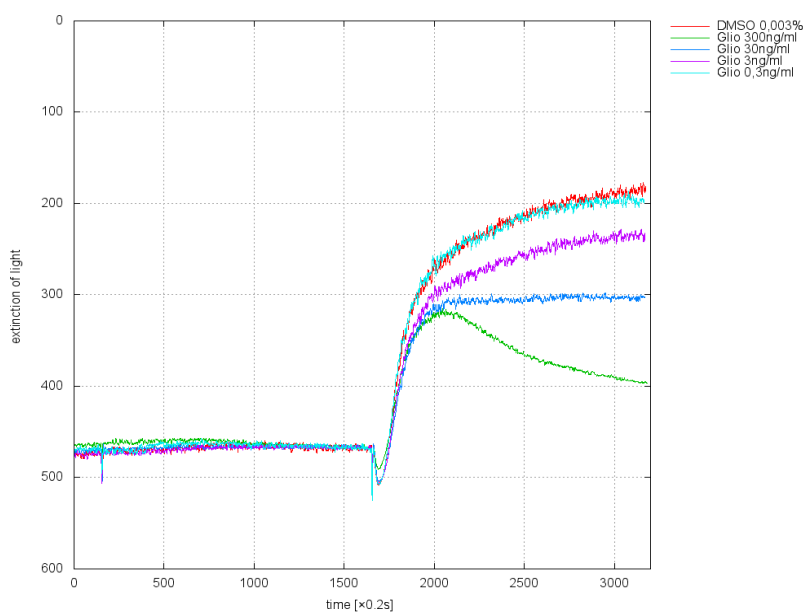


**Abbildung 16:** Änderung der Aggregation humaner Thrombozyten durch Überstände von B5233, des *gliPA*- und *gliPR*-Stammes aus Minimalmedium (A) oder reinem in DMSO gelöstem Gliotoxin (B). Verdünntes PRP wurde für je 5 min. mit den Überständen bzw. den verschiedenen Konzentrationen von Gliotoxin koinkubiert und anschließend die Aggregation durch Zugabe von Collagen oder ADP induziert. Die Auswertung erfolgte mittels der Routine. Angegeben ist der Mittelwert der Aggregationsänderung der Plättchen im Vergleich zur Vektorkontrolle  $\pm$  SEM. A: N = 3. B: N = 6; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Somit konnte kein klarer Unterschied zwischen den Überständen des Wildtyps bzw. des rekonstituierten Stammes und der Deletionsmutante festgestellt werden. Auf Grund dessen wurde hier auf die Gewinnung von Gliotoxin aus dem Medium verzichtet und das Toxin käuflich erworben. Es wurde in DMSO gelöst und in den physiologisch sinnvollen Endkonzentrationen 300 ng/ml, 30 ng/ml, 3 ng/ml und 0,3 ng/ml (Lewis *et al.*, 2005) in der Aggregometrie eingesetzt. Wie auch schon bei den Morphologien und den Überständen erfolgte die Koinkubation von Toxin mit Plättchen über einen Zeitraum von 5 min mit anschließender Aktivierung durch Collagen oder ADP und einer weiteren Inkubation von 5 min mit einer durchgehenden Messung der Lichttransmission. Als Vektorkontrolle diente DMSO in der entsprechenden Verdünnung. Um einen Einfluss von DMSO auf die Plättchenaggregation auszuschließen, wurde als erstes die Aggregation von unbehandeltem PRP mit DMSO-versetztem PRP verglichen. Folgend wurde für die Auswertung die Aggregation der Plättchen bei Vorhandensein der entsprechenden DMSO-Konzentration als 0 % gesetzt und damit die Aggregation bei Gliotoxin-Anwesenheit verglichen.

Wie in Abbildung 16B zu sehen, konnte eine deutliche Dosis-abhängige Verringerung der Aggregation beobachtet werden, von ca. -3 % bei 3 ng/ml bis hin zu ca. -80 % bei 300 ng/ml PRP. Dieser Effekt trat unabhängig von dem verwendeten Agonisten auf. Neben diesem Dosis-abhängigen Einfluss von Gliotoxin konnte zudem eine Geschlechter-spezifische Reaktion

beobachtet werden: bei PRP von männlichen Spender konnte eine stärkere Verringerung der Aggregation als bei PRP von weiblichen Spendern beobachtet werden, sowohl bei Induktion mit Collagen, als auch mit ADP. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die Aggregometrie von Thrombozyten koinkubiert mit DMSO als Vektorkontrolle sowie verschiedenen Konzentrationen von Gliotoxin. Der Graph zeigt deutlich den shape change der Thrombozyten nach Agonist-Zugabe sowie einen ersten Anstieg der Kurve hinweisend auf eine Aggregation der Plättchen. Allerdings fiel die Kurve nach der ersten Welle der Aggregation Dosis-abhängig wieder ab (Pfeil). Für eine stabile Interaktion der Plättchen untereinander ist die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nötig (Michelson, 2012). Da diese Interaktion durch die Koinkubation der Plättchen mit Gliotoxin inhibiert wurde, ist dies ein Hinweis für eine Rezeptor-spezifische Interaktion des Toxins mit humanen Thrombozyten über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

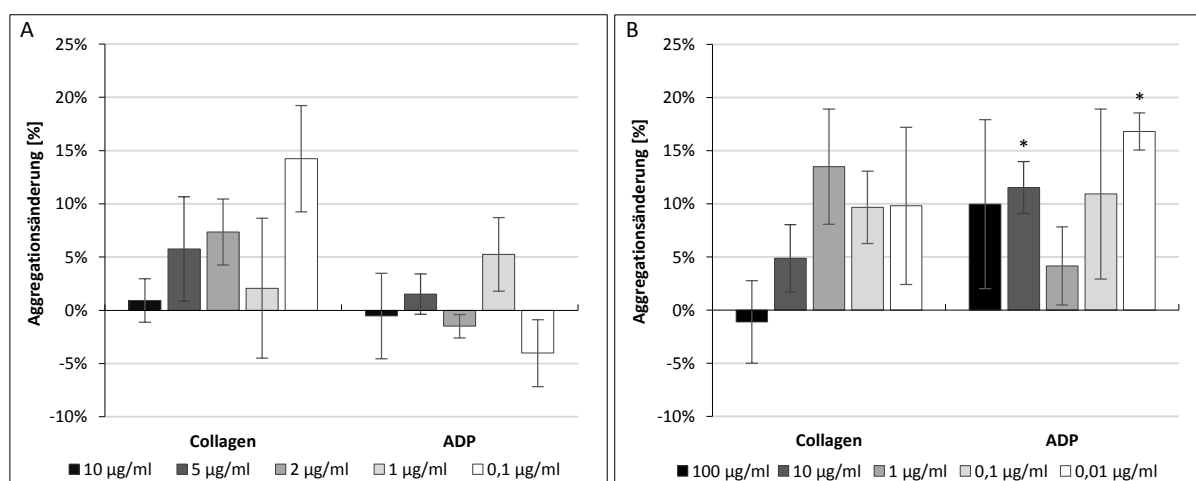


**Abbildung 17:** Koinkubation von humanen Thrombozyten mit DMSO als Vektorkontrolle sowie mit verschiedenen Konzentrationen von Gliotoxin. Nach einer Inkubationszeit von 30 s wurden die Thrombozyten mit dem Effektor versetzt (DMSO oder Gliotoxin), anschließend für 5 min koinkubiert, mit ADP aktiviert und für weitere 5 min inkubiert. Daten repräsentativ für N = 6.

Um den Einfluss von Gliotoxin mit dem anderer Toxine von *Aspergillus* zu vergleichen, wurden verschiedene Konzentrationen von Fumagillin, Verruculogen, Citrinin und Deoxynivalenol in der Aggregometrie eingesetzt. Fumagillin und Verruculogen werden wie Gliotoxin von *A. fumigatus* sezerniert, Citrinin und Deoxynivalenol von anderen *Aspergillus*-Arten. Sie wirken ebenfalls zytotoxisch, genotoxisch oder auch nephrotoxisch und könnten die Aktivität humaner Thrombozyten beeinflussen (Chan & Gentry, 1984; Flajs & Peraica, 2009;

Froquet *et al.*, 2003; Grandoni *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1983). Die eingesetzten Konzentrationen richteten sich nach der Löslichkeit der Toxine sowie den Angaben in der Literatur. Als Kontrollen dienten hier ebenfalls unbehandeltes PRP sowie PRP versetzt mit der entsprechenden Konzentration des Lösemittels des Toxins als Vektorkontrolle. Die Auswertung erfolgte wieder mittels der erstellten Routine. In den folgenden Abbildungen sind die Änderungen der Aggregationen durch die jeweiligen Toxine dargestellt.

Zunächst wurde der Einfluss von Fumagillin gelöst in DMSO analysiert (Abbildung 18A). Nach Koinkubation und folgender Aktivierung der Plättchen mit Collagen bewegte sich die Erhöhung der Aggregation zwischen ca. 1 % bei 10 µg/ml und etwa 14 % bei 0,1 µg/ml. Nach Aktivierung mit ADP hingegen kam es neben einer Verringerung der Aggregation bei 10 µg/ml, 2 µg/ml und 0,1 µg/ml von ~ -0,5, -1,5 % und ~ - 4 % ebenfalls zu einer Erhöhung nach Koinkubation mit 5 µg/ml bzw. 1 µg/ml von 1,5 % bzw. ca. 5 %. Somit konnte sich kein eindeutiger Einfluss dieses Toxins auf die Aggregation humaner Thrombozyten feststellen lassen.

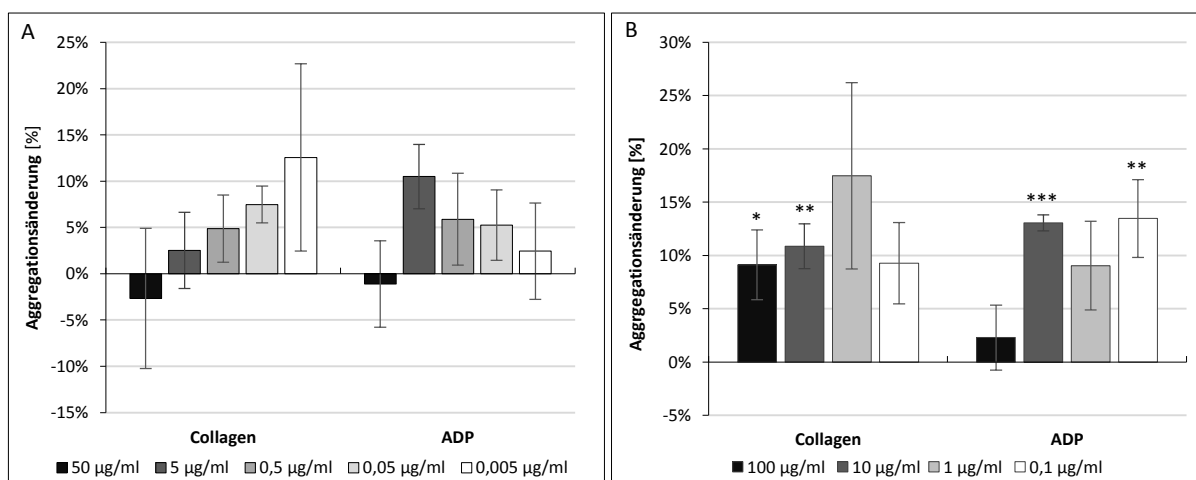


**Abbildung 18:** Änderung der Aggregation humaner Thrombozyten durch unterschiedliche Konzentrationen von Fumagillin (A) und Verrucologen (B). Verdünntes PRP wurde für je 5 min mit verschiedenen Konzentrationen von Fumagillin bzw. Verrucologen koinkubiert und anschließend die Aggregation durch Zugabe von Collagen oder ADP induziert. Die Auswertung erfolgte mittels der Routine. Angegeben ist der Mittelwert der Aggregationsänderung der Plättchen im Vergleich zur Vektorkontrolle  $\pm$  SEM. N = 4; \* p < 0,05.

Auch nach der Koinkubation von Plättchen mit Verrucologen gelöst in DMSO konnte mit Collagen als Induktor der Aggregation keine signifikante Änderung festgestellt werden (Abbildung 18B). Hier wurden die Plättchen mit Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0,01 µg/ml inkubiert. Bei der höchsten Konzentration von Verrucologen konnte eine leichte Verringerung der Aggregation von ca. -1 % beobachtet werden, während sich die Aggregation bei den niedrigeren Konzentrationen zwischen von 4 % bei 10 µg/ml und 13 % bei 1 µg/ml bewegten.

Im Gegensatz zu der Aktivierung mit Collagen ließ sich bei der Verwendung von ADP keine Verringerung der Aggregation feststellen. Hier wurde sie durch die Koinkubation mit Verruculogen um etwa 4 % bei 1 µg/ml von bis zu 17 % bei 0,01 µg/ml erhöht. Zudem ließ sich bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 0,01 µg/ml ein p-Wert von unter 0,05 berechnen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich diese Werte innerhalb der Fehlerbalken der nächst höheren Konzentration befanden.

Abbildung 19A stellt die Änderungen der Aggregation auf Grund von Citrinin gelöst in Ethanol dar. Bei einer Aktivierung der Plättchen durch Collagen konnte mit fallender Konzentration des Toxins eine erhöhte Änderung der Aggregation von ca. -3 % auf ca. 13 % festgestellt werden. Bei Aktivierung durch ADP hingegen wurde bei der höchsten Konzentration eine Änderung der Aggregation von ca. 2 % beobachtet werden, die dann bei der nächst geringeren Konzentration sprunghaft auf ca. 10 % anstieg und dann bis zu ca. 3 % bei 0,005 µg/ml abfiel. Auch hier konnte sich kein eindeutiger Einfluss dieses Toxins auf die Aggregation humaner Thrombozyten feststellen lassen. Zudem konnte auf Grund der großen Fehler keine Signifikanz bestimmt werden.



**Abbildung 19:** Änderung der Aggregation humaner Thrombozyten durch unterschiedliche Konzentrationen von Citrinin (A) und Deoxynivalenol (B). Verdünntes PRP wurde für je 5 min mit verschiedenen Konzentrationen von Citrinin bzw. Deoxynivalenol koinkubiert und anschließend die Aggregation durch Zugabe von Collagen oder ADP induziert. Die Auswertung erfolgte mittels der Routine. Angegeben ist der Mittelwert der Aggregationsänderung der Plättchen im Vergleich zur Vektorkontrolle  $\pm$  SEM, A: N = 3. B: N = 5; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Neben Citrinin wurde weiter Deoxynivalenol gelöst in Wasser (bidest) eingesetzt (Abbildung 19B). Wie hier dargestellt schwankte die Aggregationserhöhung bei Collagen als Agonist um 9-17 % mit 1 µg/ml mit der größten Erhöhung. Für die Konzentrationen 100 µg/ml und 10 µg/ml konnten hier zudem Signifikanzen mit Werten unter 0,05 bzw. unter 0,01

festgestellt werden. Bei einer Aktivierung mit ADP schwankten die Werte nach ca. 2 % bei 100 µg/ml zwischen 9 % und 13 % bei den niedrigeren Konzentrationen. Auch hier ließen sich Signifikanzen feststellen, für 10 µg/ml mit einem p-Wert unter 0,001 und für 0,1 µg/ml unter 0,01. Allerdings ist festzuhalten, dass sich die Fehlerbalken der signifikanten Werte sowohl nach Collagen- als auch nach ADP-Aktivierung jeweils mit dem Fehler bei 1 µg/ml überlappten.

Zusammenfassend konnte abgesehen von dem Dosis- und Geschlechter-spezifischen Effekt von Gliotoxin kein Einfluss der hier analysierten Toxine gefunden werden.

### **3.2. Analyse der sekundären Hämostase**

Neben der primären sollte auch die sekundäre Hämostase analysiert und so die Hypothese von Gillies & Tait der fibrinolytischen und plasminogenolytischen Aktivität von sezernierten Proteasen von *A. fumigatus* (siehe Kapitel 1.6) (Gillies & Tait, 2002) untersucht werden. Hierfür wurde PRP wie schon bei der Aggregometrie mit verschiedenen Morphologien, Kulturfiltraten und Mykotoxinen inkubiert und das anschließend durch Zentrifugation von den Plättchen abgetrennte Plasma auf die Koagulationsparameter Thrombinzeit (TPZ) mit dem International Normalized Ratio (INR), der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) und den Konzentrationen von Fibrinogen und D-Dimeren hin analysiert. Da hier die Exposition der Plättchen mit dem einzelnen Effektoren gleichzeitig erfolgte und nicht die Aktivität der Plättchen, sondern die Änderung der Gerinnungsfaktoren im Vordergrund stand, wurde die Inkubationszeit von 5 min auf 15 min erhöht. So konnte zudem ein Informationsverlust durch eine zu kurze Inkubationszeit vermieden werden.

### 3.2.1. Einfluss verschiedener Morphologien von *A. fumigatus* und ihrer Überstände

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Morphologien von *A. fumigatus* mit PRP für 15 min bei RT in einem Verhältnis von 1:17 inkubiert, die Plättchen abzentrifugiert und das Plasma analysiert. Tabelle 2 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Hier ist zu erkennen, dass sich die Werte für die Thromboplastinzeit, die partielle Thromboplastinzeit sowie die Konzentration von Fibrinogen und seiner D-Dimere für die unbehandelte Kontrolle sowie auch für die Proben mit Minimalmedium und den einzelnen Morphologien von *A. fumigatus* innerhalb des Referenzbereichs für eine normal funktionierende Koagulation bewegen. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden.

**Tabelle 2:** Einfluss der Morphologien von *A. fumigatus* ATCC46645 auf die Gerinnungsparameter (N = 4 - 5)

	TPZ [%]	INR	PTT [s]	Fibrinogen [g/l]	D-Dimere [mg/l]
<b>Referenzbereich</b>	<b>70 - 130</b>	<b>0,85 - 1,18</b>	<b>23 - 36</b>	<b>2,1 - 4</b>	<b>0 - 0,5</b>
negative Kontrolle	92,80	1,05	31,36	2,83	<0,2 – 0,22
MM	90,00	1,07	32,10	2,73	<0,2
Konidien	90,00	1,07	31,86	2,68	<0,2
Geschwollene Konidien	89,60	1,07	32,12	2,73	<0,2
Keimschläuche	91,40	1,06	32,06	2,70	<0,2
Hyphen	91,80	1,05	31,76	2,70	<0,2

MM: Minimalmedium; TPZ: Thromboplastinzeit; INR: International Normalized Ratio; PTT: partielle Thromboplastinzeit.

Weiter wurden verschiedene Kulturüberstände von Kulturen von *A. fumigatus* auf einen Einfluss auf die Koagulation hin untersucht (Tabelle 3). Hierfür wurden die Überstände von Keimschläuchen und Hyphen von *A. fumigatus* ATCC46645 (ATCC) gewonnen und sowohl nativ als auch als 10faches Konzentrat in einem Verhältnis von 1:10 für 15 min bei 37 °C mit PRP inkubiert. Wie in Tabelle 3 zu sehen, konnte für die nativen Überstände keine Änderung der Koagulationsparameter nachgewiesen werden. Bei den Konzentraten führte die Behandlung mit konzentrierten Überständen von Keimschläuchen und Hyphen zu einer Erhöhung der partiellen Thromboplastinzeit und des INR, die auch bei konzentriertem Minimalmedium zu finden war und somit nicht als relevant eingestuft werden konnte. Bei dem konzentrierten Keimschlauch-Überstand konnte eine leichte Verringerung der Thrombinzeit gemessen werden. Diese liegt allerdings nur 1 % unter dem Wert der entsprechenden Kontrolle und kann auch auf Grund des bereits beim Medium erhöhten INR vernachlässigt werden.

**Tabelle 3:** Einfluss von nativen und konzentrierten Überständen verschiedener Morphologien von *A. fumigatus* ATCC46645 auf die Gerinnungsparameter (N = 3).

	<b>TPZ</b> [%]	<b>INR</b>	<b>PTT</b> [s]	<b>Fibrinogen</b> [g/l]	<b>D-Dimere</b> [mg/l]
<b>Referenzbereich</b>	<b>70 - 130</b>	<b>0,85 - 1,18</b>	<b>23 - 36</b>	<b>2,1 - 4</b>	<b>0 - 0,5</b>
negative Kontrolle	100,67	0,99	28,57	2,40	0,40
1x MM	91,33	1,06	30,97	2,23	0,36
10x MM	70,67	<b>1,22</b>	<b>38,67</b>	2,13	0,34
ATCC 1x KS	92,67	1,05	30,93	2,20	0,37
ATCC 10x KS	<b>69,67</b>	<b>1,25</b>	<b>40,73</b>	2,10	0,38
ATCC 1x HY	95,33	1,03	29,70	2,17	0,38
ATCC 10x HY	84,00	1,11	<b>37,80</b>	2,10	0,43

MM: Minimalmedium; 1x: nativer Überstand; 10x: konzentrierter Überstand; KS: Keimschlauch; HY: Hyphen  
TPZ: Thromboplastinzeit; INR: International Normalized Ratio; PTT: partielle Thromboplastinzeit.

