

**Aktivierungsmuster humaner
neutrophiler Granulozyten nach
Kontakt mit den pathogenen Pilzen
Candida albicans und
*Aspergillus fumigatus***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anke Hornbach
aus Hildesheim

Würzburg, 2010

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. J. Löffler

Gutachter: Professor Dr. J. Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

**Aktivierungsmuster humaner
neutrophiler Granulozyten nach
Kontakt mit den pathogenen Pilzen
Candida albicans und
*Aspergillus fumigatus***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anke Hornbach
aus Hildesheim

Würzburg, 2010

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Experimente wurden in der Zeit von Juni 2006 bis Dezember 2009 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie sowie im Forschungslabor der medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg durchgeführt. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, April 2010

Anke Hornbach

Inhaltsverzeichnis

1	Summary	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	4
3.1	<i>Candida albicans</i>	4
3.1.1	Erregerbiologie	4
3.1.2	Klinische Bilder und Epidemiologie der Candidose	5
3.1.3	Zellwandaufbau von <i>Candida albicans</i>	6
3.1.4	Virulenzfaktoren von <i>Candida albicans</i>	6
3.1.4.1	Morphologische Plastizität von <i>Candida albicans</i>	7
3.1.4.2	Genetische Regulation der morphologischen Plastizität	8
3.1.4.3	Filamentspezifische Proteinexpression	9
3.1.4.4	Sezernierte Aspartatproteasen	10
3.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	14
3.2.1	Erregerbiologie	14
3.2.2	Klinische Bilder und Epidemiologie der Aspergillose	15
3.2.3	Zellwandaufbau von <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
3.2.4	Virulenzfaktoren von <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
3.2.4.1	Pigmentbildung als Virulenzfaktor	16
3.2.4.2	Gliotoxin	16
3.3	Der neutrophile Granulozyt und seine Bedeutung in der Bekämpfung von <i>Candida albicans</i> und <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
3.3.1	Einführung	17
3.3.2	Chemotaxis	18
3.3.3	Phagozytose und Abtötung	19
3.3.4	Der oxidative Burst	22
3.3.5	Zytokinsekretion von neutrophilen Granulozyten	24
3.3.6	Neutrophil extracellular traps (NETs)	24
3.4	Zielsetzung	25
4	Material und Methoden	26
4.1	Material	26
4.1.1	Geräte	26
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
4.1.3	Reagenzien und Lösungen	28
4.1.3.1	Häufig verwendete Reagenzien und Lösungen	28
4.1.3.2	Besondere Reagenzien und Lösungen	28
4.1.3.3	Farbstoffe	28
4.1.4	Antikörper	29
4.1.5	Kits	29
4.1.6	Oligonukleotide für die qRT-PCR	29
4.1.7	Verwendete Pilzstämmen	30
4.1.7.1	<i>Candida albicans</i>	30
4.1.7.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	30
4.1.8	Verwendete Zelltypen	30
4.1.8.1	Humane neutrophile Granulozyten aus Frischblut	30
4.1.9	Medien	31
4.1.9.1	Medien für die Pilzkultivierung	31
4.1.9.2	Medien für die Zellkultur	31
4.1.10	Pufferlösungen	32
4.1.10.1	Pufferlösungen für ELISA	32

4.1.10.2	Pufferlösungen für die Durchflusszytometrie.....	32
4.1.10.3	Pufferlösungen für die Mikroskopie	33
4.1.10.4	Pufferlösungen für Microarray-Experimente.....	33
4.2	Methoden.....	34
4.2.1	Pilze.....	34
4.2.1.1	Kultivierung von <i>Candida albicans</i>	34
4.2.1.2	Kultivierung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
4.2.2	Gewinnung von <i>A. fumigatus</i> -Kulturüberständen.....	35
4.2.3	Zellkultur	35
4.2.3.1	Gewinnung von humanen Granulozyten aus Frischblut.....	35
4.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.....	35
4.2.4	Konfrontationsexperimente	36
4.2.4.1	Messung der ROI-Freisetzung von humanen Granulozyten	36
4.2.4.2	Chemotaxis.....	36
4.2.4.3	Abtötungsversuch auf Plattenbasis	37
4.2.4.4	XTT-Assay.....	37
4.2.4.5	Apoptose-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie.....	38
4.2.4.6	Elastase-Aktivitätsmessung.....	39
4.2.5	Fluoreszenzmikroskopische Versuche.....	40
4.2.5.1	Wachstumsinhibitionsversuch	40
4.2.5.2	Nachweis von Elastase und NETs mittels Immunfluoreszenz	40
4.2.6	Proteinanalysen.....	41
4.2.6.1	Zytokin-ELISA (IL-8)	41
4.2.7	Transkriptomuntersuchungen.....	42
4.2.7.1	Infektion von neutrophilen Granulozyten mit <i>A. fumigatus</i> -Hyphen	42
4.2.7.2	Isolierung von RNA aus neutrophilen Granulozyten	42
4.2.7.3	Amplifikation der RNA.....	43
4.2.7.4	cDNA-Synthese und Labeling	43
4.2.7.5	Design der Sonden	43
4.2.7.6	Hybridisierung und Auswertung.....	43
4.2.7.7	Quantitative RT-PCR.....	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Untersuchungen zum Phänotyp der Mutanten	46
5.2	Die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten wird durch eine Deletion von <i>SAP9</i> reduziert.....	49
5.3	Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch <i>SAP9</i> beeinflusst	52
5.4	Die durch <i>C. albicans</i> induzierte Apoptose wird durch Deletion von <i>SAP9</i> reduziert	56
5.5	<i>SAP9</i> moduliert die ROS-induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten	59
5.6	Die Degranulation von neutrophilen Granulozyten wird nicht durch die sezernierte Aspartatprotease <i>SAP9</i> beeinflusst.....	60
5.7	Die durch neutrophile Granulozyten vermittelte Filamentationsinhibition ist <i>SAP9</i>-unabhängig	66
5.8	<i>SAP9</i> ist in die Abtötung durch neutrophile Granulozyten involviert	67
5.9	Microarray-Analysen von neutrophilen Granulozyten nach Infektion mit <i>A. fumigatus</i>-Hyphen.....	70
6	Diskussion	73
6.1	Einführung zur Fragestellung	73
6.2	Potentielle zellwandregulatorische Funktionen von <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i>.....	73
6.3	<i>SAP9</i> moduliert die Induktion gerichteter Motilität in Granulozyten	74
6.4	ROS-induzierte und durch <i>SAP9</i> beeinflusste Apoptose als potentieller Immunevasionsmechanismus	76
6.5	Die Degranulation neutrophiler Granulozyten verläuft unabhängig von <i>SAP9</i>.....	78
6.6	Der Einfluss von <i>SAP9</i> auf Wachstumsinhibition und Abtötung.....	79
6.7	Hypothesen zur Interaktion von <i>Sap9</i> mit neutrophilen Granulozyten	80

6.8	Das Zytokinprofil neutrophiler Granulozyten während der <i>A. fumigatus</i>- Infektion	81
7	Literaturverzeichnis.....	83
8	Anhang.....	98
8.1	Liste der Microarray-Oligonukleotide.....	98
8.2	Abkürzungsverzeichnis	103
8.3	Publikationsliste	106
8.3.1	Veröffentlichungen.....	106
8.3.2	Kongressbeiträge	106
8.4	Danksagung	107
8.5	Lebenslauf.....	108

Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Abbildung 3-1:	Morphotypen von <i>C. albicans</i>	7
Abbildung 3-2:	Genetische Regulation der morphologischen Plastizität	8
Abbildung 3-3:	Dendrogramm der <i>SAP</i> -Genfamilie	11
Abbildung 3-4:	Lebenszyklus von <i>A. fumigatus</i>	14
Abbildung 3-5 :	Die charakteristischen Nuklei neutrophiler Granulozyten	18
Abbildung 4-1:	Transwell-System zur Messung der Chemotaxis.....	36
Abbildung 5-1:	Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme nach 2 h	47
Abbildung 5-2:	Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme nach Übernacht-Anzucht	48
Abbildung 5-3:	Hefen sind schwache Induktoren einer <i>SAP</i> -unabhängigen Chemotaxis	49
Abbildung 5-4:	Keimschläuche induzieren eine <i>SAP9</i> -abhängige Migration	50
Abbildung 5-5:	IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten als Reaktion auf <i>C. albicans</i>	51
Abbildung 5-6:	<i>SAP9</i> beeinflusst den Hefe-induzierten oxidativen Burst	52
Abbildung 5-7:	<i>SAP9</i> beeinflusst den keimschlauch-induzierten oxidativen Burst	53
Abbildung 5-8:	Kontrollen	54
Abbildung 5-9:	<i>C. albicans</i> -induzierte Apoptose nach einer Stunde	56
Abbildung 5-10:	Deutliche Apoptoseinduktion durch Keimschläuche nach 2 Stunden	57
Abbildung 5-11:	Die Populationsverschiebung durch Apoptoseinduktion ist <i>SAP9</i> -abhängig.....	58
Abbildung 5-12:	Nach drei Stunden stagniert die Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten	58
Abbildung 5-13:	Inhibition der ROS-Bildung durch DPI und Glutathion.....	59
Abbildung 5-14:	Inhibition der ROS-Produktion führt zu reduzierter Apoptose.....	60
Abbildung 5-15:	Positiv- und Negativkontrolle.....	61
Abbildung 5-16:	<i>C. albicans</i> Wildtyp und neutrophile Granulozyten	61
Abbildung 5-17:	<i>C. albicans</i> $\Delta sap9$ und neutrophile Granulozyten.....	62
Abbildung 5-18:	unspezifische Fluoreszenz durch Antikörperfärbung und Autofluoreszenz von <i>C. albicans</i>	62
Abbildung 5-19:	Intrazelluläre Elastasefreisetzung nach 30 min	63
Abbildung 5-20:	Intrazelluläre Elastasefreisetzung nach 2 h	64
Abbildung 5-21:	Extrazelluläre Elastasefreisetzung nach 30 min	65
Abbildung 5-22:	Extrazelluläre Elastasefreisetzung nach 2 h	65
Abbildung 5-23:	Die Filamentation wird durch neutrophile Granulozyten inhibiert	66
Abbildung 5-24:	Quantifizierung der Wachstumsinhibition.....	67
Abbildung 5-25:	Die Abtötung von <i>SAP9</i> -deletierten Hefen ist geringer als die des Wildtyps.....	68
Abbildung 5-26:	Der Einfluss von Sap1- 6 auf das Abtötungsverhalten gegenüber Hefen	68
Abbildung 5-27:	Die Schädigung von <i>SAP9</i> -deletierten Keimschläuchen fällt geringer aus als die des Wildtyps	69
Abbildung 5-28:	Der Einfluss von Sap1- 6 auf das Abtötungsverhalten gegenüber Keimschläuchen .	69
Abbildung 6-1:	Eine mögliche Funktion von Sap9 in der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten .	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Hyphen-koregulierte, durch <i>EFG1</i> kontrollierte Gene*	9
Tabelle 5-1:	Genexpression von neutrophilen Granulozyten nach Koinkubation mit <i>A. fumigatus</i> Hyphen für 2 h	71
Tabelle 5-2:	Genexpression von neutrophilen Granulozyten nach Koinkubation mit <i>A. fumigatus</i> Hyphen für 6 h	71
Tabelle 8-1:	Oligonukleotide für <i>Aspergillus</i> -Granulozyten-Microarray.....	98

Tabelle 8-2: Kontrollen (Housekeeping-Gene)..... 102
Tabelle 8-3: Kontrollen (*Aspergillus*-Gene) 103

1 Summary

Human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play a major role in the immune defence against invasive infections caused by the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. The aim of this work was to further characterize the interaction of both fungi with PMNs with a focus on diverse PMN effector functions.

C. albicans expresses a set of aspartic proteases which are associated with virulence and can contribute to adhesion, tissue invasion and immune evasion. Here, the role of the aspartic proteases Sap1-6, Sap9 and Sap10 in the interaction with human neutrophils was analysed. It could be demonstrated that, in contrast to other aspartic proteases, the cell surface associated GPI-anchored enzyme Sap9 has a major impact on recognition of *C. albicans* by PMNs. *SAP9* expression is required for the effective induction of PMN chemotaxis towards *C. albicans* filaments, an essential prerequisite of effective PMN activation. Targeted motility can be enhanced by autologous secretion of IL-8, but no influence of *SAP9* on the process of IL-8 secretion could be observed here. However, deletion of *SAP9* led to a mitigated release of reactive oxygen intermediates (ROI) in human PMNs. Likewise, *C. albicans* induced apoptosis triggered by ROI formation was decreased. In confrontation assays, killing of a *SAP9* deletion mutant was reduced in comparison to the wild-type. Beside ROI production, degranulation represents an additional important effector mechanism contributing to microbial killing, however, the release of elastase in response to *C. albicans* was found to be not dependent on *SAP9*, as well as the PMN-mediated growth inhibition of germ tubes. The data presented here clearly implicate Sap9 protease activity, which was already attributed to immune evasion before, with the initiation of protective innate immunity.

Like *C. albicans*, *A. fumigatus* evokes PMN antifungal activity. Custom-made microarray analyses focusing on the cytokine profile of PMNs during interaction with *A. fumigatus* hyphae revealed that only few cytokines are upregulated during the course of infection.

In summary it could be demonstrated that the interaction between Saps and PMNs is revealing novel molecular mechanisms which lead to an activation of these cells. Furthermore, microarray analyses lead to the awareness that *de novo* cytokine synthesis of PMNs is barely influenced by *A. fumigatus*, pointing out that instant killing of the fungus might be of higher importance.

2 Zusammenfassung

Humane neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr invasiver Infektionen durch die humanpathogenen Pilze *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand in einer Charakterisierung der Interaktion beider Pilzspezies mit neutrophilen Granulozyten, mit Fokussierung auf die unterschiedlichen Effektormechanismen dieser Zellen.

C. albicans exprimiert eine Reihe von Aspartatproteasen, welche mit der Virulenz des Erregers assoziiert sind und zu Adhäsion, Gewebeinvasion und Immunevasion beitragen können. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Aspartatproteasen Sap1-6, Sap9 und Sap10 in der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu anderen Aspartatproteasen, das zelloberflächenassoziierte GPI-verankerte Enzym Sap9 einen maßgeblichen Einfluss auf die Erkennung von *C. albicans* durch neutrophile Granulozyten hat. *SAP9*-Expression ist erforderlich, um die gerichtete Motilität (Chemotaxis) neutrophiler Granulozyten zu *C. albicans*-Keimschläuchen hin zu induzieren. Dieser Prozess stellt eine Grundvoraussetzung zur effektiven Aktivierung neutrophiler Granulozyten darstellt. Die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten kann durch autologe Sekretion des Zytokins IL-8 verstärkt werden. Es konnte jedoch kein Einfluss von *SAP9* auf die IL-8 Sekretion beobachtet werden. Allerdings führte die Deletion von *SAP9* zu reduzierter Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) in neutrophilen Granulozyten. Die mit der ROS-Generierung in Verbindung stehende und durch *C. albicans* induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten war ebenfalls vermindert. In Konfrontationsassays war die Abtötung einer *SAP9*-Deletionsmutante verglichen mit dem Wildtyp reduziert. Die Degranulation stellt neben der Produktion von ROS einen weiteren wichtigen Effektormechanismus zur Abtötung von Mikroben dar, jedoch verlief die Freisetzung von Elastase ebenso unabhängig von *SAP9* wie die durch neutrophile Granulozyten ausgelöste Wachstumsinhibition von Keimschläuchen.

Die hier präsentierten Daten verbinden die Aktivität der Protease Sap9, der zuvor bereits eine Rolle in der Immunevasion von *C. albicans* zugeschrieben wurde, mit der Initiation der protektiven angeborenen Immunität.

Wie *C. albicans* stimuliert auch *A. fumigatus* die Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Microarray-Analysen mit Fokus auf dem Zytokinprofil neutrophiler Granulozyten während der Interaktion mit *A. fumigatus*-Hyphen offenbarten, dass nur wenige Zytokine im Lauf der Infektion hochreguliert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Sap-Granulozyten-Interaktion neue molekulare Mechanismen zur Aktivierung dieser Zellen birgt. Zudem brachten die Microarray-

Analysen die Erkenntnis, dass die *de novo*-Zytokinsynthese durch *A. fumigatus* nur geringfügig beeinflusst wird und eine schnelle Abtötung des Pilzes offenbar im Vordergrund steht.

3 Einleitung

3.1 *Candida albicans*

3.1.1 Erregerbiologie

Der Sprosspilz *C. albicans* wird taxonomisch in die Abteilung der Ascomycota, der Schlauchpilze, eingeordnet.

Neben *Saccharomyces cerevisiae* und anderen *Candida*-Spezies gehört *C. albicans* zu den wenigen diploiden Schlauchpilzen. Lange wurde *C. albicans* für strikt asexuell gehalten, bis vor einigen Jahren der sogenannte Mating-Type-Like-Lokus (*MTL*-Lokus) entdeckt wurde. Auch der Phänotyp der Pilzzellen, den manche Stämme spontan wechseln können, entscheidet über das Paarungsverhalten. Man unterscheidet weiße Zellen, die gleichmäßig rund-oval geformt sind und weiße Kolonien bilden, von den opaken, die eine längliche Form haben und flache, dunklere Kolonien bilden (203). Ein Wechsel von weiß zu opak ermöglicht die Paarung. Opake Zellen paaren sich deutlich effizienter als weiße Zellen, und nur *MTL*-homozygote Zellen sind überhaupt in der Lage, den Phänotypwechsel zu vollziehen (124, 139). In klinischen Isolaten sind etwa 5-7 % der *Candida*-Population paarungskompetent (124). Der Phänotypwechsel findet nicht nur spontan statt, sondern kann durch Umweltreize wie eine anaerobe Umgebung, die z.B. im Darm vorkommt, induziert werden (173). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass CO₂ den Phänotypwechsel induzieren und den opaken Phänotyp bei 37°C stabilisieren kann, da dieser bei Körpertemperatur häufig wieder zum weißen Phänotyp wechselt (82). Haut weist eine niedrigere Temperatur als das Körperinnere auf und ermöglicht daher durch die Erhaltung des opaken Phänotyps eine effiziente Paarung (105).

C. albicans ist ein Kommensale, der vornehmlich die Vagina, den Gastrointestinaltrakt sowie die orale Mucosa besiedelt und bei einem großen Anteil der Bevölkerung zur normalen Mikroflora gehört. In einer US-Studie wiesen 50 % der untersuchten gesunden Population orales Trägertum auf (44). In einer polnischen Studie an Vorschul- und Schulkindern waren 40 % mit *C. albicans* in der Mundhöhle kolonisiert (181). Die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes ist ebenfalls in diversen Studien untersucht worden. In zwei französischen Studien zur gastrointestinalen Besiedlung von Morbus-Crohn-Patienten war 2009 ein Anteil von 22 % der getesteten gesunden Kontrollgruppe im Darm kolonisiert, während 2006 in 40 % der Kontrollindividuen eine *C. albicans*-Kolonisation nachweisbar war (19, 211). Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie häufig *C. albicans* als harmloser Kommensale bei gesunden Individuen gefunden werden kann.

Ist das Immunsystem allerdings in seiner Funktionsfähigkeit beeinträchtigt, so kann *C. albicans* Infektionen verursachen. Man bezeichnet diesen Pilz daher auch als opportunistisches Pathogen.

3.1.2 Klinische Bilder und Epidemiologie der Candidose

Candidosen können mucosal oder systemisch auftreten. Zu den mucosalen Candidosen gehört die vulvovaginale Infektion. Eine weitere mucosale Candidose ist die orale Infektion mit der Ausbildung der typischen weißlichen Beläge („Mundsoor“).

Gelangt *C. albicans* in den Blutstrom, entwickelt sich eine lebensbedrohliche systemische Erkrankung, die Candidämie. Bei der Candidämie kann es auch zur Invasion von Organen wie z.B. Gehirn, Niere oder Leber kommen.

Mucosale Infektionen mit *C. albicans* sind recht häufig in der Bevölkerung zu finden. So tritt z.B. die vulvovaginale Candidose bei 75 % aller Frauen einmal in deren Leben auf (130).

Candidämien, die systemischen Erkrankungen, werden nicht nur durch *C. albicans* verursacht. Andere *Candida*-Spezies wie *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* oder *C. krusei* werden immer häufiger im Zusammenhang mit invasiven Erkrankungen assoziiert. Verschiedene Studien der letzten Jahre ergaben zusammengefasst, dass über die Hälfte der Erkrankungen jedoch immer noch durch *C. albicans* verursacht wird, während *C. glabrata* mit rund 15 % und *C. parapsilosis* mit rund 10 % vertreten sind (18, 208, 222). Der infektiöse Organismus variiert je nach Patientenkollektiv. Während in 70 % der *C. albicans*-Infektionen ein solider Tumor vorlag und in 36 % eine hämatologische Erkrankung, haben die nicht-*albicans*-Spezies höheren Anteil an hämatologischen Erkrankungen (228). Die Mortalität invasiver *Candida*-Infektionen ist speziesabhängig und liegt in Europa zwischen 28 und 59 %. Eine aktuelle US-Studie gibt die Mortalität für ausschließlich durch *C. albicans* verursachte Infektionen mit 33 % an (145).

Erkrankungen des Immunsystems wie etwa HIV begünstigen die Entwicklung von mucosalen Candidosen besonders im oralen und pharyngealen Bereich (185). Auch die Applikation von corticosteroidhaltigen Asthmasprays kann zur oralen Infektion führen, wenn die Anwendung längerfristig durchgeführt und damit eine Immunsuppression erreicht wird (61).

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer systemischen Erkrankung ist die Neutropenie, welche als Folge von Chemotherapien und Bestrahlungen bei Organtransplantierten oder Krebspatienten auftritt (2, 48, 93, 222). Des Weiteren stellen hämatologische Erkrankungen wie Leukämie einen Risikofaktor dar (163). *C. albicans* kann entweder durch Gewebepenetration den Blutstrom erreichen oder durch die Kontamination von intravaskulären Verweilkathetern. Kolonisation mit *C. albicans* und das gleichzeitige Tragen eines intravaskulären Verweilkatheters birgt ein großes Risiko für invasive Infektionen (16, 102, 140, 176). Sonden für künstliche Ernährung, ein langer Aufenthalt auf der Intensivstation, die systemische Gabe von Corticosteroiden oder Langzeitantibiotika begünstigen ebenfalls die Entwicklung einer Candidämie (32). In einer Studie wurde gezeigt, dass etwa 80 % der Infektionen katheterverursacht waren. Den zweithäufigsten Grund stellten Antibiotika dar (67 %), gefolgt von künstlicher Ernährung (32 %) und intra-abdominalen Eingriffen (31 %) (208). Man spricht im Falle der Can-

didosen, systemisch wie mucosal, von endogenen Infektionen, da solche Infektionen meist vom Träger selbst ausgehen.

3.1.3 Zellwandaufbau von *Candida albicans*

Den Hauptbestandteil der Zellwand, etwa 80 %, machen Polysaccharide aus. Davon sind etwa 60 % verzweigte Glucosepolymere mit β -(1,3)- und β -(1,6)-Verbindungen, die β -Glucane genannt werden. Chitin, ein *N*-Acetylglucosaminpolymer mit β -(1,4)-Verbindungen, ist mit einem Anteil von 1-9 % ein weiterer Polysaccharidbestandteil der Zellwand (50, 142). Die β -Glucane und Chitin bilden durch ihre rigide Struktur den Skelettteil der Zellwand. Die dritte Polysaccharidkomponente wird von Mannosepolymeren, auch Mannan genannt, gebildet, die den Matrixteil und die äußere Schicht der Zellwand darstellen und etwa 40 % der Gesamtmenge an Polysacchariden ausmachen (27, 29). Die mit der Zellwand kovalent assoziierten Proteine (Mannoproteine) zeichnen sich durch *N*- und/oder *O*-Glycosylierung aus. Sie sind entweder mit einem GPI-Anker über β -(1,6)-Glucan mit β -(1,3)-Glucan verknüpft oder, im Falle der sogenannten Pir-Proteine (proteins with internal repeats), direkt über Alkali-labile Bindungen mit dem β -(1,3)-Glucan. Eine andere Gruppe der kovalent assoziierten Zellwandproteine ist über Disulfidbrücken mit anderen Proteinen verbunden. Mit bis zu 88 % aller kovalent gebundenen Zellwandproteine stellen die GPI-Proteine die größte Gruppe dar (96, 129, 146). Neben den oben genannten drei Proteingruppen, welche durch den Besitz eines Sekretions-Signalpeptids gekennzeichnet sind, gibt es auch Proteine, die kein typisches Sekretionssignal besitzen, aber trotzdem in der Zellwand nachgewiesen werden können, so beispielsweise Proteine der hsp70 und hsp90-Familien (29). Bei diesen Proteinen ist unbekannt, ob und wie sie in der Zellwand verankert sind.

3.1.4 Virulenzfaktoren von *Candida albicans*

C. albicans verfügt über vielfältige Virulenzfaktoren. Der Polymorphismus, die Fähigkeit des Pilzes, von der Hefe- zur Hyphenform zu wechseln, ermöglicht das Überwinden von Gewebebarrieren. Im Prozess der Gewebeinvasion spielen auch die sezernierten Aspartatproteasen (Saps) eine wichtige Rolle. Des Weiteren wird eine Vielzahl von Adhäsinen exprimiert, die den Kontakt zwischen Pilz und Wirtszelle ermöglichen. In den folgenden Kapiteln sollen die oben genannten Virulenzfaktoren näher beschrieben werden.

3.1.4.1 Morphologische Plastizität von *Candida albicans*

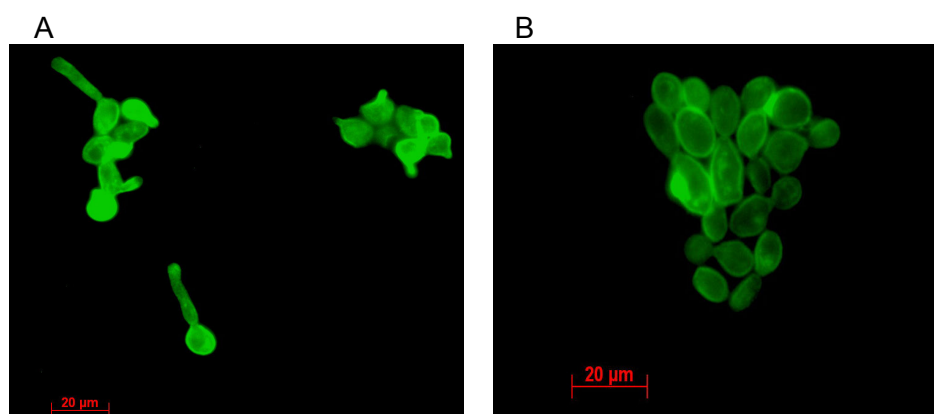


Abbildung 3-1: Morphotypen von *C. albicans*

- A:** verschiedene Stadien der filamentösen Wachstumsform.
 Rechts im Bild gerade auskeimende Hefen, links größere Keimschläuche.
B: Hefeform (Blastokonidien)
 Die Pilze wurden mit FITC angefärbt.

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* ist die morphologische Plastizität dieses Erregers. Einzelzellen der Hefeform werden Blastokonidien genannt (Abbildung 3-1 B). Unter bestimmten Bedingungen bilden die Blastokonidien längliche Auswüchse, die als Keimschläuche bezeichnet werden (Abbildung 3-1 A). Die Auskeimung von Hefen zu filamentösen Formen kann durch eine Vielzahl von Umwelteinflüssen induziert werden. Zu den wichtigsten Umwelteinflüssen, die die Auskeimung begünstigen, zählen ein Anstieg der Umgebungstemperatur auf 37°C, neutraler pH, Präsenz von Serum oder *N*-Acetylglucosamin im Medium, Adhärenz oder Kohlenstoffdioxid (131, 158, 202, 216). Durch kontinuierliches Wachstum der Keimschläuche beginnt die filamentöse Wachstumsphase, welche aus echten Hyphen besteht. Echte Hyphen sind durch Septen unterteilt, die innerhalb der Hyphen gebildet werden. Neben den echten Hyphen existiert eine weitere filamentöse Wachstumsform, die als Pseudohyphen bezeichnet wird. Pseudohyphen entstehen, wenn bei der Zellteilung der Blastokonidien eine Tochterzelle nach der Knospung weiterwächst, aber weiterhin mit der Mutterzelle verbunden bleibt (216). Es entsteht eine Kette von länglichen, aneinandergereihten Einzelzellen, die an echte Hyphen erinnern, aber statt Septen durch Einschnürungen getrennt sind. Unter ungünstigen Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel oder niedriger Temperatur kann *C. albicans* auf filamentösen Formen endständige, dickwandige Sporen, sogenannte Chlamyosporen, bilden. Von diesen wird vermutet, dass sie eine Überdauerungsform darstellen, was bisher allerdings noch nicht nachgewiesen wurde.

3.1.4.2 Genetische Regulation der morphologischen Plastizität

Die morphologische Plastizität ist von Wichtigkeit für die Invasion von *C. albicans* und bedarf daher einer genauen und komplexen Regulationsmechanismen unterworfenen Feinabstimmung (103). Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die Filamentation induzieren oder inhibieren. Der Transkriptionsfaktor Efg1 gehört den basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren an und stellt eine Downstream-Komponente des cAMP-PKA-Signalweges dar (14). Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von *EFG1* die Bildung von Pseudohyphen und den weiß-opaken Phänotypwechsel induzieren kann (43, 123, 214). Deletionsmutanten von *EFG1* weisen eine moderate Defizienz in der Hyphenbildung auf, wobei statt echten Hyphen Pseudohyphen gebildet werden (123). Unter Sauerstofflimitierung ist die Hyphenbildung dieser Mutante sogar verstärkt (206). Der Effekt von Efg1 auf die Filamentation scheint daher abhängig von den Wachstumsbedingungen zu sein.

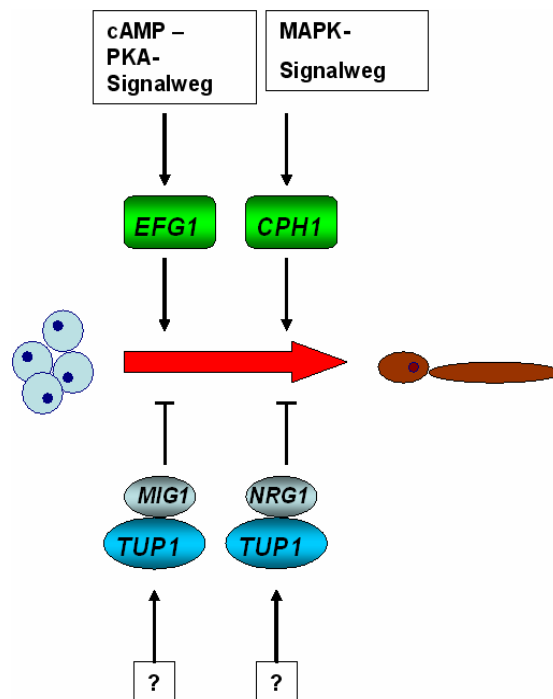


Abbildung 3-2: Genetische Regulation der morphologischen Plastizität

vereinfacht übernommen aus Biswas *et al.*, 2007

Dem Transkriptionsaktivator Cph1 kommt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Filamentation zu. Während Virulenz und Filamentation bei einer *EFG1*-Mutante moderat reduziert sind, zeigt eine *EFG1/CPH1*-Doppelmutante extreme Defekte in der Fähigkeit, Hyphen zu bilden. Auch die Virulenz ist drastisch vermindert, aber nicht komplett ausgeschaltet (31, 123). Neben den beiden positiven Regulatoren Efg1 und Cph1 spielt der negative Regulator Tup1, der die Beibehaltung der Hefeform vermittelt, eine wichtige Rolle. Wird *TUP1* deletiert, resultiert dies in einem

konstitutiv filamentösen Phänotyp, der Unfähigkeit, bei Temperaturen über 42°C zu wachsen sowie in einer veränderten, unförmigen Zellwand (20). Die konstitutive Filamentierung der *TUP1*-Mutante hängt offenbar von Efg1 ab, da eine *TUP1/EFG1*-Doppelmutante keine Hyphen mehr bildet (21). Die *TUP1*-Mutante ist trotz des filamentösen Phänotyps avirulent. Die Tatsache, dass eine Filamentierungsdefizienz wie bei der *EFG1/CPH*-Mutante trotzdem zu Organinfektionen führen kann und die konstitutive Filamentation der *TUP1*-Mutante mit Avirulenz verbunden ist, lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht die eine oder andere Wachstumsform für sich von Wichtigkeit sind, sondern die morphologische Plastizität, die dem Pilz eine optimale Anpassung an die jeweiligen Bedingungen ermöglicht.

3.1.4.3 Filamentspezifische Proteinexpression

Durch den Prozess der Auskeimung kann Gewebe durch das apikale Wachstum der Keimschläuche penetriert werden (209). Die durch die filamentöse Wachstumsform verursachte Gewebeinvasion und -degradation wird jedoch neben der mechanischen Schädigung durch eine Vielzahl von Effektorproteinen verursacht.

Tabelle 3-1: Hyphen-koregulierte, durch *EFG1* kontrollierte Gene*

Funktion	Name	Referenz
Adhäsionsfaktor	<i>ALS1</i> (nicht hyphenspezifisch)	(59)
	<i>ALS3</i>	(81, 213)
	<i>HWP1</i>	(201)
Sezernierte Aspartatproteasen	<i>SAP4</i>	
	<i>SAP5</i>	(51)
	<i>SAP6</i>	

* vereinfacht und gekürzt übernommen aus Kumamoto und Vincses, 2005

Einige mit der Virulenz assoziierte Proteine wie Adhäsine werden vor allem in filamentösen Formen exprimiert und durch Efg1 reguliert. Das Adhäsin Hwp1, ein Mannoprotein, ist in die Filamentation und die Zellwandregulation involviert. Eine Nullmutante kann auf serumhaltigem festem Nährboden keine Hyphen bilden, aber unter anderen Bedingungen wie z.B. serumhaltigem Flüssigmedium. Auch die Virulenz dieser Mutante ist in verschiedenen Modellen reduziert (201, 209, 224). Der Virulenzdefekt einer *EFG1*-Mutante kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass die für die korrekte Zellwandarchitektur notwendigen Gene wie z.B. *HWP1* nicht exprimiert werden und das Fehlen von Efg1-kontrollierten zellwandassoziierten Proteinen zu einer veränderten Zellwandstruktur führt.

Ein anderes durch Efg1 reguliertes Adhäsins, das Glycoprotein Als1 aus der *ALS*-Genfamilie, ist ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert. Als1 ist offenbar an der Entwicklung systemischer

Erkrankungen beteiligt, wie anhand eines hämatogen disseminierten Mausmodells gezeigt wurde (25).

Die *EFG1*-Mutante ist im Gegensatz zur *CPH1*-Mutante nicht in der Lage, Gewebe zu penetrieren oder zu schädigen, was darauf hindeutet, dass *EFG1*-regulierte Gene in diesen Prozess involviert sind. Mittels Antikörperfärbung konnten die sezernierten Aspartatproteasen Sap4-6 auf Hyphen nachgewiesen werden (51). Experimente mit serumhaltigem Medium zeigten, dass die Expression von *SAP4-6* in einer *EFG1*-Mutante reduziert war, in Experimenten mit pH- und Temperaturwechsel aber induziert wurde. *EFG1* kann somit als positiver oder negativer Regulator für *SAP4-6* angesehen werden. Da die Filamentation der *EFG1*-Mutante aber nicht durch Serum induziert werden kann, ist die Expression von *SAP4-6* nicht unbedingt mit der Hyphenbildung verbunden, sondern mit einem anderen Faktor, welcher ebenfalls Hyphenbildung reguliert (51). In Expressionanalysen konnte demonstriert werden, dass die Expression von *SAP5* unabhängig von *EFG1*, aber abhängig von *CPH1* verläuft. Während die Deletion von *EFG1* keinen Einfluss auf die *SAP5*-Expression hatte, führte die Deletion von *EFG1/CPH1* im RHE-Modell zu reduzierter *SAP5*-Expression. Sap5 ist demnach nicht an Hyphenbildung gekoppelt, da die *EFG1/CPH1*-Mutante nicht filamentiert. Auch *SAP4* und *SAP6* können offenbar hyphenunabhängig exprimiert werden, da Naglik *et al.* zeigten, dass die Expression von *SAP4* bzw. *SAP6* in oralen Monolayern und um RHE-Modell gering blieb, obwohl hyphales Wachstum vorhanden war (152). In einem anderen Infektionsmodell, basierend auf der Invasion muriner parenchymaler Organe, führte nur die Deletion von *SAP6* zu verringerter Gewebeinvasion, während die Pilze Hyphen bildeten und alle anderen Proteasen exprimiert wurden (51). *EFG1* reguliert nicht nur hyphenspezifische Gene, sondern ebenso die Expression von *SAP1-3*, die primär von Hefen sezerniert werden (99).

Neben *Efg1* spielt der Repressor *Tup1* in der Regulation der Saps eine Rolle. Der Transkriptionsfaktor *Nrg1* reprimiert durch die Rekrutierung des Repressors *Tup1* hyphenspezifische Gene, z.B. *SAP5*. Eine *NRG1*-Deletion führt zu konstitutiver Filamentation und einer Derepression von *SAP5* (150). Der Transkriptionsfaktor *Mig1* agiert ähnlich wie *Nrg1* und reprimiert durch *Tup1* die Expression von *SAP9*. *Tup1* kann darüber hinaus unabhängig von beiden Transkriptionsfaktoren die Expression von *SAP6* und *SAP7* reprimieren (148).

3.1.4.4 Sezernierte Aspartatproteasen

Die Familie der sezernierten Aspartatproteasen (engl. secreted aspartic proteases = Saps) umfasst 10 Mitglieder, die aufgrund von Sequenzhomologien in drei Gruppen eingeteilt werden können (Abbildung 3-3). Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie zwei konservierte Aspartatreste im aktiven Zentrum und die typischen Sequenzmotive aller Aspartatproteasen besitzen. Des Weiteren existieren konservierte vier Cysteinreste in der Sap-Familie, welche in die Beibehaltung der dreidimensionalen Struktur involviert sein könnten (85). Die Gene der Saps kodieren

Preproenzyme, welche 60-200 Aminosäuren länger sind als das fertige Enzym. Die Sekretion beginnt im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER), wo das N-terminale Signalpeptid (Prepeptid) entfernt wird. Im Trans-Golgi-Netzwerk wird anschließend das Propeptid an einer Lysin-Arginin-Prozessierungsstelle von der Subtilisin-Endoprotease Kex2 abgespalten (94). Es wird vermutet, dass die Proregion des Proteins eine Art Chaperon darstellt, welches die korrekte Faltung im ER kontrolliert, da Sap1 ohne das Propeptid im ER zurückgehalten wird (6). Als letztes erfolgen die Verpackung in sekretorische Vesikel und der Transport zur Membran. Es wird vermutet, dass das prävakuläre Proteinsortiergen *VPS4* in die extrazelluläre Sekretion involviert ist (113). Sap1-8 werden sezerniert, während Sap9 und Sap10 C-terminale Konsensussequenzen für einen GPI-Anker besitzen, der sie in Zellwand (Sap10) und Zellmembran (Sap9 und Sap10) verankert (1, 192).

