



**Das pH-regulierte Protein 1 (Pra1) von *Candida albicans* moduliert
CD4⁺ T-Zell-Antworten der Maus *in vitro* durch direkte Bindung an die
T-Zell-Oberfläche**

—

**The pH-regulated protein 1 (Pra1) of *Candida albicans* modulates
mouse CD4⁺ T cell responses *in vitro* by directly binding to the
T cell surface**

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

Vorgelegt von

Arne Bergfeld

aus

Bünde

Würzburg, Juni 2018

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des *Promotionskomitees*:

Vorsitzender: Prof. Dr. Oliver Kurzai

1. Betreuer: PD Dr. Niklas Beyerdorf

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Kerkau

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 T-Zellen.....	1
1.2 <i>Candida albicans</i>	8
1.3 Immunabwehr gegen <i>Candida albicans</i>	9
1.4 Pra1 ist ein Immunevasionsmolekül von <i>C. albicans</i>	10
1.5 Ziel dieser Arbeit	13
2. MATERIAL & METHODEN	15
2.1 Material	15
2.1.1 Tiere	15
2.1.2 Rekombinantes Pra1, sezernierte Proteine von <i>C. albicans</i> und rekombinantes Aspf2	15
2.1.3 Antikörper.....	16
2.1.4 Kits.....	17
2.1.5 Puffer und Medien	17
2.1.6 Reagenzien	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Präparation von Lymphknoten und Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension	20
2.2.2 Zellkultur.....	20
2.2.3 Isolation von Lymphozyten aus der Lamina propria.....	26
2.2.4 Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie	26
2.2.5 Nachweis der Bindung des Pra1 an T-Zellen.....	27
2.2.6 Messung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen	28
2.2.7 Western Blot.....	29
2.2.8 Messung der Zinkkonzentration	32
2.2.9 Software	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens von rPra1	33
3.1.1 rPra1 bindet an CD4 ⁺ T-Zellen der Maus	33
3.1.2 Zn ²⁺ verstärkt die Bindung von rPra1 an Maus-CD4 ⁺ T-Zellen	34
3.1.3 Zum Nachweis von gebundenem rPra1 auf CD4 ⁺ T-Zellen ist eine Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml rPra1 nötig.....	37
3.1.4 Die Menge des an CD4 ⁺ T-Zellen der Maus gebundenen rPra1 steigt linear mit der Inkubationszeit und nimmt nach der Inkubation wieder ab.....	38
3.2 CD55 ist nicht der Ligand für rPra1 auf Maus CD4 ⁺ T-Zellen.....	40

3.3 Untersuchung des Bindungsverhaltens von wildtypischem Pra1	44
3.3.1 Lymphozyten aus <i>C. albicans</i> -infizierten Mäusen besaßen kein gebundenes Pra1 auf ihrer Zelloberfläche	44
3.3.2 Zellkulturüberstand von <i>C. albicans</i> -Kulturen zeigt im Western Blot ein Signal für Pra1 und bindet an CD4 ⁺ T-Zellen.....	50
3.4 Rekombinantes Aspf2 kann im Gegensatz zur rPra1 nicht an CD4 ⁺ T-Zellen binden.....	54
3.5 rPra1 hat einen kostimulatorischen Effekt auf CD4 ⁺ T-Zellen.....	56
3.6 rPra1 reduziert die Zytokinsekretion von CD4 ⁺ T-Zellen.....	61
3.7 Während der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Effektorzellen in vitro reduziert rPra1 die Zahl an IFN- γ -produzierenden T-Zellen.....	63
3.8 In CD4 ⁺ Th1-Zellen löst rPra1 keine Apoptose aus.....	64
4. DISKUSSION	69
4.1 Nachweis einer Bindung von Pra1 an CD4 ⁺ T-Zellen.....	69
4.2 Einflussfaktoren auf die Bindung von rPra1 an CD4 ⁺ T-Zellen.....	73
4.3 Bindung von wildtypischem Pra1 an CD4 ⁺ T-Zellen	75
4.4 Vergleich anderer fungaler sezernierter Proteine auf Bindungsfähigkeit an CD4 ⁺ T-Zellen.....	79
4.5 Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch Bindung von rPra1 an CD4 ⁺ T-Zellen	80
4.6 Beeinflussung der IFN- γ -produzierenden Zellen durch Bindung von rPra1 an CD4 ⁺ T-Zellen	82
4.7 Reduktion der Zytokinsekretion durch Bindung von rPra1 an CD4 ⁺ T-Zellen	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
5. SUMMARY	90
ABKÜRZUNGEN.....	92
DANKSAGUNG.....	94
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	95
AFFIDAVIT	95
LEBENS LAUF	96
PUBLIKATION.....	98
BIBLIOGRAFIE.....	99

1. EINLEITUNG

Der Mensch ist permanent einer Umwelt aus Mikroorganismen ausgesetzt. Wir sind sowohl auf unserer Körperoberfläche wie auch auf inneren Oberflächen mit residenten Mikroorganismen besiedelt. Die meisten dieser residenten Erreger verursachen keine klinisch sichtbare Erkrankung des Wirtes, besitzen aber die Fähigkeit, unter bestimmten Voraussetzungen den Wirt krank zu machen.

Es war Robert Koch, der 1876 als Erster beschrieb, dass kleine Erreger Krankheiten auslösen können. Bis dahin war nicht bekannt, wie es sein konnte, dass mehrere Individuen an gleichen Symptomen in kurzer Zeit verstarben. Es gelang ihm, *Bacillus anthracis* in vitro zu kultivieren und mit dem Erreger Versuchstiere zu infizieren [3]. Für diese Leistung wurde er später mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet und gilt heute als Vater der Bakteriologie.

Die residente Flora in und auf unserem Körper besteht aus Bakterien und Pilzen und dient der Kontrolle pathogener Erreger und auch dem „Training“ des Immunsystems. Sie ist unter normalen Umständen nicht pathogen. Sollte es aber zu einer Schwächung des Immunsystems kommen, können manche dieser Erreger eine Erkrankung des Wirtes auslösen. Erreger, die im physiologischen Zustand keine Infektion verursachen, aber bei einer Schwäche des Immunsystems eine Infektion auslösen können, nennt man fakultativ pathogene Erreger [4].

Das Immunsystem des Menschen ist es, das diese fakultativ pathogenen Erreger unter Kontrolle hält. Ist es jedoch zu einer Infektion gekommen, ist es ebendieses Immunsystem, das die Infektion anschließend bekämpft, eindämmt und im besten Fall beendet.

1.1 T-Zellen

Nachdem ein Erreger invasiv geworden ist, also eine mechanische Barriere unseres Körpers überschritten hat, kommt er in Berührung mit unserem Immunsystem. Dieses kann in zwei Grundtypen aufgeteilt werden: die angeborene und erworbene Immunität.

Die angeborene Immunität besteht zellulär aus Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und angeborenen lymphoiden

Zellen. Humoral wird die angeborene Abwehr gebildet durch das Komplementsystem, Zytokine und die natürlichen Antikörper.

Noch bevor Krankheitserreger allerdings mit dem Immunsystem in Kontakt kommen, müssen sie zuerst mechanische Barrieren überqueren. Erst wenn die Haut oder Schleimhaut überwunden ist, spricht man von einer invasiven Infektion. Auch die Zellen der Epithelien sind durch Produktion von antimikrobiellen Peptiden an der Immunabwehr beteiligt.

Die angeborene Immunität stellt die erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger dar und ist bereits zur Geburt vorhanden. Ohne Zeitverzögerung setzt diese Form der Abwehr ein und bekämpft die Erreger. Allerdings sind die Zellen der angeborenen Immunität nicht in der Lage, alle Formen von Krankheitserregern zu bekämpfen und alle Infektionen so zu beenden.

Die angeborene Immunität richtet sich gegen Strukturen, die auf vielen Krankheitserregern in gleicher Art und Weise vorkommen. Diese sogenannten „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMP) sind entwicklungs-geschichtlich alte, konservierte Oberflächenstrukturen. PAMPs binden an Pathogen-Recognition-Receptors (PRR) auf den Zellen der angeborenen Immunität. Bindung an PRR aktiviert erste Immunmechanismen und führt zur Freisetzung von Zytokinen und Phagozytose. Eine Gruppe der PRR stellen die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like Receptor, TLR) dar [5].

Es sind vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die nach eingedrungenen Erregern suchen. Finden sie ein Pathogen, erkennen sie es über ihre PRR und fressen es [6].

Um im Körper zu überleben, haben Pathogene allerdings Mechanismen entwickelt, um vom Immunsystem nicht angegriffen zu werden oder um sich zu wehren gegen den Angriff. Diese Mechanismen der Pathogene nennen wir Immunevasion. Manche Erreger können zwar von Zellen der angeborenen Immunität phagozytiert werden, überleben aber dann innerhalb dieser Zellen. Prominente Beispiele für Pathogene, die diese Form der Immunevasion durch ihre dicke Zellwand beherrschen, sind Mykobakterien [7]. Andere Erreger sorgen dafür, dass sie von der angeborenen Immunität nicht oder nur schlecht erkannt

werden. Ein Beispiel sind Influenza-Viren, die in ihrem Infektionsablauf für die Produktion von Proteinen sorgen, die die Sekretion von Interferon α (IFN- α) reduzieren und über diesen Weg die Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren in Immunzellen senken. So stehen weniger PRR zur Verfügung, um virale DNS zu erkennen und eine Entzündungsreaktion auszulösen [8]. Zusätzlich ändern Influenza-Viren schnell ihre Oberflächen-Strukturen, was zu immer neuen Serovaren und damit zu neuen Infektionswellen führt [9].

Einzig die angeborene Immunabwehr wäre also nicht ausreichend, um die Abwehr gegen alle Krankheitserreger in unserer Umwelt zu gewährleisten, da so nicht alle Infektionen beendet werden könnten. Es würden, aufgrund der begrenzten Spezifität der PRR, überhaupt nur definierte Pathogene bekämpft werden. Neue und dem Organismus unbekannte Antigene würden nicht erkannt. Zudem ist diese Art der Immunabwehr relativ primitiv und weist keine Gedächtnisfunktion auf. Einmal durchgemachte Infektionen führen im Ablauf der angeborenen Immunabwehr bei erneuter Erkrankung durch den gleichen Erreger zu dem gleichen Ablauf der Immunreaktion. Eine schwere durchlebte Erkrankung würde so bei erneuter Infektion zu einer ebenso schweren Erkrankung führen.

Abweichend von dieser lange Zeit geltenden Regel fanden sich in letzten Jahren Hinweise, dass auch die Zellen der angeborenen Immunität in der Lage sind, eine gewisse Form des Gedächtnisses zu entwickeln. So sind Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen in der Lage, nachdem sie einem Pathogen begegnet sind, ihre funktionellen Eigenschaften, beispielsweise durch Modifikationen an Histonen, zu verändern. Diese Vorgänge werden bezeichnet als „Trained Immunity“, also trainierte Immunität [10].

Zur Überwindung dieser Nachteile der angeborenen Immunität bildet die erworbene Immunität den zweiten Schenkel im Immunsystem. Auch hier gibt es eine humorale Abwehr, die Antikörper, und eine zelluläre Abwehr, die Lymphozyten. Die Lymphozyten gliedern sich auf in B- und T-Lymphozyten. Beide richten ihre Abwehr gegen bestimmte Strukturen: die Antigene. Ein Antigen ist eine Struktur, die durch Antikörper, B- oder T-Zellrezeptoren gebunden werden kann. Antigene können gebildet werden durch Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide.

Der Vorgang der Erkennung des Antigens unterscheidet sich jedoch grundlegend zwischen B- und T-Zellen. Die Rezeptoren auf den Zellen sind zudem unterschiedlich aufgebaut.

B-Zellen tragen einen B-Zellrezeptor, der einem membranständigen Antikörper gleicht. Über diesen Rezeptor können B-Zellen gelöste Antigene erkennen, die der B-Zelle begegnen. Für die vollständige Aktivierung der B-Zellen ist nach Antigen-Erkennung oft T-Zellhilfe notwendig. Es gibt Antigene, die jedoch auch T-Zell-unabhängig zur B-Zellaktivierung führen können [11].

Aktiviert B-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen, die Antikörper produzieren. Als im Blutplasma gelöste Proteine werden Antikörper im Körper verteilt und binden an ihr Antigen. Eine solche Bindung des Antikörpers an das Antigen führt zur Bekämpfung der „markierten“ Zellen durch Lyse der Zelle durch das Komplementsystem [12] oder zum Zellangriff auf solche opsonisierte Zellen durch NK-Zellen (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity, ADCC) [13].

T-Zellen erkennen das Antigen nur innerhalb eines Major Histocompatibility Complex-Moleküls (MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex). Diese MHC-Komplexe sind Proteine der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (Antigen-Presenting Cells, APC). Die Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen besteht vor allem aus dendritischen Zellen und B-Zellen. Beide dieser Zelltypen können phagozytierte Proteine verdauen und Teile der Proteine auf ihrer Zelloberfläche in dem MHC-Molekül an Lymphozyten präsentieren [14].

Der TCR erkennt Peptid-MHC (pMHC), also das prozessierte Peptid im präsentierenden MHC-II-Molekül. Durch unterschiedliche MHC-Moleküle können körpereigene und körperfremde Antigenen gebunden werden [15].

Der T-Zellrezeptor selbst kann keine Signal-Kaskade aktivieren, sondern benötigt den CD3-Komplex um den Signalweg nach Bindung an das Antigen auszulösen. Dieser Komplex besteht aus drei Dimeren: einem CD3 $\epsilon\gamma$ -Dimer, einem CD3 $\epsilon\delta$ -Dimer und einem CD3 $\zeta\zeta$ -Homodimer [16]. Als Korezeptor benötigt der TCR das Oberflächenprotein CD4 oder CD8. Diese binden an MHC Klasse II (bei CD4⁺ T-Zellen) bzw. an MHC Klasse I (bei CD8⁺ T Zellen) [17].

Zur Aktivierung von T-Zellen werden zwei Signale benötigt: eine Stimulation über den T-Zellrezeptor und eine Kostimulation über das Oberflächenprotein CD28 [18]. Die Kostimulation über das Oberflächenmolekül CD28 wird ebenfalls von der antigenpräsentierenden Zelle zur Verfügung gestellt. Es handelt sich entweder um den Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86). Sind erstes und zweites Signal vorhanden, ist die Stimulation der T-Zelle voll ausgeprägt und es kommt zur vollständigen T-Zellaktivierung.

Unter den T-Zellen unterscheidet man die $\alpha\beta$ -T-Zellen, die eine α - und eine β -Kette tragen und damit den T-Zellrezeptor (T Cell Receptor, TCR) bilden und die $\gamma\delta$ -T-Zellen, die analog dazu eine γ - und eine δ -Kette besitzen. Da diese $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren jedoch invariabel sind und nur wenige und immer gleiche Antigene erkennen, zählen diese Zellen zur angeborenen Immunität [19, 20]. Zahlenmäßig überwiegen im menschlichen Organismus die $\alpha\beta$ -T-Zellen und es sind auch diese Zellen, die an der Abwehr gegen Pilze beteiligt sind, sodass im Folgenden, wenn von T-Zellen gesprochen wird, es sich stets um $\alpha\beta$ -T-Zellen handelt.

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten können in mehrere Untergruppen eingeteilt werden anhand ihrer Oberflächenstrukturen. Diese „Cluster of Differentiation“ (CD) bestehen aus Proteinen der Zelloberfläche, die spezifisch sind für eine Zelluntergruppe. T-Zellen tragen entweder das Oberflächenprotein CD4 oder CD8, die beiden zahlenmäßig wichtigsten T-Lymphozytengruppen sind $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. $CD8^+$ T-Lymphozyten dienen der Abwehr von Viren bzw. der Lyse Virus-befallener Zellen [21]. Sie erkennen infizierte Zellen durch präsentierte Virenantigene in MHC-I-Molekülen. Diese MHC-I-Proteine werden von allen zellkernhaltigen Zellen exprimiert und bei Infektion der Zelle präsentiert die Zelle im MHC-I-Molekül an ihrer Zelloberfläche Peptide des Pathogens. $CD8^+$ T-Zellen erkennen das fremde Peptid und die Zelle somit als krank, die T-Zellen werden aktiviert durch Stimulation des T-Zellrezeptors und leiten Effektormechanismen ein. Ziel ist die Abtötung der infizierten Zelle, was durch Degranulation von toxischen Granula aus $CD8^+$ T-Lymphozyten geschieht. Diese Granula enthalten u.a. Granzyme und Perforin [22].

Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen werden üblicherweise die konventionellen T-Zellen (T_{kon}) von den regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) unterschieden.

Regulatorische T-Zellen (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺) sorgen dafür, dass die Immunantwort in ihrer Intensität nicht überschießt und verhindern Autoreaktivität [23, 24].

Die konventionellen CD4⁺ T-Zellen besitzen verschiedene Funktionen. Ihnen allen ist gemein, dass sie Helferfunktionen bei der Immunabwehr erfüllen, weshalb sie auch T-Helferzellen genannt werden. Sie verstärken die Effektorfunktionen der Zellen der angeborenen Immunität und helfen Infektionen zu bekämpfen, die die angeborene Immunität allein nicht bewältigen könnte. Außerdem helfen CD4⁺ T-Zellen mit ihrem Oberflächenprotein CD40L den CD8⁺ T-Zellen zur verstärkten Expansion [25] und B-Zellen zum Immunglobulinklassen-Switch [26]. Nach ihren Funktionen werden CD4⁺ T-Lymphozyten wiederum in Untergruppen eingeteilt.

Zahlenmäßig kleine Populationen innerhalb der T-Zellen bilden außerdem die NK-T-Zellen. Zusammen mit den $\gamma\delta$ -T-Zellen werden diese Zellen zu den unkonventionellen T-Zellen gerechnet.

Die NK-T-Zellen tragen einen invariablen TCR, der in CD1d-Molekülen präsentierte Lipide erkennt. Diese Lipide können beispielweise von Bakterien stammen. Nach Aktivierung über den TCR produzieren die Zellen große Mengen an Zytokinen [27].

Nach Aktivierung einer naiven CD4⁺ T-Zelle entstehen T-Effektorzellen. Diese erfüllen Effektorfunktionen, wie beispielsweise die Abwehr einer bakteriellen Infektion. Aus diesen T-Effektorzellen können im Anschluss an das Ende einer Infektion Gedächtnis-T-Zellen entstehen, indem spezifische T-Zellen nach Ende der Infektion nicht zugrunde gehen. Kommt es erneut zur Infektion durch den Krankheitserreger, existieren diese spezifischen Gedächtnis-T-Zellen bereits, teilen sich wieder und können die Infektion schnell beenden [28].

Die Subtypen der CD4⁺ T-Helferzellen entstehen aus naiven CD4⁺ T-Zellen und bilden verschiedene Arten von T-Effektorzellen. Während der Aktivierung der konventionellen naiven CD4⁺ T-Zelle durch die Bindung ihres Antigens im MHC-

Komplex und dem Kostimulus (2. Signal) lenken Zytokine der antigen-präsentierenden Zelle das Schicksal der Differenzierung der T-Helferzelle. Ist beispielsweise im Prozess der Aktivierung IL-12 vorhanden, differenziert die naive CD4⁺ T-Zelle zu einer Th1-Zelle [29].

Weitere wichtige Untergruppen der T-Helferzellen sind Th2- und Th17-Zellen. Aktivierte naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren zu Th2-Zellen unter der Einwirkung von IL-4 oder durch TGF-β und IL-6 zu Th17-Zellen [2] (Abb. 1).

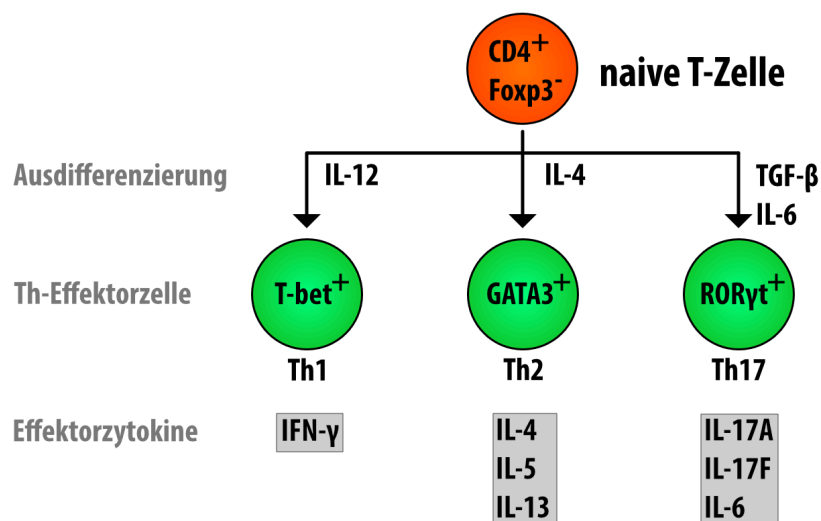


Abbildung 1: Differenzierung der T-Helferzell-Subpopulationen

Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren nach Aktivierung gesteuert durch Zytokine („Ausdifferenzierung“) in die verschiedenen Untergruppen. Bei der Differenzierung werden die phänotypischen Transkriptionsfaktoren der Effektorzellen (dargestellt in „Th-Effektorzelle“) exprimiert. Die differenzierten Zellen produzieren die phänotypischen Zytokine („Effektorzytokine“). Vgl. Review in Cretney et al., 2012 [2].

CD4⁺ Th2-Zellen erfüllen Aufgaben im Bereich der Abwehr von Wurminfektionen und tragen bei zu allergischen Hypersensitivitätsreaktionen, wie beispielsweise Asthma bronchiale. Effektorzytokine dieser Zellen sind IL-4, IL-5 und IL-13 [30].

Die CD4⁺ Th1-Zellen dienen der Aktivierung von Makrophagen. Manche Pathogene können von Makrophagen erst zerstört werden, nachdem diese durch Th1-Lymphozyten aktiviert wurden. Diese Erreger besitzen eine starke Zellwand oder andere Mechanismen, um dem Verdau in Lysosomen zu entgehen. Hierzu gehören Mykobakterien [31] und Pilze [32]. *Candida albicans*-Hefen können zwar

in Phagosomen der Makrophagen aufgenommen werden, jedoch werden sie dort nicht zerstört. Die Erreger würden sich in den Makrophagen weiter vermehren, schlussendlich zur Lyse der Makrophagen führen und die infektiöse Beladung der Phagosomen freisetzen. Die Infektion kann so ohne die Hilfe der T-Zellen nicht beendet werden [33].

Der Hauptmechanismus bei der Aktivierung von Makrophagen durch Th1-Lymphozyten ist die Sekretion von Zytokinen, allen voran das Interferon γ (IFN- γ). Dieses Zytokin wird unter anderem durch Th1-Zellen sezerniert und aktiviert in Zielzellen bestimmte Effektormechanismen [34].

1.2 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein Hefepilz, der ubiquitär in der Umwelt vorkommt und auch die Schleimhäute im Mund, Magen-Darm-Trakt, Urogenitaltrakt und die Haut besiedelt [35]. Die Mehrheit der Menschen ist mit dem Pilz besiedelt [36]. Der Pilz weist einen Polymorphismus auf, d.h. er kann seine äußere Form wechseln von der Hefeform zu einem Pseudomyzel. *C. albicans* ist die medizinisch relevanteste Spezies der Hefen [37].

Bereits bei geringer Immunschwäche kann sich der Pilz ausbreiten. Ausgelöst werden kann das Pilzwachstum durch eine vorübergehende oder persistierende Immunsuppression, beispielsweise durch eine Infektion mit dem HI-Virus oder durch die Immunschwäche bei Diabetes mellitus [38]. Ein Soor in der Speiseröhre oder im Mund-Rachen-Raum ist oft ein erstes Zeichen einer gestörten Immunabwehr. Eine solche Infektion, die ausbricht durch ein Nachlassen des Immunsystems, nennt man opportunistische Infektion.

Risikofaktoren für opportunistische Candidose sind Schwächung oder Verletzung mukosaler Barrieren, Malfunktion neutrophiler Granulozyten, metabolische Erkrankungen und ein Lebensalter größer 70 Jahre bzw. kleiner 1 Jahr [39]. Unter allen HIV-infizierten Patienten leiden 50% an einem oropharyngealen Soor und sogar mehr als 90%, sobald die CD4-Zellzahl unter 200/ μ l abfällt [40].

Opportunistische lokale Infektionen mit *C. albicans* stellen in aller Regel für den Patienten keine gefährliche Situation dar, weil sie sich nicht im Körper ausbreiten. Sie erzeugen keine systemische Erkrankung oder gar Sepsis, sondern „nur“ lokale

Beschwerden (die jedoch für den Patienten durchaus als stark belastend erlebt werden können).

Bei einem Polytrauma beispielsweise, das mit einem Aufenthalt auf der Intensivstation einhergeht, kann das Immunsystem durch den Stress des Traumas so stark geschwächt sein, dass die Infektion bis zur invasiven Infektion mit Sepsis (Candidämie) voranschreitet. Risikofaktoren für eine Candidämie sind u.a. antibiotische Therapie, Chemotherapie, invasive Katheter, Neutropenie und Operationen [39]. Eine solche Candidämie ist medikamentös nur schwer zu behandeln und hatte in den 80er Jahren eine Letalität von bis zu 75% [41] und durch verbesserte Therapie mit Antimykotika lag die Letalität 2003 bzw. 2005 etwa bei 15-50% [42, 43]. *C. albicans* ist der vierthäufigste Erreger einer Sepsis in den USA (10% aller Septitiden) [39, 44] und der häufigste Pilz als Ursache einer Infektion [45]. In Europa belegt *Candida* den 7. Platz der häufigsten Erreger einer Sepsis und bei zwei Drittel der invasiven Candidosen ist *C. albicans* der Verursacher [46].

1.3 Immunabwehr gegen *Candida albicans*

Bei Infektionen durch Pilze beginnt die zelluläre Immunabwehr durch den Angriff neutrophiler Granulozyten und Makrophagen. Diese Zellen können Pilzzellen teilweise phagozytieren oder setzen lysosomale Enzyme oder oxidative Mediatoren wie H₂O₂ frei. Auch Zellen der erworbenen Immunität sind an der Abwehr gegen Pilze beteiligt. B-Zellen produzieren Antikörper, die manche Pilze, wie auch *C. albicans*, opsonisieren können [47].

T-Helferzellen (Th-Zellen) sind in der Lage, den Verdau der *C. albicans*-Zellen in den Zellen der angeborenen Immunität zu stärken. Dies geschieht vor allem durch Th1- und Th17-Zellen. Depletierung von CD4⁺ T-Helferzellen im Tierversuch führt zu einer geringeren Chance, die Infektion zu überleben [48].

Th17-Zellen, die in vitro durch IL-6 und TGF-β1 erzeugt werden [49], sezernieren wie Th1-Zellen bei Infektionen durch *C. albicans* Interferone, um Makrophagen voll zu aktivieren [50]. Th1-Zellen sind zahlenmäßig den Th17-Zellen überlegen.

Candida albicans ist ein fakultativ pathogener Erreger. Sobald er sich in das Gewebe des Wirtes ausdehnt, wird die Infektion invasiv. Die Dissemination im

Organismus geschieht durch die runde Hefeform, welche apathogen ist [51]. Im Zuge der Invasivität bildet der Hefepilz dann sog. Pseudohyphen oder echte Hyphen [52], welche die pathogene Form von *C. albicans* darstellen.

Sobald der Pilz die epitheliale Barriere überwunden hat, wird er vom Immunsystem erkannt. Die angeborene Immunität erkennt das β -Glucan der fungalen Zellmembran als fremd. Im humanen System ist es der PRR Dectin-1, der das β -Glucan bindet. Aber der Pilz hat hier einen Abwehrmechanismus entwickelt, um der Immunabwehr zu entkommen: Mannan in der Pilz-Zellmembran kann das β -Glucan abschirmen und so vor der Bindung an den PRR schützen. Die angeborene Immunität wird so weniger stark aktiviert [53].

Bei der chronischen mukokutanen Candidose (CMC) handelt es sich um ein Krankheitsbild, das durch einen angeborenen Immundefekt der T-Zellen entsteht, beispielsweise im Rahmen des seltenen Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) Syndroms. Weil die Betroffenen eine reduzierte Zahl an Th1-Zellen besitzen, entsteht ein Mangel an Typ 1-Zytokinen wie IFN- γ , IL-12 und IL-2. Durch diesen Mangel kann die Hefe nicht mehr „in Schach gehalten“ werden und es kommt zu chronischen Infektionen im Gastrointestinaltrakt dieser Patienten [54].

1.4 Pra1 ist ein Immunevasionsmolekül von *C. albicans*

Um die Immunabwehrhürden zu meistern und die invasive Infektion voranzutreiben, hat der Pilz Mechanismen entwickelt. Vor einigen Jahren wurden Proteine entdeckt, die *C. albicans* produziert und die sowohl auf der Oberfläche der Zellmembran gebunden vorliegen als auch in das umgebende Milieu sezerniert werden. Das erste dieser Proteine war das pH-Regulated Protein 1 (Pra1) [55, 56]. Alternative Namen des Moleküls sind CRASP2 (Complement regulator acquiring surface protein 2) oder Fbp1 (Fibrinogen-binding protein 1) [41].

Pra1 wird von *C. albicans* nur sezerniert, solange der pH des Mediums über 6,0 liegt. Diese Eigenschaft verlieh ihm ursprünglich seinen Namen. Das Protein ist 299 Aminosäuren lang und stark glykosyliert [56]. Im glykosylierten Zustand ist das Mannoprotein, also eine Proteinverbindung, die zu großen Teilen aus Mannose besteht [57], 58 kDa groß [58].

Das sezernierte Pra1 bindet an CR3 (auch bekannt als CD11b/CD18-Integrin oder Mac-1), das auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen vorkommt. Dieser Rezeptor dient zur Erkennung von Pathogenen und kann die Zellen der angeborenen Immunität im Sinne eines Chemoattraktants lenken. Die Bindung von gelöstem Pra1 an CR3 jedoch schützt den Pilz vor der Immunabwehr [59]: Neutrophile Granulozyten können *C. albicans* weniger effektiv abtöten nach der Bindung von löslichem Pra1 an CR3, da der Rezeptor dann für die Erkennung von membranständigem Pra1 durch CR3 blockiert ist. Dadurch wird die Sauerstoffradikalfreisetzung und die Degranulation der neutrophilen Granulozyten reduziert. Membran-gebundenes Pra1 dient der Bindung von Leukozyten an *C. albicans*, gelöstes Pra1 hingegen fungiert als Schutz des Pilzes vor Immunzellen und kompetiert mit membranständigem Pra1 auf den Hyphen [59].

Dass Pra1 mit der Pathogenität fungaler Infektionen assoziiert sein könnte, legt die Entdeckung nahe, dass Pra1 auf den als pathogen definierten Hyphen verstärkt exprimiert wird im Vergleich zur Hefe-Form [60].

Neben der Bindung an Immunzellen besitzt Pra1 weitere Funktionen, die direkt auf das Komplementsystem wirken. Luo et al. beschrieben 2009, dass Pra1 ebenfalls Einfluss auf das Komplementsystem hat. Auf der Pilzzelle gebundenes Pra1 bindet seinerseits Faktor H, Factor H-like 1 Protein (FHL-1), C4BP und Plasminogen, ohne diese durch die Bindung an das Pra1 in ihrer funktionellen Aktivität zu stören. Faktor H und FHL-1 hemmen die C3-Konvertase (C3bBb) und fördern den Abbau von aktivem C3b (als Teil der C3-Konvertase) zu iC3b. C4BP bindet C3b und fördert den Abbau des C3-Konvertase-Komplexes. Durch die Hemmung der C3-Konvertase wird die Entstehung des Komplement-Lyse-Komplexes verhindert und auch dies ist ein Mechanismus, um dem Angriff des Immunsystems zu entkommen. Plasminogen kann weiterhin durch Plasminogenaktivatoren zu Plasmin gespalten werden und degradiert anschließend Fibrinogen als Teil des umgebenden Gewebes des Wirtes (Abb. 2) [41, 60].