### 3.2.2. Einfluss von Filtraten mit proteolytischer Aktivität auf die sekundäre Hämostase

Um den Einfluss proteolytischer Aktivität auf die sekundäre Hämostase zu analysieren, wurde der Überstand von ATCC46645 aus MM sowie MM B/P für 15 min und 37 °C mit einer Verdünnung in PRP von 1:10 inkubiert. Durch die geringere Verdünnung sollte das Entgehen einer eventuellen Änderung der Parameter durch eine zu geringe Konzentration des Überstandes vermieden werden. Als Kontrollen dienten unbehandeltes PRP (negative Kontrolle) sowie PRP inkubiert mit MM und MM B/P. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis der Analyse. Wie auch für Morphologien und deren Überstände konnte für den Protease-Überstand keine Änderungen der untersuchten Koagulationsparameter beobachtet werden.

**Tabelle 4:** Einfluss von proteasehaltigen Überständen von *A. fumigatus* ATCC46645 auf die Koagulationsparameter (N = 3)

	<b>TPZ</b> [%]	<b>INR</b>	<b>PTT</b> [s]	<b>Fibrinogen</b> [g/l]	<b>D-Dimere</b> [mg/l]
<b>Referenzbereich</b>	<b>70 - 130</b>	<b>0,85 - 1,18</b>	<b>23 - 36</b>	<b>2,1 - 4</b>	<b>0 - 0,5</b>
negative Kontrolle	102,00	1,00	31,80	3,00	0,40
MM	92,67	1,07	34,20	3,80	0,38
MM B/P	95,00	1,05	33,70	2,73	0,35
ATCC MM	93,33	1,06	32,47	2,73	< 0,2 - 0,42
ATCC MM B/P	92,67	1,06	33,40	2,73	< 0,2 - 0,40

MM: Minimalmedium; MM B/P: Minimalmedium mit BSA und Pepton; TPZ: Thromboplastinzeit; INR: International Normalized Ratio; PTT: partielle Thromboplastinzeit.



### 3.2.3. Effekt von Mykotoxinen auf die sekundäre Hämostase

Neben den Morphologien und Überständen von *A. fumigatus* sollten auch hier der Effekt von Mykotoxinen auf die sekundäre Hämostase untersucht werden. Hierfür wurde die jeweils höchste Konzentration der Toxine aus der Aggregometrie verwendet und die Toxine für je 15 min bei 37 °C mit PRP inkubiert. Als Kontrollen fungierten eine unbehandelte Probe PRP sowie die verschiedenen Lösungsmittel der einzelnen Toxine.

Wie in Tabelle 5 zu sehen, konnte für keines der hier verwendeten Mykotoxine ein relevanter Einfluss auf die analysierten Koagulationsparameter festgestellt werden.

**Tabelle 5:** Einfluss von Mykotoxinen auf die Koagulationsparameter (N = 3)

		TPZ [%]	INR	PTT [s]	Fibrinogen [g/l]	D-Dimere [mg/l]
<b>Referenzbereich</b>		<b>70 - 130</b>	<b>0,85 - 1,18</b>	<b>23 - 36</b>	<b>2,1 - 4</b>	<b>0 - 0,5</b>
negative Kontrolle		102,67	1,00	30,40	2,73	<0,2 - 0,49
H <sub>2</sub> O	[1 %]	102,67	1,00	30,63	2,73	<0,2 - <b>0,53</b>
DMSO	[1 %]	102,67	1,00	31,40	2,60	<0,2 - 0,48
EtOH	[0,1 %]	100,67	1,01	30,80	2,73	<0,2 - 0,47
Citrinin	[5 µg/ml]	102,00	1,00	30,33	2,73	<0,2 - 0,49
Deoxynivalenol	[100 µg/ml]	101,67	1,00	30,33	2,73	<0,2 - 0,48
Fumagillin	[100 µg/ml]	102,33	1,00	31,87	2,60	<0,2 - 0,47
Verruculogen	[100 µg/ml]	101,33	1,01	31,87	2,37	<0,2 - 0,41
Gliotoxin	[300 ng/ml]	102,33	1,00	30,27	2,67	<0,2 - 0,49

EtOH: Ethanol; TPZ: Thromboplastinzeit; INR: International Normalized Ratio; PTT: partielle Thromboplastinzeit.

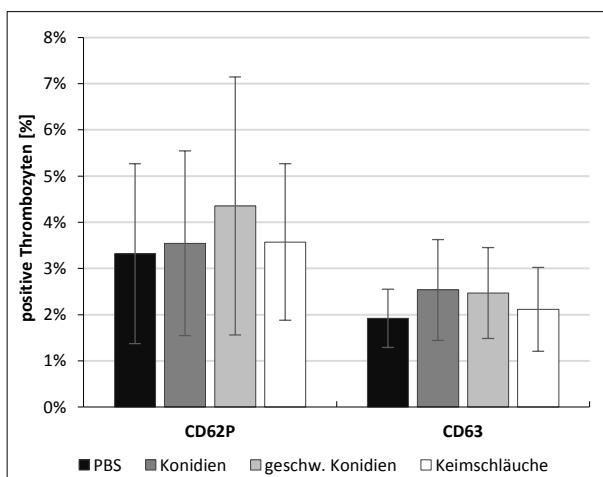
Abschließend ließ sich durch keine der eingesetzten Morphologien, Überstände oder Mykotoxine von *Aspergillus* eine Änderungen der hier untersuchten Koagulationsparameter der sekundären Hämostase beobachten.

### **3.3. Analyse der Thrombozytenaktivität**

Da *A. fumigatus* nicht nur einen Einfluss auf die Aggregation sondern auch auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten haben könnte, wurde diese mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden die Plättchen wie bei der Aggregometrie für 15 min mit dem jeweiligen Effektor inkubiert und entweder als ruhende oder als aktivierte Plättchen mit den Antikörpern gegen CD62P bzw. CD63 spezifisch für aktivierte Plättchen sowie gegen CD41 zur Identifizierung gefärbt, die Durchflusszytometrie durchgeführt und 5 000 CD41-positive Events auf das Vorhandensein von CD62P bzw. CD63 hin analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent positiver Thrombozyten für CD62P bzw. CD63. Um die Richtung der weiteren Forschung dieser Arbeit einzugrenzen, wurde die Analyse der Plättchenaktivierung nur für Morphologien, proteasehaltige Überstände sowie Gliotoxin durchgeführt.

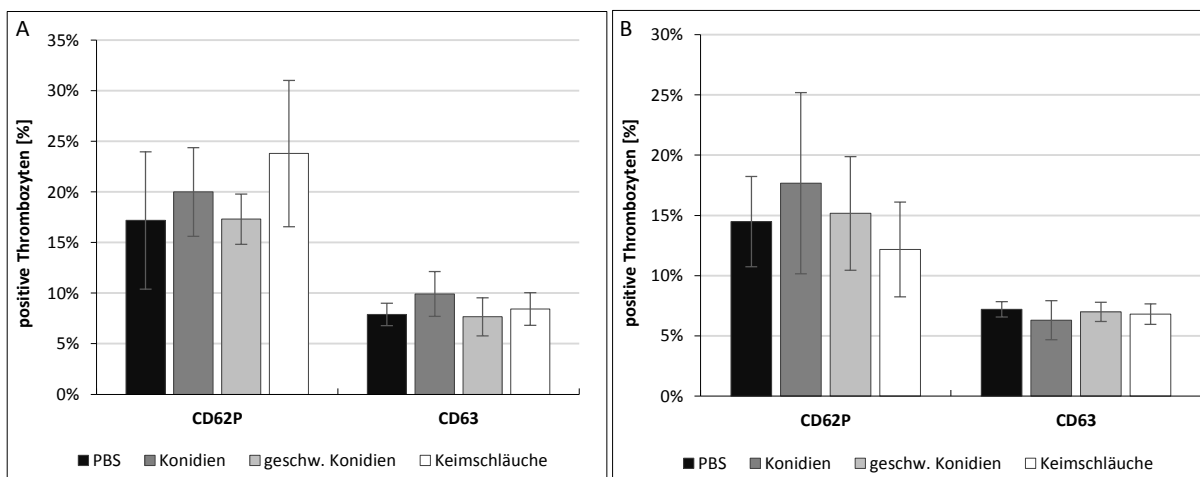
#### **3.3.1. Einfluss der Morphologien von *A. fumigatus* auf die Thrombozytenaktivierung**

In Abbildung 20 ist das Ergebnis von ruhenden Plättchen koinkubiert mit Konidien, geschwollenen Konidien und Keimschläuche von *A. fumigatus* dargestellt. Da die Morphologien von *A. fumigatus* dazu neigen in Medium zu verklumpen und somit das Durchflusszytometer hätten verstopfen können, wurden die Morphologien durch Zentrifugation vom Medium getrennt, in demselben Volumen PBS aufgenommen und für 8 s sonifiziert, um eine erneutes Verkleben der Zellen zu vermeiden. Die Intaktheit der Konidien und Keimschläuche wurde mikroskopisch verifiziert. Anschließend wurden die Morphologien in einer 1:17-Verdünnung mit PRP für 5min koinkubiert, mit den Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Auf Grund ihrer Größe wurde auf die Analyse von Hyphen verzichtet. Als Kontrollen dienten sowohl unbehandeltes PRP als auch PRP koinkubiert mit PBS, zur Berechnung des p-Wertes mittels Student's T-Test wurde PRP koinkubiert mit PBS herangezogen. Wie zu erkennen, bewegte sich die Anzahl positiver Thrombozyten für CD62P zwischen 2,5 % und 4,5 %, für CD63 zwischen ca. 2 % und ca. 3 %. Es konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden.



**Abbildung 20:** Einfluss verschiedener Morphologien von *A. fumigatus* auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit den Morphologien koinkubiert, anschließend als ruhende Plättchen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3.

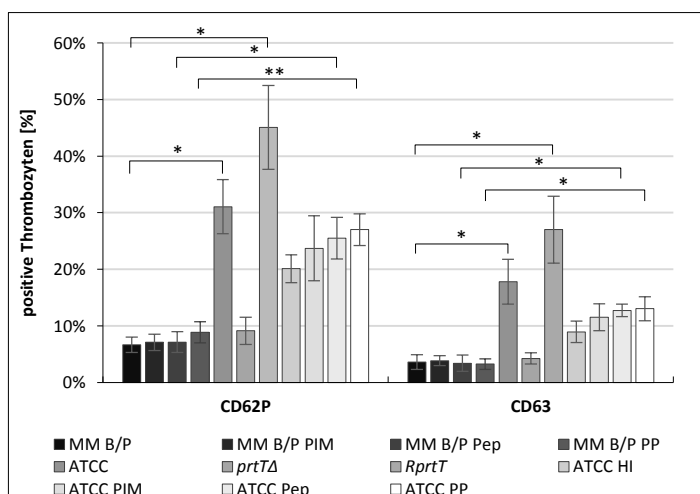
Das Ergebnis von aktivierten Plättchen ist in den Abbildungen Abbildung 21A und 21B dargestellt. Hier konnten für Collagen-aktivierte Plättchen im Durchschnitt 20 % CD62P-positive und 8 % CD63-positive Thrombozyten festgestellt werden. Bei der Aktivierung mit ADP wurden ~ 15 % CD62P-positive und ~ 6 % CD63-positive Thrombozyten gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl positiver Thrombozyten zwischen Kontrolle und Morphologie beobachtet werden.



**Abbildung 21:** Einfluss verschiedener Morphologien von *A. fumigatus* auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit den Morphologien koinkubiert, anschließend mit Collagen (A) bzw. mit ADP (B) aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3.

### 3.3.2. Einfluss von Überständen mit proteolytischer Aktivität auf die Plättchenaktivierung

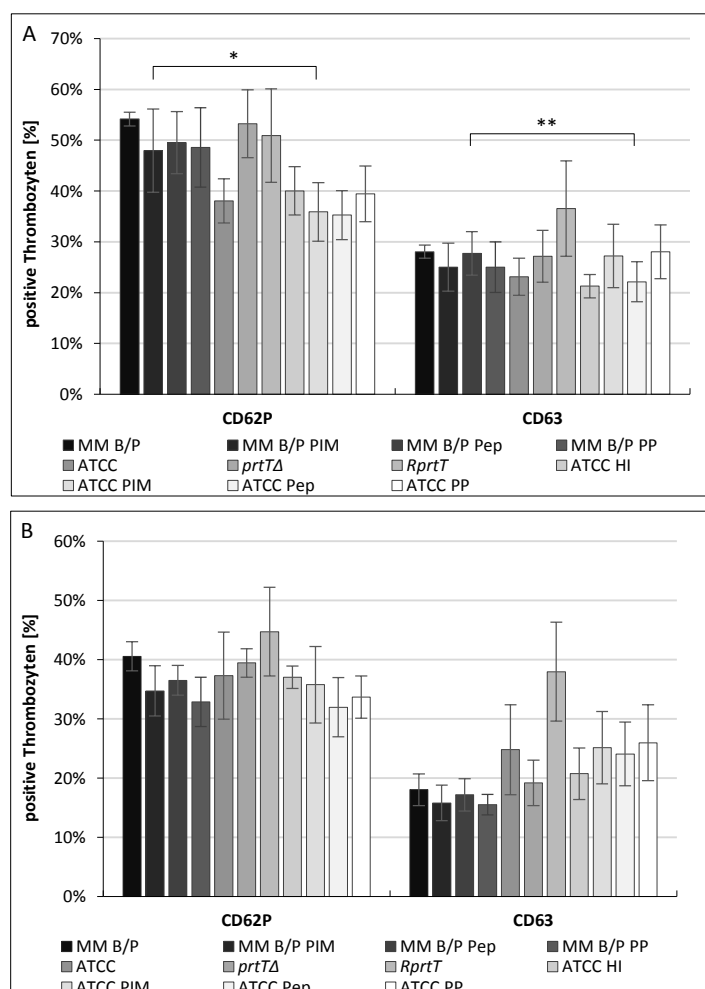
Im Gegensatz zu den Morphologien führte die Koinkubation von Plättchen mit proteasehaltigen Überständen von ATCC46645 und AfS62 kultiviert in Medium mit BSA und Pepton als alleinige C- und N-Quelle zu einer signifikanten Erhöhung von CD62P- bzw. CD63-positiver Plättchen (Abbildung 22), ein deutliches Zeichen von Plättchenaktivierung. Die Prozentzahl von CD62P-positiven Plättchen erhöhte sich im Mittel um das 5- bis 7-fache auf ca. 30 % bzw. 45 %, die von CD63-positiven Plättchen im Mittel um das 6- bis 9fache auf ca. 18 % bzw. 27 %. Diese Erhöhung konnte durch eine vorherige Hitze-Inaktivierung (HI) des Überstandes von ATCC46645 (ATCC) oder der Zugabe von Protease-Inhibitoren (PIM, Pep, PP) nicht vollständig aufgehoben werden. Die Koinkubation von Plättchen mit dem Überstand von AfS61 hingegen führte zu keiner Erhöhung der Prozentzahl der CD62P- oder CD63-positiven Thrombozyten.



**Abbildung 22:** Einfluss verschiedener proteasehaltiger Überstände von *A. fumigatus* auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit den Überständen bzw. Medium koinkubiert, die Thrombozyten anschließend als ruhende Plättchen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63- positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. MM B/P: Medium mit BSA und Pepton als C- und N-Quelle, PIM: Protease-Inhibitor-Mix; Pep: pepstatin A; PP: Mischung aus PIM und Pep; HI: Hitze-Inaktivierung.

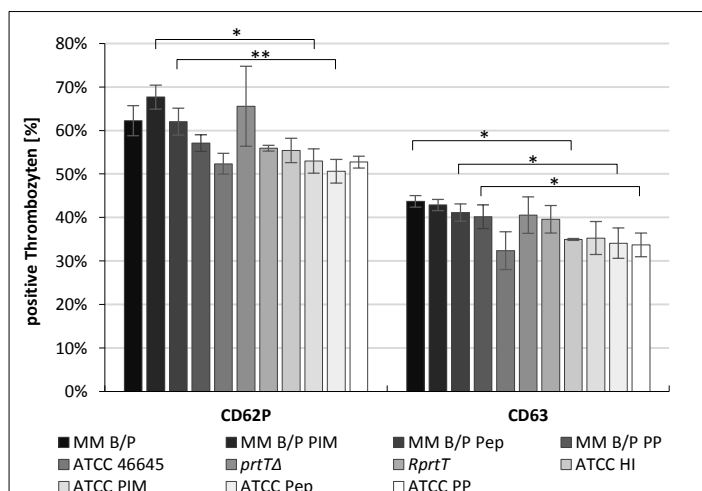
Die Aktivierung der Plättchen mittels Collagen (Abbildung 23A) nach der Koinkubation mit dem Überstand des Wildtyps ATCC46645 sowie dem Überstand des *prtT*-Deletionsstammes oder des rekonstituierten Stammes führten zu keiner weiteren signifikanten Erhöhung oder Verringerung der CD62P- oder CD63-positiven Thrombozyten. Allerdings konnte hier eine relativ niedrige Prozentzahl von CD62P-positiven Plättchen nach Koinkubation mit dem Wildtyp-Überstand verglichen mit der Kontrolle MM B/P beobachtet werden. Darüber hinaus konnte für den PIM-behandelten Überstand des Wildtyps eine signifikante Verringerung der CD62P-positiven Thrombozyten ermittelt werden. Dies konnte auch für den Pep-behandelten Wildtyp-Überstand bei CD63 nachgewiesen werden. Allerdings ist hier abermals zu beobachten, dass sich die Fehlerbalken der signifikanten Proben mit den jeweils benachbarten

Proben überlappen. Nach Aktivierung mit ADP (Abbildung 23B) konnte für keinen nativen oder behandelten Überstand eine signifikante Änderung beobachtet werden. Allerdings wiesen die Überstände bei CD63 ein Muster ähnlich dem bei ruhenden Plättchen auf.



**Abbildung 23:** Einfluss verschiedener proteasehaltiger Überstände von *A. fumigatus* auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit den Überständen bzw. Medium koinkubiert, die Thrombozyten anschließend mit Collagen (A) oder ADP (B) aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. MM B/P: Medium mit BSA und Pepton als C- und N-Quelle, PIM: Protease-Inhibitor-Mix; Pep: Pepstatin A; PP: Mischung aus PIM und Pep; HI: Hitze-Inaktivierung

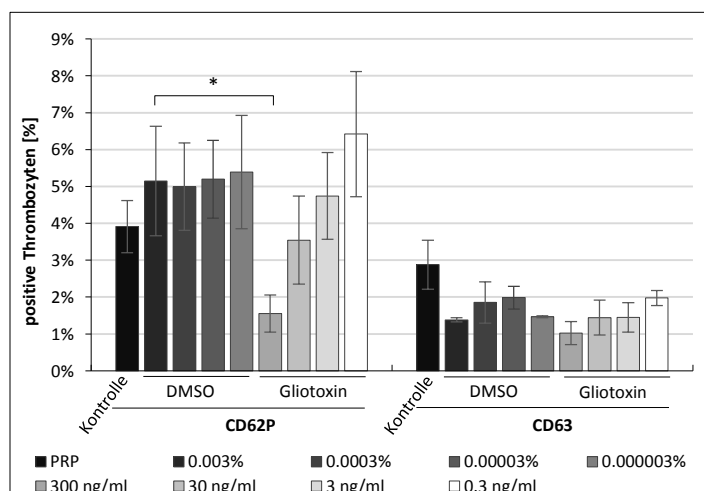
Neben Collagen und ADP wurde hier die Analyse von TRAP-6-aktivierten Thrombozyten hinzugezogen (Abbildung 24). TRAP-6 (Thrombin Receptor Activator Peptide 6, Peptid-Sequenz SFLLRN) führt zu einer Aktivierung von Thrombozyten über die Bindung an den Rezeptor PAR1 und dessen Aktivierung (Reséndiz *et al.*, 2007). Wie auch schon bei der Aktivierung mit Collagen oder ADP konnte hier für die unbehandelten Überstände des Wildtyps und seiner Derivate keine signifikante Änderung der CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten ermittelt werden. Allerdings führte die Koinkubation mit PIM- bzw. Pep-behandelten ATCC-Überständen zu einer signifikant-geringeren Prozentzahl CD62P-positiver Plättchen. Bei CD63 konnte dies für Hitze-inaktivierte und mit Pep- sowie PP-behandelte Wildtyp-Überstände gezeigt werden. Allerdings befinden sich die hier signifikanten Werte und ihre Fehlerbalken wieder innerhalb der Fehlerbalken der Werte der anderen behandelten Überstände.



