

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig

**Untersuchung der Interaktion von Makrophagen mit dem humanpathogenen
Hefepilz *Candida albicans*:
Toll-like Rezeptoren und NF- κ B Aktivierung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander Roeder
aus
Nürnberg
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.C. Korting

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher
Prof. Dr. M. Schliwa
Prof. Dr. G. Enders

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. M. Schaller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2004

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Candida albicans	1
1.1.1 Klinische Bedeutung von <i>Candida albicans</i>	1
1.1.2 Pathogenität und Virulenzfaktoren.....	2
1.1.3 Zusammensetzung und Struktur der Zellwand	4
1.1.4 Pharmakotherapie und antimykotische Forschung.....	5
1.2 Das Immunsystem	7
1.2.1 Die erworbene Immunantwort	8
1.2.2 Die angeborene Immunantwort	8
1.2.3 Toll-like Rezeptoren (TLRs)	10
1.3 Die intrazelluläre Signaltransduktion	13
1.3.1 TLR-Signalkaskade.....	13
1.3.2 NF- κ B	15
1.3.3 Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen und AP-1	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Verwendete C. albicans-Präparationen	18
2.1.1 Synchronisation von <i>C. albicans</i> Wildtyp.....	18
2.1.2 Antimykotika (AM)-vorbehandelte Präparation	19
2.1.3 Hitze-inaktivierte Präparation	19
2.1.4 Sekretorische Aspartat Proteasen (Sap)-inaktivierte Präparation....	20
2.2 Verwendete Mausmakrophagen	20
2.3 Stimulation der Makrophagen mit den C. albicans-Präparationen	21
2.3.1 Gewinnung der nukleären Proteine.....	21
2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	22
2.4.1 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids	23
2.4.2 EMSA-Mix	24
2.4.3 Supershift	24

2.4.4	Kompetitionsassay	25
2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	25
2.6	Western-Blotting	26
2.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.6.2	Proteintransfer	27
2.6.3	Immundetektion	28
2.6.4	Stripping	29
2.7	Statistische Auswertung und benutzte Software	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Untersuchung der Induktion von NF- κ B in Wildtyp-Makrophagen.....	30
3.1.1	Der lebende und der AM-vorbehandelte Stamm aktivieren NF- κ B ...	31
3.1.2	Keine NF- κ B Aktivierung durch den Hitze-inaktivierten Stamm	34
3.1.3	Der Sap-inaktivierte Stamm aktiviert NF- κ B	35
3.2	Untersuchung der TLR Aktivierung	37
3.2.1	TLR2 und TLR4 erkennen den lebenden Stamm	37
3.2.2	TLR2 erkennt den AM-vorbehandelten Stamm	38
3.2.3	Der lebende Stamm induziert TNF- α in Wildtyp- und TLR4- defizienten Makrophagen nach Vorstimulation mit IFN- γ	39
3.3	Untersuchung der Signaltransduktion.....	40
3.3.1	Der AM-vorbehandelte Stamm aktiviert I κ B- α	40
3.3.2	Der AM-vorbehandelte Stamm aktiviert MAP Kinasen	42
3.3.2.1	Aktivierung und Kinetik der extracellular related kinase (ERK) ..	43
3.3.2.2	Aktivierung und Kinetik von p38.....	44
3.3.2.3	Aktivierung und Kinetik der c-Jun NH ₂ -terminal kinase (JNK)	45
3.3.3	Der AM-vorbehandelte Stamm bewirkt c-Jun Transkription.....	46
4.	DISKUSSION	48
4.1	Die Bedeutung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) in <i>C. albicans</i> für die TLR-vermittelte Aktivierung von NF- κ B...49	
4.2	Kollaboration von TLR2 und TLR4 in der Erkennung des lebenden Stammes.....	50