Durch die Inhibition der Komplementkaskade entstehen außerdem weniger Anaphylotxine C3a und C5a [41]. Davon unabhängig kann Pra1 direkt an das

Komplementprotein C3 in Lösung binden und so auch unabhängig von Faktor H die Entstehung von aktiviertem C3a verhindern und die Komplement-Kaskade aufhalten [61].

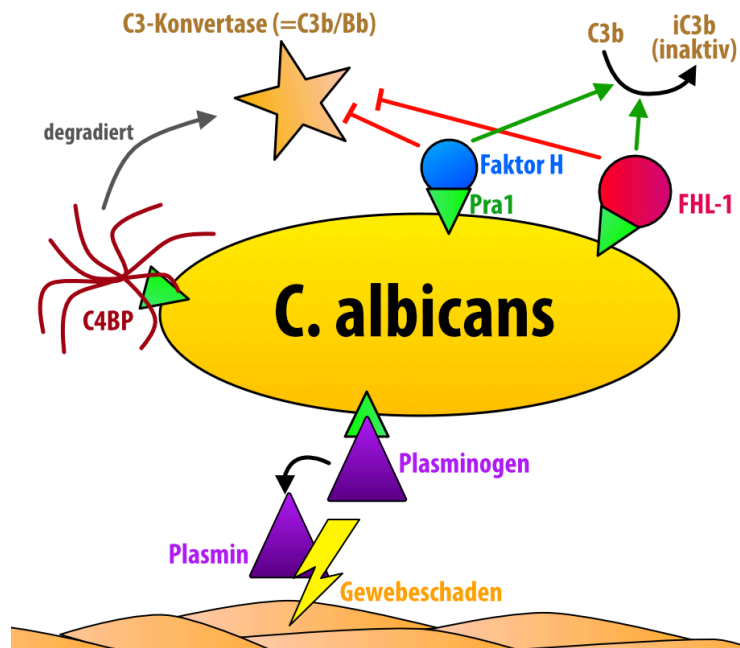


Abbildung 2: gebundenes Pra1 hemmt die Komplementkaskade und fördert die Degradierung des Wirtsgewebes

Pra1 an der Pilzmembran bindet Faktor F und Faktor H-like 1 Protein, welche die C3-Konvertase hemmen. Der Fortgang der Komplementkaskade wird so gehemmt. C4BP fördert die Degradierung der C3-Konvertase. Außerdem bindet Pra1 an Plasminogen, was nach Aktivierung zu Plasmin das Gewebe um den Pilz herum schädigt.

Sezerniertes Pra1 kann an die Pilzmembran binden über den Zink-Kotransporter Zrt1, sodass das Pra1 nachdem es sezerniert wurde zum Pilz zurückkehren kann. Pra1 selbst hat mehrere Zink-bindende Motive in seiner Proteinstruktur und Citiulo et al. konnten 2012 zeigen, dass Pra1 in vitro Zink bindet [62]. Pra1 ist funktionell als „Zinkophor“ beschrieben: Zink ist als Spurenelement wichtig für das Wachstum der Pilze. Um sich aus dem Wirt Zink zuzuführen, sezerniert *C. albicans* Pra1 in die Zellumgebung und dieses gelöste Pra1 bindet an Zink. Zink-beladenes Pra1 bindet an der Pilzmembran und die Hefe kann das Zink aus dem gebundenen Pra1 für ihren eigenen Stoffwechsel verwenden [62].

Für die Bindung von Pra1 an T-Zellen zeigen unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Peter Zipfel (Hans-Knöll-Institut, Jena), dass rekombinantes Pra1 an humane T-Zellen binden kann. Die Funktion dieser Bindung ist jedoch unbekannt. Die Immunabwehr gegen Pilze ist, wie bereits beschrieben, auf die erworbene Immunabwehr und hier vor allem die T-Zellen angewiesen. Es wäre denkbar, dass eine Bindung von Pra1 an T-Zellen eine vorteilhafte Funktion für *C. albicans* hat. Beispielsweise könnte die Effektorfunktion der T-Zellen durch die Bindung von Pra1 beeinflusst werden.

1.5 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Pra1 auf CD4⁺ T-Zellen von Mäusen untersucht, um den Einfluss von Pra1 auf das erworbene Immunsystem zu beschreiben. Ziel war die Charakterisierung der Bindung von Pra1 an T-Zellen im Maus-System als Modell-Organismus, nachdem humane CD4⁺ T-Zellen eine Bindung an Pra1 gezeigt hatten.

Wünschenswert wäre eine genaue Kenntnis des Effekts von Pra1 im humanen und Maus-System. Eine Bindung von Pra1 an T-Zellen sollte untersucht werden und wenn eine solche gefunden würde, sollte der in den CD4⁺ T-Zellen durch die Bindung ausgelöste Effekt charakterisiert werden. Vorstellbar wäre, dass Proteine, die von dem Pathogen *C. albicans* sezerniert werden, einen Vorteil für das invasive Wachstum der Hefen haben und damit zur Pathogenität und Letalität der Candidämie beitragen (Abb. 3).

Die Einschätzung des pathogenen Effekts von Pra1 im humanen System würde helfen zu entscheiden, ob Pra1 ein potenzielles Ziel in der Therapie der Candidämie sein könnte.

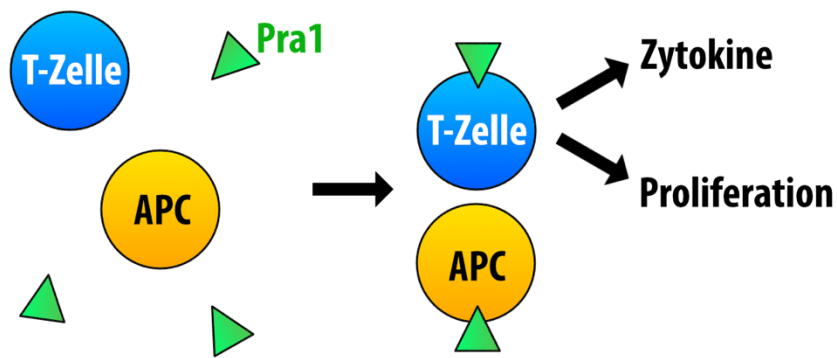


Abbildung 3: Untersuchung des Einflusses von Pra1 auf CD4⁺ T-Zellen

Bekannt ist bisher im Maus-System, dass Pra1 an Antigen-präsentierende Zellen (APC) binden kann. Ob auch T-Zellen das Pra1 binden können und ob diese Bindung Einfluss hat auf Effektorfunktionen (wie die Zytokinproduktion) oder Zellteilung wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

In einem zweiten Schritt könnte dann der Versuch unternommen werden, den untersuchten Effekt von Pra1 durch Antikörper gegen Pra1 zu unterbinden.

Durch die zielgerichtete Therapie mit dem potentiellen pharmakologischen Angriffspunkt des Pra1 könnte ein neuer therapeutischer Ansatz der Candidämie gefunden werden, um die bisweilen sehr ungünstige Prognose dieses drastischen Krankheitsgeschehens zu verbessern.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Alle verwendeten Mäuse entstammten der Hauszucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie, Würzburg. Wildtyp-Mäuse (WT) und OT-II-Mäuse [63] besaßen einen C57BL/6-Hintergrund.

CD55^{-/-} C57BL/6-Mäuse [64] wurden bezogen von der Universität Cardiff, Vereinigtes Königreich (B. Paul Morgan und Timothy R. Hughes). Fortgezüchtet wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Virologie und Immunbiologie, Würzburg.

Das Alter der verwendeten Tiere betrug zwischen 6 und maximal 20 Wochen.

In-vivo-Experimente mit *C. albicans*-infizierten Mäusen wurden durchgeführt mit BALB/c-Mäusen am Hans-Knöll-Institut, Jena.

2.1.2 Rekombinantes Pra1, sezernierte Proteine von *C. albicans* und rekombinantes Aspf2

Rekombinantes Pra1 wurde zur Verfügung gestellt durch die Arbeitsgruppe von Prof. Peter Zipfel am Hans-Knöll-Institut, Jena. Exprimiert wurde es in *Pichia pastoris* und nach Sekretion aufgereinigt über den His-Tag [60].

Ebenso wurde rekombinantes Aspf2 durch die gleiche Gruppe zur Verfügung gestellt. Es wurde auch in *Pichia pastoris* exprimiert und über einen His-Tag aufgereinigt [65].

Auch Überstände von wildtypischen *C. albicans* (Stamm SC5314) und Pra1-KO-Pilzkulturen wurden von der Gruppe bezogen. Die Kulturen wurden in YPD-Medium (2% Glucose, 2% Pepton, 1% Hefe-Extrakt) bei 30°C gezüchtet. Die Hefezellen wurden zentrifugiert und 100 ml des Kulturüberstandes wurden auf 2 ml konzentriert durch Zentrifugation in Amicon Ultra15 10 kDa-Säulen (Millipore).

2.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur Färbung am Durchflusszytometer				
Antigen	Konjugierung	Klon	Hersteller	Produkt- Nummer
CD3 (Maus)	PerCP	145-2C11	BioLegend	100326
	unkonjugiert	145-2C11	BioLegend	100331
CD4 (Maus)	AlexaFluor647	RM4-5	BioLegend	100530
	PacificBlue	RM4-5	BioLegend	100531
CD25 (Maus)	FITC	7D4	BD Pharmingen	553942
	Biotin	7D4	BD Pharmingen	553070
CD28 (Maus)	unkonjugiert	E18	Exbio Antibodies	LOT 514337
CD55 (Maus)	unkonjugiert	RIKO-3	BioLegend	131802
CD69 (Maus)	PE	H1.2F3	BD Bioscience	553237
Fas (Maus)	unkonjugiert	Jo2	BD Bioscience	554254
Foxp3 (Maus/Human)	PE	3G3	Miltenyi Biotec	130-093-014
Gata3 (Maus/Human)	eFluor660	TWAJ	eBioscience	50-9966-41
IFN- γ (Maus)	AlexaFluor488	XMG1.2	BioLegend	505813
IgG (Hamster)	FITC	polyklonal aus Ziege	Jackson ImmunoResearch	127-095-160
IgG (Kaninchen)	PE	polyklonal aus Esel	Jackson ImmunoResearch	711-116-152
IgG (Maus)	FITC	polyklonal aus Ziege	Jackson ImmunoResearch	115-095-166
IL-4 (Maus)	PE	11B11	BioLegend	504104
	unkonjugiert	polyklonal	R&D Systems	AB-404-NA
Streptavidin	PerCP	-	BioLegend	405213
T-bet (Maus/Human)	PerCP-Cy5.5	eBio4B10	eBioscience	45-5825-82

2.1.4 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits		
Kit-Bezeichnung	Hersteller	Produkt-Nummer
BD Calibrate unlabeled beads	BD Pharmingen	349502
LD-Collums for purification	Miltenyi Biotec	130-042-901
LegendPlex Multi Analyte Flow Assay Kit	BioLegend	740150
MagniSort Mouse CD4 T Cell Enrichment Kit	eBioscience	8804-6821-74

2.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien	
Bezeichnung	Zusammensetzung
0,1 M NaHCO₃-Puffer	- Na ₂ CO ₃ 1,59 g/l - NaHCO ₃ 2,93 g/l - pH 9,6
BSS	- 1,1 l BSS I-Lösung - 1,1 l BSS II-Lösung - 7,8 l ddH ₂ O
BSS I	- in 10 l ddH ₂ O - Glucose 100 g - KH ₂ PO ₄ 6 g - Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 23,8 g - Phenolrot 1 g
BSS II	- in 10 l ddH ₂ O - CaCl ₂ 2H ₂ O 18,6 g - KCl 40 g - NaCl 40 g - MgCl ₂ 6 H ₂ O 20 g - MgSO ₄ 7 H ₂ O 20 g
BSS mit 0,2% BSA	- 10 l BSS + 20 g BSA
Ca²⁺/Mg²⁺-freies PBS	- 1 ml 500 mM EDTA - 99 ml PBS
FACS-Puffer	- in 500 ml PBS - 0,5 g BSA - 1 ml NaN ₃ 10%

Laemmli-Puffer (6x)	<ul style="list-style-type: none"> - 0,72 ml 1 M Tris, pH 6,8 - 2,4 ml 10% SDS - 3 ml Glycerol - 0,6 ml β-Mercaptoethanol - 1,2 ml 1% Bromphenolblau - 2,08 ml ddH₂O
PBS	<ul style="list-style-type: none"> - in 10 l ddH₂O - NaCl 80 g - KCl 2 g - Na₂HPO₄ 2H₂O 11,5 g - KH₂PO₄ 2 g - CaCl₂ 4H₂O 1,67 g - MgCl₂ 6H₂O 1 g
RPMI⁺ + 5% FCS	<ul style="list-style-type: none"> - RPMI: Gibco RPMI Medium 1640 (1x), #21875-034 - 50 ml SC - 27,5 ml FCS
SC (Supplement Complete)	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml FCS (Fetal Calf Serum, 35 min hitzeinaktiviert bei 56°C) - 100 ml Na-Pyruvat 100 mM - 100 ml nicht-essentielle AS, MEM, 100x - 100 ml Penicillin und Streptomycin (100 μg/ml) - 5 ml β-Mercaptoethanol, 50 mM - 60 ml Glutamin-Lösung 5%
TBST	<ul style="list-style-type: none"> - 24,2 g Tris - 87,6 g NaCl - 10 ml Tween-20 - 800 ml ddH₂O
Transferpuffer (1x)	<ul style="list-style-type: none"> - 28,8 g Glycin - 6,04 g Tris - 200 ml Methanol - 1,6 l ddH₂O
Tris 1,0 M (pH 6,8)	<ul style="list-style-type: none"> - 121,1 g Tris - in 1 l ddH₂O
Tris 1,5 M (pH 8,8)	<ul style="list-style-type: none"> - 181,65 g Tris - in 1 l ddH₂O

2.1.6 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien		
Bezeichnung	Hersteller	Produkt-Nummer
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	
Annexin V	BD Bioscience	550475
Brefeldin A	Sigma Aldrich	B6542-5MG
DNAse I (10 mg/ml)	Roche	10548100
Fixable Viability Dye eFluor780	eBioscience	65-0865-14
Fixation Buffer and Diluent	eBioscience	00-5521-00
Fluozin-3AM	Thermofisher scientific	F-24195
Formaldehyd	AppliChem	
HEPES	Roth	
Ionomycin	Sigma Aldrich	I0634-1MG
Kollagenase D (42 U/ml)	Roche	70457420
Maus-IL-12	RD Systems	419-ML
MgCl ₂	Ferak	
Mouse Immunoglobulin G	Sigma Aldrich	I5381-5MG
Natriumazid	Roth	
OVA-Peptid (327-339)	China Peptides Co.	
Permeabilisation Buffer	eBioscience	00-8333-56
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Calbiochem	524400
Propidiumiodid	BioLegend	421301
SDS	Sigma	
Streptavidin MicroBeads	MACS Miltenyi Biotech	130-048-101
TEMED	Roth	
Tris	AppliChem	
Trockenmilchpulver	AppliChem	
Trypanblau	AppliChem	
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit (CFSE)	Life Technologies	V12883
X2 PageRuler Prestained Protein Ladder	Fisher Scientific	26616
ZnCl ₂	Merck	

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Lymphknoten und Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Die Mäuse wurden euthanasiert durch CO₂-Narkose, sofort danach wurden große Lymphknoten (inguinal, axillär, zervikal, mesenterial) und die Milz präpariert. Anschließend wurden alle Biopsate mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 70 µm Zellsieb (Cell Strainer, Falcon, #352350) gerieben und in BSS/BSA-Puffer in Suspension gebracht und nach Zentrifugieren (3 min, 460 g, RT) und Entfernen des Überstandes in neuem BSS/BSA suspendiert.

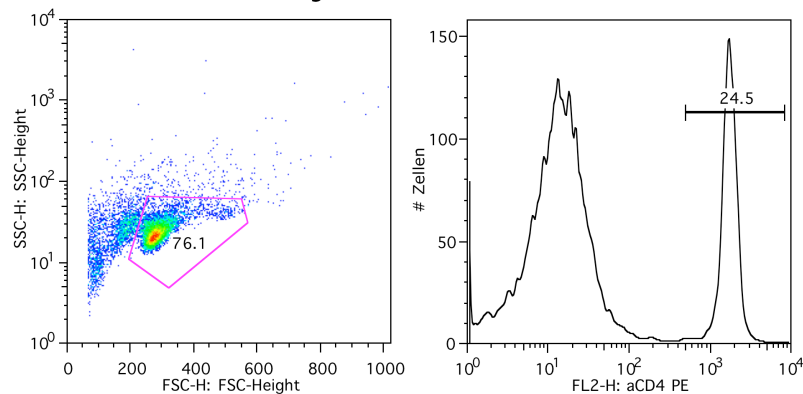
In der Suspension der Milzzellen sind stets Erythrozyten enthalten. Um diese zu entfernen, wurden die Milzzellen pelettiert und das Pellet auf dem Vortexmischer in 3 ml ddH₂O resuspendiert. Wenige Sekunden später wurde die Lyse abgestoppt durch Zugabe einer gleich großen Menge 1,8% NaCl-Lösung, um eine 0,9%ige NaCl-Lösung herzustellen. Nachdem der Zellebris sich abgesetzt hatte, wurde der Überstand, in dem die Leukozyten suspendiert waren, mit einer Pasteur-Pipette in ein neues Gefäß überführt. Um die Zellen zu schonen wurde außerdem BSS/BSA zugegeben, die Zellen erneut zentrifugiert und in frischem BSS/BSA resuspendiert. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer 1:10 Verdünnung in 0,04% Trypanblau in PBS in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop.

2.2.2 Zellkultur

Anreicherung der CD4⁺-Zellen

Zellen wurden mit dem „MagniSort Mouse CD4 T Cell Enrichment Kit“ nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Zur Überprüfung der Reinheit wurden 1x10⁶ Zellen vor und nach Anreicherung der CD4⁺ Zellen auf CD4-Positivität gefärbt. Zuerst wurden unspezifische Bindungen geblockt durch 15 min Inkubation mit 2.4G2 bei 4°C. Dieser Überstand aus Hybridomzellen bindet die Fc-γ-Rezeptoren II/III der Maus [66]. Anschließend wurde der Fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD4 zugegeben und erneut bei 4°C für 15 min inkubiert. Der Anteil an CD4⁺ Zellen wurde dann am FACSCalibur gemessen. Die Reinheit der CD4⁺-Zellen lag in allen Experimenten bei mindestens 90% und im Durchschnitt der Experimente bei etwa 93% (Abbildung 4).

A vor CD4⁺-Zell-Anreicherung



B nach CD4⁺-Zell-Anreicherung

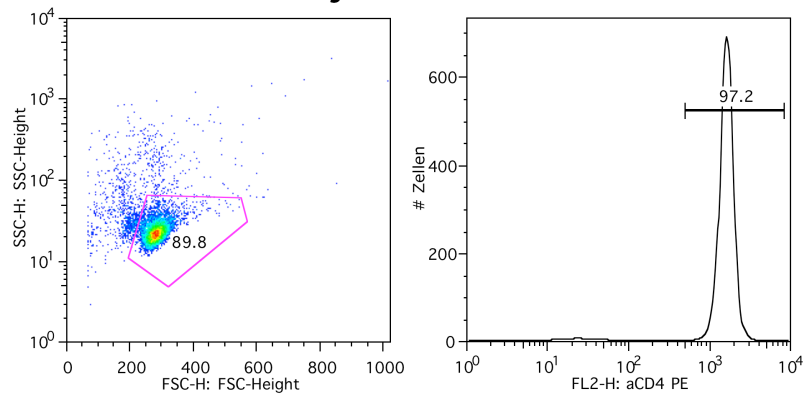


Abbildung 4: Effektivität der Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen

Im Forward- und Side-Scatter wurden lebende Zellen ausgewählt und anschließend CD4⁺ Zellen markiert. Es zeigt sich hier exemplarisch eine Erhöhung des Anteils der CD4⁺ T-Zellen von 24,5% auf 97,2%.

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurden die Zellen mit CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester oder Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit) markiert. Dieser Farbstoff wird in die Zellen aufgenommen und verbleibt dort. Teilt sich eine Zelle, erhalten beide entstehenden Tochterzellen etwa 50% des CFSE-Gehalts der ungeteilten Zelle. Da der Farbstoff in der Durchflusszytometrie durch die Fluoreszenz des CFSE gemessen werden kann, können Zellen, die sich nicht geteilt haben (CFSE^{hoch}) von geteilten Zellen (CFSE^{niedrig}) unterschieden werden [67].

Zur Markierung der Zellen mit CFSE wurden die Zellen in BSS überführt und dreimal in BSS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl eingestellt auf 1×10^7 Zellen/ml in BSS und das CFSE zugegeben. Inkubiert wurde mit 5 μ M CFSE für 5

min bei Raumtemperatur im Dunklen. Um die CFSE-Markierung zu stoppen, wurde BSS/BSA zugegeben (BSA stoppt den Prozess). Die Zellen wurden hiernach noch zweimal in BSS/BSA gewaschen.

Kostimulations-Experimente

Die aufgereinigten CD4⁺-Zellen wurden in RPMI⁺ + 5% FCS aufgenommen.

Zur Untersuchung der Kostimulation wurden 96-Napf-Flachboden-Platten (Cellstar, Greiner) am Vortag mit anti-CD3-Antikörper beschichtet. Anti-CD3-mAk vernetzt CD3-Moleküle, wodurch eine T-Zellrepetorkomplexstimulation simuliert wird. Hierfür muss der Antikörper jedoch auf der Zellkulturplatte immobilisiert werden [68]. Der Antikörper wurde hierzu in angegebener Konzentration in steril gefiltertem 0,1 M NaHCO₃-Puffer suspendiert und jeweils 100 µl pro Napf auf die Platte pipettiert. Das Beschichten wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt. Am Folgetag wurden die beschichteten Näpfe jeweils dreimal mit 200 µl BSS/BSA gewaschen. Um die Bindung weiterer Proteine an die Plastikplatte zu verhindern, wurden die beschichteten Näpfe anschließend mit 100 µl normalem Maus-Ig (0,2 mg/ml verdünnt in BSS/BSA) für 30 min im Inkubator bei 37°C geblockt. Anschließend wurde erneut dreimal mit BSS/BSA gewaschen. Andernfalls hätten zugegebene Proteine, wie beispielsweise rekombinantes Pra1, ebenfalls an die Plastikplatte gebunden, und es wäre nicht sicher zu sagen, ob der beobachtete Effekt von gelöstem oder gebundenem Pra1 ausgeht.

Auf die beschichtete Platte wurden 1x10⁵ Zellen pro Napf ausgesät und Kostimulationsagentien wurden in Lösung zugegeben. Pro Napf wurde mit einem Gesamtvolumen von 200 µl gearbeitet.

Als Positivkontrolle der Kostimulation wurde ein anti-CD28-mAk eingesetzt, der zusammen mit dem auf der Platte beschichteten anti-CD3-mAk die T-Zellen voll aktiviert. Verwendet wurde ein konventioneller anti-CD28-mAk, der nur kostimulatorische Aktivität besitzt, ohne selbst Zellen durch Stimulation am T-Zellrezeptor zu aktivieren [69, 70].

Th1-Differenzierung

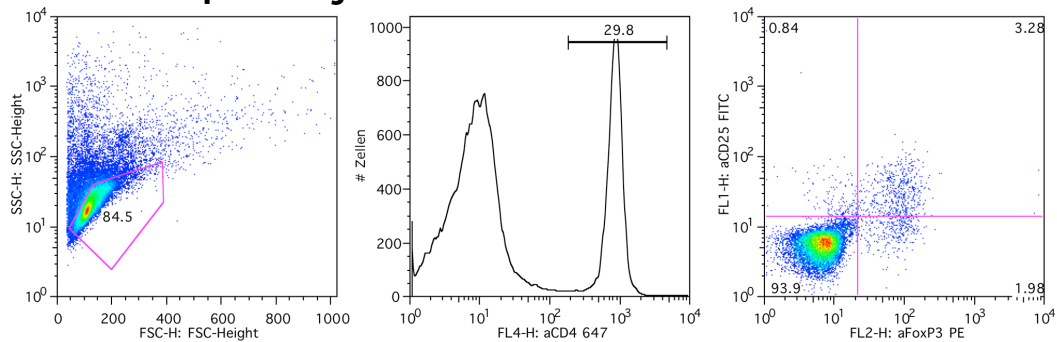
Es wurden OT-II-Mäuse verwendet, bei denen alle CD4⁺ T-Zellen einen transgenen T-Zell-Rezeptor tragen, sodass alle CD4⁺ T-Zellen der Maus durch das gleiche Peptid im MHC-II-Molekül aktiviert werden können. Das Peptid, das ihre T-Zellrezeptoren erkennen, ist ein Abschnitt (Aminosäuren 327-339) des Proteins Ovalbumin (OVA), das die T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen angeboten bekommen [63].

Es wurden Lymphknoten und Milzen aus OT-II-Mäusen präpariert und Erythrozyten der Milz lysiert wie bereits für Wildtyp-Mäuse beschrieben.

Anschließend wurden die Zellen von den CD25⁺ Zellen depletiert, um regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zu entfernen [71]. T_{reg}-Zellen besitzen ebenfalls einen TCR, der das OVA-Peptid binden würde und so die Differenzierung der Th1-Zellen stören könnte. Hierzu wurden die Zellsuspensionen mit biotinyliertem anti-CD25-Antikörper inkubiert und danach dreimal gewaschen. Zu den resuspendierten Zellen wurden Streptavidin-beschichtete Beads gegeben und für 15 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die so markierten Zellen auf eine LD-Säule gegeben (Miltenyi Biotech).

Die Effektivität der CD25⁺-Zelldepletierung wurde immer durch Färbung von CD25 und Foxp3 kontrolliert und betrug im Durchschnitt aller Versuche nach Depletierung 2% Foxp3⁺ Zellen aller CD4⁺ Zellen (vor der Depletion etwa 6,4% Foxp3⁺ aller CD4⁺ Zellen, Abbildung 5).

A vor CD25-Depletierung



B nach CD25-Depletierung

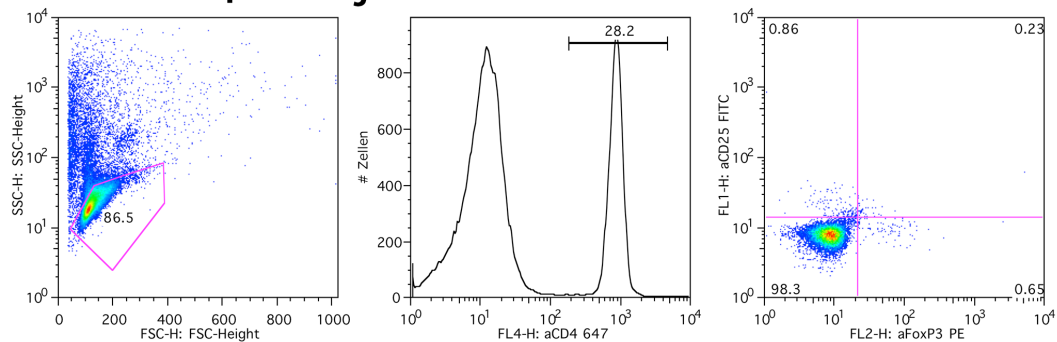


Abbildung 5: Effektivität der Depletierung von CD25⁺ OT-II-T-Zellen

Lebende Zellen wurden im Forward- und Side-Scatter ausgewählt, davon wurden CD4⁺ Zellen selektiert. Als Marker für T_{reg}-Zellen wurden Foxp3⁺ Zellen ausgewertet. Exemplarisch ist hier nach Depletierung der CD25⁺ Zellen eine Reduktion der Foxp3⁺ Zellen von 5,25 auf 0,88% der CD4⁺ Zellen zu sehen.

Die Zellen wurden dann auf 48-Napf-Flachbodenplatten ausgesät. Zur Differenzierung zu Th1-Zellen wurde 1 μ M OVA-Peptid, 10 μ g/ml anti-IL-4 und 10 ng/ml IL-12 zugegeben. IL-12 ist das Zytokin, das in aktivierten Lymphozyten die Differenzierung zu IFN- γ -produzierenden T-Zellen lenkt [72], IL-4 würde IL-4-produzierende T-Helferzellen (Th2-Phänotyp) induzieren [73]. Zur Kontrolle wurden stets Zellen nur mit 1 μ M OVA-Peptid inkubiert, um „Th0“-Zellen zu erzeugen. Diese Vorkultur zur Differenzierung der beiden T-Helferzell-Populationen wurde für 5 Tage inkubiert. Das Medium wurde während der 5 Tage nicht gewechselt.

Vor der weiteren Arbeit mit den Zellen wurde der Phänotyp nach der Vorkultur kontrolliert durch 2 Stunden Inkubation mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin und weiteren 2 Stunden mit 10 μ g/ml Brefeldin A. PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) und Ionomycin sind beides Mitogene und aktivieren T-Zellen

[74]. Brefeldin A hemmt die Sekretion translatierter Proteine im Golgi-Apparat und führt so zu einer intrazellulären Anreicherung von Proteinen, die normalerweise sezerniert würden [75]. Die so stimulierten Zellen wurden intrazellulär auf phänotypische Zytokine (INF- γ für Th1-Zellen und IL-4 für Th2-Zellen) und Transkriptionsfaktoren (T-bet für Th1-Zellen und Gata3 für Th2-Zellen) gefärbt [29].

Apoptose-Induktion

Differenzierte Th1-Zellen wurden nach dem Waschen auf 96-Napf-Flachbodenplatten mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen/Napf ausgesät. Zur Induktion der Apoptose wurde anti-Fas-Antikörper zugegeben. Die Inkubation wurde für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt.

Fas (CD95) ist ein Oberflächenprotein auf Zellen, das nach Bindung an den Fas-Liganden (FasL) die Apoptose in Zellen einleitet: Activation-Induced Cell Death (AICD). Dieser Prozess ist im Körper wichtig, um die T-Zellexpansion zu begrenzen. Im Rahmen der Immunantwort expandieren T-Zellen stark, allerdings soll diese Expansion ein gewisses Maß nicht übersteigen. Daher können überschüssige T-Zellen auf diese Weise entfernt werden. Aktivierte T-Zellen exprimieren den FasL [76].

Die Messung der Apoptose erfolgte durch Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid. Annexin V bindet an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, welches von Zellen nur zur äußeren Seite der Zellmembran gebracht wird, wenn die Zelle durch Apoptose stirbt [77].

Propidiumiodid interkaliert in die DNS, kann diese allerdings nur erreichen, wenn die Zellmembran permeabel geworden ist. Diese Auflockerung der Zellmembran passiert, wenn Zellen gestorben sind [77].

Annexin V markiert dementsprechend Zellen, die soeben in die Apoptose eingetreten sind und Propidiumiodid markiert Zellen, die bereits gestorben sind [77].

2.2.3 Isolation von Lymphozyten aus der Lamina propria

Teile des Darms von oral mit *C. albicans* infizierten Mäusen wurden präpariert und mit gekühltem, sterilem PBS ausgespült. Anschließend wurden die Biopsate in 24-Napf-Flachbodenplatten überführt und in RPMI aufgenommen.

Mit einer sterilen Schere wurden die Präparate möglichst stark zerkleinert. Zugegeben wurden dann DNase I (280 U/ml) und Kollagenase D (100 µg/ml). Der enzymatische Verdau des Bindegewebes wurde 45 min bei 37°C während der Zentrifugation mit 1 g durchgeführt.

Nach dem Zentrifugieren wurde die Suspension durch ein 40 µm Zellsieb mit einem Spritzenstempel gedrückt, nachgespült wurde mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS. Die gefilterte Suspension wurde erneut zentrifugiert bei 4°C und 400 g für 6 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS resuspendiert.

2.2.4 Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie

Zur Färbung wurden die Zellen auf eine 96-Napf-V-Boden-Platte (Cellstar, Greiner) übertragen und zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend durch schnelles Umkippen der Platte nach unten entfernt.