**Abbildung 24:** Einfluss verschiedener proteasehaltiger Überstände von *A. fumigatus* auf die Aktivierung von humanen Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit den Überständen bzw. Medium koinkubiert, die Thrombozyten anschließend mit TRAP-6 aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. MM B/P: Medium mit BSA und Pepton als C- und N-Quelle, PIM: Protease-Inhibitor-Mix; Pep: Pepstatin A; PP: Mischung aus PIM und Pep; HI: Hitze-Inaktivierung

### 3.3.3. Einfluss von Gliotoxin auf die Thrombozytenaktivierung

Während die Koinkubation von humanen Thrombozyten mit proteasehaltigen nativen Überständen von *A. fumigatus* zu einer erhöhten Prozentzahl von Plättchen positiv für die Aktivierungs-spezifischer Markern führte, konnte nach Koinkubation mit Gliotoxin ein Dosis-spezifischer Rückgang für CD62P beobachtet werden (Abbildung 25). Hier wurde ein signifikanter Rückgang von ca. 3,5 % bei einer Gliotoxin-Konzentration von 300 ng/ml nachgewiesen werden. Die Prozentzahl CD62P-positiver Plättchen näherte sich mit sinkender Konzentration den Kontrollen (PRP mit entsprechender DMSO-Menge) an und erhöhte sich bei 0,3 ng/ml Gliotoxin sogar leicht. Bei CD63 konnte ein ähnlicher, wenn auch deutlich geringerer Effekt beobachtet werden.

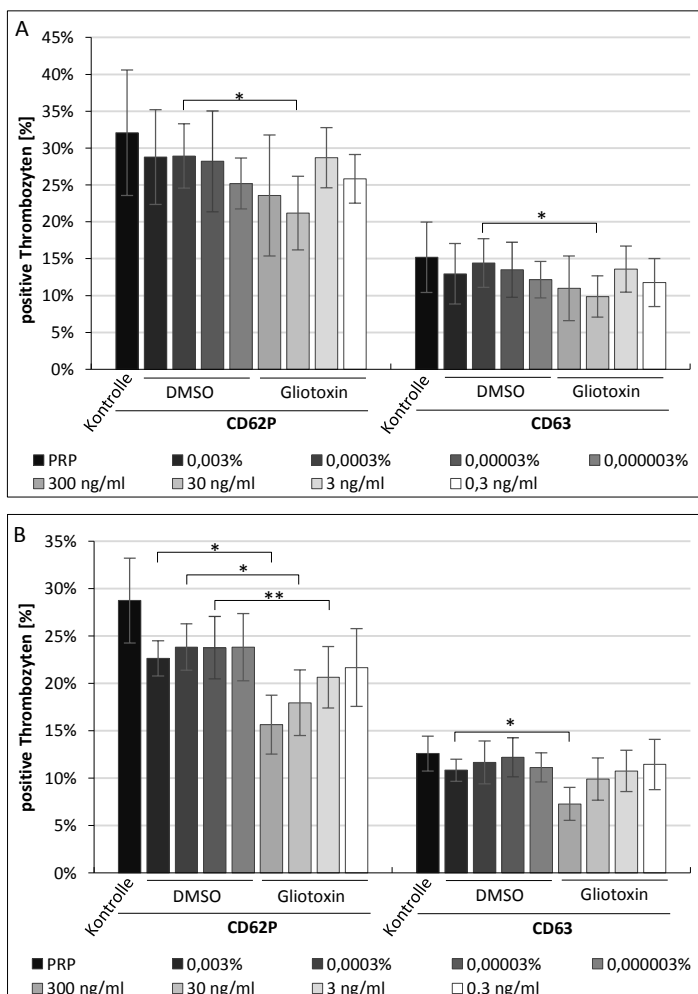


**Abbildung 25:** Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivierung humaner Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit verschiedenen Konzentrationen von Gliotoxin koinkubiert, anschließend die ruhenden Thrombozyten durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 4. \* p < 0,05.

Bei einer anschließenden Aktivierung der mit Gliotoxin koinkubierten Thrombozyten mit Collagen konnte dieser Dosis-abhängige Effekt nicht beobachtet werden. Hier fiel die Anzahl

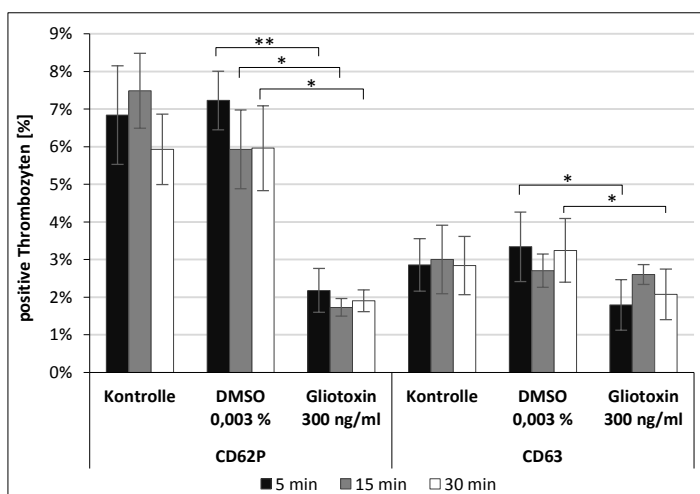
positiver Thrombozyten zunächst bis 30 ng/ml Gliotoxin leicht ab und stieg anschließend wieder an. Allerdings ist der Abfall bei 30 ng/ml von 8 % bei CD62P und ca. 4,5 % bei CD63 rechnerisch signifikant (Abbildung 26A).

Bei einer Aktivierung mit ADP wiederum konnte der bei ruhenden Plättchen beobachtete Effekt deutlich gezeigt werden (Abbildung 26B). Hier führte die Koinkubation der Plättchen mit Gliotoxin in den drei höchsten Konzentrationen zu einer signifikanten Verringerung der CD62P-positiven Plättchen verglichen mit den entsprechenden Kontrollen von PRP koinkubiert mit DMSO, die sich mit sinkender Konzentration den Werten der Kontrollen annäherten. Allerdings konnte hier im Gegensatz zu ruhenden Plättchen keine Steigerung der CD62P-positiven Plättchen über die Werte der Kontrollen hinaus beobachtet werden. Bei CD63 konnte ebenfalls dieser Effekt nachgewiesen werden. Doch wie auch schon bei ruhenden Plättchen war er hier weniger deutlich zu sehen. Dennoch konnte für die höchste Gliotoxin-Konzentration eine rechnerisch signifikante Reduktion der CD63-positiven Thrombozyten gezeigt werden.



**Abbildung 26:** Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivierung humaner Thrombozyten. PRP wurde für 5 min mit verschiedenen Konzentrationen von Gliotoxin koinkubiert, anschließend mit Collagen (A) oder ADP (B) aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

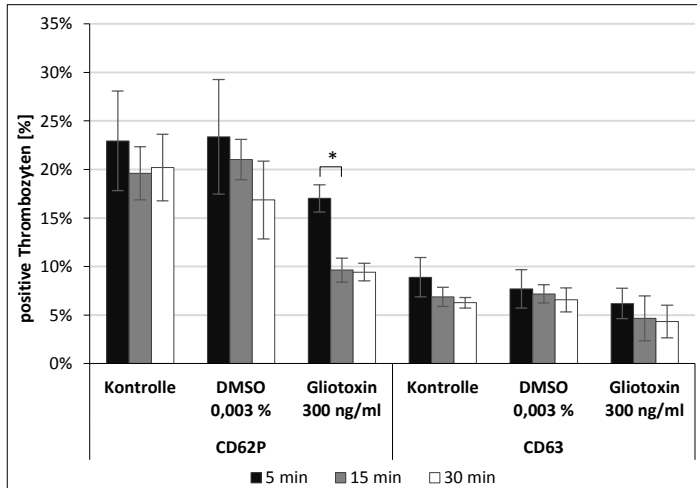
Neben der Koinkubation der Plättchen mit sinkender Gliotoxin-Konzentration wurde ein möglicher zeitabhängiger Einfluss des Toxins untersucht. Hierfür wurde PRP mit 300 ng/ml Gliotoxin bzw. 0,003 % DMSO für 5 min, 15 min und 30 min koinkubiert und anschließend als ruhende oder ADP-aktivierte Plättchen durchflusszytometrisch analysiert. Auf Grund der oben erhaltenen Daten sowie des Abbaus des Collagen-Rezeptors (Shedding) wurde hier auf Collagen als Agonist verzichtet. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, fiel die Anzahl positiver Thrombozyten durch Gliotoxin deutlich signifikant ab, fiel aber mit verlängerter Koinkubation nicht weiter.



**Abbildung 27:** Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivierung humaner Thrombozyten bei verlängerter Koinkubation. PRP wurde für 5 min, 15 min und 30 min mit Gliotoxin koinkubiert, anschließend als ruhende Plättchen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Im Gegensatz dazu konnte für nach der Koinkubation mit ADP-aktivierten Plättchen ein eine weitere Verringerung positiver Thrombozyten nach längerer Koinkubation gezeigt werden (Abbildung 28). Die Prozentzahl verringerte sich im Mittel von ca. 17 % nach 5-minütiger Koinkubation signifikant auf ca. 9,5 % mit 15 min Koinkubation. Eine längere Behandlung der Plättchen führte allerdings zu keiner weiteren Minderung von CD62P-positiven Thrombozyten. Für CD63 konnte dieser Einfluss von Gliotoxin nur in einem wesentlich geringeren Maß gezeigt werden.



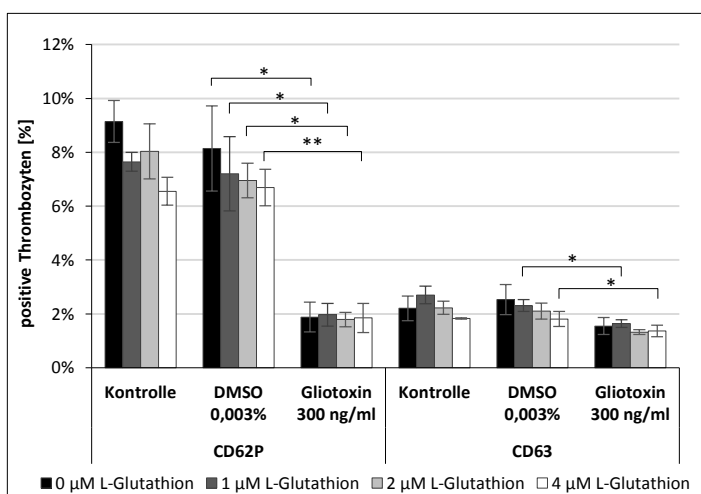


**Abbildung 28:** Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivierung humaner Thrombozyten bei verlängerter Koinkubation. PRP wurde für 5 min, 15 min und 30 min mit Gliotoxin koinkubiert, anschließend mit ADP aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3; \* p < 0,05.

Auf Grund der hier erhaltenen Ergebnisse wurden die weiteren Analysen mit einer Gliotoxin-Konzentration von 300 ng/ml und einer Koinkubationszeit von 15 min durchgeführt.

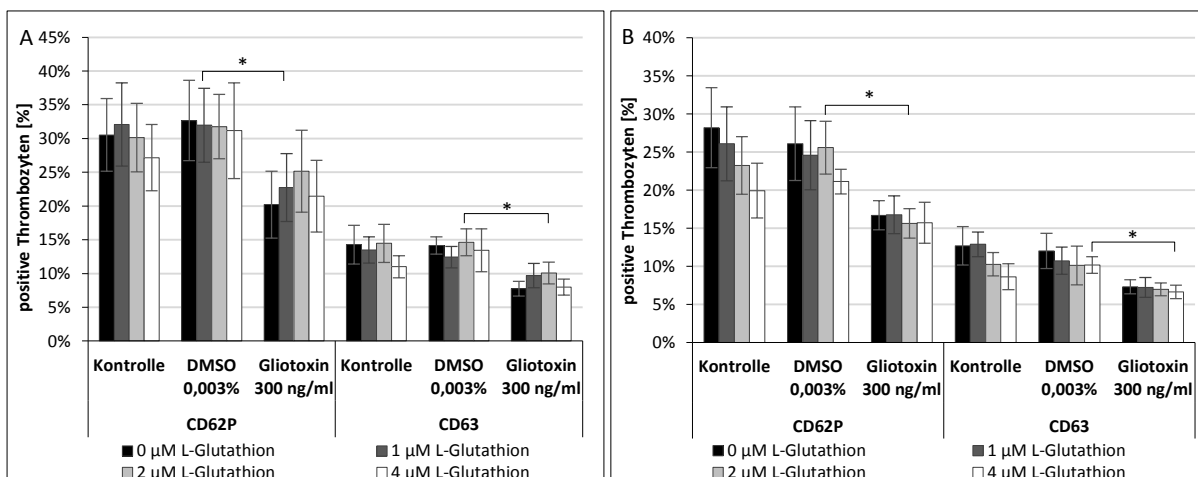
### 3.3.4. Inhibierung der Wirkung von Gliotoxin

Die in dieser Arbeit beobachtete antithrombotische Wirkung von Gliotoxin auf humane Plättchen könnte durch seine Disulfid-Brücken am Piperazinring bedingt sein. In diesem Fall sollte die Wirkung von Gliotoxin durch die Zugabe von L-Glutathion, welches gemischte Disulfide mit dem Toxin bildet, verringert werden können (Bertling *et al.*, 2010). Um dies zu verifizieren, wurde Gliotoxin und DMSO für 30 min mit steigenden Konzentrationen von L-Glutathion bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend mit PRP wie oben beschrieben koinkubiert. Die Analyse zeigte keine Änderung in der Aktivierung der Thrombozyten durch mit L-Glutathion behandeltem Gliotoxin im Vergleich zu nativem Gliotoxin (Abbildung 29). Es konnte nur die bereits beobachtete signifikante Abnahme der CD62-positiven Plättchen auf Grund der Behandlung mit nativem Gliotoxins nachgewiesen werden.



**Abbildung 29:** Inhibierung der Wirkung von Gliotoxin durch L-Glutathion. Gliotoxin wurde mit steigenden L-Glutathion-Konzentrationen für 30 min bei Raumtemperatur behandelt und anschließend für 15 min bei 37 °C mit PRP inkubiert. Die Plättchen wurden darauf folgend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Sowohl bei der Aktivierung des PRP mit Collagen (Abbildung 30A) als auch mit ADP (Abbildung 30B) konnte wie schon bei ruhenden Plättchen die inhibierende Wirkung von Gliotoxin gezeigt werden. Zudem konnte nach Aktivierung mit Collagen eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der CD62P-positiven Plättchen nach der Vorbehandlung des Toxins mit L-Glutathion bis zu 2 μM beobachtet werden, die allerdings bei 4 μM wieder zurück ging. Bei Aktivierung mit ADP konnte keine Änderung der CD62- und CD63-positiven Plättchen nach Koinkubation mit vorbehandeltem Toxin nachgewiesen werden.

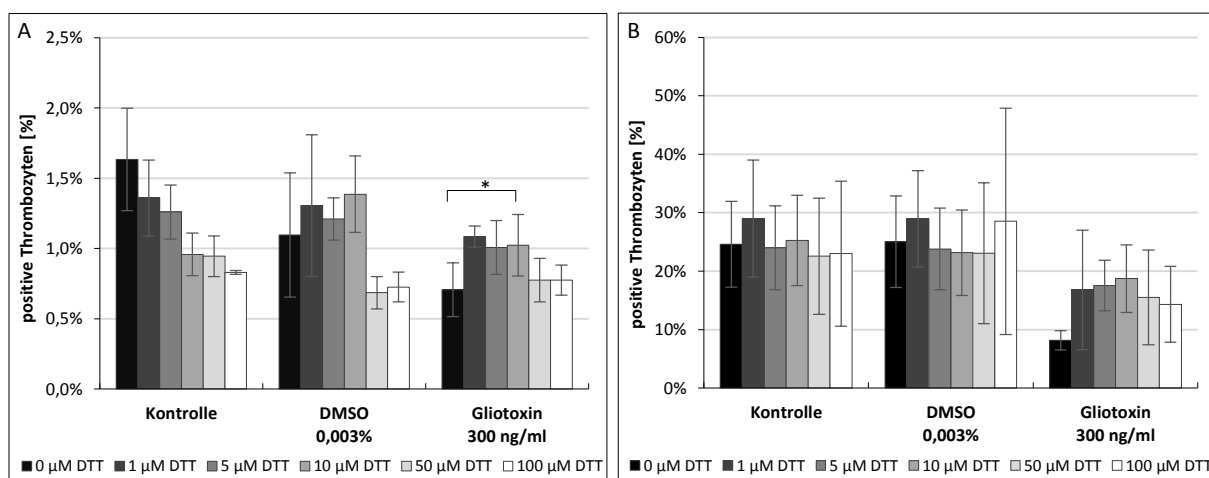


**Abbildung 30:** Inhibition von Gliotoxin durch L-Glutathion. Gliotoxin wurde mit steigenden L-Glutathion-Konzentrationen für 30 min bei Raumtemperatur behandelt und anschließend für 15 min bei 37 °C mit PRP inkubiert. Die Plättchen wurden darauf folgend mit Collagen (A) oder ADP (B) aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 3; \*  $p < 0,05$ .

Es konnte demnach keine signifikante Inhibition von Gliotoxin durch L-Glutathion gefunden werden. Um dennoch den Wirkmechanismus von Gliotoxin über die Disulfidbrücken zu bestätigen, wurde diese Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen von Dithiothreitol (DTT) wiederholt. Auch DTT bildet gemischte Disulfide mit Gliotoxin, wodurch es inhibiert wird (Kroll *et al.*, 1999). Die Analyse ruhender Plättchen zeigte von 1 µM bis 10 µM DTT im Vergleich zu purem Gliotoxin eine gleichbleibend erhöhte Anzahl CD62P-positiver Thrombozyten und damit eine Reduktion des antithrombotischen Effekts von Gliotoxin, die bei 10 µM eine Signifikanz aufwies. Allerdings verringerte sich die Anzahl positiver Thrombozyten bei 50 µM und 100 µM wieder (Abbildung 31A). Zudem ist zu erkennen, dass DTT-Konzentrationen ab 10 µM einen negativen Einfluss auf die Aktivität ruhender Plättchen haben. Bei der Aktivierung der Plättchen mit ADP konnte eine erhöhte Anzahl CD62P-positiver Thrombozyten im Vergleich zu nativem Gliotoxin beobachtet werden, die mit steigender DTT-Konzentration weiter erhöht wurde. Zudem konnte ein negativer Einfluss von DTT auf unbehandelte Plättchen ausgeschlossen werden (Abbildung 31B).

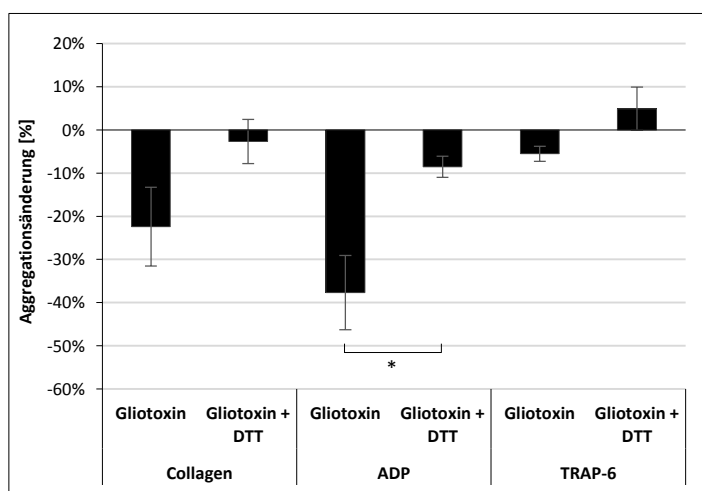
Obwohl für 10 µM DTT eine Signifikanz bei ruhenden Plättchen nachgewiesen werden konnte, so hatte diese Konzentration einen negativen Einfluss auf unbehandelte Thrombozyten, der zukünftige Ergebnisse verfälschen könnte. Dem gegenüber führte die Vorinkubation von Gliotoxin mit 5 µM DTT im Mittel zu einer annähernd gleichen Inhibition des Toxins, allerdings mit einem geringeren Einfluss auf ruhende Thrombozyten. Auf Grund dessen wurde

für die weiteren Analysen eine DTT-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  mit einer Vorinkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur gewählt.