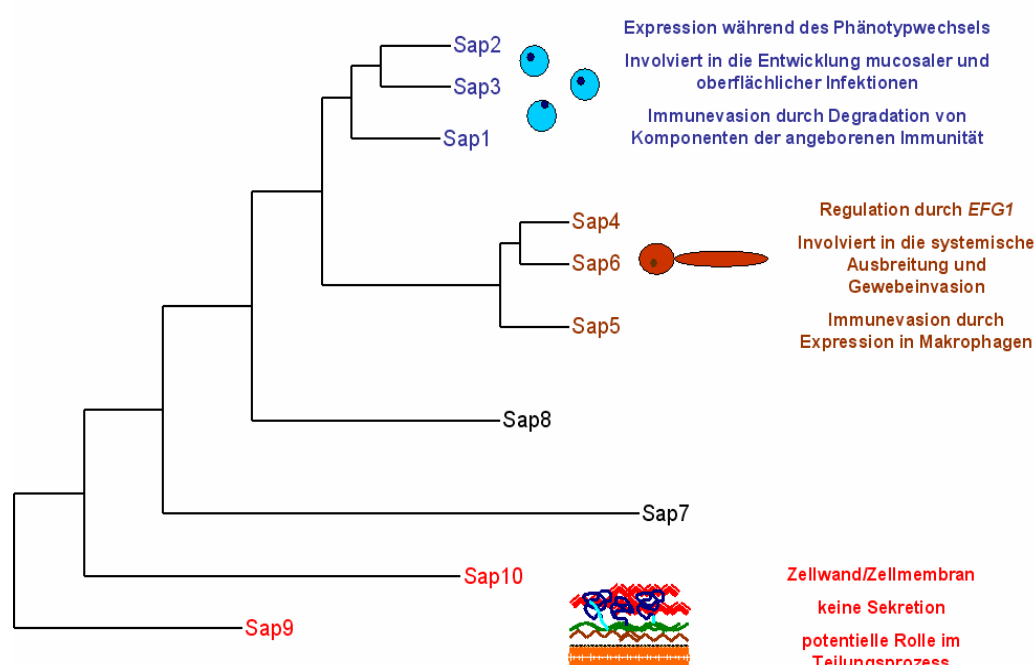


Abbildung 3-3: Dendrogramm der SAP-Genfamilie
(basierend auf den Sequenzhomologien; nach Netea *et al.*, 2008)

Sap1-3 weisen eine Homologie von 67 % zu den anderen Isoenzymen auf und stellen die erste Gruppe innerhalb der Enzymfamilie dar. Das Expressionsoptimum liegt im sauren pH-Bereich, wie er z.B. in der Vagina und auf der Haut vorherrscht. Sap1-3 werden hauptsächlich bei Hefen detektiert, können aber auch bei Hyphen nachgewiesen werden. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Sap1-3 eine Rolle in mucosalen Infektionen zukommt. In verschiedenen Epithelmodellen wie dem vaginalen rekonstituierten Humanepithel (reconstituted human epithelium, RHE) oder dem oralen Epithelmodell war die Gewebeschädigung durch Deletionsmutanten

reduziert. In einem Ratten-Vaginitismodell waren Sap1-3 für die Manifestation der Infektion entscheidend (40, 191, 194). Auch die zelluläre Kommunikation durch Zytokine wird durch Sap1-3 beeinflusst. Deletion von *SAP1* und *SAP2* führten zu reduzierter Zytokinfreisetzung von Epithelzellen (193). Während die Studien mit Deletionsmutanten eine Rolle von Sap1-3 in Epithelinfektionen propagieren, zeigen Expressionsanalysen mittels RT-PCR und Rekombinase-basiertem Reportersystem, dass die Expression von *SAP1-3* in rekonstituiertem humanem Epithel, in Monolayern oraler Zellen und in Mundhöhlenabstrichen von HIV-Patienten detektierbar, aber niedrig bleibt (116, 152). Eine weitere Studie konnte Transkripte von *SAP1-3* in Patienten mit oraler Candidose nachweisen (195). Die im Hinblick auf die Expression sehr unterschiedlichen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass aufgrund der verschiedenen Techniken und Modelle die Ergebnisse variieren können.

Wenn Proteine die einzige zur Verfügung stehende Stickstoffquelle darstellen, ist die Expression der Saps essentiell für das Überleben des Pilzes (84, 210). Die unter solchen Bedingungen dominierende Protease ist Sap2, die sich durch ein sehr breites Substratspektrum auszeichnet (84, 238). Zu den Substraten gehören Mucin, welches normalerweise mucosale Oberflächen schützt, Keratin, Kollagen, aber auch Bestandteile des Immunsystems wie IgA, Lactoferrin, Cathepsin D oder Komplement (33, 69, 83, 95, 184). Kürzlich wurde gezeigt, dass Sap1-3 Komplement C3b, C4b und C5 degradieren können (72). Die oben genannten Beispiele verdeutlichen, dass ein großer Teil der Sap-Substrate nicht nur der Nährstoffgewinnung dient, sondern vielmehr der Gewebeinvasion und Immunevasion.

Der Wechsel vom weißen zum opaken Phänotyp ist ein Bestandteil des Paarungsprozesses von *C. albicans*, da opake Zellen eine deutlich höhere Paarungskompetenz besitzen (139). Dass Expression von Saps auch in opaken Zellen stattfindet, konnte für *SAP1-3* demonstriert werden (215, 238).

Die zweite Gruppe innerhalb der Sap-Enzymfamilie, Sap4-6, weist eine Homologie von 89 % zu den anderen sieben Isoenzymen auf. Im Gegensatz zu *SAP1-3* werden *SAP4-6* im neutralen pH-Bereich exprimiert. Mit Sap-spezifischen Antikörpern wurden Sap4-6 auf Hyphen nachgewiesen (51). Wie bereits in Kap 3.1.4.3 beschrieben, werden *SAP4-6* durch den Transkriptionsfaktor Efg1 reguliert, der auch die Filamentation beeinflusst. Die Expression von *SAP4-6* ist jedoch nicht zwangsläufig an die Filamentation gekoppelt (s. Kap.3.1.4.3). In systemischen Modellen der Candidose wie der intravenösen Injektion, der Invasion parenchymaler Organe und einem murinen Peritonitismodell konnte eine reduzierte Virulenz von Deletionsmutanten nachgewiesen werden (51, 101, 186). Auch in der Immunevasion spielen Sap4-6 eine Rolle. Deletionsmutanten können wesentlich effektiver von Makrophagen abgetötet werden als der Wildtyp (17). Zwei neuere Studien zeigen, dass die Expression von *SAP4-6* im RHE-Modell und in Monolayern oraler Zellen unterschiedlich verläuft. Während *SAP5* das konstitutiv am höchsten exprimierte *SAP*-Gen war, blieb die Expression von *SAP4* und *SAP6* niedrig trotz Hyphenbil-

dung. Auch zur Gewebeinvasion und Gewebeerstörung tragen Sap4-6 in diesen Studien nicht bei (116, 152). Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Felk *et al.*, die eine reduzierte Gewebeschädigung von murinen Organen nach Infektion mit einer *SAP4-6* Mutante beobachteten (51). Die Erkenntnisse zeigen, dass je nach Lokalisation der Infektion die Expression der Saps variiert und dass *SAP4-6* eher in der Invasion innerer Organe als in der Zerstörung von Epithelien eine Rolle spielen. Auch Komplementation von deletierten Proteasen wurde beobachtet. Im RHE war die Expression von *SAP5* deutlich erhöht, wenn *SAP1-3* deletiert wurden, und Deletion von *SAP4-6* führte zu einer verstärkten *SAP2*-Expression (116, 152). Die variable Expression der Saps und ihre Fähigkeit, fehlende Proteasen zu komplementieren, ermöglicht eine gesicherte Nährstoffversorgung des Pilzes und die effiziente Invasion verschiedener Gewebetypen.

Sap7 und Sap8 sind die am wenigsten untersuchten Proteasen der Sap-Familie und ihre Funktion ist noch weitgehend unklar. Sap7 weist eine Homologie von 27 % zu den anderen Isoenzymen auf (144). Vaginalabstriche und Speichel von Patienten, die an vaginaler bzw. oraler Candidose erkrankt waren, wiesen deutlich mehr *SAP7*-Transkripte auf als die der gesunden Kontrollgruppe (153, 154). Im murinen intraperitonealen Infektionsmodell konnte Induktion von *SAP7* nicht detektiert werden, während im murinen Modell der Vaginitis eine deutliche Hochregulation von *SAP7* stattfand (51, 219). Die Expression von *SAP7* ist jedoch nicht entscheidend für die Entwicklung der Erkrankung, wie anhand von Deletionsmutanten gezeigt wurde (219). *SAP8* ist temperaturreguliert mit einem Optimum bei 30°C, wird aber auch bei Körpertemperatur in humanen und Tiermodellen detektiert (143, 154, 177).

Im Gegensatz zu Sap1-8 werden Sap9 und Sap10 nicht ins Medium abgegeben. Sie besitzen C-terminale Konsensussequenzen für einen GPI-Anker, der sie in Zellwand (Sap10) und Zellmembran (Sap9 und Sap10) verankert (1). Daher besitzen sie strukturelle Ähnlichkeiten mit den Yapsinen aus *Saccharomyces cerevisiae*. Beide Proteasen spalten ihre Substrate an basischen oder dibasischen Prozessierungsstellen (1). Die Expression wurde *in vivo* und *in vitro* untersucht, sie erfolgt offenbar unabhängig von pH und Morphotyp. Deletionsmutanten von *SAP9* und *SAP10* weisen in SD-Medium einen abnormalen Phänotyp auf, da sie sich bei der Knospung nicht vollständig von der Mutterzelle ablösen und Aggregate bilden, was zu der Annahme geführt hat, dass Sap9 und Sap10 eine Rolle in zellulären Prozessen spielen. Die Deletion von *SAP9* oder *SAP10* führt zu reduzierter RHE-Invasion und verändertem Adhärenzverhalten (1). *SAP9* und *SAP10*-Transkripte konnten sowohl bei asymptomatischen Trägern als auch bei Candidose-Patienten in 80-90 % der Speichelproben nachgewiesen werden. *SAP9* ist das konstant am höchsten exprimierte *SAP*-Gen in RHE-Experimenten, in oralen Zellkulturen, in Patientenproben und im murinen HIV-Modell (152, 177). In der Leber infizierter Mäuse konnte *SAP9* ebenfalls nachgewiesen werden (51). Aber auch die Gabe von Antimykotika wie z.B. Fluconazol oder Caspofungin oder Biofilmbildung verstärken die Expression von *SAP9* (35, 65).

3.2 *Aspergillus fumigatus*

3.2.1 Erregerbiologie

Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* gehört der Abteilung der Ascomycota, der Schlauchpilze, an. Der Name leitet sich von dem lateinischen Wort *fumus* (Rauch) ab und verweist auf die grau-grüne Farbe des in den Konidien enthaltenen Pigments 1,8-Dihydroxynaphtalen-Melanin. *A. fumigatus* ist ein Saprophyt, der von verrottendem pflanzlichen Material wie Kompost lebt und aufgrund seiner großen Temperaturtoleranz von 12-56°C sowohl in feucht-kalten Räumen als auch im warmen Inneren von Komposthaufen oder Mülltonnen anzutreffen ist.

Die Verbreitung in der Umwelt erfolgt durch die asexuell gebildeten Konidien, die einen Durchmesser von 3 µm besitzen. Pro Kubikmeter Luft können in geschlossenen Räumen bis zu 100 Konidien enthalten sein, die bei ausreichender Feuchtigkeit und gutem Nährstoffangebot auskeimen und Hyphen bilden. Diese wachsen zu einem neuem Myzel aus, auf dem bei guter Belüftung neue Fruchtkörper (Konidiophoren) mit Konidien entstehen (Abbildung 3-4). Pro Konidiophor werden etwa 10000 neue Konidien gebildet.

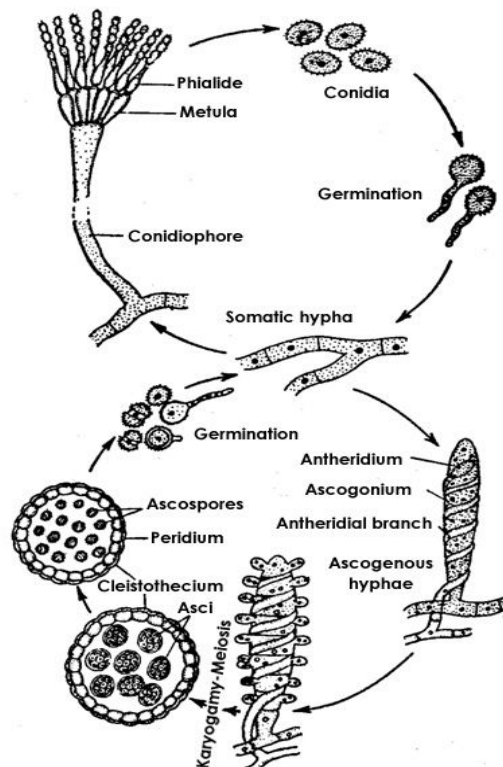


Abbildung 3-4: Lebenszyklus von *A. fumigatus*

mit asexuellem Weg (oberer Teil) und sexuellem Weg (unterer Teil).

Quelle: http://www.fao.org/inpho/content/compend/img/ch31/fig_4_1_4b.jpg

Eine Person atmet pro Tag einige hundert Konidien ein, welche bei immunkompetenten Individuen in den Alveolen von Phagozyten eliminiert werden und damit kein gesundheitliches Risiko

bergen (108). Lange wurde darüber spekuliert, ob *A. fumigatus* einen sexuellen Vermehrungszyklus besitzt, da die Präsenz von Mating-Typ-Genen und anderen mit sexueller Vermehrung zusammenhängenden Genen bekannt war (168). In diesem Jahr konnte gezeigt werden, dass *A. fumigatus* tatsächlich einen voll funktionsfähigen sexuellen Zyklus mit Kleistothezienbildung und Ascosporen aufweist (157). Die Existenz eines sexuellen Vermehrungszyklus führt zu einer größeren genetischen Variation durch die Rekombination von Genen, wobei Nachkommen entstehen können, welche erhöhte Virulenz oder Antimykotikaresistenzen besitzen. Daher ist ein sexueller Vermehrungszyklus von medizinischer Bedeutung (46). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Isolate mit einem bestimmten Paarungstyp häufig klinischen, invasiven Isolaten entstammen (3, 4).

3.2.2 Klinische Bilder und Epidemiologie der Aspergillose

Im Unterschied zu *C. albicans*-vermittelten Infektionen handelt es sich bei Aspergillosen um sogenannte exogene Infektionen, da dieser Pilz nicht als Kommensale auf oder im menschlichen Körper lebt und eine Inhalation der Konidien notwendig ist, um eine Erkrankung auszulösen.

Die Inhalation der Konidien hat für immunkompetente Personen normalerweise keine Folgen. Bisweilen können bei starker Konidienexposition Allergien auftreten. Im Zusammenhang mit einer Immunsuppression, wie sie durch Neutropenie, Antibiose, Corticosteroide oder Zytostatika entsteht, kann eine Konidieninhalation jedoch Krankheiten von bronchopulmonalen Entzündungen bis hin zur sogenannten invasiven (disseminierten) Aspergillose verursachen (36, 132, 133, 171). Diese ist durch die Ausbreitung des Pilzes von der Lunge in diverse Organe wie z.B. Nieren oder Gehirn gekennzeichnet (5, 109). Risikopatienten sind Individuen mit hämatologischen Erkrankungen, COPD, Asthma, Organtransplantat-Empfänger und Patienten mit Tumoren (36, 57). Durch die immer häufiger durchgeführten Stammzelltransplantationen und die damit verbundenen langen Chemotherapien nimmt auch die Zahl der invasiven Aspergillosen zu. Bei 5-15 % dieses Patientenkollektivs tritt im Laufe der Chemotherapie auch eine Aspergillose auf (77). Die Letalität in Europa variiert je nach Patientenkollektiv. Während sie bei Patienten mit akuter myelogener Leukämie 38 % beträgt, sterben bis zu 94 % der nicht-neutropenischen Patienten (36, 57, 163, 164).

Daher ist es sehr wichtig, bei Verdacht (z.B. hohes Fieber und Husten) oder bestehender Diagnose einer Aspergillose sofort das richtige Antimykotikum zu verabreichen. Allerdings ist anzumerken, dass trotz Behandlung ein beträchtlicher Teil der Patienten letztendlich an der Mykose verstirbt (122).

3.2.3 Zellwandaufbau von *Aspergillus fumigatus*

Der erste Kontakt zwischen Pilz und Immunsystem ist die Pilzzellwand, die bei *A. fumigatus* aus β -(1,3)-Glucan, Galaktomannan, Chitin und Galaktomannanproteinen besteht (11, 54). Hinsichtlich der β -Glucan-Komposition unterscheidet sich *A. fumigatus* von *C. albicans* durch das Fehlen von β -(1,6)-Glucan und durch die Präsenz eines linearen β -(1,3)/(1,4)-Glucans (55). Das verzweigte β -(1,3)/(1,6)-Glucan ist über β -(1,4)-Verbindungen an Chitin gebunden und stellt den rigiden Teil der Zellwand dar. Diese Schicht macht etwa 30 % der gesamten Zellwand aus, das lineare β -(1,3)/(1,4)-Glucan etwa 10 % (110). In einer vergleichenden Analyse von Zellwandproteinen aus *S. cerevisiae* wurden 81 putative GPI-Proteine in *A. fumigatus* identifiziert (24, 26, 73). Auch Proteine, die nicht kovalent gebunden sind, können in der Zellwand lokalisiert sein, so z.B. die Phosphatase *phoAp* (12).

3.2.4 Virulenzfaktoren von *Aspergillus fumigatus*

3.2.4.1 Pigmentbildung als Virulenzfaktor

Das Melanin der Konidien ist ein wichtiger, für die Zellwandintegrität essentieller Bestandteil (170). Die Pigmentierung der Konidien führt weiterhin zu einer Maskierung der darunterliegenden Zellwandpolysaccharide und stellt somit eine Immunevasionsstrategie dar (30). Das für eine Polyketidsynthase kodierende Gen *pkpP* ist in die Melaninsynthese involviert und wurde daher in verschiedenen Studien deletiert, um seine Funktion zu untersuchen. Es zeigte sich, dass *pkpP* nicht nur in Konidien, sondern auch in Keimschläuchen exprimiert wird (106). *PkpP* ist in die Phagolysosomfusion und damit in die Abtötung durch Makrophagen involviert, da eine *pkpP*-Mutante zu stärkerer Phagolysosomfusion führte als der Wildtyp (91). Dies indiziert, dass *A. fumigatus* durch Pigmentbildung in der Lage ist, den Prozess der Degradation durch das Phagolysosom zu inhibieren. Des Weiteren stellt die *pkpP*-abhängige Melaninsynthese einen Schutzmechanismus gegen von Phagozyten generierten ROS dar (90, 107).

3.2.4.2 Gliotoxin

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist das Epipolythiodioxopiperazin Gliotoxin, das als Sekundärmetabolit gebildet wird. Die Synthese von Gliotoxin wird über ein Cluster von zwölf Genen reguliert. Zwei dieser zwölf Gene wurden intensiv studiert: *GliZ*, ein für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodierendes Gen, welcher die Expression der anderen elf Gene kontrolliert, und *GliP*, ein für eine nonribosomale Peptidsynthase kodierendes Gen. Anhand von *GliZ* und *GliP*-Deletionsmutanten konnte demonstriert werden, dass das Gencluster in der Tat die Synthese von Gliotoxin reguliert. Deletionen von *GliZ* oder *GliP* hatten zur Folge, dass kein Gliotoxin mehr produziert wird (37, 104, 217).

Der Wirkmechanismus von Gliotoxin beruht wahrscheinlich zum Teil auf einer Kreuzvernetzung des Toxins mit Proteinen, wobei ROS entstehen (66, 232). Des Weiteren aktiviert Gliotoxin das

proapoptotische Protein Bak. Die daraus resultierende ROS-Generation fördert die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien (169). Auf Zellen der angeborenen Immunität hat Gliotoxin eine suppressive Wirkung. Es inhibiert sowohl die Phagozytose als auch den Transkriptionsfaktor NFκB und induziert Apoptose in Makrophagen und Monozyten (49, 147, 165, 212, 233). Gliotoxin verhindert das Zusammenfügen der NADPH-Oxidase-Untereinheiten neutrophiler Granulozyten, was zur Folge hat, dass kein oxidativer Burst mehr stattfinden kann (225, 242). Darüberhinaus führt eine Inkubation mit Gliotoxin bei neutrophilen Granulozyten zu einer Veränderung des Aktin- Zytoskeletts und zur Inhibition der Phagozytose (34).

In *in vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Gliotoxin auf die Letalität bei Mäusen ergaben unterschiedliche Erkenntnisse. Während die Infektion mit Gliotoxin-Deletionsmutanten bei Cortisonacetat-immunsupprimierten Mäusen zu einer längeren Lebensdauer führte als bei der Infektion mit dem Wildtyp, war dies bei Mäusen, die durch die Kombinationsbehandlung mit Cortisonacetat und Cyclophosphamid eine Neutropenie entwickelten, nicht der Fall (15, 37, 104, 207, 217). Dies deutet darauf hin, dass neutrophile Granulozyten ein primäres Ziel von Gliotoxin darstellen und dass Gliotoxin besonders bei nicht-neutropenischen Patienten durchaus einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Aspergillose hat.

3.3 Der neutrophile Granulozyt und seine Bedeutung in der Bekämpfung von *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*

3.3.1 Einführung

Neutrophile Granulozyten sind Zellen der angeborenen Immunität. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von Infektionen, da sie innerhalb von wenigen Stunden an den Ort der Infektion gelangen und den Hauptanteil der Leukozytenpopulation ausmachen. Jeden Tag bilden sich aus pluripotenten Knochenmarks-Stammzellen eines gesunden Erwachsenen bis zu 10^{11} neutrophile Granulozyten, die, sobald sie den Blutkreislauf erreichen, eine recht kurze Lebensdauer von bis zu acht Stunden haben. Sind neutrophile Granulozyten durch einen Stimulus aktiviert worden, so kann sich ihre Lebensdauer jedoch auf bis zu zwei Tage verlängern. Aufgrund ihrer guten Mobilität und den mannigfaltigen Effektormechanismen sind neutrophile Granulozyten entscheidend für die akute Phase von Infektionen (97, 172, 197).

Die Zellen sind durch ihre segmentierten Nuklei und verschiedene zytoplasmatische Granula charakterisiert (Abbildung 3-5). Es wird zwischen azurophilen, spezifischen und Gelatinase-Granula unterschieden, die essentiell für die Eliminierung von Pathogenen sind. Die Granula enthalten jeweils charakteristische Proteasen, antimikrobielle Peptide und Enzyme. Sie fusionieren bereits 20 s nach der Aufnahme von Partikeln mit dem Phagosom und sie machen bis zu 40 % des Vakuolen-Volumens aus (74).

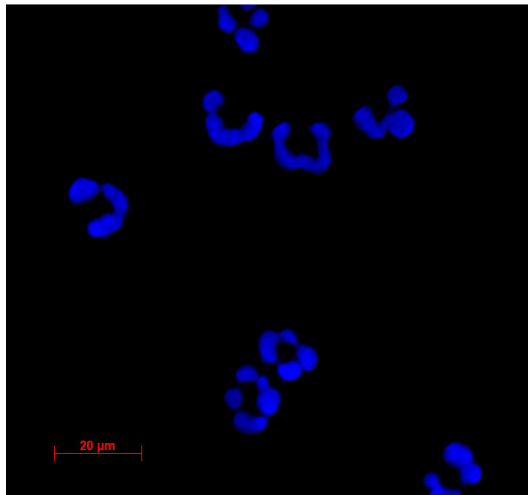


Abbildung 3-5 :Die charakteristischen Nuklei neutrophiler Granulozyten
(gefärbt mit DAPI).

Neben der Degranulation, der Freisetzung der granulären Komponenten, verfügt der neutrophile Granulozyt auch über sauerstoffabhängige Mechanismen, um Mikroorganismen effektiv zu eliminieren. Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Phagosom, der sogenannte oxidative Burst, schädigt aber auch umliegendes Gewebe. Daher ist eine fein abgestimmte Regulation zwischen Abtötung und Gewebeschädigung von großer Bedeutung. Die wichtigsten Effektormechanismen der neutrophilen Granulozyten sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

3.3.2 Chemotaxis

Wie andere Phagozyten zeigen auch neutrophile Granulozyten das Verhalten der Chemotaxis, d.h. das gerichtete Bewegen in Richtung eines ansteigenden Gradienten mikrobieller Moleküle. Die Migration ist der erste Schritt zur Beseitigung einer Infektion. Mit Geschwindigkeiten von bis zu 20 μm pro Minute zählen die neutrophilen Granulozyten zu den schnellsten mobilen Säugerzellen (45, 156).

Die für die Chemotaxis relevanten Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren. Nachdem ein chemotaktischer Faktor an die Rezeptoren gebunden hat, werden G-Proteine aktiviert, denen in neutrophilen Granulozyten eine komplexe Signalkaskade folgt. Diese regulatorischen Systeme beinhalten unter anderem die Proteinkinase C-Familie, kleine GTP-bindende Proteine sowie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (156).

Zytokine wie IL-1, IL-8 oder TNF- α , die von aktivierten Makrophagen abgegeben werden, rekrutieren die neutrophilen Granulozyten, und durch autologe Sekretion von IL-8 können neutrophile

Granulozyten selbst ihre Migrationsaktivität verstärken. Die Zytokine bewirken aber nicht nur die Migration von neutrophilen Granulozyten, sondern sie stimulieren auch Endothelzellen, Selektine und Integrin-Liganden zu produzieren. So wird es den neutrophilen Granulozyten ermöglicht, über die Endothelzellen zu „rollen“, zu adhären und anschließend trans- oder parazellulär ins Gewebe zu invadieren. Dieser Vorgang wird als Diapedese bezeichnet.

C. albicans ist in der Lage, Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten zu induzieren, was zunächst anhand von Experimenten mit Kulturüberständen demonstriert werden konnte (38, 47, 204). Einige der chemotaktischen Faktoren werden nur in der „white“-Phase gebildet, offenbar, damit der Prozess der Paarung ungehindert ablaufen kann (68). Gelöstes β -1,6-Glucan konnte als ein chemotaktischer Faktor identifiziert werden, ebenso wie Pra1, ein Fibrinogen-Bindeprotein, welches an Integrin $\alpha_M\beta_2$ bindet und auf diese Weise Migration von Leukozyten induziert (187, 205). Zu den Rezeptoren, die in die *C. albicans*-vermittelte Chemotaxis involviert sind, gehören neben Integrin $\alpha_M\beta_2$ auch der Formyl-Peptidrezeptor neutrophiler Granulozyten, an den eine bisher unbekannte von *C. albicans* produzierte Substanz bindet (47). Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, zwischen den Morphotypen des Pilzes zu differenzieren. In Experimenten mit gemischten Kulturen, in denen gleichzeitig Hefen und Keimschläuche enthalten sind, werden Keimschläuche schnell attackiert, während Hefen zunächst ignoriert werden (240). Keimschläuche induzieren eine deutlich gesteigerte Migration, während Hefen einen schwachen Stimulus darstellen. Durch Inhibition des ERK-Signalweges wurde die Migration zu Keimschläuchen stark reduziert, was für eine Schlüsselrolle dieser Signalkaskade in der Erkennung von *C. albicans* spricht (240).

Kulturüberstände von *A. fumigatus* wirken inhibitorisch auf die Migration, zurückzuführen ist dies unter anderem auf Gliotoxinproduktion (151, 234). Weitere Proteine, die die Migration unterdrücken können, sind die alkalische Protease und das Toxin Restrictocin, deren Deletion zu einer Steigerung der Chemotaxis verglichen mit dem Wildtyp führt (86).

3.3.3 Phagozytose und Abtötung

Haben die neutrophilen Granulozyten mittels Chemotaxis den Infektionsherd erreicht, werden mit sogenannten Pathogen-Erkennungsrezeptoren (engl. pathogen recognition receptors, PRRs) die Adhäsion der Mikroorganismen an die Zelloberfläche und die Phagozytose eingeleitet (155). Neutrophile Granulozyten exprimieren Lectine wie Dectin-1, Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) und Komplementrezeptoren (155). Dectin-1 besitzt eine C-Typ-Lectindomäne, mit der es β -Glucane der Pilzzellwand erkennt (155). Durch die Tyrosinkinase Syk und das „Caspase recruitment domain protein 9“ (CARD 9) werden protektive Reaktionen wie die Produktion von IL-2, IL-10, IL-6 und IL-17 induziert (71, 115, 178). Die Synergie von TLR2 und Dectin-1 kann zu einer Aktivierung von MAPK-Signalwegen und NF κ B führen, wodurch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α produziert werden (23, 63). *C. albicans* ist aufgrund seiner morphologischen

Plastizität in der Lage, die Erkennung durch Dectin-1 zu verhindern, da die β -Glucane von Hyphen nicht an der Zelloberfläche lokalisiert, sondern durch die Schicht von Mannoproteinen bedeckt sind (39, 64). *In vivo*-Nachweise von exponiertem β -Glucan im Mausmodell zeigten jedoch, dass nach fünf Tagen Infektionszeit β -Glucan auch auf der Oberfläche von Hyphen deutlich detektierbar war. Der genaue Hintergrund dieser Exponierung ist unklar. Es wird vermutet, dass infiltrierende Immunzellen die Pilze angreifen, was zu einer Schädigung der Zellwand und damit zur Zugänglichkeit des β -Glucans für Dectin-1 führt (237). Die Strategie des „Maskierens“ nutzt auch *A. fumigatus*, der durch die Pigmentierung der Konidien eine Erkennung durch PRRs verhindern kann.

Dectin-1 hat in der Bekämpfung von *A. fumigatus* nach neuen Erkenntnissen große Bedeutung, da Dectin-1-defiziente Mäuse eine hohe Mortalität aufwiesen und nur geringe Mengen an Zytokinen produzierten. Neutrophile Granulozyten der Knockout-Mäuse waren stark beeinträchtigt, einen oxidativen Burst und damit die Abtötung auszulösen (236). Auch in der Kontrolle von *C. albicans*-Infektionen spielt Dectin-1 eine wichtige Rolle. Intravenöse Injektion von *C. albicans* führte bei Dectin-1-defizienten Mäusen zu gesteigerter Mortalität verglichen mit Wildtyp-Mäusen, und Mäuse mit Dectin-1-defizienten Makrophagen hatten Schwierigkeiten, gastrointestinale Infektionen mit *C. albicans* effizient zu bekämpfen (62, 220). Menschen mit einer Mutation im für Dectin-1 kodierenden Gen und daraus resultierender Dectin-1-Defizienz zeigen sich nur für mucosale Candidosen anfällig. Die durch *C. albicans* induzierte Zytokinausschüttung dieser Personen ist defekt, jedoch sind Phagozytose und Abtötung des Pilzes durch Immunzellen nicht verändert (53).

TLR2 und TLR4 sind die wichtigsten in die antifungale Reaktion involvierten TLRs. Während TLR2 Phospholipomannan erkennt und eine MyD88/Erk-abhängige antiinflammatorische Reaktion induziert, führt die Aktivierung von TLR4 durch Mannan über MyD88/NF κ B-Signalwege zu einer proinflammatorischen Reaktion. Daher ist eine fein tarierte Balance zwischen beiden Rezeptoren von großer Bedeutung für die Entwicklung der Infektion. Neutrophile Granulozyten *TLR2*-defizienter Mäuse haben durch die fehlende antiinflammatorische Reaktion eine reduzierte Lebenszeit und funktionelle Defizite, was sich in einer Ausbreitung von *C. albicans* äußert (221). *C. albicans*-Hefen und *A.fumigatus*-Konidien induzieren eine *TLR2*-Hochregulation, während beide Morphotypen von *C. albicans* sowie *A.fumigatus*-Konidien eine *TLR4*-Aktivierung bewirken (9). Die Bekämpfung von *A. fumigatus* durch humane neutrophile Granulozyten verläuft morphotypabhängig. *TLR2* wird bei der Inkubation mit Konidien hochreguliert, während erhöhte Mengen an *TLR4*-mRNA bei Inkubation mit Konidien und Hyphen detektiert werden können. Beide Morphotypen, Konidien und Keimschläuche, induzieren einen oxidativen Burst. Die Expression der einzelnen TLRs ist an verschiedene Effektorfunktionen gekoppelt. Während *TLR2*-Expression Gelatinasefreisetzung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach sich

zieht, bewirkt TLR4 die Freisetzung azurophiler myeloperoxidasepositiver Granula sowie IL-10-Sekretion (10).

Neben Dectin-1 und den TLRs ist auch der Komplementrezeptor 3 in die Erkennung und Phagozytose von *C. albicans* involviert. Bereits vor längerer Zeit wurde entdeckt, dass β -Glucan die Stimulation von neutrophilen Granulozyten durch den Komplementrezeptor 3 vermitteln kann. Neuere Arbeiten zeigen, dass diese Stimulation durch β -1,6-Glucan und nicht durch das in der Zellwand dominierende β -1,3-Glucan hervorgerufen wird (179, 182). Bindung der Komplementregulatoren Faktor H (FH) und Faktor H-related Protein 1 (FHR1) an den Komplementrezeptor 3 vermitteln Adhärenz neutrophiler Granulozyten an *C. albicans* und verstärken die antimikrobielle Aktivität der Zellen (125).

Bei der Abtötung von *C. albicans* unterscheiden neutrophile Granulozyten zwischen beiden Morphotypen. Während Keimschläuche nur von mobilen Zellen eliminiert werden, können Hefen auch bei einer Immobilisierung des Aktin-Zytoskeletts phagozytiert und abgetötet werden (240). Die Phagozytose ist in einer dreidimensionalen Umgebung, wie es dem Gewebe entspricht, am effizientesten. *A. fumigatus* trifft in den Alveolen der Lunge auf eine zweidimensionale Umgebung und wird daher in einer solchen besser phagozytiert (8).

C. albicans kann nach der Phagozytose durch Makrophagen die Fusion des Phagosoms mit lysosomalen Komponenten inhibieren, überleben und durch Auskeimung die Makrophagen zerstören (52, 127). In den Phagosomen neutrophiler Granulozyten ist der Pilz nicht in der Lage, Immunevasion durch Auskeimung zu betreiben (183). Jedoch hat *C. albicans* Mechanismen entwickelt, der Abtötung anderweitig zu widerstehen. Das Neutrophilen-Phagosom ist arm an Aminosäuren, daher exprimiert *C. albicans* verstärkt Gene, die die Arginin- und Methioninbiosynthese induzieren. Des Weiteren kommt es zu einer Hochregulation von Genen, die mit einer Reaktion auf oxidativen Stress verbunden sind (58, 183). *A. fumigatus* kann ebenfalls die Fusion von Phagosom und Lysosom reduzieren (91).

Die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten führt dazu, dass Hefen nicht auskeimen und Keimschläuche nicht mehr weiterwachsen (58). Während *C. albicans* effizient im Wachstum gehemmt wird, kann *A. fumigatus* durch Sekretion eines unbekanntes Faktors diese Wachstumsinhibition abschwächen (151). Der Mechanismus der Wachstumsinhibition beruht bei *C. albicans* vermutlich auf induziertem Nährstoffmangel, oxidativem Stress und der Freisetzung antimikrobieller Substanzen wie Lactoferrin (58, 166). Die Auskeimung von *A. fumigatus*-Konidien wird durch Lactoferrin-vermittelten Eisenentzug verhindert (119, 244). Wie wichtig neutrophile Granulozyten für die Abtötung von *A. fumigatus* sind, wurde kürzlich mit einem Mausmodell mittels Zelldepletion verdeutlicht. Während die Depletion von alveolären Makrophagen keinen Einfluss auf Wachstumsinhibition und Abtötung intratracheal verabreichter Konidien hatte, führte die Depletion von neutrophilen Granulozyten zu hoher Mortalität (141).

Sowohl *A. fumigatus* als auch *C. albicans* können diverse Proteine des Komplementsystems binden. *A. fumigatus*-Konidien können FH, das Faktor H-like Protein (FHL1), FHR1, C4bp und Plasminogen an ihre Oberfläche rekrutieren und somit einer Attacke durch das Komplementsystem entgehen (7, 229). Zudem binden die pathogenen *Aspergillus*-Spezies wie *A. fumigatus* deutlich weniger C3 als ihre weniger pathogenen Verwandten (76). *C. albicans* kann einerseits durch die Bindung von FH, FHL1 und C4bp Immunevasion betreiben, wobei als Interaktionspartner für FH und FHL1 sowie für Plasminogen Pra1 identifiziert werden konnte, andererseits können die an den Pilz gebundenen Komplementfaktoren aber auch über eine Bindung an den Komplementrezeptor 3 neutrophiler Granulozyten die Phagozytose und das Abtöten induzieren (125, 126, 136, 137).

3.3.4 Der oxidative Burst

Erste Beobachtungen an phagozytierenden neutrophilen Granulozyten zeigten, dass in den Zellen während des Abtötungsvorgangs der Sauerstoffverbrauch abrupt anstieg und vermehrt H_2O_2 gebildet wurde (89). Dieses Phänomen wurde respiratorischer oder oxidativer Burst genannt. Die Generation von Superoxidanionen wird von der NADPH-Oxidase katalysiert. Dieses Enzym wird bei Aktivierung der neutrophilen Granulozyten aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt, bestehend aus dem membrangebundenen Flavocytochrom_{b558} und cytosolischen Komponenten (87, 88). Durch Elektronenübertragung von cytosolischem NADPH zum phagolysosomalen Sauerstoff werden Superoxidanionen (O_2^-) generiert, welche aufgrund ihrer Instabilität in andere Oxidanzien wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit (ONOO-), hypochlorige Säure (HOCl) oder Nitrylchloride (NO_2Cl) umgewandelt werden. Diese hochreaktiven Oxidantien reagieren mit verschiedenen mikrobiellen Komponenten wie DNA, Proteinen oder Lipiden und induzieren so das Absterben der Mikroorganismen.

Neben der NADPH-Oxidase existieren noch zwei weitere Enzyme zur Generation von antimikrobiellen Oxidantien. Die Myeloperoxidase (MPO), die die Bildung von hypochloriger Säure aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen katalysiert, macht etwa 5 % des gesamten Neutrophilenproteins und etwa 25 % des Granulaproteins aus. Hypochlorige Säure gilt als das am stärksten wirksame Oxidanz in neutrophilen Granulozyten (74, 197). Trotz der hohen Konzentration in den Zellen und obwohl MPO-defiziente Patienten Immunschwächen aufweisen, ist gezeigt worden, dass bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen die Produkte der NADPH-Oxidase eine größere Bedeutung haben als die der Myeloperoxidase (114).

Die Abtötung von Mikroorganismen durch die Produkte der NO-Synthase konnte beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden.

Bei der chronischen Granulomatose (engl. chronic granulomatous disease, CGD) fehlt Patienten die Fähigkeit, mit Hilfe der NADPH-Oxidase Mikroorganismen zu eliminieren. Es existieren vier Typen der CGD, die sich durch Mutationen in jeweils einem der vier für das Enzym kodierenden

Gene auszeichnen. Am häufigsten ist hierbei die gp91phox-Untereinheit betroffen (etwa 65 % aller CGD-Fälle, jedoch fast ausschließlich Männer) (197). Die Anfälligkeit für bestimmte Infektionen ist bei CGD-Patienten groß, besonders *A. fumigatus* und *Staphylococcus aureus* sind hier zu nennen (239).

Verschiedene Komponenten von *C. albicans* und *A. fumigatus* induzieren den oxidativen Burst. Vor allem Zellwandbestandteile wie Mannoproteine und β -(1,6)-Glucan spielen eine wichtige Rolle (167, 182). In Experimenten mit immobilisiertem β -Glucan konnte gezeigt werden, dass es eine Integrin-vermittelte Inhibition der ROS-Freisetzung von neutrophilen Granulozyten gibt, solange kein direkter Kontakt zwischen Pilz und Zelle besteht. So können die Zellen durch selektive ROS-Freisetzung Gewebeschäden vermeiden (112). ROS können entweder intrazellulär in das Phagosom oder extrazellulär freigesetzt werden (198, 200). Diese Erkenntnis ist bedeutsam für die Bekämpfung der unterschiedlichen Pilzmorphologien, da Keimschläuche im Gegensatz zu Konidien oder Hefen zu groß sind, um phagozytiert zu werden. Neutrophile Granulozyten gehen einen engen Kontakt mit Keimschläuchen ein, um dann den oxidativen Burst und die Degranulation gezielt an den Pilzstrukturen einleiten zu können (42, 119, 190, 240).