4.3 Die Rolle von TLR2 in der Erkennung des AM-vorbehandelten Stammes.....	52
4.4 I κ B- α als Knotenpunkt in der Stress-induzierten Aktivierung von NF- κ B	54
4.5 Zusätzliche Aktivierung von AP-1 durch den AM-vorbehandelten Stamm.....	55
4.6 Cross-Talk zwischen NF- κ B und AP-1	57
4.7 Strategien zur therapeutischen Hemmung von NF- κ B und der TLRs	58
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS	63
7. VERZEICHNIS EINGESETZTER MATERIALIEN	78
8. ABKÜRZUNGEN	82
9. DANKSAGUNG	84
10. LEBENSLAUF	85

1. EINLEITUNG

1.1 *Candida albicans*

1.1.1 Klinische Bedeutung von *Candida albicans*

Die Spezies *Candida albicans* (lat. *candidus*: glänzend weiß; *albicare*: weiß sein/werden) ist eine pathogene Hefe der Gattung *Candida* mit diploidem Chromosomensatz (8 Chromosomen). In der Systematik der Pilze zählt der Organismus zu der Klasse der Basidiomyceten des Phylums Ascomycota [13]. In der Kultur bildet *C. albicans* weiße, glatte, zum Teil cremige Kolonien mit hefeartigem Geruch. Morphologisch können bei diesem polymorphen Pilz Blastokonidien (elongierte Sprosszellen), Pseudohyphen als hintereinander gelagerte Einzelzellen und echte Hyphen unterschieden werden [68]. Ein wichtiges diagnostisches Kriterium gegenüber anderen Hefen ist die Fähigkeit von *C. albicans*, auf nährstoffarmen Nährböden wie Reis-Tween-Agar sogenannte Chlamydosporen zu bilden. Diese Strukturen fungieren als Dauersporen, werden meistens etwas größer (bis zu 17 µm) als Blastokonidien und besitzen eine widerstandsfähige Zellwand.

Maximal 20 der über 150 bekannten *Candida* Spezies wurden bisher als Infektionserreger beschrieben. Häufig findet man in Abhängigkeit vom Patientengut zunehmend auch andere Spezies von *Candida*, insbesondere als Erreger von tiefen Mykosen. Je stärker das zelluläre Immunsystem beeinträchtigt ist, desto häufiger treten andere *Candida* Arten auf, wie z.B. *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* und *Candida dubliniensis* [92,95]. Dennoch nimmt *C. albicans* weiterhin aufgrund seiner Häufigkeit und klinischen Relevanz eine herausragende Stellung ein. *C. albicans* besiedelt als harmloser Kommensale die Haut und Schleimhaut des gesunden Menschen. So wird dieser Keim häufig auf Abstrichmaterialien der Haut nachgewiesen und ist bei Gesunden zu 20 – 50% im Oropharynx zu finden [68]. Des Weiteren zählt *C. albicans* zur normalen vaginalen Flora [92] und kann bei über 55% gesunder Erwachsener im Jejunalsekret detektiert werden [16].

Endogene Candidainfektionen entstehen oft bei Patienten mit herabgesetzter Resistenz, gehäuft vor allem bei gestörter zellulärer Immunität. Somit ist *C. albicans* ein typischer opportunistischer Krankheitserreger, der für ein breites Spektrum von lokalen und systemischen Mykosen verantwortlich ist; hierzu zählen kutane, subkutane und Organmanifestationen [25]. Vor allem die intertriginösen Bereiche der

Haut (interdigital, axillär, perianal, inguinal) sowie der Windelbereich bei Säuglingen sind durch das dort vorherrschende feuchtwarme Mikroklima betroffen. Bei den Erkrankungen der Haut und Schleimhaut ist besonders die erosive Candidose und der Soor, ein durch zum Teil dicke Beläge gekennzeichnete Befall der Zunge, des harten Gaumens und der Speiseröhre, welcher vor allem bei AIDS-Patienten und anderweitig Immunsupprimierten auftritt, hervorzuheben. Das Krankheitsbild der vulvovaginalen Candidose (VVC) findet sich oft bei ansonsten gesunden Frauen und verläuft nicht selten chronisch oder rezidivierend [92].