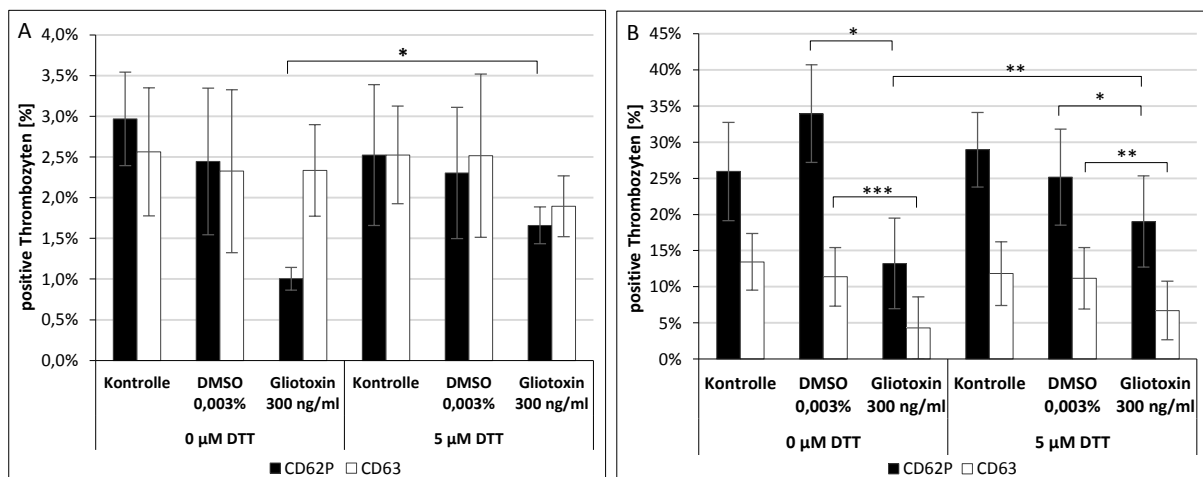
**Abbildung 31:** Inhibition von Gliotoxin durch Dithiothreitol (DTT). Gliotoxin wurde mit steigenden DTT-Konzentrationen für 30 min bei Raumtemperatur behandelt und anschließend für 15 min bei 37 °C mit PRP inkubiert. Die Plättchen wurden darauf folgend entweder als ruhende (A) oder als mit ADP-aktivierte Plättchen (B) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 2-3; \*  $p < 0,05$ ; PRP: negative Kontrolle.

Anschließend wurde der Einfluss von Gliotoxin mit und ohne DTT-Behandlung auf die Aggregation von Plättchen verglichen (Abbildung 32). Bei Collagen- und ADP-aktivierten Plättchen konnte der inhibierende Effekt von Gliotoxin teilweise durch die Vorinkubation mit DTT aufgehoben werden, bei ADP signifikant. Bei TRAP-6-aktivierten Thrombozyten konnte durch unbehandeltes Gliotoxin kaum eine Änderung beobachtet werden, entsprechend hatte die Behandlung des Toxins mit DTT kaum einen Effekt. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis auf eine direkte und Rezeptor-spezifische Interaktion von Gliotoxin mit humanen Thrombozyten.



**Abbildung 32:** Inhibition von Gliotoxin durch DTT bei der Aggregation von Plättchen. Gliotoxin wurde mit und ohne DTT vorinkubiert. Anschließend wurde PRP mit unbehandeltem und behandeltem Toxin bzw. DMSO während der Aggregometrie koinkubiert und mit Collagen, ADP oder TRAP-6 aktiviert. Die Auswertung erfolgte mittels der Routine. Angegeben ist der Mittelwert der Aggregationsänderung der Plättchen im Vergleich zur Vektorkontrolle  $\pm$  SEM, N = 4; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

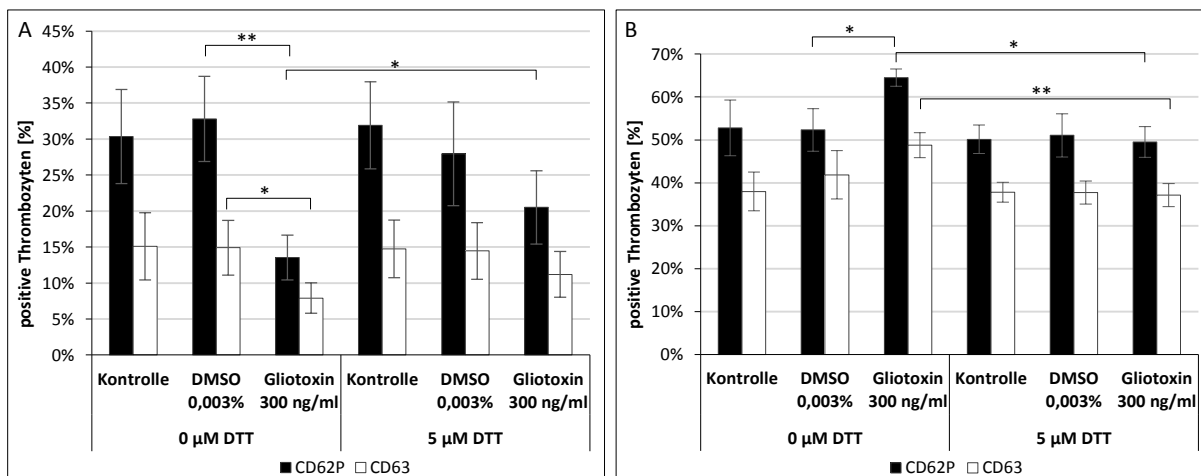
Zusätzlich zur Aggregation wurde die Aktivierung von Plättchen nach Koinkubation mit Gliotoxin mit und ohne DTT analysiert. Bei ruhenden Plättchen konnte eine signifikante Erhöhung der CD62P-positiven Plättchen von ca. 160 % durch die Vorbehandlung des Toxins mit DTT erreicht werden (Abbildung 33A). Bei der CD63-positiven Plättchen konnte keine Änderung beobachtet werden.



**Abbildung 33:** Inhibition von Gliotoxin durch DTT. Gliotoxin wurde mit und ohne DTT vorinkubiert und anschließend mit PRP für 15 min bei 37 °C koinkubiert. Die Plättchen wurden daraufhin ruhend (A) bzw. als Collagen-aktivierte Thrombozyten (B) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63- positive Thrombozyten ± SEM; N = 4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; PRP: negative Kontrolle.

Die Behandlung der Thrombozyten mit Gliotoxin führte zu einer Verminderung der durch Collagen induzierten Thrombozytenaktivierung. Dies konnte durch die Vorinkubation von Gliotoxin mit DTT teilweise revidiert und die Anzahl CD62P-positiver Plättchen deutlich gesteigert werden. Wenn auch der Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und Gliotoxin jeweils mit DTT weiterhin signifikant blieb, so näherten sich die beiden Werte doch einander an. Auch bei CD63 konnte die hoch-signifikant verringerte Anzahl CD63-positiver Plättchen bei unbehandeltem Toxin durch DTT vermindert werden (Abbildung 33B).

Bei der Aktivierung der mit Gliotoxin behandelten Plättchen mit ADP konnte ein ähnliches Ergebnis beobachtet werden. Auch hier wurde die Anzahl CD62P-positiver Thrombozyten nach der Vorinkubation des Toxins mit DTT signifikant erhöht. Zudem konnte die zuvor gefundene deutliche CD62P- und CD63-Verringerung mittels DTT zum großen Teil aufgehoben werden (Abbildung 34A).

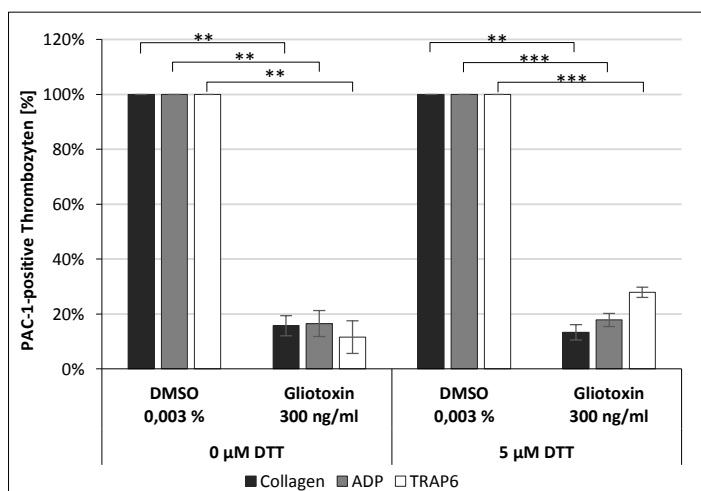


**Abbildung 34:** Inhibierung von Gliotoxin durch DTT. Gliotoxin wurde mit und ohne DTT vorinkubiert und anschließend mit PRP für 15 min bei 37 °C koinkubiert. Die Plättchen wurden daraufhin mit ADP (A) bzw. TRAP-6 (B) aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind CD62P- bzw. CD63-positive Thrombozyten  $\pm$  SEM; N = 4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; PRP: negative Kontrolle.

Als weiterer Agonist wurde hier, wie auch schon bei den proteasehaltigen Überständen, TRAP-6 verwendet. Im Gegensatz zu der Aktivierung mit Collagen oder ADP konnte hier ein leicht-positiver Einfluss von unbehandeltem Gliotoxin auf die Plättchen beobachtet werden (Abbildung 34B). Sowohl CD62P als auch CD63 zeigten eine gesteigerte Prozentzahl an positiven Thrombozyten, bei CD62P sogar signifikant. Dies konnte durch die Koinkubation des Toxins mit DTT wieder vollständig aufgehoben werden. Bei CD62P war diese Reduktion wieder signifikant, bei CD63 sogar deutlich signifikant. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese einer möglichen Rezeptor-spezifischen Inhibierung durch Gliotoxin über seine Disulfid-Brücken, möglicherweise über die ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>.

### 3.3.5. Einfluss von Gliotoxin auf die Bindung von PAC-1 an Thrombozyten

Zur weiteren Analyse der Plättcheninhibierung durch Gliotoxin als auch zur Analyse einer Rezeptor-spezifischen Interaktion, wurde die Bindung des FITC-gekoppelten Antikörpers PAC-1 an koinkubierte und aktivierte Plättchen untersucht. PAC-1 bindet an oder in der Nähe des aktivierten Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Seine Bindung an Gliotoxin-behandelte Plättchen verglichen mit DMSO-behandelten Plättchen kann Aufschluss über eine verminderte Aktivität geben. Da zudem in den bisherigen Ergebnissen ein nur geringer Einfluss von Gliotoxin auf den Rezeptor PAR1 gefunden wurde, sollte bei diesem Aktivator auch die Bindung von PAC-1 nicht vermindert sein, wenn Gliotoxin nicht mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  interagiert. Wie in Abbildung 35 zu sehen, wurde die Bindung von PAC-1 durch die Koinkubation des PRP mit Gliotoxin signifikant um über 80 % bei allen drei Aktivatoren verringert. Diese verringerte Bindung war durch Vorinkubation des Toxins mit DTT nur geringfügig reversibel. Einzig bei der Aktivierung durch TRAP-6 konnte eine leichte Erhöhung der PAC-1-Bindung nach DTT-Behandlung des Toxins beobachtet werden. Demnach kann die Bindung von Gliotoxin an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die Bindung von PAC-1 unabhängig von den hier verwendeten Agonisten inhibieren.



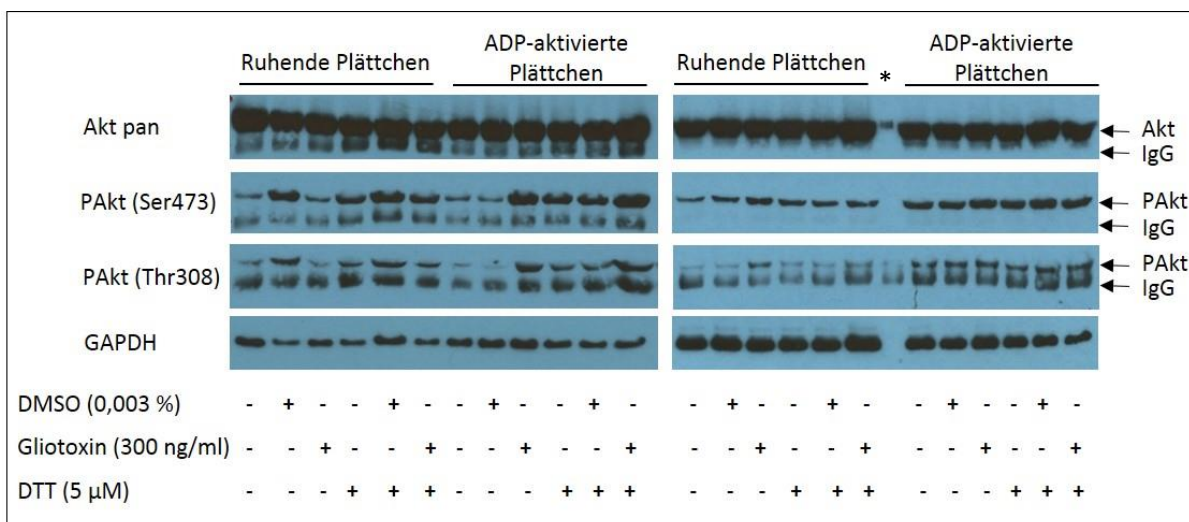
**Abbildung 35:** Analyse der PAC-1-Bindung an mit Gliotoxin behandelte Plättchen. PRP wurde für 15 min bei 37 °C mit Gliotoxin mit und ohne DTT-Behandlung koinkubiert, anschließend aktiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die relative Bindung von PAC-1 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle (100 %-Bindung). N = 3; Mittelwert ± SEM; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

### 3.3.6. Analyse der möglichen Bindung von Gliotoxin an den ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub>

Um eine mögliche direkte Interaktion von Gliotoxin mit dem ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> nachzuweisen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt.

Die Aktivierung von P2Y<sub>12</sub> führt über den PI3K-Signalweg zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase Akt an den Aminosäuren Thr308 und Ser473 (Kim *et al.*, 2009; Michelson, 2012). Diese Phosphorylierungen können mittels Westernblot nachgewiesen werden. Hierfür wurden PRP mit Gliotoxin mit und ohne DTT-Vorinkubation analog zur Durchflusszytometrie koinkubiert und gegebenenfalls mit ADP aktiviert. Um eine eventuelle Voraktivierung der Plättchen auszuschließen bzw. die Aktivierung mit ADP zu bestätigen, wurden Aliquots der unbehandelten ruhenden und ADP-aktivierten Plättchen im Durchflusszytometer überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach der anschließenden Proteinisolierung wurde ein Westernblot mit den Antikörpern gegen unphosphoryliertes Akt (Akt pan) sowie gegen phosphoryliertes Akt [PAkt (Thr308), PAkt (Ser437)] durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde unbehandeltes ruhendes, als Positivkontrolle unbehandeltes ADP-aktiviertes PRP verwendet. Der Antikörper gegen GAPDH diente als Ladekontrolle. In Abbildung 36 sind repräsentativ die Ergebnisse von zwei der vier durchgeführten Replikate dargestellt. In beiden Replikaten konnten für den Antikörper Akt pan deutliche Signale gezeigt werden. Bei den Antikörpern PAkt (Ser374) und PAkt (Thr308) konnte im Allgemeinen eine nur leichte Phosphorylierung gezeigt werden, was auf einen geringen Anteil des phosphorylierten Proteins am Gesamtprotein zurückzuführen ist. Im linken Blot wurde zudem bei PAkt (Ser473) bei ruhenden Plättchen koinkubiert mit DMSO ohne DTT sowie bei den Proben mit DTT eine verstärkte Bindung des Antikörpers gezeigt, während bei dem zweiten Replikat rechts bei PAkt (Ser473) nur für die Probe ruhender Plättchen mit Gliotoxin eine verstärkte Bindung nachzuweisen war. Bei ADP-aktivierten Plättchen konnte bei dem linken Blot für diesen Antikörper bei der Positivkontrolle sowie der Probe mit DMSO allein nur eine geringe Phosphorylierung beobachtet werden, während sie bei den weiteren Proben deutlicher zu sehen war. Bei dem rechten Blot konnte bei den aktivierten Plättchen und dem Antikörper PAkt (Ser473) eine relativ gleichmäßige Bindung beobachtet werden. Das gleiche Bild konnte für den Antikörper PAkt (Thr308) gezeigt werden. Die nach dem Strippen der Membranen durchgeführte Hybridisierung mit dem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass die unterschiedlichen Grade der Antikörperbindung gegen phosphoryliertes Akt nicht durch unterschiedlich aufgetragene Proteinmengen hervorgerufen wurden. Auf Grund dessen wurden die hier erhaltenen Ergebnisse als inkonsistent eingestuft.



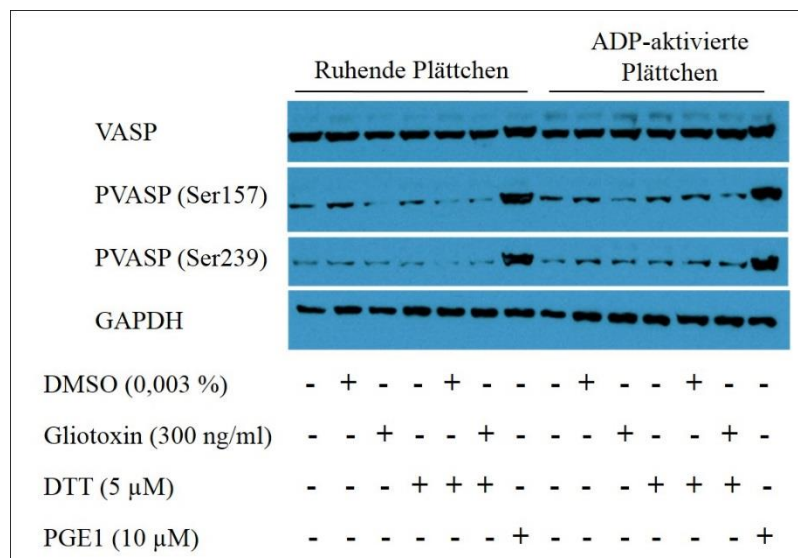


**Abbildung 36: Analyse der Akt-Phosphorylierung in zwei unabhängigen Replikaten.** PRP wurde mit Gliotoxin mit und ohne DTT-Vorbehandlung inkubiert, die Proteine extrahiert und über eine 12 %-SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nylonmembran geblotet und diese mit Anti-Akt- sowie Anti-PAkt-Antikörpern hybridisiert. Der Antikörper gegen GAPDH diente als Ladekontrolle. Daten repräsentativ für N = 4. \*: Proteine übergelaufen aus der Kammer links daneben. Diese Banden sind nicht relevant für das Ergebnis.

Als weiteren Nachweis für eine Gliotoxin-Interaktion mit P2Y<sub>12</sub> wurde eine Westernblot-Analyse der Phosphorylierung des Vasolidator-stimulierten Phosphoproteins (VASP), ein Aktin-regulatorisches Protein (Aleil *et al.*, 2005), durchgeführt. In ruhenden Plättchen liegt VASP unphosphoryliert vor. Die Phosphorylierung von VASP wird durch einen erhöhten cAMP-Level induziert, was bei gesunden Menschen durch die ADP-Bindung an P2Y<sub>12</sub> verhindert wird. Aus diesem Grund kann eine Phosphorylierung von VASP (PVASP) mit einer P2Y<sub>12</sub>-Inhibierung in Verbindung gebracht werden und seine Analyse Einblicke in die Aktivität dieses Rezeptors gewähren (Aleil *et al.*, 2005; Michelson, 2012). Für diese Analyse wurden die Plättchen mit DMSO und Gliotoxin mit und ohne DTT inkubiert. Anschließend wurden wieder die entsprechenden Aliquots im Durchflusszytometer analysiert, bevor die Proteinisolierung und Westernblot-Analyse mit den Antikörpern gegen unphosphoryliertes VASP (VASP) sowie gegen phosphoryliertes VASP [PVASP (Ser157) und PVASP (Ser239)] durchgeführt wurde. Neben den unbehandelten ruhenden und ADP-aktivierten Plättchen als Negativkontrolle, wurden als Positivkontrolle Plättchen mit PGE 1 (Prostaglandin Enhancer 1), einem Aktivator der cAMP-Kaskade, inkubiert. In Abbildung 37 ist ein repräsentatives Ergebnis der drei Replikate dargestellt. Für den Antikörper VASP konnte für alle Proben ein deutliches Signal gezeigt werden. Bei den beiden Antikörpern PVASP (Ser157) und PVASP (Ser239) konnten für die Proben ohne PGE 1 eine gleichmäßig niedrige, den Negativkontrollen entsprechende Bindung gezeigt werden, die Positivkontrollen hingegen wiesen ein deutlich-verstärktes Signal

auf. Die nach dem Strippen durchgeführte Ladekontrolle mit GAPDH zeigte eine gleichmäßige Proteinmenge der einzelnen Proben.