Trotz der dominierenden Rolle von *A. fumigatus*-Infektionen bei CGD-Patienten ist der Effekt von ROS auf die Abtötung von *A. fumigatus*-Keimschläuchen viel diskutiert worden. Die Deletion des Transkriptionregulators *AfYap1*, der die Transkription anti-oxidativer Gene kontrolliert, hatte keinen Einfluss im *in vivo*-Infektionsmodell und in Abtötungsversuchen mit neutrophilen Granulozyten. Ob der Grund hierfür in einer komplementären Aktivierung anderer anti-oxidativer Gene zu suchen ist, ist nicht bekannt (117). Im Widerspruch dazu stehen andere Studien, die belegen, dass neutrophile Granulozyten von CGD-Patienten das Wachstum von *A. fumigatus*-Keimschläuchen nicht inhibieren konnten und dass die Abtötung von *A. fumigatus* stark beeinträchtigt war (118, 159, 175, 199). Allerdings werden Konidien durch CGD-Granulozyten ebenso effizient in der Auskeimung gehemmt wie durch Granulozyten gesunder Spender (243). Im Gegensatz zur Aspergillose haben Candidosen einen eher geringen Anteil an den Infektionen von CGD-Patienten (239). Die oben beschriebenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass an der Bekämpfung der verschiedenen Morphotypen und Spezies unterschiedliche Mechanismen beteiligt sind, die sich untereinander ergänzen. Hierbei spielen vor allem die Granula eine wichtige Rolle. Sie können durch den oxidativen Burst aktiviert werden und Enzyme wie z.B. Elastase oder Cathepsin D freisetzen. Granula-Protease-defiziente Mäuse mit funktionsfähiger Superoxidproduktion sind nicht in der Lage, *C. albicans*-Infektionen effektiv zu bekämpfen. Demnach können ROS nicht nur direkt fungizid wirken, sondern auch indirekt über die Aktivierung der Granula (174).

Die Generation von ROS dient nicht nur der Abtötung beider Pilzspezies. Konstitutive und pathogen-induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten wird durch ROS ausgelöst und reguliert somit Zell-Homöostase bzw. den Ausgang der Infektion (41). Durch Hitze abgetötete *C. albi-*

cans können Apoptose neutrophiler Granulozyten induzieren, nachdem diese die Pilzzellen phagozytiert haben (180).

3.3.5 Zytokinsekretion von neutrophilen Granulozyten

Die zelluläre Kommunikation durch Zytokine vermittelt Migration, Differenzierung und aktiviert Immunzellen. Zur Klasse der Zytokine gehören Wachstumsfaktoren, Chemokine und Interleukine.

Neutrophile Granulozyten produzieren sowohl einige proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN γ oder GM-CSF als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 (188).

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind kleine, 8-14 kDa schwere Zytokine, deren Funktion in erster Linie die Auslösung von Chemotaxis ist. Aus der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus des Proteins leitet sich die systematische Nomenklatur der Chemokine ab. Bei der CC-Familie folgen die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander, bei der CXC-Familie sind sie durch eine Aminosäure voneinander getrennt. Der Name von Chemokinen beinhaltet außer der Familienkennzeichnung auch die fortlaufende Nummerierung und ein „L“ für „Ligand“, so z.B. CCL20 oder CXCL2. Die CC-Familie umfaßt 24, die CXC-Familie 16 Mitglieder. Weitere Chemokine mit nur einem Familienmitglied sind Fraktalkin (CX3C-Motiv) und Lymphotaktin (C-Motiv).

Unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen können neutrophile Granulozyten Chemokine exprimieren. So wird z.B. funktional aktives CCL20 in Überständen von mit TNF- α oder LPS stimulierten neutrophilen Granulozyten gefunden (189). IL-8 (CXCL8), ein wichtiger Mediator für Chemotaxis, der entweder durch Sekretion von anderen Zelltypen oder durch autologe Sekretion das Migrationspotential erhöhen kann, wird morphotypabhängig freigesetzt, wenn *C. albicans* als Stimulus fungiert (240). Des Weiteren wird durch Sekretion von IL-8 und TNF- α die Menge an extrazellulärer membrangebundener Elastase deutlich erhöht (161).

3.3.6 Neutrophil extracellular traps (NETs)

Vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass neutrophile Granulozyten durch fädige, netzartige Strukturen einen weiteren Effektormechanismus besitzen, mit dem sie Mikroorganismen abtöten können (22). NETs bestehen unter anderem aus Chromatin, Histonen und dem granulären Enzym Elastase. Neuere Studien ergaben, dass das antimikrobiell wirksame Protein Calprotectin ebenfalls Bestandteil der NETs ist (226). Da die Konsistenz der NETs klebrig ist, bleiben Mikroorganismen wie *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* sowie beide Morphotypen von *C. albicans* darin hängen und werden abgetötet (22, 134, 227). Bei der NET-abhängigen Abtötung von *C. albicans* spielt das antimikrobielle Protein Calprotectin eine essentielle Rolle. Fehlt es in den NETs, verlieren diese ihre fungizide Wirkung (226). Demgegenüber wirken bei Bakterien vor allem Histone und Elastase mikrobizid (22). Bildet ein neutrophiler

Granulozyt NETs, führt dies zum Zelltod. Durch die Aktivierung verformt sich der Nukleus, es kommt zu einer Vermischung von Chromatin und Elastase. Die Zellmembran bricht auf, um die Masse in Richtung des Mikroorganismus abzugeben. Diese Art des Zelltodes entspricht weder der klassischen Apoptose noch der Nekrose (60).

3.4 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die nähere Charakterisierung der Interaktion neutrophiler Granulozyten mit den humanpathogenen Pilzen *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* mit den folgenden Schwerpunkten:

- sezernierte Aspartatproteasen (Saps) von *C. albicans* spielen eine Rolle bei der Entwicklung mucosaler und systemischer Candidosen. Die Interaktion der Saps mit neutrophilen Granulozyten und die Auswirkungen auf die Effektormechanismen dieser phagozytischen Zellen sollen in dieser Arbeit mit Hilfe von *SAP*-Deletionsmutanten aufgeklärt werden.
- Zytokine dienen der zellulären Kommunikation und werden von neutrophilen Granulozyten während der Bekämpfung von Mikroorganismen produziert. In dieser Arbeit soll ein Zytokin-fokussiertes Microarray-System eigenständig entwickelt und die Zytokinexpression neutrophiler Granulozyten während der Konfrontation mit *A. fumigatus*-Hyphen analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent
Brutschränke	Heraeus
Cytospin-Zentrifuge	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACScalibur	BD
ELISA-Reader GENios FL	Tecan
Fluoreszenzmikroskop LSM 510	Zeiss
Heizblöcke	Grant Instruments
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Koloniezähler ProtoCol SR	SynBiosis
Kühlzentrifuge Megafuge 1. OR	Heraeus
Lichtmikroskop	Leitz
LightCycler 1.5	Roche
Magnetrührer	Hartenstein
pH-Meter pH530	WTW
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Brand
Schüttelinkubatoren (Certomat)	Braun Biotech
Schütteltisch PheroShaker	Biotec-Fischer
Spektrophotometer NanoDrop	Peqlab ND-1000
Tischzentrifuge Mikrorapid K	Hettich
Tischzentrifuge, kühlbar (Centrifuge 5417R)	Eppendorf
Vakuumzentrifuge SpeedVac	Savant
Vortex (7-2020)	Neolab
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Memmert

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Hersteller
Dispenser-Aufsätze	Hartenstein
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Kanülen (20G)	Sterican
Kapillaren für Light Cycler	Roche
MaxiSorp ELISA-Platten 96-well	Nunc
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
Objektträger normal	Hartenstein
2,5ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Plastikpipetten	Sarstedt
15 ml, 50 ml-Plastikröhrchen	Greiner bio-one
0,5 ml, 1,5 ml, 2ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt
1,5 ml RNase- freie Reaktionsgefäße	Ambion
Spritzen (10 / 20 ml)	Braun
Sterilfilter 0,2 µm für Spritzen	Schleicher & Schüll
Sterilfilter 0,2 µm für Schott-Flaschen	Hartenstein
SuperFrost Objektträger	Hartenstein
Transwell-Einsätze	Costar
96-Well ELISA-Platte, Rundboden	Nunc
96-Well Polypropylenplatten, matt	Greiner bio-one
24-Well Zellkulturplatte	Sarstedt
96-Well Zellkulturplatte, Flachboden	Sarstedt

4.1.3 Reagenzien und Lösungen

4.1.3.1 Häufig verwendete Reagenzien und Lösungen

Die üblichen Chemikalien wurden bei Sigma, Merck, AppliChem und Roth erworben, Zellkulturmedien von Gibco und Biochrom.

4.1.3.2 Besondere Reagenzien und Lösungen

Stoff	Verwendung/Beschreibung	Hersteller
ACK-Lysepuffer	Erythrozytenlyse	Lonza
Blocklösung	Microarray-Slideblockierung	Schott Nexterion
Complete Tabs ohne EDTA	Proteaseinhibition	Roche
DPI	NADPH-Oxidasehemmer	Sigma
Eukitt Eindeckmedium	Fluoreszenzmikroskopie	Fluka
fMLP	Chemotaxis-Induktion	Sigma
Gliotoxin	Toxin aus <i>A.fumigatus</i>	Sigma
Glutathion	Reduktionsmittel	Sigma
Koenzym Q ₀	XTT-Assay	Sigma
PMA	Proteinkinase C- Induktor	Sigma
Poly-L-Lysin	Objektträgerbeschichtung	Sigma
Polymorphprep	Isolation von Granulozyten	Nycomed
TRIzol	RNA-Isolation	Invitrogen
XTT-Natriumsalz	XTT-Assay	Sigma
Zymosan A	Stimulanz für Granulozyten	Sigma

4.1.3.3 Farbstoffe

Farbstoff	Verwendung/Beschreibung	Hersteller
AnnexinV-FITC	Apoptosenachweis	BD
BCECF-AM	Zellfarbstoff	Invitrogen
DAPI	Nukleusfärbung	Sigma
DCFH-DA	ROS-Nachweis	Sigma
FITC	Farbstoff für Pilze	Sigma
Propidiumiodid	Nekrosenachweis	Sigma
CBZ(Ala ₄) ₂ -Rhodamin 110	Elastasesubstrat	Invitrogen

Die vollständigen Namen der besonderen Chemikalien und Farbstoffe finden sich im Methodenteil im jeweiligen Protokoll.

4.1.4 Antikörper

Name	Kopplung	Hersteller
α Elastase (Kaninchen)	-	Calbiochem
Ziege α Kaninchen	Alexa 546	Molecular Probes

4.1.5 Kits

Name	Verwendung	Hersteller
IL-8 CytoSet™	Zytokin - ELISA	Biosource
MessageAmplii Kit	RNA-Amplifikation	Ambion
LabelStar Array Kit	RNA-Labeling/Umschrieb	Qiagen
Light Cycler Fast Start DNA Master HybProbe Kit	qRT-PCR	Roche
BCA Protein Assay Kit	Proteinbestimmung	Pierce

4.1.6 Oligonukleotide für die qRT-PCR

Name	Sequenz (5' - 3')
LTB F	CCC ACC TCA TAG GCG CT
LTB R	TAG CCG ACG AGA CAG TAA GGT A
LTB FL (Sonde)	GGC TGG GAG ACG ACG AAG GA- FL
LTB LC (Sonde)	LC640- CAG GCG TTT CTG ACG AGC GGG-PH
NCF1F	CAA CTA TGC AGG TGA GCC ATA C
NCF1R	GAC ACG TCT TGC CCT GAC T
NCF1 FL (Sonde)	AGC TGT TGA GGT CAT TCA CAA GCT CC - FL
NCF1 LC (Sonde)	LC640- GGA CGG CTG GTG GGT CAT CAG - PH
MIP3a F	CTG TCT TGG ATA CAC AGA CCG TA
MIP3a R	GGT TCT TTC TGT TCT TGG GCT A
MIP3a FL (Sonde)	GTT GTC TGT GTG CGC AAA TCC AAA - FL
MIP3a LC (Sonde)	LC640- CAG ACT TGG GTG AAA TAT ATT GTG CGT C - PH
h_ALAS-forw	AAT GAG TCG CCA CCC ACG
h_ALAS-rev	CAG CTC CCG CTC TAA GTC CA
AL2-FL (Sonde)	CCT GCC CCA GCA CCA TGT TGT TTC - FL
AL2 LC (Sonde)	LC640- GTG TCC ATA ACT GCC CCA CAC ACC - PH

alle oben aufgeführten Oligonukleotide wurden bei TibMolbiol erworben.

4.1.7 Verwendete Pilzstämme

4.1.7.1 *Candida albicans*

Stamm	Genotyp	Quelle
SC 5314	Wildtyp	(70)
CAI4[pClp10]	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434+pClp10 (Integration)	(149)
M119 Δ sap1-3	Δ sap1::hisG/ Δ sap1::hisG; Δ sap2::hisG/ Δ sap2::hisG; Δ sap3::hisG/ Δ sap3::hisG-URA3-hisG	(100)
M31 Δ sap4-6	Δ sap6::hisG/ Δ sap6::hisG; Δ sap4::hisG/ Δ sap4::hisG; Δ sap5::hisG/ Δ sap5::hisG-URA3-hisG	(186)
M1188 Δ sap9/10	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434; Δ sap10::hisG/ Δ sap10::hisG; Δ sap9::hisG/ Δ sap9::hisG-URA3-hisG	(1)
M1018 Δ sap9	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434; Δ sap9::hisG/ Δ sap9::hisG-URA3- hisG	(1)
M1171 Δ sap10	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434; Δ sap10::hisG/ Δ sap10::hisG- URA3-hisG	(1)
M1182 Δ sap9[SAP9], Klon Re5	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434; Δ sap10::hisG/ Δ sap10::hisG; Δ sap9::hisG/ Δ sap9::hisG	(1)
M1180 Δ sap9[pCIP10]	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 Δ sap9::hisG/ Δ sap9::hisG+pClp10 (Integration)	(1)

4.1.7.2 *Aspergillus fumigatus*

Stamm	Genotyp	Quelle
ATCC 46645	Wildtyp	
<i>A.fumigatus</i> Δ gliP	akuBKU80::hpha Δ akuB ^{KU80} ;gliP::ble ^b Δ gliP	(104)

4.1.8 Verwendete Zelltypen

4.1.8.1 Humane neutrophile Granulozyten aus Frischblut

(s. Kap. 4.2.3.1).

4.1.9 Medien

4.1.9.1 Medien für die Pilzkultivierung

<u>Sabouraud-Medium</u>		16 g Agar-Agar 40 g Glucose 10 g Bacton-Pepton ad 1 l H ₂ O demin.
<u>Bierwürz-Medium</u>		Bierwürze ad 1 l H ₂ O demin.
<u>M199 Medium</u>		9,8 g M199 35,7 g HEPES ad 1 l H ₂ O demin., pH auf 4 bzw. 7 einstellen, sterilfiltrieren
<u>SD-Medium</u>		6,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g Glucose ad 1 l H ₂ O demin., pH 5,8
<u>YPD-Medium</u>	Lösung A	20g Bacton Pepton 10g Bacton yeast Extract ad 200 ml H ₂ O demin., autoklavieren
	Lösung B	20 g Glucose 35,7 g HEPES ad 800 ml H ₂ O demin., pH 7 einstellen, sterilfiltrieren
		Lsg. A+B zusammengeben

4.1.9.2 Medien für die Zellkultur

<u>Granulozyten-Medium</u>	RPMI 1640 (mit/ ohne Phenolrot) 5 % FCS
----------------------------	--

4.1.10 Pufferlösungen

4.1.10.1 Pufferlösungen für ELISA

<u>Probenpuffer</u>	3,2 g	NaCl
	0,452 g	Na ₂ HPO ₄
	0,08 g	KH ₂ PO ₄
	0,08 g	KCl
	2 g	BSA Fraktion V
	0,4 ml	Tween 20
	400 ml	H ₂ O demin. , pH 7,4

<u>Beschichtungspuffer</u>	1,6 g	NaCl
	0,226 g	Na ₂ HPO ₄
	0,04 g	KH ₂ PO ₄
	0,04 g	KCl
	200 ml	H ₂ O demin., pH 7,4

<u>Waschpuffer</u>	0,624 g	KH ₂ PO ₄
	0,18 g	EDTA*2H ₂ O
	0,2 ml	Tween 20
	400 ml	H ₂ O demin., pH 7,4

Substratlösung Tetramethylbenzidin (TMB) von BD

Stopplösung 0,9 M H₂SO₄

4.1.10.2 Pufferlösungen für die Durchflusszytometrie

AnnexinV-Bindepuffer (10x) 0,1 M HEPES pH 7,4
 1,4 M NaCl
 25 mM CaCl₂
 ad 500 ml H₂O demin.
 zur Verwendung 1/10 verdünnen in H₂O demin.

4.1.10.3 Pufferlösungen für die Mikroskopie

Fixierlösung 3,7 % Formaldehyd in Ampuwa

Blockierlösung 2 % BSA
1 % FCS
in PBS

4.1.10.4 Pufferlösungen für Microarray-Experimente

Prähybridisierung I 0,1 % Triton X-100

Prähybridisierung II 1 mM HCl

Prähybridisierung III 100 mM KCl

Blocklösung Schott Nexterion Blocklösung

Hybridisierungspuffer Schott Nexterion Hybridisierungspuffer

Waschpuffer I 2X SSC
0,2 % SDS

Waschpuffer II 2X SSC

Waschpuffer III 0,2X SSC

4.2 Methoden

4.2.1 Pilze

4.2.1.1 Kultivierung von *Candida albicans*

Zur Langzeitlagerung wurden die verwendeten Stämme bei der Ankunft in Einfriermedium (35 % Glycerin) eingerieben und bei -80°C gelagert.

Am Tag vor dem Experiment wurden die Stämme auf Sabouraud-Platten ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Am Tag des Experiments wurden die über Nacht herangezogenen Pilze in 20 ml RPMI 1640 Medium + 5 % FCS oder in M199-Medium mit einem Wattestäbchen eingerieben. Um Hefen zu erhalten, wurden die Pilze entweder in RPMI Medium 2 h bei 22°C, in M199 Medium (pH 4) für 2,5 h bei 30°C oder in SD-Medium für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Schüttlergeschwindigkeit betrug in allen Fällen 200 rpm.

Zur Generierung von *C. albicans*-Keimschläuchen wurden die Kolben entweder mit RPMI 1640 Medium + 5 % FCS 1-2 h bei 37°C oder mit M199 Medium (pH 7) 2-3 h bei 30°C geschüttelt (200 rpm). Die Inkubationszeit variierte je nach Stamm und gewünschter Keimschlauchlänge, welche mikroskopisch überprüft wurde. Die gewünschte Anzahl an Pilzzellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer nach der Anzucht bestimmt (s. Kap.4.2.3.2).

4.2.1.2 Kultivierung von *Aspergillus fumigatus*

Herstellen einer Konidiensuspension

10 µl einer Konidienlösung des Wildtyp-Stammes ATCC 46645 oder der *gliP*- Mutante wurden auf Bierwürz-Platten ausplattiert und etwa 3 Tage bei 28°C inkubiert, bis ein dichter, grünlich-grauer Konidienrasen entstand. Die Platte wurde unter der Sterilwerkbank mit mehreren Millilitern destilliertem Wasser übergossen und die Konidien mit einem Wattestäbchen vorsichtig abgerieben. Die so entstandene Suspension wurde anschließend über ein Zellsieb in ein 50 ml Falcontube pipettiert, um Myzelreste zu beseitigen. Die Reinheit der Suspension wurde mikroskopisch bestätigt und die Konidienzahl auf 2×10^8 / ml eingestellt.

Anzucht von Keimschläuchen und Hyphen

Konidien aus einer Stocklösung (dest. Wasser) wurden in der gewünschten Konzentration in einen Erlenmeyerkolben mit 20 ml RPMI 1640-Medium und 5 % FCS gegeben. Nach der Konidienquellung über Nacht bei Raumtemperatur im Schüttler (200 rpm) wurde die Temperatur am frühen Morgen mittels Zeitschaltuhr auf 37°C erhöht und die Auskeimung erfolgte, je nach Stamm, nach 4-6 h. Die Keimschlauch- oder Myzelbildung wurde mikroskopisch überprüft.

4.2.2 Gewinnung von *A. fumigatus*-Kulturüberständen

Konidien aus einer frischen Suspension wurden in 50 ml RPMI1640 + 5 % FCS inokuliert und 24 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttler angezogen (Konidienkonzentration: 1×10^6 /ml). Danach wurden die Kulturen durch Faltenfilter passiert, um das Myzel zu entfernen. Der Überstand wurde mit 0,22 µm-Sterilfiltern filtriert, aliquotiert und bei -20 ° C gelagert.

4.2.3 Zellkultur

4.2.3.1 Gewinnung von humanen Granulozyten aus Frischblut

Freiwilligen Spendern wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Anschließend erfolgten die Aufschichtung des mit HBSS-Puffer verdünnten Blutes (Puffer: ein Drittel des Blutvolumens) auf jeweils 5 ml Polymorphprep und eine Zentrifugation (1600 rpm, Raumtemperatur, 30 min ohne Bremse). Die Granulozyten-Schicht, die nach der Gradientenzentrifugation entstand, lag unter der Schicht aus PBMCs. Die PBMCs wurden zuerst mit einer Plastik-Pasteurpipette abgesaugt und verworfen, danach wurden die Granulozyten mit einer neuen Pasteurpipette abgenommen. Das Volumen dieser Lösung wurde mit HBSS-Puffer auf 20-50 ml (je nach Menge) eingestellt und anschließend erfolgte ein Waschschrift (1800 rpm, RT, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur mit 4°C kaltem ACK-Lysepuffer behandelt, um verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation (1800 rpm, RT, 2 min) wurde das Pellet in RPMI1640-Medium + 5 % FCS aufgenommen und die Zellzahl eingestellt.

4.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Die zu bestimmende Anzahl an Zellen wurde in einem definierten Volumen resuspendiert. Die Zellen (10 µl) wurden dann 1:10 in Trypanblau (30 µl) und Medium (60 µl) verdünnt, um beim Auszählen gleichzeitig die lebenden Zellen (weiß) von den abgestorbenen (blau) zu unterscheiden. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauerkammer ermittelt. Die Zellzahl ließ sich mit folgender Formel errechnen:

$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen pro Großquadrat (oder 16 Kleinquadrate)} \times 10^4}{(\text{Volumen des Großquadrates}) \times 10 (\text{Verdünnung in Trypanblau})}$
--

4.2.4 Konfrontationsexperimente

4.2.4.1 Messung der ROI-Freisetzung von humanen Granulozyten

Die Freisetzung von ROS wurde mit Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) ermittelt. DCFH-DA dringt in die Zellen ein und wird intrazellulär deacetyliert, was dazu führt, dass der Stoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Durch ROS wird DCFH zu DCF (Dichlorfluorescein) oxidiert. Dieses fluoresziert grün und kann somit als Nachweis für ROS dienen.

Für ein solches Experiment wurde die Granulozytenzahl auf $4 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und 2×10^7 Zellen mit DCF (Endkonzentration $2,5 \mu\text{M}$) versetzt. In eine 96-Well-Polypropylenplatte wurden pro Well $50 \mu\text{l}$ des Stimulus (jeweils 4 Wells pro Stimulus) vorgelegt. *C. albicans*-Keimschläuche oder Hefen wurden auf $2 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt, so dass in einem Well 1×10^5 vorlagen. Als Positivkontrolle (Überprüfung der Granulozyten-Aktivierung) wurde Phorbolmyristat-Acetat (PMA) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugegeben. Um Spontanfreisetzung von ROS zu überprüfen (Negativkontrolle), wurde Medium verwendet. Nach Vorlegen der Stimuli wurden in jedes Well $50 \mu\text{l}$ der Zellsuspension gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Messung im auf 37°C erwärmten Plattenlesegerät bei $485\text{nm}/535 \text{ nm}$ über einen Zeitverlauf von 2,5 h.

Der oxidative Burst in Gegenwart des NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenyleiodoniumchlorid DPI ($5 \mu\text{g/ml}$) oder des Scavengers Glutathion (1 mg/ml) wurde wie folgt ermittelt: die Granulozyten wurden 30 min in Anwesenheit der Substanz bei 37°C vorinkubiert, dann mit DCFH-DA versetzt und zu den Stimuli in die Wells gegeben, welche ebenfalls mit den Substanzen in der erforderlichen Konzentration versetzt waren.

4.2.4.2 Chemotaxis

Mit Hilfe des Transwell-Systems von Costar wurde die Migrationsaktivität der neutrophilen Granulozyten zu einem Stimulus hin untersucht (Abbildung 4-1).

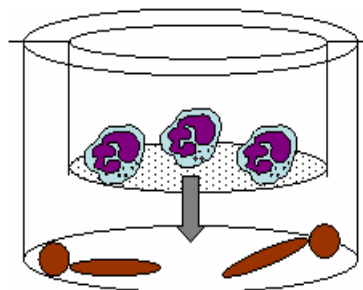


Abbildung 4-1: Transwell-System zur Messung der Chemotaxis

Für den Versuch wurden Granulozyten in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ mit dem Farbstoff 2'7'-bis-(carboxyethyl)-5-(and-6-)carboxyfluorescein (BCECF-AM; $3,3 \mu\text{M}$) für 20 min bei RT

im Dunklen inkubiert, anschließend 2x mit Medium gewaschen und resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden in die Wells einer 24-Well Platte die Stimuli (jeweils 500 µl) vorgelegt. Die Pilzstämmen wurden auf 1×10^6 /ml eingestellt, so dass durch Zugabe von 500 µl Pilzkultur pro Well 5×10^5 Pilze vorlagen. Als Positivkontrolle diente n-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), als Negativkontrolle Medium. Pro Ansatz mussten je zwei Wells befüllt werden, da ein Well mit Transwell-Einsatz versehen wurde und je eines ohne Einsatz als Kontrolle diente. Weil das Gesamtvolumen am Boden der Wells 600 µl betragen musste, wurden zusätzlich noch 100 µl Medium in jene Wells mit Einsatz gegeben.

Nach Einsetzen der Transwells wurden je 100 µl der Granulozyten in die Kammer gegeben, oder, bei den Kontrollen, direkt in das Well.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden die Transwells entfernt und die Fluoreszenz bei 485/530 nm gemessen.

4.2.4.3 Abtötungsversuch auf Plattenbasis

Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten und der Pilze wurden auf je 4×10^6 /ml eingestellt. Die Granulozyten wurden für 30 min bei 37°C mit 25 ng/ml PMA vorstimuliert. Je 20 µl der Pilz- und Zellsuspension wurden in 2 ml-Eppendorfcups gefüllt (in Duplikaten). Als Kontrolle dienten Ansätze, die nur Pilze (und 20 µl Medium anstatt der Zellen) enthielten. Die Inkubation erfolgte für eine Zeitspanne von 0 h -3 h bei 37°C. Zu den definierten Zeitpunkten wurden die Ansätze mit 2 ml eiskaltem destilliertem Wasser versetzt und gründlich gevortext, um die Zellen zu lysieren. In eine mit je 250 µl PBS / Well gefüllte 96-Well-Platte wurden dann 50 µl des Ansatzes pipettiert, durchmischt und anschließend 90 µl auf Sabouraud-Platten ausgestrichen (2 Platten pro Ansatz).

Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und am Folgetag mit dem Zählgerät ProtoCol ausgewertet. Die zu jeder Probe und jedem Zeitpunkt durchgeführte Kontrolle (Pilze ohne Zellen) wurde in der Auswertung als 100 % gesetzt.

4.2.4.4 XTT-Assay

Um die Schädigung von *C. albicans*-Keimschläuchen durch neutrophile Granulozyten zu ermitteln, wurde der XTT-Assay (67, 138) mit Modifikationen) angewendet. XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid) wurde frisch vor dem Versuch in 1x PBS in einer Konzentration von 0,5 mg/ml angesetzt und anschließend für 30 min bei 55°C im Wasserbad erwärmt. Koenzym Q₀ (2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinon) wurde nach Abkühlen der XTT-Lösung in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben und die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

1×10^6 Granulozyten in 100 µl und 1×10^6 *C. albicans*-Keimschläuche in 100 µl wurden in RPMI 1640 Medium + 5 % FCS 3 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollansätze dienten Proben mit Gra-

nulozyten und Medium (Bestimmung der spontanen Zellschädigung) sowie Keimschläuche und Medium (Positivkontrolle). Nach 1 h und nach 3 h wurden die Proben mit 800 µl eiskaltem destilliertem Wasser versetzt und bei 14000 rpm, 4°C für 4 min zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml eiskaltem destilliertem Wasser. Das Pellet wurde im Anschluss an den Waschschrift in 400 µl der XTT-Lösung gründlich resuspendiert und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurde nochmals für 1 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und 100 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte überführt. Die Auswertung erfolgte am Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 451 nm.

Die Schädigung des Pilzes errechnete sich aus den erhaltenen Messwerten wie folgt:

$$[1 - (A_{450\text{Pilze+PMNs}} - A_{450\text{PMNs}}) / A_{450\text{Pilze}}] \times 100$$

4.2.4.5 Apoptose-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie

Um die durch *C. albicans* und *A. fumigatus* verursachte Apoptose von neutrophilen Granulozyten zu bestimmen, wurden die Farbstoffe AnnexinV-FITC und Propidiumiodid verwendet. Dies ermöglicht, die Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches durch die bei der Apoptose entstehende Umstrukturierung der Zellmembran nach außen exponiert wird. AnnexinV-positive Zellen befinden sich im Frühstadium der Apoptose. Propidiumiodid hingegen dringt nur in Zellen ein, deren Membran zerstört wurde, wie es bei nekrotischen oder spätapoptotischen Zellen der Fall ist. Daher wurden nur die ausschließlich AnnexinV-positiven Zellen ausgewertet.

Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen mit 5×10^5 Pilzen in RPMI 1640-Medium + 5 % FCS koinkubiert. Für die Untersuchung der *A. fumigatus*-Kulturüberstände wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Kulturüberstand resuspendiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Ansätze bei 2500 rpm (RT) für 2 min pelletiert, in 500 µl kaltem PBS aufgenommen und durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl AnnexinV-Bindepuffer aufgenommen, wieder zentrifugiert und im AnnexinV-Bindepuffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte mit 5 µl AnnexinV-FITC und 7 µl Propidiumiodid (aus einer 50 µg/ml Stocklösung) für 15 min bei RT im Dunkeln. Danach wurde ein letztes Mal mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und die Ansätze in FACS-Röhrchen überführt. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (zum Einstellen der Population) sowie für jeden Zeitpunkt gefärbte, aber nicht infizierte Zellen (Bestimmung der Spontanapoptose).

Um den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen mit 5 µg/ml DPI vorinkubiert (30 min, 37°C). DPI inhibiert die NADPH-Oxidase und reduziert somit die Bildung von ROS erheblich. Nach Zugabe der Pilze wurde die DPI-Konzentration wieder auf 5 µg/ml eingestellt und die Ansätze für 2 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten uninfizierte, DPI-behandelte Zellen sowie Zellen, denen die gleiche Menge des Lösungsmittels

DMSO zugesetzt worden war. Ebenso wie im DPI-Experiment wurde mit Glutathion (1 mg/ml) verfahren.

Die Messung wurde am FACScalibur durchgeführt (jeweils 10.000 Ereignisse im für die Neutrophilen bestimmten Gate wurden gezählt), die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CellQuest von BD.

4.2.4.6 Elastase-Aktivitätsmessung

Elastase ist ein wichtiger Bestandteil der azurophilen Granula, welche kurz nach der Phagozytose mit dem Phagosom fusionieren und ihre Inhaltsstoffe abgeben. Um die Aktivität der Elastase zu quantifizieren, wurde ein Bisamid-Derivat des Farbstoffs Rhodamin 110 ((CBZ-Ala₄)₂-R110) verwendet. Dieses nichtfluoreszente Substrat wird durch die Elastase in ein fluoreszentes Monoamid und danach in Rhodamin 110 umgewandelt. Mit einer Exzitationswellenlänge von 498 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm sind die enzymatischen Produkte dem Fluorescein ähnlich und lassen sich daher im FITC-Kanal des Durchflusszytometers gut messen.

Messung der intrazellulären Elastaseaktivität

5x10⁵ Zellen pro Ansatz (500 µl) wurden mit der gleichen Menge an *C. albicans*-Keimschläuchen bzw. Hefen bei 37°C in RPMI 1640-Medium + 5 % FCS koinkubiert. Zu den ausgewählten Zeitpunkten (30 min und 2 h) wurden die Zellen bei 1800 rpm für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl HBSS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe des Substrats (4 µM in DMSO) erfolgte ein Inkubationsschritt von 20 min bei 37°C. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben anschließend sofort auf Eis überführt und mit 7 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) für 10 min gefärbt. Durch eine weitere Zentrifugation und erneute Aufnahme in HBSS-Puffer wurde dann überschüssiges Propidiumiodid entfernt und die Proben in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung von 10.000 Ereignissen im für Neutrophile gesetzten Gate erfolgte direkt im Anschluss. Als Positivkontrolle diente Zymosan A (25 µg/ml), welches vor der Zugabe für 15 min in PBS gekocht und anschließend in PBS gewaschen wurde.

Messung der extrazellulären Elastaseaktivität

Um die Menge an freigesetzter Elastase zu bestimmen, wurden 5x10⁵ Zellen pro Ansatz mit ebenso vielen Pilzen wie oben beschrieben koinkubiert. Da in diesem Versuch der Überstand und nicht die Zellen selbst untersucht werden sollte, wurde das Experiment in farblosem RPMI 1640-Medium + 5 % FCS durchgeführt. Ein Ansatzvolumen betrug 100 µl. Zu den bereits oben genannten Zeitpunkten wurden die Proben pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in eine Polystyrol-96-well-Platte (Nunc MaxiSorp) überführt. Die Messung erfolgte im Plattenlesegerät bei 485nm / 535nm.

4.2.5 Fluoreszenzmikroskopische Versuche

4.2.5.1 Wachstumsinhibitionsversuch

Das Wachstum von *C. albicans*- Keimschläuchen ist nachweislich vermindert, wenn neutrophile Granulozyten anwesend sind (58). Mit diesem Versuch kann das Ausmaß der Wachstumsinhibition nachgewiesen werden. Die herangezogenen Keimschläuche wurden dafür mit 0,1 mg Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) bei 37°C für 15 min gefärbt und anschließend zweimal mit Medium gewaschen, bis keine gelbliche Färbung im Überstand mehr zu erkennen war. Dann wurden 2×10^5 der gefärbten Pilze zu 2×10^5 Granulozyten gegeben (MOI=1) und bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben auf Objektträger im Cytospin mit anschließender Fixierung (3,7 % Paraformaldehyd für 15 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben getrocknet und in Eindeckmedium eingebettet. Einige Proben wurden zwecks Nukleusdarstellung nach der Fixierung noch mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol-Hydrochlorid (DAPI; 10 min, RT, in Blockpuffer) gefärbt. Die nach der Färbung weitergewachsenen Keimschläuche bleiben ungefärbt. Mittels Durchlicht- und GFP-Kanal konnte am Fluoreszenzmikroskop die Länge bestimmt werden. Dafür wurde die AxioVision Software von Zeiss verwendet, mit der sich Längen von Objekten in μm messen läßt. Der FITC-gefärbte Teil und der ungefärbte, weiter gewachsene Teil wurden separat vermessen und das Wachstum folgendermaßen berechnet:

$$\text{Wachstum [\%]} = \text{Länge (ungefärbter Teil)} \times 100 / \text{Länge (gefärbter Teil)}$$

4.2.5.2 Nachweis von Elastase und NETs mittels Immunfluoreszenz

In die Wells einer 24-Well-Platte wurden steril autoklavierte, kleine runde Deckgläser gegeben und diese vor Beginn des Versuchs mit Poly-L-Lysin beschichtet, da neutrophile Granulozyten nur bei Stimulation adhärent werden und ansonsten leicht gewaschen werden können. Dazu wurden je 100 μl Poly-L-Lysin auf jedes Deckgläschen pipettiert und für 15 min bei RT unter der Sterilwerkbank bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Poly-L-Lysin wieder vorsichtig abgenommen und mit 500 μl PBS gewaschen. Es folgte eine Lufttrocknung der Deckgläschen für 5-10 min unter der Sterilwerkbank. Die Pilze wurden wie bereits in Kap. 4.2.5.1 beschrieben gefärbt. Jeweils 5×10^5 Granulozyten pro Ansatz und eine variierende Menge Pilze (MOI 2, 3 und 5) wurden dann in die Wells mit den Deckgläschen gegeben und die Platte bei RT für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Es folgte die Koinkubation bei 37°C / 5 % CO_2 und die Fixierung mit 300 μl 3,7 % Formaldehyd für 15 min bei RT. Die Platte sollte aufgrund der bereits gefärbten Pilze dunkel stehen. Nach der Fixierung wurden die Proben 1x mit 500 μl PBS vorsichtig gewaschen und dann für 45 min mit Blockierlösung bei RT geblockt. Der Erstantikörper, in diesem Falle anti-Elastase, wurde 1/500 in Blockierlösung verdünnt und im Anschluss an das Blocken

zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen und der Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen, Alexa 546) in einer 1/200-Verdünnung in Blockierlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT für 30 min, in den letzten 10 min wurde DAPI zugegeben. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläschen äußerst vorsichtig mit einer Pinzette aus den Wells geholt und mit den Pilzen/Zellen nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf den vorher ein Tropfen Eindeckmedium gegeben worden war. Die mikroskopische Auswertung erfolgte einen Tag später nach Aushärtung des Eindeckmediums.

4.2.6 Proteinanalysen

4.2.6.1 Zytokin-ELISA (IL-8)

Zur Analyse der aus *Candida*-Granulozyten-Kokulturen gewonnenen Zytokin-Überständen wurde das ELISA CytoSet™ für IL-8 von Biosource verwendet. Alle verwendeten Lösungen sind im Materialteil aufgelistet. Zur Analyse der Zytokinüberstände wurden 96-Well MaxiSorp Mikrotiterplatten mit entsprechend verdünntem Beschichtungsantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte einmal mit dem Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden 250 µl von dem Probenpuffer für 1 h in jedes Well pipettiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Währenddessen wurden die Zytokinüberstände (1:5 und 1:10) und die Standards (1:2) im Probenpuffer verdünnt. Je 100 µl wurden von der Standardreihe (doppelter Ansatz) und von den verdünnten Proben (doppelter Ansatz) in die Wells pipettiert. Sofort danach wurde 50 µl von dem entsprechend verdünnten Nachweis-antikörper in jedes Well gegeben. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann 100 µl von entsprechend verdünnter Streptavidin-HRP Lösung in jedes Well gegeben und weitere 30 min kontinuierlich geschüttelt. Danach wurde die Platte wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl von der frisch angesetzten TMB-Lösung in jedes Well pipettiert und ein letztes Mal für 30 min bei kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde in jedes Well 100 µl von der Stopplösung (0,9 M H₂SO₄) gegeben. Anschließend (innerhalb von 30 min) wurde die optische Dichte der einzelnen Lösungen bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Bezugswellenlänge von 650 nm bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

4.2.7 Transkriptomuntersuchungen

4.2.7.1 Infektion von neutrophilen Granulozyten mit *A. fumigatus*-Hyphen

Für die Microarray-Analysen wurden 1×10^7 Granulozyten mit und ohne 1×10^7 *A. fumigatus*-Hyphen in RPMI 1640-Medium + 5 % FCS bei 37°C koinkubiert (Volumen pro Probe: 1 ml). Jedem Ansatz wurde vor Beginn der Koinkubation 1 µl RNase-Inhibitor zugegeben. Von vier verschiedenen Spendern wurde Gesamt-RNA aus folgenden Proben isoliert:

- infiziert mit *A. fumigatus*-Hyphen für 2 h
- Kontrollzellen 2 h
- infiziert mit *A. fumigatus*-Hyphen für 6 h
- Kontrollzellen 6 h

4.2.7.2 Isolierung von RNA aus neutrophilen Granulozyten

Zur RNA-Extraktion wurde TRIzol, ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, verwendet, da auf diese Weise die qualitativ beste RNA gewonnen werden konnte. Alle Arbeiten mit RNA erfolgten unter einem gereinigten Abzug und unter Verwendung von RNase-freien Lösungen und Pipettenspitzen.