C. albicans ist zudem der häufigste Erreger systemischer Pilzinfektionen. Vor allem bei Leukämie-Patienten, bei Immunsupprimierten, oder nach invasiven therapeutischen Eingriffen verursacht der Keim nach Dissemination über die Blutbahn lokalisierte Organinfektionen (z.B. insbesondere von Niere und Leber), transiente Fungämien und Sepsis. Weitere Risikofaktoren für diese lebensbedrohlichen Komplikationen sind hormonelle Umstellungen (Kontrazeptiva, Gravidität), Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus, Adipositas), lokale Belastungen (Hämostase, Okklusion, Verbrennungen), Kortikosteroid- und Chemotherapie, sowie eine langanhaltende Verabreichung mit Antibiotika, insbesondere Vancomycin und/oder Imipenem [23]. Die Mortalitätsrate systemischer Candidainfektionen beträgt etwa 35% [113], und nach jüngeren Untersuchungen in Nordamerika ist *Candida* in Blutkulturen der vierthäufigste Keim nach Koagulase-negativen Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken [19].

1.1.2 Pathogenität und Virulenzfaktoren

Die Pathogenese von *Candida* lässt sich in mehrere Infektionsstadien unterteilen. *Candida* kolonisiert bzw. adhärirt an mukosale Oberflächen und penetriert das Epithelium. Nach der Invasion und Zerstörung des Epitheliums gelangt der Keim in die Blutbahn und wird disseminiert. Anschliessend erfolgt über Adhäsion und Penetration von Endothelzellen die Invasion in das Organgewebe [69].

Obwohl für das Auftreten einer solchen Pilzerkrankung der Immunstatus des Wirtes von entscheidender Bedeutung ist, scheint auch der Erreger selbst für Aufrechterhaltung und Fortgang der Infektion maßgeblich zu sein. Dies ergibt sich bereits aus der Überlegung, dass nur sehr wenige Pilzarten pathogenetisch von Bedeutung sind und demnach im Vergleich zu den apathogenen Arten über

besondere Eigenschaften verfügen müssen. Ein entsprechendes Verständnis der Beziehungen zwischen Erreger und Wirt setzt deshalb eine Charakterisierung von möglichen Virulenzeigenschaften humanpathogener Pilze voraus.

Anders als bei einigen obligat pathogenen Bakterien, für deren Virulenz oft nur eine bzw. einige wenige Determinanten verantwortlich sind, scheint die Pathogenität von *C. albicans* durch eine Vielzahl von Mechanismen bedingt zu sein [63]. Offensichtlich gelingt es diesem Opportunisten durch das koordinierte Zusammenspiel verschiedener Eigenschaften, sich an unterschiedliche Wirtsnischen anzupassen und sich bei entsprechender Disposition des Wirtes zu vermehren und auszubreiten. Während des Infektionsgeschehens stehen potentielle Virulenzgene vermutlich regulatorisch in enger Beziehung zueinander, werden wahrscheinlich stadienspezifisch je nach Anforderung exprimiert und tragen so in ihrer Kombination zur Flexibilität und Virulenz dieses Keims als Erreger bei [12]. Dazu zählen

- die Fähigkeit zur Adhärenz an unterschiedliche Wirtsoberflächen,
- das dimorphe Wachstum (Hefen-Hyphen-Transition),
- phänotypisches switching und
- die Sekretion hydrolytischer Enzyme wie Lipasen und Phospholipasen.