Verdünnungen aller Antikörper zur FACS-Analyse wurden in FACS-Puffer hergestellt.

Inkubiert wurden die Zellsuspensionen entweder mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper oder es wurde zuerst ein primärer Antikörper ohne konjugiertes Flurochrom verwendet. Bei direkter Färbung, d.h. wenn der primäre Antikörper bereits an ein Flurochrom gekoppelt ist, wurden vor Zugabe des Antikörpers unspezifische Bindungen geblockt durch Zugabe von 2.4G2 (gelöst in FACS-Puffer) und 15 min auf Eis inkubiert. Wenn der primäre Antikörper keinen Fluoreszenzfarbstoff trug, wurden die Zellen nach der Inkubation in FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper gegen die Spezies des ersten Antikörpers inkubiert.

Nach der Färbung wurden die Zellen gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen. Messungen wurden durchgeführt an einem FACSCalibur oder LSR II (beide BD Bioscience).

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) ist ein Verfahren, mit dem fluoreszierende Antikörper auf Zellen gemessen werden können. Ein Antikörper gegen ein gesuchtes Antigen, an den ein Fluorochrom gebunden ist, kann so detektiert werden. Auf diese Weise können verschiedene Oberflächenantigene auf ein und derselben Zellen identifiziert werden. Des Weiteren können Zellen auch nach ihren Oberflächenantigenen sortiert werden und in getrennte Populationen aufgetrennt werden.

Die Detektion von intrazellulären Antigenen ist ebenfalls möglich. Hierfür müssen Zellen zuerst fixiert und permeabilisiert werden (Fixation Buffer und Permeabilisation Buffer, eBioscience). Durch diesen Prozess wird die Zellmembran durchlässig für die Antikörper.

Zur Messung der fluoreszierenden Antikörper müssen die Zellen in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Das Durchflusszytometer saugt die Suspension in eine sehr dünne Kapillare ein und führt die Zellen extrem schnell an einem Laser vorbei. Dieser Laser regt die Fluoreszenz der Fluorochrome mit einer bestimmten Wellenlänge an. Die emittierte Fluoreszenz kann dann gemessen werden. Mehrere Filter erlauben die Detektion eines eng definierten Wellenlängenbereichs. Auf diese Weise können auf einer Zelle durch verschiedene Fluorochrome mit bekanntem Farbspektrum verschiedene Eigenschaften untersucht werden. Durch die dünne Kapillare ist gewährleistet, dass zu jedem Zeitpunkt immer nur eine Zelle von dem Laser angeregt wird.

Neben der Fluoreszenz der Zellen wird auch das Vorwärts- (Forward-Scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht des Lasers (Side-Scatter, SCC) gemessen. Die Vorwärtsstreuung erlaubt eine Aussage über die Größe der gemessenen Zelle, das Seitwärtsstreulicht über die Granularität der Zelle. So können beispielsweise Lymphozyten (klein, wenig granulär) von Makrophagen (größer, granulärer) unterschieden werden.

2.2.5 Nachweis der Bindung des Pra1 an T-Zellen

Benutzt wurden ausschließlich Lymphknotenzellen oder Lymphknotenzellen gepoolt mit Milzzellen nach Lyse der Erythrozyten.

Es wurden 1×10^5 Zellen pro Napf auf 96-Napf-V-Bodenplatten pipettiert und in PBS suspendiert. Im Volumen von 50 μ l pro Napf wurde rekombinantes Pra1 (10

µg/ml, wenn nicht anders angegeben) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Hiernach wurden die Zellen dreimal gewaschen in FACS-Puffer. Nachgewiesen wurde Pra1 durch ein polyklonales anti-Pra1-Serum aus einem immunisierten Kaninchen (AG Zipfel, Jena). Der Antikörper wurde titriert und in optimaler Verdünnung von 1:400 in FACS-Puffer verwendet. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 30 min bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal in FACS-Puffer gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde anti-Kaninchen-PE verwendet und ebenfalls für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen in FACS-Puffer wurden unbesetzte Bindungsstellen am sekundären Antikörper blockiert durch Zugabe eines polyklonalen Kaninchen-Serums (4°C, 15 min). Zuletzt wurden Antikörper zur Färbung von den Oberflächenmarkern CD3 und CD4 zugegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Nach letztmaligem Waschen wurden die Zellen im Durchflusszytometer untersucht.

In der Auswertung der Färbungen der Bindungsversuche von Pra1 wurde teilweise die relative MFI berechnet zur Darstellung des gemessenen Fluoreszenzsignals. Hierzu wurde das Signal der Probe durch das Signal der Probe ohne Pra1 dividiert. Es ergibt sich so ein Vielfaches des Hintergrundsignals.

2.2.6 Messung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen

Es wurden Überstände der CD4⁺ T-Zellkulturen abgenommen und sofort tiefgefroren bei -80°C. Zur Messung der Zytokinkonzentration wurde der Kit „LegendPlex“ (BioLegend) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Die Analyse erfolgt in diesem System mit unterschiedlich beschichteten Beads. Zum einen werden verschiedene Größen der Beads verwendet, zum anderen tragen die Beads unterschiedlich starke APC-Fluoreszenz. Durch diese beiden Merkmale kann die Software erkennen, um welche Sorte Beads es sich handelt. Unterschiedliche Sorten Beads sind mit unterschiedlichen Antikörpern gegen zu untersuchende Zytokine beschichtet. Die Zytokine binden nach Zugabe zu den Beads an die Antikörper und anschließend wird ein sekundärer, polyklonaler Antikörper gegen Zytokine zugegeben, der durch die konjugierte PE-Fluoreszenz sichtbar gemacht wird (Abb. 6). In der Durchflusszytometrie werden so die

unterschiedlich beschichteten Beads gefunden und anhand ihrer PE-Fluoreszenz wird die Menge der Zytokine in der Probe bestimmt.

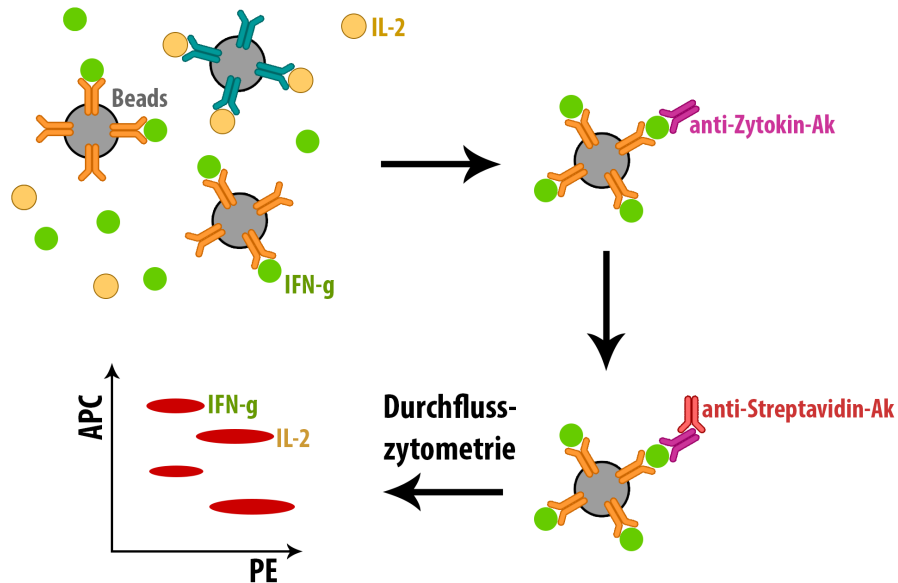


Abbildung 6: Messprinzip der Bestimmung der Zytokinkonzentration

An mit mAk beschichtete Beads bindet das spezifische Zytokin und kann durch einen 2. und 3. Antikörper in der Durchflusszytometrie gemessen werden.

Gemessen wurden die Beads am FACSCalibur (BD Bioscience). Die Auswertung erfolgte mithilfe der Auswertungs-Software des Herstellers des Kits.

2.2.7 Western Blot

SDS-PAGE

In der SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel Electrophoresis) werden Proteingemische auf ein Gel aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Durch eine Porenstruktur im Gel laufen die Proteine ihrer Größe nach unterschiedlich schnell. Große Proteine bleiben öfter „hängen“ und wandern langsamer, kleinere Proteine laufen schneller durch das „Gitter“. Gleich große Proteine bleiben auf etwa der gleichen Stelle im Gel liegen und bilden bei der Sichtbarmachung der Proteine sogenannte Banden.

Benutzt wurde das SDS-Page-System der Firma Bio-Rad mit dem sowohl das Gel gegossen wurde als auch die Elektrophorese durchgeführt wurde (Mini Transfer Blot Cell und PowerPac HC, Bio-Rad).

Zuerst wurde das Trenngel in angegebener Zusammensetzung gegossen (Tab. 5). Nach etwa 20 min wurde das Sammelgel auf das erstarrte Trenngel gegossen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Gels der SDS-PAGE			
	Trenngel 12%	Trenngel 7,5%	Sammelgel 3%
Acrylamid	3,33 ml	2,5 ml	390 µl
Tris	1,5 M, pH 8,8 2,5 ml	1,5 M, pH 8,8 2,5 ml	1 M, pH 6,8 375 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	30 µl
ddH₂O	4 ml	4,85 ml	1,85 ml
TEMED	10 µl	10 µl	7 µl
10% APS	50 µl	50 µl	20 µl

Die Proben wurden in Laemmli-Puffer suspendiert, die Taschen jeweils mit 15 µl beladen. Eine Tasche pro Gel wurde mit 3 µl eines Markes (X2 PageRuler Prestained Protein Ladder) beladen.

Die Elektrophorese lief zuerst 30 min mit einer Stromstärke von 80 mA und wurde nach Einlaufen der Proben in das Sammelgel für weitere 60 min bei 120 mA durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Transferpuffer überführt zur Vorbereitung auf den Western Blot.

Western Blot

Um die Proteine, die sich auf unterschiedlicher Höhe im Agarose-Gel befanden, zu untersuchen, wurden alle Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen. Dieser Prozess der Übertragung vom Gel auf die Membran heißt Western Blot. Sobald die Proteine auf der Membran sind, kann untersucht werden, um welche Proteine es sich handelt.

In der Blottingkammer wurde die aktivierte Membran auf 4 Streifen Whatman-Papier, getränkt in Transferpuffer, gelegt.

Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P Transfer Membrane, EMD Millipore) für 30 s in Methanol getaucht, anschließend in ddH₂O gewaschen und in Transferpuffer überführt. Erst nach Aktivierung kann die Membran die Proteine aus dem Gel aufnehmen.

Auf die aktivierte Membran wurde das Gel gelegt und mit drei in Transfer-Puffer getränkten Whatman-Papieren bedeckt.

Das Blotting lief für 90 min (Electrophoresis Power Supply ST 6006T, Gibco BRL Life Technologies).

Entwicklung des Blots

Direkt nach dem Blotten wurde die Membran in einer Trockenmilch-TBST-Lösung (1 g Trockenmilchpulver in 20 ml TBST) für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu reduzieren.

Durch einen spezifisch gegen ein bekanntes Antigen gerichteten (primären) Antikörper können gesuchte Proteine nachgewiesen werden.

Nachdem der primäre Antikörper mit dem Blot inkubiert wurde, wurde der sekundäre Antikörper zugegeben. Die verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugiert. Diese Peroxidase setzt ein zugegebenes Substrat in Chemilumineszenz um, welche in einer Fotokammer sichtbar gemacht und fotografiert werden kann.

Zunächst wurde der primäre Antikörper, gelöst in 10 ml TBST, zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und am Folgetag durch dreimaliges Waschen mit TBST für insgesamt 30 min entfernt.

Der sekundäre Antikörper (Tab. 6) wurde gelöst in 10 ml TBST und für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Auch nach diesem Schritt wurde die Membran 30 min in TBST gewaschen.

Zur Detektion der Antikörperbindung wurde Chemilumineszenz-Lösung (Enhanced Chemiluminescence, ECL) zugegeben (WesternBright Quantum, Biozym, #541014). Die Lumineszenz wurde anschließend in einer Fotokammer detektiert (LAS-3000, Fujifilm).

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot		
Antigen	Hersteller	Produkt-Nummer
Hase	Jackson Immunoresearch	111-035-144
Maus	Jackson Immunoresearch	315-035-045

2.2.8 Messung der Zinkkonzentration

Die Proben wurden in 96-Napf-Flachbodenplatten mit jeweils 30 µl Puffer pro Napf (20 mM HEPES, 20 M MgCl₂, 250 µM Tris) analysiert [78]. Die Messung der Zinkbindungseigenschaft des Pra1 wurde durchgeführt durch Zugabe von 10 µM ZnCl₂ bzw. eine Probe ohne ZnCl₂. Durch Messung des freien (gelösten) Zinks konnte so auf die Zinkbindung des Pra1 geschlossen werden. Sollte Pra1 kein Zink binden, würde die Fluoreszenz nicht abfallen. Sollte Zink gebunden werden, würde die Fluoreszenz fallen und sich der Fluoreszenz der Probe ohne zugegebenem ZnCl₂ annähern.

Die Proben wurden als 4-fache technische Replikate angelegt.

Zur Messung der freien Zinkkonzentration wurde pro Probe 2 µM Fluoazin-3 zugegeben, was nach vorheriger Titration des Fluoazin das beste Verhältnis aus spezifischem Signal und Hintergrundsignal ergab.

Der Indikator emittiert bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm umso mehr Licht bei 516 nm je mehr Zink er gebunden hat. Die Inkubation wurde bei 4°C im Dunklen für 25 min durchgeführt.

Gemessen wurde die Fluoreszenz nach 20 min am Tecan Infinite Pro 200.

2.2.9 Software

Am Durchflusszytometer gemessene Werte (am FACSCalibur und LSR II) wurden in FlowJo (FlowJo LLC) in der Version 8.8.7 analysiert und exportiert für die Darstellung.

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Prism 6 (GraphPad) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens von rPra1

3.1.1 rPra1 bindet an CD4⁺ T-Zellen der Maus

Eine Bindung von Pra1 an T-Zellen ist beschrieben für humane CD4⁺ T-Zellen. Der Rezeptor auf diesen Zellen ist CD46 (Dr. Dasari und Prof. Peter Zipfel, Hans-Knöll-Institut Jena, unveröffentlichte Daten). Die Maus dient in der Biologie als Modellorganismus zur Erforschung von Erkrankungen des Menschen und Erprobung von Therapien. Für Immunzellen der Maus ist eine Bindung an Monozyten und Phagozyten am Mac-1-Rezeptor beschrieben [79]. Der Mac-1-Rezeptor (CD11b/CD18) wird exprimiert von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und reifen NK-Zellen [80].

Zuerst wurde die Bindung von rekombinantem Pra1 (rPra1) an T-Zellen untersucht. Da CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen spielen, wurde diese Gruppe der T-Zellen untersucht [81].

Zur Untersuchung der Bindung wurden Leukozyten aus Lymphknoten und der Milz einer Maus isoliert und mit 10 µg/ml rPra1 in PBS inkubiert (37°C, 30 min). Nach der Selektion lebender Zellen mithilfe von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden CD3⁺ CD4⁺ Zellen ausgewählt. Im Histogramm (Abb. 7) sind Zellen dargestellt, die mit rPra1 inkubiert wurden und die Negativkontrolle („Pra1-“), d.h. Zellen, die nur in PBS inkubiert und anschließend genauso gefärbt wurden wie die mit rPra1 inkubierten Zellen.

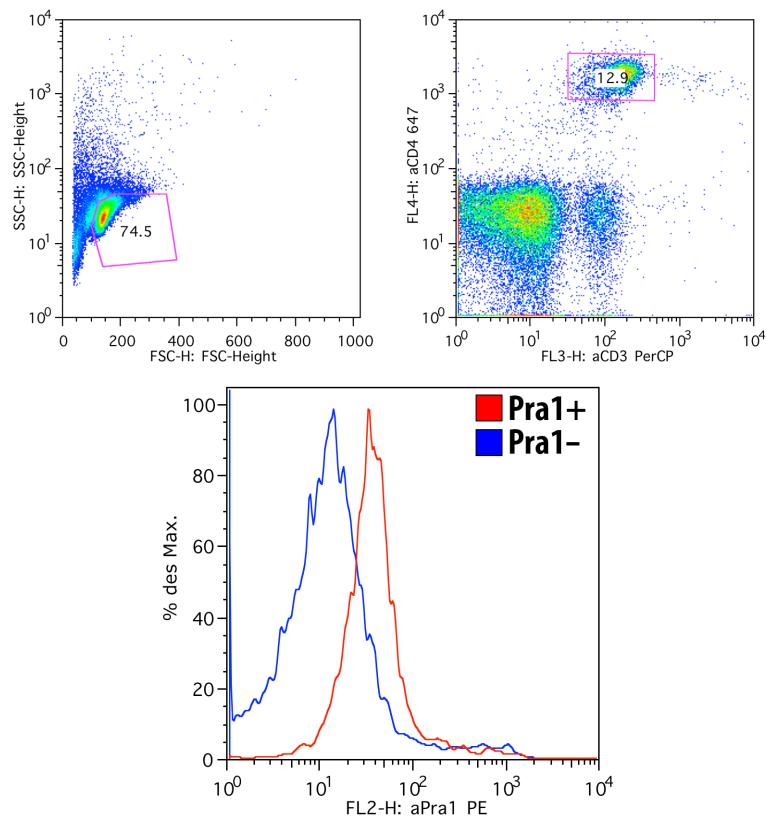


Abbildung 7: rPra1 bindet an CD4⁺ T-Zellen der Maus

Milzzellen der Maus wurden nach Lyse der Erythrozyten für 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml rPra1 in Lösung inkubiert („Pra1+“). Die Negativkontrolle ergab sich aus Zellen inkubiert ohne rPra1 nur in PBS („Pra1-“). Nach Auswahl lebender Zellen mit Hilfe von Forward- und Side-Scatter wurden CD3⁺ CD4⁺ Zellen selektiert. Die Färbung des rPra1 erfolgte mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Man erkennt eine deutliche Verschiebung der roten Kurve im Vergleich zur Negativkontrolle (blau): Das Signal des gefärbten rPra1 auf der Zelloberfläche liegt höher als das der Negativkontrolle. Dies zeigt, dass rPra1 an die Oberfläche von CD3⁺ CD4⁺ Zellen bindet.

3.1.2 Zn²⁺ verstärkt die Bindung von rPra1 an Maus-CD4⁺ T-Zellen

Pra1 besitzt mehrere Bindungsstellen für Zink [62]. Funktionell wirkt rPra1 als Zinkophore, also als ein Molekül, das Zink im Wirt bindet und es dem Pathogen zuführt. So kann sich *C. albicans* mit Zink versorgen. Untersucht wurde zuerst, ob das verwendete rPra1 ebenfalls Zink binden kann.

Wie Abb. 8A zeigt, ergaben sich ohne zugegebenes rPra1 in der Probe mit freiem Zink („ZnCl₂ 10 μM“) höhere Fluoreszenz-Werte des Zink-Indikators im Vergleich zur Probe ohne zugegebenes Zink. Durch Zugabe von rPra1 näherte sich die Kurve der Fluoreszenz der Probe ohne zugegebenes Zink an. Durch das rPra1 liegt die Menge des freien Zinks damit auf dem Niveau der Probe ohne freies Zink. In diesem Experiment konnte rPra1 konzentrationsabhängig 10 μM Zn²⁺ sequestrieren, was in etwa der Zink-Konzentration im Serum von Mäusen entspricht [82]. Ebenfalls scheint eine Konzentration von 10⁻⁵ μg/ml rPra1 bereits nahe der Sättigung für die Sequestrierung von 10 μM Zn²⁺ zu sein (Abb. 8B).

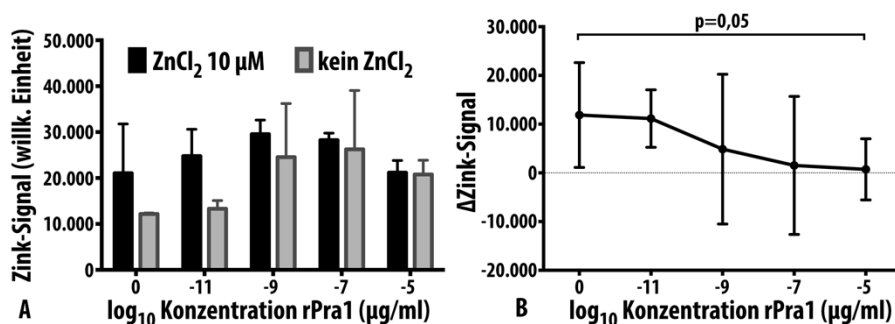


Abbildung 8: rPra1 kann an freies Zink binden

A: absolute Fluoreszenz des Zink-Indikators **B:** ΔFluoreszenz der Zinkkonzentration (Differenz von Signal und Hintergrundsignal)

Das Fluorochrom hat eine zunehmende Fluoreszenz bei steigender Konzentration von freiem Zink. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 technischen Replikaten eines Experiments von insgesamt drei mit ähnlichem Ergebnis, getestet wurde mit einem zweiseitigen T-Test.

Bei Bindungsversuchen von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen ergaben sich teilweise keine starken Signale. Deshalb wurde untersucht, ob sich ein Einflussfaktor auf das Bindungsverhalten von rPra1 an T-Zellen finden lässt. Da Zink an rPra1 binden kann, wurde Zink während der Inkubation von Lymphknoten-Zellen mit rPra1 zugegeben und der Einfluss auf die Bindung von rPra1 untersucht. Die Hypothese war, dass Zink die Bindung von rPra1 an die T-Zellen verbessert.

Bereits 1 μM ZnCl₂ konnte die Bindung an CD4⁺ T-Zellen leicht verbessern (Abb. 9). 10 μM Zink entspricht der Zink-Serumkonzentration [82]. Mit steigender

Zink-Konzentration während der Inkubation mit rPra1 lässt sich die Bindung an T-Zellen verbessern.

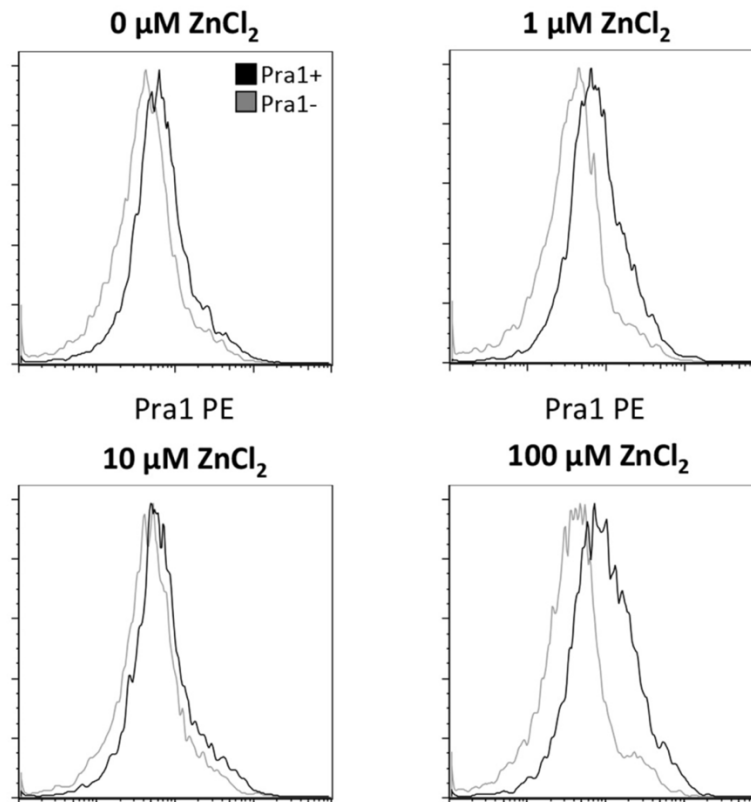


Abbildung 9: Zink verstärkt die Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen der Maus
Leukozyten der Maus aus inguinalen, axillären und zervikalen Lymphknoten wurden mit rPra1 (10 µg/ml) inkubiert und zusätzlich ZnCl₂ zugegeben. Dargestellt sind lebende CD3⁺ CD4⁺ Zellen. Gebundenes rPra1 wurde durch polyklonales Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum nachgewiesen. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Ein signifikanter Nachweis der Färbung von gebundenem rPra1 auf CD4⁺ T-Zellen gelang in Gegenwart und Abwesenheit von ZnCl₂ (Abb. 10A).

In der Zusammenschau ergab sich ab 10 µM ZnCl₂ eine Optimierung der Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen, der stärkste Effekt konnte mit 100 µM erzielt werden. Bei dieser hohen Konzentration von ZnCl₂ wurde das Signal signifikant verbessert im Vergleich zur Inkubation ohne ZnCl₂ und die relative MFI des Pra1-Signals betrug etwa 1,6 (Abb. 10B).

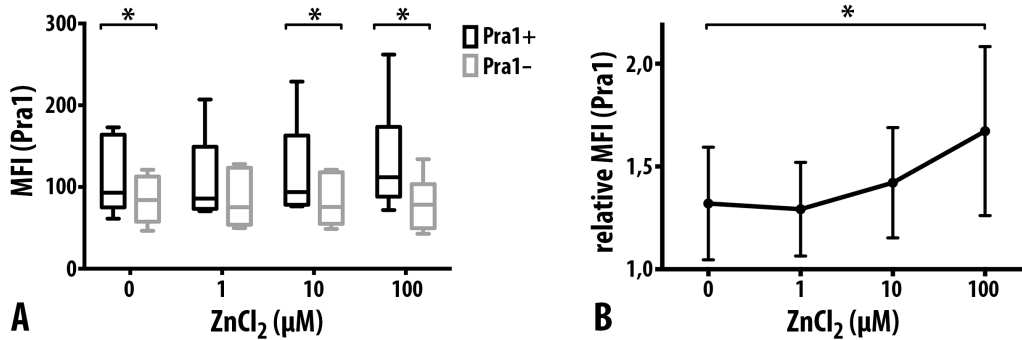


Abbildung 10: Zink verstärkt die Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen der Maus

A: CD4⁺ CD3⁺ Zellen wurden inkubiert mit 10 µg/ml rPra1 („Pra1+“) und ohne rPra1 („Pra1-“) und verschiedenen Konzentrationen von ZnCl₂. Dargestellt ist die MFI des Pra1-Signals mit Mittelwert, oberem und unterem Quartil und gesamter Streuung der Messwerte aus 6 Experimenten. Getestet wurde mit zweiseitigem T-Test: * p<0,05

B: Gezeigt ist die relative MFI des Pra1-Signals berechnet aus Signal der Probe („Pra1+“) dividiert durch Signal der jeweiligen Negativkontrolle („Pra1-“). Die Grafik zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung aus 6 Experimenten. Getestet wurde mit zweiseitigem T-Test: * p<0,05.

Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Rekombinantes Pra1 kann Zink binden und Zink stellt einen Einflussfaktor auf die Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen dar. Wird ZnCl₂ in der Konzentration von mindestens 10 µM während der Inkubation von rPra1 mit Lymphozyten zugegeben, wird die Bindung signifikant verbessert.

3.1.3 Zum Nachweis von gebundenem rPra1 auf CD4⁺ T-Zellen ist eine Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml rPra1 nötig

Nachdem die beste Konzentration an ZnCl₂ zur Verbesserung der Färbung von rPra1 auf CD4⁺ T-Zellen gefunden war, wurde im nächsten Schritt die optimale Konzentration von rPra1 bei der Inkubation mit Lymphknotenzellen zum Nachweis von gebundenem rPra1 an CD4⁺ T-Zellen ermittelt. Die höchste gewählte Konzentration von 10 µg/ml entspricht dabei der Konzentration rPra1, die standardmäßig in allen Versuchen zum Bindungsverhalten von rPra1 verwendet wurde. Eine höhere Konzentration von rPra1 konnte in der Titration nicht getestet werden, da die dafür benötigte Menge an rPra1 nicht zur Verfügung standen.

In der Konzentration von 1 µg/ml zeigte sich ein leichter Anstieg der MFI des Pra1-Signals, jedoch war erst ab 10 µg/ml eine Verschiebung der Kurve sichtbar (Abb. 11). Bei rPra1-Konzentrationen kleiner als 1 µg/ml konnte kein gebundenes rPra1 auf T-Zellen nachgewiesen werden.

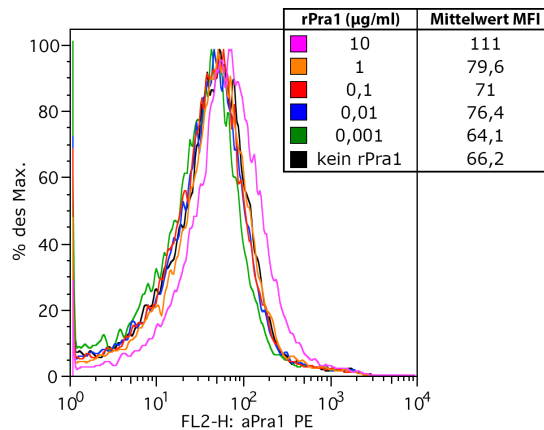


Abbildung 11: nach Inkubation von T-Zellen mit rPra1 ist gebundenes Pra1 nachweisbar auf CD4⁺ T-Zellen ab einer Konzentration von 10 µg/ml

Lymphknoten-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentration von rPra1 und jeweils 10 µM ZnCl₂ inkubiert.

Dargestellt sind lebende CD3⁺ CD4⁺ Zellen. Die Färbung wurde mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum durchgeführt.

Für eine Aussage über das Vorhandensein einer Bindung von Pra1 an T-Zellen ist damit mindestens eine rPra1-Konzentration von 10 µg/ml nötig.

3.1.4 Die Menge des an CD4⁺ T-Zellen der Maus gebundenen rPra1 steigt linear mit der Inkubationszeit und nimmt nach der Inkubation wieder ab

In Bindungsversuchen zuvor wurde stets eine Inkubation der CD4⁺ T-Zellen mit rPra1 von 30 min gewählt. Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens von rPra1 über die Zeit wurde die Kinetik der Bindung des rPra1 an CD4⁺ T-Zellen untersucht. Es wurden hierzu zwei verschiedene Ansätze gewählt: eine On- und eine Off-Kinetik.

Bei der On-Kinetik wurde überprüft, wie sich das Signal von gebundenem rPra1 an den Zellen verhält bei unterschiedlich langer Inkubation der Zellen mit gelöstem rPra1 (Abb. 12A).

Bei der Off-Kinetik wurden Lymphknotenzellen für 30 min mit 10 µg/ml rPra1 und 10 µM ZnCl₂ inkubiert und anschließend gewaschen. Die Zellen wurden dann gelagert bei 37°C (Abb. 12B) für unterschiedlich lange Zeiträume. Es sollte die Frage beantwortet werden, wie sich das Signal von gebundenem rPra1 auf den Zellen über die Zeit verhält.

Bei der On-Kinetik (Abb. 12A) zeigte sich eine konstante Zunahme von Zellgebundenem rPra1 auf den CD4⁺ T-Zellen. Die letzte Probe wurde 60 min nach Beginn der Inkubation entnommen und zu diesem Zeitpunkt war das Signal am stärksten bei etwa dem 2-fachen des Hintergrundsignals.

In allen weiteren Versuchen zum Bindungsverhalten von rPra1 wurde stets eine Inkubationszeit von 30 min verwendet.

Für die Off-Kinetik wurde bei einer Lagerung bei 37°C (Abb. 12B) ein Abfall des Signals über die Zeit beobachtet. Der Signalabfall zeigte sich annähernd linear und erreichte nach etwa 45 min das Signal des Hintergrundes. Nach 60 min nahm das Signal noch einmal gering zu und erreichte dann nach 90 min wieder das Niveau des Hintergrundsignals.