Bei dieser Analyse konnte keine Phosphorylierung von VASP auf Grund von Gliotoxin nachgewiesen werden.



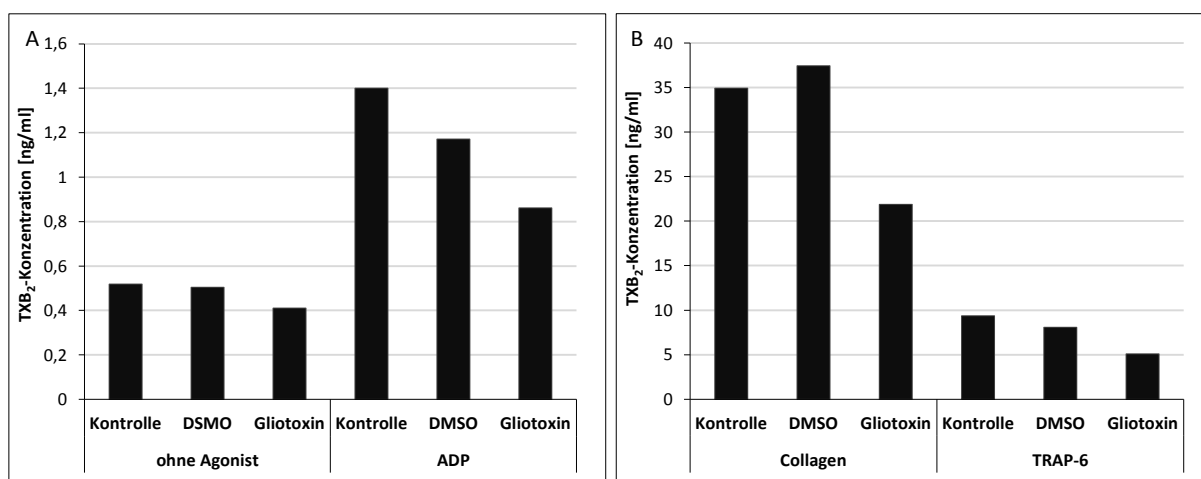
**Abbildung 37: Analyse der VASP-Phosphorylierung.** PRP wurde mit Gliotoxin mit und ohne DTT-Vorbehandlung inkubiert, die Proteine extrahiert und über eine 12 %-SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nylonmembran geblotet und diese mit Anti-VASP- sowie Anti-PVASP-Antikörpern hybridisiert. Der Antikörper gegen GAPDH diente als Ladekontrolle. Daten repräsentativ für N = 3.

### 3.3.7. Einfluss von Gliotoxin auf die Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese in Thrombozyten

Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ist ein kurzlebiges Prostaglandin-Derivat, welches über die Aktivität der Cyclooxygenase COX-1 und der Thromboxan-Synthase TXS aus Arachidonsäure hergestellt und im Verlauf der Plättchenaktivierung freigesetzt wird. Nach einer Halbwertszeit von nur etwa 30 s zerfällt es im Plasma in das stabilere Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) sowie in weiterer inaktive Metabolite (Michelson, 2012; Nakahata, 2008). Dieses TXB<sub>2</sub> kann mit Hilfe eines Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA) im Plasma nachgewiesen werden. Es dient somit als Maß für die TXA<sub>2</sub>-Synthese und gewährt so einen Einblick in den COX-Signalweg und das Maß der Aktivierung der Plättchen.

Dieser ELISA wurde zur weiteren Analyse der Wirkung von Gliotoxin auf die Plättchenaktivierung durchgeführt. Hierfür wurden die Plättchen zunächst mit Toxin bzw. DMSO ohne DTT koinkubiert und das isolierte Plasma eingesetzt. Abbildung 38A zeigt das Ergebnis des ELISA bei ruhenden und ADP-aktivierten Plättchen, Abbildung 38B das Ergebnis bei Collagen- bzw. TRAP-6-aktivierten Plättchen. Wie zu sehen konnte für ruhende Plättchen

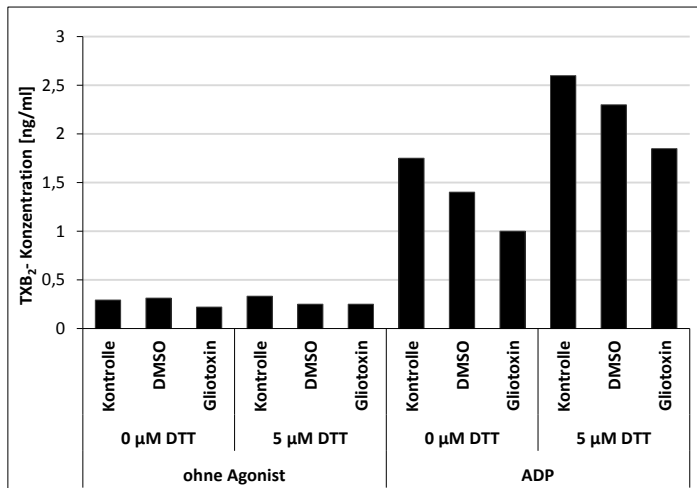
eine geringe Menge an TXB<sub>2</sub> nachgewiesen werden, die durch die Koinkubation der Plättchen mit Gliotoxin abnahm. Die Konzentration an TXB<sub>2</sub> nahm durch Aktivierung mit ADP um etwa das Dreifache auf 1,4 ng/ml bei der unbehandelten Kontrolle zu, verringerte sich allerdings durch die Koinkubation der Plättchen mit DMSO und fiel durch die Koinkubation mit Gliotoxin weiter ab auf ~ 0,8 ng/ml. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von TXB<sub>2</sub> im Plasma durch die Zugabe von DMSO und anschließender Collagen-Aktivierung von 35 ng/ml auf etwa 37 ng/ml und fiel erst durch die Koinkubation mit Gliotoxin auf ~ 21 ng/ml ab. Die Aktivierung der Plättchen mit TRAP-6 führte bei der unbehandelten Kontrolle zu einer TXB<sub>2</sub>-Konzentration von ca. 9 ng/ml, die durch Gliotoxin um etwa die Hälfte auf 5 ng/ml fiel. Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Ergebnisse aus Aggregometrie und Durchflusszytometrie von einer Inhibierung der Plättchenaktivität durch Gliotoxin.



**Abbildung 38:** Analyse der TXB<sub>2</sub>-Konzentration in Plasma nach der Koinkubation von PRP mit Gliotoxin. PRP wurde für 15 min bei 37 °C mit DMSO (0,003 %) bzw. Gliotoxin (300 ng/ml) koinkubiert und als ruhende und ADP-aktivierte (A) sowie als Collagen- und TRAP6-aktivierte (B) Plättchen weiterverwendet. Das Plasma wurde isoliert und mit Hilfe eines ELISA analysiert. PRP: unbehandelte Kontrolle. N = 1.

Um auch hier eine Beteiligung der Disulfid-Brücken am Piperazinring von Gliotoxin nachzuweisen, wurden wie bisher DMSO und Gliotoxin mit und ohne DTT vorbehandelt, anschließend das PRP hiermit koinkubiert, das Plasma von ruhenden und ADP-aktivierten Plättchen isoliert und analysiert (Abbildung 39). Hier konnte bei ruhenden Plättchen wieder eine geringe Menge an TXB<sub>2</sub> im Plasma bei der unbehandelten Kontrolle ohne DTT nachgewiesen werden, die sich durch die Koinkubation des PRP mit Gliotoxin leicht verringerte. Dies konnte allerdings durch die Vorbehandlung des Toxins mit DTT nicht verhindert werden. Bei ADP-aktivierten Plättchen konnte bei den Proben ohne DTT ein ähnliches Bild wie auch schon in Abbildung 38A beobachtet werden. Allerdings führte hier die

Koinkubation der Plättchen mit DTT zu einer Erhöhung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Plasma, sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Proben mit DMSO und Gliotoxin. Zudem blieb das Verhältnis zwischen der Probe mit DMSO und der Probe mit Gliotoxin nach DTT-Behandlung entsprechend der Proben ohne DTT bestehen, eine Erhöhung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration und damit eine Inhibierung der Gliotoxin-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 39:** Analyse der TXB<sub>2</sub>-Konzentration in Plasma nach der Koinkubation von PRP mit Gliotoxin. DMSO (0,003 %) und Gliotoxin (300 ng/ml) wurden mit und ohne DTT vorbehandelt und anschließend mit PRP inkubiert. Das Plasma von ruhenden und ADP-aktivierten Plättchen wurde isoliert und analysiert. PRP: Kontrolle. N = 1.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der pathophysiologischen Änderung der Hämostase durch *A. fumigatus* im humanen Wirt, die zu einer besseren Erkennung und Behandlung von Aspergillosen beitragen soll. Hierfür wurde zum einen die sekundäre Hämostase mittels der Analyse von Koagulationsparametern, zum anderen die primäre Hämostase durch die Analyse der Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten nach der Inkubation der Plättchen mit Morphologien, Überständen und Mykotoxinen von *A. fumigatus* untersucht.

### 4.1. Hyphen von *A. fumigatus* sowie ihr Kultur-Überstand führen zu einer verstärkten Aggregation von humanen Thrombozyten

In den letzten Jahren wurde die Rolle von Thrombozyten als Zellen des Immunsystems verstärkt untersucht. Hierbei wurde auch eine mögliche Aktivierung von Plättchen durch Konidien oder Hyphen von *A. fumigatus* analysiert. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde die Fähigkeit von Konidien zur spezifischen und saturierenden Bindung der D-Domäne von Fibrinogen an Konidien dieses Pilzes sowie die Aktivierung von Plättchen durch Konidien und Hyphen gezeigt (Annaix *et al.*, 1992; Bouchara *et al.*, 1997; Christin *et al.*, 1998; Perkhofer *et al.*, 2008; Rambach *et al.*, 2015; Rødland *et al.*, 2010; Speth *et al.*, 2013b). Die Aktivierung von Plättchen durch Konidien wurde hierbei auf das in der Zellwand befindliche Melanin zurückgeführt. Zudem wurde gezeigt, dass die Hydrophobin-Schicht auf den Konidien möglicherweise weitere Strukturen, die zu einer Plättchenaktivierung führen könnten, maskiert (Rambach *et al.*, 2015), wie dies bereits für die Interaktion von Konidien mit DCs und alveolaren Makrophagen gezeigt wurde (Aimanianda *et al.*, 2009). Auch bei den Hyphen konnte eine stimulierende Wirkung von Zellwandbestandteilen wie Galactosaminogalactan nachgewiesen werden (Rambach *et al.*, 2015; Speth *et al.*, 2013b). Rødland *et al.* konnte zudem zeigen, dass die Aktivierung von Plättchen durch Hyphen in etwa der durch die Aktivierung des Thrombinrezeptors entspricht (Rødland *et al.*, 2010).

Diese Ergebnisse konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Weder die Ergebnisse der Aggregometrie noch der Durchflusszytometrie gaben Hinweise auf eine Aktivierung der humanen Thrombozyten durch Konidien, geschwollene Konidien oder Keimschläuche. Auch die Ergebnisse der Analyse der sekundären Hämostase zeigten keinen Einfluss dieser Morphologien. Eine signifikante Bindung von Fibrinogen an Konidien hätte zu einem Abfall der Fibrinogen-Konzentration im Plasma ohne gleichzeitigen Anstieg der Konzentration der Abbauprodukte des Fibrinogens, den D-Dimeren, geführt. Dieser wurde in

der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Allerdings konnte im Zuge der Aggregometrie eine signifikante Steigerung der Plättchenaggregation durch Hyphen unter Verwendung von Collagen als Agonist beobachtet werden (Abbildung 9A). Bei dieser konnte aber keine Aggregation der Plättchen durch Hyphen ohne Stimulus gezeigt werden. Die beobachtete Signifikanz bei dem Agonisten ADP scheint bedingt durch die geringen Standardfehler des Mittels, aber durch die Überlappung mit den Werten anderer Morphologien biologisch weniger von Bedeutung zu sein.

Ähnliches wurde auch bei der Verwendung von nativen und ankonzentrierten Überständen von Keimschläuchen und Hyphen beobachtet (Abbildung 9B). Bei der Aggregometrie führten der native und ankonzentrierte Überstand von Keimschläuche sowie der native Überstand von Hyphen zu keiner signifikanten Steigerung der Aggregation bei Verwendung von Collagen. Erst bei dem 10fachen Hyphen-Überstand konnte ein solches Verhalten der Plättchen beobachtet werden, auch hier ohne Anzeichen einer Voraktivierung der Plättchen während der Koinkubation. Hier konnten wie bei den Morphologien unter Verwendung von ADP Signifikanzen bei nativem Keimschlauch- und konzentriertem Hyphen-Überstand beobachtet werden, die allerdings wieder biologisch weniger von Bedeutung waren. Zudem zeigten sich bei der Analyse der sekundären Hämostase keine Änderungen der untersuchten Parameter.

Die Ergebnisse des Einflusses von Morphologien und deren Überständen auf humane Thrombozyten decken sich. Möglicherweise führt ein Bestandteil der Zellwand der Hyphen, der während des Wachstums in das Medium abgegeben wird und bei Konidien noch durch die Schicht hydrophober Rodlets verdeckt wird, zu der gesteigerten Aggregation der Plättchen nach deren Aktivierung – bei den Hyphen durch den direkten Kontakt mit den Plättchen, bei dem Überstand durch die erhöhte Konzentration des Bestandteils auf Grund der Ankonzentrierung. Eine Beteiligung von  $\beta$ -Galactosaminogalactan (GAG), auf das im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird, kann hier nicht ausgeschlossen werden, was allerdings durch weitere Analysen des Überstandes bestätigt werden muss.

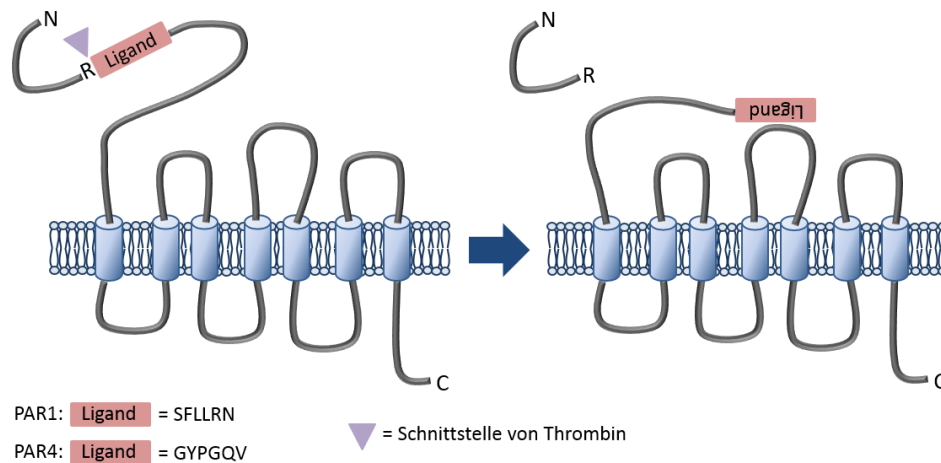
Ein Grund für die der Literatur teilweise entgegengesetzten Ergebnisse könnte die kürzere Koinkubation der Morphologien mit den Plättchen sein. In der oben zitierten Literatur wurden die Plättchen von 30 min bis hin zu 120 min mit *A. fumigatus* inkubiert, während in dieser Arbeit 5 min bzw. 15 min inkubiert wurde. Allerdings war auf Grund der Durchführbarkeit, speziell bei der Verwendung des Aggregometers, eine längere Koinkubationszeit nicht möglich.

#### 4.2. Proteolytisch aktiver Überstand von *A. fumigatus* aktiviert humane Thrombozyten

Neben dem oben beschriebenen Überständen von verschiedenen Morphologien, wurde Überstand mit sezernierten proteolytischen Enzymen von *A. fumigatus* eingesetzt. Von *Aspergillus* ist bekannt, dass sezernierte Proteasen fibrinolytische Aktivität aufweisen (Gillies & Tait, 2002). In einer Studie von 1985 wurden von Koagulopathien im Zusammenhang mit IA bei Patienten mit Nierentransplantation berichtet. Die aus diesen Patienten isolierten *Aspergillus*-Stämme sezernierten proteolytische Enzyme mit caseinolytischer und fibrinogenolytischer Aktivität (McClellan *et al.*, 1985).

Entgegen dieser Veröffentlichungen konnten in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse der verschiedenen Parameter der sekundären Hämostase keine Änderungen in der Konzentration von Fibrinogen oder den D-Dimeren durch den proteasehaltigen Überstand beobachtet werden. Im Aggregationsassay hingegen führten der Überstand von *A. fumigatus* ATCC44645 und dem für *prtT* rekonstituierten Stamm AfS62 aus Medium mit BSA und Pepton zu einem shape change während der 5-min-Koinkubation, wohingegen der Überstand des *prtT*-Deletionsstammes AfS61 zu keiner Änderung führte (Abbildung 12 und Abbildung 14). Dies wurde durch die durchflusszytometrische Analyse der Plättchenaktivität bestätigt: während die Überstände des Wildtyps und von AfS62 zu einer Erhöhung der CD62P- und CD63-positiven Thrombozyten führte, zeigte der Überstand von AfS61 keinen Einfluss auf die Aktivität ruhender Plättchen (Abbildung 22). Dieser Effekt konnte durch die Hitzeinaktivierung des Überstandes des Wildtyps sowie durch die Behandlung des Überstandes mit Protease-Inhibitoren teilweise aufgehoben werden (Abbildung 13, Abbildung 15 und Abbildung 22). Dies sind deutliche Hinweise für eine Beteiligung von PrtT-abhängigen sezernierten hydrolytischen Enzymen mit proteolytischer Aktivität bei der Aktivierung von Plättchen durch *A. fumigatus*. PrtT als Transkriptionsfaktor reguliert die Expression verschiedener Proteine, unter ihnen die Serinendoprotease Alp, die Metalloendoprotease Mep, das Aspergillopepsin Pep, die Dipetidylpeptidase Dpp4, die beiden für eine Serincarboxypeptidase codierenden Gene AFUA\_6G00310 und AFUA\_2G17330 sowie das für eine Serinprotease codierende Gen AFUA\_7G06220 (Bergmann *et al.*, 2009; Sharon *et al.*, 2009). Möglicherweise führt die Aktivität einer oder mehrerer von PrtT regulierten Proteasen zur Aktivierung der Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR1 und/oder PAR4. *In vivo* werden diese Rezeptoren durch die Serinprotease Thrombin aktiviert (Abbildung 40) (Michelson, 2012). Ein ähnlicher wie in Abbildung 40 beschriebener Mechanismus wäre auch durch die Aktivität von Proteasen von *A. fumigatus* möglich, was zu der hier beobachteten Aktivierung der Plättchen führen würde. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse von Speth *et al.* (2013). In dieser Studie wurde

eine sowohl Zeit- als auch Dosis-abhängige Aktivierung von Thrombozyten durch Überstände von *A. fumigatus* aus 2 Tage-alten Kulturen nachgewiesen. Durch die Verwendung verschiedener Protease-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine oder mehrere Serinproteasen bei der Aktivierung der Plättchen durch den Überstand beteiligt sind (Speth *et al.*, 2013b). Als eine von PrtT regulierte Protease könnte Alp eine dieser Serinproteasen sein.



**Abbildung 40:** Aktivierung der Rezeptoren PAR1 bzw. PAR4 durch Thrombin. Thrombin bindet an die N-terminale Exodomäne des Rezeptors und durchschneidet die Peptidbindung zwischen Arginin und Serin (PAR1) bzw. Glycin (PAR4), wodurch ein neuer N-Terminus freigelegt wird, der als Ligand an den eigenen Rezeptor bindet und so den Signalweg zur Plättchenaktivierung in Gang setzt (modifiziert nach Coughlin, 2000 und Michelson, 2012).