Nach dem Pelletieren der Proben (2500 rpm, Raumtemperatur, 2 min) wurde pro Probe 1 ml TRIzol zum Pellet gegeben, kräftig auf- und abpipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Eppendorfcups für 15 s kräftig von Hand geschüttelt und im Anschluss daran für 2-3 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4°C, bei der sich das Phenol-Probengemisch in drei Phasen auftrennt: im unteren Drittel des Reaktionsgefäßes befindet sich die rötliche Phenol-Chloroform-Phase, darüber eine weißliche Interphase und darüber die wässrige, RNA-haltige Phase. Diese wurde vorsichtig abgenommen, in neue Eppendorfcups überführt und sofort mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach dem Durchmischen der Proben durch vorsichtiges Schwenken folgte eine Inkubation bei RT für 10 min, danach eine Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 10 min. Das entstandene Pellet war durchsichtig und der Überstand musste dementsprechend vorsichtig abgenommen werden. Das Pellet wurde in 75 % Ethanol gewaschen (7500 g, 5 min, 4°C) und anschließend 5 min bei RT in der Vakuumzentrifuge ohne Heizung getrocknet, wobei unbedingt darauf zu achten war, dass der Überstand vorher sehr sauber abgenommen wurde.

Die Resuspendierung der RNA-Pellets erfolgte in 15 µl RNase-freiem Wasser im Heizblock bei 50°C für 5 min. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwertung bei -80°C gelagert.

Die Quantifizierung der enthaltenen RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop durchgeführt, die Qualitätskontrolle erfolgte mit den RNA Nano Chips für den Agilent Bioanalyser.

4.2.7.3 Amplifikation der RNA

Die Amplifikation von RNA dient der mRNA-Vermehrung, um die für einen Microarray oder ein ähnliches Experiment benötigte Menge an mRNA zu gewinnen. Die RNA wird hierfür zunächst in cDNA umgeschrieben, welche am 5'Ende eine T7-Promoter-Sequenz enthält. Dann erfolgt die Zweitstrangsynthese. Die daraus entstandene, zuvor aufgereinigte doppelsträngige DNA dient als Template für die *in vitro*-Transkription.

Die Amplifikation der in dieser Arbeit verwendeten RNA wurde mit dem MessageAmpII-aRNA-Amplifikationskit von Ambion nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

4.2.7.4 cDNA-Synthese und Labeling

Um in der Transkriptionsanalyse aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden in diesem Experiment ein Pool aller Proben mit jeder einzelnen Probe verglichen (s. Liste in Kap. 4.2.7.1). Für die Hybridisierung musste die amplifizierte RNA wieder in cDNA umgeschrieben werden, wobei die Farbstoffe Cy3 (zu untersuchende Proben) und Cy5 (Pool) inkorporiert wurden. Nach der cDNA-Synthese wurden dann jeweils Pool und Probe zusammengegeben und aufgereinigt. Die genaue Durchführung ist dem Protokollheft des LabelStar Array Kit von Qiagen zu entnehmen.

4.2.7.5 Design der Sonden

In Anlehnung an bereits durchgeführte Microarray-Experimente der AG Löffler wurden interessante Gene, welche offenbar in den Inflammationsprozess involviert sind, ausgewählt und die Sonden (55-70-mere in Antisense-Orientierung) durch die Firma Operon synthetisiert. Beratung bei Auswahl und Design der Sonden erfolgte durch Frau Dr. Hauser vom Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) der Fraunhofer-Gesellschaft in Stuttgart. Eine Liste aller verwendeten Sonden inklusive Kontrollen findet sich im Anhang in den Tabellen 8-1 bis 8-3.

4.2.7.6 Hybridisierung und Auswertung

Die für diesen Array bedruckten Epoxy-Slides wurden vor der Nutzung prähybridisiert (waschen in folgenden Puffern: Puffer I 5 min, Puffer II 2x2 min, Puffer III 10 min, H₂O demin. für 1 min) Für die Blockierung wurden die Slides für 15 min bei 50°C in Blocklösung inkubiert und im Anschluss daran für 1 min mit H₂O demin. gewaschen. Durch eine kurze Zentrifugation (2 min, 200 g, RT) wurden die Slides getrocknet. Die zu hybridisierenden Proben (20 µl) wurden in 480 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 3 min gekocht. Direkt danach erfolgte die Hybridisierung auf den Slides über Nacht bei 42°C. Am nächsten Morgen wurden die Slides in folgenden Puffern gewaschen: 15 min Waschpuffer I, 15 min Waschpuffer II, 15 min Waschpuffer III. Um die Slides zu trocknen, wurden sie für 5 min bei 800 rpm und RT zentrifugiert, das Einscannen erfolgte direkt im Anschluss mit dem Scanner ScanArray 4000. Das Setzen der Grids für

die Auswertung wurde mit dem Programm ScanAlyze durchgeführt, die Auswertung der Arrays erfolgte dann im IZKF-Microarraylabor der Universität Würzburg durch Frau Dr. Kneitz.

4.2.7.7 Quantitative RT-PCR

Mit der quantitativen RT-PCR kann im Vergleich zur konventionellen PCR die Menge an PCR-Produkten bestimmt werden. Voraussetzung für die Durchführung der qRT-PCR ist der Einsatz von genspezifischen Primern und Hybridisierungs sonden. Pro Gen werden neben den Primern eine Fluorescein-gekoppelte und eine LC640-gekoppelte Sonde eingesetzt. Beide sind spezifisch für ein bestimmtes PCR-Produkt und lagern sich im Abstand von ein bis zwei Basenpaaren an dieses an. Der zweite Farbstoff kann Licht nur emittieren, wenn er durch den ersten Farbstoff angeregt wird. Dieser Vorgang wird als „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) bezeichnet und setzt voraus, dass beide Sonden direkt nebeneinander gebunden haben. Dadurch ist es möglich, die Menge eines PCR-Produktes nach jedem Zyklus zu quantifizieren.

Die qRT-PCR wurde mit dem Light Cycler FastStart DNA Master HybrProbe Kit (Roche) im Labor der AG Löffler durchgeführt. Das Kit enthält die Taq-Polymerase, die vor ihrer Verwendung mit 60 µl Reaktionsmix (Reaktionspuffer, dNTPs, 10 mM MgCl₂) versetzt wurde. In den Kapillaren wurden jeweils 17 µl Mastermix (s.unten) mit 25 ng (ad 3 µl) cDNA oder 3 µl Wasser (Negativkontrolle) gemischt.

Mastermix für die qRT-PCR im Light Cycler:

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
H ₂ O	ad 17 µl	-/-
Taq-Mix (10X)	2 µl	1X
25 mM MgCl ₂	2,4 µl	4 mM (3 mM durch das MgCl ₂ , 1 mM aus Taq-Mix)
je Primer (5 µM)	0,5 µl	125 nm
je Sonde (3 µM)	0,5 µl	75 nm

Die Kapillaren wurden bei 2.000 rpm für 5 s zentrifugiert und in das Light Cycler-Karussell gesetzt. Anschließend lief die PCR unter folgenden Bedingungen ab:

Enzymaktivierung	95 °C	8 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	9 s	50 Zyklen
Hybridisierung	54 °C	15 s	50 Zyklen
Elongation	72 °C	20 s	50 Zyklen
Kühlung	40 °C	5 min	1 Zyklus

Die Messwerte für die einzelnen Gene wurden gegen das Housekeeping-Gen hALAS normalisiert.

Nachdem die „Cycle thresholds“ (ct) von hALAS mit Hilfe des Light Cyclers ermittelt waren, wurden diese mit den ct-Werten des zu untersuchenden Gens verrechnet (Normalisierung). Der Cycle Threshold ist definiert als die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes signifikant vom Hintergrundsignal abhebt. Somit lässt sich mit Hilfe der Cycle Thresholds eine vergleichende quantitative Aussage über die Ausgangs-DNA-Menge in einer Probe machen. Die Normalisierung unter Zuhilfenahme der Cycle Thresholds geschah, unter der Annahme einer maximalen Amplifikationseffizienz von 100 %, mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{ct}$ - Methode.

$$\Delta\text{ct} = \text{ct Testgen} - \text{ct Housekeeping-Gen}$$

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct Gen (infiziert)} - \Delta\text{ct Gen (uninfiziert)}$$

$$\text{n-fache Expression (Testgen/Kontrollgen): } 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$$

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zum Phänotyp der Mutanten

Die Deletion von *SAP9* und/oder *SAP10* führt bei Anzucht in SD-Medium zu einem Sprossungsdefekt und damit einhergehender Klumpenbildung der Pilze (1). In dieser Arbeit wurden die Mutanten in RPMI1640 + 5 % FCS für zwei Stunden angezogen. Eine leichte Klumpung zu diesem Zeitpunkt war lediglich bei der $\Delta sap10$ -Mutante festzustellen und auch hier war eine Zählung noch gut möglich. Wurden die Pilze für 2 h in SD-Medium angezogen, zeigte sich, dass nach dieser kurzen Zeit auch in diesem Medium keine nennenswerte Klumpung stattfand (Abbildung 5-1).

Um zu klären, ob die fehlende Klumpenbildung der Mutanten eine Folge des Mediums darstellt oder ob dieser Effekt auf der kurzen Anzuchtzeit von 2 h beruht, wurden Übernachtskulturen jeweils in RPMI- und SD-Medium am Folgetag mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass der Wildtyp in beiden Medien mit guter Abtrennung der Tochterzellen wuchs, während die Mutanten in SD-Medium die von Albrecht *et al.* beschriebene Klumpenbildung aufgrund des Teilungsdefekts aufwiesen (1). Die $\Delta sap9$ -Mutante bildete in RPMI-Medium keine Klumpen, während das Wachstum der $\Delta sap10$ -Mutante auch in RPMI zu Pilz-Aggregaten führte (Abbildung 5-2). Demnach ist der klumpige Phänotyp in erster Linie vom Medium abhängig. Die Klumpenbildung der $\Delta sap10$ -Mutante in RPMI-Medium deutet darauf hin, dass bei dieser Mutante der Effekt noch ausgeprägter ist als bei der $\Delta sap9$ -Mutante und eine längere Kultivierung hier unabhängig vom Medium zum beobachteten Phänotyp führt.

Die Analyse der Filamentierungskinetiken ergab, dass die $\Delta sap1-3$ - und $\Delta sap4-6$ -Mutanten sich in ihrer Filamentierung nicht vom Wildtyp unterschieden und nach 1,5 h etwa 5 μm große Keimschläuche gebildet hatten. Diese Keimschlauchlänge war bei der $\Delta sap9/10$ - und der $\Delta sap9$ -Mutante 30 min später erreicht. Die verzögerte Auskeimung beruht auf der Deletion von *SAP9*, da die $\Delta sap10$ -Einzelmutante zeitgleich mit dem Wildtyp auskeimte. Die Komplementierung von *SAP9* in der $\Delta sap9$ -Mutante führte ebenfalls wieder zu schnellerer Auskeimung. Um diese stammabhängigen Differenzen zu synchronisieren, wurden die $\Delta sap9/10$ - und die $\Delta sap9$ -Mutanten 30 min früher als die anderen Stämme inokuliert und im Schüttler platziert. Zusätzlich erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle der Stämme. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass auftretende Unterschiede der Stämme in ihrer Interaktion mit den Zellen aus unterschiedlicher Keimschlauchlänge resultieren.

Die Generierung von *C. albicans*-Mutanten ist mit Manipulationen im *URA3*-Lokus des Genoms verbunden (56). Der Wildtyp-Stamm CA14+pClp10 entstammt dem in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp SC5314, wurde aber im *URA3*-Lokus manipuliert und trägt das leere Plasmid pClp10. In

Experimenten zur ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten wurde der Wildtyp SC5314 mit CAI4+pClp10 verglichen (s. Kap. 5.3).

Um zu untersuchen, ob die Expression des leeren Plasmids allein eine Auswirkung auf die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten hat, wurden in Experimenten zur ROS-Freisetzung die $\Delta sap9$ -Einzelmutante mit dem leeren Plasmid pClp10 mit der $\Delta sap9$ -Einzelmutante ohne Plasmid verglichen (s. Kap. 5.3).

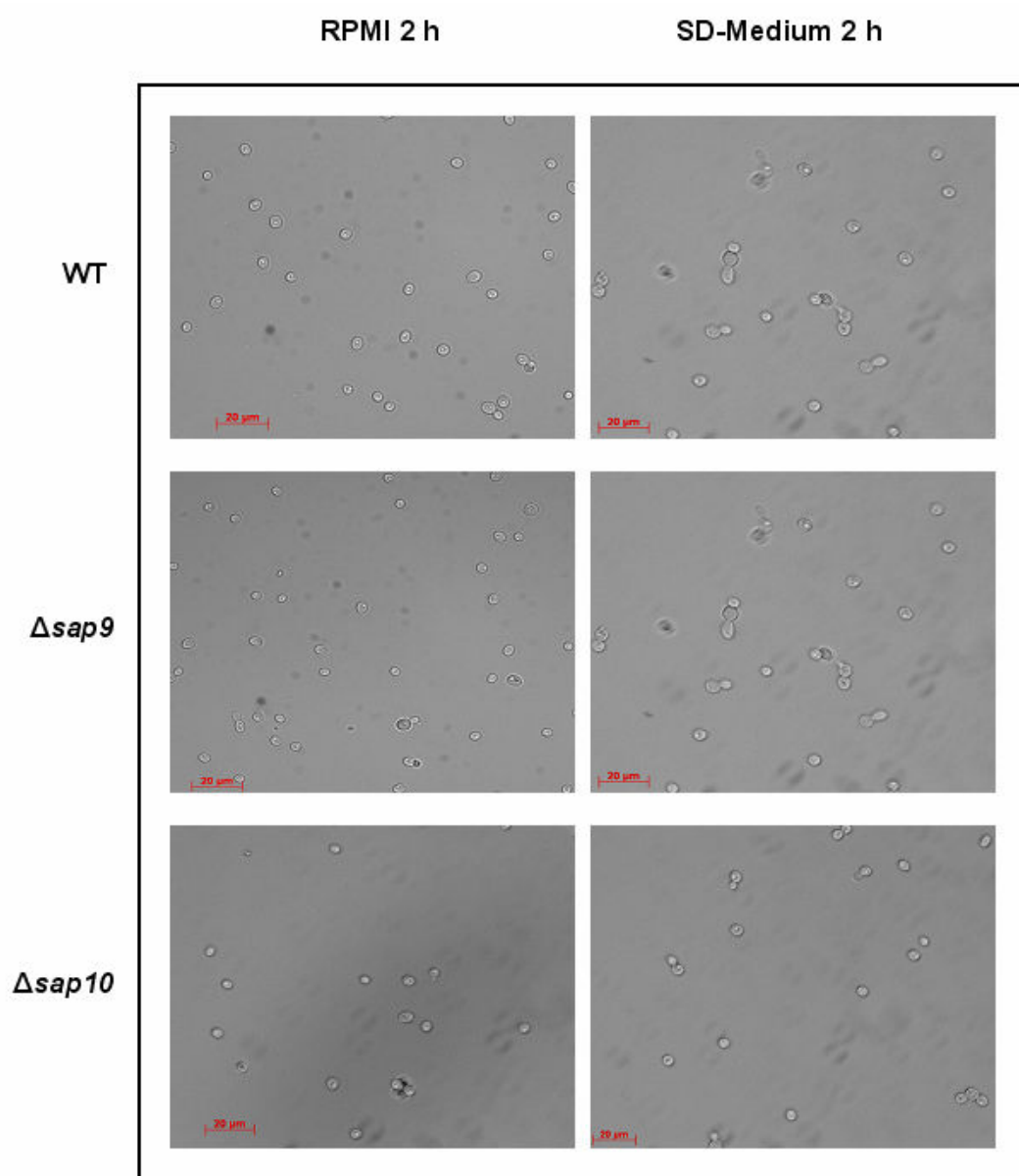


Abbildung 5-1: Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme nach 2 h

Wildtyp, $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ wurden für 2 h in SD-Medium bei 30°C oder in RPMI + 5 % FCS bei 22°C angezogen und lichtmikroskopisch analysiert (Objektiv: 40X).

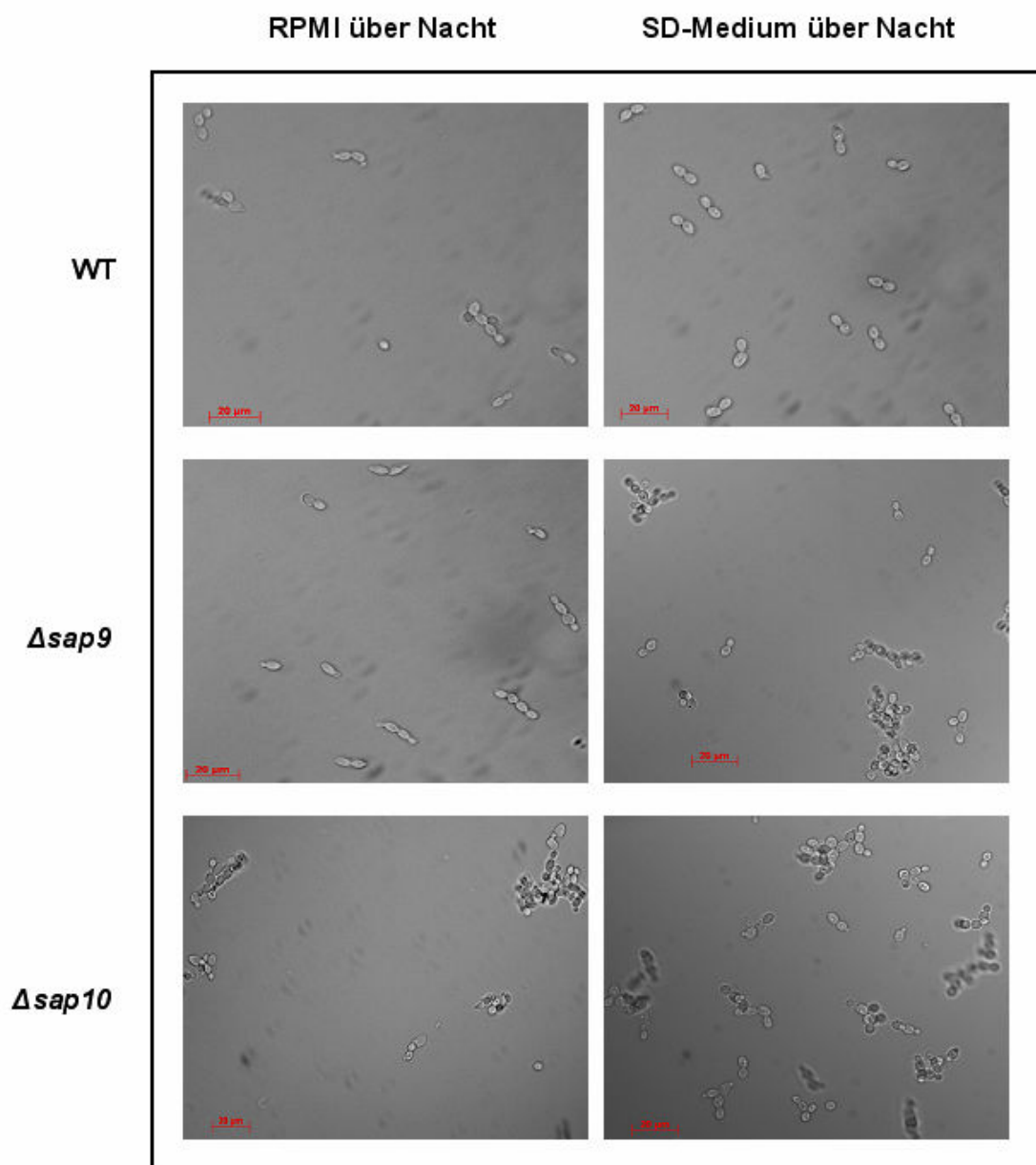


Abbildung 5-2: Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme nach Übernachtsanzucht

Wildtyp, $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ wurden für ca. 16 h in SD-Medium bei 30°C oder in RPMI + 5 % FCS bei 22°C angezogen und lichtmikroskopisch analysiert (Objektiv: 40X).

5.2 Die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten wird durch eine Deletion von *SAP9* reduziert

Chemotaxis, die gerichtete Migration neutrophiler Granulozyten zu einem Stimulus, kann durch *C. albicans* induziert werden (47, 187, 240). Die Rolle der Saps bei diesem Prozess wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Das für diesen Versuch verwendete Transwell-System besteht aus Filter-Einsätzen für 24-Well-Platten mit einer Porengröße von 3 μm . Nur wenn die etwa 15 μm neutrophilen Granulozyten hinreichend aktiviert werden, migrieren sie durch die Poren zu der chemotaktisch wirkenden Substanz.

Um den Einfluss der Saps auf die Migrationsaktivität zu überprüfen, wurden zunächst Hefen und 5-10 μm große Keimschläuche des Wildtyps sowie der *SAP*-Dreifachdeletionsmutanten getestet.

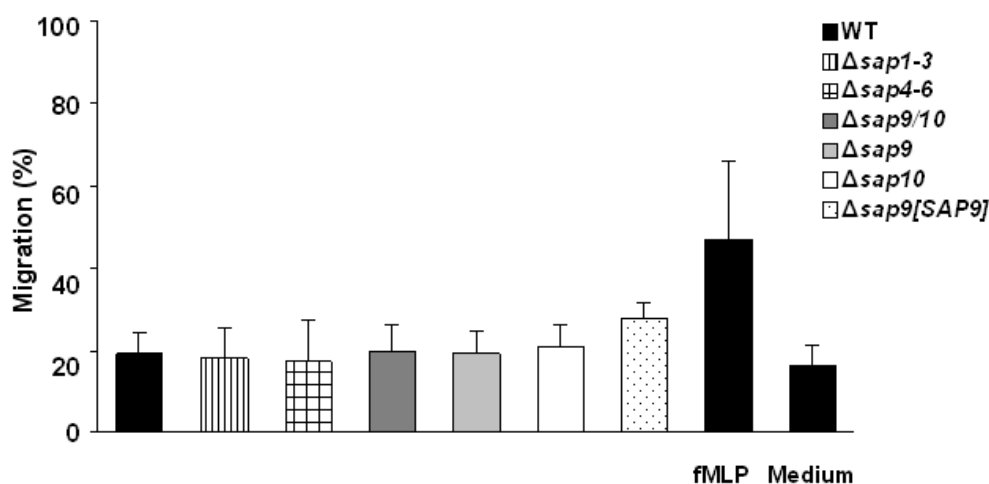


Abbildung 5-3: Hefen sind schwache Induktoren einer *SAP*-unabhängigen Chemotaxis

Die Migration von neutrophilen Granulozyten zu Wildtyp- und *SAP*-Mutanten (Hefen) nach einer Stunde Koinkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte von mehr als fünf Experimenten mit Standardabweichung. fMLP: Positivkontrolle; Medium: Negativkontrolle.

Während Wildtyp-Hefen eine nur wenig über der Spontanmigration liegende Migrationsreaktion von $19 \pm 5\%$ auslösten und keine der Mutanten sich signifikant vom Wildtyp unterschied (Abbildung 5-3), induzierten die Keimschläuche des Wildtyps eine Chemotaxis von $65 \pm 26\%$ (Abbildung 5-4). Die Koinkubation mit der $\Delta sap1-3$ -Mutante ($65 \pm 35\%$) und der $\Delta sap4-6$ -Mutante ($68 \pm 22\%$) führte nicht zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp, die Migration zu den Keimschläuchen der $\Delta sap9/10$ -Mutante war mit $42 \pm 10\%$ signifikant reduziert (Abbildung 5-4). Um zu überprüfen, ob die Deletion von *SAP9* oder *SAP10* die Ursache für diesen Effekt war oder es sich um einen Synergismus handelte, wurden im Anschluss an die Mehrfachmutanten auch die Einzelmutanten getestet. Hier zeigte sich, dass eine Deletion von *SAP9*

allein ausreichte, um die Migration neutrophiler Granulozyten stark zu vermindern ($29 \pm 4 \%$). Eine *SAP10*-Einzelmutante zeigte ein dem Wildtyp ähnliches Aktivierungspotential ($58 \pm 34 \%$). Die komplementierte Version der $\Delta sap9$ -Mutante exprimiert *SAP9* auf dem Plasmid pClp10. Auf diese Weise konnte der reduzierende Effekt auf die Chemotaxis rückgängig gemacht und belegt werden, dass es sich in der Tat um einen *SAP9*-abhängigen Mechanismus handelt (Abbildung 5-4).

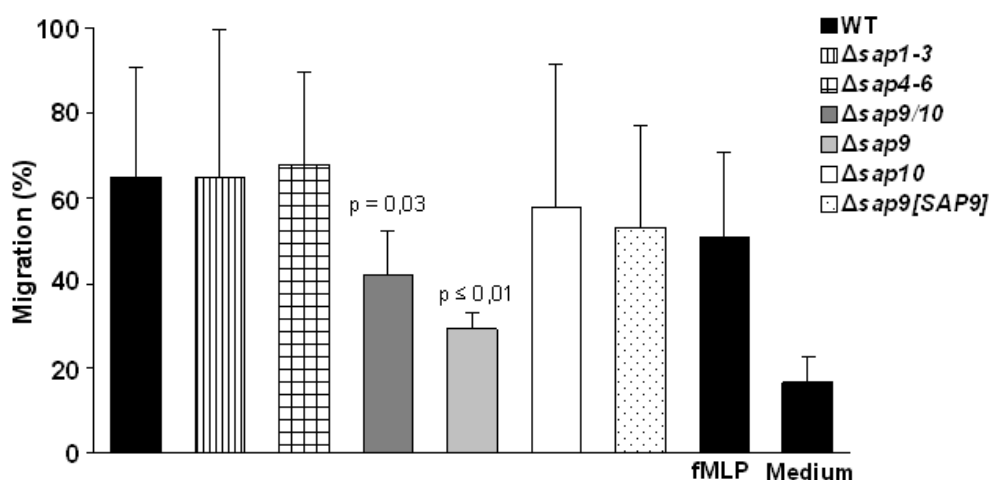


Abbildung 5-4: Keimschläuche induzieren eine *SAP9*-abhängige Migration

Migration von neutrophilen Granulozyten zu Wildtyp- und *SAP*-Mutanten nach einer Stunde Koinkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte von mehr als fünf Experimenten mit Standardabweichung. fMLP: Positivkontrolle; Medium: Negativkontrolle.

Durch Sekretion des Zytokins IL-8 können neutrophile Granulozyten ihre eigene Migrationsaktivität verstärken. IL-8 Sekretion wird besonders durch die filamentöse Wachstumsform von *C. albicans* induziert (240). Um zu untersuchen, ob die Deletion der Aspartatprotease *SAP9* auch auf die Sekretion von IL-8 und somit auf die Rekrutierung weiterer Granulozyten einen Einfluss hat, wurden Hefen und Keimschläuche des Wildtyps sowie der *SAP9*-Mutanten für 6 h und 8 h mit Granulozyten inkubiert und der Überstand mittels ELISA auf IL-8 getestet. Nach 6 h zeigte sich ein Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen Wildtyp-Hefen (1645 ± 351 pg/ml) und Keimschläuchen (2105 ± 663 pg/ml), welcher nach 8 h allerdings kleiner wurde, da die Menge an sezerniertem IL-8 bei Keimschläuchen gleich blieb und bei Hefen noch anstieg (Abbildung 5-5).

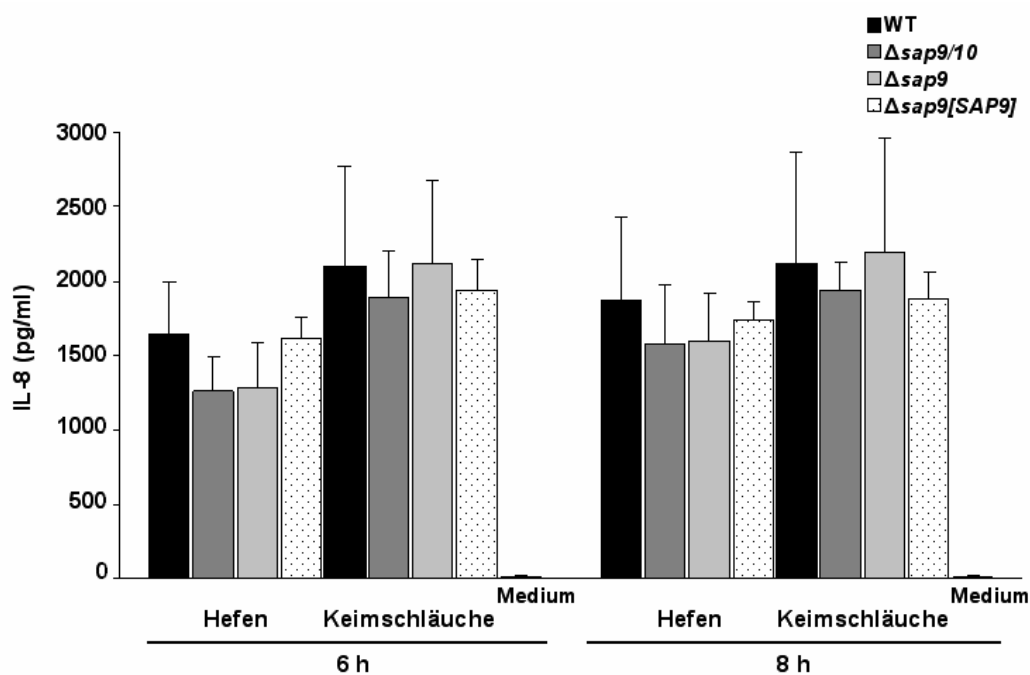


Abbildung 5-5: IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten als Reaktion auf *C. albicans*

Die Überstände von Kokulturen wurden nach 6 h und 8 h abgenommen und mittels ELISA auf ihren IL-8-Gehalt überprüft. Kontrolle: Medium und Granulozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei Experimenten mit Standardabweichung.

Nach 6 h war die Zytokinsekretion als Reaktion auf $\Delta sap9/10$ - und $\Delta sap9$ -Hefen reduziert (1262 ± 233 pg/ml bzw. 1283 ± 301 pg/ml). Diese Unterschiede waren sowohl nach 6 h als auch nach 8 h ($\Delta sap9/10$: 1576 ± 405 bzw. $\Delta sap9$: 1594 ± 329 pg/ml) ohne Signifikanz. Keimschläuche der $\Delta sap9/10$ -Mutante sowie der $\Delta sap9$ -Mutante unterschieden sich zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant vom Wildtyp.

5.3 Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch SAP9 beeinflusst

Um den Einfluss sezernierter Aspartatproteasen auf den oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, wurden neutrophile Granulozyten mit dem Wildtyp sowie zunächst mit den Dreifachmutanten ($\Delta sap1-3$, $\Delta sap4-6$, $\Delta sap9/10$) koinkubiert. Die Erfassung der ROS-Freisetzung erfolgte mit Dichlorfluorescein (s. Kap. 4.2.4.1) über einen Zeitverlauf von 2,5 h. Es wurden sowohl Hefen als auch 5-10 μm lange Keimschläuche in diesem Experiment verwendet. Da die Trockengewichtsdifferenz zwischen Hefen und Keimschläuchen unter 20 % lag, konnte gewährleistet werden, dass es sich bei den Ergebnissen um morphotypspezifische und nicht um biomassenabhängige Reaktionen handelt. Im Verlauf der Experimente mit Hefen zeigte sich, dass die $\Delta sap1-3$ - und die $\Delta sap4-6$ -Mutanten einen ähnlichen oxidativen Burst auslösten wie der Wildtyp, während die $\Delta sap9/10$ -Mutante dazu nicht in der Lage war. Stattdessen war die ROS-Freisetzung signifikant reduziert (Abbildung 5-6).

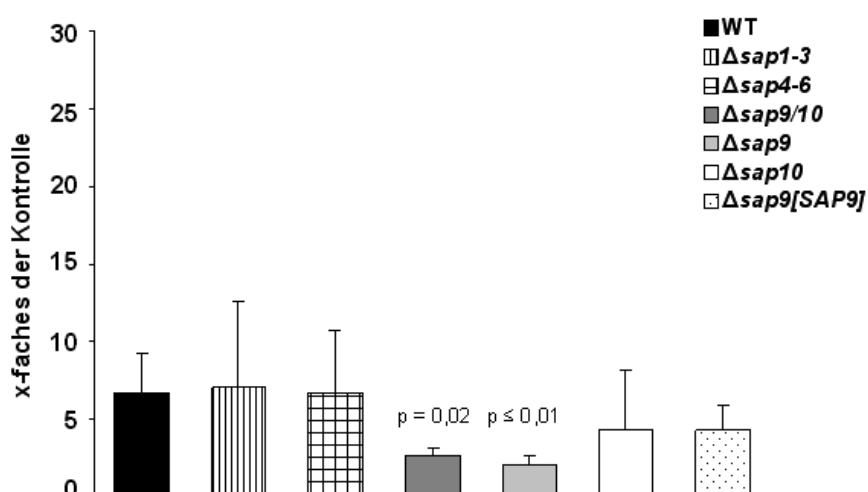


Abbildung 5-6: SAP9 beeinflusst den Hefe-induzierten oxidativen Burst

Darstellung des oxidativen Bursts als Reaktion auf *C. albicans*-Hefen (MOI=0,5) zum Zeitpunkt $t = 100$ min als Steigerung im Verhältnis zur Kontrolle (Medium und Granulozyten). Dargestellt sind die Mittelwerte von mehr als 5 Experimenten mit Standardabweichung.

Das Gleiche wurde für Keimschläuche beobachtet, welche generell eine deutlich höhere ROS-Freisetzung provozierten. Auch hier war der oxidative Burst bei der $\Delta sap9/10$ -Mutante stark vermindert. Eine Zeitpunktanalyse zeigte eine ROS-Reduktion nach 100 min Koinkubation für die $\Delta sap9/10$ -Hefen (3-faches der Kontrolle, im Vergleich der Wildtyp: 7-faches \pm 3-faches der Kontrolle, $p=0,02$; Abbildung 5-6). Dieser Effekt war ähnlich mit Keimschläuchen als Stimulus ($\Delta sap9/10$: 13 \pm 3-faches der Kontrolle; Wildtyp: 21 \pm 6-faches der Kontrolle, $p= 0,04$; Abbildung 5-7). Die jeweiligen Einzelmutanten wurden ebenfalls getestet, um herauszufinden, welche der

beiden Proteasen diesen Effekt verursachte. Es zeigte sich, dass, ähnlich wie bei der Chemotaxis, eine $\Delta sap10$ -Mutante keinen Effekt auf die ROS-Freisetzung verglichen zum Wildtyp hatte. Im Kontrast dazu führte eine $\Delta sap9$ -Mutante zu einer deutlichen Reduktion des oxidativen Bursts, was sowohl für Keimschläuche (12 ± 6 -faches der Kontrolle; $p \leq 0,01$) als auch für Hefen ($1,9$ -faches der Kontrolle; $p \leq 0,01$) galt.

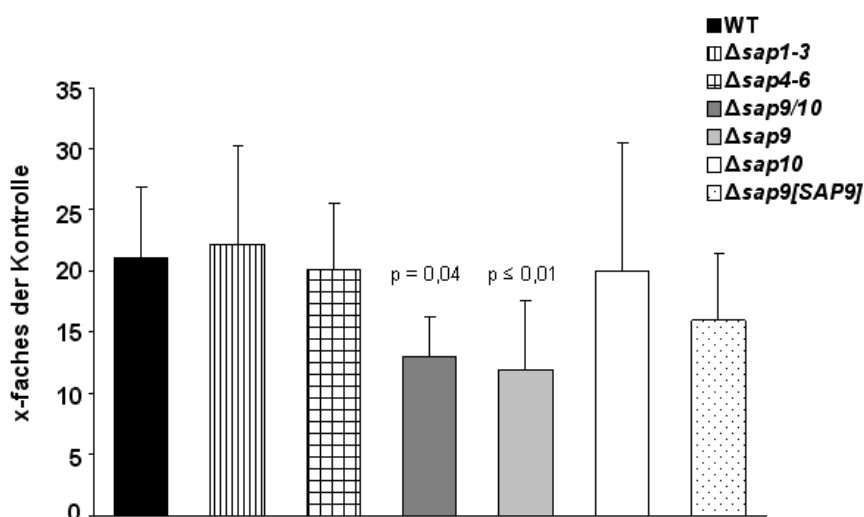


Abbildung 5-7: SAP9 beeinflusst den keimschlauch-induzierten oxidativen Burst

Darstellung des oxidativen Bursts als Reaktion auf *C. albicans*-Keimschläuche (MOI=0,5) zum Zeitpunkt $t = 100$ min als Steigerung im Verhältnis zur Kontrolle (Medium und Granulozyten). Dargestellt sind die Mittelwerte von mehr als 5 Experimenten mit Standardabweichung.

Die Effekte der $\Delta sap9$ -Mutante konnten aufgehoben werden, wenn die komplementierte Mutante verwendet wurde, welche *SAP9* auf dem Plasmid pClp10 kodiert (Abbildung 5-6 und Abbildung 5-7). Um zu bestätigen, dass die Rekonstitution des Wildtyp-ähnlichen oxidativen Bursts der Komplementante ein Effekt der Deletion von *SAP9* und nicht des Plasmids selbst ist, wurde eine $\Delta sap9$ -Mutante mit leerem Plasmid (Stamm M1180) getestet. Die ROS-Freisetzung entsprach hier der Mutante ohne Plasmid (Abbildung 5-8 A).

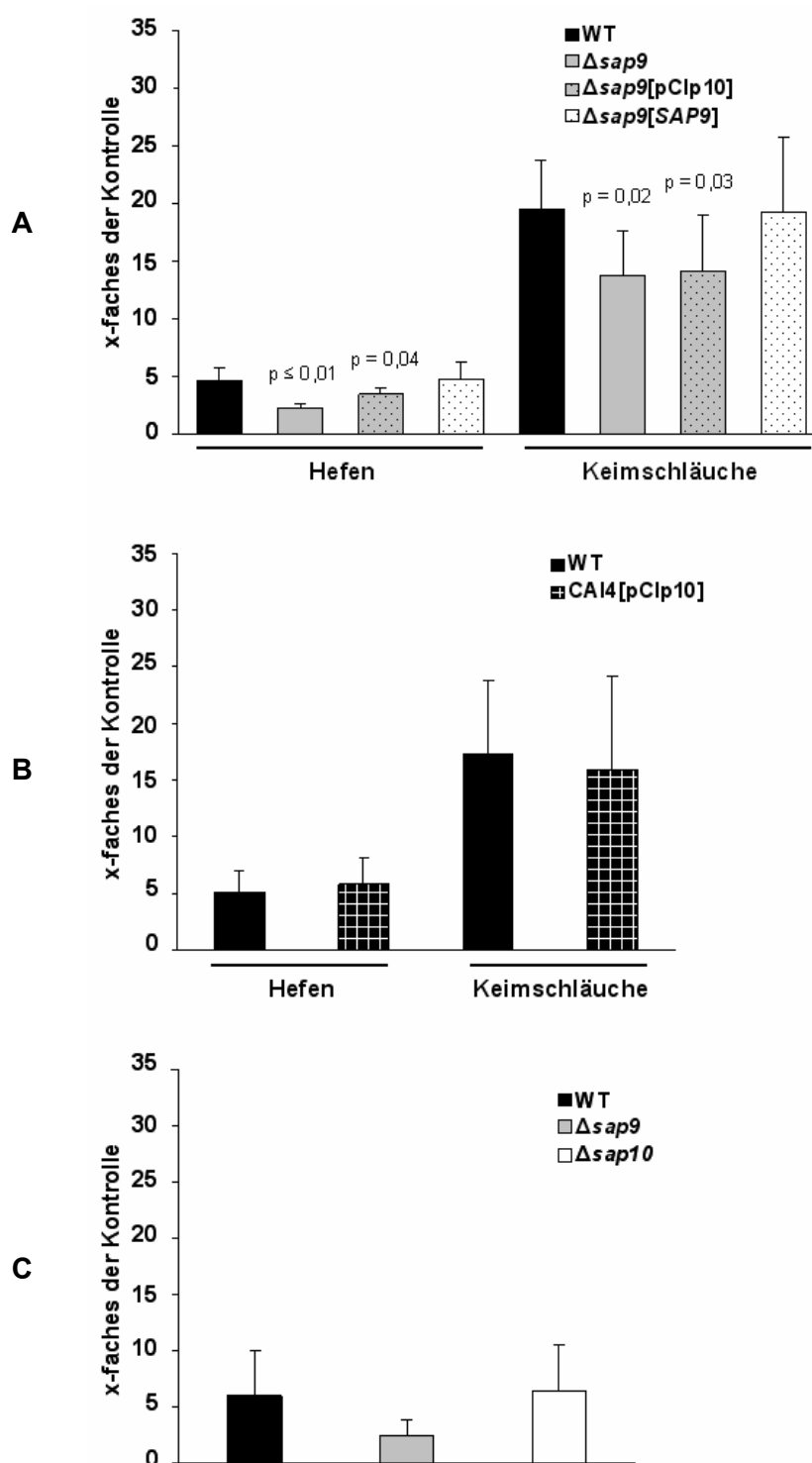


Abbildung 5-8: Kontrollen

A: Expression des Plasmids pClp10 in der *SAP9*-Deletionsmutante hat keinen Einfluss auf die ROS-Freisetzung

B: Manipulation des *URA3*-Lokus hat keinen Einfluss auf die ROS- Freisetzung

C: die Anzucht der Pilze in SD-Medium hat keinen Einfluss auf die ROS-Freisetzung.