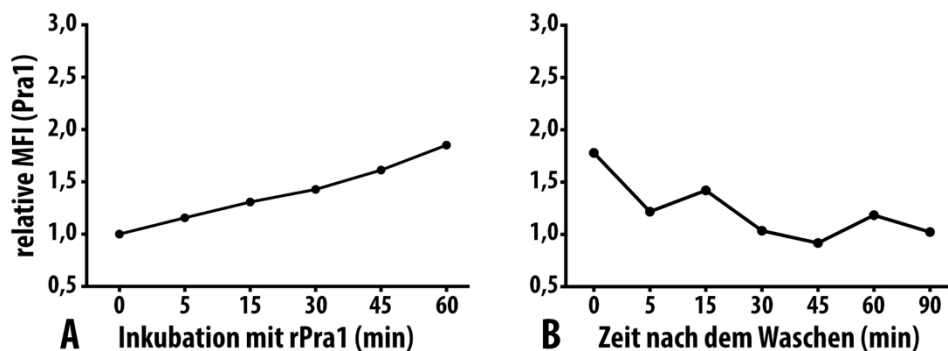


Abbildung 12: Das Signal von gebundenem rPra1 nimmt linear mit der Länge der Inkubation zu, nach Inkubation nimmt es nichtlinear wieder ab

A+B: Nachweis des rPra1 mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum. CD3⁺ CD4⁺ Zellen im Lebendgate. Gezeigt sind jeweils einzelne Experimente von jeweils zweien mit ähnlichem Ergebnis.

A: on-Kinetik bei 37°C. Gepoolte Lymphknoten-Zellen wurden unterschiedlich lange mit 10 µg/ml rPra1 ohne ZnCl₂ bei 37°C inkubiert. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

B: off-Kinetik bei 37°C. Nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml rPra1 und 10 µM ZnCl₂ wurden die Zellen gewaschen und das Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum zugegeben nach unterschiedlich langer Lagerung der Zellen bei 37°C.

Es konnte also eine über die Zeit konstante Zunahme der Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. In der Off-Kinetik ergab sich ein Abfall des Signals von gebundenem rPra1 über die Zeit mit nur noch wenig nachweisbarem rPra1 an der Zelloberfläche nach 45 min.

3.2 CD55 ist nicht der Ligand für rPra1 auf Maus CD4⁺ T-Zellen

Im humanen System ist bekannt, dass Pra1 auf T-Zellen an CD46 (MCP) bindet (Arbeiten von Dr. Dasari und Prof. Peter Zipfel, unveröffentlichte Daten). Der MCP dient als Regulatorprotein auf der Zelloberfläche dem Schutz körpereigener Zellen vor Angriffen des Komplementsystems [83].

In der Maus wird CD46 jedoch nicht in T-Zellen exprimiert [84] und ist damit kein möglicher Bindungspartner für rPra1 auf CD4⁺ T-Zellen.

Ein weiterer Rezeptor, an den Pra1 bindet, ist CR3 (Mac-1) [79]. Jedoch kann auch dieser Ligand nicht die Bindung an CD4⁺ T-Zellen erklären, da diese keinen CR3 exprimieren.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen CD46 mit dem Proteom der Maus konnten jedoch Proteine mit ähnlicher Struktur gefunden werden (Tab. 7).

Tabelle 7: Strukturverwandte Proteine der Maus im Vergleich zu humanem CD46 (MCP) in absteigender Übereinstimmung			
	Eintrag	E-Wert	Übereinstimmung
CD46 (MCP)	NP_034908.1	2E-122	46 %
CR1	AAA78271.1	2E-122	46 %
CR2	AAA37449.1	2E-38	35 %
Crry/p65	NP_038527.2	2E-32	34 %
CD55	AAH11314.1	1E-24	34 %
C4b-binding protein alpha-Kette	BAC75871.1	3E-24	33 %
Complement factor H precursor	NP_034018.2	1E-16	26 %

Durchgeführt mit BLASTp (Version 2.4.0+) und Datenbank-weiter Suche (alle nicht-redundanten GenBank CDS Translationen+PDB+SwissProt+PIR+PRF ausgenommen Environmental Samples aus WGS Projekten)

Die besten Kandidaten als Bindungspartner für rPra1 waren demnach Crry/p65, CR1, CR2, und CD55. In der Maus sind CR1 (auch CD35) und CR2 (auch CD21) Splice-Varianten voneinander. Beide werden von Mäusen nur von B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen exprimiert [85]. Damit kommen diese beiden Proteine nicht infrage zur Erklärung der gefundenen Bindung an CD4⁺ T-Zellen. Crry/p65 konnte durch Bindungsversuche mit Crry-Knockout-Tieren zuvor ausgeschlossen werden [1].

Von Seiten der Homologie und auch funktionell blieb so zunächst mit dem Oberflächenprotein CD55 ein weiterer vielversprechender möglicher Bindungspartner für rPra1 übrig.

Die Bindung von rPra1 wurde überprüft mit Lymphknotenzellen von CD55-KO-Mäusen. Der Phänotyp der Mäuse wurde jeweils vorher überprüft durch Färbung von CD55 (Abb. 13).

Nur Zellen wildtypischer Mäuse (Positivkontrolle) zeigten ein CD55-Signal. Die Negativkontrolle wurde erstellt durch Färbung von wildtypischen LK-Zellen,

jedoch wurden die Zellen nicht mit einem anti-CD55-Antikörper inkubiert, sondern stattdessen mit PBS.

CD55-Knockout-Tiere zeigten kein Signal für CD55, ähnlich der Negativkontrolle. Der Phänotyp als CD55-Knockout war somit bestätigt.

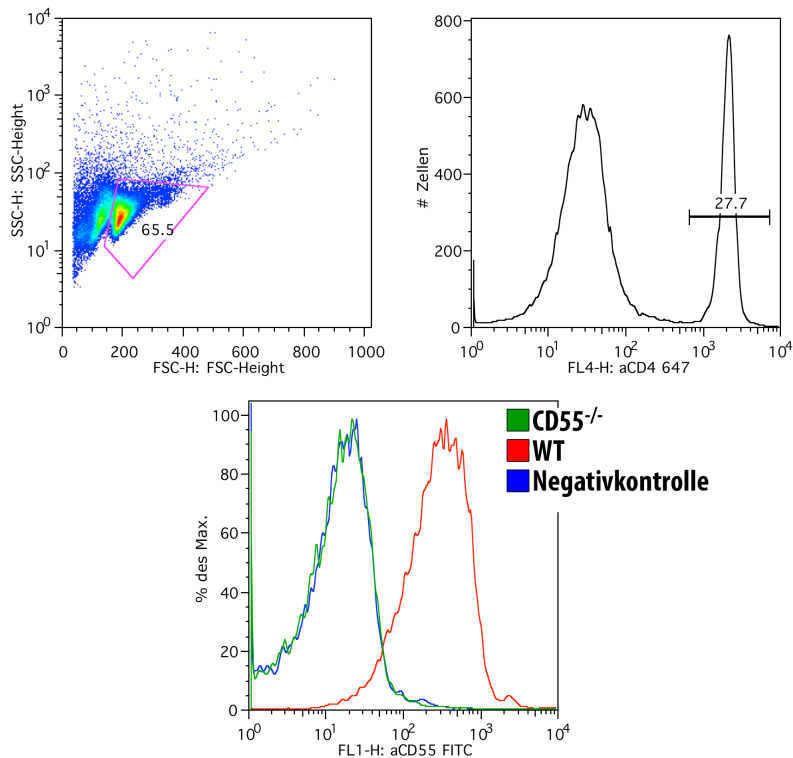


Abbildung 13: Bestätigung des Phänotyps der CD55^{-/-}-Tiere

Zur Bestätigung des Knockouts wurde CD55 auf gepoolten Lymphknotenzellen gefärbt. Als Positivkontrolle dienten Zellen einer wildtypischen Maus („WT“). Die Negativkontrolle wurde erstellt durch das Weglassen des anti-CD55-mAk bei der Färbung von wildtypischen Zellen. Gezeigt sind CD4⁺ Zellen im Lebendgate. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Die Inkubation mit rPra1 und Färbung dessen wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben. Es wurde jeweils eine Positivkontrolle mit Zellen wildtypischer Tiere angefertigt. In drei analysierten Tieren konnte im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen keine Reduktion der Färbung von Pra1 festgestellt werden (Abb. 14A). Die Färbung des Pra1 auf CD55-KO-Zellen schien im Vergleich mit wildtypischen T-Zellen sogar leicht verbessert zu sein (Abb. 14B). Allerdings blieb die Verbesserung der Bindungsfähigkeit von rPra1 an CD55^{-/-} T-Zellen insignifikant, eventuell da die Stichprobe mit nur drei Tieren zu klein war.

Eine Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen von CD55-Knockout-Mäuse konnte somit erfolgreich durchgeführt werden. Damit konnte auch CD55 als potentieller Bindungspartner auf CD4⁺ T-Zellen für rPra1 ausgeschlossen werden.

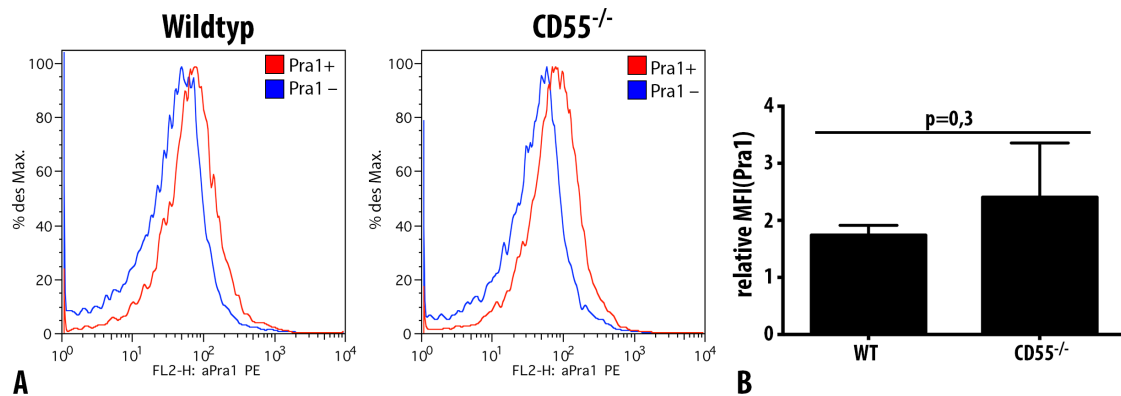


Abbildung 14: rPra1 kann an CD55^{-/-} CD4⁺ Zellen binden

A: Lymphknotenzellen eines CD55-KO-Tiers und einer wildtypischen Maus im Vergleich. Die Inkubation der Zellen wurde unter etablierten Bindungsbedingungen mit rPra1 ohne zugegebenes ZnCl₂ durchgeführt. Gezeigt sind lebende CD4⁺ Zellen. Nachweis des rPra1 durch polyklonales Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum.

B: Analyse der Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Experimenten, getestet wurde mit einem zweiseitigen T-Test.

Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Auch der Effekt von ZnCl₂ auf die Pra1-Färbung wurde in CD55-KO-Tieren überprüft. Dies erfolgte wie bereits zuvor durch Zugabe von ZnCl₂ während der Inkubation der Zellen mit rPra1 (Abb. 15).

Auch bei den Zellen von CD55-Knockout-Tieren ließ sich eine Verbesserung der Färbung von rPra1 durch Steigerung der Konzentration von ZnCl₂ auf 100 µM nachweisen (jedoch nicht signifikant). Diese konzentrationsabhängige Verbesserung der Färbung durch ZnCl₂ entspricht dem Ergebnis, das wildtypische Zellen gezeigt hatten.

Die Bindung von rPra1 an CD55-KO-Zellen war signifikant in An- und Abwesenheit von ZnCl₂.

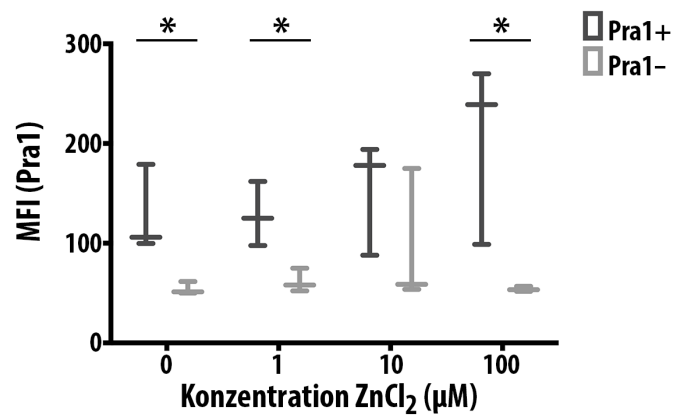


Abbildung 15: Zink verbessert die Bindung von rPra1 auch an CD55^{-/-} CD4⁺ T-Zellen

rPra1 wurde inkubiert mit Lymphknotenzellen von CD55^{-/-}-Mäusen, ZnCl₂ wurde in Lösung während der Inkubation zugegeben. Pra1 wurde durch Färbung mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten und die absolute Streuung der Werte von CD3⁺ CD4⁺ Zellen im Lebendgate.

CD4⁺ T-Zellen aus CD55^{-/-} Mäusen konnten rPra1 binden. Tendenziell schienen T-Zellen aus CD55-Knockout-Tieren sogar besser an rPra1 binden zu können als wildtypische T-Zellen. Die Bindung an CD55-KO-T-Zellen kann, wie zuvor in wildtypischen CD4⁺ T-Zellen, verbessert werden durch Zugabe von Zink.

3.3 Untersuchung des Bindungsverhaltens von wildtypischem Pra1

3.3.1 Lymphozyten aus *C. albicans*-infizierten Mäusen besaßen kein gebundenes Pra1 auf ihrer Zelloberfläche

Nach Charakterisierung der Bindungsfähigkeit von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen stellte sich die Frage, ob sich auch wildtypisches Pra1 gebunden an CD4⁺ T-Zellen nachweisen lässt. Es schloss sich nach den in vitro-Versuchen ein in-vivo-Experiment an. Hierzu wurden Mäuse für 3 Tage oral mit einem Antibiotikum (Cefoperazon 0,5 mg/ml im Trinkwasser) vorbehandelt und anschließend mit einer oralen Dosis *C. albicans* „infiziert“. Durch die reduzierte bakterielle Standortflora im Gastrointestinaltrakt kann der Pilz wachsen und die freie Nische besetzen. Nach jeweils 4 und 14 Tagen wurden Proben aus dem lymphatischen Gewebe entnommen und CD4⁺ T-Zellen auf das Vorhandensein von gebundenem

Pra1 untersucht. Gemessen wurde, ob sich gebundenes Pra1 auf isolierten CD4⁺ T-Zellen nachweisen lässt. Die Hypothese war, dass die Hefen im Gastrointestinaltrakt in die pathogene und invasiv wachsende Hyphenform übergehen und dabei Pra1 sezernieren. Dieses sezernierte Pra1 würde dann an CD4⁺ T-Zellen binden, die sich entweder in der direkten Umgebung des Pilzes (Lamina propria des Darms oder mesenteriale Lymphknoten) oder eventuell sogar weiter entfernt in der Milz oder in oberflächlichen Lymphknoten befinden.

Das Experiment wurde durchgeführt durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ilse Jacobsen am Hans-Knöll-Institut Jena. Die tatsächliche Belastung der Tiere mit *C. albicans* wurde durch die Arbeitsgruppe gemessen.

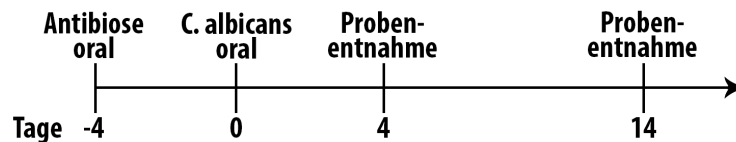


Abbildung 16: Ablauf des in vivo-Versuchs

4 Tage vor Versuchsbeginn wurden Tiere mit dem Antibiotikum Cefoperazon (0,5 mg/ml) im Trinkwasser behandelt, um die residente Bakterienflora im Darm zu beseitigen. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere oral infiziert mit *C. albicans* (5×10^8 Zellen/ml im Trinkwasser) des Stammes pAct1::luc(opt). Proben wurden entnommen an Tag 4 und 14 nach „Infektion“.

C. albicans-Kolonien als Zeichen der tatsächlichen Besiedlung der Mäuse mit Hefen konnten durch Sven Rudolphi (Hans-Knöll-Institut, Jena) nach Sektion der Tiere sowohl im Gewebe von Magen, Dünndarm, Zökum und Kolon als auch im luminalen Inhalt dieser Gewebe nachgewiesen werden. Mittelwerte der Konzentration lagen im Gewebe zwischen 10^4 und 10^5 koloniebildende Einheiten/g Gewebe und luminal bei etwa 10^6 koloniebildende Einheiten/g Material.

Beispielhaft zeigt Abb. 17 die Ergebnisse für ein Tier (Proben an Tag 4 entnommen) mit scheinbar hohen Signalen für Pra1 innerhalb der CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina propria. Dieses Signal wurde jedoch gemessen sowohl in Proben von Tieren, die *C. albicans* oral verabreicht bekommen hatten als auch in Kontrolltieren, die kein *C. albicans* erhalten hatten. Die Untersuchung der gleichen Proben auf gebundenes Pra1 mit einem monoklonalen anti-Pra1-

Antikörper (Klon 8c3) ergab jedoch ein Signal, das vergleichbar war mit dem der Negativkontrolle.

In der Milz und in peripheren Lymphknoten wurden mit dem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum leicht erhöhte Pra1-Signale gemessen. Auch diese erhöhten Messwerte ließen sich nicht nachweisen mit dem monoklonalen Antikörper.

Die Positivkontrolle wurde durchgeführt mit Lymphknotenzellen eines nicht infizierten Tieres. Lymphozyten wurden wie in Bindungsexperimenten zuvor mit rPra1 inkubiert und anschließend parallel zu den anderen Proben gefärbt und gemessen. Sowohl mithilfe des Kaninchenantiseraums als auch mit dem monoklonalen Antikörper konnte ein Signal gemessen werden.

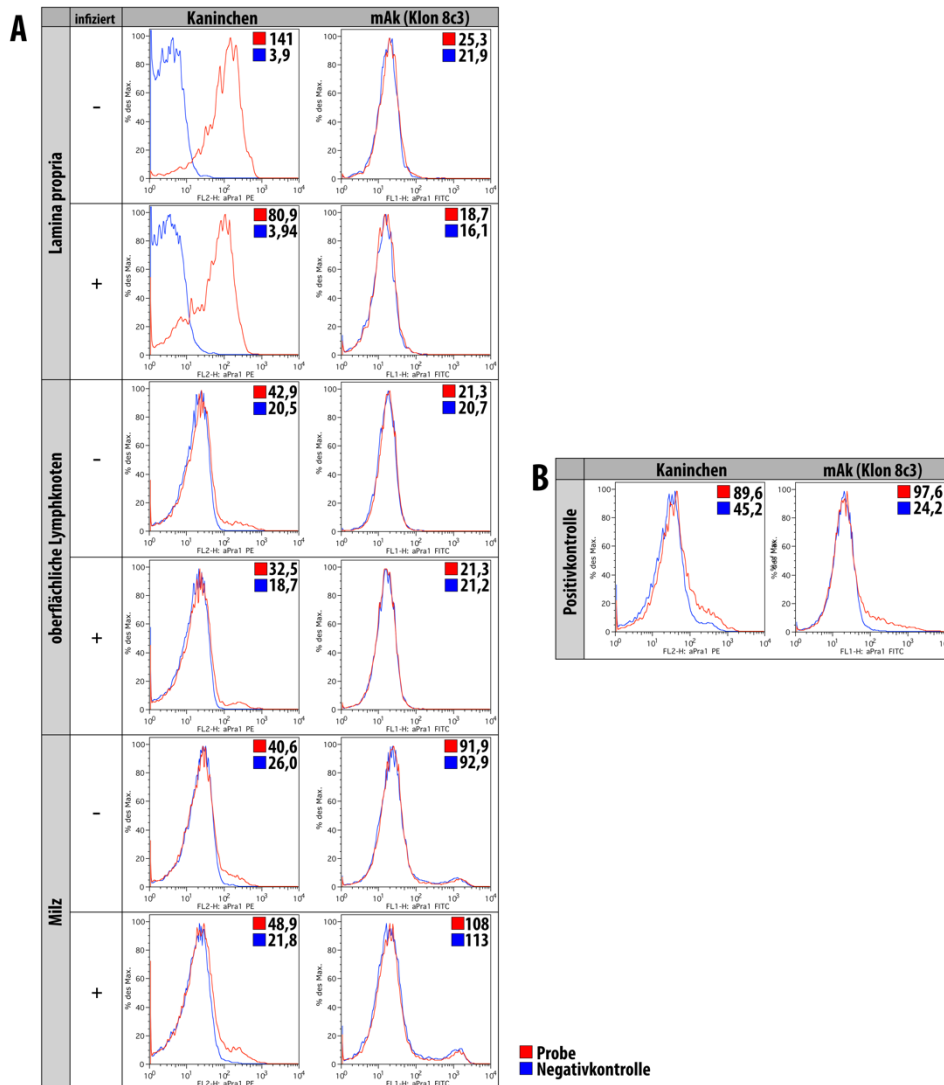


Abbildung 17: Färbung von Pra1 auf CD4⁺ T-Zellen der Maus nach in vivo Infektion mit C. albicans am Beispiel eines Tiers

A: Zeitpunkt der Probenentnahme der gezeigten Proben 4 Tage nach oraler Gabe von C. albicans. Dargestellt sind die Histogramme jeweils eines Tiers, das eine orale Dosis C. albicans bekommen hat („infiziert“) und zum Vergleich eines Kontrolltiers, das C. albicans nicht erhalten hat („nicht infiziert“). Werte im Histogramm zeigen die MFI des Pra1.

B: Als Positivkontrolle wurden Lymphknotenzellen eines nicht-infizierten Tiers mit 10 µg/ml rPra1 inkubiert und parallel zu den untersuchten Proben gefärbt.

Die Färbung der Pra1 wurde durchgeführt mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum bzw. monoklonalem anti-Pra1-Antikörper (Klon 8c3).

Gezeigt sind CD3⁺ CD4⁺ Zellen im Lebendgate.

In der Übersicht aller genommenen Proben (Abb. 18) wurde mit dem Kaninchen-Antiserum ein starkes Signal gemessen in CD4⁺ T-Zellen der Lamina propria. In

Proben von Tag 4 lag das Signal sogar erheblich höher als in Proben von Tag 14. Auch in T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten wurde ein starkes Signal gefunden, jedoch standen hier nur wenige Proben und wenige Zellen zur Verfügung. Bei Zellen aus oberflächlichen Lymphknoten oder der Milz wurden mit dem anti-Pra1-Antiserum keine starken Signale gemessen.

Mithilfe des monoklonalen Antikörpers konnte ebenfalls in peripheren Lymphknoten oder der Milz kein positives Signal für Pra1 gemessen werden. In den Proben von Tag 4 lagen jedoch die Werte von Zellen aus der Lamina propria und mesenterialen Lymphknoten etwas höher als in Zellen von nicht infizierten Tieren. Bei Zellen aus mesenterialen Lymphknoten muss jedoch auch hier bemerkt werden, dass nur wenige Zellen zur Verfügung standen und das Ergebnis daher sehr kritisch beurteilt werden muss.

Die Färbung des rPra1 als Positivkontrolle verlief in dieser Versuchsserie erfolgreich. Sowohl an Tag 4 als auch an Tag 14 wurden gute Signale für Pra1 gemessen. Dies trifft auch zu für den monoklonalen anti-Pra1-Antikörper (Klon 8c3).

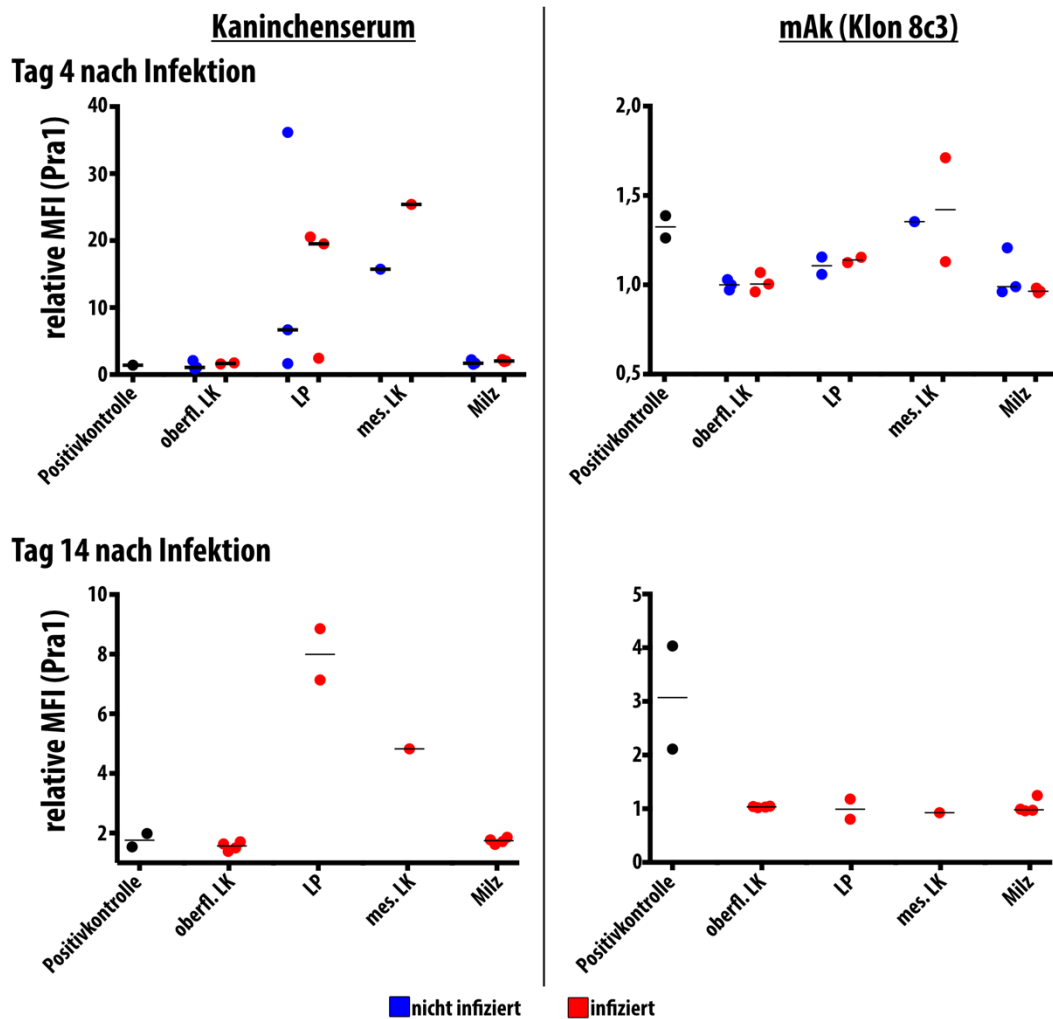


Abbildung 18: Färbung von Pra1 auf CD4⁺ T-Zellen der Maus nach in-vivo-Infektion mit *C. albicans*

LP: Lamina propria; **mes. LK:** mesenteriale Lymphknoten; **oberfl. LK:** oberflächliche Lymphknoten (gesammelte Zellen aus zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten)

Probenentnahme am 4. (oben) bzw. 14. Tag (unten) nach Infektion der Tiere.

Die Positivkontrolle wurde erstellt an Tag 4 mit Lymphknotenzellen von nicht infizierten Tieren, an Tag 14 mit Lymphknotenzellen von infizierten Tiere. Zellen wurden hierzu mit 10 µg/ml rPra1 inkubiert und anschließend parallel zu den Proben gefärbt.

Die Färbung wurde durchgeführt mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum bzw. monoklonalem anti-Pra1-Antikörper (Klon 8c3). Dargestellt sind CD3⁺ CD4⁺-Zellen im Lebendgate.

Alle Proben wurden nach der Färbung über Nacht in 1,8% Formaldehyd fixiert und am Folgetag am Durchflusszytometer untersucht.

Gezeigt sind einzelne Daten und der Mittelwert.

Es konnten erhöhte Messwerte in Zellen der Lamina propria und der mesenterialen Lymphknoten gemessen werden. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede der Messwerte zwischen mit *C. albicans* infizierten und nicht-infizierten Tieren. Von einem spezifischen Signal durch Zell-gebundenes Pra1 ist daher nicht auszugehen. In Lymphozyten der Milz und oberflächlichen Lymphknoten ergaben sich keine Hinweise für gebundenes Pra1.

3.3.2 Zellkulturüberstand von *C. albicans*-Kulturen zeigt im Western Blot ein Signal für Pra1 und bindet an CD4⁺ T-Zellen

Eine Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen konnte zuvor gezeigt werden. Es sollte nun untersucht werden, ob auch wildtypisches Pra1 an CD4⁺ T-Zellen binden kann.

Es wurden Zellkulturüberstände von *C. albicans*-Kulturen mit Zellen aus Lymphknoten der Maus inkubiert. Sollte in dem Proteingemisch aus sezernierten Proteinen von *C. albicans* wildtypisches Pra1 vorhanden sein, könnte dies an die CD4⁺ T-Zellen binden und ließe sich durch die zuvor erprobten Antikörper nachweisen.

Zunächst wurde in dem Proteingemisch der Pilzkulturen überprüft, ob darin Pra1 enthalten ist. Es standen sezernierte Proteingemische von wildtypischen *C. albicans*-Kulturen und zur Negativkontrolle von Pra1-Knockout-*C. albicans* zur Verfügung [86]. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes Pra1 verwendet.

Die Proben wurden titriert, auf ein Elektrophoresegel aufgetragen und nachfolgend mit Hilfe eines Western Blots auf das Vorhandensein von Pra1 untersucht. Als Antikörper zur Detektion wurde das Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum verwendet, das zuvor erfolgreich durch die Arbeitsgruppe von Prof. Zipfel auf Bindungsfähigkeit auch an wildtypisches Pra1 im Western Blot überprüft worden war.

Wie Abb. 19 zeigt, fanden sich in der Positivkontrolle in der höchsten eingesetzten Konzentration des rPra1 zwei deutliche Banden: bei ca. 60 und 120 kDa.

In den Zellkulturüberständen von wildtypischen *C. albicans* konnten ebenfalls zwei Banden ausgemacht werden: bei 130 und 180 kDa. Diese Banden schwächten passend zur Titration der Proben ab. Jedoch fanden sich die gleichen Banden — wenn auch erheblich schwächer — in den Proben der Pra1-Knockout-*C. albicans*-

Kultur. Da in diesen Kulturüberständen kein Pra1 enthalten war, zeigt das Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum hier möglicherweise eine Kreuzbindung zu anderen Pilzproteinen als Pra1.

Die gefundene Doppelbande in den Proben der Überstände der wildtypischen *C. albicans*-Kultur könnte theoretisch durch die Bildung von Tri- und Tetramere von Pra1 erklärt werden, zu denen sich wildtypisches Pra1 zusammenlagern könnte.

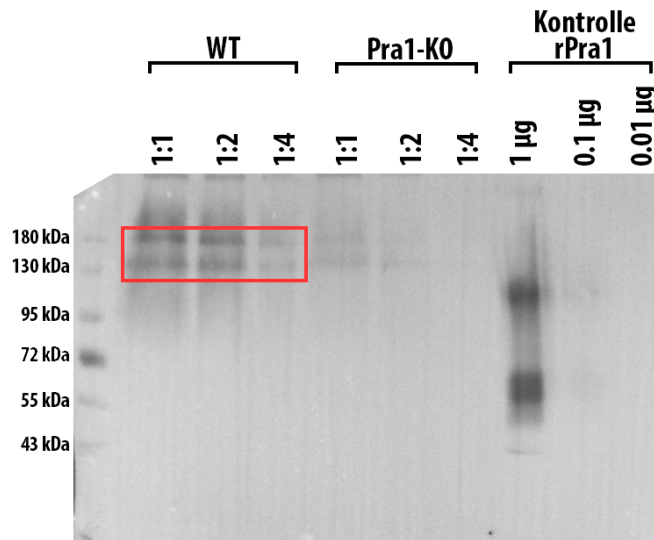


Abbildung 19: Nachweis von wildtypischem Pra1 im Western Blot

Sezernierte Proteine wildtypischer („WT“) und Pra1-KO-Kulturen („Pra1-KO“) wurden in angegebener Verdünnung in PBS auf das Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle diente rPra1. Pra1 wurde detektiert mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum, der Blot wurde hierzu 10 min belichtet.