Wie oben bereits beschrieben konnte die Inaktivierung durch Hitze und die Zugabe von Protease-inhibitoren gegen Serin- und Cystein-Proteasen (Protease-Inhibitor-Mix, PIM) sowie saure Proteasen wie Pepsin (Pepstatin A, Pep) die Aktivierung der Thrombozyten durch den Protease-Überstand des Wildtyps nur teilweise aufheben. Diese Restaktivität könnte durch Zellwandbestandteile verursacht werden, die durch die hohen Temperaturen nicht denaturiert wurden. Ein möglicher Kandidat ist das sekretierte GAG. Dieses Polysaccharid wurde bereits 1976 in *A. niger* beschrieben (Bardalaye & Nordin, 1976) und später auch in *A. fumigatus* identifiziert und analysiert (Fontaine *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2011). Es vermittelt die Bindung von *A. fumigatus* an Plastik, Fibronectin, und Epithelzellen. Zudem wurde es als ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) bei Biofilmen von *A. fumigatus* beschrieben und spielt eine Rolle bei der Immunantwort des Wirtes auf diesen Pilz: GAG unterdrückt die Entzündungsreaktion *in vitro* und *in vivo* teilweise durch die Maskierung von  $\beta$ -Glucan vor Dectin-1, induziert die Apoptose bei Neutrophilen und vermittelt eine Resistenz gegenüber Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Zudem wurde gezeigt, dass GAG für die volle Virulenz von *A. fumigatus* essentiell ist (Fontaine *et al.*, 2014; Gravelat *et al.*, 2013; Lee



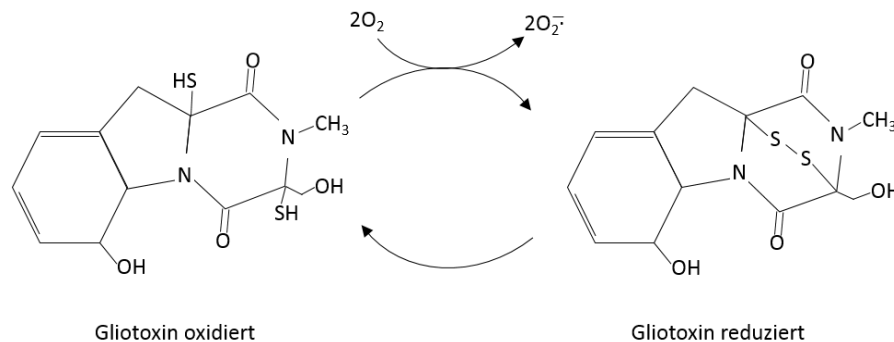
*et al.*, 2015; Loussert *et al.*, 2010). Darüber hinaus untersuchten Rambach *et al.* die Aktivierung von Thrombozyten durch Zellwandbestandteile von *A. fumigatus* und konnten eine Aktivierung von Plättchen durch das aus der Zellwand aufgereinigte GAG (Urea-lösliche SGG-Fraktion) nachweisen (Rambach *et al.*, 2015), was die oben aufgestellte Hypothese unterstützt.

Eine Aktivierung von Thrombozyten führt nicht nur zur Bildung von Thrombosen im Patienten. Thrombozyten als Teil des Immunsystems interagieren durch die Freisetzung der Granula-Inhalte, von Mikropartikeln sowie über Oberflächenproteine mit Leukozyten und Endothelzellen: die während der Aktivierung der Thrombozyten freigesetzten Chemokine und Zytokine ziehen Leukozyten an und aktivieren diese. P-Selektin (CD62P) auf der Plättchenoberfläche vermittelt die Bindung von Plättchen an Neutrophile, wodurch die Degranulation induziert wird. Über die Bindung von CD40L an CD40 auf B-Zellen triggern Plättchen die B-Zell-Proliferation und Differenzierung. Weiter vermitteln aktivierte Plättchen zum Teil auch durch Wachstumsfaktoren (Platelet derived Growth Factor, PDGF) die Anziehung und Aktivierung von Monozyten, deren Bindung an Endothelzellen und Differenzierung zu Makrophagen oder DCs. Zudem wird die transendotheliale Migration von Leukozyten an die Stelle der Entzündung erleichtert. Die von den Plättchen freigesetzten Mikropartikeln, die dieselben Oberflächenproteine wie aktivierte Plättchen tragen, aktivieren zusätzlich Leukozyten und Endothelzellen (Jenne C. N. *et al.*, 2013; Speth *et al.*, 2013a). Diese und weitere Interaktionen mit Zellen des Immunsystems ausgelöst durch die Aktivierung von Plättchen durch Proteasen und Zellwandbestandteile von *A. fumigatus* könnten zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und somit zu der bei Patienten mit IA beobachteten Thrombosen und Gewebeerstörung führen.

### 4.3. Gliotoxin inhibiert die Aktivität humaner Thrombozyten

Zusätzlich zu der Wirkung von Proteasen auf humane Thrombozyten wurde der Einfluss von Mykotoxinen von *Aspergillus* auf diese analysiert. Die Ergebnisse der Aggregationsassays sowie die Untersuchung der verschiedenen Gerinnungsparameter durch das Zentrallabor zeigten weder für Fumagillin, Verruculogen, Deoxynivalenol oder Citrinin einen Effekt auf die primäre oder sekundäre Hämostase. Auch für Gliotoxin konnte kein Einfluss auf die sekundäre Hämostase festgestellt werden. Allerdings konnte im Zuge des Aggregationsassays ein deutlicher Dosis-abhängiger und Geschlechter-spezifischer Einfluss dieses Toxins auf die Aggregation der Thrombozyten beobachtet werden (Abbildung 16B). Nach der Stimulation der Plättchen mit Collagen oder ADP stoppte die Aggregation nach der ersten Welle und die Plättchen disaggregierten wieder (Abbildung 17). Die Inhibierung der Aktivität der Thrombozyten durch Gliotoxin konnte durchflusszytometrisch bestätigt und zusätzlich ein Zeit-abhängiger inhibierender Effekt des Toxins auf die Thrombozyten festgestellt werden (Abbildung 25 bis Abbildung 28). Im Vergleich der Agonisten wurde zudem ein stärkerer inhibierender Effekt von Gliotoxin auf ruhende und ADP-aktivierte als auf Collagen-aktivierte Thrombozyten beobachtet, sowohl bei der Aggregation als auch der Analyse der Aktivierungsmarker. Bei der Aktivierung durch den hinzugezogenen Agonisten TRAP-6 konnte nur eine geringe Inhibierung der Plättchenaggregation durch Gliotoxin beobachtet werden, die Prozentzahl CD62P- und CD63-positiver Thrombozyten stieg sogar an. Diese Ergebnisse liefern Hinweise für eine Rezeptor-spezifische, Dosis- und Zeit-abhängige Interaktion von Gliotoxin mit humanen Thrombozyten an dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  sowie an den ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> über die Disulfid-Brücken an seinem Piperazinring. Die im Aggregationsassay beobachtete inhibierte Aggregation kann auf eine Inhibierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch Gliotoxin zurückgeführt werden. Zu der Ausbildung einer stabilen Interaktion der Thrombozyten untereinander und damit zur Ausbildung eines stabilen Aggregats ist die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nötig, die von freien Thiol-Gruppen sowie von dem Austausch von Disulfiden abhängig ist (Lahav *et al.*, 2002; Michelson, 2012). Ist diese Bindung gestört, können die Plättchen nicht stabil miteinander aggregieren. Gliotoxin kann mit den Thiolgruppen am Cystein des Integrins gemischte Disulfid-Brücken eingehen, und somit zu einer Hemmung der Aktivierung des Integrins und damit zu einer Inhibierung des Outside-In-Signales und der Fibrinogen-Bindung im Zuge der Plättchenaktivierung führen. Zudem postulierten Bertling *et al.* eine direkte Blockierung der Interaktion vom Fibrinogen mit dem Integrin auf Grund der ROS freigesetzt durch den Redox-Zyklus der Thiolgruppen am Piperazinring von Gliotoxin (Abbildung 41) (Bertling *et al.*, 2010). Fibrinogen ist anfällig für

die Oxidation der Cysteinreste durch angeregte Sauerstoffmoleküle, die auch die Aggregation von Thrombozyten in PRP inaktivieren (Stief *et al.*, 2000).

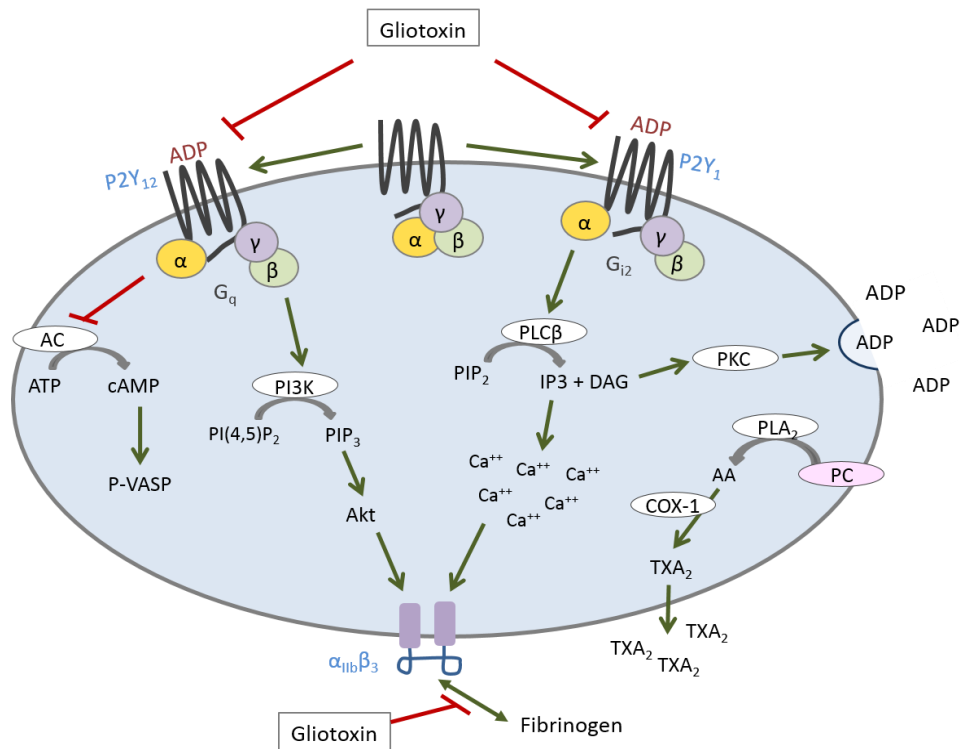


**Abbildung 41:** Darstellung des Redox-Zyklus von Gliotoxin zwischen seiner oxidierten und reduzierten Form (modifiziert nach Gardiner *et al.*, 2005).

Der stärkere Effekt von Gliotoxin auf ADP- im Vergleich zu Collagen-aktivierte Thrombozyten lässt den Schluss einer Interaktion des Toxins mit den ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> zu. Diese Rezeptoren besitzen beide Cystein-Reste mit einer Thiol-Gruppe, an die Gliotoxin binden kann. Zudem ist eine volle Aktivierung von Thrombozyten mittels Collagen zum Teil von der Bindung des freigesetzten ADPs an seine Rezeptoren während der ersten Welle der Aggregation sowie von der Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  abhängig. Eine Inhibierung der ADP-Rezeptoren zusammen mit einer verminderten Fibrinogen-Bindung an die mit Gliotoxin inkubierten Thrombozyten ist eine Erklärung für die verminderte Aggregation und die verminderte Anzahl CD62P- und CD63-positiver Thrombozyten. Dies kann auch den wesentlich geringeren Einfluss von Gliotoxin auf TRAP-6-aktivierte Plättchen aufklären. Thrombin ist ein wirkungsvoller Agonist der Rezeptoren PAR1 und PAR4. PAR1 besitzt eine hohe Affinität für Thrombin und induziert einen starken aber kurzen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und ist somit an der ersten Phase der Aggregation beteiligt. PAR4 hat eine geringere Affinität für Thrombin, induziert aber einen längeren Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und ist somit wesentlich für die zweite Phase der Aggregation und die stabile Ausbildung der Plättchen-Aggregation. PAR4 benötigt keine weitere Aktivierung durch P2Y<sub>12</sub> für eine vollständige Aktivierung der Thrombozyten (Michelson, 2012).

Die Behandlung von Gliotoxin mit Dithiothreitol (DTT), das mit Gliotoxin gemischte Disulfid-Brückenbindungen an dessen Piperazinring ausbildet und das Toxin so inaktiviert (Gardiner *et al.*, 2005), führte zu einem Rückgang der Plättcheninhibierung für Collagen und ADP sowohl bei der Analyse im Durchflusszytometer als auch im Aggregationsassay. Auch

die Effekte bei TRAP-6 konnten in beiden Fällen durch DTT revidiert werden, was die Beteiligung der Thiol-Gruppen von Gliotoxin bestätigt (Abbildung 32 bis Abbildung 34). Die Geschlechter-spezifische Reaktion der Thrombozyten auf Gliotoxin, die im Aggregationsassay beobachtet wurde, kann mit dem normalen physiologischen Unterschied in der Blutgerinnung zwischen den Geschlechtern bedingt durch Sexualhormone sowie dem Zyklus der Frau erklärt werden (Bailey *et al.*, 2009).



**Abbildung 42:** Schematische Darstellung der möglichen Interaktion von Gliotoxin mit humanen Thrombozyten. Gliotoxin bindet über seine Disulfid-Brücken am Piperazinring an die Cysteinreste der Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> und inhibiert diese, wodurch die Bindung von ADP an diese Rezeptoren inhibiert und somit die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten verringert wird. Zusätzlich verringert die Bindung von Gliotoxin an das Integrin α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> die Bindung an Fibrinogen und damit die Interaktion der Thrombozyten untereinander und die Ausbildung eines stabilen Aggregats (modifiziert nach Michelson, 2012).

Abbildung 42 zeigt eine mögliche Interaktion von Gliotoxin mit humanen Thrombozyten. Hiernach führt eine Inhibierung von P2Y<sub>12</sub> durch Gliotoxin zu einer verringerten Phosphorylierung der Kinase Akt auf Grund der fehlenden Aktivität der Kinase PI3K sowie zu einem Anstieg des cAMP-Niveaus und damit zu einer Phosphorylierung von VASP. Die Westernblot-Analyse von Akt erbrachte nur inkonsistente Ergebnisse und mittels Westernblot-Analyse von VASP konnte keine Phosphorylierung dieses Proteins durch Gliotoxin nachgewiesen werden. Eine Inhibierung der Plättchenaktivität durch eine Phosphorylierung von VASP kann somit ausgeschlossen werden (Abbildung 37). Da sich die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>

und P2Y<sub>12</sub> strukturell unterscheiden (Michelson 2012), kann eine Interaktion von Gliotoxin mit P2Y<sub>1</sub> an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Bindung von Gliotoxin an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde durch die Analyse der PAC-1-Bindung durchflusszytometrisch untersucht und ein deutlich verringertes PAC-1-Signal für alle drei verwendeten Agonisten beobachtet, das durch die Koinkubation von Gliotoxin mit DTT teilweise reversibel war (Abbildung 35). Die hier beobachtete verringerte PAC-1-Bindung könnte auf einer Inhibierung durch Gliotoxin zurückzuführen sein. Da das PAC-1-Signal durch DTT nur geringfügig erhöht wurde, ist aber auch eine einfache Besetzung des Epitops für PAC-1 an oder um das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch Gliotoxin denkbar.

Die Freisetzung von TXA<sub>2</sub> und damit das Maß der Aktivierung der Plättchen wurde mittels ELISA von TXB<sub>2</sub> untersucht und auch hier ein Gliotoxin-bedingter Rückgang der TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Plasma beobachtet. Die Vorinkubation von Gliotoxin mit DTT führte bei ruhenden und ADP-aktivierten Thrombozyten zwar zu einer generell höheren TXB<sub>2</sub>-Konzentration, allerdings nicht zu einer Änderung des Verhältnisses von TXB<sub>2</sub> bei DMSO- zu Gliotoxin-Koinkubation (Abbildung 38 und Abbildung 39). Dieses vorläufige Ergebnis zeigt wieder eine Verringerung der Aktivität der Thrombozyten durch Gliotoxin, allerdings scheint diese nicht nur auf der Bildung von Disulfid-Brückenbindungen zu beruhen. Da der ELISA allerdings nicht wiederholt und das Ergebnis nicht bestätigt werden konnte, kann keine endgültige Aussage hierüber getroffen werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich die Inhibierung von humanen Thrombozyten durch Gliotoxin. Dieses wird während des Wachstums von *A. fumigatus* sezerniert. Da *A. fumigatus* bei einer IA nicht nur Blutgefäße sondern auch Gewebe invadiert, besteht die Möglichkeit, dass sich Gliotoxin im Verlauf der IA im Gewebe akkumuliert und dort seine immunsuppressiven und zytotoxischen Eigenschaften zum Tragen kommen, was ein Grund für die bei einer IA beobachteten Gewebeschäden sein könnte (Kwon-Chung & Sugui, 2009) (eigene Hypothese). Bei einem Durchbruch der Gefäßwand durch das Wachstum des Pilzes könnte das um den Pilz akkumulierte Toxin in Kontakt mit humanen Thrombozyten kommen und dort die Aktivierung der Thrombozyten trotz Gefäßverletzung und Aktivität der von *A. fumigatus* sezernierten Proteasen durch die oben beschriebenen Mechanismen inhibieren (eigene Hypothese). Allerdings muss diese Hypothese sowie die Interaktion der ADP-Rezeptoren mit Gliotoxin noch durch weitere Analysen untersucht werden, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

#### 4.4. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich den Einfluss von *A. fumigatus* auf die Aktivität humaner Thrombozyten: zum einen eine Aktivierung durch die Aktivität sezernierter Proteasen oder durch GAG, zum anderen eine Inhibierung durch das sezernierte Gliotoxin. Durch diese beiden sich scheinbar widersprechenden Effekte von *A. fumigatus* können die im Verlauf einer IA auftretenden Thromben, Blutungen und Gewebeerstörungen erklärt werden. Dennoch ist das Bild noch nicht vollständig.

Um die für die Aktivierung der Thrombozyten verantwortlichen Fraktionen zu identifizieren, kann eine Analyse des proteasehaltigen Überständen des Wildtyps ATCC46645 sowie von des *prtT*-Deletionsstammes AfS61 durchgeführt werden. Hierbei wird der Überstand über eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und verglichen. Proteinbanden, die beim Wildtyp auftauchen, aber nicht bei AfS61 können dann aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert werden. An Hand dieser könnten die Unterschiede zwischen den beiden Überständen identifiziert und so eine Aussage über die für die Thrombozytenaktivierung verantwortlichen Bestandteile des Überstandes getroffen werden. Diese Bestandteile könnten dann aufgereinigt mit PRP inkubiert und die Aktivität der Thrombozyten anschließend mittels Durchflusszytometrie oder Analyse der löslichen Thrombozytenmarker wie z. B. sCD40L oder des nach der Aktivierung im Plasma vorhandenen Thromboxan B<sub>2</sub> mittels ELISA untersucht werden. Dieses Vorgehen könnte auch für die Analyse der Hyphen-Überstände angewendet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Blockierung der Rezeptoren PAR1 und PAR4 durch Antikörper (Michelson, 2012; Shi *et al.*, 2004) oder Antagonisten (Varopaxar, Atopaxar) (Michelson, 2011) vor der Koinkubation der Thrombozyten mit dem Protease-Überstand von *A. fumigatus*. Sollten Thrombozyten durch den Überstand über PAR1 und/oder PAR-4 aktiviert werden, sollte eine Blockierung dieser Rezeptoren eine Aktivierung der Thrombozyten verhindern oder zumindest verringern. Anschließend könnten ein Proteinextrakt aus den so behandelten Thrombozyten gewonnen und die PAR1/4-Aktivierung über eine Westernblot-Analyse funktionell untersucht werden. Darüber hinaus könnten für die weiteren Untersuchungen Thrombozyten von PAR1<sup>-/-</sup> und/oder PAR4<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen verwendet werden. Diese können Rückschlüsse zulassen über eine Beteiligung dieser Rezeptoren bei der Aktivierung der Thrombozyten durch proteasehaltige Überstände.