Darstellung der oxidativen Reaktion zum Zeitpunkt $t = 100$ min als Steigerung im Verhältnis zur Kontrolle (Medium und Granulozyten). Dargestellt sind die Mittelwerte von mehr als drei Experimenten mit Standardabweichung.

Des Weiteren musste untersucht werden, ob die Manipulation des *URA3*-Lokus durch die Gen-deletion einen Einfluss auf das Verhalten der neutrophilen Granulozyten hat. Der Stamm CAI4+pClp10 entstammt dem Wildtyp SC5314, wurde aber im *URA3*-Lokus manipuliert und trägt das leere Plasmid pClp10. Mit beiden Morphotypen dieses Stammes wurden ebenfalls Messungen des oxidativen Burst durchgeführt, welche sich nicht von denen des Wildtyps SC5314 unterscheiden (Abbildung 5-8 B). Dies lässt darauf schließen, dass die *URA3*-Manipulation die Reaktion der neutrophilen Granulozyten nicht beeinflusst und die beobachteten Effekte der $\Delta sap9$ -Mutante ausschließlich auf Deletion und Reintegration des *SAP9*-Gens beruhen.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte der $\Delta sap9$ -Mutante abhängig vom Anzucht-medium sind, wurden die Pilze für 2 h in SD-Medium bei 30 °C statt in RPMI-Medium angezo-gen, ausgezählt und in RPMI-Medium aufgenommen. Messungen des oxidativen Bursts zeig-ten, dass Wildtyp, $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutante die gleichen Einflüsse auf den oxidativen Burst hatten wie in RPMI angezogenen Pilze (Abbildung 5-8 C).

5.4 Die durch *C. albicans* induzierte Apoptose wird durch Deletion von *SAP9* reduziert

Die Apoptose neutrophiler Granulozyten kann durch verschiedene Mikroorganismen induziert werden. Das Absterben der neutrophilen Granulozyten führt zu einer raschen Phagozytose durch Makrophagen, wodurch das umliegende Gewebe vor austretenden ROS geschützt wird (98, 235, 241). Um die Auswirkungen lebender *C. albicans* auf die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und eine eventuelle Rolle der Saps in der Induktion des programmierten Zelltodes zu untersuchen, wurden 5×10^5 Granulozyten und 5×10^5 Pilze für 1-3 h koinkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten mit AnnexinV-FITC und Propidiumiodid gefärbt.

Nach einer Stunde war der Anteil der apoptotischen Zellen noch gering und Unterschiede zwischen Morphotypen und Stämmen nicht signifikant erkennbar (Abbildung 5-9).

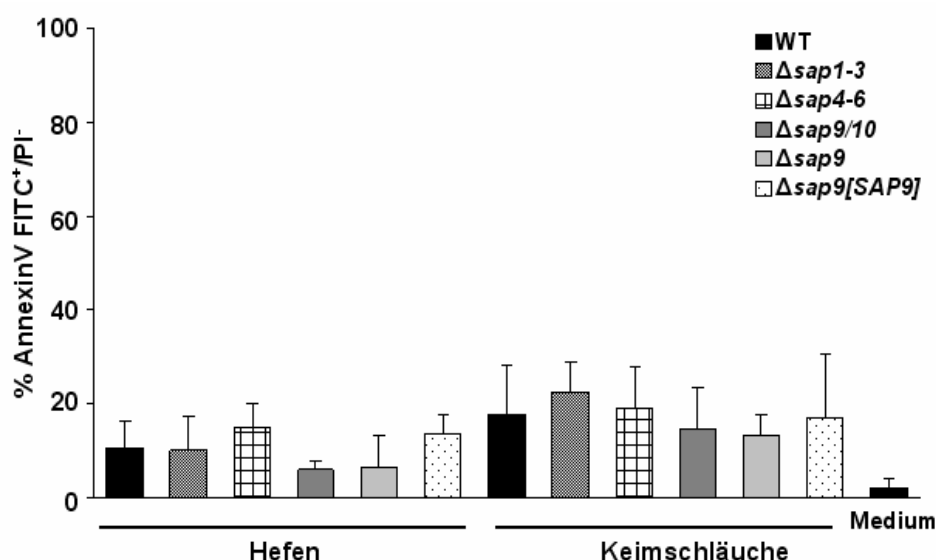


Abbildung 5-9: *C. albicans*-induzierte Apoptose nach einer Stunde

Nur Annexin-positive, PI-negative Zellen wurden als apoptotisch angesehen. Mittelwerte aus mindestens fünf Experimenten mit Standard-abweichung. Kontrolle: Medium und Granulozyten.

Die Apoptoserate stieg nach 2 h signifikant an, wenn die Zellen mit Wildtyp-Keimschläuchen inkubiert wurden, während Wildtyp-Hefen nur geringe Effekte auf die Apoptose hatten (Hefen: 12 ± 7 %, Keimschläuche: 34 ± 18 %; $p \leq 0,001$, Abbildung 5-10). Wie auch schon bei der Chemotaxis oder beim oxidativen Burst beobachtet, unterschieden sich die Deletionsmutanten $\Delta sap1-3$ (Hefen: 15 ± 8 %, Keimschläuche: 33 ± 5 %) und $\Delta sap4-6$ (Hefen: 18 %, Keimschläuche: 35 ± 18 %) nicht deutlich vom Wildtyp, weder bei Hefen als eingesetztem Stimulus noch bei Keimschläuchen (Abbildung 5-10). Jedoch führte die Koinkubation mit Keimschläuchen der $\Delta sap9/10$ -Mutante ($15,4 \pm 5$ %; $p = 0,02$) und der $\Delta sap9$ -Mutante ($10,4 \pm 6$ %; $p \leq 0,01$) zu

signifikant verringerter Apoptose (Abbildung 5-10). Die Hefen dieser beiden Mutanten lösten zwar reduzierte, jedoch nicht signifikant verminderte Apoptose verglichen mit dem Wildtyp aus. Der ebenfalls getestete komplementierte Stamm konnte den reduzierenden Effekt der *SAP9*-Deletion auf die Apoptose wieder rückgängig machen ($28 \pm 7\%$).

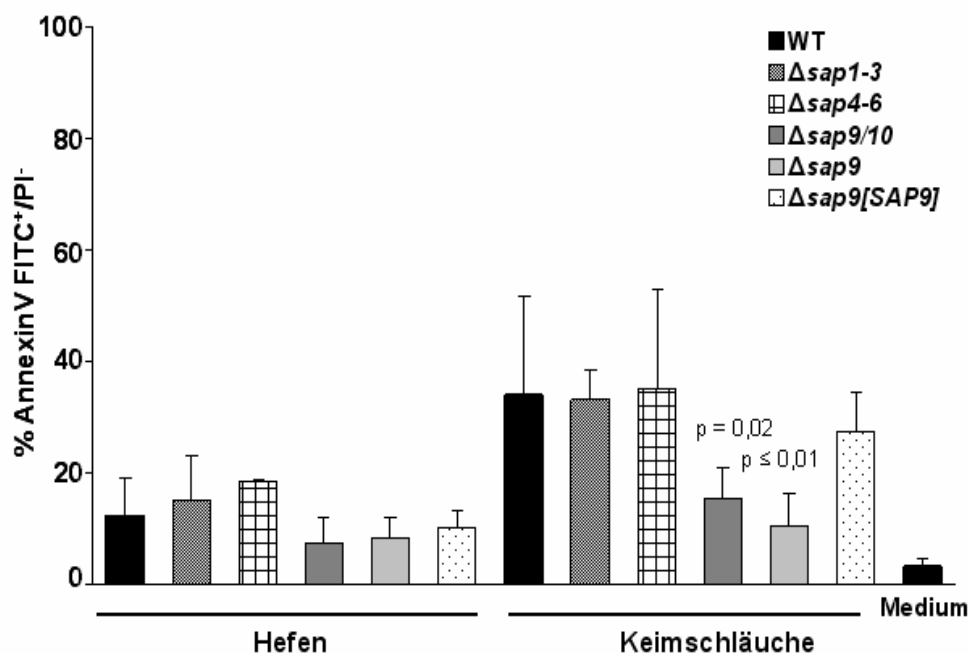


Abbildung 5-10: Deutliche Apoptoseinduktion durch Keimschläuche nach 2 Stunden

Nur Annexin-positive, PI-negative Zellen wurden als apoptotisch angesehen. Mittelwerte aus mindestens fünf Experimenten mit Standardabweichung. Kontrolle: Medium und Granulozyten.

Die zur Auswertung herangezogenen Dotplots zeigten, dass Wildtyp-Keimschläuche eine deutliche Populationsverschiebung nach rechts (AnnexinV-FITC positiv) auslöste. Diese Verschiebung war bei der $\Delta sap9$ -Mutante deutlich schwächer (Abbildung 5-11). Nach 3 h stagnierte der Anteil der apoptotischen Zellen (Wildtyp-Hefen: $15 \pm 6\%$; Wildtyp-Keimschläuche: $30 \pm 10\%$; $p \leq 0,0001$). Es kam zu keiner weiteren Steigerung der Apoptoserate (Abbildung 5-12). Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *SAP9* auch einen Einfluss auf die Induktion der Granulozyten-Apoptose nimmt.

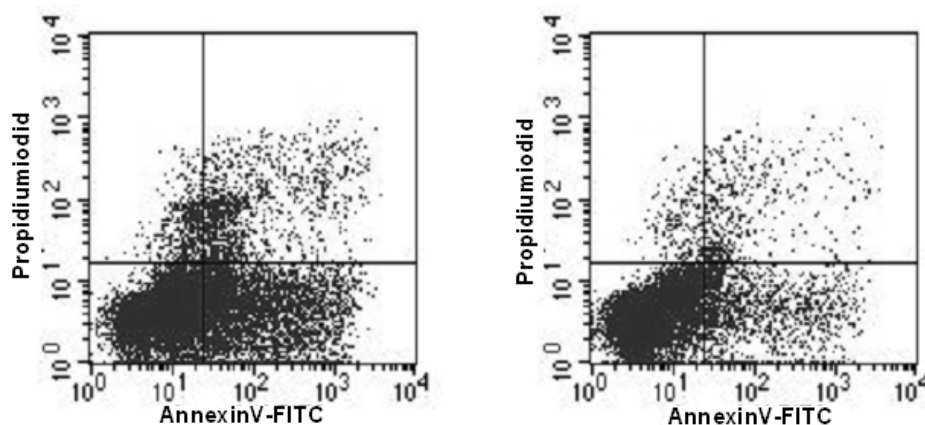


Abbildung 5-11: Die Populationsverschiebung durch Apoptoseinduktion ist *SAP9*-abhängig

Darstellung zweier exemplarischer Dot Plots, wie sie bei der Messung und der Auswertung verwendet wurden.

Links: Der Wildtyp induziert eine deutliche Verschiebung der Zellpopulation nach rechts (AnnexinV-FITC positive Zellen: 36 %).

Rechts: Deletion von *SAP9* führt zu einer deutlich erkennbar reduzierten Verschiebung (AnnexinV-FITC positive Zellen: 12 %).

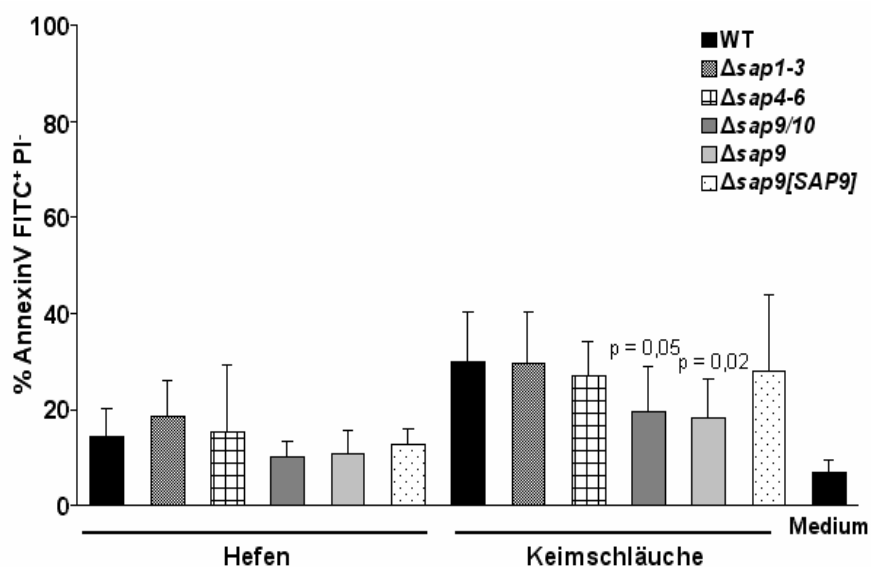


Abbildung 5-12: Nach drei Stunden stagniert die Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten

Nur Annexin-positive, PI-negative Zellen wurden als apoptotisch angesehen. Mittelwerte aus mindestens fünf Experimenten mit Standardabweichung. Kontrolle: Medium und Granulozyten.

5.5 SAP9 moduliert die ROS-induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten

Die durch Mikroorganismen induzierte Apoptose wird mit der ROS-Generation durch die NADPH-Oxidase in Verbindung gebracht. Die Deletion von *SAP9* führt zu reduzierter ROS-Freisetzung und könnte somit auch die Ursache für die verringerte Apoptose darstellen.

Um diesen Ansatz zu untersuchen, wurden Apoptose und ROS-Formation in Gegenwart des NADPH-Oxidaseinhibitors DPI (5 µg/ml) quantifiziert. In Kontrollversuchen wurden die Pilze mit der gleichen Menge DPI inkubiert und im Durchflusszytometer auf Apoptose hin untersucht. Der Versuch ergab keine Schädigung der Pilze durch DPI. Ebenso verfahren wurde mit dem Lösungsmittel DMSO, welches weder auf die Zellen noch auf die Pilze in der eingesetzten Menge einen proapoptotischen Effekt hatte. Eingesetzt in einer Konzentration von 5 µg/ml inhibierte DPI den oxidativen Burst komplett (Abbildung 5-13).

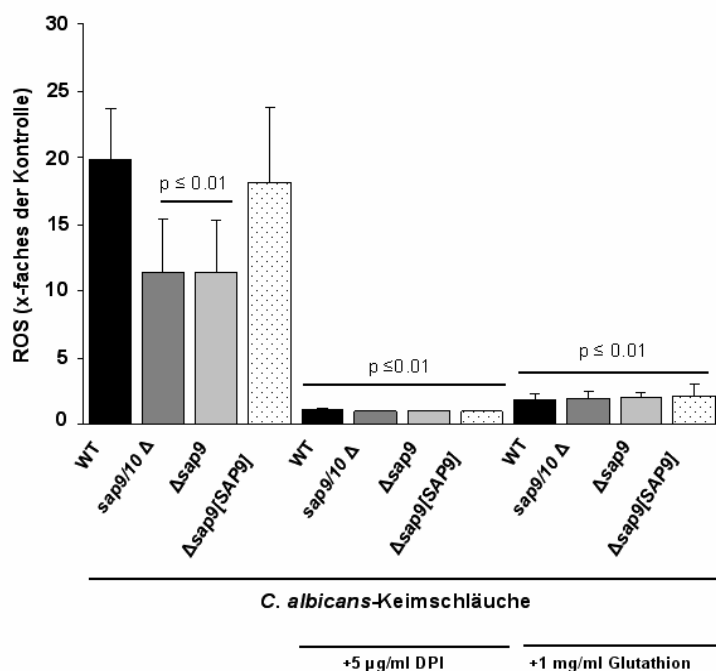


Abbildung 5-13: Inhibition der ROS-Bildung durch DPI und Glutathion

Dargestellt ist die ROS-Freisetzung zum Zeitpunkt $t=100$ min als x-fache Steigerung verglichen mit der Kontrolle (Medium und Granulozyten). Mittelwerte von mindestens 3 Experimenten mit Standardabweichung.

Es zeigte sich des Weiteren, dass der Einsatz von DPI zu einer signifikant reduzierten Apoptose führte, die nicht mehr stammabhängig war. Ohne DPI waren nach 2 h 10 ± 6 % der mit der $\Delta sap9$ -Mutante inkubierten Zellen apoptotisch (Abbildung 5-10). Mit DPI blieb dieser Anteil bei der $\Delta sap9$ -Mutante ähnlich (14 ± 2 %), während der Wildtyp durch die Hemmung der NADPH-Oxidase nur noch Apoptose induzieren konnte, die der durch die $\Delta sap9$ -Mutante ausgelösten Apoptose glich (18 ± 8 %; Abbildung 5-14).

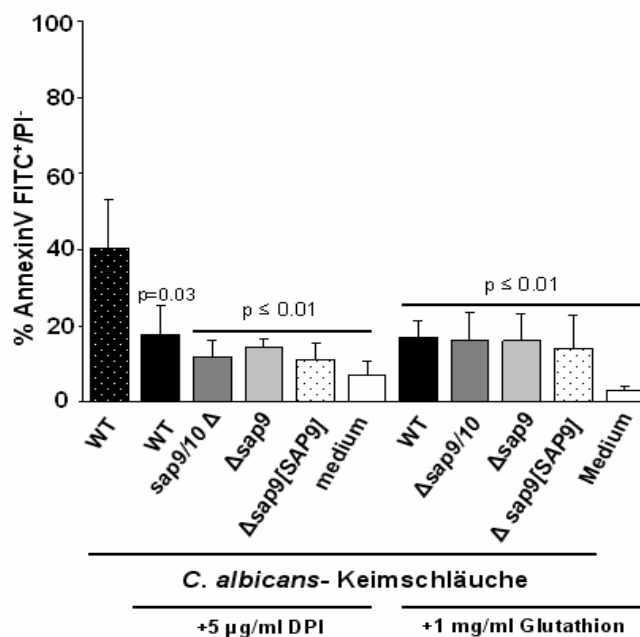


Abbildung 5-14: Inhibition der ROS-Produktion führt zu reduzierter Apoptose

Nur Annexin-positive, PI-negative Zellen wurden als apoptotisch angesehen. Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten mit Standardabweichung.

Das gleiche Experiment wurde mit dem Reduktionsmittel Glutathion (1 mg/ml) durchgeführt, welches ROS durch Übertragung von Elektronen effektiv zu neutralisieren vermag (Abbildung 5-13). Die Gegenwart von Glutathion führte zu ebenfalls signifikant reduzierter Apoptose, wenn auch nicht mit der gleichen Effektivität wie DPI (Abbildung 5-14). Diese Ergebnisse zeigen, dass *C. albicans*-induzierte ROS-Produktion zur Apoptose der neutrophilen Granulozyten führt und dass Sap9 diesen Prozess maßgeblich beeinflusst.

5.6 Die Degranulation von neutrophilen Granulozyten wird nicht durch die sezernierte Aspartatprotease SAP9 beeinflusst

Das Enzym Elastase, eine Serinprotease der azurophilen Granula, hat einen maßgeblichen Anteil an der mikrobiellen Degradation im Phagolysosom. Innerhalb kürzester Zeit fusionieren die Granula mit dem Phagosom und entleeren ihren Inhalt. Die Elimination von Mikroorganismen kann aber nur auf diesem Wege erfolgen, wenn sie klein genug sind. Obwohl neutrophile Granulozyten viele Partikel aufnehmen können, sind sie nicht in der Lage, Keimschläuche von *C. albicans* oder *A. fumigatus* zu phagozytieren. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass die Zellen die Pilze umfließen und so versuchen, ihre Kontaktfläche zu vergrößern, um auf diese Weise ihre toxischen Substanzen möglichst effizient freizusetzen (240). Des Weiteren ist bekannt, dass Elastase sich an der Oberfläche der Granulozyten anlagert, wenn diese stimuliert werden (161, 162). Um dieses Verhalten zu dokumentieren, wurden fluoreszenzmikroskopische

Präparate angefertigt, bei denen die Zellen nicht permeabilisiert wurden, um nur extrazelluläre Elastase mittels Antikörperfärbung darzustellen.

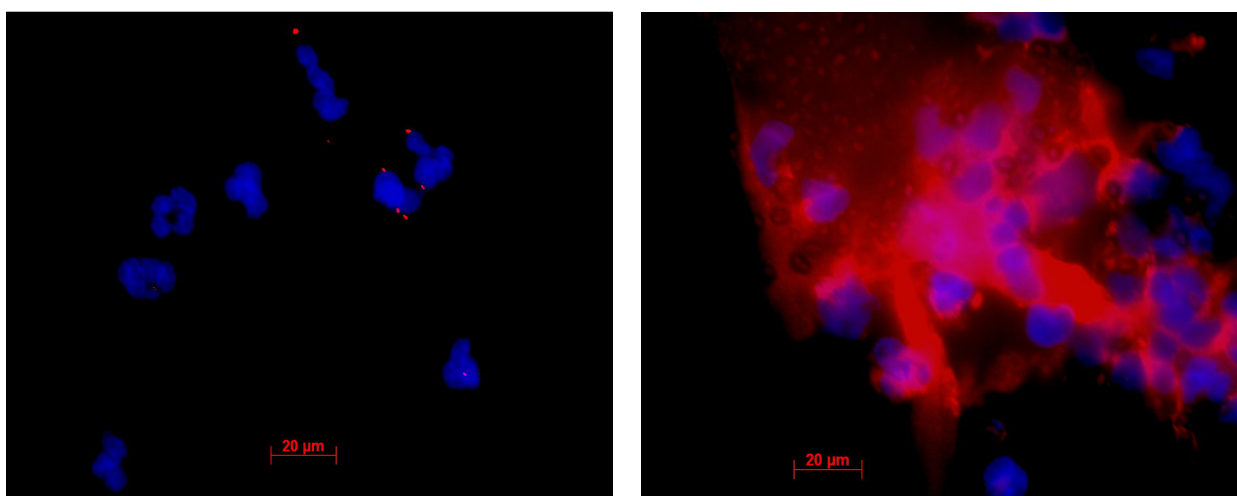


Abbildung 5-15: Positiv- und Negativkontrolle

Links: unbehandelte Granulozyten (Negativkontrolle); rechts: mit 2,5 µg/ml Zymosan (Positivkontrolle). Die Nuklei wurden mit DAPI angefärbt, rot dargestellt ist Elastase, die nach Stimulation mit Zymosan zu einer Klumpung der Zellen, Nukleusverformung und massiver Degranulation führt.

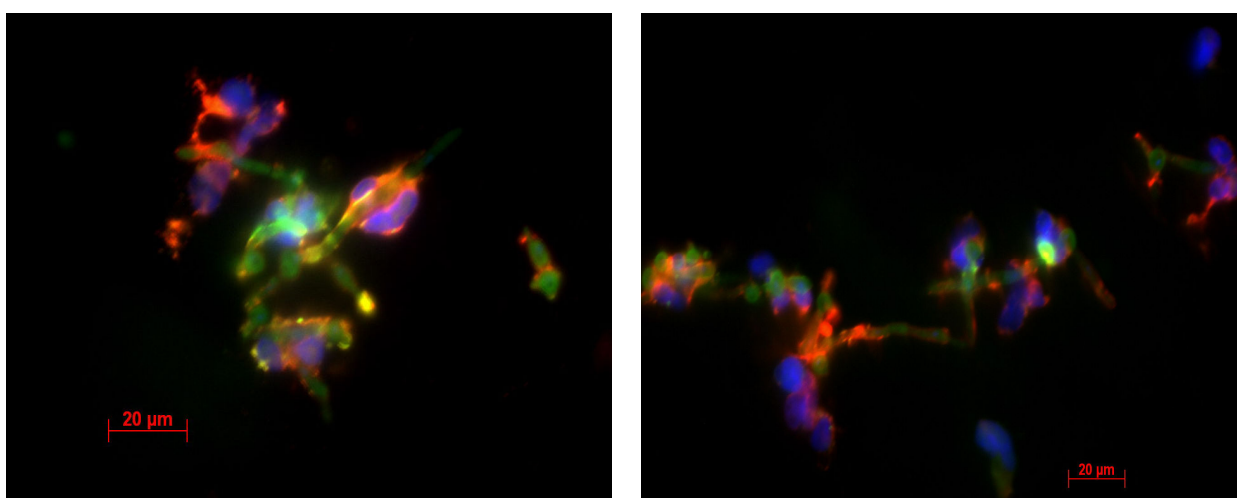


Abbildung 5-16: *C. albicans* Wildtyp und neutrophile Granulozyten

Mit FITC gefärbte Pilze (grün) und Granulozyten (mit DAPI blau gefärbte Nuklei) wurden für 2 h koinkubiert. Elastase (rot) tritt aus den Zellen aus und lagert sich an die Pilze an. Gut zu erkennen ist das Umfließen der Keimschläuche im linken Bild.

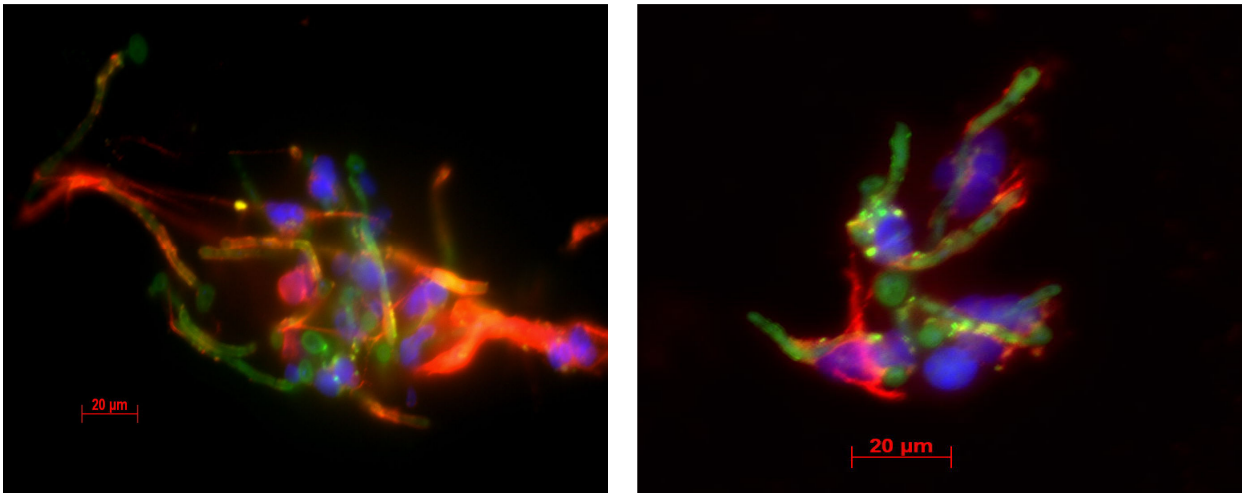


Abbildung 5-17: *C.albicans* Δ sap9 und neutrophile Granulozyten

Mit FITC gefärbte Pilze (grün) und Granulozyten (mit DAPI blau gefärbte Nuklei) wurden für 2 h koinkubiert. Elastase (rot) tritt aus den Zellen aus und lagert sich an die Pilze an. Dieses Geschehen ist besonders intensiv im linken Bild zu beobachten.

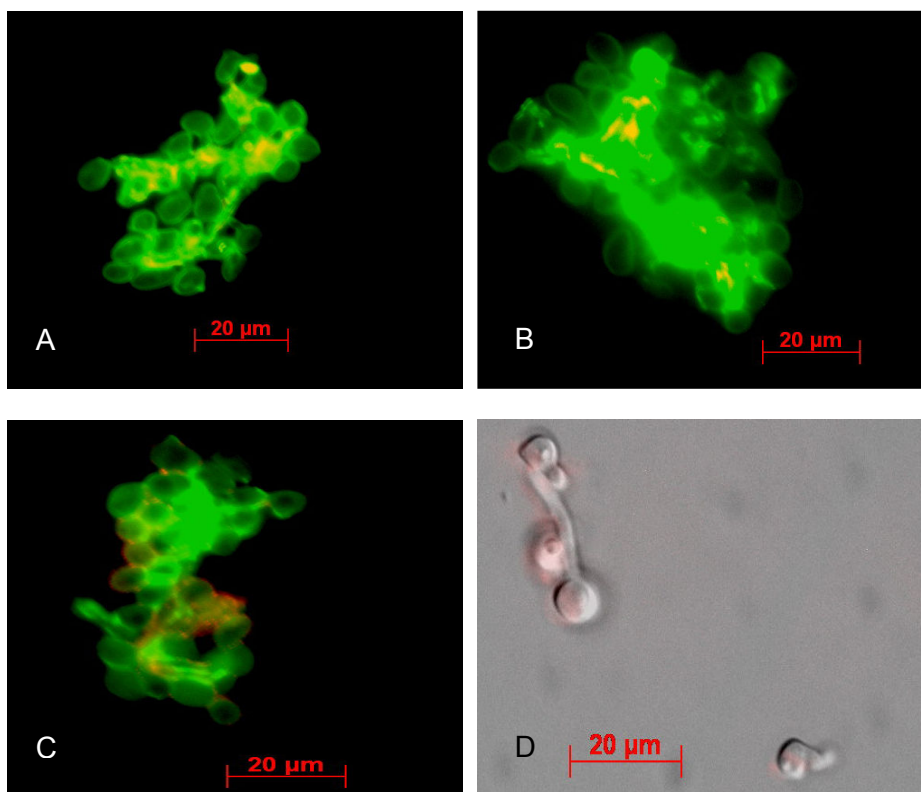


Abbildung 5-18: unspezifische Fluoreszenz durch Antikörperfärbung und Autofluoreszenz von *C. albicans*

Kontrollfärbungen:

- A: FITC-gefärbte Pilze und Erstantikörper (Kaninchen - α Elastase)
- B: FITC-gefärbte Pilze und Zweitantikörper (Ziege - α Kaninchen Alexa 546)
- C: FITC-gefärbte Pilze, Erst- und Zweitantikörper
- D: Autofluoreszenz von Keimschläuchen (Durchlicht- und Rhodaminkanal)

Es zeigte sich, dass zwischen Wildtyp und $\Delta sap9$ -Mutante rein qualitativ keine Unterschiede in der Freisetzung von Elastase zu beobachten waren (Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17). In allen Ansätzen fiel auf, dass Pilze, die Kontakt mit den Zellen hatten, von der Elastase umflossen zu sein schienen. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch Autofluoreszenz des Pilzes oder durch unspezifische Antikörperbindungen an die Pilze entsteht, wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, die zeigten, dass alle Pilze, sowohl ungefärbt als auch mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt, eine leichte rote Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 5-18). Die FITC- und antikörpergefärbten Kontrollpilze wiesen im Mehrfarbbild durch die Überlagerung von FITC und Alexa546 meist eine gelbliche Farbe auf, während die mit Granulozyten inkubierten Pilze grün und rot erschienen. Zudem trat aus den Zellen massiv Elastase aus, welche sich zum Teil fädig verteilte, so dass zwischen unspezifischer Färbung und spezifischer Färbung von Elastase gut unterschieden werden konnte. Elastase ist auch Bestandteil der NETs, welche von neutrophilen Granulozyten gebildet werden können. Das teilweise fädige Austreten von Elastase entspricht der Optik der NETs, jedoch konnte in diesen Experimenten die für NETs typische Kollokalisierung von Elastase mit DNA nicht beobachtet werden.

Um die Degranulation auch quantitativ darstellen zu können, wurde ein Substrat verwendet, welches nach der enzymatischen Spaltung durch Elastase fluoresziert. Zunächst wurde mit diesem Verfahren die intrazelluläre Freisetzung mittels Durchflusszytometrie überprüft.

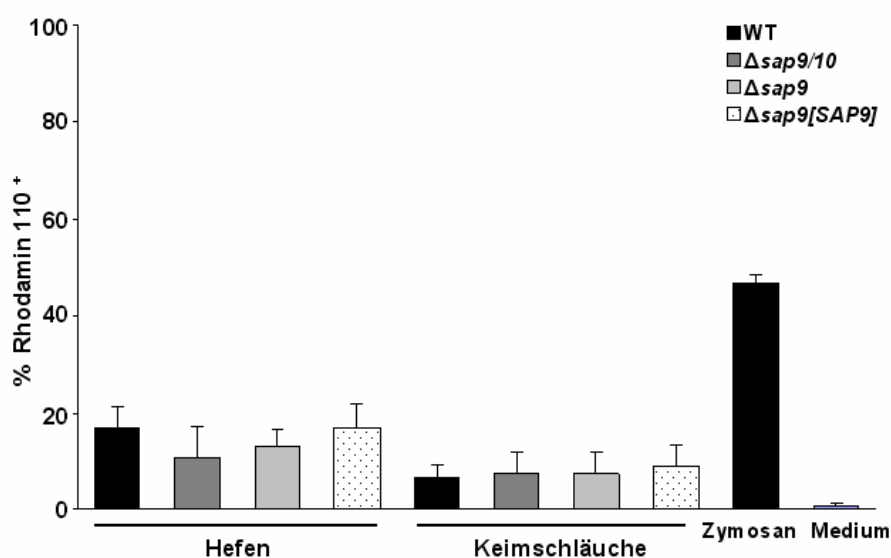


Abbildung 5-19: Intrazelluläre Elastasefreisetzung nach 30 min

Pilze und Granulozyten (MOI=1) wurden für 30 min koinkubiert und anschließend mit dem Elastasesubstrat (4 μ M) versetzt. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch im FITC-Kanal. Dargestellt sind nur die R110-positiven, PI-negativen Zellen. Mittelwerte von mindestens 3 Experimenten mit Standardabweichung.

Bereits nach 30 min erfolgte eine Reaktion der Granulozyten. Da Hefen phagozytiert werden und somit schnell eine Degranulation auslösen, war der Anteil an Rhodamin110-positiven Zellen größer in den Ansätzen mit Hefen als in denen mit Keimschläuchen. Während Wildtyp-Hefen 17 ± 4 % der Zellen zur Elastase-Freisetzung brachten, lag dieser Wert für Keimschläuche nach 30 min bei 6 ± 3 %. Zwischen Wildtyp und den anderen getesteten Stämmen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 5-19). Die Positivkontrolle, Zymosan A ($25 \mu\text{g/ml}$), führte zu einer starken Degranulation (47 ± 2 % Rhodamin 110-positiv). Hefen konnten nach 2 h Inkubationszeit zu keiner deutlichen Steigerung der Degranulation mehr führen (Wildtyp-Hefen: 15 ± 10 %). Im Gegensatz dazu reagierten die Zellen auf Wildtyp-Keimschläuche mit einer Steigerung der Degranulation nach zwei Stunden auf 16 ± 9 % (Abbildung 5-20). Wie auch nach 30 min war kein Unterschied zwischen den Stämmen feststellbar.

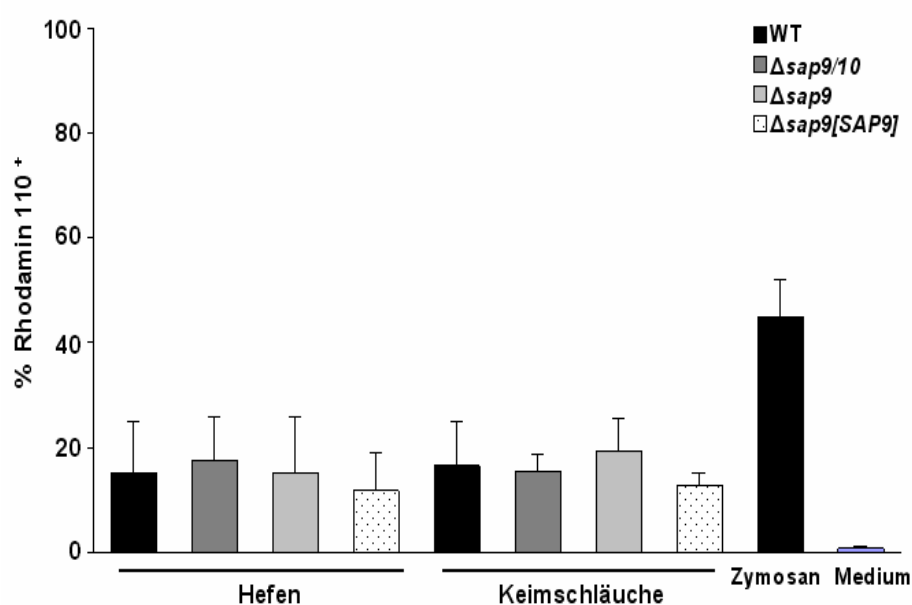


Abbildung 5-20: Intrazelluläre Elastasefreisetzung nach 2 h

Pilze und Granulozyten ($\text{MOI}=1$) wurden für 2 h koinkubiert und anschließend mit dem Elastasesubstrat ($4 \mu\text{M}$) versetzt. Die Messung erfolgte durchflusssy-
tometrisch im FITC-Kanal. Dargestellt sind nur die R110-positiven, PI-negativen Zellen. Dargestellt sind nur die R110-positiven, PI-negativen Zellen. Mittelwerte von mindestens 3 Experimenten mit Standardabweichung.

Da Elastase auch freigesetzt wird, wurden Kulturüberstände nach 30 min und 2 h mit dem Substrat inkubiert, um aktive Elastase nachzuweisen.

Nach 30 min lag die gemessene Fluoreszenz für Wildtyp-Hefen bei 2423 ± 927 RFU, die für Keimschläuche bei 2340 ± 506 RFU. Aktivierung durch Zymosan hatte bei dieser Art der Degranulation offenbar nur einen geringen Stellenwert, da hier nur 1097 ± 339 RFU gemessen wurden. Die $\Delta\text{sap9/10}$ -Hefen und die Δsap9 -Hefen führten zu einer leicht reduzierten, jedoch

nicht signifikanten Freisetzung von Elastase. Bei Keimschläuchen gab es keine stammabhängigen Unterschiede (Abbildung 5-21).

Nach zwei Stunden war die extrazelluläre Degranulation weiter fortgeschritten (Wildtyp-Hefen: 4008 ± 2527 RFU; Wildtyp-Keimschläuche: 3613 ± 1288 RFU). Hefen und Keimschläuche waren immer noch gleichermaßen fähig, die Stimulierung der Elastasefreisetzung zu induzieren, und obwohl wieder eine leichte Reduktion der Degranulation nach Inkubation mit den $\Delta sap9/10$ - und $\Delta sap9$ -Mutanten beobachtet wurde, war diese aufgrund der recht hohen Schwankungen nicht signifikant (Abbildung 5-22).