Im Folgenden wurden Bindungsversuche mit den Gemischen der sezernierten Proteine aus wildtypischen und Pra1-Knockout-Kulturen durchgeführt. Es wurden wieder Lymphknotenzellen der Maus verwendet und unter gleichen Bedingungen wie bereits beschrieben mit den Kulturüberständen von *C. albicans* inkubiert. Anschließend wurde das Bindungsverhalten mit dem polyklonalen anti-Pra1-Antiserum und zum Vergleich mit einem monoklonalen anti-Pra1-Antikörper (Klon 1E12) untersucht. Auch dieser monoklonale Antikörper zeigte gute Bindungseigenschaften an gelöstes rPra1 und wurde hier alternativ zu dem sonst verwendeten monoklonale anti-Pra1-Antikörper Klon 8c3 verwendet.

Wie Abb. 20 exemplarisch zeigt, ließ sich durch das polyklonale Antiserum in den Kulturüberständen der wildtypischen *C. albicans*-Kultur, der Pra1-KO-Kultur und

der Positivkontrolle ein Signal messen, das stärker als das der Negativkontrolle war. Das Signal der Proben der wildtypischen *C. albicans*-Kultur lag am höchsten. Auch die Proben der Pra1-Knockout-*C. albicans*-Kultur zeigten höhere Werte als die Proben der Positivkontrolle. Bei der Untersuchung der Proben zeigte sich im Western Blot bereits eine Kreuzreaktivität des anti-Pra1-Antiserums mit anderen Pilzproteinen, die sich bei der Inkubation der Zellen mit den Überständen zu wiederholen schien.

Zur Färbung wurde in diesem Versuch außerdem ein anderer Klon des monoklonalen anti-Pra1-Antikörpers verwendet als zuvor. Der Klon 1E12 zeigte zuvor gute Bindungsfähigkeit an gelöstes Pra1, konnte jedoch in keiner Probe ein deutlich erhöhtes Signal für zellgebundenes Pra1 messen. Da auch die Positivkontrolle negativ blieb, muss hier davon ausgegangen werden, dass der gewählte Antikörper kein zellgebundenes Pra1 nachweisen konnte.

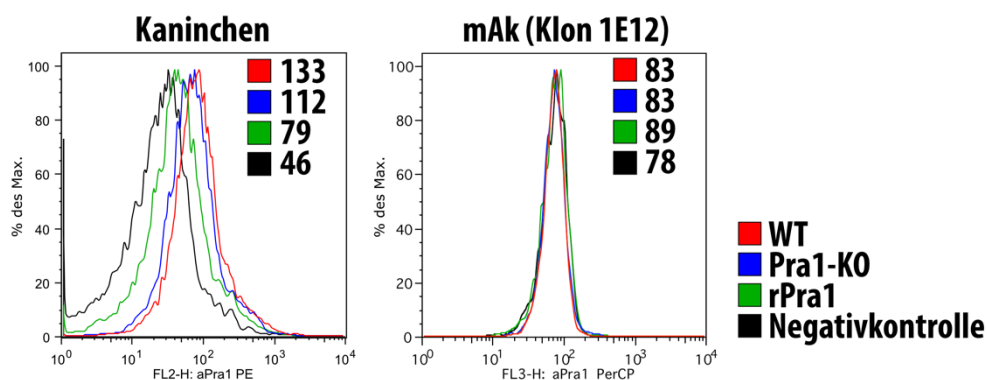


Abbildung 20: sezernierte Proteine von *C. albicans* binden an CD4⁺ T-Zellen der Maus

Sezernierte Proteine wurden mit wildtypischen Lymphknotenzellen der Maus inkubiert. Die Proteingemische entstammten wildtypischen *C. albicans*-Kulturen („WT“) und Pra1-KO-*C. albicans*-Kulturen („Pra1-KO“). Die Positivkontrolle („rPra1“) entspricht Zellen inkubiert mit rPra1 wie zuvor. Zellen der Negativkontrolle wurden inkubiert lediglich in PBS.

Pra1 wurde gefärbt durch polyklonales Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum bzw. durch monoklonalen anti-Pra1-Antikörper (Klon 1E12). Dargestellt sind lebende CD3⁺ CD4⁺ Zellen. Die Zahlen entsprechen der gemessenen MFI des Pra1-Signals.

In der Zusammenschau der Experimente (Abb. 21) fanden sich die höchsten Signale bei den sezernierten Proteinen aus wildtypischen *C. albicans*-Kulturen. Jedoch führten auch die Überstände der Pra1-KO-Kulturen nach Inkubation mit

T-Zellen zu einer deutlichen Bindung des anti-Pra1-Antiserums auf CD4⁺ T-Zellen. Diese Werte lagen jeweils recht deutlich über denen der Positivkontrolle (10 µg/ml rPra1).

Auch die Zugabe von ZnCl₂ während der Inkubation der Zellen mit den Kulturüberständen wurde getestet (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich hier die bereits bekannte Zunahme des Signals bei Bindung von rPra1 an T-Zellen. Durch die Erhöhung der Konzentration von ZnCl₂ blieb die Signalstärke von gebundenem Pra1 in wildtypischen Proben jedoch in etwa konstant, was daran liegen könnte, dass die Zellkulturüberstände bereits mit ZnCl₂ gesättigt waren. Auch das Signal der Überstände der Pra1-KO-Kulturen blieb unverändert durch die Zugabe von Zink.

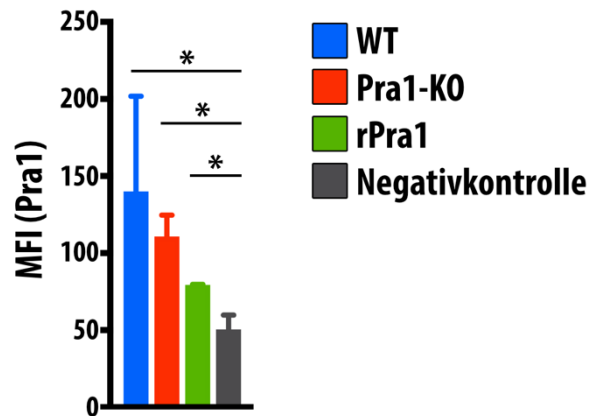


Abbildung 21: sezernierte Proteinen von *C. albicans* binden an CD4⁺ T-Zellen der Maus

Wildtypische Lymphknotenzellen der Maus wurden beladen mit einem Gemisch sezernierter Proteine von wildtypischen und Pra1-KO-Pilzkulturen. Als Positivkontrolle wurden Zellen inkubiert mit rPra1 wie zuvor. Zellen der Negativkontrolle wurden inkubiert lediglich in PBS. Es wurde kein Zink zugegeben.

Pra1 wurde gefärbt mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der MFI(Pra1) lebender CD3⁺ CD4⁺ Zellen.

Es wurden 2 Chargen von Überstände der Pilzkulturen in insgesamt 3 Experimenten verwendet. Getestet wurde mit einseitigem T-Test: * $p < 0,05$

Die untersuchten Zellkulturüberstände von *C. albicans* zeigten im Western Blot eine Doppelbande, was durch vorhandenes wildtypisches Pra1 erklärt werden könnte, das sich zu Tri- und Tetrameren zusammengelagert hat. Diese Tri- und Tetramere könnten bei Bindung an CD4⁺ T-Zellen die gefundenen erhöhten

Signale innerhalb der wildtypischen Proben im Vergleich zu rekombinantem Pra1 erklären. Das rPra1 liegt in Mono- und Dimeren vor und besitzt so weniger Bindungsstellen für das anti-Pra1-Antiserum, wodurch sich eventuell die schwächere Färbung des rekombinanten Pra1 erklären lässt.

3.4 Rekombinantes Aspf2 kann im Gegensatz zur rPra1 nicht an CD4⁺ T-Zellen binden

Um der Frage nachzugehen, ob auch andere Pilzproteine die Fähigkeit besitzen, an T-Zellen zu binden, wurde ein ähnliches Protein gewählt: Aspf2 von *Aspergillus fumigatus*. Dieses Protein wird von dem Pilz ebenfalls sezerniert und besitzt eine Strukturähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit Pra1 von über 40% [56].

Aufgereinigtes rekombinantes Aspf2 (rAspf2) wurde ebenso wie zuvor rPra1 mit Lymphknotenzellen einer Maus inkubiert. Untersucht wurde die Bindung anschließend mit einem polyklonalen Maus-anti-Aspf2-Antiserum.

Die untersuchten CD4⁺ T-Zellen wurden wie zuvor im Lebendgate ausgewählt und als Histogramm des rAspf2-Signals dargestellt (Abb. 22A). Das Signal der Färbung von gebundenem rAspf2 lag nicht höher als das der Negativkontrolle (Abb. 22B). Als Positivkontrolle wurde gleichzeitig mit Zellen der gleichen Maus eine Bindungskontrolle mit rPra1 durchgeführt. rPra1 zeigte eine gute Bindung an CD4⁺ T-Zellen (Abb. 22C). Dieses Ergebnis fand sich in drei unabhängigen Versuchen.

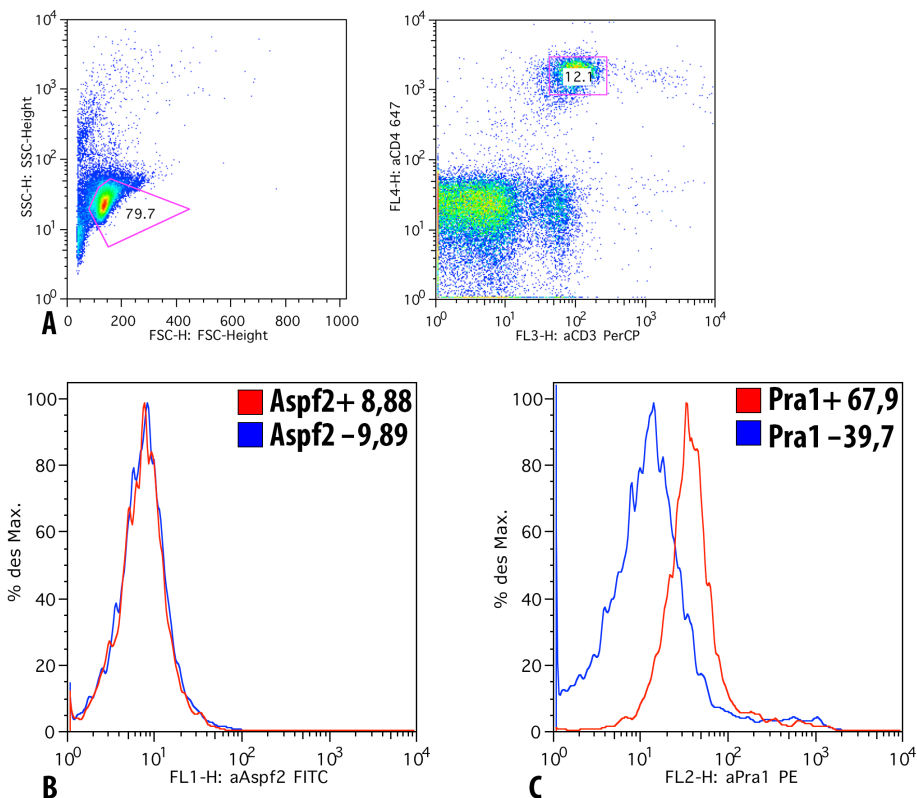


Abbildung 22: Aspf2 bindet nicht an CD4⁺ T-Zellen der Maus

A: Die untersuchten Zellen wurden im Lebendgate als CD3⁺ CD4⁺ Zellen ausgewählt.

B: Die Färbung mit polyklonalem Maus-anti-Aspf2-Antiserum zeigt kein erhöhtes Signal im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Zellen der Negativkontrolle („Aspf2-“) wurden nur in PBS inkubiert.

C: Die taggleiche Positivkontrolle mit rPra1 („Pra1+“) zeigt eine erfolgreiche Färbung im Vergleich zur Negativkontrolle („Pra1-“). Die Färbung erfolgte mit polyklonalem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum.

Ebenfalls wurde untersucht, ob die Zugabe von ZnCl₂ die Bindung von rAspf2 an die T-Zellen verbessern kann, wie bereits für rPra1 festgestellt. Ein nicht vorhandenes Signal durch eine zu schwache Bindung könnte so eventuell sichtbar gemacht werden.

Jedoch ließ sich auch durch die Zugabe von 10 μM ZnCl₂ kein Signal für gebundenes Aspf2 auf CD4⁺ T-Zellen nachweisen (Abb. 23). Die relative MFI des Aspf2-Signals blieb auch mit 10 μM ZnCl₂ bei etwa 1,0, sodass von einer Bindung von Aspf2 an CD4⁺ T-Zellen nicht ausgegangen werden kann.

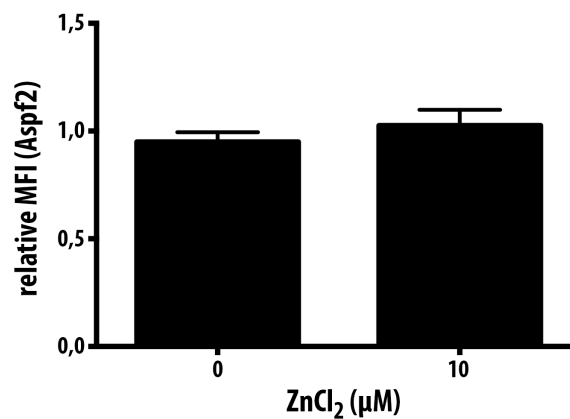


Abbildung 23: rAspf2 bindet nicht an CD4⁺ T-Zellen der Maus

Die Färbung mit polyklonalem Maus-anti-Aspf2-Antiserum zeigt eine relative MFI des Pra1-Signals von etwa 1,0. ZnCl₂ wurde während der Inkubation mit Aspf2 zugegeben, was die relative MFI(Pra1) nicht erhöhen konnte. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung der relativen MFI des Pra1-Signals (Signal der Probe dividiert durch Signal der Negativkontrolle). Die Daten stammen aus 3 Experimenten. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Rekombinantes Aspf2 kann damit, anders als rPra1, nicht an Maus-CD4⁺ T-Zellen binden. Eine eventuell schwache Bindung kann auch durch Zugabe von Zink während der Inkubation des rAspf2 mit LK-Zellen nicht gefunden werden.

3.5 rPra1 hat einen kostimulatorischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen

Nach Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden funktionelle Untersuchungen der Bindung von rPra1 an die T-Zellen durchgeführt. Es stellte sich die Frage, nachdem der Bindungspartner des Pra1 auf den T-Zellen nicht gefunden war, welche Reaktion die Bindung von rPra1 in T-Zellen auslösen würde. Hierzu wurden aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen verwendet und in vitro mit rPra1 inkubiert. Durch die Aufreinigung waren 93% aller inkubierten Zellen in dem in-vitro-Experiment CD4⁺ Zellen. Dies war nötig, da auch andere Zellen als CD4⁺ T-Zellen rPra1 binden können [59]. Der Einfluss von ZnCl₂ auf die Aktivierung und Proliferation wurde ebenfalls untersucht.

Abb. 24 zeigt exemplarisch ein Experiment: Ausgewertet wurden lebende Zellen (ausgewählt im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht), die den Oberflächenmarker CD4 trugen. Innerhalb dieser Zellen wurden jeweils die Marker CFSE (als Marker

der Zellteilung, [67]), CD25 (als Aktivierungsmarker, entspricht der α -Kette des IL-2-Rezeptors, [87]) und CD69 (früher Aktivierungsmarker, [88]) untersucht.

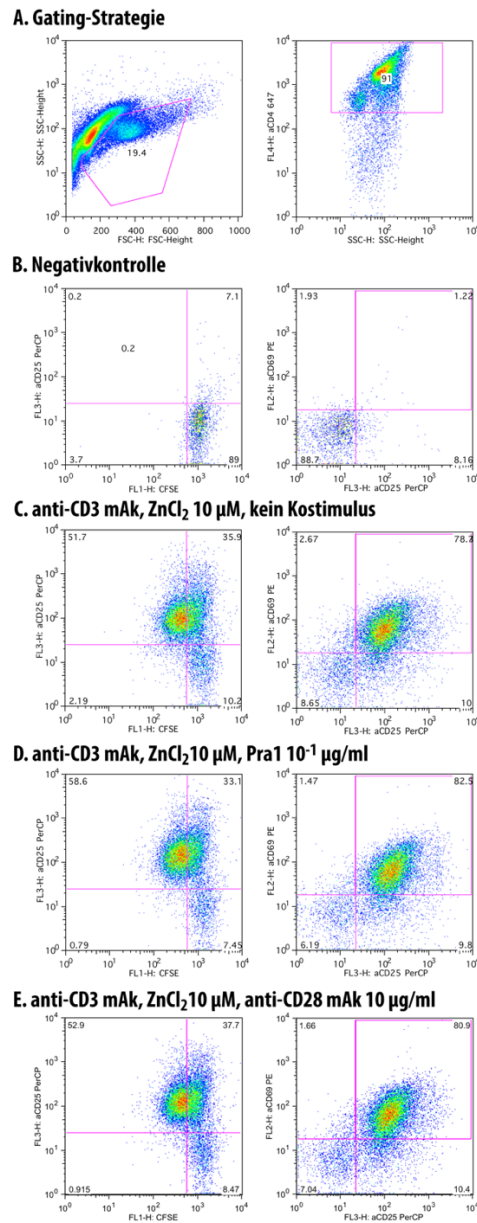


Abbildung 24: rPra1 wirkt als Kostimulator auf T-Zellen der Maus in vitro

A: Es wurden CD4⁺ Zellen im Lebendgate ausgewählt.

B: Die Negativkontrolle ohne beschichteten anti-CD3-mAk auf der Platte zeigt keine Zellaktivierung.

C: Zellen wurden aktiviert durch auf der Platte beschichteten anti-CD3-Antikörper in der Konzentration von 2,5 μ g/ml, Zink wurde mit 10 μ M in Lösung zugegeben.

D: Wie C, jedoch mit Pra1 als kostimulatorisches Signal in der Konzentration 10⁻¹ μ g/ml in Lösung zugegeben.

E: Wie C, jedoch mit anti-CD28 mAk als kostimulatorisches Signal in der Konzentration 10 μ g/ml in Lösung zugegeben.

Als Negativkontrolle wurden Zellen in Näpfe ausgesät, ohne diese vorher mit anti-CD3-mAk zu beschichten. Den Zellen fehlt damit die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor. Durch die Zugabe von kostimulatorischen Signalen wie anti-CD28-mAk zeigten sich kaum CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen. Zudem fanden sich nur wenige Prozent CD25⁺ CD69⁺ Zellen (Daten nicht gezeigt). Es scheint ohne anti-CD3-mAk keine Aktivierung von Zellen stattgefunden zu haben (Abb. 24 und 25).

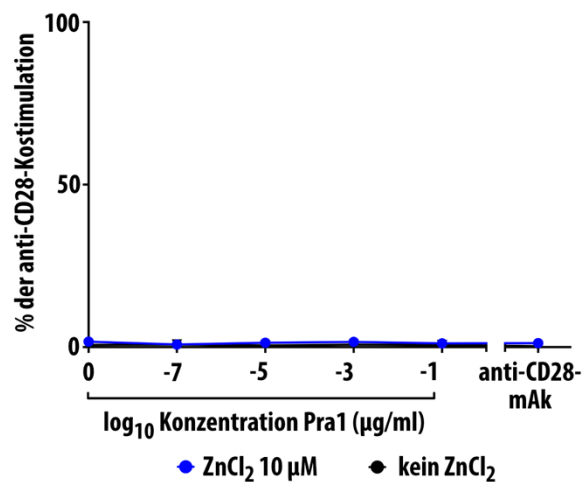


Abbildung 25: rPra1 hat keine Wirkung als 1. Signal auf T-Zellen der Maus in vitro

Es wurden CD4⁺- T-Zellen angereichert und ausgesät in Näpfe ohne beschichteten anti-CD3-mAk. Die Inkubation wurde für 3 Tage durchgeführt. ZnCl₂ und der Kostimulus wurden in Lösung zugegeben. Der anti-CD28-mAk diente als Positivkontrolle (10 µg/ml). Die Auswertung der Proliferation erfolgte durch Messung der CFSE-Verdünnung (CFSE^{niedrig} bedeutet Proliferation) und der CD25-Expression auf CD4⁺ T-Zellen. 0% der anti-CD28-Kostimulation entspricht dem Anteil der CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen nur in Medium, 100% entspricht dem Anteil der CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen mit Plattengebundenem anti-CD3-mAk. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Experimenten. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

In Gegenwart von plattengebundenem anti-CD3-mAk lässt sich in den Proben mit zugegebenem kostimulatorischen Signal ein konzentrationsabhängiger Anstieg der CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen durch Zugabe von rPra1 erkennen (Abb. 26, schwarze Kurve). Mit Zugabe von 10 µM ZnCl₂ (Abb. 26, blaue Kurve) lässt sich durch rPra1 in der höchsten verwendeten Konzentration (10⁻¹ µg/ml) eine Kostimulation der Zellen erreichen, die sogar höher lag, als die Kostimulation durch den anti-CD28-mAk.

Auch in der Auswertung der CD25⁺ CD69⁺ doppelt positiven Zellen (Daten nicht gezeigt) erkennt man einen Anstieg der Zellaktivierung um das etwa 1,5-fache. Hier wird eine Sättigung jedoch bereits bei niedriger Konzentration rPra1 (10⁻⁵ µg/ml) erreicht.

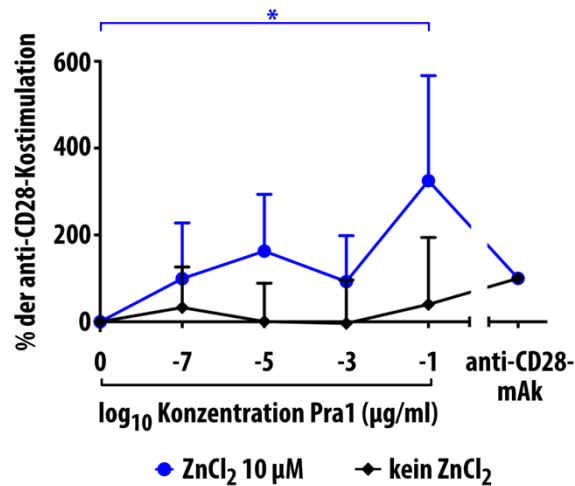


Abbildung 26: rPra1 wirkt als Kostimulator auf T-Zellen der Maus in vitro

Es wurden CD4⁺-T-Zellen angereichert, der anti-CD3-mAk wurde in der Konzentration von 2,5 µg/ml auf der Platte beschichtet. ZnCl₂ und der Kostimulator wurden in Lösung zugegeben. Die Positivkontrolle der Kostimulation wurde erstellt durch den anti-CD28-mAk (10 µg/ml, Klon E18). Die Inkubation erfolgte für 3 Tage. Die Proliferation der Zellen wurde ausgewertet durch Messung der CFSE-Verdünnung und der Expression von CD25 auf den CD4⁺ Zellen im Lebendgate. 0% der anti-CD28-Kostimulation entspricht dem Anteil der CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen bei nur anti-CD3-mAk, 100% entspricht dem Anteil an CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen bei anti-CD28-Kostimulation. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Experimenten. Getestet wurden mit einem zweiseitigen T-Test: * p<0,05. Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Wie beschrieben kann rPra1, nicht jedoch rAspf2 aus Aspergillus fumigatus, an T-Zellen binden. Nun wurde überprüft, ob die Beobachtung, dass rAspf2 nicht an T-Zellen binden kann, sich auch in fehlenden Effekten der funktionellen Untersuchungen widerspiegelt.

Es wurde der gleiche Ansatz gewählt wie zuvor für rPra1 und stattdessen rAspf2 in Lösung zugegeben in der Zellkultur. Nach 3 Tagen wurden die Zellen auf die gleichen Aktivierungsmarker untersucht wie bereits beschrieben.

In der Konzentration, in der rPra1 einen deutlichen Effekt zeigte (10⁻¹ µg/ml), fand sich für rAspf2 keine erhöhte Rate an CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen (Abb. 27, 0,1 µg/ml).

Auch in höheren Dosierungen von rAspf2 ließ sich keine Verstärkung der Zellaktivierung erreichen.

Betrachtet man die CD25⁺ CD69⁺ doppelt positiven Zellen (Daten nicht gezeigt) ergibt sich ein vergleichbares Bild: Bei der Konzentration von Pra1, die eine deutliche Verstärkung der Zellaktivierung erbrachte, fand sich in den Versuchen mit Aspf2 praktisch keine Verstärkung der Zellaktivierung.

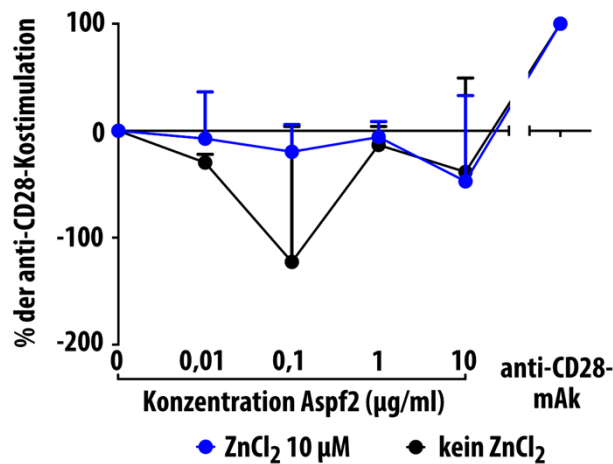


Abbildung 27: Aspf2 kann Maus T-Zellen in vitro nicht kostimulieren

Es wurden CD4⁺-T-Zellen angereichert, der anti-CD3-mAk wurde in der Konzentration von 2,5 µg/ml auf der Platte beschichtet. ZnCl₂ und der Kostimulus wurden in Lösung zugegeben. Die Positivkontrolle der Kostimulation wurde erstellt durch den anti-CD28-mAk (10 µg/ml, Klon E18). Die Inkubation erfolgte für 3 Tage. Die Proliferation der Zellen wurde ausgewertet durch Messung der CFSE-Verdünnung und der Expression von CD25 auf den CD4⁺ Zellen im Lebendgate. 0% der anti-CD28-Kostimulation entspricht dem Anteil der CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen bei nur anti-CD3-mAk, 100% entspricht dem Anteil an CFSE^{niedrig} CD25⁺ Zellen bei anti-CD28-Kostimulation. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Experimenten.

Es wurde durch Zugabe von rPra1 in Lösung kostimulatorische Aktivität beobachtet. Diese war konzentrationsabhängig und konnte durch Zugabe von 10 µM ZnCl₂, was der Serumkonzentration entspricht [82], deutlich verstärkt werden. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass rAspf2 nicht an T-Zellen binden kann (Abb. 22 und 23), ließ sich kein Effekt durch die Zugabe von rAspf2 hinsichtlich Aktivierung der T-Zellen finden.

3.6 rPra1 reduziert die Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Zellen

Nachdem festgestellt wurde, dass rPra1 eine kostimulatorische Aktivität auf CD4⁺ T-Zellen besitzt, wurde weiterhin der Einfluss der Bindung von rPra1 an T-Zellen auf die Sekretion von bestimmten Zytokinen untersucht. Die untersuchten Zytokine charakterisieren die Effektorfunktion der T-Zellen und spielen in der Abwehr von Pilzinfektionen eine große Rolle.

Die Lymphozyten wurden wie zuvor mit auf der Platte beschichtetem anti-CD3-mAk für 3 Tage bei 37°C inkubiert. rPra1 und als Positivkontrolle ein anti-CD28-mAk wurden in Lösung zugegeben. Anschließend wurde ein Teil des Überstandes der Näpfe entnommen und bei -80°C tiefgefroren.

In Vorexperimenten wurden Proben an allen drei Tagen abgenommen und analysiert. Die größte Menge sezernierter Zytokine zeigte sich für alle untersuchten Zytokine am dritten Tag, sodass anschließende Messungen nur am dritten Tag durchgeführt wurden.

Für IL-5, IL-10 und IL-6 wurde unter allen Bedingungen keine messbare Zytokinsekretion festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Für fünf der untersuchten Zytokine wurden messbare Sekretionen festgestellt: IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-17 und IL-4.

Über die gezeigten 5 Experimente war das Ausgangsniveau der Zytokinproduktion der Zellen um den Faktor 10, d.h. sehr unterschiedlich, verteilt, sodass die gemessenen Werte (Abb. 28, linke Spalte) auf das Niveau des Wertes ohne kostimulatorisches Signal normalisiert wurden (Abb. 28, rechte Spalte).

Eine signifikante Reduktion der Zytokinproduktion fand sich für IL-2, TNF- α und IL-4. Die verminderte Sekretion von IFN- γ blieb knapp unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,07$). 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ rPra1 hatten keinen Einfluss auf die Produktion von IL-17, erst 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ rPra1 reduzierten die Menge an IL-17 (nicht signifikant).

Der als Positivkontrolle eingesetzte anti-CD28-mAk induzierte in der Tendenz eine höhere IL-2-Produktion der anti-CD3-mAk-stimulierten CD4⁺ T-Zellen [18].

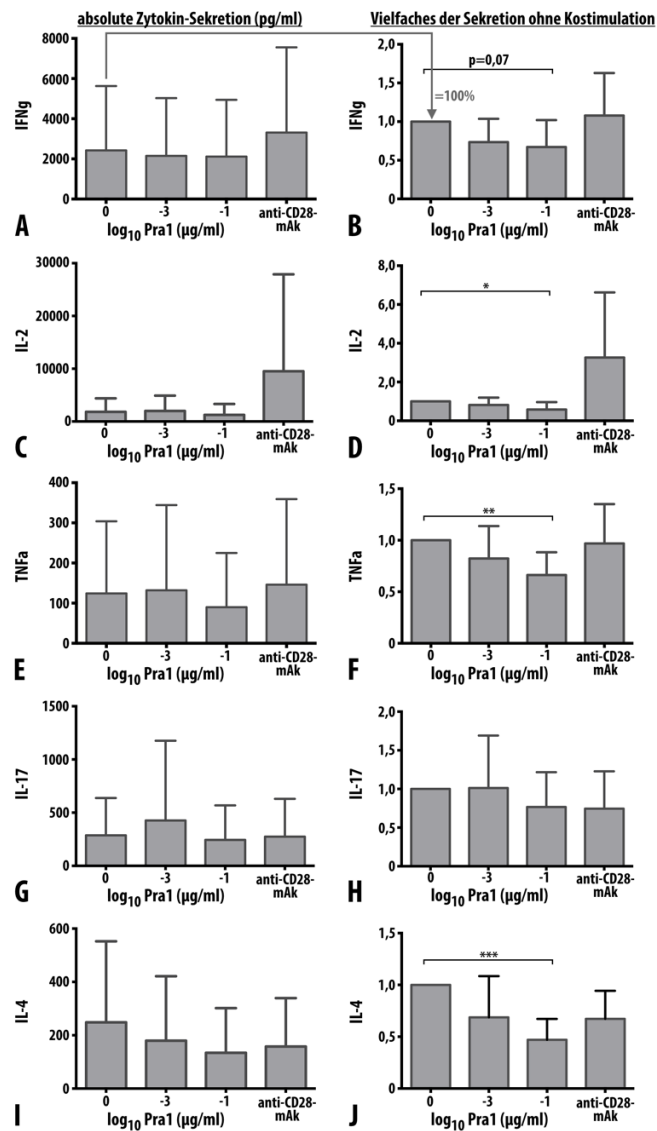


Abbildung 28: rPra1 reduziert Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Zellen der Maus in vitro

Angereicherte CD4⁺ T-Zellen wurden für 3 Tage kultiviert. Der anti-CD3-mÄk wurde in der Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ auf der Platte beschichtet. Der Kostimulus wurde in Lösung zugegeben. Die Positivkontrolle erfolgte mit dem anti-CD28-mÄk (10 $\mu\text{g/ml}$, Klon E18). Die Zytokinkonzentration wurde aus dem Überstand der Zellkultur gemessen.