Um den Ort der Interaktion von Gliotoxin mit humanen Thrombozyten sowie die Auswirkungen dieser näher zu analysieren könnten zunächst die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> geblockt werden, z. B. durch R-138727 oder MRS2179 (Algaier *et al.*, 2008; Nylander *et al.*,

2004), und diese Thrombozyten dann mit und ohne Gliotoxin-Behandlung im Durchflusszytometer analysiert werden. Auch eine Immunpräzipitation von P2Y<sub>1</sub> und anschließender Westernblot-Analyse der Phospholipase C $\beta$  nach der Gliotoxin-Behandlung der Thrombozyten kann einen Nachweis für die Interaktion von P2Y<sub>1</sub> mit Gliotoxin erbringen. Weiter kann auch die Bindung von FITC-gekoppeltem Fibrinogen an mit Gliotoxin behandelten Thrombozyten im Durchflusszytometer quantitativ bestimmt werden, woraus Rückschlüsse auf eine Interaktion zwischen dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und Gliotoxin geschlossen und die Ergebnisse aus der Analyse der PAC-1-Bindung überprüft werden können. Weiter kann die Adhäsion von behandelten Thrombozyten mit Neutrophilen analysiert werden, entweder im Durchflusszytometer mittels SSC und FSC, oder mikroskopisch bei dem sog. Rosetten-Assay, so benannt nach der Bildung von Rosetten von Thrombozyten an Neutrophilen bei Ca<sup>2+</sup>-Anwesenheit (Hamburger & McEver, 1990). Darüber hinaus könnte auch eine Proteom-Analyse von Thrombozyten mit und ohne Gliotoxin-Behandlung durch eine 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Analyse der unterschiedlichen Banden nähere Einblicke in die Auswirkungen der Interaktion des Toxins mit humanen Thrombozyten zulassen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen sowie die zukünftigen Ergebnisse können zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Änderungen der lokalen Hämostase durch *A. fumigatus* im menschlichen Wirt beitragen und damit zu einer schnelleren und besseren Erkennung und Behandlung einer Invasiven Aspergillose führen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abad, A., Fernández-Molina, J. V., Bikandi, J. & other authors (2010).** What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**, 155-182.
- Adam, S. S., Key, N. S. & Greenberg, C. S. (2009).** D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *BLOOD* **113**, 2878.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S. & other authors (2009).** Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460**, 1117-1123.
- Aleil, B., Ravanat, C., Cazenave, J. P., Rochoux, G., Heitz, A. & Gache, C. (2005).** Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 85-92.
- Algaier, I., Jakubowski, J. A., Asai, F. & Von Kügelgen, I. (2008).** Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y<sub>12</sub> receptor. *J Thromb Haemost* **6**, 1908-1914.
- Alp, S. & Arikan, S. (2008).** Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology* **48**, 331-337
- Amich, Vicentefranqueira, R., Mellado, E., Ruiz-Carmuega, A., Leal, F. & Calera, J. A. (2014).** The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cellular Microbiology* **16**, 548-564.
- Amich, J. & Calera, J. A. (2014).** Zinc Acquisition: A Key Aspect in *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Mycopathologia* **178**, 379-385.
- Amitani, R., Taylor, G., Elezis, E.-N., Llewellyn-Jones, C., Mitchell, J., Kuze, F., Cole, P. J. & Wilson, R. (1995).** Purification and Characterization of Factors Produced by *Aspergillus fumigatus* Which Affect Human Ciliated Respiratory Epithelium. *Infection and Immunity* **63**, 3266-3271.
- Andrews, R. K., Arthur, J. F. & Gardiner, E. E. (2014).** Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thrombosis and Haemostasis* **112.4/2014**, 1-7.
- Annaix, V., Bouchara, J.-P., Larcher, G., Chabasse, D. & Tronchin, G. (1992).** Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection and Immunity* **60**, 1747-1755.
- Askew, D. S. (2008).** *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 331-337.
- Bailey, A. L., Scantlebury, D. C. & Smyth, S. S. (2009).** Go Red for Women: Thrombosis and Anti-Thrombotic Therapy in Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 284-288.



- Balloy, V., Huerre, M., Latgé, J.-P. & Chignard, M. (2005).** Differences in Patterns of Infection and Inflammation for Corticosteroid Treatment and Chemotherapy in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infection and Immunity* **73**, 494-503.
- Bardalaye, P. C. & Nordin, J. H. (1976).** Galactosaminogalactan from Cell Walls of *Aspergillus niger*. *Journal of Bacteriology* **125**, 655-669.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J.-P., Diaquin, M., Kobayashi, H. & Latgé, J.-P. (1997a).** Biochemical and Antigenic Characterization of a New Dipeptidyl-Peptidase Isolated from *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 6238–6244.
- Beauvais, A., Monod, M., Wyniger, J., Debeaupuis, J.-P., Grouzmann, E., Brakch, N., Svab, J., Hovanessian, A. G. & Latgé, J.-P. (1997b).** Dipeptidyl-Peptidase IV Secreted by *Aspergillus fumigatus*, a Fungus Pathogenic to Humans. *Infection and Immunity* **65**, 3042–3047.
- Behnsen, J., Lessing, F., Schindler, S., Wartenberg, D., Jacobsen, I. D., Thoen, M., Zipfel, P. F. & Brakhage, A. A. (2010).** Secreted *Aspergillus fumigatus* Protease Alp1 Degrades Human Complement Proteins C3, C4, and C5. *Infection and Immunity* **78**, 3585–3594.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., Leventakos, K. & Kontoyiannis, D. P. (2009).** *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood* **114**, 5393-5399.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E. & Kontoyiannis, D. P. (2010).** Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British Journal of Haematology* **150**, 406-417.
- Berenguer, U., Allende, M. C., Lee, J. W., Garrett, K., Lyman, C., Ali, N. M., Bacher, J., Pizzo, P. A. & Walsh, T. J. (1995).** Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 1079-1086.
- Bergmann, A., Hartmann, T., Cairns, T., Bignell, E. M. & Krappmann, S. (2009).** A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infection and Immunity* **77**, 4041-4050.
- Bertling, A., Niemann, S., Uekötter, A., Fegeler, W., Lass-Flörl, C., Von Eiff, C. & Kehrel, B. E. (2010).** *Candida albicans* and its metabolite gliotoxin inhibit platelet function via interaction with thiols. *Thrombosis and Haemostasis* **104**, 270-278.
- Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* **3**, 527–535.
- Bok, J. W., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. & Keller, N. P. (2005).** LaeA, a Regulator of Morphogenetic Fungal Virulence Factors. *Eukaryotic Cell* **4**, 1574–1582.
- Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Kirby, K. A. & Keller, N. P. (2006).** GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Infection and Immunity* **74**, 6761–6768.

- Botterel, F., Cordonnier, C., Barbier, V., Wingerstmann, L., Liance, M., Coste, A., Escudier, E. & Bretagne, S. (2002).** *Aspergillus fumigatus* causes *in vitro* electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells. *Histol Histopathol* **17**, 1095-1101.
- Bouchara, J.-P., Larcher, G., Joubaud, F., Penn, P., Tronchin, G. & Chabasse, D. (1993).** Extracellular fibrinolytic enzymes of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **7**, 81-92.
- Bouchara, J.-P., Sanchez, M., Chevaller, A., Marot-Leblond, A., Lissitzky, J.-C., Trochin, G. & Chabasse, D. (1997).** Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection and Immunity* **65**, 2717 - 1724.
- Brakhage, A. B. & Langfelder, K. (2002).** Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* **56**, 433-455.
- Brewer, D. B. (2006).** Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British Journal of Haematology* **133**, 251–258.
- Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. (2011).** Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews* **25**, 155-167.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G. & White, T. C. (2012).** Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine* **4**.
- Brown, J. S., Aufauvre-Brown, A., Brown, J., Jennings, J. M., Arst Jr, H. & Holden, D. W. (2000).** Signature-tagged and directed mutagenesis identify PABA synthetase as essential for *Aspergillus fumigatus* pathogenicity. *Molecular Microbiology* **36**, 1371±1380.
- Bünger, J., Westphal, G., Mönnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E. & Müller, M. (2004).** Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* **202**, 199-211.
- Bygdeman, S. (1967).** Effect of an Asperillus Enzyme on Adenosinediphosphate (ADP) induced Platelet Aggregation and Adhesiveness. *Life Sciences* **6**.
- Chan, P. K.-C. & Gentry, P. A. (1984).** Inhibition of Bovine Platelet Function by T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol and Deoxynivalenol. *Fd Chem Toxic* **22**, 643-648.
- Chee, Y. (2014).** Coagulation. *J R Coll Physicians Edinb* **44**, 42-45.
- Cherdyntseva, T. A. & Egorov, N. S. (1988).** Production by fungi of the genera *Aspergillus*, *Acremonium*, *Verticillium* of extracellular proteases which coagulate blood plasma and lyse blood clots. *Mikrobiologiya* **57**, 574-578.
- Chiang, L. Y., Sheppard, D. C., Gravelat, F. N., Patterson, T. F. & Filler, S. G. (2008).** *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells *in vitro* and during invasive pulmonary disease. *Infection and Immunity* **76**, 3429-3438.
- Choi, H. S., Shim, J. S., Kim, J.-A., Kang, S. W. & Kwon, H. J. (2007).** Discovery of gliotoxin as a new small molecule targeting thioredoxin redox system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **359** 523–528.

- Christin, L., Wysong, D. R., Meshulam, T., Ryan, H., Simons, E. R. & Diamond, R. D. (1998).** Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils. *Infection and Immunity* **66**, 1181-1189.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A. & other authors (2007).** Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine* **13**, 463-469.
- Clemetson, K. J. (2012).** Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research* **129**, 220-224.
- Coméra, C., André, K., Laffitte, J., Collet, X., Galtier, P. & Maridonneau-Parini, I. (2007).** Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes and Infection* **9**, 47 e 54.
- Cornely, O. A. & Ullmann, A. J. (2005).** Klinische Anwendung von Antimykotika. *UNI-MED Verlag AG*.
- Coughlin, S. R. (2000).** Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-264.
- Cox, D., Kerrigan, S. W. & Watson, S. P. (2011).** Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 1097–1107.
- Cramer, J., Robert A. , Gamcsik, M. P., Brooking, R. M. & other authors (2006).** Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase in *Aspergillus fumigatus* Eliminates Gliotoxin Production. *Eukaryotic Cell* **5**, 972–980.
- Cui, C.-B., Kakeya, H. & Osada, H. (1996).** Novel Mammalian Cell Cycle Inhibitors, Tryprostatins A, B and Other Diketopiperazines Produced by *Aspergillus fumigatus* II. Physico-chemical Properties and Structures. *The Journal of Antibiotics* **49**, 534-540.
- D'Enfert, C., Diaquin, M., Delit, A., Wuscher, N., Debeaupuis, J.-P., Huerre, M. & Latge, J.-P. (1996).** Attenuated Virulence of Uridine-Uracil Auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **64**, 4401–4405.
- Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. (2009).** Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis *Clin Microbiol Rev* **22**, 447-465.
- Daví, G. P., Carlo (2007).** Platelet Activation and Atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine* **357**, 2482-2494.
- de Nicola, P., Gibelli, A., Turazza, G. & Giarola, P. (1967).** Influence of an *Aspergillus* Enzyme on ADP-induced Platelet Aggregation and Fibrinolysis. *Life Sciences* **6**.
- Denning, D. W., Ward, P. N., Fenelon, L. & Benbow, E. W. (1992).** Lack of Vessel Wall Elastolysis in Human Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infection and Immunity* **60**, 5153-5156.
- Denning, D. W. (2001).** Chronic forms of pulmonary aspergillosis *Clinical Microbiology and Infection* **7**, 25-31
- Denning, D. W. (2003).** Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**, 1142-1151.

- Denning, D. W., Pleuvry, A. & Cole, D. C. (2013).** Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Medical Mycology* **51**, 361-370.
- Dhingra, S., Andes, D. & Calvo, A. M. (2012).** VeA Regulates Conidiation, Gliotoxin Production, and Protease Activity in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* **11**, 1531–1543.
- Dhingra, S., Lind, A. L., Lin, H.-C., Tang, Y., Rokas, A. & Calvo, A. M. (2013).** The Fumagillin Gene Cluster, an Example of Hundreds of Genes under *veA* Control in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* **8**, e77147.
- Dupont, B., Richardson, M., Verweij, P. E. & Meis, J. F. G. M. (2000).** Invasive aspergillosis. *Medical Mycology* **38**, 215–224.
- Dyer, P. S. & O'Gorman, C. M. (2012).** Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Asperillus* species. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 165-192.
- Ellis, M. (1999).** Therapy of *Aspergillus fumigatus*-Related Diseases. *Contrib Microbiol* **2**, 105-129.
- Fallon, J. P., Reeves, E. P. & Kavanagh, K. (2011).** The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology* **157**, 14481 - 11488.
- Flajs, D. & Peraica, M. (2009).** Toxicological Properties of Citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol* **60**, 457-464.
- Fleck, C. B., Schöbel, F. & Brock, M. (2011).** Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 400–407.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. & Latgé, J.-P. (2000).** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* **275**, 27594-27607.
- Fontaine, T., Delangle, A., Simenel, C. & other authors (2011).** Galactosaminogalactan, a New Immunosuppressive Polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogen* **7**, e1002372.
- Fontaine, T., Muszkieta, L., Delangle, A. & other authors (2014).** Structural Characterization of the New Immunosuppressive Galactosaminogalactan Produced by *Aspergillus fumigatus*. *6th Advances Against Aspergillosis Poster Abstract*, 128.
- Frisvad, E. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* **47**, S53-S71.
- Froquet, R., Arnold, F., Batina, P. & Parent-Massin, D. (2003).** Do trichothecenes reduce viability of circulating blood cells and modify haemostasis parameters? *Mycopathologia* **156**.
- Fuller, K. K., Richie, D. L., Feng, X., Krishnan, K., Stephens, T. J., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Askew, D. S. & Rhodes, J. C. (2011).** Divergent Protein Kinase A isoforms co-ordinately regulate conidial germination, carbohydrate metabolism and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* **79**, 1045–1062.

- Gardiner, D. M., Waring, P. & Howlett, B. J. (2005).** The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **151**, 1021–1032.
- Gillies, J. & Tait, R. C. (2002).** Coagulopathies induced by disseminated aspergillosis. <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/articles/gillies3htm-main>.
- Grandoni, K. M., Gentry, P. A., Holub, B. J. & Yagen, B. (1992).** Trichothecene mycotoxins inhibit phosphoinositide hydrolysis in bovine platelets stimulated with platelet activating factor *Toxicology* **72**, 51-60.
- Gravelat, F. N., Anne Beauvais, A., Liu, H. & other authors (2013).** Aspergillus Galactosaminogalactan Mediates Adherence to Host Constituents and Conceals Hyphal  $\beta$ -Glucan from the Immune System. *PLoS Pathogen* **9**, e1003575.
- Greten, H., Rinninger, F. & Greten, T. (2010).** Innere Medizin. *Thieme-Verlag*.
- Große, V. & Krappmann, S. (2008).** The Asexual Pathogen *Aspergillus fumigatus* Expresses Functional Determinants of *Aspergillus nidulans* Sexual Development. *Eukaryotic Cell* **7**, 1724–1732.
- Gupta, M., Samsal, D., Bandyopadhyay, S., Bagchi, G., Chatterjee, T. & Dey, S. (1983).** HEMATOLOGICAL CHANGES PRODUCED IN MICE BY OCHRATOXIN A AND CITRININ *Toxicology* **26**, 55-62.
- Hamburger, S. A. & McEver, R. P. (1990).** GMP-140 Mediates Adhesion of Stimulated Platelets to Neutrophils *Blood* **75**, 550-554.
- Hartmann, T., Sasse, C., Schedler, A., Hasenberg, M., Gunzer, M. & Krappmann, S. (2011).** Shaping the fungal adaptome – Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 408-416.
- Hearn, V. M. & Mackenzie, W. (1980).** Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen* **23**, 549-562.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V. & Brakhage, A. A. (2013).** *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in Microbiology* **3**, Article 440.
- Hensel, M., Arst Jr, H. N., Aufauvre-Brown, A. & Holden, D. W. (1998).** The role of the *Aspergillus fumigatus* *areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis. *Molecular & general genetics* **258**, 553–557.
- Hissen, A. H. T., Wan, A. N. C., Warwas, M. L., Pinto, L. J. & Moore, M. M. (2005).** The *Aspergillus fumigatus* Siderophore Biosynthetic Gene *sidA*, Encoding L -Ornithine N<sup>5</sup>-Oxygenase, Is Required for Virulence. *Infection and Immunity* **73**, 5493–5503.
- Hohl, T. M. & Feldmesser, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell* **6**, 1953-1963.
- Horn, F., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Pollmächer, J., Valiante, V. & Brakhage, A. A. (2012).** Systems biology of fungal infection. *Frontiers in Microbiology* **3**, 1-20.

- Ibrahim-Granet, O., Dubourdeau, M., Latgé, J.-P., Ave, P., Huerre, M., Brakhage, A. A. & Brock, M. (2008).** Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cellular Microbiology* **10**, 134–148.
- Jahn, B., Langfelder, K., Schneider, U., Schindel, C. & Brakhage, A. A. (2002).** PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology* **4**, 793–803.
- Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Togni, G., Latge, J.-P. & Monod, M. (1994).** Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* **14**, 917-928.
- Jenne C. N., Urrutia, R. & Kubes, P. (2013).** Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol* **35**.
- Jia, X., Chen, F., Pan, W. & other authors (2014).** Gliotoxin promotes *Aspergillus fumigatus* internalization into type II human pneumocyte A549 cells by inducing host phospholipase D activation. *Microbes and Infection* **16**, 491 e 501.
- Jürgens, J. (1966).** Effect of an *Aspergillus* Enzyme on Platelet Aggregation in Humans. *Life Sciences* **5**, 1379-1387.
- Jurk K, K. B. (2005).** Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* **31**, 381-392.
- Kamai, Y., Chiang, L. Y., Lopes Bezerra, L. M., Doedt, T., Lossinsky, A. S., Sheppard, D. C. & Filler, S. G. (2006).** Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. *Medical Mycology* **44**, 115-117
- Kamai, Y., Lossinsky, A. S., Liu, H., Sheppard, D. C. & Filler, S. G. (2009).** Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* **11**, 170-182.
- Kamei, K. & Watanabe, A. (2005).** *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology Supplement* **1**, **43**, S95 - S99.
- Kehrel, B. E. (2008).** Blutplättchen - Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* **28**, 289-298.
- Kemkes-Matthes, B., Oehler, G., Kujath, P. & Spannagel, U. (2001).** Blutgerinnung und Thrombose. *Thieme-Verlag*.
- Khoufache, K., Puel, O., Loiseau, N. & other authors (2007).** Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology* **7**, 1471-2180-1477-1475.
- Kim, S., Mangin, P., Dangelmaier, C., Lillian, R., Jackson, S. P., Daniel, J. L. & Kunapuli, S. P. (2009).** Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Glycoprotein VI-mediated Akt Activation in Platelets. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 33763 - 33772.
- Klechkovskaia, V. V. & Egorov, N. S. (1983).** Plasma-coagulating and fibrinolytic activities of fungi in the genus *Aspergillus*. *Mikrobiologiya* **52**, 396-403.
- Klöcking, H. P. & Markwardt, F. (1975).** Thrombolytic and pharmacodynamic properties of *Aspergillus ochraceus* protease. *Farmakol Toksikol* **38**, 341-349.

- Kogan, T. V., Jadoun, J., Mittelman, L., Hirschberg, K. & Osherov, N. (2004).** Involvement of Secreted *Aspergillus fumigatus* Proteases in Disruption of the Actin Fiber Cytoskeleton and Loss of Focal Adhesion Sites in Infected A549 Lung Pneumocytes. *Journal of Infectious Diseases* **189**, 1965–1973.
- Kosalec, I., Klaric, M. S. & Pepeljnjak, S. (2005).** Verruculogen production in airborne and clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* Fres. *Acta Pharm* **55**, 357–364.
- Kothary, M. H., Chase Jr., T. & Macmillan, J. D. (1984).** Correlation of Elastase Production by Some Strains of *Aspergillus fumigatus* with Ability to Cause Pulmonary Invasive Aspergillosis in Mice. *Infection and Immunity* **43**, 320-325.
- Kousha, M., Tadi, R. & Soubani, A. O. (2011).** Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review* **20**, 156–174.
- Krappmann, S. & Braus, G. H. (2005).** Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Medical Mycology* **43**, , S31-S40.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J. & H.A.B. Wösten, H. A. B. (2013).** Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* **74**, 1-29.
- Kroll, M., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelerie, F., Thomas, D., Friguet, B. & Conconi, M. (1999).** The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chemistry & Biology* **6**, 689–698.
- Kupfahl, C., Heinekamp, T., Geginat, G., Ruppert, T., Härtl, A., Hof, H. & Brakhage, A. A. (2006).** Deletion of the *gliP* gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology* **62**, 292-302.
- Kwon-Chung, K. J. & Sugui, J. A. (2009).** What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical Mycology* **47**, S97 - S103.
- Lahav, J., Jurk, K., Hess, O., Barnes, M. J., Farndale, R. W., Luboshitz, J. & Kehrel, B. E. (2002).** Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood* **100**, 2472-2478.
- Lass-Flörl, C., Roilides, E., Löffler, J., Wilflingseder, D. & Romani, L. (2013).** Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* **56**, 403-413.
- Latgé, J.-P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 310-350.
- Latgé, J.-P. & Beauvais, A. (2014).** Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology* **20**, 111-117.
- Lee, J. D. & Kolattukudy, P. E. (1995).** Molecular Cloning of the cDNA and Gene for an Elastinolytic Aspartic Proteinase from *Aspergillus fumigatus* and Evidence of Its Secretion by the Fungus during Invasion of the Host Lung. *Infection and Immunity* **63**, 3796–3803.
- Lee, M. J., Liu, H., Barker, B. M. & other authors (2015).** The Fungal Exopolysaccharide Galactosaminogalactan Mediates Virulence by Enhancing Resistance to Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathogen* **11**, e1005187.