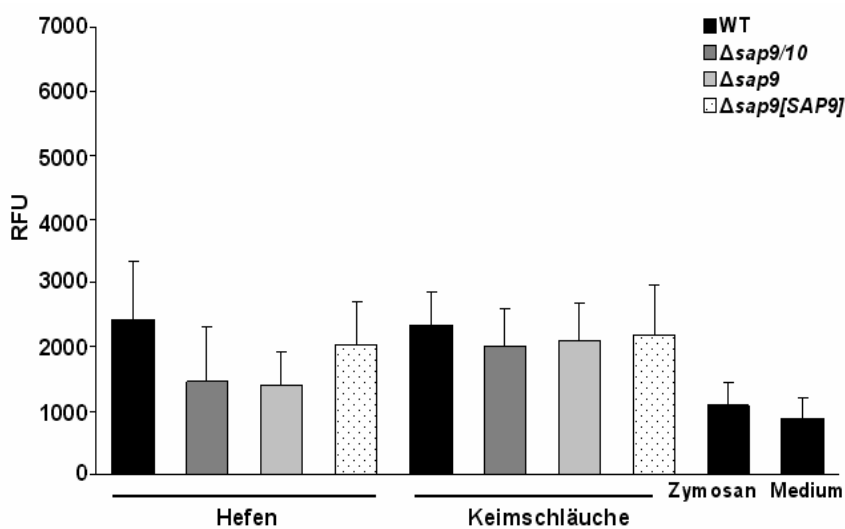


Abbildung 5-21: Extrazelluläre Elastasefreisetzung nach 30 min

Pilze und Granulozyten (MOI=1) wurden für 30 min koinkubiert. Die Kulturüberstände wurden im Anschluss mit dem Elastasesubstrat ($4 \mu\text{M}$) inkubiert und im Plattenleser ausgewertet. Mittelwerte von mindestens drei Experimenten mit Standardabweichung.

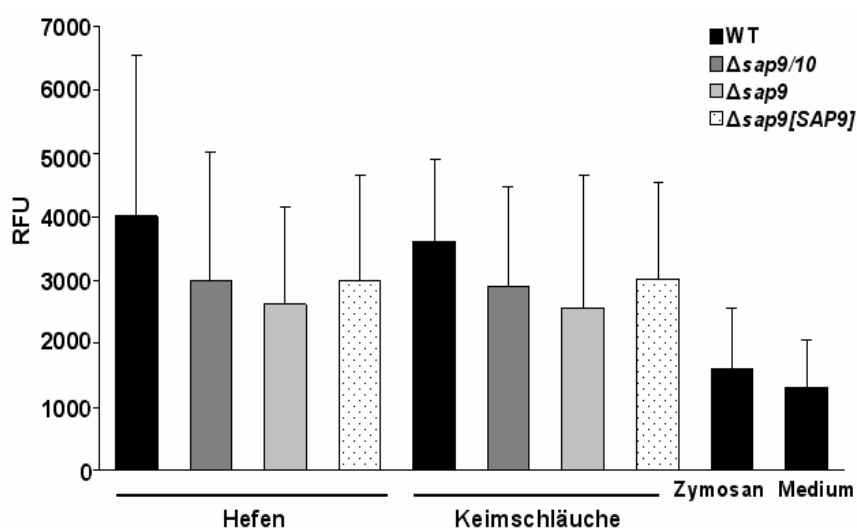


Abbildung 5-22: Extrazelluläre Elastasefreisetzung nach 2 h

Pilze und Granulozyten (MOI=1) wurden für 2 h koinkubiert. Die Kulturüberstände wurden im Anschluss mit dem Elastasesubstrat ($4 \mu\text{M}$) inkubiert und im Plattenleser ausgewertet. Mittelwerte von mindestens drei Experimenten mit Standardabweichung.

5.7 Die durch neutrophile Granulozyten vermittelte Filamentationsinhibition ist *SAP9*-unabhängig

Neutrophile Granulozyten können die Auskeimung von *C. albicans*-Hefen und das Wachstum von Keimschläuchen zu Hyphen inhibieren (58, 240). Bis jetzt sind neutrophile Granulozyten überhaupt die einzigen Zellen, von denen dieses Verhalten bekannt ist. Es sollte festgestellt werden, ob die Saps auch hier eine Rolle spielen. Dafür wurden kleine Keimschläuche des Wildtyps und der $\Delta sap9/10$ -Mutante mit FITC angefärbt und dann für eine Stunde mit neutrophilen Granulozyten koinkubiert. Mittels Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie konnte dann ermittelt werden, wieviel die Pilze gewachsen waren, da der apikale weitergewachsene Teil nicht mehr grün gefärbt war wie der basale Teil. Als Kontrolle dienten Proben ohne Zellzusatz (Abbildung 5-23).

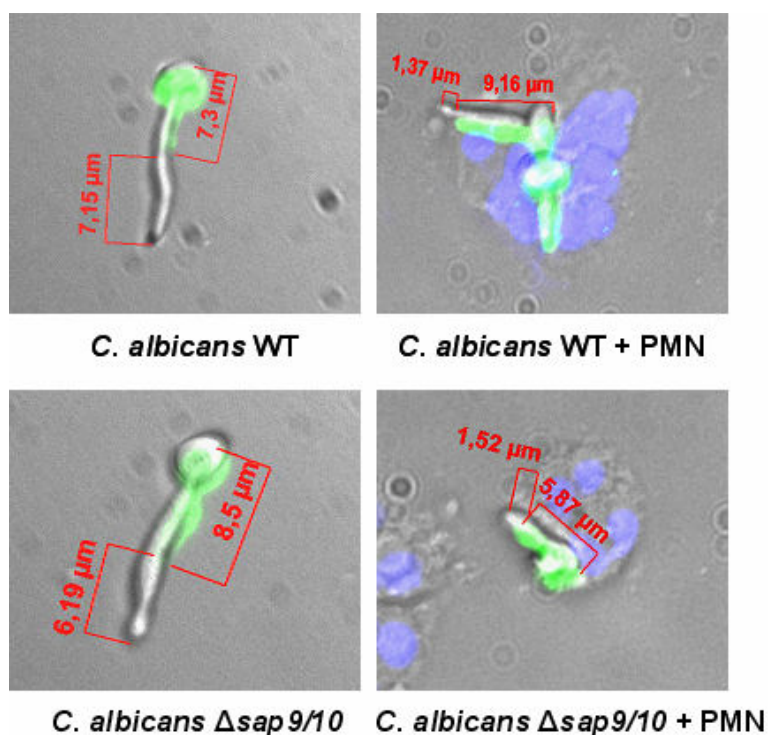


Abbildung 5-23: Die Filamentation wird durch neutrophile Granulozyten inhibiert

FITC-gefärbte Pilze und Zellen wurden für eine Stunde koinkubiert und das Wachstum (ungefärbter Teil des Keimschlauches) mittels Mikroskopie analysiert. Als Kontrolle dienten Ansätze nur mit Pilzen.

Das Wachstum der Wildtyp-Keimschläuche war um 75 %, das der Mutante um 78 % reduziert, was darauf hindeutet, dass die Deletion von *SAP9* keinen Einfluss auf die Filamentation hat (Abbildung 5-24).

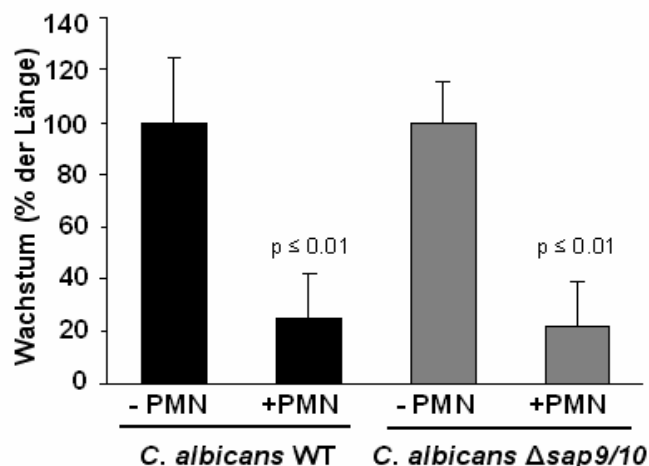


Abbildung 5-24: Quantifizierung der Wachstumsinhibition

Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei wie in Abb. 3-24 ausgewerteten Experimenten mit Standardabweichung. Die Ansätze mit Granulozyten wurden gegen Ansätze nur mit Pilzen normalisiert.

5.8 *SAP9* ist in die Abtötung durch neutrophile Granulozyten involviert

Da bisher beobachtet wurde, dass sowohl Chemotaxis als auch oxidativer Burst und die damit zusammenhängende Apoptose in Abwesenheit von *SAP9* reduziert waren, stellte sich die Frage, ob auch die Fähigkeit der Granulozyten, diesen Stamm abzutöten, verändert ist. Mit Hilfe eines plattenbasierten Infektionsversuches sollte dies geklärt werden. Granulozyten und Hefen (MOI = 1) wurden für drei Stunden koinkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Zelllyse und das Ausplattieren einer Verdünnung. Als Kontrolle dienen Ansätze ohne Zellen, gegen die die Testansätze normalisiert wurden. Nach einer Stunde zeigte sich keine Veränderung verglichen mit der Kontrolle. Nach zwei Stunden war die Überlebensrate des Wildtyps nur noch 72 ± 21 %, die der Δ sap9-Mutante 93 ± 24 %. Nach drei Stunden Inkubation lebten nur noch 53 ± 14 % des Wildtyps, aber 88 ± 15 % der Mutante. Der komplementierte Stamm wurde ähnlich effizient wie der Wildtyp eliminiert (Abbildung 5-25).

Sap1-6 hatten keinen Einfluss auf das Abtötungsverhalten, die Mutanten wurden in gleichem Ausmaß eliminiert wie der Wildtyp. Nach drei Stunden betrug der Prozentsatz der überlebenden Pilze 69 ± 16 % für die Δ sap1-3-Mutante und 66 ± 17 % für die Δ sap4-6-Mutante, verglichen mit 58 ± 21 % für Wildtyp-Hefen (Abbildung 5-26).

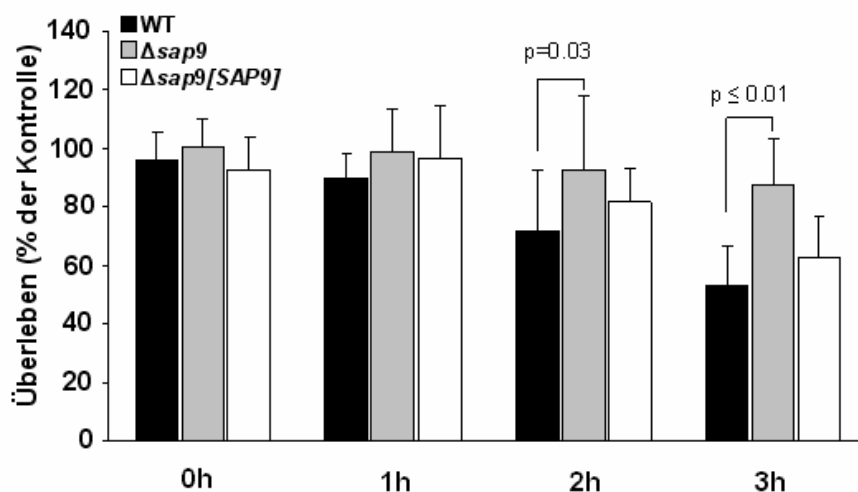


Abbildung 5-25: Die Abtötung von *SAP9*-deletierten Hefen ist geringer als die des Wildtyps

Darstellung im Verhältnis zur Kontrolle. Mittelwerte von mindestens fünf Experimenten mit Standardabweichung.

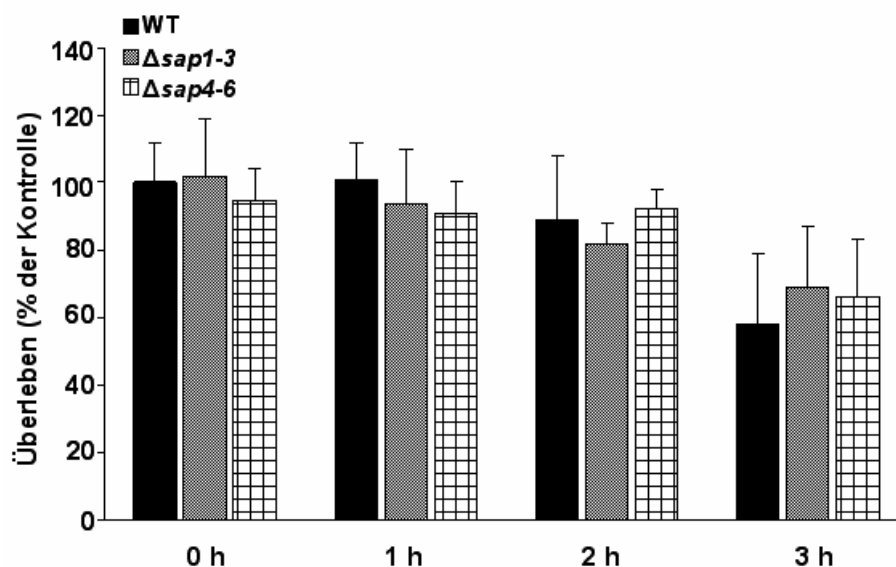


Abbildung 5-26: Der Einfluss von Sap1- 6 auf das Abtötungsverhalten gegenüber Hefen

Darstellung im Verhältnis zur Kontrolle. Mittelwerte von mindestens fünf Experimenten mit Standardabweichung.

Ein Problem stellte die Durchführung dieses Versuchs mit Keimschläuchen dar, da deren starke Adhärenz an die Reaktionsgefäße zu stark verfälschten Werten führte und damit eine Auswertung unmöglich machte. Somit wurde für diesen Morphotyp der sogenannte XTT-Assay angewendet. Keimschläuche und Granulozyten (MOI = 1) wurden für 1-3 h koinkubiert, die Zellen

lysiert und die Pilze nach Zugabe des XTT-Salzes für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgenommen und die Absorption ermittelt. Auch bei Keimschläuchen verhielt es sich so, dass nach drei Stunden die $\Delta sap9$ -Mutante weniger stark geschädigt war als der Wildtyp ($\Delta sap9$: 47 ± 9 %; Wildtyp: 64 ± 18 %; $p = 0,03$). Die Komplementation von *SAP9* führte wieder zu erhöhter Schädigung (Abbildung 5-27). Wie auch bei den Hefen hatte der Einsatz der Deletionsmutanten von *SAP1-3* und *SAP4-6* keinerlei Effekt auf die Schädigung verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 5-28). Diese Resultate zeigen, dass auch die Abtötung durch *SAP9* beeinflusst wird, egal ob es sich um Hefen oder um Keimschläuche handelt.

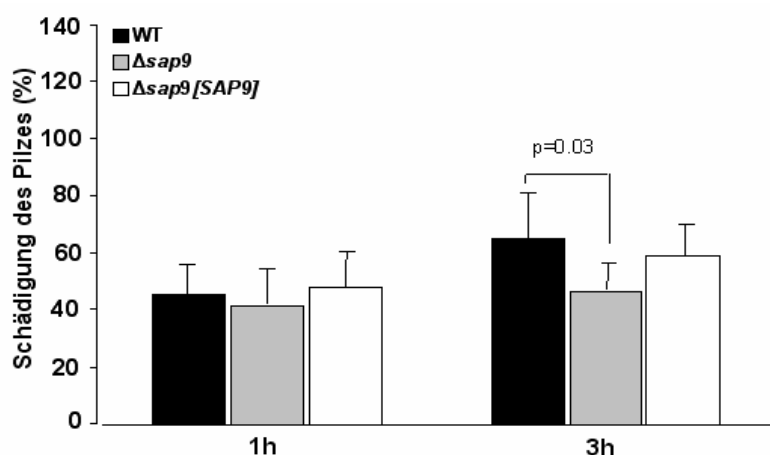


Abbildung 5-27: Die Schädigung von *SAP9*-deletierten Keimschläuchen fällt geringer aus als die des Wildtyps

Messung der metabolischen Aktivität von Pilzen mittels XTT-Assay. Mittelwert von mindestens fünf Experimenten mit Standardabweichung.

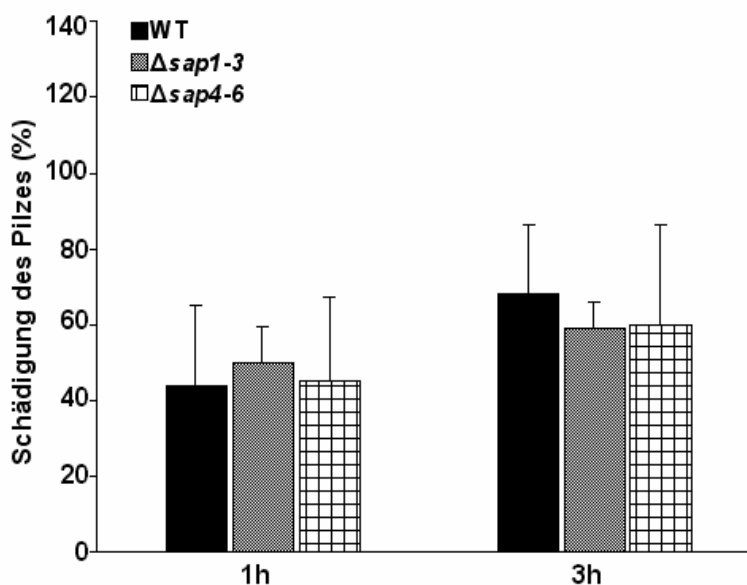


Abbildung 5-28: Der Einfluss von *Sap1-6* auf das Abtötungsverhalten gegenüber Keimschläuchen

Messung der metabolischen Aktivität von Pilzen mittels XTT-Assay. Mittelwert von mindestens vier Experimenten mit Standardabweichung.

5.9 Microarray-Analysen von neutrophilen Granulozyten nach Infektion mit *A. fumigatus*-Hyphen

Um die Expression von Zytokinen und anderen mit der Entzündungsreaktion in Zusammenhang stehenden Genen näher zu untersuchen, wurden von 117 ausgewählten Genen DNA-Sonden durch die Firma Operon erstellt und diese auf Epoxy-Slides gespottet (s. Tab. 8-1 bis 8-3). Neutrophile Granulozyten wurden für 2 h und 6 h mit *A. fumigatus*-Hyphen koinkubiert oder als Kontrollzellen unbehandelt gelassen, anschließend wurde die RNA isoliert und amplifiziert, um eine höhere Ausbeute zu erhalten. Nach der Amplifikation lag die Menge der gewonnenen RNA bei rund 5-10 µg.

Für die Hybridisierung wurde ein Pool aus allen Proben (Koinkubationen und Kontrollzellen) erstellt. Jede Probe, Kontrolle wie Koinkubation, wurde mit diesem Pool hybridisiert. Für die Hybridisierung wurden pro Slide 500 ng des Pools und 500 ng der zu untersuchenden Probe in cDNA umgeschrieben. Während dieses Vorgangs wurden die Proben und der Pool mit Cy3 bzw. Cy5 markiert. Die kompetitive Hybridisierung erfolgte im Anschluss daran über Nacht.

Zunächst wurde die Genexpression nach 2 h analysiert. Hier fiel auf, dass nur 11 der 117 Gene mehr als 2-fach reguliert waren. Dies entsprach einem Anteil von 9 %. Sechs der 11 Gene gehörten zu den Klassen der Zytokine und Immunrezeptoren (*IL8RB*, *LTB*, *TNFRSF1A*, *CXCL2*, *Dectin-1*, *IL10RA*). Interessanterweise wurden auch Gene wie *NCF-1* reguliert, welches die gp47phox-Untereinheit der NADPH-Oxidase kodiert, oder die V1-Untereinheit A einer vakuolären ATPase (*ATP6V1A*). Auffallend war, dass alle differentiell regulierten Gene nach 2 h herunterreguliert waren. Die vollständige Anzahl aller nach 2 h regulierten Gene findet sich in Tabelle 5-1.

Nach 6 h Koinkubation war die Zahl der regulierten Gene ähnlich gering wie nach 2 h (Tabelle 5-2) Neun von den 117 Genen, also 8 %, wiesen eine mehr als 2-fache Expression auf. Im Gegensatz zu dem früheren Zeitpunkt waren acht von neun Genen hochreguliert. Der überwiegende Teil der Gene gehörte zu den Zytokinen und Immunrezeptoren (*CCL20*, *CXCL2*, *CCL4*, *LTB*, *TNFRSF1A*, *MIF*). Auch nach 6 h waren Gene hochreguliert, welche primär nicht mit einer Immunreaktion in Verbindung gebracht werden wie z.B. *ACTB* oder *GAPDH*.

Vergleicht man Gene, die an beiden Zeitpunkten eine Regulation zeigten, so zeigt sich, dass sie nach 2 h herunterreguliert waren und vier Stunden später nach 6 h hochreguliert wurden (*CXCL2*, *TNFRSF1A*, *ACTB*). Nur *LTB* war unter beiden Bedingungen herunterreguliert.

Tabelle 5-1: Genexpression von neutrophilen Granulozyten nach Koinkubation mit *A. fumigatus* Hyphen für 2 h

Klassifikation	Gen	Regulation	p-Wert
Immunrezeptoren	IL8RB (CXCR2) IL8 Rezeptor B	6,3 ↓	0,003
Transkriptionsfaktor	NFKBIA (auch IκBα) (nuclear factor of kappa light polypeptide)	6 ↓	0,008
Zytokine	LTB Lymphotoxin β	4,5 ↓	0,003
Protonenpumpe	ATP6V1A (ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A)	4 ↓	0,008
ROI-Freisetzung	NCF-1 (neutrophil cytosolic factor 1)	3,2 ↓	0,003
Immunrezeptoren	TNFRSF1A (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A)	2,6 ↓	0,05
Zytoskelett	ACTB (Actin B)	2,3 ↓	0,2 (n.s.)
Zytokine	CXCL2 Chemokin (CXC-Motiv) Ligand 2	2,2 ↓	0,2 (n.s.)
Oxidativer Stress	TXN Thioredoxin	2,2 ↓	0,01
Immunrezeptoren	Dectin-1	2,1 ↓	0,1 (n.s.)
Immunrezeptoren	IL10RA (CXCR1) IL10 Rezeptor A	2,1 ↓	0,003

Tabelle 5-2: Genexpression von neutrophilen Granulozyten nach Koinkubation mit *A. fumigatus* Hyphen für 6 h

Klassifikation	Gen	Regulation	p-Wert
Zytokine	CXCL2 Chemokin (CXC-Motiv) Ligand 2	11,5 ↑	0,002
Zytokine	CCL20 (MIP3α) Chemokin (CC-Motiv) Ligand 20	7,7 ↑	5,01E-06
Zytokine	CCL4 Chemokin (CC-Motiv) Ligand 4	6,7 ↑	0,02
Zellmetabolismus	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,7 ↑	0,007
Zytoskelett	ACTB Actin B	3,4 ↑	0,07 (n.s.)
Zytokine	LTB Lymphotoxin β	2,5 ↓	0,03
Immunrezeptoren	TNFRSF1A Tumor necrosis factor superfamily Rezeptor 1A	2,5 ↑	0,05
Zytokine	MIF Macrophage migration inhibitory factor	2,3 ↑	0,01
Protease	uPA Plasminogen activator, Urokinase	2,2 ↑	0,1 (n.s.)

Die Expression von *CCL20* (*MIP3a*), *LTB* und *NCF-1* wurde zur Bestätigung der erhaltenen Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR überprüft. Als Kontrolle diente das Housekeeping-Gen *hALAS*. Die Messungen zeigten, dass die Expression von *CCL20* bei allen vier Zellspendern nach 6 h anstieg, wobei die Expression spenderabhängig stark variierte. Wie im Microarray war *LTB* nach 2 h herunterreguliert. Nach 6 h wiesen die Proben von zwei Spendern immer noch eine Negativregulation auf, während die Proben der anderen zwei Spender 4-5 fach verglichen mit dem 2 h-Wert hochreguliert waren. *NCF-1* war nach 2 h und 6 h herunterreguliert. Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern erklären sich durch die wesentlich höhere Sensitivität der qRT-PCR.

Die erhaltenen Microarray-Ergebnisse konnten somit bestätigt werden.

6 Diskussion

6.1 Einführung zur Fragestellung

Die Saps ermöglichen durch ihre Anzahl, ihre breite Substratspezifität und die Expression in unterschiedlichen Umweltbedingungen eine optimale Anpassung des Pilzes an verschiedene Kolonisationsorte im Wirt. Jedoch dient die *SAP*-Expression nicht nur der Nährstoffakquise, sondern auch der Gewebeinvasion und -degradation. Anhand von *SAP*-Deletionsmutanten konnte demonstriert werden, dass Saps sowohl in die Entwicklung von mucosalen als auch systemischen Erkrankungen involviert sind (40, 51, 191, 194). Die bisher durchgeführten Studien basieren größtenteils auf der Invasion und Degradation verschiedener Epithelmodelle durch *C. albicans* sowie auf systemischen Infektionsmodellen wie intravasaler oder intraperitonealer Injektion.

Bei fortschreitender Invasion der Mucosa oder bei intravasaler Invasion trifft *C. albicans* jedoch auch auf Zellen der angeborenen Immunität, welche aus dem Blutstrom ins umliegende Gewebe einwandern können, um die eindringenden Mikroorganismen vor Ort zu eliminieren. Daten zur Makrophagen-Sap-Interaktion beweisen, dass Saps auch auf Zellen der angeborenen Immunität einen Einfluss ausüben können (17).

Da auch eine Interaktion der Saps mit neutrophilen Granulozyten möglich sein könnte, lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem Einfluss der Saps auf diese Zellen. Unter Verwendung von *SAP*-Deletionsmutanten wurden die verschiedenen Effektormechanismen der neutrophilen Granulozyten untersucht, um mit den Zellen interagierende Saps zu identifizieren.

6.2 Potentielle zellwandregulatorische Funktionen von *SAP9* und *SAP10*

Die Deletion von *SAP9* und/oder *SAP10* führte, wie in den ersten Versuchen mit diesen Mutanten beobachtet, zu einer Veränderung des Phänotyps. Die Tochterzellen lösten sich nicht mehr komplett von den Mutterzellen und bildeten Ketten und Klumpen. Vermutet wird daher, dass *Sap9* und *Sap10* regulatorische Funktionen während der Sprossung besitzen (1). Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der Mutanten vom Medium oder von der Inkubationszeit abhängig ist, wurden in dieser Arbeit Wildtyp, $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ jeweils für 2 h und über Nacht in RPMI- und SD-Medium angezogen. Nach zwei Stunden, der in dieser Arbeit verwendeten Anzuchtzeit, war keine Klumpenbildung für alle drei Stämme in beiden Medien festzustellen. Die Übernachtskulturen der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ -Mutanten wiesen in SD-Medium den klumpigen Phänotyp auf. Die $\Delta sap10$ -Mutante bildete zusätzlich dazu auch in RPMI-Medium Klumpen, was darauf schließen lässt, dass der Teilungsdefekt in dieser Mutante besonders ausgeprägt ist.

Offenbar ist die Anzucht in SD-Medium und nicht die Anzuchtzeit der primäre Grund für die Aggregatbildung. RPMI-Medium besitzt als Zellkulturmedium sowohl eine andere Zusammensetzung als auch einen anderen pH-Wert als SD-Medium, welches für die Pilzanzucht verwendet wird. Dies deutet darauf hin, dass bei Anzucht in RPMI andere, bei neutralem pH exprimierte Proteine von *C. albicans* den Teilungsdefekt abschwächen, und dieser Effekt in SD-Medium aufgrund des leicht sauren pH-Wertes oder der Zusammensetzung des SD-Mediums nicht auftritt.

Da die Deletion von *SAP9* die Auskeimung von Hefen in RPMI-Medium verzögert, während eine *SAP10*-Deletion auf diesen Vorgang keinen Einfluss ausübt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Sap9 eine Rolle in der Zellwandregulation während der Auskeimung spielt, während Sap10 nicht an diesem Prozess beteiligt zu sein scheint.

SAP9-Expression wird durch die Antimykotika Caspofungin oder Fluconazol, die die Zellwand destabilisieren, verstärkt (35). Sap9 scheint infolgedessen nicht nur regulatorische Funktionen in der Knospung und Auskeimung, sondern auch in der Stabilisierung der Zellwand zu besitzen. Biofilmbildung führt ebenfalls zu erhöhter *SAP9*-Expression (65). Während der Initiationsphase der Biofilmbildung findet eine Aggregation der Pilzzellen statt, die mit der Expression adhärenzrelevanter Proteine wie Eap1 einhergeht (120, 121). Da *SAP9*-Deletionsmutanten eine erhöhte Adhärenz an Epithelzellen verglichen mit dem Wildtyp aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass Sap9 selbst nicht zur Adhärenz während der Biofilmbildung beiträgt (1). Als Protease kann Sap9 möglicherweise jedoch Substrate hydrolysieren, die wichtig für die Biofilmarchitektur sind oder eine Komponente der extrazellulären Matrix des Biofilms darstellen.

SAP10-Deletionsmutanten weisen erhöhte Adhärenz an Epithelzellen und einen Sprossungsdefekt auf, aber in der Reaktion auf Antimykotika, in der Biofilmbildung und in der Auskeimung spielt Sap10 offenbar keine Rolle. Daher kann als Schlussfolgerung formuliert werden, dass zwar sowohl Sap9 als auch Sap10 den Sprossungsprozess beeinflussen, beide Enzyme aber ansonsten unterschiedliche Funktionen haben.

6.3 ***SAP9* moduliert die Induktion gerichteter Motilität in Granulozyten**

Mittels gerichteter Motilität, auch Chemotaxis genannt, migrieren neutrophile Granulozyten durch das Endothel der Gefäße zu einem proinflammatorischen Stimulus. Unter Verwendung eines Transwell-Systems wurde die *C. albicans*-induzierte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten analysiert. Es zeigte sich, dass Hefen nur einen geringfügigen Stimulus darstellten und zudem keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Sap-Mutanten festzustellen waren. Keimschläuche hingegen lösten eine deutliche Migration aus. Während die sezernierten Saps (Sap1-6) und eine komplementierte Δ sap9-Mutante verglichen mit dem Wildtyp keinerlei Effekt auf die Granulozyten hatten, waren *SAP9*-defiziente Pilze deutlich schlechtere Stimuli.

Von *C. albicans* ist bereits bekannt, dass beide Morphotypen Chemotaxis auslösen können, wobei Keimschläuche ein deutliches höheres chemotaktisches Potential besitzen. Ist die gerichtete Motilität eingeschränkt, so können Keimschläuche nicht mehr abgetötet werden. Hefen hingegen bleiben von diesem Mechanismus unbeeinflusst. Sie werden auch bei inhibierter Motilität noch abgetötet (240). Dies zeigt klar, dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind, zwischen den Morphotypen des Pilzes zu differenzieren und ihre Eliminierungsmechanismen anzupassen. Als Induktoren der Chemotaxis gelten Zellwandkomponenten wie β -Glucan oder das in der Pilzzellwand lokalisierte Fibrinogen-Bindeprotein Pra1, welches an Integrin $\alpha_M\beta_2$ bindet und so die Adhäsion und Migration von Leukozyten initiiert (75, 205, 223). Eine Pra1-Deletionsmutante stellt einen deutlich schlechteren migratorischen Stimulus für Leukozyten dar und überlebt im Abtötungsversuch mit Granulozyten besser als der Wildtyp (205). Pra1 wird auf der Oberfläche von Hefen und Hyphen detektiert, bei Hypheninduktion wird Pra1 jedoch vermehrt exprimiert (126). Somit ist Pra1-Expression ein Grund für morphotypspezifische Chemotaxis. Nicht nur die Pilzzelle selbst, auch die Kulturüberstände induzieren Chemotaxis, z.B. durch gelöstes β -1,6-Glucan (47, 187). Von anderen chemotaktischen Faktoren ist bekannt, dass sie nur in weißen Zellen gebildet werden und nicht in opaken, um den Prozess des Matings nicht zu behindern (68).

Die Funktion von Sap9 als zellmembranlokalisierte Protease im Zusammenhang mit den erhaltenen Daten lassen die Annahme zu, dass Sap9 durch Spaltung eines Substrats, welches aktivierend auf die neutrophilen Granulozyten wirkt, in den Prozess der gerichteten Motilität involviert ist.

Albrecht *et al.* vermuten eine zellwandregulatorische Funktion von Sap9, da Deletionsmutanten einen Sprossungsdefekt wie in Kapitel 3.1.4.4 beschrieben aufweisen (1). Eine Veränderung der Zellwandstruktur von *C. albicans* durch SAP9-Deletion resultiert womöglich in einer Überlagerung chemotaktisch wirkender Proteine durch andere Zellwandkomponenten.

Sap9 kann möglicherweise auch selbst als Stimulus für neutrophile Granulozyten fungieren, wie es bereits bei Pra1 beobachtet wurde (205). Pra1 vermittelt die Aktivierung von Leukozyten durch die Bindung an Integrin $\alpha_M\beta_2$. Wenn Sap9 selbst gerichtete Motilität induziert, erfordert dies die Interaktion mit einem Rezeptor wie Integrin $\alpha_M\beta_2$, Komplementrezeptor 3, Rezeptoren der TLR-Familie oder anderen PRRs.

Neutrophile Granulozyten können ihre Migrationsaktivität verstärken, indem sie selbst das Zytokin IL-8 sezernieren und so weitere neutrophile Granulozyten rekrutieren. Die Untersuchung der Zytokinsekretion von mit *C. albicans* koinkubierten Granulozyten zeigte, dass zwischen den Stämmen keine signifikanten Unterschiede bestanden. Nach sechs Stunden waren Hefen schwächere IL-8-Induktoren als Keimschläuche. Die Zytokinsekretion zum Zeitpunkt $t = 8$ h zeigte einen Anstieg der durch Hefen induzierten IL-8-Sekretion, während die durch Keimschläuche induzierte IL-8 Sekretion verglichen mit dem früheren Zeitpunkt gleich blieb. Vermutlich führte

eine Auskeimung der Hefen zu diesem Anstieg. Es ist bereits bekannt, dass die IL-8-Produktion morphotypabhängig verläuft (240). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Zusammengefasst kann formuliert werden, dass der Effekt der *SAP9*-Deletion auf die Migration von neutrophilen Granulozyten nicht in einer veränderten IL-8-Sekretion resultiert. Für die IL-8-Produktion scheinen andere Komponenten des Pilzes wichtigere Stimuli zu sein, z.B. Mannan aus Zellwandpräparationen (28, 167).

6.4 ROS-induzierte und durch *SAP9* beeinflusste Apoptose als potentieller Immunevasionsmechanismus

Ähnlich wie die Chemotaxis ist der oxidative Burst von neutrophilen Granulozyten als Reaktion auf *C. albicans* abhängig vom Morphotyp. Keimschläuche führen zu einer deutlich höheren ROS-Freisetzung als Hefen. Eine Deletion von *SAP9* führte bei beiden Morphotypen zu einer signifikant reduzierten ROS-Freisetzung verglichen mit dem Wildtyp, welche durch Komplementation mit Plasmid-Sap9 wieder auf Wildtyp-Niveau gebracht werden konnte. Wie bereits in den Chemotaxisexperimenten beobachtet, hatte die Deletion von *SAP10* keinen Einfluss auf den oxidativen Burst verglichen mit dem Wildtyp, ebenso wie die Deletion von *SAP1-3* und *SAP4-6*. Besonders Komponenten aus der Zellwand des Pilzes, z.B. Mannoproteine oder β -1,6-Glucan, lösen den oxidativen Burst aus (167, 182). Auch wenn aufgrund zu großer Pilzstrukturen keine Phagozytose erfolgen kann, wird ROS-Produktion induziert (111).

Die reduzierte ROS-Freisetzung bei Deletion von *SAP9* kann zum einen als ein Resultat der bereits verringerten Chemotaxis gesehen werden. Weniger zielgerichtet angegriffene Pilze führen als Konsequenz auch zu weniger ROS-Freisetzung. Zum anderen ist Sap9 wie auch die Mannoproteine oder β -Glucane, die bekanntermaßen Stimuli für die ROS-Freisetzung darstellen, in die Zellwand bzw. Zellmembran integriert und kann somit ebenfalls aktivierend wirken. Wird *SAP9* deletiert, fehlt einer der offenbar mehreren Stimuli, da der oxidative Burst zwar reduziert, aber nicht vollständig inhibiert wurde. Dies verdeutlicht, dass der Prozess der ROS-Freisetzung auf einer Synergie verschiedener Komponenten beruht.

Es ist bekannt, dass der oxidative Burst nach der Phagozytose nicht nur zu einer Eliminierung der Mikroorganismen führt, sondern auch Apoptose der Phagozyten induziert (235, 241). Dass hitzeinaktivierte *C. albicans* Apoptose auslösen können, wurde bereits gezeigt (180). Bisher existierten jedoch keine Daten, die beschreiben, welchen Einfluss lebende Pilze auf diesen Prozess haben. Die Ermittlung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten nach Koinkubation mit dem Wildtyp und den *SAP*-Deletionsmutanten zeigte, dass Wildtyp-Keimschläuche zu einer deutlichen Apoptoseinduktion führten, während die *SAP9*-Deletionsmutante dazu nicht in der Lage war. Der Anteil der apoptotischen Zellen stieg von Beginn der Experimente zwei Stunden lang an, um dann zu stagnieren. Dies korrespondiert mit der ROS-Freisetzung, die in den durchgeführten Messungen ebenfalls zunächst stark ansteigt und dann ein gleichbleibendes

Niveau erreicht. Somit wird deutlich, dass mit der Akkumulation von ROS in der Zelle auch die Apoptose verstärkt.

Um zu zeigen, dass Sap9 die mit der ROS-Produktion gekoppelte Apoptose von neutrophilen Granulozyten moduliert, wurden ROS-Freisetzung und Apoptose unter Einwirkung des NADPH-Oxidasehemmers DPI oder des ROS-Scavengers Glutathion quantifiziert. Beide Substanzen verringerten die ROS-Produktion erheblich. Die Apoptose von Zellen, die mit dem Wildtyp inkubiert wurden, konnte mit DPI/Glutathion deutlich reduziert werden, während die $\Delta sap9$ -vermittelte geringe Apoptose durch die Inhibitoren nicht weiter zu senken war. Die wichtige Rolle von Sap9 in der Modulation der ROS-Freisetzung und der Apoptoseinduktion wird so verdeutlicht.

Viele Mikroorganismen induzieren Apoptose von neutrophilen Granulozyten, um so möglichst schnell aus dem Phagosom zu entkommen und sich weiter zu verbreiten, so z.B. *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* oder *E. coli* (98, 235, 241). Immunevasion von *C. albicans*-Keimschläuchen wurde bereits beschrieben, und die hier gewonnenen Daten lassen die Vermutung zu, dass die Induktion der Apoptose bei diesem Prozess eine Rolle spielt (17).

Immunevasion stellt für viele Mikroorganismen einen effektiven Verbreitungsmechanismus dar, wobei vielfältige Strategien existieren. Auch *C. albicans* verfügt über verschiedene Taktiken, der Abtötung durch das angeborene Immunsystem zu entgehen. Ihre Funktion als Proteasen macht die Saps zu wichtigen Faktoren der Immunevasion. Von Sap1-3 ist beispielsweise seit kurzem bekannt, dass sie Komplement C3b, C4b und C5 degradieren (72). Des Weiteren zählen einige Komponenten der angeborenen Immunität wie z.B. IgA, Lactoferrin und Cathepsin D zu den Substraten von Sap2 (69, 95, 184). Werden Keimschläuche von Makrophagen aufgenommen, kann eine starke Produktion der hyphenassoziierten Proteasen Sap4-6 nachgewiesen werden, und das Wachstum der Keimschläuche im Phagosom, vermutlich in Kombination mit der Proteaseaktivität, führt letztendlich zur Disruption der Zellen. Deletionsmutanten von *SAP4-6* hingegen werden deutlich effektiver von Makrophagen abgetötet. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Sap4-6 ebenfalls eine Rolle in der Immunevasion spielen (17). Anders als in Kontakt mit Makrophagen ist die Expression von *SAP4-6* bei Aufnahme durch neutrophile Granulozyten reduziert, was dafür spricht, dass Sap4-6 speziell für das Überleben in Makrophagen von Wichtigkeit sind (58)

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss von Sap9 auf wichtige Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Da die Deletion von *SAP9* zu reduzierten Reaktionen führte, lässt sich daraus schlussfolgern, dass Sap9 zur Erkennung durch neutrophile Granulozyten beiträgt. Die durch Sap9 vermittelte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt zur Induktion der Apoptose, ein Immunevasionsmechanismus, der auch von anderen Mikroorganismen verwendet wird. Obwohl *C. albicans* effektiv eliminiert wird, so wäre es dennoch ein Vorteil des Pilzes, durch Wirtszelllyse der Abtötung zu entgehen, auch wenn dieses nur den

geringen Prozentsatz der Pilze betrifft, welcher nach einigen Stunden noch nicht abgetötet wurde. Die Art und Weise, in der *C. albicans* Apoptose induziert, ist noch nicht untersucht worden. Es ist lediglich bekannt, dass die Phagozytose hitzeinaktivierter Pilze zu einer Caspase-abhängigen Apoptose führt (180). Die Apoptose ist mit großer Wahrscheinlichkeit das Resultat der akkumulierten ROS nach einer durch Sap9 mitvermittelten Aktivierung der Zellen. Ob Sap9 als zelloberflächenassoziiertes Protein jedoch auch durch Bindung an apoptoserelevante Rezeptoren wie den TNF-Rezeptor oder den Fas-Rezeptor Apoptose zu induzieren vermag und wie die genaue Signaltransduktion abläuft, bleibt zu klären.