Dargestellt sind in der linken Spalte Mittelwerte der absoluten Zytokinsekretion mit Standardabweichung und in der rechten Spalte normalisierte Werte der Zytokinsekretion als Vielfaches der Zytokinmenge des Wertes ohne Kostimulus. Die Daten entstammen 4 Experimenten.

Getestet wurde mit einem zweiseitigen T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Veröffentlicht in Bergfeld et al., 2017 [1].

Die Zugabe von rPra1 in Lösung zu Zellen, die durch auf der Platte beschichteten anti-CD3-mÄk aktiviert wurden, erbrachte eine konzentrationsabhängige und

signifikante Reduktion der Sekretion von IL-2, TNF- α und IL-4. Die Reduktion von IFN- γ war knapp nicht signifikant.

3.7 Während der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Effektorzellen in vitro reduziert rPra1 die Zahl an IFN- γ -produzierenden T-Zellen

Für die Abwehr gegen Pilze wie *C. albicans* sind Th1-Zellen (zusammen mit Th17-Zellen) die wichtigste Untergruppe der T-Helferzellen. Es wurde daher untersucht, ob rPra1 durch Bindung an T-Zellen eine Wirkung auf die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen besitzt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Lymphknotenzellen aus OT-II-Mäusen verwendet und die regulatorischen T-Zellen entfernt. Die Zellen wurden durch das OVA-Peptid (Aminosäuren 327-339), das auf antigenpräsentierende Zellen in MHC-II-Molekülen präsentiert wird, über den T-Zellrezeptor aktiviert und durch zugegebenes IL-12 zur Differenzierung zu Th1-Zellen gelenkt. Zur Reduktion der Differenzierung von Th2-Zellen wurde den Th1-Zellen ein anti-IL-4-Ak zugegeben. Als Kontrolle wurden Zellen nur durch das OVA-Peptid aktiviert (im Folgenden als Th0-Zellen bezeichnet).

Unter diesen Differenzierungsbedingungen wurden die Zellen für 5 Tage inkubiert und zur Untersuchung des Einflusses von Pra1 wurde rPra1 (10^{-3} $\mu\text{g/ml}$) zugegeben.

Nach 5 Tagen wurden die Zellen auf Marker von Th1-Zellen gefärbt (IFN- γ und T-bet).

Es fand sich im relativen Anteil der Th1-Zellen (Abb. 29A) ein unscharfes Bild, eventuell ist eine Abnahme der Th1-Zellen erkennbar. Die Frequenz an IFN- γ -produzierenden Zellen war nicht in allen Proben reduziert, sondern teilweise unbeeinflusst. Auch waren die Werte in den Wiederholungen sehr unterschiedlich. Bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen fiel jedoch auf, dass nach 5 Tagen Kultur weniger Th1-Zellen vorlagen (Abb. 29B). Hier zeigten sich durch zugegebenes rPra1 eine reduzierte Zahl an Th1-Zellen um etwa den Faktor 5. Die Reduktion der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen durch rPra1 war

signifikant nach Normalisierung der Werte auf das jeweilige Ausgangsniveau (Abb. 29C).

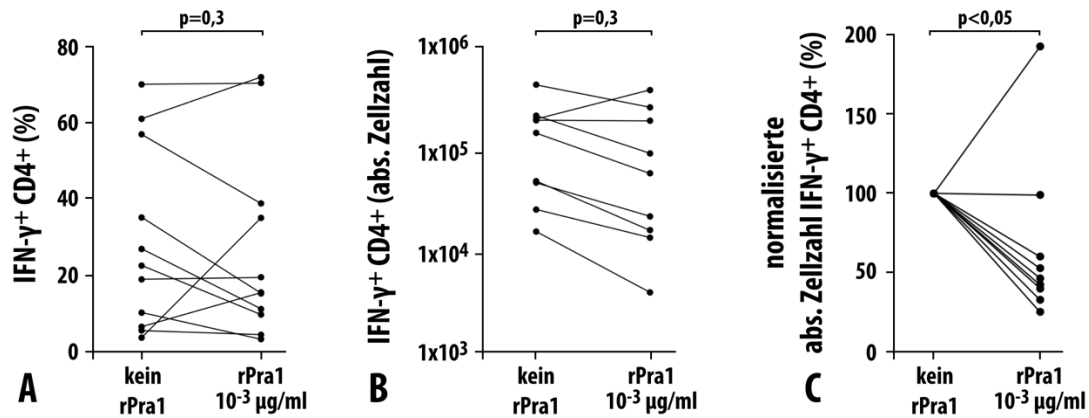


Abbildung 29: rPra1 reduziert Th1-Zellen nach Differenzierung naiver T-Zellen in vitro

A: prozentualer Anteil lebender Th1-Zellen nach Differenzierungskultur, **B:** absolute Th1-Zellzahl nach Differenzierungskultur, **C:** normalisierte absolute Th1-Zellzahl nach Differenzierungskultur

Zellen von OT-II-Mäusen wurden CD25-depletiert und 5 Tage in Kultur unter Differenzierungs-Bedingungen für Th1-Zellen gehalten (OVA-Peptid 1 µM, mIL-12 10 ng/ml, anti-mIL-4 10 µg/ml). Während der Kultur wurde rPra1 in der Konzentration von 10⁻³ µg/ml in Lösung zugegeben bzw. kein Pra1 zugegeben. Für die absolute Zellzahl zeigt sich nach Normalisierung der Ergebnisse eine Reduktion der Th1-Zellen (einseitiger T-Test).

Quelle: S. Werner, N. Beyersdorf

3.8 In CD4⁺ Th1-Zellen löst rPra1 keine Apoptose aus

Es stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus die Reduktion der IFN-γ-produzierenden T-Zellen durch rPra1 ausgelöst wird. Eine Erklärung könnte die Einleitung von Apoptose in CD4⁺ T-Zellen sein. Daher wurde untersucht, ob rPra1 durch die Bindung an CD4⁺ T-Zellen in diesen Zellen den Zelltod auslösen kann. Nach 5 Tagen Kultur unter Differenzierungsbedingungen für Th1-Zellen und als Negativkontrolle ohne zugegebene Zytokine als Th0-Zellen wurde vor Beginn der Apoptoseuntersuchung der entstandene Phänotyp der Zellen analysiert. Die Kultur zur Differenzierung der Zellen wurde wie zuvor durchgeführt, nur dass nun rPra1 nicht während der Differenzierung zugegeben wurde, sondern erst nachdem Th1- und Th0-Zellen differenziert waren.

Hierbei zeigte sich zur Bestätigung des Phänotyps der differenzierten Zellen nach der Vorkultur in Abb. 30 für Th1-Zellen ein großer Anteil an IFN- γ -produzierenden Zellen und ein hoher Anteil an T-bet-positiven Zellen. T-bet ist der Transkriptionsfaktor, der zur Bildung des Th1-Phänotyps notwendig ist [29]. Innerhalb der Th0-Zellen produzierten nur wenige Zellen IFN- γ . Auch der Anteil an T-bet-positiven Zellen blieb sehr gering.

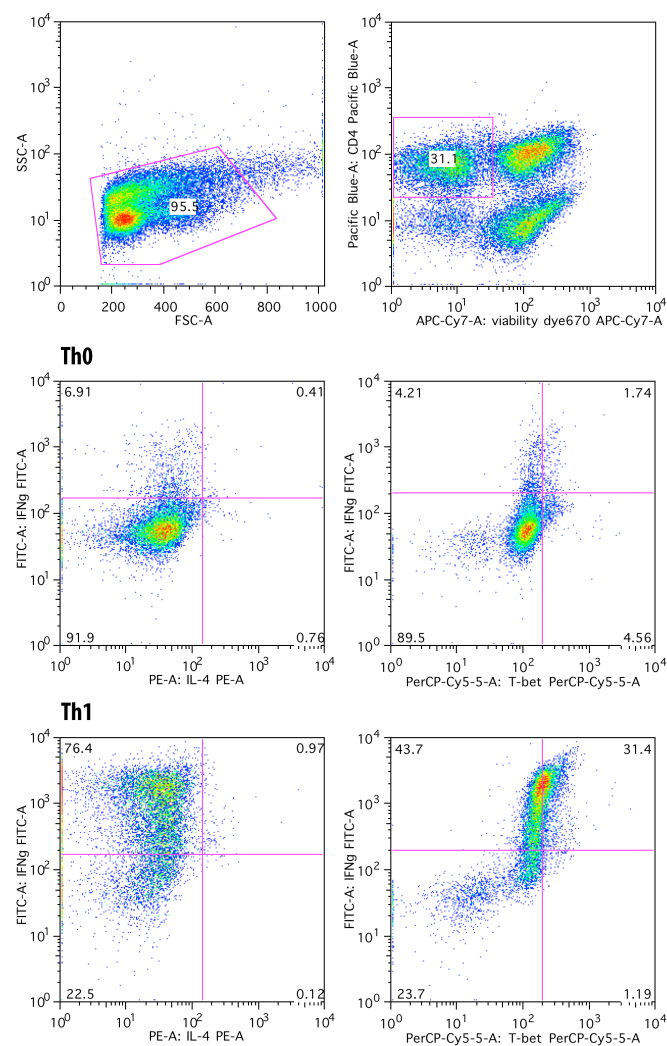


Abbildung 30: Kontrolle des Phänotyps der Zellen nach Differenzierungskultur
 Lymphknoten- und Milzzellen von OT-II-Mäusen für 5 Tage in Kultur unter Differenzierungsbedingungen (Th0: OVA-Peptid 1 μ M; Th1: OVA-Peptid 1 μ M, mL-12 10 ng/ml, anti-mIL-4 10 μ g/ml).
 Die Kontrolle des Phänotyps nach Differenzierung von Th1-Zellen erfolgte durch intrazellulären Nachweis von IFN- γ und Transkriptionsfaktor T-bet und Ausschluss von IL-4-Produktion.

Zur Untersuchung der Aktivität von rPra1 als Induktor von Apoptose wurden die differenzierten Th1- und Th0-Zellen direkt nach Abnahme aus der Vorkultur erneut ausgesät und am Folgetag analysiert. Abb. 31 zeigt exemplarisch die Auswertung der Proben.

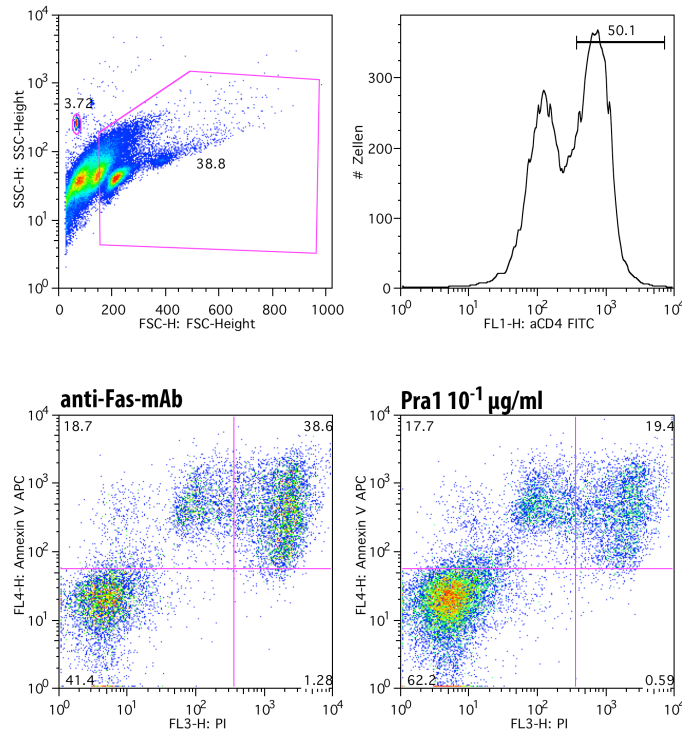


Abbildung 31: Apoptoseinduktion durch rPra1

Die Vorkultur wurde für 5 Tage unter Differenzierungsbedingungen durchgeführt, die Inkubation zur Untersuchung auf Apoptose anschließend für 24 Stunden.

Oben: Die Gating-Strategie exemplarisch für Th1-Zellen ohne ZnCl₂. Das ovale Gate markiert unbeladene Beads für die Bestimmung der absoluten Zellzahl. Anti-Fas-mAk wurde in der Konzentration 0,5 µg/ml als Positivkontrolle verwendet.

Unten: Exemplarisch 2 Ergebnisse mit Auswertung durch Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung. Lebende Zellen sind Annexin V- und Propidiumiodid-negativ.

Es fand sich auch bei steigender Konzentration von rPra1 kein Anstieg in der Häufigkeit von toten Zellen weder als prozentualer Anteil aller Zellen noch als absolute Zahl toter Zellen in der Kultur (Abb. 32). Dies trifft zu sowohl auf Th0- wie auch auf Th1-Zellen. In absoluten Zellzahlen wurde die Zahl lebender Zellen durch rPra1 sogar leicht erhöht. Die Zugabe von 10 µM ZnCl₂ hatte wenig Einfluss auf dieses Ergebnis. In der Positivkontrolle mit anti-Fas-mAk trat ebenfalls kein Unterschied durch ZnCl₂ auf.

Der als Positivkontrolle eingesetzte anti-Fas-mAk war jedoch in der Lage, Zelltod zu induzieren und besaß einen besseren Effekt auf Th1-Zellen als auf Th0-Zellen [89]. Innerhalb der Th1-Zellen konnte die Zahl lebender Zellen durch den Antikörper nach 24 Stunden um mehr als 50% reduziert werden.

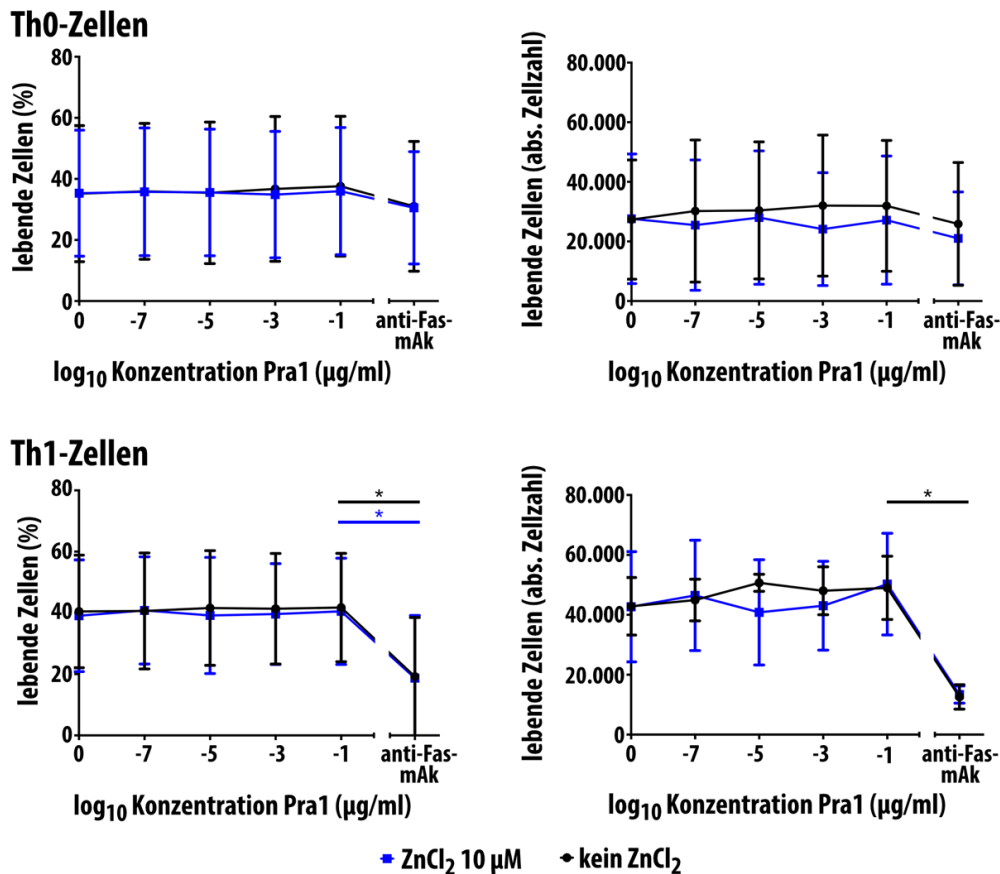


Abbildung 32: rPra1 löst in Th1-Zellen keine Apoptose aus

Oben: Th0-Zellen, **Unten:** Th1-Zellen

Th1- bzw. Th0-differenzierte Zellen wurden nach Vorkultur für 24 Stunden inkubiert unter Apoptose induzierenden Bedingungen. rPra1 wurde in Lösung zugegeben. Die Positivkontrolle wurde durch anti-Fas-mAk in der Konzentration 0,5 µg/ml erstellt. Lebende Zellen wurden ausgewertet als Annexin V- und Propidiumiodid-negative Zellen innerhalb der lebenden CD4⁺ Zellen. Absoluten Zellzahlen wurden durch Rückrechnung mithilfe unmarkierter Beads bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Experimenten. Getestet wurde mit einem zweiseitigen T-Test: * p<0,05.

Nachdem ausgeschlossen war, dass rPra1 in T-Zellen Apoptose induzieren kann, wurde untersucht, ob Pra1 in Zellen, die bereits durch Apoptose untergehen, den Zelltod verstärken kann (Abb. 33).

Es zeigte sich für die Titration des anti-Fas-mAk nur ein geringer konzentrationsabhängiger Effekt auf die Zahl lebender Zellen. Bereits die geringste Konzentration von 0,5 µg/ml anti-Fas-mAk hatte einen etwa gleich starken Effekt wie die höchste gewählte Konzentration von 12,5 µg/ml.

Der Effekt von anti-Fas-mAk auf Th0- und Th1-Zellen war wie zuvor unterschiedlich stark: In Th1-Zellen reduzierte der anti-Fas-mAk den Anteil lebender Zellen deutlicher als in Th0-Zellen.

rPra1 reduzierte nicht die Zahl lebender Zellen. Wie im Versuch zuvor konnte lediglich eine leichte Erhöhung der lebenden Zellen innerhalb der Th1-Zellen erreicht werden. Diese Verbesserung des Überlebens von Zellen gelang nur bei Zellen, die nicht bzw. nur mit kleinster Konzentration an anti-Fas-mAk inkubiert wurden.

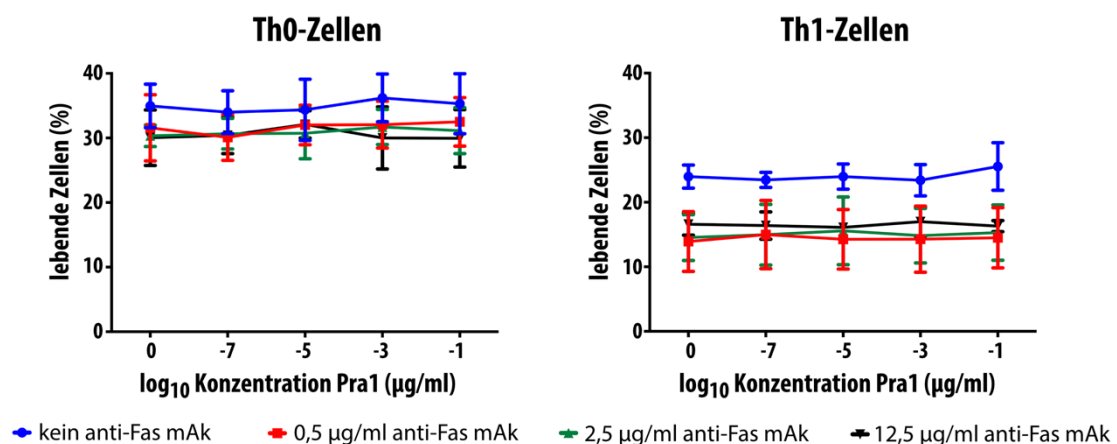


Abbildung 33: rPra1 kann die Wirkung von anti-Fas-mAk nicht verstärken

Th1- bzw. Th0-differenzierte Zellen wurden nach 5 Tagen der Vorkultur für 24 Stunden unter Apoptose induzierenden Bedingungen inkubiert. Der anti-Fas-mAk und rPra1 wurden in Lösung zugegeben.

Lebende Zellen wurden ausgewertet als Annexin V- und Propidiumiodid-negative Zellen innerhalb der lebenden CD4⁺ Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Experimenten.

Damit konnte rPra1 die Apoptose weder auslösen noch die durch Fas induzierte Apoptose verstärken. Die Reduktion von IFN-γ-produzierenden Th1-Zellen durch rPra1 kann damit nicht durch Apoptose in diesen Zellen erklärt werden.

4. DISKUSSION

4.1 Nachweis einer Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen

Rekombinantes Pra1 bindet auf humanen T-Zellen an das Oberflächenprotein CD46 (MCP, Daten unveröffentlicht). An Immunzellen der Maus kann Pra1 ebenfalls binden über den Mac-1-Rezeptor. Dieses Protein kommt vor auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und reifen NK-Zellen [79, 80]. Außerdem exprimieren Subpopulationen zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen während der Zellaktivierung den Mac-1-Rezeptor [90].

Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage, ob Pra1 auch an T-Zellen der Maus binden kann. Unter den T-Zellen spielen die CD8⁺ T-Zellen für die Abwehr gegen *C. albicans* keine Rolle, da es die Aufgabe der CD8⁺ T-Zellen ist, virusinfizierte Zellen zu bekämpfen. Für die Immunabwehr gegen Pilze wie *C. albicans* sind die CD4⁺ T-Zellen zuständig, sodass nur diese Gruppe der T-Zellen untersucht wurde. Dennoch zeigen auch CD8⁺ T-Zellen die Fähigkeit zur Bindung an Pra1, wenngleich diese schwächer ausfällt als die Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen [1].

Untersucht wurde die Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen als in-vitro-Versuch durch Inkubation von Leukozyten, isoliert aus Lymphknoten und der Milz, mit rekombinantem Pra1 in Lösung. Tatsächlich konnte innerhalb der CD4⁺ T-Zellen mithilfe eines Kaninchen-anti-Pra1-Antiserums ein Signal von gebundenem Pra1 gemessen werden. Dieses Signal lag deutlich über dem der Negativkontrolle (Abb. 7). Eindeutige Färbungen gelangen nur mit Antiserum aus immunisierten Tieren, schwächer mit dem monoklonalen Antikörper Klon 8c3 und gar nicht mit dem Klon 1E12. Das anti-Pra1-Antiserum enthält polyklonale Antikörper, die an verschiedenste Epitope binden können. Dadurch ergibt sich die bessere Anfärbbarkeit des rPra1, da mehr Epitope des rPra1 erkannt und gebunden werden können.

Es wäre auch denkbar, dass das rPra1 nicht spezifisch an einen Rezeptor auf den T-Zellen bindet, sondern beispielsweise durch sterische Interaktion an verschiedenen Oberflächenproteinen auf den T-Zellen haftet.

Die nötige Konzentration von rPra1 zur Nachweisbarkeit der Bindung an T-Zellen wurde titriert und es ergab sich ab 10 µg/ml rPra1 ein eindeutig positives Signal für gebundenes rPra1 auf CD4⁺ T-Zellen. Schon bei 1 µg/ml rPra1 stieg die MFI des Pra1 leicht an, was jedoch für den sicheren Nachweis zu wenig war. Höhere Konzentrationen als 10 µg/ml konnten nicht getestet werden, da dafür nötige Mengen von rPra1 nicht verfügbar waren. Man muss davon ausgehen, dass große Mengen rPra1 durch B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen gebunden werden, bevor sie an CD4⁺ T-Zellen binden können, wodurch sich die Menge an gelöstem rPra1 reduziert. Es ist also ein Überschuss an rPra1 nötig, um dieses auf T-Zellen nachzuweisen. Mit 10 µg/ml rPra1 ist eine Bindung an T-Zellen zwar zu erkennen, jedoch ist auch hier die Verschiebung der Bindungskurve im Histogramm nicht sehr stark (Abb. 11).

Nachdem mit dem Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum eine erfolgreiche Färbung des gebundenen rPra1 gelang, wurden mehrere monoklonale Antikörper getestet zum Nachweis von Pra1 auf T-Zellen. Es sollte sichergestellt werden, dass die zum Nachweis der Bindung von rPra1 an T-Zellen verwendeten Antikörper tatsächlich nur das gebundene rPra1 markieren und nicht zusätzlich andere Zielstrukturen auf den Leukozyten. Diese verwendeten monoklonalen Antikörper zeigten gute Bindungseigenschaften an gelöstes rPra1 (S. Werner und N. Beyersdorf, unveröffentlichte Daten), konnten jedoch zellgebundenes rPra1 nicht nachweisen. Das polyklonale Antiserum blieb stets überlegen, da dieses aus einem Gemisch an Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Pra1-Proteins besteht. Die Chance, dass nach Bindung von Pra1 an die T-Zellen noch Epitope sterisch verfügbar sind, ist damit für das Antiserum größer als für den monoklonalen Antikörper, der nur ein einziges Epitop erkennt. Das Epitop, das die monoklonalen Antikörper erkennen, ist möglicherweise strukturell nahe am Bindungsort von Pra1 an den T-Zellen, sodass der Antikörper das Epitop nicht mehr erreichen kann.

In einem Experiment gelang es mit einem monoklonalen Antikörper ein starkes Signal von mit rPra1 inkubierten Lymphozyten zu messen. Dies waren die Positivkontrollen, die im Rahmen des in-vivo-Experiments durchgeführt wurden und mit dem monoklonalen Antikörper (Klon 8c3) gefärbt wurden (Abb. 18).

Eine mögliche Erklärung für diese Bindungseigenschaft des monoklonalen Antikörpers an gebundenes rPra1, die nur in dieser Versuchsserie beobachtet wurde, ist die Fixierung der Zellen. In keinem anderen Versuch wurden Zellen, die mit rPra1 inkubiert wurden, gefärbt und dann in Formaldehyd fixiert. Durch die Fixierung mit Formaldehyd bilden sich Quervernetzungen, sog. Crosslinks, innerhalb von Proteinen und auch zwischen Proteinen bilden sich diese Verbindungen. Die Crosslinks entstehen durch Reaktion von Aminosäureseitenketten untereinander. Durch diese Querverbindungen könnte die Bindung eines schwach affin bindenden monoklonalen anti-Pra1-Antikörpers stabilisiert werden und eine Lösung von der Bindungsstelle vor der Färbung verhindert werden [91]. Eine alternative Erklärung wäre, dass der Antikörper zwar an gelöstes rPra1 binden kann, jedoch das rPra1 durch Bindung an die T-Zellen seine räumliche Struktur leicht verändert, sodass der monoklonale Antikörper sein Epitop nicht mehr findet. Das Formaldehyd könnte durch Änderung der Sekundärstruktur, wie man es im Rahmen der Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval) bei der Färbung von histologischen Schnitten nach Paraffin-Einbettung kennt [92], zu einer Verbesserung der Bindungsstärke des Antikörpers an sein Epitop führen.

An welchen Ligand Pra1 an T-Zellen bindet, ist unbekannt. Auf Monozyten und Makrophagen ist dieser Ligand das Oberflächenprotein Mac-1 [59]. Da dieses von der Mehrheit der T-Zellen nicht exprimiert wird, kommt dieses Protein hier jedoch als Bindungspartner nicht in Frage [80].

Im humanen System konnte der Bindungspartner bereits identifiziert werden durch Arbeiten von Dr. Prasad Dasari und Prof. Peter Zipfel (unveröffentlicht, Hans-Knöll-Institut, Jena): Auf humanen T-Zellen bindet Pra1 an CD46 (Membrane Cofactor Protein, MCP).

Als Bindungspartner im Maus-System kommt dieser Rezeptor jedoch nicht in Frage, da Mäuse auf CD4⁺ T-Zellen kein MCP exprimieren [84]. In einem ersten Screening wurde untersucht, ob funktionell ähnliche Oberflächenproteine in der Maus der gesuchte Ligand sein könnten.

Mögliche Kandidaten waren vor allem komplementregulierende Oberflächenproteine, da auch MCP ein solches Protein ist. Nachdem sich im

Vergleich der Aminosäuresequenzen und struktureller Ähnlichkeit mögliche Proteine als Bindungspartner zeigten, wurden CD55 (Decay Accelerating Factor, DAF), Crry/p65 (Complement Receptor Type-1 Related Gene Y) und CD59a untersucht. Diese Proteine werden alle von CD4⁺ T-Zellen der Maus exprimiert [84] und erfüllen Funktionen im Komplementsystem.

Zur Untersuchung dieser drei potentiellen Kandidaten wurden Knockout-Mäuse für jeweils eines der drei Proteine in Würzburg getestet. Crry/p65 und CD59a-Knockout-Mäuse wurden auf die Bindungsfähigkeit an rPra1 getestet. Hier zeigte sich keine Reduktion des Signals von gebundenem rPra1 im Vergleich zu wildtypischen Zellen [1].

In dieser Arbeit wurden CD55-Knockout-Mäuse getestet und auch hier fand sich keine Abnahme des Pra1-Signals. Im Gegenteil war die MFI von rPra1 auf diesen Zellen sogar verstärkt im Vergleich mit wildtypischen Zellen (Abb. 14B). Durch Zugabe von Zink wurde das Signal weiter verbessert, wie es sich bereits für wildtypische Zellen gezeigt hatte (Abb. 15).

Als potentieller Bindungspartner von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen kann CD55 damit ausgeschlossen werden, jedoch stellt sich die Frage, ob der Knockout von CD55 die Bindungseigenschaft von Pra1 verändert. Eine endgültige Aussage ist hier zurzeit nicht möglich, da nur 3 Bindungsexperimente mit CD55-KO-Mäusen durchgeführt wurden. CD55 verhindert die Bindung des Komplementfaktors C3b an Zellen, sodass letztlich die Zellyse durch den Membran-Angriffskomplex verhindert wird [64, 93]. Möglicherweise beeinflusst der Knockout von CD55 die Bindungseigenschaft von Pra1 an die T-Zellen, eventuell durch Einfluss auf den gesuchten Liganden von Pra1. Möglich wäre, dass der Knockout von CD55 den vermeintlichen Rezeptor aus einem intrazellulären Kompartiment zur Zelloberfläche bringt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch den CD55-Knockout der gesuchte Ligand verstärkt exprimiert wird, schließlich ist CD55 ein Komplementregulator und die Zellen könnten durch das Fehlen dieses Proteins kompensatorisch andere Mechanismen verstärken, um sich vor Aktivierung des Komplementsystems zu schützen. Auch könnte durch den Knockout mehr C3b auf der Zelloberfläche gebunden sein, was wiederum zu einer besseren Bindung des rPra1 führen würde [64].

Möglich wäre, dass im Maus-System eine ganz andere Struktur der Bindungspartner für Pra1 ist als im humanen System. Der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.3$ besitzt die Fähigkeit Zink zu binden [94]. Denkbar wäre es beispielsweise, dass Pra1 an Zink-Ionen bindet und diese Zink-beladene Bindungsstelle des Pra1 dann wiederum an die Kaliumkanäle bindet. Über diese Bindungsstelle des Kanals, der rPra1 gebunden hat, könnte es dann auch zur Interferenz mit der Zellaktivierung kommen, da die Zellen die Ströme über $K_v1.3$ zur Aktivierung benötigen. Eine Blockade der Kanäle verhindert die Zellaktivierung und wird in der Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose diskutiert [95, 96].

Um den Liganden endgültig zu identifizieren, könnte man rPra1 an Beads binden und die rPra1-beschichteten Beads dann mit T-Zellen inkubieren. Nach einer Degradierung der T-Zellen blieben die Beads übrig, an denen der Ligand an das rPra1 gebunden hängen bliebe. In einem zweiten Schritt wäre es dann möglich, über eine Massenspektrometrie die Proteine zu analysieren, die an den Beads hängen. Hierfür müssten jedoch ausreichend Liganden mit rPra1 besetzt sein, damit genug Proteinmaterial zur Messung zur Verfügung steht.