- Lefkove, B., Govindarajan, B. & Arbiser, J. L. (2007). Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors. *Expert Rev Anti Infect* **5**, 573-579.
- Lewis, R. E., Wiederhold, N. P., Chi, J., Han, X. Y., Komanduri, K. V., Kontoyiannis, D. P. & Prince, R. A. (2005). Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. *Infection and Immunity* **73**, 635–637.
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A. & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2341–2349.
- Liebmann, B., Mühleisen, T. W., Müller, M., Hecht, M., Weidner, G., Braun, A., Brock, M. & Brakhage, A. (2004a). Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. *Archives in Microbiology* **181**, 378–383.
- Liebmann, B., Müller, M., Braun, A. & Brakhage, A. A. (2004b). The Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A Network Regulates Development and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **72**, 5193–5203.
- Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M.-C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B., Kauffmann-Lacroix, C., Latgé, J.-P. & Beauvais, A. (2010). In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* **12**, 405-410.
- Madlener, K. & Pötsch, B. (2010). Hämostaseologie. *Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg*.
- Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A. A. & Brock, M. (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS Journal* **272**, 3615–3630.
- Markaryan, A., Morozova, I., Yu, H. & Kolattukudy, P. E. (1994). Purification and Characterization of an Elastinolytic Metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and Immunoelectron Microscopic Evidence of Secretion of This Enzyme by the Fungus Invading the Murine Lung. *Infection and Immunity* **62**, 2149-2157.
- McClellan, S. L., Komorowski, R. A., Farmer, S. G., Hussey, C. V., Kauffman, H. M. J. & Adams, M. B. (1985). Severe bleeding diathesis associated with invasive aspergillosis in transplant patients. *Transplantation* **39**, 406-410.
- McDonagh, A., 1., Fedorova, N. D. & other authors (2008). Sub-Telomere Directed Gene Expression during Initiation of Invasive Aspergillosis. *PLoS Pathogen* **4**, e1000154.
- Michelson, A. D. (2011). Advances in Antiplatelet Therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**, 62-69.
- Michelson, A. D. (2012). Platelets. *Academic Press, Elsevier 3rd edition*.
- Molina, J.-M., Tourneur, M., Sarfati, J., Chevret, S., Gouvello, A., Gobert, J.-G., Balkan, S. & Derouin, F. (2002). Fumagillin Treatment of Intestinal Microsporidiosis. *N Engl J Med* **346**, 1963-1969.
- Monod, M., Paris, S., Sarfati, J., Jatton-Ogay, K., Ave, P. & Latgé, J.-P. (1993). Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus* *FEMS Microbiology Letters* **106**, 39-46



- Monod, M., Jousson, O. & Reichard, U. (2009).** *Aspergillus fumigatus* Secreted Proteases. *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*, ASM Press, 87-106.
- Morgenstern, E. (2010).** Thrombozytenmorphologie. In: *Pötsch B, Madlener K (Hrsg) Hämostaseologie Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag*, 15-28.
- Nakahata, N. (2008).** Thromboxane A<sub>2</sub>: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* **118**, 18-35.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J. & other authors (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.
- Nieswandt, B., Pleines, I. & Bender, M. (2011).** Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 92-104.
- Nishibori, M., Cham, B., McNicol, A., Shalev, A., Jain, N. & Gerrard, J. M. (1993).** The Protein CD63 Is in Platelet Dense Granules, is Deficient in a Patient with Hermansky-Pudlak Syndrome, and Appears Identical to Granulophysin. *J Clin Invest* **91**, 1775-1782.
- Nurden, A. T. (2011).** Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* **105 Suppl 1**, S13-13.
- Nylander, S., Mattsson, C., Ramström, S. & Lindahl, T. L. (2004).** Synergistic action between inhibition of P2Y<sub>12</sub>/P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>/thrombin in ADP- and thrombin-induced human platelet activation. *British Journal of Pharmacology* **142**, 1325-1331.
- O’Gorman, C. M., Fuller, H. T. & Dyer, P. S. (2009).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *nature* **457**, 471-475.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P. & Gow, A. R. (2003).** Antifungal Agents: mechanism of action. *Trends in Microbiology* **11**, 272-279.
- Ok, M. (2011).** Analyse der Interaktion und die gezielte Modifikation von angeborener Immunantwort gegenüber *Aspergillus fumigatus*. *OPUS Universitätsbibliothek Würzburg*.
- Orciuolo, E., Stanzani, M., Canestraro, M., Galimberti, S., Carulli, G., Lewis, R., Petrini, M. & Komanduri, K. V. (2007).** Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Journal of Leukocyte Biology* **82**, 839-848.
- Panepinto, J. C., Oliver, B. G., Fortwendel, J. R., Smith, D. L. H., Askew, D. S. & Rhodes, J. C. (2003).** Deletion of the *Aspergillus fumigatus* Gene Encoding the Ras-Related Protein RhbA Reduces Virulence in a Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infection and Immunity* **71**, 2819–2826.
- Paoletti, M., Carla Rydholm, Elke U. Schwier & other authors (2005).** Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *aspergillus fumigatus*. *Current Biology* **15**, 1424-1248.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.-P., Kazutoshi Shibuya, Philippe, B., Diamond, R. D. & Latgé, J.-P. (2003).** Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **71**, 3551–3562.

- Patterson, D. S. P., Shreeve, B. J., Roberts, B. A. & MacDonald, S. M. (1981).** Verruculogen Produced by Soil Fungi in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 916-917.
- Patterson, K. & Streck, M. E. (2010).** Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc* **7**, 237-244.
- Paul, S. & Moye-Rowley, W. S. (2014).** Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Frontiers in Physiology* **5**, 1-14.
- Peerschke, E. I. B., Yin, W., Grigg, S. E. & Ghebrehiwet, B. (2006).** Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **4**, 2035–2042.
- Perkhofer, S., Niederegger, H., Blum, G., Burgstaller, W., Ledochowski, M., Dierich, M. P. & Lass-Flörl, C. (2007).** Interaction of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. in vitro. *Int J Antimicrob Agents* **29**, 424-429.
- Perkhofer, S., Kehrel, B. E., Dierich, M. P., Donnelly, J. P., Nussbaumer, W., Hofmann, J., von Eiff, C. & Lass-Flörl, C. (2008).** Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. *The Journal of Infectious Diseases* **198**, 1243-1246.
- Rambach, G., Dum, D., Mohsenipour, I., Hagleitner, M., Würzner, R., Lass-Flörl, C. & Speth, C. (2010).** Secretion of a fungal protease represents a complement evasion mechanism in cerebral aspergillosis. *Molecular Immunology* **47**, 1438–1449.
- Rambach, G., Blum, G., Latgé, J.-P. & other authors (2015).** Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets. *The Journal of Infectious Diseases* **212**, 1140-1149
- Reichard, U., Büttner, S., Eiffert, H., Staib, F. & Rüchel, R. (1990).** Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol* **33**, 243-251.
- Reichard, U., Eiffert, H. & Rüchel, R. (1994).** Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **32**, 427-436.
- Reichard, U., Monod, M., Odds, F. & Rüchel, R. (1997).** Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**, 189-196.
- Rementeria, A., López-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Pontón, J. & Garaizar, J. (2005).** Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* **22**, 1-23.
- Reséndiz, J. C., Kroll, M. H. & Lassila, R. (2007).** Protease-activated receptor-induced Akt activation – regulation and possible function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **5**, 2484–2493.
- Rhodes, J. C. (2006).** *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Medical Mycology* **44**, 77-81.

- Rødland, E. K., Ueland, T., Pedersen, T. M., Halvorsen, B., Müller, F., Aukrust, P. & Frøland, S. S. (2010).** Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of aspergillosis. *Infection and Immunity* **78**, 1269-1275.
- Rowley, J. W., Schwertz, H. & S., W. A. (2012).** Platelet mRNA: the meaning behind the message. *Curr Opin Hematol* **19**, 385-391.
- Rüchel, R. & Reichard, U. (1999).** Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. *Contrib Microbiol* **2**, 21-43.
- Sabater-Vilar, M., Nijmeijer, S. & Fink-Gremmels, J. (2003).** Genotoxicity Assessment of Five Tremorgenic Mycotoxins (Fumitremorgen B, Paxilline, Penitrem A, Verruculogen, and Verrucosidin) Produced by Molds Isolated from Fermented Meats. *Journal of Food Protection* **11**, 2123-2129.
- Sales-Campos, H., Tonani, L., Ribeiro Barros Cardoso, C. & Von Zeska Kress, M. R. (2013).** The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in *Aspergillus fumigatus* Lung Infection. *BioMed Research International* **2013**, 1-14.
- Samson, R. A., Varga, J. & Dyer, P. S. (2009).** Morphology and Reproductive Mode of *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*, 7-13.
- Sandhu, D. K., Sandhu, R. S., Khan, Z. U. & Damodaran, V. N. (1976).** Conditional Virulence of a p-Aminobenzoic Acid-Requiring Mutant of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **13**, 527-532.
- Sasse, C., Bignell, E. M., Hasenberg, M., Haynes, K., Gunzer, M., Braus, G. H. & Krappmann, S. (2008).** Basal expression of the *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA is sufficient to support pulmonary aspergillosis. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 693-704.
- Scharf, D. H., Remme, N., Habel, A., Chankhamjon, P., Scherlach, K., Heinekamp, T., Hortschansky, P., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2011).** A Dedicated Glutathione S - Transferase Mediates Carbon-Sulfur Bond Formation in Gliotoxin Biosynthesis. *J Am Chem Soc* **133**, 12322-12325.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. B. & Hertweck, C. (2012).** Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 467-472.
- Scharf, D. H. (2013).** Gliotoxin-Biosynthese in *Aspergillus fumigatus* - Schwefeleinbau in Naturstoffe. *Biospektrum* **03.2013**, 338.
- Schöbel, F., Jacobsen, I. D. & Brock, M. (2010).** Evaluation of Lysine Biosynthesis as an Antifungal Drug Target: Biochemical Characterization of *Aspergillus fumigatus* Homocitrate Synthase and Virulence Studies. *Eukaryotic Cell* **9**.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst Jr., H. N., Haynes, K. & Haas, H. (2004).** Siderophore Biosynthesis But Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1213-1219.
- Semple, J. W., Italiano Jr, J. E. & Freedman, J. (2011).** Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* **11**, 264-274.

- Sharon, H., Hagag, S. & Osherov, N. (2009).** Transcription Factor PrtT Controls Expression of Multiple Secreted Proteases in the Human Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **77**, 4051-4060.
- Sheth, N. K., Kurup, V. P. & Barron, B. A. (1980).** The role of *Aspergillus fumigatus* antigens in blood coagulation and platelet function. *Microbios* **28**, 91-96.
- Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L. F., Ruf, W. & Mueller, B. M. (2004).** Protease-Activated Receptors (PAR1 and PAR2) Contribute to Tumor Cell Motility and Metastasis. *Molecular Cancer Research* **2**, 395-402.
- Sin, N., Meng, L., Wang, M. Q. W., Wen, J. J., Bornmann, W. G. & Crews, C. M. (1997).** The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 6099–6103.
- Speth, C., Löffler, J., Krappmann, S., Lass-Flörl, C. & Rambach, G. (2013a).** Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol* **8**, 1431–1451.
- Speth, C., Rambach, G., Blum, G., Latge, J. P., Heinekamp, T., Jeckström, H., Fontaine, T., Hagleitner, M. & Lass-Flörl, C. (2013b).** *Aspergillus fumigatus* surface components on conidia and hyphae trigger activation of human thrombocytes. *Mycoses* **56**, 51.
- Speth, C., Rambach, G., Blum, G., Latgé, J. P., Heinekamp, T., Jeckström, H., Fontaine, T., Hagleitner, M. & Lass-Flörl, C. (2013c).** *Aspergillus fumigatus* surface components on conidia and hyphae trigger activation of human thrombocytes. *Mycoses* **56**, 51.
- Stanzani, M., Orciuolo, E., Lewis, R., Kontoyiannis, D. P., Martins, S. L. R., John, L. S. S. & Komanduri, K. V. (2005).** *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* **105**, 2258.
- Steinbach, W. J. (2008).** Clinical aspects of the genus *Aspergillus*. *The Aspergilli - Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, 359-375.
- Stief, T. W., Kurz, J., Doss, M. O. & J., F. (2000).** Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res* **97**, 473-480.
- Sugui, J. A., Pardo, J., Chang, Y. C. & other authors (2007a).** Role of *laeA* in the Regulation of *alb1*, *gliP*, Conidial Morphology, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* **6**, 1552–1561.
- Sugui, J. A., Pardo, J., Chang, Y. C. & other authors (2007b).** Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. *Eukaryotic Cell* **6**, 1562–1569.
- Swieringa, F., Kuijpers, M. J. E., Heemskerk, J. W. M. & van der Meijden, P. E. J. (2014).** Targetin platelet receptor function in thrombus formation: The risk of bleeding. *Blood Reviews* **28**, 9-21.
- Szewczyk, E. & Krappmann, S. (2010).** Conserved regulators of mating are essential for *Aspergillus fumigatus* cleistothecium formation. *Eukaryotic Cell* **9**, 774-783.
- Tang, C. M., Cohen, J., Krausz, T., Van Noorden, S. & Holden, D. W. (1993).** The Alkaline Protease of *Aspergillus fumigatus* Is Not a Virulence Determinant in Two Murine Models of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infection and Immunity* **61**, 1650-1656.

- Tang, Y.-Q., Yeaman, M. R. & Selsted, M. E. (2002).** Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infection and Immunity* **70**, 6524-6533.
- Tekaia, F. & Latgé, J.-P. (2005).** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology* **8**, 385-392.
- Thompson, G. R. r., Cadena, J. & Patterson, T. F. (2009).** Overview of Antifungal Agents. *Clinics in Chest Medicine* **30**, 203-215.
- Thon, J. N., Montalvo, A., Patel-Hett, S. & other authors (2010).** Cytoskeletal mechanism of proplatelet maturation and platelet release. *Journal of Cell Biology* **191**, 861-874.
- Tomee, J. F. C., Wierenga, A. T. J., Hiemstra, P. S. & Kauffman, H. F. (1997).** Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Release of Proinflammatory Cytokines and Cell Detachment in Airway Epithelial Cell Lines. *The Journal of Infectious Diseases* **176**, 300-303.
- Tsai, H.-F., Chang, Y. C., Washburn, R. G., Wheeler, M. H. & Kwon-Chung, K. J. (1998).** The Developmentally Regulated alb1 Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *Journal of Bacteriology* **180**, 3031-3038.
- van Loevezijn, A., van Maarseveen, J. H., Stegman, K., Visser, G. M. & Koomen, G.-J. (1998).** Solid Phase Synthesis of Fumitremorgin, Verruculogen and Tryprostatin Analogs based on a Cyclization/Cleavage Strategy *Tetrahedron Letters* **39**, 4737-4740.
- Vermeulen, E., Lagrou, K. & Verweij, P. E. (2013).** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Curr Opin Infect Dis* **26**, 493-500.
- Vickers, I., Reeves, E. P., Kavanagh, K. A. & Doyle, S. (2007).** Isolation, activity and immunological characterisation of a secreted aspartic protease, CtsD, from *Aspergillus fumigatus*. *Protein Expression and Purification* **53**, 216-224.
- Yeaman, M. R. (2010).** Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 525-544.
- Yeaman, M. R. (2014).** Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 426-437.

## **6. Anhang**

### **Förderung**

Diese Arbeit wurde gefördert durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums Würzburg sowie durch das Stipendium „Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ des Frauenbüros der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen zur Untersuchung des Einflusses von *Aspergillus fumigatus* auf die Hämostase“ eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

.....

Ort, Datum

.....

Anette Schedler

## **Danksagung**

Auf dieser Seite möchte ich den Personen danken, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Prof. Dr. Sven Krappmann danke ich für die Möglichkeit dieses spannende Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können sowie für die Betreuung, egal ob in Würzburg oder aus Erlangen.

Ein weiterer Dank geht an mein Promotionskomitee mit Prof. Dr. Jürgen Löffler, Prof. Dr. Gabriele Pradel und Prof Dr. Ulrich Dobrindt für die konstruktiven Diskussionen während der jährlichen Treffen.

Besonders möchte ich Prof. Dr. Jürgen Löffler dafür danken mich für das letzte Jahr in seinem Labor aufgenommen und betreut zu haben und mir so die Möglichkeit gegeben zu haben, die Arbeit beenden zu können.

Ich danke auch Prof. Dr. Bernhard Nieswandt für die Bereitstellung des Aggregometers und des KX21 hematology analyzer in seinem Labor. Ein Dank geht auch an seine Mitarbeiter, vor allem Dr. Frauke May und Dr. Timo Vögtle, für die Einführung in die Aggregometrie und die Beantwortung meiner vielen Fragen.

Zudem gilt mein Dank Nicole Schnell und Dr. Michael Ok für die Erstellung der Routinen zur Auswertung der Aggregometrie.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Kollegen aus der AG Krappmann. Anna, Thomas, Micha, Patrick, Edyta und Jorge, vielen Dank für die schöne Zeit im Labor und für die Geduld meine nicht immer gute Laune am Ende des Tages ertragen zu haben. Ich möchte auch unseren „Nachbarn“, der AG Morschhäuser danken für die gute Atmosphäre und den ein oder anderen kleinen Plausch auf dem Flur. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der AG Löffler, die mich so herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben. Vor allem möchte ich Kristin Czakai für die angenehme Zusammenarbeit in diesem Projekt danken.

Ein großer Dank geht an Markus Mohr für seine unerschöpfliche Geduld, Hilfe und Nachsicht sowie an meine Eltern und Schwestern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Vielen Dank!



## **Curriculum Vitae**

## Publikationen und Konferenzbeiträge

### Publikationen

**Schedler A.**, Czakai K., May F., Nieswandt B., Einsele H., Löffler J., Krappmann S. *Secreted effectors of Aspergillus fumigatus influence the activity of human platelets.* (in Vorbereitung)

Czakai K., Dittrich M., Kaldorf M., Müller T., Krappmann S., **Schedler A.**, Bonin M., Dühring S., Schuster S., Speth C., Rambach G., Einsele H., Dandekar T., Löffler J. (2017) *Influence of Platelet-rich Plasma on the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with Aspergillus fumigatus.* International Journal of Medical Microbiology 307 (2): 95-107

Hartmann T., Sasse C., **Schedler A.**, Hasenberg M., Gunzer M., Krappmann S. (2011) *Shaping the fungal adaptome – Stress responses of Aspergillus fumigatus.* International Journal of Medical Microbiology 301: 408–416

### Konferenzbeiträge

6<sup>th</sup> Trends In Medical Mycology 2013 (Poster)

**Schedler A.**, Czakai K., Nieswandt B., Krappmann S., Löffler J. Secreted effectors of *Aspergillus fumigatus* influence platelet activity of the human host. Poster Presentations: *Mycoses* 56 (s3): p. 117, (P174)

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2012 (Poster)

**Schedler A.**, Czakai K., Löffler J., Krappmann S. Analysis of host-pathogen interactions to investigate the influence of *Aspergillus fumigatus* on haemostasis. (2012). Programm: p. 101, (EKP20)

7<sup>th</sup> International Symposium der Graduate School of Life Sciences “EPOS“ 2012 (Poster)

**Schedler A.**, Czakai K., Löffler J., Krappmann S. Analysis of host-pathogen interactions to investigate the influence of *Aspergillus fumigatus* on haemostasis.

FEMS-Leopoldina-Symposium “Emerging Topics in Microbial Pathogenesis“ 2011 (Poster)

Bergmann A., **Schedler A.**, Sasse C., Krappmann S. Extracellular proteolysis of *A. fumigatus* and eIF2 $\alpha$  kinase signaling - is there a connection?

Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie 2011 (Poster)

Bergmann A., **Schedler A.**, Sasse C., Krappmann S. Extracellular proteolysis of *A. fumigatus* and eIF2 $\alpha$  kinase signaling - is there a connection? (2011) Biospektrum Tagungsband: p. 262 (SRP033)

6<sup>th</sup> International Symposium der Graduate School of Life Sciences “BioBang” 2011 (Poster)

**Schedler A.**, Czakai K., Löffler J., Krappmann S. Supernatants and secondary metabolites of *A. fumigatus* influence platelet aggregation.

5<sup>th</sup> International Symposium der Graduate school of Life Sciences “Chiasma” 2010 (Poster)

**Schedler A.**, Ok M., Krappmann S., Löffler J. Supernatants of different *A. fumigatus* morphologies influence platelet aggregation.