Von anderen pathogenen Mikroorganismen wie *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* und *A. fumigatus* ist bekannt, dass sie durch Sekretion von Effektorproteinen die Beeinflussung apoptoserelevanter Proteine wie z.B. Bax, Bak, Bcl-2 oder Caspase-1 Apoptose induzieren können (78, 169, 230). Diese Art der Apoptoseinduktion erfordert jedoch eine Sekretion von Effektoren. Da Sap9 fest in der Zellmembran verankert ist, kann nur eine Bindung von Sap9 an entsprechende Interaktionspartner proapoptotisch wirken. Unter Umständen tragen aber auch die enzymatischen Produkte von Sap9 zur Apoptoseinduktion bei.

Eine andere Art der Immunevasion ist die Verzögerung oder Inhibition der phagosomalen Ausreifung, welche *C. albicans* ebenfalls als Strategie nutzt. Von Pra1 ist bekannt, dass es die Ausreifung des Makrophagen-Phagosoms verzögern kann (128). Untersuchungen zeigten, dass *C. albicans* im Phagosom neutrophiler Granulozyten starkem Nährstoffmangel und oxidativem Stress ausgesetzt ist und innerhalb kurzer Zeit abgetötet wird (58, 183). Aufgrund dieser ungünstigen Bedingungen ist es unwahrscheinlich, dass Sap9 ebenso wie Pra1 die phagosomale Ausreifung verzögern kann.

6.5 Die Degranulation neutrophiler Granulozyten verläuft unabhängig von SAP9

Elastase, ein wichtiger Bestandteil der azurophilen Granula, wird bei Stimulation, z.B. durch Zytokine oder durch Mikroorganismen, nicht nur ins Phagosom abgegeben, sondern auch sezerniert und an die Zelloberfläche gebunden, wo sie aktiv bleibt (161, 162).

C. albicans induziert unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen eine intrazelluläre Degranulation, und interessanterweise führte die Inkubation mit Hefen zu einer ausgeprägteren Reaktion als mit Keimschläuchen, welche erst nach 2 h ähnlich hohe Elastaseaktivität wie die Hefen auslösten. Im Überstand von Kokulturen konnte morphotypunabhängige Elastaseaktivität ermittelt werden. SAP9-Expression hatte weder auf die intra- noch auf die extrazelluläre Degranulation einen Einfluss.

Phagozytose scheint gezielt die intrazelluläre Degranulation zu stimulieren, wenn kleinere Partikel wie Hefen oder Zymosan aufgenommen werden. Die extrazelluläre Freisetzung von Elasta-

se verläuft unspezifisch. Offenbar werden auch nicht phagozytierte, eventuell bereits ausgekeimte Hefen auf diese Weise attackiert.

Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten durch NET-Bildung lysieren und Elastase sowie DNA freisetzen (60). Da jedoch in Vorversuchen eine Quantifizierung von NETs mittels SytoxGreen keine Ergebnisse brachte und mit den in dieser Arbeit verwendeten Protokollen NET-Bildung von nicht vorstimulierten Zellen auch mikroskopisch eher selten zu beobachten war, ist es unwahrscheinlich, dass die detektierte Elastase in Kulturüberständen aus NETs stammt (22, 227).

Der genaue Mechanismus der extrazellulären Elastasefreisetzung bleibt unklar, da nicht gezeigt werden konnte, ob es sich um eine Freisetzung im Rahmen einer nekrotischen Zellyse handelt oder um eine aktive Sekretion des Enzyms, welche die Viabilität der Zellen nicht beeinflusst. Dies könnte in weiterführenden Experimenten geklärt werden, in denen die Überstände auf die Existenz normalerweise nicht sezernierter intrazellulärer Proteine überprüft werden. Eine weitere Möglichkeit, Zelltod festzustellen, wäre eine durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zellen, von denen der Überstand abgenommen wurde.

6.6 Der Einfluss von *SAP9* auf Wachstumsinhibition und Abtötung

Fradin *et al.* haben gezeigt, dass es in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten zu einer Wachstumsinhibition der Filamente kommt (58). Um zu untersuchen, ob Sap9 die Wachstumsinhibition beeinflusst, wurden die Keimschläuche von Wildtyp und der $\Delta sap9/10$ -Mutante nach einer Stunde Inkubation mit und ohne Zellen vermessen. Beide Stämme wurden annähernd gleich in ihrer Filamentation inhibiert.

Da bereits gezeigt wurde, dass Sap9 sowohl die Migration als auch den oxidativen Burst und die damit zusammenhängende Apoptose beeinflusst, wurde des Weiteren untersucht, wie die verschiedenen Stämme durch neutrophile Granulozyten abgetötet werden. *SAP1-3*- sowie *SAP4-6*-Deletionsmutanten wurden mit der gleichen Effizienz abgetötet wie der Wildtyp. Die Deletion von *SAP9* hingegen führte zu einem höheren Prozentsatz überlebender Pilze, was sowohl für Hefen als auch für Keimschläuche galt.

Der genaue Mechanismus der zellvermittelten Wachstumsinhibition ist unklar, aber es wird vermutet, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus oxidativem Stress, Nährstoffmangel und antimikrobiellen Substanzen handelt (58). Intakte Motilität ist ebenfalls wichtig für die Wachstumsinhibition (240). Da der oxidative Burst als Reaktion auf die $\Delta sap9/10$ -Mutante stark vermindert ist, ist dieser Effektormechanismus wahrscheinlich nicht die Hauptursache für die Wachstumsinhibition. Im Hinblick auf die Erkenntnis, dass die Wachstumsinhibition offenbar *SAP9*-unabhängig verläuft, ist jedoch anzunehmen, dass die Granulakomponenten hier einen maßgeblichen Einfluss ausüben, da die Degranulation ebenfalls *SAP9*-unabhängig verläuft.

Da die Deletion von *SAP9* jedoch die meisten Effektorfunktionen der neutrophilen Granulozyten beeinflusste, resultiert dies im Endeffekt in einer verminderten Abtötung durch neutrophile Granulozyten. Die Unterschiede in der Abtötungseffizienz zwischen Wildtyp und *SAP9*-Mutante waren signifikant, aber gering. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass keine der untersuchten Effektorfunktionen durch *SAP9*-Deletion vollständig inhibiert wurde. Dies weist darauf hin, dass Sap9 nur einer von vielen Faktoren ist, der zur Aktivierung der Zellen und so zur Abtötung der Pilze beiträgt.

Besonders die Kohlenhydratkomponenten aus der Pilzzellwand sind direkt in die Aktivierung involviert. Mannoproteine und β -Glucane, besonders β -1,6-Glucan, induzieren Phagozytose, oxidativen Burst sowie Lactoferrin-Freisetzung und damit die Abtötung (167, 182). Weitere zellwandassoziierte Proteine wie Pra1 oder die *ALS*-Adhäsinfamilie tragen dazu bei, dass neutrophile Granulozyten über Adhäsionsproteine wie z.B. Integrin $\alpha_M\beta_2$ an die Pilze adhäreren können und auf diesem Wege engen Kontakt ermöglichen (80, 205). In *SAP*-Expressionsstudien wurde gezeigt, dass Saps die Deletion von Isoenzymen durch Expression anderer Saps kompensieren können (116, 152). Die Expression anderer Saps, z.B. Sap4-6, kann also unter Umständen den Verlust von Sap9 zumindest teilweise kompensieren, was durch Expressionsanalysen der *SAP9*-Deletionsmutante während der Infektion mit *C. albicans* geklärt werden könnte. Aber auch andere sezernierte Proteine wie Phospholipasen oder Metalloproteasen spielen im Abtötungsprozess womöglich eine Rolle.

6.7 Hypothesen zur Interaktion von Sap9 mit neutrophilen Granulozyten

Für Sap9, welche in dieser Arbeit als einzige der acht untersuchten Proteasen einen Einfluss auf die Interaktion mit Granulozyten zeigte, ist bisher nur bekannt, dass es das antimikrobielle Peptid Histatin-5 spaltet und so den Wechsel vom Kommensalen zum Pathogen ermöglicht (135). Arbeiten in der Arbeitsgruppe um B. Hube in Jena befassen sich zur Zeit mit der Identifikation weiterer Sap9-Substrate. Da Sap9 als zellmembranassoziiertes Protein offenbar auch regulatorische Funktionen in der Zellseparation während der Knospung besitzt, sind potentielle Substrate vermutlich ebenfalls in der Zellwand oder Zellmembran zu finden (1). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass Sap9 durch Spaltung von Pilz- und Wirtsproteinen, welche dann ihrerseits als Stimulus dienen, die neutrophilen Granulozyten aktiviert (Abbildung 6-1). Eine andere durch diese Arbeit entwickelte Hypothese bezieht sich auf die Lokalisation von Sap9 an der Oberfläche des Pilzes. In dieser Hypothese reguliert die Expression von *SAP9* direkt die Form und Zusammensetzung der Pilzzellwand und beeinflusst auf diese Weise die Interaktion mit den Zellen.

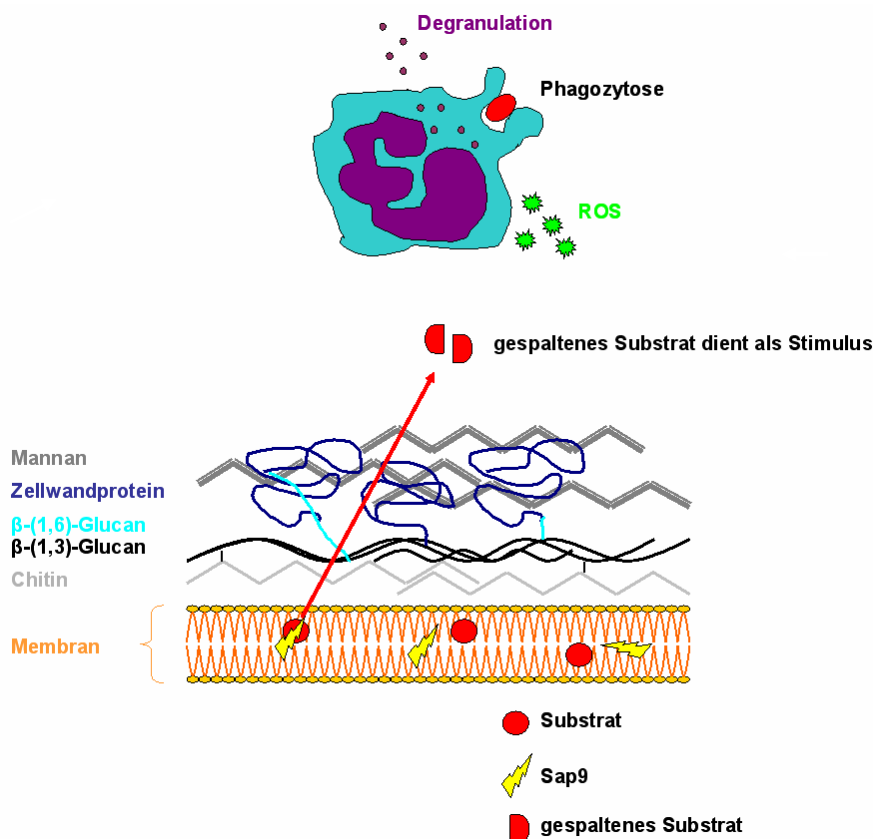


Abbildung 6-1: Eine mögliche Funktion von Sap9 in der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten

6.8 Das Zytokinprofil neutrophiler Granulozyten während der *A. fumigatus*- Infektion

Die Analyse der Expressionsprofile neutrophiler Granulozyten, die mit *A. fumigatus* infiziert waren, zeigte, dass sowohl nach 2 h als auch nach 6 h nur ein geringer Anteil der zu untersuchenden Gene reguliert war. In der AG Löffler wurden bereits genomweite Microarray-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass die Anzahl differentiell regulierter Gene in neutrophilen Granulozyten deutlich geringer ist als die in anderen Immunzellen (M. Mezger, persönliche Kommunikation). Dies konnte in hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass der Microarray jedoch nur die *de novo*-Zytokinsynthese berücksichtigt und nicht die unter Umständen bereits zum Zeitpunkt der Infektion im Zytoplasma fertig vorliegenden Zytokine.

Die geringe Anzahl differentiell regulierter Gene lässt darauf schließen, dass neutrophile Granulozyten primär vor Ort Mikroorganismen bekämpfen und die Kommunikation mit anderen Zellen eher im Hintergrund steht. Nach 2 h waren alle differentiell regulierten Gene, vor allem Zytokine und Immunrezeptoren, herunterreguliert. Die *A. fumigatus*-vermittelte Zytokinproduktion wird offenbar erst später induziert. Neben Zytokinen waren auch Gene des oxidativen Bursts und der

Phagozytose herunterreguliert, wie z.B. *NCF-1*, welches für die gp47phox-Untereinheit der NADPH-Oxidase kodiert, und *ATP6V1A*, ein Gen, welches für eine vakuoläre ATPase kodiert. Die Herunterregulation von *NCF-1* deutet darauf hin, dass der oxidative Burst nach 2 h abgeschlossen ist und die Zellen in Apoptose übergehen. Ein weiteres Indiz dafür ist die *C. albicans*-induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten, welche nach 2 h ein Maximum erreicht. Die Ansäuerung des Phagosoms oder anderer Organellen durch die vakuoläre ATPase ist ein Prozess, der nach der Aufnahme der Mikroorganismen induziert wird. Eine Herunterregulation der vakuolären ATPase nach 2 h ist ein weiterer Hinweis auf den Abschluss von oxidativem Burst und Phagozytose.

Thioredoxin ist ein Molekül, welches in die Redoxregulation involviert ist. Es gilt des Weiteren als Stimulus für die Produktion von TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 und IL-8 (196). Dass Thioredoxin nach 2 h signifikant herunterreguliert ist, hängt demnach womöglich mit der noch nicht aktivierten Zytokinproduktion zusammen.

In ihren Microarray-Analysen zur Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit Kulturüberständen von *A. fumigatus* wiesen Higurashi *et al.* eine Hochregulation von Lymphotoxin B (*LTB*) nach 3 h nach (79). Obwohl *LTB* primär von Lymphozyten exprimiert wird, scheinen auch neutrophile Granulozyten dieses Zytokin zu sezernieren. In dieser Arbeit konnte für 2 h und 6 h eine Herunterregulation von *LTB* beobachtet werden. Dass die Art der Regulation in beiden Arbeiten variiert, lässt sich durch die Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen erklären. Offenbar führt die Anwesenheit des Pilzes zu einer Herunterregulation, während die Verwendung von Überständen die Hochregulation induziert.

Eine andere Erklärung für detektiertes *LTB* sind die Präparationen von neutrophilen Granulozyten, welche geringe Anteile an Lymphozyten enthalten können. Dieser Anteil ist allerdings so gering, dass er keinen Einfluss auf die Microarray-Analyse haben dürfte.

Nach sechs Stunden Inkubationszeit waren bis auf *LTB* alle differentiell regulierten Gene hochreguliert, wobei besonders die Zytokine dominierten. Dies steht in Einklang mit den früher durchgeführten genomweiten Arrays, bei denen ebenfalls nach 6 h eine Zunahme der Zytokinexpression zu beobachten war (M. Mezger, persönliche Kommunikation). Auffällig war, dass ein eigentlich als Housekeeping-Kontrolle ausgewähltes Gen, *GAPDH*, signifikant hochreguliert war. Die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, das der ATP-Gewinnung dient. Der Gebrauch von *GAPDH* als Kontrolle ist nicht immer unumstritten. Es konnte gezeigt werden, dass *GAPDH* durchaus weitreichendere Funktionen besitzt als die Regulation der Glykolyse. Dazu gehören beispielsweise die Induktion von Apoptose sowie die Transkriptionsaktivierung (218, 245). Da beide Prozesse auch im Infektionsgeschehen eine Rolle spielen, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion mit *A. fumigatus* in dieser Arbeit auch die Expression von *GAPDH* beeinflusst.

7 Literaturverzeichnis

1. **Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod, and B. Hube.** 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* **281**:688-694.
2. **Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock, and A. Pahissa.** 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**:1829-1835.
3. **Alvarez-Perez, S., J. L. Blanco, P. Alba, and M. E. Garcia.** 2009. Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*:1-6.
4. **Alvarez-Perez, S., M. E. Garcia, E. Bouza, T. Pelaez, and J. L. Blanco.** 2009. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. *Med Mycol* **47**:601-608.
5. **Ascioglu, S., J. H. Rex, B. de Pauw, J. E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. W. Denning, J. P. Donnelly, J. E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. F. Meis, T. F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. M. Shah, D. A. Stevens, and T. J. Walsh.** 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* **34**:7-14.
6. **Beggah, S., B. Lechenne, U. Reichard, S. Foundling, and M. Monod.** 2000. Intra- and intermolecular events direct the propeptide-mediated maturation of the *Candida albicans* secreted aspartic proteinase Sap1p. *Microbiology* **146 (Pt 11)**:2765-2773.
7. **Behnsen, J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage, and P. F. Zipfel.** 2008. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect Immun* **76**:820-827.
8. **Behnsen, J., P. Narang, M. Hasenberg, F. Gunzer, U. Bilitewski, N. Klippel, M. Rohde, M. Brock, A. A. Brakhage, and M. Gunzer.** 2007. Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **3**:e13.
9. **Bellocchio, S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S. S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S. M. Levitz, and L. Romani.** 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* **172**:3059-3069.
10. **Bellocchio, S., S. Moretti, K. Perruccio, F. Fallarino, S. Bozza, C. Montagnoli, P. Mosci, G. B. Lipford, L. Pitzurra, and L. Romani.** 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* **173**:7406-7415.
11. **Bernard, M., and J. P. Latge.** 2001. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:9-17.
12. **Bernard, M., I. Mouyna, G. Dubreucq, J. P. Debeaupuis, T. Fontaine, C. Vorgias, C. Fuglsang, and J. P. Latge.** 2002. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**:2819-2829.
13. **Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach.** 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**:2619-2622.
14. **Biswas, S., P. Van Dijck, and A. Datta.** 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:348-376.

15. **Bok, J. W., D. Chung, S. A. Balajee, K. A. Marr, D. Andes, K. F. Nielsen, J. C. Frisvad, K. A. Kirby, and N. P. Keller.** 2006. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* **74**:6761-6768.
16. **Boo, T. W., B. O'Reilly, J. O'Leary, and B. Cryan.** 2005. Candidaemia in an Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. *Mycoses* **48**:251-259.
17. **Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard, and M. Monod.** 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**:543-554.
18. **Borg-von Zepelin, M., L. Kunz, R. Ruchel, U. Reichard, M. Weig, and U. Gross.** 2007. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* **60**:424-428.
19. **Bougnoux, M. E., D. Diogo, N. Francois, B. Sendid, S. Veirmeire, J. F. Colombel, C. Bouchier, H. Van Kruiningen, C. d'Enfert, and D. Poulain.** 2006. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol* **44**:1810-1820.
20. **Braun, B. R., and A. D. Johnson.** 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**:105-109.
21. **Braun, B. R., and A. D. Johnson.** 2000. TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *candida albicans*. *Genetics* **155**:57-67.
22. **Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky.** 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
23. **Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon.** 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**:1119-1124.
24. **Bruneau, J. M., T. Magnin, E. Tagat, R. Legrand, M. Bernard, M. Diaquin, C. Fudali, and J. P. Latge.** 2001. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* **22**:2812-2823.
25. **Calderone, R. A., and W. A. Fonzi.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:327-335.
26. **Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, and F. M. Klis.** 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1477-1489.
27. **Cassone, A.** 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr Top Med Mycol* **3**:248-314.
28. **Cassone, A., P. Chiani, I. Quinti, and A. Torosantucci.** 1997. Possible participation of polymorphonuclear cells stimulated by microbial immunomodulators in the dysregulated cytokine patterns of AIDS patients. *J Leukoc Biol* **62**:60-66.
29. **Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:130-180.
30. **Chai, L. Y., M. G. Netea, J. Sugui, A. G. Vonk, W. W. van de Sande, A. Warris, K. J. Kwon-Chung, and B. Jan Kullberg.** 2009. *Aspergillus fumigatus* Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response. *Immunobiology*.
31. **Chen, C. G., Y. L. Yang, H. H. Cheng, C. L. Su, S. F. Huang, C. T. Chen, Y. T. Liu, I. J. Su, and H. J. Lo.** 2006. Non-lethal *Candida albicans* cph1/cph1 efg1/efg1 transcription factor mutant establishing restricted zone of infection in a mouse model of systemic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **19**:561-565.
32. **Cheng, M. F., Y. L. Yang, T. J. Yao, C. Y. Lin, J. S. Liu, R. B. Tang, K. W. Yu, Y. H. Fan, K. S. Hsieh, M. Ho, and H. J. Lo.** 2005. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. *BMC Infect Dis* **5**:22.

33. **Colina, A. R., F. Aumont, N. Deslauriers, P. Belhumeur, and L. de Repentigny.** 1996. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**:4514-4519.
34. **Comera, C., K. Andre, J. Laffitte, X. Collet, P. Galtier, and I. Maridonneau-Parini.** 2007. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes Infect* **9**:47-54.
35. **Copping, V. M., C. J. Barelle, B. Hube, N. A. Gow, A. J. Brown, and F. C. Odds.** 2005. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother* **55**:645-654.
36. **Cornillet, A., C. Camus, S. Nimubona, V. Gandemer, P. Tattevin, C. Belleguic, S. Chevrier, C. Meunier, C. Lebert, M. Aupee, S. Caulet-Maugendre, M. Faucheux, B. Lelong, E. Leray, C. Guiguen, and J. P. Gangneux.** 2006. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* **43**:577-584.
37. **Cramer, R. A., Jr., M. P. Gamcsik, R. M. Brooking, L. K. Najvar, W. R. Kirkpatrick, T. F. Patterson, C. J. Balibar, J. R. Graybill, J. R. Perfect, S. N. Abraham, and W. J. Steinbach.** 2006. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot Cell* **5**:972-980.
38. **Cutler, J. E.** 1977. Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect Immun* **18**:568-573.
39. **d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* **191**:1661-1674.
40. **De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schafer, and A. Cassone.** 1999. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* **179**:201-208.
41. **DeLeo, F. R.** 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* **9**:399-413.
42. **Diamond, R. D., and R. A. Clark.** 1982. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infect Immun* **38**:487-495.
43. **Doedt, T., S. Krishnamurthy, D. P. Bockmuhl, B. Tebarth, C. Stempel, C. L. Russell, A. J. Brown, and J. F. Ernst.** 2004. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**:3167-3180.
44. **Dongari-Bagtzoglou, A., P. Dwivedi, E. Ioannidou, M. Shaqman, D. Hull, and J. Burleson.** 2009. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol* **24**:249-254.
45. **Durr, M. C., S. A. Kristian, M. Otto, G. Matteoli, P. S. Margolis, J. Trias, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, E. Bohn, R. Landmann, and A. Peschel.** 2006. Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns--formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* **8**:207-217.
46. **Dyer, P. S., and M. Paoletti.** 2005. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med Mycol* **43 Suppl 1**:S7-14.
47. **Edens, H. A., C. A. Parkos, T. W. Liang, A. J. Jesaitis, J. E. Cutler, and H. M. Miettinen.** 1999. Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages. *Infect Immun* **67**:1063-1071.
48. **Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet.** 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**:685-702.
49. **Eichner, R. D., M. Al Salami, P. R. Wood, and A. Mullbacher.** 1986. The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int J Immunopharmacol* **8**:789-797.

50. **Elorza, M. V., H. Rico, and R. Sentandreu.** 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* **129**:1577-1582.
51. **Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schafer, and B. Hube.** 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* **70**:3689-3700.
52. **Fernandez-Arenas, E., C. K. Bleck, C. Nombela, C. Gil, G. Griffiths, and R. Diez-Orejas.** 2009. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* **11**:560-589.
53. **Ferwerda, B., G. Ferwerda, T. S. Plantinga, J. A. Willment, A. B. van Sriel, H. Venselaar, C. C. Elbers, M. D. Johnson, A. Cambi, C. Huysamen, L. Jacobs, T. Jansen, K. Verheijen, L. Masthoff, S. A. Morre, G. Vriend, D. L. Williams, J. R. Perfect, L. A. Joosten, C. Wijmenga, J. W. van der Meer, G. J. Adema, B. J. Kullberg, G. D. Brown, and M. G. Netea.** 2009. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* **361**:1760-1767.
54. **Fontaine, T., C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C. E. Vorgias, M. Diaquin, and J. P. Latge.** 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* **275**:27594-27607.
55. **Fontaine, T., C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C. E. Vorgias, M. Diaquin, and J. P. Latge.** 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* **275**:41528.
56. **Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717-728.
57. **Fourneret-Vivier, A., B. Lebeau, M. R. Mallaret, M. P. Brenier-Pinchart, J. P. Brion, C. Pinel, F. Garban, C. Pison, R. Hamidfar, D. Plantaz, H. Pelloux, and R. Grillot.** 2006. Hospital-wide prospective mandatory surveillance of invasive aspergillosis in a French teaching hospital (2000-2002). *J Hosp Infect* **62**:22-28.
58. **Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**:397-415.
59. **Fu, Y., A. S. Ibrahim, D. C. Sheppard, Y. C. Chen, S. W. French, J. E. Cutler, S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr.** 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**:61-72.
60. **Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky.** 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**:231-241.
61. **Fukushima, C., H. Matsuse, S. Tomari, Y. Obase, Y. Miyazaki, T. Shimoda, and S. Kohno.** 2003. Oral candidiasis associated with inhaled corticosteroid use: comparison of fluticasone and beclomethasone. *Ann Allergy Asthma Immunol* **90**:646-651.
62. **Gales, A., A. Conduche, J. Bernad, L. Lefevre, D. Olganier, M. Beraud, G. Martin-Blondel, M. D. Linas, J. Auwerx, A. Coste, and B. Pipy.** PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**:e1000714.
63. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**:1107-1117.
64. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, and D. M. Underhill.** 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* **24**:1277-1286.
65. **Garcia-Sanchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo, and C. d'Enfert.** 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**:536-545.

66. **Gardiner, D. M., and B. J. Howlett.** 2005. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **248**:241-248.
67. **Gaviria, J. M., J. A. van Burik, D. C. Dale, R. K. Root, and W. C. Liles.** 1999. Modulation of neutrophil-mediated activity against the pseudohyphal form of *Candida albicans* by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administered in vivo. *J Infect Dis* **179**:1301-1304.
68. **Geiger, J., D. Wessels, S. R. Lockhart, and D. R. Soll.** 2004. Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* **72**:667-677.
69. **Germaine, G. R., and L. M. Tellefson.** 1981. Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infect Immun* **31**:323-326.
70. **Gillum, A. M., E. Y. Tsay, and D. R. Kirsch.** 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**:179-182.
71. **Gow, N. A., M. G. Netea, C. A. Munro, G. Ferwerda, S. Bates, H. M. Mora-Montes, L. Walker, T. Jansen, L. Jacobs, V. Tsoni, G. D. Brown, F. C. Odds, J. W. Van der Meer, A. J. Brown, and B. J. Kullberg.** 2007. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* **196**:1565-1571.
72. **Gropp, K., L. Schild, S. Schindler, B. Hube, P. F. Zipfel, and C. Skerka.** 2009. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* **47**:465-475.
73. **Hamada, K., S. Fukuchi, M. Arisawa, M. Baba, and K. Kitada.** 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**:53-59.
74. **Hampton, M. B., A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn.** 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**:3007-3017.
75. **Harler, M. B., and J. Reichner.** 2001. Increased neutrophil motility by beta-glucan in the absence of chemoattractant. *Shock* **16**:419-424.
76. **Henwick, S., S. V. Hetherington, and C. C. Patrick.** 1993. Complement binding to *Aspergillus* conidia correlates with pathogenicity. *J Lab Clin Med* **122**:27-35.
77. **Herbrecht, R., A. Moghaddam, L. Mahmal, S. Natarajan-Ame, L. M. Fornecker, and V. Letscher-Bru.** 2005. Invasive aspergillosis in the hematologic and immunologic patient: new findings and key questions in leukemia. *Med Mycol* **43 Suppl 1**:S239-242.
78. **Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, and A. Zychlinsky.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2396-2401.
79. **Higurashi, H., M. Arai, A. Watanabe, H. Igari, N. Seki, K. Kamei, and T. Kuriyama.** 2007. Gene expression profiling of polymorphonuclear leukocytes treated with the culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* and gliotoxin. *Microbiol Immunol* **51**:407-419.
80. **Hoyer, L. L.** 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:176-180.
81. **Hoyer, L. L., T. L. Payne, M. Bell, A. M. Myers, and S. Scherer.** 1998. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* **33**:451-459.
82. **Huang, G., T. Srikantha, N. Sahni, S. Yi, and D. R. Soll.** 2009. CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* **19**:330-334.
83. **Hube, B.** 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**:55-69.
84. **Hube, B., M. Monod, D. A. Schofield, A. J. Brown, and N. A. Gow.** 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**:87-99.
85. **Hube, B., and J. Naglik.** 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**:1997-2005.

86. Ikegami, Y., R. Amitani, T. Murayama, R. Nawada, W. J. Lee, R. Kawanami, and F. Kuze. 1998. Effects of alkaline protease or restrictocin deficient mutants of *Aspergillus fumigatus* on human polymorphonuclear leukocytes. *Eur Respir J* **12**:607-611.
87. Iverson, D., L. R. DeChatelet, J. K. Spitznagel, and P. Wang. 1977. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. *J Clin Invest* **59**:282-290.
88. Iverson, D. B., P. Wang-Iverson, J. K. Spitznagel, and C. L. De. 1978. Subcellular localization of NAD(P)H oxidase(s) in human neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* **176**:175-178.
89. Iyer, G. Y. N., D. F. Islam, and J. H. Quastel. 1961. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* **192**:535-541.
90. Jahn, B., F. Boukhallouk, J. Lotz, K. Langfelder, G. Wanner, and A. A. Brakhage. 2000. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect Immun* **68**:3736-3739.
91. Jahn, B., K. Langfelder, U. Schneider, C. Schindel, and A. A. Brakhage. 2002. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* **4**:793-803.
92. Jaillon, S., G. Peri, Y. Delneste, I. Fremaux, A. Doni, F. Moalli, C. Garlanda, L. Romani, H. Gascan, S. Bellocchio, S. Bozza, M. A. Cassatella, P. Jeannin, and A. Mantovani. 2007. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* **204**:793-804.
93. Jorda-Marcos, R., F. Alvarez-Lerma, M. Jurado, M. Palomar, J. Nolla-Salas, M. A. Leon, and C. Leon. 2007. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* **50**:302-310.
94. Julius, D., A. Brake, L. Blair, R. Kunisawa, and J. Thorner. 1984. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**:1075-1089.
95. Kaminishi, H., H. Miyaguchi, T. Tamaki, N. Suenaga, M. Hisamatsu, I. Mihashi, H. Matsumoto, H. Maeda, and Y. Hagihara. 1995. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**:984-988.
96. Kandasamy, R., G. Vedyappan, and W. L. Chaffin. 2000. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **186**:239-243.
97. Keel, M., U. Ungethum, U. Steckholzer, E. Niederer, T. Hartung, O. Trentz, and W. Ertel. 1997. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* **90**:3356-3363.
98. Kobayashi, S. D., J. M. Voyich, G. A. Somerville, K. R. Braughton, H. L. Malech, J. M. Musser, and F. R. DeLeo. 2003. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **73**:315-322.
99. Korting, H. C., B. Hube, S. Oberbauer, E. Januschke, G. Hamm, A. Albrecht, C. Borelli, and M. Schaller. 2003. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol* **52**:623-632.
100. Kretschmar, M., A. Felk, P. Staib, M. Schaller, D. Hess, M. Callapina, J. Morschhauser, W. Schafer, H. C. Korting, H. Hof, B. Hube, and T. Nichterlein. 2002. Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of *Candida albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. *Microb Pathog* **32**:61-70.
101. Kretschmar, M., B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof, and T. Nichterlein. 1999. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* **67**:6637-6642.
102. Kullberg, B. J., and A. M. Oude Lashof. 2002. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* **7**:183-191.
103. Kumamoto, C. A., and M. D. Vines. 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* **7**:1546-1554.

104. **Kupfahl, C., T. Heinekamp, G. Geginat, T. Ruppert, A. Hartl, H. Hof, and A. A. Brakhage.** 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. *Mol Microbiol* **62**:292-302.
105. **Lachke, S. A., S. R. Lockhart, K. J. Daniels, and D. R. Soll.** 2003. Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* **71**:4970-4976.
106. **Langfelder, K., B. Philippe, B. Jahn, J. P. Latge, and A. A. Brakhage.** 2001. Differential expression of the *Aspergillus fumigatus* *pkpP* gene detected in vitro and in vivo with green fluorescent protein. *Infect Immun* **69**:6411-6418.
107. **Langfelder, K., M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, and A. A. Brakhage.** 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**:143-158.
108. **Latge, J. P.** 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**:310-350.
109. **Latge, J. P.** 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**:382-389.
110. **Latge, J. P., I. Mouyna, F. Tekaia, A. Beauvais, J. P. Debeaupuis, and W. Nierman.** 2005. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **43 Suppl 1**:S15-22.
111. **Lavigne, L. M., J. E. Albina, and J. S. Reichner.** 2006. Beta-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions. *J Immunol* **177**:8667-8675.
112. **Lavigne, L. M., X. M. O'Brien, M. Kim, J. W. Janowski, J. E. Albina, and J. S. Reichner.** 2007. Integrin engagement mediates the human polymorphonuclear leukocyte response to a fungal pathogen-associated molecular pattern. *J Immunol* **178**:7276-7282.
113. **Lee, S. A., J. Jones, S. Hardison, J. Kot, Z. Khalique, S. M. Bernardo, A. Lazzell, C. Monteagudo, and J. Lopez-Ribot.** 2009. *Candida albicans* *VPS4* is required for secretion of aspartyl proteases and in vivo virulence. *Mycopathologia* **167**:55-63.
114. **Lehrer, R. I., J. Hanifin, and M. J. Cline.** 1969. Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature* **223**:78-79.
115. **LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa.** 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**:630-638.
116. **Lermann, U., and J. Morschhauser.** 2008. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* **154**:3281-3295.
117. **Lessing, F., O. Kniemeyer, I. Wozniok, J. Loeffler, O. Kurzai, A. Haertl, and A. A. Brakhage.** 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell* **6**:2290-2302.
118. **Levitz, S. M., and R. D. Diamond.** 1985. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* Conidia to killing by neutrophils in vitro. *J Infect Dis* **152**:33-42.
119. **Levitz, S. M., and T. P. Farrell.** 1990. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *J Leukoc Biol* **47**:170-175.
120. **Li, F., and S. P. Palecek.** 2003. *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**:1266-1273.
121. **Li, F., M. J. Svarovsky, A. J. Karlsson, J. P. Wagner, K. Marchillo, P. Oshel, D. Andes, and S. P. Palecek.** 2007. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* **6**:931-939.
122. **Lin, S. J., J. Schranz, and S. M. Teutsch.** 2001. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**:358-366.
123. **Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**:939-949.

124. **Lockhart, S. R., C. Pujol, K. J. Daniels, M. G. Miller, A. D. Johnson, M. A. Pfaller, and D. R. Soll.** 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**:737-745.
125. **Losse, J., P. F. Zipfel, and M. Jozsi.** Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J Immunol* **184**:912-921.
126. **Luo, S., S. Poltermann, A. Kunert, S. Rupp, and P. F. Zipfel.** 2009. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol* **47**:541-550.
127. **Mansour, M. K., and S. M. Levitz.** 2002. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**:359-365.
128. **Marcil, A., C. Gadoury, J. Ash, J. Zhang, A. Nantel, and M. Whiteway.** 2008. Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*-macrophage interactions. *Infect Immun* **76**:4345-4358.
129. **Marcilla, A., M. V. Elorza, S. Mormeneo, H. Rico, and R. Sentandreu.** 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol* **155**:312-319.
130. **Mardh, P. A., A. G. Rodrigues, M. Genc, N. Novikova, J. Martinez-de-Oliveira, and S. Guaschino.** 2002. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis--a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* **13**:522-539.
131. **Mardon, D. N., S. K. Hurst, and E. Balish.** 1971. Germ-tube production by *Candida albicans* in minimal liquid culture media. *Can J Microbiol* **17**:851-856.
132. **Marr, K. A., R. A. Carter, M. Boeckh, P. Martin, and L. Corey.** 2002. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* **100**:4358-4366.
133. **Marr, K. A., T. Patterson, and D. Denning.** 2002. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am* **16**:875-894, vi.
134. **Mayer-Scholl, A., R. Hurwitz, V. Brinkmann, M. Schmid, P. Jungblut, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky.** 2005. Human neutrophils kill *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog* **1**:e23.
135. **Meiller, T. F., B. Hube, L. Schild, M. E. Shirliff, M. A. Scheper, R. Winkler, A. Ton, and M. A. Jabra-Rizk.** 2009. A novel immune evasion strategy of *candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS ONE* **4**:e5039.
136. **Meri, T., A. M. Blom, A. Hartmann, D. Lenk, S. Meri, and P. F. Zipfel.** 2004. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect Immun* **72**:6633-6641.
137. **Meri, T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Wurzner, J. Hellwage, S. Meri, and P. F. Zipfel.** 2002. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* **70**:5185-5192.
138. **Meshulam, T., S. M. Levitz, L. Christin, and R. D. Diamond.** 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *J Infect Dis* **172**:1153-1156.
139. **Miller, M. G., and A. D. Johnson.** 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**:293-302.
140. **Miranda, L. N., I. M. van der Heijden, S. F. Costa, A. P. Sousa, R. A. Sienra, S. Gobara, C. R. Santos, R. D. Lobo, V. P. Pessoa, Jr., and A. S. Levin.** 2009. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* **72**:9-16.
141. **Mircescu, M. M., L. Lipuma, N. van Rooijen, E. G. Pamer, and T. M. Hohl.** 2009. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis* **200**:647-656.
142. **Molano, J., B. Bowers, and E. Cabib.** 1980. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* **85**:199-212.