4.2 Einflussfaktoren auf die Bindung von rPra1 an $CD4^+$ T-Zellen

Nachdem eine Bindung von rPra1 an $CD4^+$ T-Zellen gefunden war, wurden Einflussfaktoren auf diese Bindung untersucht. Innerhalb des Pra1-Moleküls finden sich Zink-bindende Motive und diese Bindung ist wichtig für *C. albicans* um sich bei Infektionen aus dem Wirtssystem Zink zuzuführen [62]. Daraus ergab sich die Frage, ob Zink ein Einflussfaktor auf die Bindung an T-Zellen sein könnte.

Es könnte sein, dass sich durch die Bindung des zweiwertigen Ions die Sekundär- und Tertiärstruktur von Pra1 ändern und so die Bindung verbessert wird. Eine solche Änderung der Konformationsstruktur des Pra1 könnte durch die Bindung von Zink-Ionen an das Protein ausgelöst werden [97].

Das verwendete rekombinante Pra1 besitzt einen Polyhistidin-Tag (His-Tag), der zum Aufreinigen des Proteins verwendet wird. Durch die Histidin-Seitenketten könnten zusätzlich Zink-Ionen gebunden werden [98], die ebenfalls zu einer, eventuell verstärkten, Konformationsänderung führen könnten. Es wäre auch

möglich, dass eine durch Zinkionen ausgelöste Konformationsänderung des Pra1 nur in dem rekombinanten Pra1 möglich ist, da die Histidinseitenketten hierfür nötig sind.

Eine andere Erklärung für die verbesserte Nachweisbarkeit von gebundenem Pra1 auf CD4⁺ T-Zellen wäre, dass zugegebenes Zn²⁺ zur Dimerbildung des Pra1 nach Bindung an T-Zellen führt und so mehr Pra1 gebunden wird. Dieser, durch Zink induzierte, Mechanismus der Multimerisierung ist beschrieben für Kalium-Kanäle [99]. Vereinbar ist diese These mit dem Ergebnis des Western Blots (Abb. 19). Dort zeigte sich eine Doppelbande für rPra1 und wildtypisches Pra1, welche durch Zink-induzierte Multimerisierung erklärbar sein kann.

Physiologisch könnte der Mechanismus der Bindung von Zink-Ionen durch Pra1 dazu dienen, die Konzentration von freiem Zink im umgebenden Milieu zu reduzieren. Lymphozyten verfügen intrazellulär über sehr geringe Mengen Zink und steuern über einen Influx von Zink ihre Zellaktivierung [82].

Das in dieser Arbeit verwendete rPra1 konnte ebenfalls Zink binden. Freies Zink wurde dabei photometrisch durch einen Zink-Indikator gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass rPra1 in der Konzentration von 10⁻⁵ µg/ml etwa 10 µM Zink binden kann (Abb. 8).

In der Tat konnte durch Zugabe von ZnCl₂ die Bindung von Pra1 an T-Zellen verbessert werden, auch wenn ohne zugegebenes Zink zuerst fast kein Signal zu messen war (Abb. 9). Es wurden dabei ZnCl₂-Konzentrationen verwendet bis 100 µM, was etwa 10-fach über dem physiologischen Wert im humanen und murinen Plasma liegt [82]. Der physiologische Zink-Spiegel bei Menschen liegt bei etwa 1 mg/l bzw. 15 µM im Blut [100], bei Mäusen im Alter von 12 Wochen etwa 0,7 mg/l bzw. 10 µM [101]. Aber auch bei 10 µM, was als physiologischer Wert angesehen werden kann, zeigte sich diese Verbesserung des Bindungssignals.

Ohne zugegebenes ZnCl₂ lag die relative MFI des Pra1-Signals bei etwa 1,4 und durch Zugabe von 100 µM ZnCl₂ konnte dieser Wert signifikant verbessert werden auf mehr als 1,5 (Abb. 10).

Auch die Kinetik der Bindung von Pra1 auf T-Zellen wurde untersucht. Hier zeigte sich in der On-Kinetik eine über die Zeit der Inkubation konstante Zunahme des Signals. Nach 60 min war das Signal von zellgebundenem rPra1 am höchsten bei knapp dem doppelten des Hintergrundsignals.

In der Off-Kinetik zeigte sich ein Abfall des Signals, der ebenfalls mit der Länge des Versuchs zunahm. Nach 90 min lag das Signal von Pra1 auf dem Niveau des Hintergrundsignals. Pra1 ließ sich damit nach 90 min nicht mehr nachweisen.

Interessant war, dass, nachdem die Signalstärke von zellgebundenem rPra1 konstant abfiel, diese nach wieder nach 15 und 60 min leicht zunahm. Ein solcher erneuter Anstieg der Signalintensität fand sich auch in der Wiederholung des Versuchs. Bei dem erneuten Anstieg von Pra1 auf der Zelloberfläche könnte es sich um zur Oberfläche zurückkehrendes rPra1 handeln, nachdem dieses in die Zellen internalisiert worden war [102]. Interessant wäre es, die Zellen länger als die untersuchten 90 min stehen zu lassen, um zu beobachten, ob dann auch nach einer Zeit in diesen Zellen das Pra1-Signal wieder zunimmt.

4.3 Bindung von wildtypischem Pra1 an CD4⁺ T-Zellen

Alle Bindungsversuche waren zuerst mit einem rekombinanten Pra1-Molekül durchgeführt worden. Dieses wurde in *Pichia pastoris*-Hefen exprimiert und durch den angefügten Polyhistidin-Tag konnte es anschließend aus den produzierten Überständen der Pilzkultur aufgereinigt werden [103].

Genau dieser His-Tag führt aber auch zu einer gewissen Unsicherheit bei der Untersuchung der Bindungsfähigkeit von rekombinantem Pra1. Die gefundene Bindung an T-Zellen könnte sich auch, zumindest teilweise, durch Eigenschaften des His-Tag erklären lassen. Um diesen Fehler möglichst gering zu halten, wurden vergleichend Bindungsexperimente mit rekombinantem Aspf2 durchgeführt, das ebenfalls einen His-Tag besitzt.

Vollständig lässt sich dieser Fehler jedoch auch auf diese Weise nicht ausschließen, da die Histidin-Seitenketten auch mit einem Teil des Pra1-Moleküls interagieren könnten, die nur in Pra1, nicht jedoch in Aspf2 vorkommen und so zu einem Bindungsepitop führen könnten [104]. Die letzte Sicherheit kann in dieser Frage erst der Nachweis von gebundenem wildtypischem Pra1, das diesen His-Tag nicht trägt, auf T-Zellen bringen.

Der Nachweis von gebundenem wildtypischen Pra1 ist in dieser Arbeit nicht sicher gelungen. Experimente wurden durchgeführt mit Zellkulturüberständen von *C. albicans*-Kulturen. In diesen Überständen zeigte sich im Western Blot eine Doppelbande (Abb. 19). Es ist bekannt, dass Pra1 stark glykosyliert ist [56], jedoch lagen die Banden bei 120 und 180 kDa. Das Protein Pra1 selbst hat eine Molekülgröße von etwa 60 kDa [56]. Die Bande bei 120 kDa ließe sich durch Dimerbildung erklären, jedoch erscheint eine Bande bei 180 kDa fraglich, da Pra1 Trimere bilden müsste, um diese Molekülgröße zu erreichen. Eine Trimerbildung ist in der Literatur für Pra1 bisher nicht beschrieben. Ein Auslöser der Multimerisierung könnte Zink sein, das an Pra1 bindet und so zwei oder mehr Proteine aneinander binden.

Die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des polyklonalen Antikörpers muss immer bedacht werden. Die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers ist grundsätzlich nur die zweite Wahl gegenüber einem monoklonalen Antikörper, da ein polyklonaler Antikörper mehrere Epitope erkennt. Bei einem monoklonalen Antikörper wird nur ein bestimmtes Epitop erkannt [105]. Leider war es bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht gelungen, einen monoklonalen Antikörper zu erzeugen, der an Pra1 im Western Blot binden kann. Der Grund, warum Antikörper, die sich für den Nachweis von gebundenem Pra1 auf T-Zellen eignen, aber nicht zwangsläufig das gleiche Protein im Western Blot binden, ist, dass sich durch das Aufkochen der Proben für die Elektrophorese die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine ändert [106]. Ein konformationelles Epitop, das der monoklonale Antikörper im natürlichen Protein erkennt, kann durch die Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur so verändert werden, dass es der Antikörper nicht mehr bindet. Im Western Blot werden deshalb Antikörper benötigt, die lineare Epitope erkennen können [107]. Ein polyklonaler Antikörper erkennt viele verschiedene Epitope und unter diesen vielen ist eventuell eines, das sich durch das Aufkochen der Proben nicht ändert. Das polyklonale Antiserum wurde von der Partnergruppe in Jena als bindungsfähig an wildtypisches Pra1 im Western Blot getestet. Dass das Antiserum wildtypisches Pra1 binden kann, ist möglich, wahrscheinlich bindet das Antiserum aber auch andere Proteine, die von *C. albicans* sezerniert werden.

Eine unspezifische Bindung des anti-Pra1-Antiserums könnte die schwache Doppelbande der Überstände aus den *C. albicans*-KO-Kulturen erklären. Eventuell bindet das Antiserum an weitere in den Überständen enthaltene Proteine von *C. albicans*.

Obwohl nicht zweifelsfrei für die sezernierten Pilzproteine nachgewiesen werden konnte, dass darin Pra1 enthalten ist, wurden Bindungsversuche mit T-Zellen und den Proteingemischen durchgeführt. T-Zellen wurden wie zuvor mit diesen Proteinen inkubiert. Tatsächlich zeigte sich ein vermeintliches Signal für Pra1 nach Inkubation der Zellen mit wildtypischem Kulturüberstand von *C. albicans*-Kulturen. Jedoch gelang auch die Messung eines Signals für Pra1 bei Zellen, die in Überständen aus Pra1-KO-*C. albicans*-Kulturen inkubiert wurden (Abb. 20). In diesen sollte sich kein Pra1 finden und dementsprechend nicht gebunden auf CD4⁺ T-Zellen nachweisen lassen. Jedoch entspricht diese Feststellung der bereits zuvor gemachten Beobachtung aus dem Western Blot der Kulturüberstände, in dem sich eine schwache Doppelbande für Pra1 fand.

Eine Möglichkeit zur Erklärung des Pra1-Signals der Zellen, die mit Pra1-KO-Kulturüberstand inkubiert wurden, könnten unspezifische Bindungen zu anderen Pilzproteine sein. Neben Pra1 produziert *C. albicans* weitere Proteine, die auf den Zellen haften könnten und vielleicht ebenfalls durch das Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum gebunden werden.

Die Pra1-Färbung der Zellen, die mit wildtypischem Kulturüberstand inkubiert wurden, ergab höhere Signals als die Positivkontrolle, die mit rPra1 inkubiert wurde. Beim Vergleich der Stärke der Banden im Western Blot (Abb. 19) sieht man, dass mengenmäßig in den Überständen der wildtypischen Kultur eher geringere Mengen Pra1 enthalten waren. Eine höhere Konzentration an Pra1 in den Überständen der wildtypischen *C. albicans*-Kultur kann das höhere Signal damit nicht erklären.

Das stärkere Signal von wildtypischem Pra1 gebunden an CD4⁺ T-Zellen könnte durch eine bessere Anfärbbarkeit von wildtypischem Pra1 erklärt werden. Diese bessere Nachweisbarkeit im Vergleich zu rPra1 könnte an der Bildung von Pra1-

Tri- und Tetrameren liegen. Einen Hinweis für die Bildung solcher größerer Komplexe aus wildtypischem Pra1 lieferte der Western Blot (Abb. 19).

Ein zweiter Ansatz zum Nachweis von gebundenem wildtypischen Pra1 war die Untersuchung von mit *C. albicans* infizierten Mäusen als in-vivo-Experiment. Ekkena et al. zeigten schon 1987, dass wenn man Mäusen *C. albicans* oral über das Trinkwasser zuführt, der Gastrointestinaltrakt der Tiere besiedelt wird und diese Besiedlung in der Menge durch die Gabe von Antibiotika verstärkt werden kann [108]. Die Pilze besetzen die freie Nische der Bakterien. Die Hypothese war, dass die Hefen bei der Expansion versuchen invasiv zu wachsen, und dann Pra1 produzieren. Dieses sezernierte Pra1 müsste sich dann gebunden auf CD4⁺ T-Zellen der Maus nachweisen lassen.

In den untersuchten Proben (Abb. 18) fanden sich beim Nachweis mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-Pra1-Antiserum starke Signale in Zellen aus der Lamina propria. Bei einem nicht infizierten Tier fand sich zum frühen Zeitpunkt der Probenentnahme jedoch auch ein hohes Signal. Zum späten Zeitpunkt der Probenentnahme an Tag 14 standen keine nicht infizierten Tiere mehr als Negativkontrolle zur Verfügung. Bei den infizierten Tieren zeigten sich an Tag 14 ebenfalls erhöhte Signale innerhalb der Zellen aus der Lamina propria.

In mesenterialen Lymphknoten waren die Signale zu beiden Probenzeitpunkten erhöht. Die Proben aus mesenterialen Lymphknoten sind jedoch nur als Hinweis zu verwerten, da hier nur wenige CD4⁺ T-Zellen vorlagen.

Im gleichen Experiment wurde jede untersuchte Probe ebenfalls mit dem monoklonalen anti-Pra1-Antikörper (Klon 8c3) gefärbt. Am Probenstag 14 ergaben sich hier in keiner Probe erhöhte Werte. Zum frühen Zeitpunkt waren die Werte innerhalb der Zellen aus der Lamina propria gering erhöht, die der Zellen aus mesenterialen Lymphknoten stärker erhöht.

Obwohl der polyklonale Antikörper starke Signale sowohl am frühen wie auch am späten Probenzeitpunkt ergab, ist es zweifelhaft, ob diese Signale tatsächlich wildtypisches Pra1 abbilden. Der monoklonale Antikörper ergab an Tag 14 der Probenentnahme in keiner Probe ein positives Signal, an Tag 4 praktisch nur in Proben der mesenterialen Lymphknoten. Der Versuch sollte wiederholt werden und es sollte sich im Speziellen auf Zellen aus der Lamina propria und

mesenterialen Lymphknoten konzentriert werden. In dem hier durchgeführten Experiment ist es aber wahrscheinlich, dass alle gefundenen erhöhten Messwerte durch unspezifische Bindungen der Antikörper entstanden. Möglicherweise haben Lymphozyten aus der Lamina propria und mesenterialen Lymphknoten durch das Homing im mukosalen lymphatischen Gewebe Rezeptoren auf der Oberfläche [109], die zu unspezifischen Bindungen der Antikörper führen. Andererseits könnten aber auch spezielle Eigenschaften der Lymphozyten aus diesen Geweben die Bindung von Pra1 verbessern. Da dieses Tiermodell den tatsächlichen Beginn einer invasiven Infektion durch *C. albicans* abbildet, wäre es natürlich interessant genau zu wissen, ob T-Zellen aus mukosalen lymphatischen Geweben besser geeignet sind, Pra1 zu binden als Lymphozyten aus Lymphknoten oder der Milz. In diesem Experiment wurden die Hefekulturen oral verabreicht und konnten zur Probenentnahme im Lumen auch nachgewiesen werden. Der Pilz hatte sich im Magen-Darm-Trakt ausgebreitet und war gewachsen. Ob allerdings invasives Wachstum bestand, wurde nicht direkt überprüft. Nur im Falle des invasiven Wachstums könnte jedoch Pra1 im lymphatischen Gewebe gefunden werden, da es ansonsten nur in das Lumen sezerniert würde. Es kommt bei Kolonisation des Gastrointestinaltraktes zwar zu einem Kontakt zwischen *C. albicans* und Immunzellen, der auch zu einer Bildung von Immunität gegen die Hefe führt [110], ob jedoch auf diesem Weg auch sezernierte Proteine von *C. albicans* die Lymphozyten erreichen, ist unbekannt.

Bei einer Wiederholung des Versuchs sollte auch versucht werden, die Schleimhaut zu schädigen vor oder bei Infektion mit *C. albicans*. Durch eine experimentelle Schädigung der Darmschleimhaut könnte man vielleicht ein invasives Wachstum einleiten.

4.4 Vergleich anderer fungaler sezernierter Proteine auf Bindungsfähigkeit an CD4⁺ T-Zellen

Pra1 ist ein fungales Protein, das an T-Zellen binden kann. Ob auch verwandte Proteine in der Lage sind, an T-Zellen zu binden, wurde deshalb ebenfalls untersucht. Gewählt wurde das Protein Aspf2, das von *Aspergillus fumigatus*, einem ubiquitär verbreiteten Schimmelpilz, produziert und sezerniert wird. Es besitzt eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit Pra1 von 41,6% [56].

Auch für dieses Protein wurde ein polyklonales Antiserum produziert. Es zeigte Bindungsfähigkeit an rekombinantes AspF2 (rAspF2). Die Bindungsversuche von rAspF2 an T-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie zuvor mit rPra1. Es gelang jedoch nicht rAspF2 gebunden an Maus-CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen (Abb. 22). Um zu testen, ob ZnCl₂ die eventuell vorhandene Bindungsfähigkeit von rAspF2 verbessern kann, wurde es während der Inkubation der Lymphknoten-Zellen mit rAspF2 zugegeben. Es ließ sich aber auch auf diesem Weg kein gebundenes rAspF2 nachweisen (Abb. 23).

Rekombinantes AspF2 kann nicht an T-Zellen der Maus binden. Dies zeigte, dass es eine besondere Eigenschaft ist von rPra1, nicht aber von rAspF2, an CD4⁺ T-Zellen zu binden.

4.5 Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen

Nach der Untersuchung der Bindungseigenschaften von Pra1 wurden funktionelle Aspekte der T-Zellen nach Bindung an rPra1 untersucht.

In den ersten Experimenten zeigte sich nach drei Tagen Inkubation der durch anti-CD3-mAk stimulierten Zellen eine Verstärkung der Zellaktivierung und Proliferation durch zugegebenes rPra1. Die CD4⁺ T-Zellen wiesen geringere CFSE-Signale auf als Zeichen der verstärkten Teilung und besaßen erhöhte CD25-Expression (Abb. 26). Die Zellen exprimierten ebenfalls verstärkt CD69 als Zeichen der frühen Zellaktivierung (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war konzentrationsabhängig von der Menge des in Lösung zugegebenen rPra1. Ohne anti-CD3-mAk und nur mit rPra1 bzw. anti-CD28-mAk zeigte sich keine Zellaktivierung oder -teilung, sodass man hier tatsächlich von einer Kostimulation durch rPra1 und nicht von Stimulation reden kann (Abb. 25).

Der Effekt der kostimulatorischen Aktivität des rPra1 wurde verstärkt durch die Zugabe von Zink-Ionen. Ohne zugegebenes Zinkchlorid war der Effekt der Kostimulation durch rPra1 erst ab 10⁻¹ µg/ml rPra1 sichtbar. Mit 10 µM Zinkchlorid zeigte sich jedoch durch rPra1 bereits bei 10⁻⁷ µg/ml rPra1 ein deutlicher Anstieg der CD25⁺ CFSE^{niedrig} Zellen. In der höchsten gewählten Konzentration von rPra1 (0,1 µg/ml) und mit zugegebenem ZnCl₂ war die

Erhöhung der aktivierten und proliferierenden Zellen statistisch signifikant erhöht gegenüber Zellen ohne kostimulatorisches Signal.

Wie die Zinkionen die kostimulatorische Aktivität des rPra1 beeinflussen, bleibt unbekannt. Zuvor konnte bereits die Verbesserung der Nachweisbarkeit von zellgebundenem Pra1 durch Zugabe von Zink während der Inkubation von Zellen mit rPra1 beobachtet werden. Möglicherweise kommt dieser Effekt hier ebenfalls zum Tragen und es bindet mehr rPra1 an die T-Zellen und der kostimulatorische Effekt des Pilzproteins entfaltet mehr von seiner Wirkung.

Es ist bekannt, dass Zink während der T-Zellaktivierung eine Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion besitzt [111]. Es erscheint möglich, dass in diesem Fall beide Zinkeffekte eine Rolle spielen: Zink verbessert die Signaltransduktion und damit die Zellaktivierung und gleichzeitig verbessert Zink die Bindung von rPra1 an die T-Zellen und verstärkt damit die kostimulatorischen Eigenschaften des rPra1.

Es war erstaunlich, dass ein Protein, das von einem Pathogen produziert und sezerniert wird, durch die Bindung an T-Zellen in diesen die Zellaktivierung ausgelöst wird. In Bindungsversuchen zuvor war es nicht gelungen, den Rezeptor zu finden, an den rPra1 bindet, sodass natürlich keine Aussage über mögliche funktionelle Eigenschaften der Bindung möglich war.

Die gefundene Kostimulation der T-Zellen durch rPra1 wurde kontrolliert durch Wiederholung des Versuchs mit rAspf2. In ersten Versuchen konnte kein Einfluss von rAspf2 auf die Zellaktivierung oder -proliferation gefunden werden, daher wurden auch höhere Konzentrationen rAspf2 gewählt. In der Konzentration, in der rPra1 bereits kostimulatorische Aktivität besaß, zeigte sich für rAspf2 kein Effekt. Auch in der höchsten Konzentration von 10 µg/ml fand sich kein Anstieg der Aktivierungsmarker. Ein Einfluss von ZnCl₂ war hier nicht zu sehen (Abb. 27). Nachdem in Bindungsversuche keine Bindung von Aspf2 an CD4⁺ T-Zellen gefunden wurde, bestätigt dieses Ergebnis weiter den funktionellen Unterschied zwischen rPra1 und rAspf2. Auch wenn beide Proteine einen hohen Grad an Homologie aufweisen, scheinen sie, zumindest im Mausmodell, eine andere Funktion zu besitzen.

4.6 Beeinflussung der IFN- γ -produzierenden Zellen durch Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen

Für *C. albicans* ist es wenig vorteilhaft, wenn sich die CD4⁺ T-Zellen teilen und aktiviert werden. Es war daher wahrscheinlich, dass dieser Effekt nicht der einzige ist, den Pra1 durch die Bindung an CD4⁺ T-Zellen auslöst. Hypothetisch könnte man annehmen, dass Pra1 auch einen immunsupprimierenden Effekt auf die T-Zellimmunität haben könnte.

Deshalb wurde der Effekt von rPra1 auf die Differenzierung der Zellen untersucht. Hierzu wurden naive T-Zellen von OT-II-Mäusen verwendet. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen dieser Tiere tragen alle T-Zellen den gleichen T-Zell-Rezeptor, der durch einen Teil des Proteins Ovalbumin (OVA-Peptid) aktiviert werden kann. Damit sich aus den aktivierten Zellen IFN- γ -produzierende T-Zellen (Th1-Zellen) differenzieren, wurde IL-12 und ein anti-IL-4-Antikörper zugegeben. Es zeigten sich nach der Zugabe von rPra1 weniger IFN- γ -produzierende Zellen als Ergebnis der Differenzierung. Diese Reduktion war jedoch gering ausgeprägt in relativen Anteilen der IFN- γ -produzierenden Zellen, vielmehr zeigte sich eine Reduktion der absoluten Zahl dieser Zellen (Abb. 29).

Dieses Ergebnis der reduzierten IFN- γ -produzierenden T-Zellen wäre vorteilhaft für die Hefen, denn wenn durch die Bindung von Pra1 an naive T-Zellen weniger IFN- γ -produzierende T-Zellen entstehen, die spezifisch *C. albicans* erkennen, wäre die Immunabwehr gegen die Pilze geschwächt. Es stünde schlicht weniger IFN- γ zur Verfügung und Phagozyten könnten so schlechter aktiviert werden. Eine Schwächung der IFN- γ -produzierenden Zellen, den Th1-Zellen, ist auch *in vivo* assoziiert mit einem schwereren Verlauf einer *Candida*-Infektion [112].

Es schloss sich die Frage an, durch welchen Mechanismus die Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen die Zahl an IFN- γ -produzierenden Zellen reduziert. Eine Möglichkeit wäre, dass rPra1 durch die Bindung an die Th1-Zellen in diesen die Apoptose auslöst. Würden die IFN- γ -produzierenden Zellen durch Bindung von rPra1 zugrunde gehen, wäre auch die absolute Menge von IFN- γ reduziert. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden naive T-Zellen polarisiert zu Th1-Zellen und anschließend der Effekt von rPra1 auf diese differenzierten Zellen untersucht.

Als Kontrolle wurden Zellen ohne zugegebenes IL-12 ebenfalls aktiviert durch das OVA-Peptid. Die Zellen, die so aktiviert werden, erhalten kein Signal, sich in die eine oder andere Richtung zu differenzieren (Th0-Zellen). Weder innerhalb der Th1- noch in Th0-Zellen war rPra1 jedoch in der Lage, die Zahl der lebenden Zellen zu reduzieren. Im Gegenteil besaß das rPra1 für Th1-Zellen sogar eher einen protektiven Effekt, sodass mit steigender Dosis rPra1 weniger Zellen durch Apoptose untergingen. Dies könnte durch eine leichte Stimulation der Zellen im Sinne der bereits gefundenen Kostimulation erklärbar werden, wodurch die Zellen wieder in die Aktivierung und zur Zellteilung getrieben würden. Bindung von bestimmten Oberflächenproteinen und Zellkontakte können Apoptose verhindern [113].

Der als Positivkontrolle verwendete anti-Fas-mAk konnte Apoptose in Th1- und Th0-Zellen auslösen (Abb. 32). In Th1-Zellen zeigte sich ein besserer Effekt des Antikörpers hinsichtlich der ausgelösten Apoptose [114]. Dies könnte an dem Stress liegen, den die Th1-Zellen während der Polarisierung erleiden. Durch das zugegebene IL-12 steigt die Zellaktivität zusätzlich [115].

Interessant wäre ebenfalls der Effekt von rPra1 auf differenzierte Th17-Zellen, denn diese Zellen spielen neben den Th1-Zellen die wichtigste Rolle in der erworbenen Immunität zur Abwehr von Pilzinfektionen [116].

Die Auslösung von Apoptose in ausdifferenzierten Th1-Zellen durch rPra1 konnte ausgeschlossen werden. Nicht beurteilbar bleibt, ob rPra1 Apoptose auslöst in naiven T-Zellen, die ausdifferenzieren und in die Effektorzellen differenzieren.

4.7 Reduktion der Zytokinsekretion durch Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen

Es wurden die Zellkulturüberstände aus den Kulturen analysiert, die zuvor schon für die Untersuchung der Zellaktivierung verwendet wurden.

Es fand sich eine von der Konzentration des rPra1 abhängige Reduktion der Menge produzierter Zytokine in durch anti-CD3-mAk und rPra1 als kostimulatorisches Signal aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Dies sind fast ausschließlich in vivo entstandene und in vitro aktivierte Memory-T-Zellen, die schneller größere Mengen an

Zytokinen, ausgenommen IL-2, sezernieren [117]. Besonders interessant war, dass weniger IFN- γ und IL-2 produziert wurde.

IL-2 sorgt für Aktivierung weiterer T-Zellen [118], sodass eine Reduktion dieses Zytokins die Zahl aktivierter T-Zellen reduzieren kann. Weniger IFN- γ führt zur abgeschwächten Abtötung von *C. albicans* durch Phagozyten [34]. Experimentell verbessert die Gabe von IFN- γ die Immunabwehr in mit *C. albicans* infizierten Mäusen [119]. Zusätzlich zu diesen direkten Wirkungen auf die Immunabwehr gegen Pilze besitzt IFN- γ viele weitere Funktionen in der Immunabwehr. Unter anderem werden mehr MHC-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und auch die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T-Helferzellpopulationen wird beeinflusst. Es resultiert insgesamt eine gestärkte Th1-Immunantwort [120].

Ob nun die Reduktion des IL-2 durch eine Reduktion der Produktion und Sekretion dieses Zytokins zustande kommt, ist unklar. Es konnte in dieser Arbeit zuvor bereits gezeigt werden, dass rPra1 durch Bindung an CD4⁺ T-Zellen die Zellen zusätzlich aktiviert. Durch diese Aktivierung verbrauchen vorher ruhende Zellen das IL-2, da sie im Zuge ihrer Zellaktivierung den hochaffinen IL-2-Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren [121, 122]. Für IFN- γ kann diese Hypothese jedoch nicht gelten, denn dieses Zytokin wird durch T-Zellen wenig gebunden oder verbraucht.

Auch TNF- α und IL-4 wurden in geringerer Menge produziert. TNF- α ist ein Zytokin, das auf viele Funktionen im Körper Einfluss nimmt. Eine der vielen Funktionen ist die Induktion einer Entzündungsreaktion [123] und auch TNF- α kann Makrophagen zur verbesserten Phagozytose aktivieren [124, 125]. Eine experimentelle Reduktion der TNF- α -Spiegel durch Antikörper gegen das Zytokin führt bei Mäusen, die einen *Candida*-Fokus im Körper haben, zu einem Wachstum des Pilzes [126]. Injiziert man infizierten Mäusen hingegen TNF- α , wird das Überleben der Tiere verlängert [127]. Damit besitzt TNF- α eine wichtige Funktion zur Abwehr gegen *C. albicans*-Infektionen, sodass eine Reduktion der Sekretion dieses Zytokins zu geschwächter Immunabwehr führt.

IL-4 dient der Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu Th2-Zellen [128]. Durch IL-4 entstehen mehr Th2- und weniger Th1-Zellen, jedoch tragen Th2-Zellen nicht bei zur Abwehr gegen Pilze. Wenn nun weniger IL-4 sezerniert wird, können mehr naive T-Zellen in Richtung der Th1-Zellen differenzieren. Ein Überwiegen der Th1-Zellen führt so zur verbesserten Immunabwehr gegen Pilze. Wenn man Mäusen, die mit *C. albicans* infiziert sind, einen anti-IL-4-mAk verabreicht, verläuft die Infektion weniger drastisch und mehr Tiere überleben [129].

Dieses Ergebnis wäre für *C. albicans* biologisch wenig sinnvoll. Es ist nicht wünschenswert, wenn die Abwehr gegen Pilze verbessert wird. Erwärmt man eher eine verstärkte Differenzierung zu Th2-Zellen um die Immunabwehr gegen Pilze zu schwächen. Dieses Ergebnis ist daher kritisch zu betrachten.

Die Produktion von IL-17 wurde durch rPra1 verringert. Auch zeigte sich durch den kostimulatorischen anti-CD28-mAk eine reduzierte Menge IL-17. Dieses Zytokin dient ebenfalls der Auslösung einer Entzündungsreaktion im Körper und agiert synergistisch mit TNF- α [130]. Im Blut von Patienten, die an einer akuten Infektion mit *C. albicans* leiden, finden sich erhöhte IL-17-Spiegel. Andererseits haben Patienten mit chronischer mukokutaner *C. albicans*-Infektion geringere IL-17-Spiegel, was zusammen für eine protektive Rolle von IL-17 spricht [131-133]. Eine Reduktion der Sekretion von IL-17 in T-Zellen wäre also ebenso vorteilhaft für *C. albicans*. Eine Abnahme der Entwicklung von Th17-Zellen durch die kostimulatorische Aktivität durch CD28 ist bekannt [134].

Für IL-5, IL-6 und IL-10 wurde unter keiner Bedingung eine Zytokin-Sekretion gemessen. Es kann daher auch nicht beurteilt werden, ob die Sekretion dieser Zytokine durch Pra1 negativ beeinflusst wird.

Das IL-10 wird bei Infektionen durch *Candida albicans* verstärkt ausgeschüttet und Fehlen von IL-10 führt zu verstärkter Immunabwehr gegen den Pilz [135].

IL-6 ist der Auslöser der Produktion von Akute-Phase-Proteinen und führt zur Infiltration von Lymphozyten in entzündetes Gewebe. So induziert IL-6 die Einwanderung sowohl von Granulozyten als auch von Lymphozyten in entzündetes Gewebe. In Lymphozyten wird die Apoptose durch das Zytokin

reduziert [136]. Zur Schwächung der Immunabwehr könnte Pra1 die Sekretion von IL-6 reduzieren.

Das IL-5 ist funktionell verwandt mit IL-4. Auch dieses Zytokin erfüllt Funktionen in Zusammenhang mit Th2-Zellen. Es triggert die Produktion von eosinophilen Granulozyten und ist damit für die Bekämpfung von Pilzen eher unwichtig [137].

Es wurde für keines der untersuchten Zytokine eine Erhöhung der Sekretion durch rPra1 gefunden. Vor allem die Reduktion der Zytokine, die unmittelbar an der Abwehr von *C. albicans* durch Aktivierung von Makrophagen beteiligt sind, IFN- γ und TNF- α , würde die Rolle von Pra1 als sezerniertes pathogenes Protein erklären. Dies legt den Schluss nahe, dass Pra1 auch im murinen System ein Virulenzfaktor ist, der das invasive Wachstum von *C. albicans* ermöglicht durch Reduktion der Immunabwehr.

Nachdem sich der gefundene Effekt des rPra1 auf die Reduktion der Zytokinsekretion v.a. auf Memory-T-Zellen bezieht, wurde auch der Einfluss auf Th1-Effektorzellen untersucht [1]. Nach fünf Tagen Differenzierung von T-Zellen aus OT-II-Mäusen und zwei Tagen Ruhe wurden diese Zellen erneut in Gegenwart von Pra1 durch APC und Peptid-Antigen stimuliert. Zellen, die durch 0,1 μ M OVA-Peptid stimuliert wurden, produzierten in Gegenwart von rPra1 weniger IFN- γ . Nach Stimulation durch 1 μ M OVA-Peptid zeigte sich diese Reduktion der IFN- γ -Sekretion nicht. Die Zellen verfügten über die volle Kapazität zur Sekretion von IFN- γ , sodass der Effekt der Reduktion der Zytokinsekretion auf die Bindung des rPra1 zurückzuführen ist. Ohne die erneute Restimulation durch das OVA-Peptid war die Expression von IFN- γ niedriger. Dies lässt den Schluss zu, dass rPra1 die Schwelle der stimulationsinduzierten Zytokinsekretion in CD4⁺ T-Zellen erhöht.

Des Weiteren binden zu Th1-Effektorzellen differenzierte T-Zellen aus OT-II-Mäusen besser an rPra1 als Th0-Zellen [1]. Man kann davon ausgehen, dass differenzierte Effektor-Memory-Th1-Zellen den primären Bindungspartner von rPra1 darstellen.

Dieses Ergebnis könnte die Grundlage bilden, um ein in-vivo-Experiment durchzuführen, in dem Mäusen *C. albicans* appliziert wird und dann ein Pra1-neutralisierender Antikörper verabreicht wird. Es wäre interessant zu sehen, ob sich durch die dann nicht absinkenden Zytokinspiegel die Immunabwehr verbessern lässt und die Candidämie weniger schwer verläuft. Vor allem durch mehr IFN- γ und TNF- α könnte die Phagozytose durch die Makrophagen verbessert bzw. die Auslösung der Entzündungsreaktion verstärkt werden. Auch die Frage nach der biologischen Relevanz dieses Effekts von Pra1 könnte durch den in-vivo-Versuch geklärt werden.

Es bleibt zum jetzigen Zeitpunkt fraglich, ob Pra1 das einzige Pilzprotein ist, das eine solche Wirkung auf die T-Zellen besitzt oder ob dies nur der Anfang ist für die Entdeckung weiterer Pilzproteine mit ähnlicher Funktion.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen durch *C. albicans* auf den Schleimhäuten sind eine häufige Erkrankung bei Patienten mit einer Schwächung der T-Zellimmunität. Blutstrominfektionen mit der Hefe *C. albicans* (Candidämie) stellen, vor allem bei Patienten auf Intensivstationen, eine nach wie vor bedrohliche Komplikation mit hoher Letalität dar.

Das pH-regulierte Antigen 1 (Pra1) ist ein Protein, das von *C. albicans* produziert wird, auf der Oberfläche des Pilzes gebunden vorkommt und auch vom Pilz in den Überstand sezerniert wird. Im humanen System bindet das Protein an T-Zellen an das Oberflächenprotein CD46. Es ist des Weiteren bekannt, dass das Pra1 an bestimmte Immunzellen der Maus (Monozyten und Phagozyten) binden kann. Eine Bindung an T-Zellen der Maus ist bisher nicht beschrieben. Eine genaue Charakterisierung der Interaktion von Pra1 mit Immunzellen der Maus ist interessant, da die Maus als biologischer Modellorganismus zur Erforschung der Infektion mit *C. albicans* dient. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Pra1 (rPra1) auch an Maus-CD4⁺ T-Zellen binden kann.

Es wurden Einflussfaktoren auf die gefundene Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen gesucht. Als ein Einflussfaktor wurde Zink identifiziert. Pra1 kann an freies Zink binden und durch Zugabe von ZnCl₂ während der Inkubation von Pra1 mit T-Zellen kann das Signal von gebundenem Pra1 an CD4⁺ T-Zellen erhöht werden. Asp2, ein Protein aus *Aspergillus fumigatus* mit großer Homologie zu Pra1, kann nicht an diese Zellen binden.

Im in-vivo-Experiment mit Tieren, die mit *C. albicans* infiziert wurden, konnte kein wildtypisches sezerniertes Pra1 gebunden an T-Zellen nachgewiesen werden. Zellkulturüberstände von *C. albicans* zeigten nach Inkubation in vitro mit T-Zellen ein Signal für gebundenes Pra1 an CD4⁺ T-Zellen.

Die Bindungskinetik von Pra1 an T-Zellen zeigte eine über die Zeit der Inkubation konstante Zunahme des Signals von zellgebundenem rPra1 an CD4⁺ T-Zellen. In der off-Kinetik fand sich eine Abnahme des Signals über die Zeit bis an die Grenze der Nachweisbarkeit.

Der Bindungspartner von Pra1 auf T-Zellen konnte nicht identifiziert werden. Die strukturell und funktionell verwandten Oberflächenproteine Crpy, CD59a und

CD55 wurden auf Bindungsfähigkeit an T-Zellen in entsprechenden Knockout-Mäusen getestet, konnten jedoch als Rezeptor für Pra1 ausgeschlossen werden. Durch die Bindung von sezerniertem Pra1 an neutrophile Granulozyten wird die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose eingeschränkt. Die Bindung von Pra1 an CD4⁺ T-Zellen führt zur Kostimulation der T-Zellen, also zur verstärkten Zellaktivierung und Proliferation. Durch die Zugabe von 10 µM Zinkchlorid wird die kostimulatorische Aktivität von Pra1 verstärkt.

Während der Zellaktivierung von Effektor-Memory-CD4⁺ T-Zellen reduziert rPra1 die Sekretion von IFN-γ. Diese Reduktion von IFN-γ-produzierenden Zellen entsteht nicht durch einen Einfluss von Pra1 während der Zellaktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen und auch nicht durch die Auslösung von Apoptose in IFN-γ-produzierenden Th1-Zellen. Die Bindung von Pra1 an CD4⁺-T-Zellen, die über den T-Zell-Rezeptor aktiviert werden, reduziert in vitro die Sekretion des Zytokins. Zusätzlich werden weitere Zytokine in ihrer sezernierten Menge reduziert wie IL-2 und TNF-α.

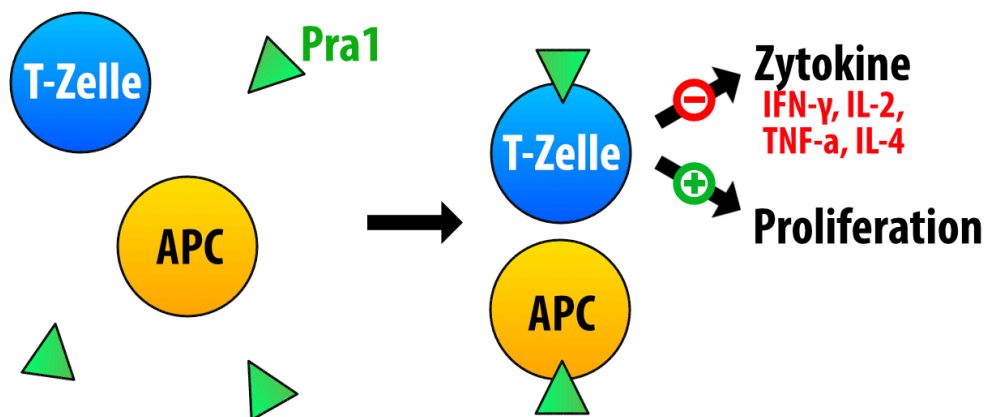


Abbildung 34: Bindung von rPra1 an CD4⁺ T-Zellen der Maus reduziert die Zytokinsekretion der Zellen

Durch die Bindung sezernieren Effektor-Memory-T-Zellen der Maus weniger Zytokine (IFN-γ, IL-4, TNF-α und IL-4). Zusätzlich wirkt Pra1 als kostimulatorische Molekül und führt zu verstärkter Teilung der Zellen.

5. SUMMARY

Infections caused by *C. albicans* on mucosal surfaces are a common disease in patients suffering from suppression of the T cell immune defense. Blood stream infections by the yeast *C. albicans* (candidemia) represent still a severe complication in patients in intensive care units with high rates of lethality.

The pH-regulated antigen 1 (Pra1) is a protein produced by *C. albicans* which is present on the surface of the fungi and is secreted into the supernatant of fungal cultures as well. Pra1 can bind to human T cells via the surface protein CD46. It is known, that this protein can also bind to certain immune cells of mice (monocytes and phagocytes). Binding to T cells of mice is not yet known. A characterization of the interaction of Pra1 with immune cells of mice would be valuable, because mice act as a biological model system for the investigation of infections with *C. albicans*. In this paper, it could be shown that recombinant Pra1 (rPra1) can bind to mouse CD4⁺ T cells as well.

After the finding that rPra1 can bind to CD4⁺ T cells, different parameters determining this binding have been studied. Zinc was found to be one influencing factor on the binding. Pra1 can bind free zinc ions and by the addition of ZnCl₂ while incubating T cells with Pra1 the signal of bound Pra1 to CD4⁺ T cells could be increased.

Aspf2, a protein from *Aspergillus fumigatus* with high homology to Pra1, was not able to bind to these cells.

In in-vivo-experiments with animals infected with *C. albicans*, no wild-typic secreted Pra1 was found bound to T cells. Supernatant from *C. albicans* cultures produced, after incubation in vitro, a signal for cell-bound Pra1 on CD4⁺ T cells.

Kinetics of the binding of rPra1 to T cells showed a constant increase of signal over the time of incubation. The off-kinetics revealed a decrease of cell-bound rPra1 over time to the edge of detectability.

The receptor of Pra1 on T cells has not been identified yet. The structurally and functionally comparable surface proteins Crry, CD59a and CD55 were tested in knockout mice for each of these proteins and could be excluded as possible receptors.

After binding of secreted Pra1 to neutrophilic granulocytes these cells experience a decreased capacity to phagocytose pathogens. The binding of Pra1 to CD4⁺ T cells leads to a costimulation of T cells, which results in increased cell activation and proliferation. This costimulatory capacity of Pra1 can be augmented by adding 10 μM zinc chloride.

During activation of naïve CD4⁺ T cells Pra1 reduces the secretion of IFN-γ. The reduction of IFN-γ-producing cells is not due to an influence of Pra1 during cell activation of naive CD4⁺ T cells to Th1 cells and is also not due to induction of apoptosis in IFN-γ-producing Th1 cells. The binding of Pra1 to ex-vivo isolated CD4⁺ T cells reduces the in vitro secretion of IFN-γ after stimulating these cells via their T cell receptor. Additionally, the secretion of IL-2 and TNF-α was reduced.

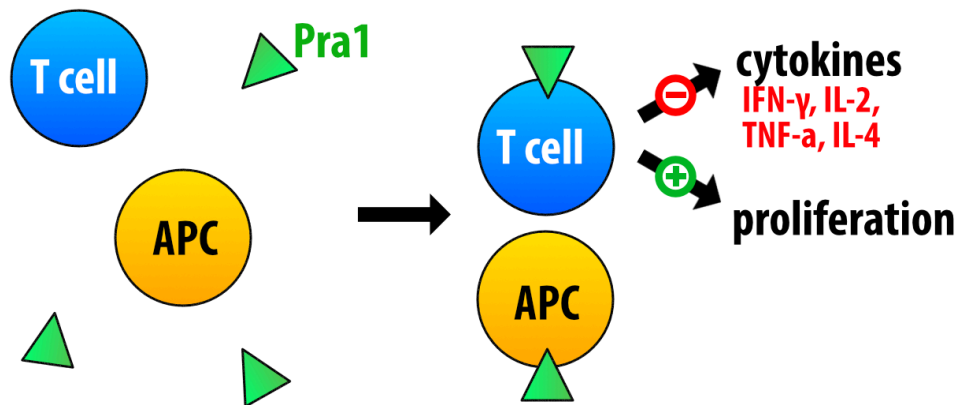


Abbildung 35: Binding of rPra1 inhibits cytokine secretion by mouse CD4⁺ T cells
 After binding of rPra1 resting memory T cells secrete less cytokines (IFN-γ, IL-2, TNF-α and IL-4). In addition to that rPra1 has costimulatory activity on T cells and leads to increased proliferation of T cells.

ABKÜRZUNGEN

APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinthioisocyanat
FSC	Forward Scatter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KO	Knockout
LK	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

Pra1	pH-Regulated Antigen 1
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rAspf2	Rekombinantes Aspf2
rPra1	rekombinates Pra1
RT	Raumtemperatur
SCC	Side Scatter
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T Cell Receptor (T-Zell-Rezeptor)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich zuerst bei PD Dr. Niklas Beyersdorf, der mich sowohl im Labor wie auch beim Schreiben dieser Arbeit fortwährend unterstützt hat und auch in negativen Ergebnissen immer einen positiven Erkenntnisgewinn gesehen hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig, Prof. Dr. Jürgen Löffler und Prof. Dr. Thomas Kerkau möchte ich danken für die Betreuung meiner Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Sandra Werner hat großen Anteil an vielen Ergebnissen dieser Arbeit und hatte bei vielen Fragen im Labor einen guten Rat.

Dem Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg mit allen seinen Mitarbeitern bin ich dankbar für die gute Zeit und die Unterstützung.

Der Partnergruppe dieses Projektes im Hans-Knöll-Institut in Jena und im Speziellen Dr. Prasad Dasari und Prof. Dr. Peter Zipfel danke ich für die Zurverfügungstellung der vielen Materialien und Prasad für die Unterstützung bei vielen praktischen Fragen. Sven Rudolphi und Prof. Dr. Ilse Jacobsen möchte ich danken für die Beteiligung am in-vivo-Experiment und die Überlassung der Proben.

Der AG Hudecek danke ich für die unkomplizierte Nutzung des Photometers.

Der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) danke ich für die finanzielle Förderung des Projekts C6 im Rahmen des FungiNet / Transregio 124.

Der GSLS verdanke ich das Stipendium und die Förderung im Rahmen des strukturierten Doktorandenprogramms.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines gesamten Studiums, wann immer es nötig war, in allen Bereichen unterstützt haben und mir so alle Möglichkeiten eröffnet haben. Und zu guter Letzt möchte ich Feli danken für die ständige Aufmunterung, wenn auch ein Experiment einmal nicht funktioniert hat.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation ‚**Das pH-regulierte Protein 1 (Pra1) von *Candida albicans* moduliert CD4⁺ T-Zell-Antworten der Maus in vitro durch direkte Bindung an die T-Zell-Oberfläche**‘ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Pretz, 15.06.2018.....

(Arne Bergfeld)

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled ‚**The pH-regulated protein 1 (Pra1) of *Candida albicans* modulates mouse CD4⁺ T cell responses in vitro by directly binding to the T cell surface**‘ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Pretz, 15.06.2018

(Arne Bergfeld)

PUBLIKATION

Direct Binding of the pH-Regulated Protein 1 (Pra1) from *Candida albicans* Inhiits Cytokine Secretion by Mouse CD4+ T Cells

Arne Bergfeld, Prasad Dasari, Sandra Werner, Timothy R. Hughes, Wen-Chao Song, Peter Hortschansky, Axel A. Brakhage, Thomas Hünig, Peter F. Zipfel, Niklas Beyersdorf

Frontiers in Microbiology, Mai 2017

BIBLIOGRAFIE

1. Bergfeld, A., et al., *Direct binding of the pH-regulated protein 1 (Pra1) from Candida albicans inhibits cytokine secretion by mouse CD4+ T cells*. Front Microbiol, 2017. **8**.
2. Cretney, E., A. Kallies, and S.L. Nutt, *Differentiation and function of Foxp3+ effector regulatory T cells*. Cell, 2012. **34**(2): p. 74-80.
3. Hof, H. and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*. Duale Reihe. 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 330.
4. Hahn, H., et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2005, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 21-33.
5. Groß, U., *Kurzlehrbuch Med. Mikrobiologie und Infektiologie*. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
6. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
7. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(2): p. 136-169.
8. Hale, B.G., R.A. Albrecht, and A. Garcia-Sastre, *Innate immune evasion strategies of influenza viruses*. Future Microbiol, 2010. **5**(1): p. 23-41.
9. Taubenberger, J.K. and J.C. Kash, *Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation*. Cell Host Microbe, 2010. **7**: p. 440-451.
10. Netea, M.G., et al., *Trained Immunity: A program of innate immune memory in health and disease*. Science, 2016. **352**(6284).
11. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*, ed. 8th. 2012: Garland Science.
12. Sarma, J.V. and P.A. Ward, *The Complement System*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 227-235.
13. Ahmad, A. and J. Menezes, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections*. FASEB J, 1996. **10**: p. 258-266.
14. van der Merwe, P.A. and S.J. Davis, *Molecular Interactions mediating T cell antigen recognition*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 659-684.
15. Rock, K.L., E. Reits, and J. Neefjes, *Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 724-737.
16. Birnbaum, M.E., et al., *Molecular architecture of the alpha beta T cell receptor-CD3 complex*. PNAS, 2014. **111**(49): p. 17576-17581.
17. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010. **107**(39): p. 16916-16921.
18. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**: p. 607-609.
19. Paul, S., Shilpi, and G. Lal, *Role of gamma-delta T cells in autoimmunity*. J Leukoc Biol, 2015. **97**(2): p. 259-271.

20. Chien, Y.-h., C. Meyer, and M. Bonneville, *$\gamma\delta$ T cells: First line of defense and beyond*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 121-155.
21. Cox, M.A., S.M. Kahan, and A.J. Zajac, *Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love*. *Virology*, 2013. **435**(1): p. 157-169.
22. Wong, P. and E.G. Pamer, *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 29-70.
23. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 331-337.
24. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 338-344.
25. Zhang, S., H. Zhang, and J. Zhao, *The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(4): p. 405-408.
26. Crotty, S., *A brief history of T cell help to B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 185-189.
27. Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter, *Raising the NKT cell family*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(3): p. 197-206.
28. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-763.
29. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 713-758.
30. Nakayama, T., et al., *Th2 cells in health and disease*. *Annu Rev Immunol*, 2017. **35**: p. 53-84.
31. Lyadova, I.V. and A.V. Panteleev, *Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**.
32. van de Veerdonk, F.L. and M.G. Netea, *T-cell subsets and antifungal host defenses*. *Curr Fungal Infect Rep*, 2010. **4**: p. 238-243.
33. Farah, C.S., et al., *Primary role for CD4+ T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis*. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 724-731.
34. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-189.
35. da Silva Dantas, A., et al., *Cell biology of Candida albicans-host interactions*. *Curr Opin Microbiol*, 2016. **34**: p. 111-118.
36. Tang, S.X., et al., *Epithelial discrimination of commensal and pathogenic Candida albicans*. *Oral Dis*, 2016. **22**: p. 114-119.
37. Seeliger, H.P.R. and T. Heymer, *Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt*. 1981, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
38. Scully, C., M. El-Kabir, and L.P. Samaranayake, *Candida and oral candidosis: A review*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1994. **5**(2): p. 125-157.
39. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem*. *Clin Microbiol Rev*, 2007. **20**: p. 133-163.

40. Cassone, A. and R. Cauda, *Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders*. AIDS, 2012. **26**(12): p. 1457-1472.
41. Zipfel, P.F., et al., *Immune escape of the human facultative pathogenic yeast Candida albicans: The many faces of the candida Pra1 protein*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**: p. 423-430.
42. Zaoutis, T.E., et al., *The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(9): p. 1232-1239.
43. Gudlaugsson, I., et al., *Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(9): p. 1172-1177.
44. Alonso-Valle, H., et al., *Candidemia in a tertiary care hospital: Epidemiology and factors Influencing mortality*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003. **22**: p. 254-257.
45. Magill, S.S., et al., *Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections*. N Engl J Med, 2014. **370**(13): p. 1198-1208.
46. Leroy, O., et al., *Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006)*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1612-1618.
47. Hof, H., *Mykologie für Mediziner*. 2003, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
48. Ashman, R.B. and J.M. Papadimitriou, *Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to Candida albicans infection*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 646-672.
49. Burkett, P.R., G. Meyer zu Horste, and V.K. Kuchroo, *Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity*. J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2211-2219.
50. Romani, L., *Innate and adaptive immunity in Candida albicans infections and saprophytism*. J Leukoc Biol, 2000. **68**: p. 175-179.
51. Lo, H.-J., et al., *Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent*. Cell, 1997. **90**: p. 939-949.
52. Jacobsen, I.D., et al., *Candida albicans dimorphism as a therapeutic target*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**: p. 85-93.
53. Gantner, B.N., R.M. Simmons, and D.M. Underhill, *Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments*. EMBO J, 2005. **24**: p. 1277-1286.
54. Kluger, N., et al., *Gastrointestinal manifestations on APECED syndrome*. J Clin Gastroenterol, 2013. **47**(2): p. 112-120.
55. Lopez-Ribot, J., et al., *Cloning of a cDNA fragment encoding part of the protein moiety of the 58-kDa fibrinogen-binding mannoprotein of Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **157**: p. 273-278.

56. Sentandreu, M., et al., *Cloning and characterization of PRA1, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of Candida albicans*. J Bacteriol, 1998. **180**(2): p. 282-289.
57. Cohen, R.E. and C.E. Ballou, *Mannoproteins: Structure*. Plant Carbohydrates II. Encyclopedia of Plant Physiology (New Series), ed. T. W. and L. F.A. Vol. 13. 1981, Berlin, Heidelberg: Springer.
58. Casanova, M., et al., *Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from Candida albicans*. Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 4221-4229.
59. Soloviev, D.A., et al., *Identification of pH-regulated antigen 1 released from candidca albicans as the major ligand for leukocyte Integrin alphaMbeta2*. J Immunol, 2007. **178**: p. 2038-2046.
60. Luo, S., et al., *Immune evasion of the human pathogenic yeast Candida albicans: Pra1 is a factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein*. Mol Immunol, 2009. **47**: p. 541-550.
61. Luo, S., et al., *Secreted pH-regulated antigen 1 of Candida albicans blocks activation and converison of complement C3*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2164-2173.
62. Citiulo, F., et al., *Candida albicans scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion*. PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002777.
63. Barnden, M.J., et al., *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based a- and b-chain genes under the control of heterologous regulatory elements*. Immunol Cell Biol, 1998. **76**: p. 34-40.
64. Sun, X., et al., *Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**: p. 628-633.
65. Bacher, P., et al., *Identification of immunogenic antigens from Aspergillus fumigatus by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2014. **193**(3332-3343).
66. Unkless, J.C., *Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors*. J Exp Med, 1979. **150**: p. 580-596.
67. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**: p. 131-137.
68. Dixon, J.F.P., J.L. Law, and J.J. Favero, *Activation of human T lymphocytes by crosslinking of anti-CD3 monoclonal antibodies*. J Leukoc Biol, 1989. **46**: p. 214-220.
69. Dennehy, K.M., et al., *Cutting edge: Monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory response*. J Immunol, 2006. **176**: p. 5725-5729.
70. Sharpe, A.H. and A.K. Abbas, *T-cell costimulation - biology, therapeutic potential, and challenges*. New Eng J Med, 2006. **355**(10): p. 973-975.

71. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-336.
72. Hsieh, C.-S., et al., *Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-549.
73. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. **145**: p. 3796-3806.
74. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T-cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol, 1989. **143**: p. 1283-1289.
75. Klausner, R.D., J.G. Donaldson, and J. Lippicott-Schwartz, *Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure*. J Cell Biol, 1992. **116**: p. 1071-1080.
76. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski, *Activation-induced cell death in T cells*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 70-81.
77. Atale, N., et al., *Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques*. J Microsc, 2014. **255**(1): p. 7-19.
78. Kaltenberg, J., et al., *Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**: p. 1496-1503.
79. Soloviev, D.A., S. Jawhara, and W.A. Fonzi, *Regulation of innate immune response to Candida albicans Infections by alphaMbeta2-Pra1p interaction*. Infect Immun, 2011. **79**(4): p. 1546-1558.
80. van Spriel, A.B., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2478-2486.
81. Romani, L., *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**: p. 275-288.
82. Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, *Ion channel and transporters in lymphocyte function and immunity*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**: p. 532-546.
83. Seya, T., et al., *Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**: p. 1255-1260.
84. Miwa, T. and W.-C. Song, *Membrane complement regulatory proteins: Insight from animal studies and relevance to human diseases*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**: p. 445-459.
85. Jacobson, A.C. and J.H. Weis, *Comparative functional evolution of human and mouse CR1 and CR2*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 2953-3959.
86. Luo, S., et al., *The pH-regulated antigen 1 of Candida albicans binds the human complement inhibitor C4b-binding protein and mediates fungal complement evasion*. J Biol Chem, 2011. **286**: p. 8021-8029.
87. Fazekas De St. Groth, B., A.L. Smith, and C.A. Higgins, *T cell activation: in vivo veritas*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**: p. 260-268.
88. Ziegler, S.F., et al., *Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens*. Eur J Immunol, 1993. **23**: p. 1643-1648.

89. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**: p. 789-795.
90. Christensen, J.E., et al., *CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8*. Int Immunol, 2001. **13**(4): p. 593-600.
91. Hoffman, E.A., et al., *Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes*. J Biol Chem, 2015. **290**(44): p. 26404-26411.
92. Sompuram, S.R., et al., *Antibodies immunoreactive with formalin-fixed tissue antigens recognize linear protein epitopes*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**: p. 82-90.
93. Harris, C.L., N.K. Rushmere, and B.P. Morgan, *Molecular and functional analysis of mouse decay accelerating factor (CD55)*. Biochem J, 1999. **341**: p. 821-829.
94. Teisseyre, A. and J.W. Mozrzymas, *Influence of extracellular pH on the modulatory effect of zinc ions on Kv1.3 potassium channels*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57**: p. 131-147.
95. Liu, Q., et al., *Modulation of Kv channel expression and function by TCR and costimulatory signals during peripheral CD4 lymphocyte differentiation* J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 897-909.
96. Kahlfuß, S., et al., *Immunsuppression by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of Kv1.3 and KCa3.1 channels in T cells*. Mol Cell Biol, 2014. **34**: p. 820-831.
97. Ebert, J.C. and B.A. Russ, *Robust recognition of zinc binding sites in proteins*. Protein Sci, 2007. **17**: p. 54-65.
98. Evers, T.H., et al., *His-tags as Zn(II) binding motifs in a protein-based fluorescent sensor*. Protein Eng Des Sel, 2008. **21**(8): p. 529-536.
99. Bixby, K.A., et al., *Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 38-43.
100. Kaur, K., et al., *Zinc: The metal of life*. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2014. **13**: p. 258-376.
101. Woodward, W.D., S.M. Filteau, and O.B. Allen, *Decline in serum zinc level throughout adult life in laboratory mouse*. J Gerontol, 1984. **39**(5): p. 521-524.
102. Chiechanover, A., et al., *Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 9681-9689.
103. Hochuli, E., et al., *Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent*. Nat Biotechnol, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
104. Debeljak, N., et al., *Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant protein*. Anal Biochem, 2006. **359**(2): p. 216-223.

105. Lipman, N.S., et al., *Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources*. ILAR J, 2005. **46**(3): p. 258-268.
106. Bass, J.J., et al., *An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research*. Scand J Med Sci Sports, 2017. **27**: p. 4-25.
107. Forsström, B.r., et al., *Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes*. PLoS One, 2015. **10**(3).
108. Ekkena, O. and R.J. Scherertz, *Factors affecting colonization and dissemination of Candida albicans from the gastrointestinal tract of mice*. Infect Immun, 1987. **55**(7): p. 1558-1563.
109. Masopust, D. and J.D. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**: p. 309-320.
110. Domer, J.E., *Intragastric colonization of infant mice with Candida albicans induces systemic immunity demonstrable upon challenge as adults*. J Infect Dis, 1988. **157**(5): p. 950-958.
111. Yu, M., et al., *Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx*. J Exp Med, 2011. **208**(4): p. 775-785.
112. Mencacci, A., et al., *Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1483-1490.
113. Arch, R.H. and C.B. Thompson, *Lymphocyte survival - the struggle against death*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 113-140.
114. Fang, Y., et al., *Comparison of sensitivity of Th1, Th2, and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis*. J Leukoc Biol, 2010. **87**: p. 1019-1028.
115. Yoo, J.K., et al., *IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4+ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway*. J Immunol, 2002. **169**: p. 3637-3643.
116. Conti, H.R. and S.L. Gaffen, *Host responses to Candida albicans: Th17 cells and mucosal candidiasis*. Microb Infect, 2010. **12**: p. 518-527.
117. Berard, M. and D.F. Tough, *Qualitative differences between naive and memory T cells*. Immunology, 2002. **106**(127-138).
118. Liao, W., J.-X. Lin, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 13-25.
119. Redmond, H.P., et al., *Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms*. J Immunol, 1993. **150**: p. 3427-3433.
120. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-795.
121. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2007. **26**: p. 453-479.

122. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**: p. 180-190.
123. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**: p. 149-160.
124. Riipi, L. and E. Carlson, *Tumor necrosis factor (TNF) is induced in mice by Candida albicans: Role of TNF in fibrinogen increase*. Infect Immun, 1990. **58**(9): p. 2750-2754.
125. Bekker, L.-G., et al., *TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways*. J Immunol, 2001. **166**: p. 6728-6734.
126. Futenma, M., K. Kawakami, and A. Saito, *Production of tumor necrosis factor-alpha in granulocytopenic mice with pulmonary candidiasis and its modification with granulocyte colony-stimulating factor*. Microbiol Immunol, 1995. **39**(6): p. 411-417.
127. Louie, A., et al., *Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis*. Infect Immun, 1994. **62**(7): p. 2761-2772.
128. Steinke, J.W. and L. Borish, *Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res, 2001. **2**: p. 66-70.
129. Romani, L., et al., *Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis*. J Exp Med, 1992. **167**: p. 19-25.
130. Reynolds, J.M., P. Angkasekwinai, and C. Dong, *IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**: p. 413-423.
131. Curtis, M.M. and S.S. Way, *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 177-185.
132. Zheng, J., et al., *Gain-of-function STAT1 mutations impair STAT3 activity in patients with chronic mucocutaneous candidiasis (CMC)*. Eur J Immunol, 2015. **45**: p. 2834-2846.
133. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**: p. 624-631.
134. Bouguermouh, S., et al., *CD28 co-stimulation down regulates Th17 development*. PLOS One, 2009. **4**(3).
135. Tavares, D., P. Ferreira, and M. Arala-Chaves, *Increased resistance to systemic candidiasis in athymic or interleukin-10-depleted mice*. J Infect Dis, 2000. **182**: p. 266-273.
136. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**: p. 3463-3468.
137. Sanderson, C.J., *Interleukin-5, eosinophils, and disease*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3101-3109.