143. **Monod, M., B. Hube, D. Hess, and D. Sanglard.** 1998. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144 (Pt 10)**:2731-2737.
144. **Monod, M., G. Togni, B. Hube, and D. Sanglard.** 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**:357-368.
145. **Moran, C., C. A. Grussemer, J. R. Spalding, D. K. Benjamin, Jr., and S. D. Reed.** 2009. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control*.
146. **Moukadiri, I., and J. Zueco.** 2001. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res* **1**:241-245.
147. **Mullbacher, A., and R. D. Eichner.** 1984. Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:3835-3837.
148. **Murad, A. M., C. d'Enfert, C. Gaillardin, H. Tournu, F. Tekaia, D. Talibi, D. Marechal, V. Marchais, J. Cottin, and A. J. Brown.** 2001. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**:981-993.
149. **Murad, A. M., P. R. Lee, I. D. Broadbent, C. J. Barelle, and A. J. Brown.** 2000. Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast* **16**:325-327.
150. **Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds, and A. J. Brown.** 2001. *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**:4742-4752.
151. **Murayama, T., R. Amitani, Y. Ikegami, R. Kawanami, W. J. Lee, and R. Nawada.** 1998. Effects of *Aspergillus fumigatus* culture filtrate on antifungal activity of human phagocytes in vitro. *Thorax* **53**:975-978.
152. **Naglik, J. R., D. Moyes, J. Makwana, P. Kanzaria, E. Tschlaki, G. Weindl, A. R. Tappuni, C. A. Rodgers, A. J. Woodman, S. J. Challacombe, M. Schaller, and B. Hube.** 2008. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* **154**:3266-3280.
153. **Naglik, J. R., G. Newport, T. C. White, L. L. Fernandes-Naglik, J. S. Greenspan, D. Greenspan, S. P. Sweet, S. J. Challacombe, and N. Agabian.** 1999. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* **67**:2482-2490.
154. **Naglik, J. R., C. A. Rodgers, P. J. Shirlaw, J. L. Dobbie, L. L. Fernandes-Naglik, D. Greenspan, N. Agabian, and S. J. Challacombe.** 2003. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* **188**:469-479.
155. **Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg, and N. A. Gow.** 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**:67-78.
156. **Niggli, V.** 2003. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:1619-1638.
157. **O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer.** 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**:471-474.
158. **Ogletree, F. F., A. T. Abdelal, and D. G. Ahearn.** 1978. Germ-tube formation by atypical strains of *Candida albicans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **44**:15-24.
159. **Ohno, Y., and J. I. Gallin.** 1985. Diffusion of extracellular hydrogen peroxide into intracellular compartments of human neutrophils. Studies utilizing the inactivation of myeloperoxidase by hydrogen peroxide and azide. *J Biol Chem* **260**:8438-8446.
160. **Orciuolo, E., M. Stanzani, M. Canestraro, S. Galimberti, G. Carulli, R. Lewis, M. Petrini, and K. V. Komanduri.** 2007. Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *J Leukoc Biol* **82**:839-848.

161. **Owen, C. A., M. A. Campbell, S. S. Boukedes, and E. J. Campbell.** 1997. Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. *Am J Physiol* **272**:L385-393.
162. **Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, and E. J. Campbell.** 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* **131**:775-789.
163. **Pagano, L., M. Caira, A. Candoni, M. Offidani, L. Fianchi, B. Martino, D. Pastore, M. Picardi, A. Bonini, A. Chierichini, R. Fanci, C. Caramatti, R. Invernizzi, D. Mattei, M. E. Mitra, L. Melillo, F. Aversa, M. T. Van Lint, P. Falcucci, C. G. Valentini, C. Girmenia, and A. Nosari.** 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **91**:1068-1075.
164. **Pagano, L., M. Caira, A. Nosari, M. T. Van Lint, A. Candoni, M. Offidani, T. Aloisi, G. Irrera, A. Bonini, M. Picardi, C. Caramatti, R. Invernizzi, D. Mattei, L. Melillo, C. de Waure, G. Reddicono, L. Fianchi, C. G. Valentini, C. Girmenia, G. Leone, and F. Aversa.** 2007. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis* **45**:1161-1170.
165. **Pahl, H. L., B. Krauss, K. Schulze-Osthoff, T. Decker, E. B. Traenckner, M. Vogt, C. Myers, T. Parks, P. Warring, A. Muhlbacher, A. P. Czernilofsky, and P. A. Baeuerle.** 1996. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med* **183**:1829-1840.
166. **Palma, C., A. Cassone, D. Serbousek, C. A. Pearson, and J. Y. Djeu.** 1992. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**:4604-4611.
167. **Palma, C., D. Serbousek, A. Torosantucci, A. Cassone, and J. Y. Djeu.** 1992. Identification of a mannoprotein fraction from *Candida albicans* that enhances human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions and stimulates lactoferrin in PMNL inhibition of candidal growth. *J Infect Dis* **166**:1103-1112.
168. **Paoletti, M., C. Rydholm, E. U. Schwier, M. J. Anderson, G. Szakacs, F. Lutzoni, J. P. Debeauvais, J. P. Latge, D. W. Denning, and P. S. Dyer.** 2005. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* **15**:1242-1248.
169. **Pardo, J., C. Urban, E. M. Galvez, P. G. Ekert, U. Muller, J. Kwon-Chung, M. Lobigs, A. Mullbacher, R. Wallich, C. Borner, and M. M. Simon.** 2006. The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol* **174**:509-519.
170. **Pihet, M., P. Vandeputte, G. Tronchin, G. Renier, P. Saulnier, S. Georgeault, R. Mallet, D. Chabasse, F. Symoens, and J. P. Bouchara.** 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol* **9**:177.
171. **Post, M. J., C. Lass-Floerl, G. Gastl, and D. Nachbaur.** 2007. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transpl Infect Dis* **9**:189-195.
172. **Radsak, M., C. Iking-Konert, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G. M. Hansch.** 2000. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* **101**:521-530.
173. **Ramirez-Zavala, B., O. Reuss, Y. N. Park, K. Ohlsen, and J. Morschhauser.** 2008. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **4**:e1000089.
174. **Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal.** 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**:291-297.

175. **Rex, J. H., J. E. Bennett, J. I. Gallin, H. L. Malech, and D. A. Melnick.** 1990. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis* **162**:523-528.
176. **Rex, J. H., J. E. Bennett, A. M. Sugar, P. G. Pappas, C. M. van der Horst, J. E. Edwards, R. G. Washburn, W. M. Scheld, A. W. Karchmer, A. P. Dine, and et al.** 1994. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med* **331**:1325-1330.
177. **Ripeau, J. S., M. Fiorillo, F. Aumont, P. Belhumeur, and L. de Repentigny.** 2002. Evidence for differential expression of *candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. *J Infect Dis* **185**:1094-1102.
178. **Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa.** 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**:507-517.
179. **Ross, G. D., J. A. Cain, B. L. Myones, S. L. Newman, and P. J. Lachmann.** 1987. Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for beta-glucans. *Complement* **4**:61-74.
180. **Rotstein, D., J. Parodo, R. Taneja, and J. C. Marshall.** 2000. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock* **14**:278-283.
181. **Rozkiewicz, D., T. Daniluk, M. L. Zaremba, D. Cylwik-Rokicka, W. Stokowska, M. Pawinska, E. Dabrowska, G. Marczuk-Kolada, and D. Waszkiel.** 2006. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. *Adv Med Sci* **51 Suppl** 1:187-190.
182. **Rubin-Bejerano, I., C. Abeijon, P. Magnelli, P. Grisafi, and G. R. Fink.** 2007. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* **2**:55-67.
183. **Rubin-Bejerano, I., I. Fraser, P. Grisafi, and G. R. Fink.** 2003. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11007-11012.
184. **Ruchel, R.** 1986. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* **3**:316-319.
185. **Samaranayake, L. P.** 1992. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **73**:171-180.
186. **Sanglard, D., B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, and N. A. Gow.** 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**:3539-3546.
187. **Sato, T., K. Iwabuchi, I. Nagaoka, Y. Adachi, N. Ohno, H. Tamura, K. Seyama, Y. Fukuchi, H. Nakayama, F. Yoshizaki, K. Takamori, and H. Ogawa.** 2006. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol* **80**:204-211.
188. **Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella.** 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**:195-203.
189. **Scapini, P., C. Laudanna, C. Pinardi, P. Allavena, A. Mantovani, S. Sozzani, and M. A. Cassatella.** 2001. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* **31**:1981-1988.
190. **Schaffner, A., C. E. Davis, T. Schaffner, M. Markert, H. Douglas, and A. I. Braude.** 1986. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* **78**:511-524.
191. **Schaller, M., M. Bein, H. C. Korting, S. Baur, G. Hamm, M. Monod, S. Beinhauer, and B. Hube.** 2003. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue

- damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* **71**:3227-3234.
192. **Schaller, M., B. Hube, M. W. Ollert, W. Schafer, M. Borg-von Zepelin, E. Thoma-Greber, and H. C. Korting.** 1999. In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* **112**:383-386.
193. **Schaller, M., H. C. Korting, C. Borelli, G. Hamm, and B. Hube.** 2005. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun* **73**:2758-2765.
194. **Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. Chen, and B. Hube.** 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* **34**:169-180.
195. **Schaller, M., W. Schafer, H. C. Korting, and B. Hube.** 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**:605-615.
196. **Schenk, H., M. Vogt, W. Droge, and K. Schulze-Osthoff.** 1996. Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J Immunol* **156**:765-771.
197. **Segal, A. W.** 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**:197-223.
198. **Segal, A. W.** 2006. How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. *Novartis Found Symp* **279**:92-98; discussion 98-100, 216-109.
199. **Segal, B. H., T. L. Leto, J. I. Gallin, H. L. Malech, and S. M. Holland.** 2000. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* **79**:170-200.
200. **Seguchi, H., and T. Kobayashi.** 2002. Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils. *J Electron Microsc (Tokyo)* **51**:87-91.
201. **Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.** 1999. *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* **181**:5273-5279.
202. **Simonetti, N., V. Strippoli, and A. Cassone.** 1974. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* **250**:344-346.
203. **Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, and D. R. Soll.** 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**:189-197.
204. **Smail, E. H., D. A. Melnick, R. Ruggeri, and R. D. Diamond.** 1988. A novel natural inhibitor from *Candida albicans* hyphae causing dissociation of the neutrophil respiratory burst response to chemotactic peptides from other post-activation events. *J Immunol* **140**:3893-3899.
205. **Soloviev, D. A., W. A. Fonzi, R. Sentandreu, E. Pluskota, C. B. Forsyth, S. Yadav, and E. F. Plow.** 2007. Identification of pH-regulated antigen 1 released from *Candida albicans* as the major ligand for leukocyte integrin alphaMbeta2. *J Immunol* **178**:2038-2046.
206. **Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, and J. F. Ernst.** 1999. Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**:5514-5517.
207. **Spikes, S., R. Xu, C. K. Nguyen, G. Chamilos, D. P. Kontoyiannis, R. H. Jacobson, D. E. Ejzykowicz, L. Y. Chiang, S. G. Filler, and G. S. May.** 2008. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis* **197**:479-486.
208. **St-Germain, G., M. Laverdiere, R. Pelletier, P. Rene, A. M. Bourgault, C. Lemieux, and M. Libman.** 2008. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **19**:55-62.
209. **Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**:1535-1538.

210. **Staub, P., U. Lermann, J. Blass-Warmuth, B. Degel, R. Wurzner, M. Monod, T. Schirmeister, and J. Morschhauser.** 2008. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:146-156.
211. **Standaert-Vitse, A., B. Sendid, M. Joossens, N. Francois, P. Vandewalle-El Khoury, J. Branche, H. Van Kruiningen, T. Jouault, P. Rutgeerts, C. Gower-Rousseau, C. Libersa, C. Neut, F. Broly, M. Chamailard, S. Vermeire, D. Poulain, and J. F. Colombel.** 2009. *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**:1745-1753.
212. **Stanzani, M., E. Orciuolo, R. Lewis, D. P. Kontoyiannis, S. L. Martins, L. S. St John, and K. V. Komanduri.** 2005. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* **105**:2258-2265.
213. **Stichternoth, C., and J. F. Ernst.** 2009. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **75**:3663-3672.
214. **Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst.** 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**:1982-1991.
215. **Strauss, A., S. Michel, and J. Morschhauser.** 2001. Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**:3761-3769.
216. **Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**:317-324.
217. **Sugui, J. A., J. Pardo, Y. C. Chang, K. A. Zarembler, G. Nardone, E. M. Galvez, A. Mullbacher, J. I. Gallin, M. M. Simon, and K. J. Kwon-Chung.** 2007. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot Cell* **6**:1562-1569.
218. **Tarze, A., A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer, and C. Brenner.** 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**:2606-2620.
219. **Taylor, B. N., H. Hannemann, M. Sehna, A. Biesemeier, A. Schweizer, M. Rollinghoff, and K. Schroppel.** 2005. Induction of *SAP7* correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect Immun* **73**:7061-7063.
220. **Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G. D. Brown.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**:31-38.
221. **Tessarolli, V., T. H. Gasparoto, H. R. Lima, E. A. Figueira, T. P. Garlet, S. A. Torres, G. P. Garlet, J. S. Da Silva, and A. P. Campanelli.** 2009. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. *Med Mycol*:1-12.
222. **Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, and R. Grillot.** 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**:359-366.
223. **Tsikitis, V. L., J. E. Albina, and J. S. Reichner.** 2004. Beta-glucan affects leukocyte navigation in a complex chemotactic gradient. *Surgery* **136**:384-389.
224. **Tsuchimori, N., L. L. Sharkey, W. A. Fonzi, S. W. French, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler.** 2000. Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* **68**:1997-2002.
225. **Tsunawaki, S., L. S. Yoshida, S. Nishida, T. Kobayashi, and T. Shimoyama.** 2004. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun* **72**:3373-3382.
226. **Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky.** 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**:e1000639.

227. **Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky.** 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**:668-676.
228. **Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. De Pauw, and F. Meunier.** 1999. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* **28**:1071-1079.
229. **Vogl, G., I. Lesiak, D. B. Jensen, S. Perkhofer, R. Eck, C. Speth, C. Lass-Flörl, P. F. Zipfel, A. M. Blom, M. P. Dierich, and R. Würzner.** 2008. Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol Immunol* **45**:1485-1493.
230. **Wang, J. H., B. Yu, H. Y. Niu, H. Li, Y. Zhang, X. Wang, and P. He.** 2009. C-jun N-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Staphylococcus aureus*-induced U937 apoptosis. *Chin Med Sci J* **24**:26-29.
231. **Ward, C., E. R. Chilvers, M. F. Lawson, J. G. Pryde, S. Fujihara, S. N. Farrow, C. Haslett, and A. G. Rossi.** 1999. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* **274**:4309-4318.
232. **Waring, P., and J. Beaver.** 1996. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Gen Pharmacol* **27**:1311-1316.
233. **Waring, P., R. D. Eichner, A. Mullbacher, and A. Sjaarda.** 1988. Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *J Biol Chem* **263**:18493-18499.
234. **Watanabe, A., K. Kamei, T. Sekine, M. Waku, K. Nishimura, M. Miyaji, and T. Kuriyama.** 2003. Immunosuppressive substances in *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *J Infect Chemother* **9**:114-121.
235. **Watson, R. W., H. P. Redmond, J. H. Wang, C. Condrón, and D. Bouchier-Hayes.** 1996. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol* **156**:3986-3992.
236. **Werner, J. L., A. E. Metz, D. Horn, T. R. Schoeb, M. M. Hewitt, L. M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G. D. Brown, and C. Steele.** 2009. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* **182**:4938-4946.
237. **Wheeler, R. T., D. Kombe, S. D. Agarwala, and G. R. Fink.** 2008. Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog* **4**:e1000227.
238. **White, T. C., and N. Agabian.** 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* **177**:5215-5221.
239. **Winkelstein, J. A., M. C. Marino, R. B. Johnston, Jr., J. Boyle, J. Curnutte, J. I. Gallin, H. L. Malech, S. M. Holland, H. Ochs, P. Quie, R. H. Buckley, C. B. Foster, S. J. Chanock, and H. Dickler.** 2000. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* **79**:155-169.
240. **Wozniok, I., A. Hornbach, C. Schmitt, M. Frosch, H. Einsele, B. Hube, J. Löffler, and O. Kurzai.** 2008. Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol* **10**:807-820.
241. **Yamamoto, A., S. Taniuchi, S. Tsuji, M. Hasui, and Y. Kobayashi.** 2002. Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clin Exp Immunol* **129**:479-484.
242. **Yoshida, L. S., S. Abe, and S. Tsunawaki.** 2000. Fungal gliotoxin targets the onset of superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:716-723.
243. **Zarembek, K., S. J., and P. Zervas.** 2006. Chronic granulomatous disease (CGD) and normal human neutrophils arrest the growth of *Aspergillus fumigatus* conidia: a new fungistatic role for lactoferrin. *J Immunol* **176**(supplement):S70.

244. **Zarembek, K. A., J. A. Sugui, Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung, and J. I. Gallin.** 2007. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol* **178**:6367-6373.
245. **Zheng, L., R. G. Roeder, and Y. Luo.** 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**:255-266.

8 Anhang

8.1 Liste der Microarray-Oligonukleotide

Tabelle 8-1: Oligonukleotide für *Aspergillus*-Granulozyten-Microarray

Gen	ID*	Name/Funktion	Oligonukleotidsequenz
<i>TLR1</i>	NM_003263	Toll-like Rezeptor 1	tctggcagctctggaagaaatcagccgatgggtggga-aactgaattgtgatcaat
<i>TLR2</i>	NM_003264	Toll-like Rezeptor 2	gacatcctgaacctgctggccacgcacatgggatgga-gagtacacaggaattt
<i>TLR3</i>	NM_003265	Toll-like Rezeptor 3	tgtggaggtgagacagacccttaggaataaatgg-gaccaccagggttgctg
<i>TLR4</i>	NM_138554	Toll-like Rezeptor 4	atgttgctcctgccaattgcatcctgtacc-cactgtcctctggattccatga
<i>TLR5</i>	NM_003268	Toll-like Rezeptor 5	tcaggagaaaggacttttgtttcctgtccaggttcg-gacagcgccaacatt
<i>TLR6</i>	NM_006068	Toll-like Rezeptor 6	atgctctgccagggacaaagtctctcatgaagaca-aatctgtatatcttctttctaggt
<i>TLR7</i>	NM_016562	Toll-like Rezeptor 7	tggcattgccacacgtgaggaaaatacgacatcgc-caatctaaggctgaacacatgcacgc
<i>TLR8</i>	NM_016610	Toll-like Rezeptor 8	aaaagttgctgtagggagcttggcagttgggtgg-cacgtgtgaaagagaattga
<i>TLR9</i>	NM_017442	Toll-like Rezeptor 9	gagggacagggatagaggattgggcagcgagg-cacagtcatgatgtgtg
<i>TLR10</i>	NM_030956	Toll-like Rezeptor 10	taaacaatcctgggatgaacaccttttccataagccct-tataaactgtgaagggtttctatagga
<i>CX3CL1</i>	NM_002996	Chemokin (C-X3-C Motiv) Ligand 1 (Fraktalkin)	aaatggcacagacgttggtgatgagggtggaaaagtct-ttcaaagtctcactactcttccaagtct
<i>CX3CR1</i>	NM_001337	Chemokin (C-X3-C Motiv) Rezeptor 1	cccagcaaatgcatagatgagaggattcaggcaa-caatggctaaatgcaaccgt
<i>CCL1</i>	NM_002981	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 1	gtgatgatctgcatgtctctggtctggctggccttctg-gagcagcttggat
<i>CCR 1</i>	NM_001295	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 1	ggcttctctggtccaaggacttgtccgt-gaagtcttgttctgggcttctgggt
<i>CCL 2</i>	NM_002982	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 2	gggattctctatagctgcgagcctctgcactga-gatcttctattgggaag
<i>CCR 2</i>	NM_000648	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 2	aatccacttctctgtcagcttggctgtctcagg-cagtctggtatgcaggcttctca
<i>CCR 3</i>	NM_001837	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 3	caactgtatctagtgaggtgtcatttcaacttccaata-caactcagcagtgaaatgtgcaatgattct
<i>CCL 4</i>	NM_002984	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 4	cttctcgcagtgtaagaaaagcagcaggcggtgg-gagggctgagcccattggt
<i>CCR 4</i>	NM_005508	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 4	tggacctgagccgctgtattgaacaggaccagaac-caccacagaattccaag
<i>CCL 5</i>	NM_002985	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 5	gggtgattgagaacttaatggtaagccgattttt-catgtttgccagtaagctcctgtgaggggtgag
<i>CCR 5</i>	NM_000579	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 5	tctagcctgtccttctcccattgtctccaac-cagctctgtctcttctaca

<i>CCR 6</i>	NM_004367	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 6	ccctttaaataattatcagaagccagcataattc- cagctgtcccctagctaactgcagctcctca
<i>CCL 7</i>	NM_006273	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 7	ttgtttcaagtcagtgctgttttagtcagtcagtgatgtt- caaagcttggagttgggt
<i>CCR 7</i>	NM_001838	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 7	agcggacgcagccaggctgtaggtgacgtcg- taggcgatgtgagtgctfact
<i>CCL 8</i>	NM_005623	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 8	caacaacagcagtacaaagcacacattgacttacag- gagcactgattgccaaagaatacca
<i>CCR 8</i>	NM_005201	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 8	gcatgcacaactatgtctccagtcattgtgttt- taagtgtggcaacaacatatatggcatcc
<i>CCR 9</i>	NM_006641	Chemokin (C-C-Motiv) Re- zeptor 9	catcagccatgttaggaataggctgtggagggc- gatgcaactcctcctgggacagc
<i>CCL 11</i>	NM_002986	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 11	tctctagtcgctgaaggggtatcttctattggccaggta- aagcagcaggtgggt
<i>CCL 13</i>	NM_005408	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 13	gagctctcctctacattgcagcatcccttcatgtccat- gactcccacaggcat
<i>CCL 15</i>	NM_032965	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 15	ttaagtatttcagaccaagaaactcacaggaggtgttg- gaggtgggtggctggcc
<i>CCL 16</i>	NM_004590	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 16	ataagggagtttatttattgcagtcgtgggtttggactaa- gagttaccctagccgtgtctcatacc
<i>CCL 17</i>	NM_002987	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 17	tttaactgcattcttactctctgtgttgggtccgaaca- gatggccctgccc
<i>CCL 18</i>	NM_002988	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 18	aagtggtgctgagcaaaaccattcaataagattgtt- cattgatacatatggcacaatgtctgtctgag
<i>CCL 19</i>	NM_006274	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 19	ctgcacggtcataggttaactgtcgcggcgctt- catcttggctgaggtcctctgc
<i>CCL 20</i>	NM_004591	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 20	ttcggcgagaggtggagtagcagcactgacatca- aagcagccaggagcaaaactc
<i>CCL 21</i>	NM_002989	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 21	atggagcagcctaagcttgggtcctgctccgg- tagctgcggaacacttggcgg
<i>CCL 23</i>	NM_005064	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 23	tccaagggcagtaacaagcatgagggcaggagaggg- cagccacggagacctctatc
<i>CCL 24</i>	NM_002991	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 24	aacaaagaacatgcagcaggagaggggatgacca- cagagcccgtagggatgatg
<i>CCL 25</i>	NM_005624	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 25	cagagggaggaccaactcaggtgcagggattaa- gacttgaccctaaagacagagg
<i>CCL 26</i>	NM_006072	Chemokin (C-C-Motiv) Li- gand 26	cccaaactcctctgctgatcccctttatgagactga- gacggccctggggct
<i>CXCL 1</i>	NM_001511	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 1	atgcaggattgaggcaagcttccgccattctt- gagtggtgctatgactcgggt
<i>CXCL 2</i>	NM_002089	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 2	tcctgttcttgtgaaaacatcaataatcga- aacctctctgcttaaacagagggaaactgcat
<i>CXCL 3</i>	NM_002090	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 3	gatacgtgataagcttcttactctctcctgt- cagttggtgctcccctgttca
<i>CXCR 4</i>	NM_003467	Chemokin (C-X-C-Motiv) Rezeptor 4	caacttaatacaagactgtacactgtaggtgctgaaat- caaccactcctgaaaactgaaaaacc
<i>CXCL 5</i>	NM_002994	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 5	aaactttacagcattatcaaggatattaagacaact- gactaacgggttccattaccgcatcttcccc
<i>CXCL 6</i>	NM_002993	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 6	tgacagataacggtatgacacaccagtggttctaata- cagtacaactaaatagcatccttagggta
<i>CXCL 9</i>	NM_002416	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 9	gtttccacatcctgcagaggctaactgggcaccaat- catgttccactaaccgac
<i>CXCL 10</i>	NM_001565	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 10	atggtgctgagactggaggttccctctgctgtaggctca- gaatatgtctaagcaat
<i>CXCL 11</i>	NM_005409	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 11	tggtgctgtgctgctactttagcttctgctcttctt- gaaggagtagaaatg
<i>CXCL 12</i>	NM_000609	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 12	gtggacacacatgatgatggatgagacagagaatgat- gagcagaacgtggaggat

<i>CXCL 13</i>	NM_ 006419	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 13	gaggtagagttcagactgagctctgagtcaggctcat- tagcagagtcagtttt
<i>CXCL 14</i>	NM_ 004887	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 14	atgcaatgctaagtgttctgacatgacatagcatataa- cacagcagtaacaatgcgccatatactgggg
<i>IL1A</i>	NM_ 000575	Interleukin-1 alpha	ctcaggcatctccttcagcagcactggttggtctt- catctgggcagtcacatac
<i>IL1B</i>	NM_ 000576	Interleukin-1 beta	taccctaaggcaggcaggtggcattggtgtagacaa- caggaaagtcaggctat
<i>IL1R1</i>	NM_ 000877	Interleukin-1 Rezeptor 1	ttagtggggacaataagtcaaaggaagttcacggg- gaactaggaatgtgtctct
<i>IL1R2</i>	NM_ 004633	Interleukin-1 Rezeptor 2	tccatttattcacttgggataggattgaaagttgatgat- gaggccatagcacagtcagaccatctgc
<i>IL2</i>	NM_ 000586	Interleukin-2	atggttgctgtctcatcagcatattcacacat- gaatgtgttccagatcccttagtccagaactatta
<i>IL6</i>	NM_ 000600	Interleukin-6	agttcatagctggctcctggaggcgagata- gagcttctcttccgtcccgggtg
<i>IL6R</i>	NM_ 000565	Interleukin-6 Rezeptor	cctgccttttgccaacctaaagatgagttgcctcaagcag- caatagggtctaaaatct
<i>IL8</i>	NM_ 000584	Interleukin-8	gagatggttctcctcgggtggttctctcctgctctgtccta- gaagctgtgtgc
<i>IL8RA</i>	NM_ 000634	Interleukin-8 Rezeptor A	ttgatctaactgaagcacccggccagggtgtgtccaacag- taggagctgcagtcagagatcagagt
<i>IL8RB</i>	NM_ 001557	Interleukin-8 Rezeptor B	tttcaacatcctaaacataaacctgtgccatta- aacctcacttcccagctccc
<i>IL10</i>	NM_ 000572	Interleukin-10	accgcccggcctagaaccaaatttaggtgttataaa- taacaagctggccacagc
<i>IL10RA</i>	NM_ 001558	Interleukin-10 Rezeptor A	cggacagtatctgcattctcccaggaccagcttgctaa- taccagcaaactgg
<i>IL10</i>	NM_ 000628	Interleukin-10 Rezeptor B	ctgtgtagcattgagctgaccaccctgagttgaggtc- gatttcagatcagtcacatcat
<i>IL11</i>	NM_ 000641	Interleukin-11	caftaaaagtcaccacaatcccactctctccttt- gacctggagacagtcattgtcaacatttggcgt
<i>IL11RA</i>	NM_ 004512	Interleukin-11 Rezeptor A	aaggaccacacacactccccaggcacctacata- catgcatgcagagaatacatgtccctgcctcacag
<i>IL12A</i>	NM_ 000882	Interleukin-12 alpha	agtcccactcttcttccccctcctagtcttaatcca- catctatcaaagttt
<i>IL12B</i>	NM_ 002187	Interleukin-12 beta	caggaaacaaatgtaatcactttacagagcgcacata- cactactaaaagtagcacctcatggagcca
<i>IL12RB1</i>	NM_ 005535	Interleukin-12 Rezeptor B1	tcttgaagtcactggttgatccactgc- caagtctcctccctcagggaact
<i>IL23</i>	NM_ 016584	Interleukin-23	tctgtcagcgcgtctctggttggtccctcagttgtacc- gagtttgaagc
<i>TNF</i>	NM_ 000594	Tumornekrosefaktor	aggctgtcactcggggttcgagaagatgatct- gactgcctgggcccagaggggctgattagaga
<i>TNFRSF1A</i>	NM_ 001065	Tumornekrosefaktor- Rezeptor Superfamilie 1A	cagaatttagtgatgtacaaaagtcacagctc- cagctgaaggccccattgtccgtgctcggcccctg
<i>TNFRSF1B</i>	NM_ 001066	Tumornekrosefaktor- Rezeptor Superfamilie 1B	caaacaggtttatgataagcaggaatgccgtccagca- tacagtgcaaacttcattgtc
<i>IFNA2</i>	NM_ 000605	Interferon-alpha 2	tctcatgattctgcttgacaacctcccaggca- caagggctgtatttctctct
<i>IFNG</i>	NM_ 000619	Interferon-gamma	attgggtacagtcacagttgcaacaatatttgaag- caccaggcatgaaatctcctgagatgctatgt
<i>LTA</i>	NM_ 000595	Lymphotoxin alpha	gcctcataaatagtcacctcctgctctagtcatccc- caagctcctcatgt
<i>LTB</i>	NM_ 002341	Lymphotoxin beta	caatattcacgcactcgcaccacgcactcatattccct- caccaccatcacggc
<i>NFKB1</i>	NM_ 003998	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in	tggccatatctagaggcgtggtccaggcacaactcct- catctctcctgcatt

		B-cells 1	
<i>NFKB2</i>	NM_002502	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	agccatcactggctctaaggaaggcagagaagcg-cagccgcactatactcagatc
<i>NFKBIA</i>	NM_020529	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	agggctgatcctaccacaataagacggtttgggctagg-cagtgtgcagtggtgat
<i>NFKBIL1</i>	NM_005007	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	cactgttacaactttcgctcccaccatctctctgct-gagcagcacctggctcttctgtgtgctcc
<i>NFRKB</i>	NM_006165	Nuclear factor related to kappaB binding protein	ctcctgttccttctcagccagagcagaccagg-catggctttcacggaagccat
<i>ICEBERG</i>	NM_021571	Caspase recruitment domain family, member 18	agtgtccagagttccatcttctcttagtgcaaac-catcttgaggcaagtt
<i>Dectin-1</i>	NM_197947	Dectin-1	ataactgatatactgctagaagttgagggtca-aatcgtggcaacacaccgtgcacttcaatggcattgtt
<i>DC-SIGN</i>	NM_021155	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	ctgtctccaagttggaggctggggcagatttatata-cagagggtagtgaggcatgatattggtgat
<i>HSP90AB1</i>	NM_007355	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	agaaaataaaataaaccacaatacacacatc-caatcctgtgtcaagagtagagaggggaatgggg
<i>HSPA8</i>	NM_006597	Heat shock 70kDa protein 8	ttagcagttcacaagcagtagcggaggcgtctta-cagctctctgttctactga
<i>ICAM1</i>	NM_000201	Intercellular adhesion molecule 1	tgcttgaggaccctgatcactgcaggaaactg-gagctgcaatagtgcaagctcccagtgaaatgcaaac
<i>HMOX</i>	NM_002134	Hämoxygenase	cctgttgcgctccatttctcctcgagggctgagtagt-gaagtaaagtgccgt
<i>TXN</i>	NM_003329	Thioredoxin	tctgctcaccatcttgctgtggtgagctgac-gagcggctgtaaggaccgatgg
<i>TOLLIP</i>	NM_019009	Toll interacting protein	tggagaagaatctacacaggcgtaagaccaggc-catctgagacagggaaatcca
<i>SOD1</i>	NM_000454	Superoxiddismutase 1	gtgtttaatgttatcaggatacatttctacagctagcag-gataacagatgagtaaggggcctcaga
<i>MPO</i>	NM_000250	Myeloperoxidase	gtcacatagctagcaagccacagagccaggattg-gaaccaggcagcttagtctcc
<i>MIF</i>	NM_002415	Macrophage migration inhibitory factor	ttgtccagcccacattggccgcttcatgtcgaatagtt-gatgtagaccctgt
<i>MYD88</i>	NM_002468	Myeloid differentiation primary response gene (88)	acacaggtgccaggcaggacatcgggtcagacaca-cacaactcagtcgatagt
<i>NCF-1</i>	NM_000265	Neutrophil cytosolic factor 1	ttgctttcatctgacagaaccac-caaccgctctcgctcttctacgacctccac
<i>PTX3</i>	NM_002852	Pentraxin 3	tctctcttcattagtctcaagtttcttattatgact-gagtttccagaccttccaactggcagtggt
<i>uPA</i>	NM_002658	Homo sapiens plasminogen activator, urokinase	cttgctgtttggagttagccttgagcgaccaggta-gacgatgtagtctcctt
<i>CSF2</i>	NM_000758	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	gcacaggaagttccgggggttgagggcagtgctgctg-tagtgctggccatca
<i>GSK3A</i>	NM_019884	Glycogen synthase kinase 3 alpha	tattgaacggaggtctgtacacaggcaaaccttactgtg-gaaactaagacatcaggagctcttccactc

Tabelle 8-2: Kontrollen (Housekeeping-Gene)

Gen	ID	Name/Funktion	Oligonukleotidsequenz
<i>ACTB</i>	NM_001101	Aktin B	gctcattgccaatggtgatgacctggccgtcagg-cagctcgtagctcttctccag
<i>ALAS</i>	NM_000688	Aminolevulinat Delta- synthase 1	gaatctagggtggagaagaagccactcatccatc-caggcaggaagactcttaggg
<i>ATP6V1A</i>	NM_001690	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	tatgaaactgtttaattggctccacttaggaccagacacagcacaataaatacagaactgcatcatc
<i>CD81</i>	NM_004356	CD81-Molekül	gtagggcctggtcatagaactgcttcacatccttggc-gatctggtcctgtgtgac
<i>EEA1</i>	NM_003566	early endosome antigen 1	caactgacagcgagggtgaagaagcttctaagattc-taaatggacaatgcgtggg
<i>GAPDH</i>	NM_002046	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	ggctctctcttctcttctgtgctctgtggtgggctggtgctc-aggggtcttact
<i>GOLGA4</i>	NM_002078	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	tgcagcacttctgactcaagcctatctccaatgcctt-taactcctcctttg
<i>MYO1C</i>	NM_033375	Myosin 1C	aaaggccctacatccttgagtggggccc-gagtgtgcgggcaagctgtctgtcatc
<i>NIPB</i>	NM_031466	Trafficking protein particle complex 9	ttgaactgtccactgaaatagccattcgtgg-cactcgccggcgtgcaggatga
<i>PECR</i>	NM_018441	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	agccactgctgtggcctctaccttacaataaataa-taaaatcttctgggagttcatgatccttagaa
<i>PSMA7</i>	NM_002792	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	tgcttcagactggcgatgtagcgggtagtgactcca-cagtgaccgggtcctcca
<i>USP49</i>	NM_018561	ubiquitin specific peptidase 49	cttgagggttacacaggttctactgtttctgcataaccaag-aaggaaactggggtgtgca
<i>ZNF710</i>	NM_198526	Zinkfingerprotein 710	tggggctctggctgtccaggccgatgtctatgacgc-catgcttgacctcatgtg

Tabelle 8-3: Kontrollen (*Aspergillus*-Gene)

Gen	ID	Name/Funktion	Oligonukleotidsequenz
<i>FKS1</i>	NC_007199	β -(1,3)-Glucansynthase	gcgacgtcctggcctctgagaacaacgatct-caatgctggtggattgccaatgtacaataccat
<i>SidA</i>	AY586511	L-ornithine N5-oxygenase SidA	atggcggatatcgtgtcacagggtccctcatgtctgctccgtctccggagttccaatcggtgtgtcag
<i>Rho1</i>	AY007297	Rho GTPase Rho1	accagttattggagacgcttatccggtgataaaatctcc-gaattgaaacagaccttttgcgaaggagacg

8.2 Abkürzungsverzeichnis

-	minus
+	plus
%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
Abb.	Abbildung
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Einheit: Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	Einheit: „colony forming units“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
Δ	Deletion
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	“fetal calf serum“
g	Einheit: Gramm

g	Einheit: Gravitation
h	Einheit: Stunde
HBSS	„Hank’s buffered salt solution“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O demin.	demineralisiertes Wasser
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
KaCl	Kaliumchlorid
Kap.	Kapitel
kDa	Einheit: Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Einheit: Liter
mg	Einheit: Milligramm
µg	Einheit: Mikrogramm
ml	Einheit: Milliliter
µl	Einheit: Mikroliter
min	Einheit: Minute
mM	Einheit: millimolar
µM	Einheit: mikromolar
MOI	Multiplicity of Infection
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Einheit: Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PBMCs	„peripheral blood mononuclear cells“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	Einheit: pondus Hydrogenii (pondus = Gewicht, hydrogenium = Wasserstoff)
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase „polymerase chain-reaction“
rpm	Einheit: „rounds per minute“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase „polymerase chain reaction“
s	Einheit: Sekunde

SD	„Standard defined“
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
SSC	„saline sodium citrate“
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheit: Unit
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

8.3 Publikationsliste

8.3.1 Veröffentlichungen

Oktober 2009:

A. Hornbach, A. Heyken, L. Schild, B. Hube, J. Löffler, O. Kurzai (2009)

The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protease Sap9 Modulates the Interaction of *Candida albicans* with Human Neutrophils. *Infect. Immun.* **77**: 5216-5224

November 2007:

I. Wozniok, A. Hornbach, C. Schmitt, M. Frosch, H. Einsele, B. Hube, J. Löffler, O. Kurzai (2008)

Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol.* **10**: 807-820

8.3.2 Kongressbeiträge

September 2009:

A. Hornbach, L. Schild, A. Albrecht, B. Hube, J. Löffler, O. Kurzai

Candida albicans induced apoptosis of neutrophils is mediated by the induction of reactive oxygen species and modulated by *SAP9* expression.

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) vom 3.9.2009 - 5.9.2009 (Köln)

September 2008:

A. Hornbach, Schild, L., Albrecht, A., Löffler, J., Hube, B., Kurzai, O.

The role of fungal secreted aspartic proteases in the interaction between *Candida albicans* and human neutrophils.

Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. vom 21.9.2008 - 24.9.2008 (Dresden)

A. Hornbach, L. Schild, A. Albrecht, J. Löffler, B. Hube, O. Kurzai

Die Protease *SAP9* beeinflusst die Interaktion zwischen *Candida albicans* und humanen neutrophilen Granulozyten.

Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) vom 4.9.2009 - 6.9.2008 (Jena)

Februar 2008:

A. Hornbach, L. Schild, A. Albrecht, J. Löffler, B. Hube, O. Kurzai

Mechanisms for killing of *Candida albicans* by human neutrophils.

Vortrag beim Workshop der DGHM - Fachgruppe "Eukaryontische Krankheitserreger" vom 14.2.2008 - 15.2.2008 (Würzburg)

8.4 Danksagung

Folgenden Personen möchte ich ganz besonders für das Gelingen dieser Arbeit danken:

Prof. Dr. Matthias Frosch für die Möglichkeit, in einem exzellent ausgestatteten Labor diese Arbeit durchführen zu können,

Prof. Dr. Oliver Kurzai und PD Dr. Jürgen Löffler für die kompetente Betreuung der Arbeit und die hervorragende Unterstützung,

Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg zu fungieren,

Prof. Dr. Bernhard Hube, Dr. Antje Heyken und Lydia Schild für die gelungene Kooperation und hilfreiche Tips,

Dr. Susanne Kneitz und Marga Göbel für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente,

Dr. Nicole Hauser für die hilfreiche Beratung bei der Auswahl und dem Design der Microarray-Oligonukleotide,

Helga Sennefelder und Nina Trzeciak für die hervorragende technische Assistenz,

Dr. Heiko Slanina, Stephanie Schielke, Ruth Bauer, Sabrina Hebling, Alexandra König und allen Flow-Benutzern für die unterhaltsamen Inkubationszeiten im Labor

Kerstin Epping, Dr. Gaby Gerlach, Dirk Radloff und Nadine Leitschuh für die seelische Unterstützung in puncto Arbeit und all die schönen Stunden außerhalb des Instituts,

Ferenc Kiss für die engagierte Hilfe bei Computerproblemen,

meinem Freund Dr. Daniel Schäfer für seine Fähigkeit, mich nach schlechten Tagen wieder aufzubauen und seinen unzerstörbaren Optimismus

meiner Familie und all meinen Freunden für den unermüdlichen Beistand, ihre Motivation und ihr Vertrauen.