Insbesondere die sekretorischen Aspartat-Proteasen (Saps) scheinen aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften sowohl bei den initialen Infektionsschritten der Adhäsion und Penetration als auch bei der Invasion tieferer Gewebe eine besonders wichtige Rolle zu spielen [62]. Sie gehören zu den Carboxypeptidasen und werden auch als saure Peptidasen bezeichnet, da sie meist nur im sauren Milieu aktiv sind [31]. Ihnen gemeinsam ist ihre spezifische Hemmbarkeit durch das kompetitiv bindende Hexapeptid Pepstatin A, was in einer verringerten *Candida*-Virulenz resultiert [70]. Die Proteasen sind in der Lage, das menschliche Gewebe zu schädigen, und zerstören somit Wirtszellbarrieren während der Invasion [17,61]. Vermutlich spielen sie auch eine Rolle bei der Degradation von Wirtsproteinen für die Nährstoffbereitstellung [55] und der Eliminierung von Immunglobulinen und Komplementmolekülen des menschlichen Abwehrmechanismus [39]. Es konnten mittlerweile zehn unterschiedliche *SAP*-Gene identifiziert werden. Unterschiedliche *in vitro* Modelle weisen darauf hin, dass die Gene *SAP1* bis *SAP3* maßgeblich an lokalen Haut- und Schleimhautinfektionen beteiligt sind [82,83,85], wohingegen *SAP4* bis *SAP6* erst nach Dissemination in tiefere Organe induziert werden [20,89]. Die Relevanz dieser Enzyme bei der Infektionsentstehung könnte einen innovativen

Ansatzpunkt einer neuen antimykotischen Therapie aufzeigen. In dieser Arbeit wird daher unter anderem auch ihre Bedeutung für die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr untersucht.

1.1.3 Zusammensetzung und Struktur der Zellwand

Generell kommt der Zellwand von *C. albicans* eine große experimentelle Rolle zu, da sie in Bezug auf Virulenz, Formerhalt und Diagnostik eine wichtige Rolle zu spielen scheint [68].

Die Zellwand von *C. albicans* besteht aus maximal sechs mehr oder wenigen elektronendichten Zelllagen, ist 250-260 nm dick und besteht aus drei Ausgangsmaterialien. Den überwiegenden Anteil von 80 – 90% stellen Kohlenhydrate (β -Glukan, Mannan, Chitin), zusätzlich finden sich zu 6 – 25% Proteine (Mannoproteine) und zu 1 – 7% Fette (Glykolipide) [15]. Die Kohlenhydratpolymere der Glukane bilden, verstärkt durch Chitin, ein maschenartiges Netzwerk, welches Struktur und Festigkeit verleiht. β -Glukan und Mannan als Hauptbestandteile stellen 47 – 60% und 40% des Trockengewichts der Zelle, Chitin ist für 0,6 – 9% verantwortlich. Die relative Verteilung der Einzelkomponenten ist abhängig von der Schicht der Zellwand und unterscheidet sich vom periplasmatischen Raum zum extrazellulären Raum hin erheblich.

Glukan liegt in zwei Formen vor: als β -(1,3)-Glukan und als β -(1,6)-Glukan. Bei ersterem handelt es sich um ein für Pilze charakteristisches Polysaccharid aus etwa 1500 Glukoseeinheiten, welche 1,3-glykosidisch verbunden sind und gelegentliche β -(1,6)-Seitenketten aufweisen [53]. Je drei parallele Ketten bilden als Tripelhelix wasserunlösliche Fibrillen. β -(1,3)-Glukan kann weiter differenziert werden in einen Anteil, welcher durch alkalische Detergenzien aus dem Zellwandverband gelöst werden kann, und in einen alkalisch unlöslichen Anteil. Letzterer ist mit Chitin gebunden. Bei diesem für Pilze charakteristischen Kohlenhydrat handelt es sich um lineare Homopolymere der Glukose, welche β -glykosidisch miteinander verbunden sind.

Das Polysaccharid β -(1,6)-Glukan ist eine aus etwa 140 Glukose-Monosacchariden 1,6-glykosidisch verbundene Kette und ist wie das Chitin an das Geflecht aus β -(1,3)-Glukanen angeknüpft [54]. Dieses Kohlenhydrat kann ebenfalls in der alkalisch löslichen und in der alkalisch unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden.

Das Saccharid Mannan, ein Polymer der Mannose liegt nicht separat in der Zellwand vor, vielmehr ist es stets kovalent an Zellwandproteine gebunden [64]. Es dient dem wabigen, dreidimensionalen Stützskelett als Füllmaterial. Bezeichnungen wie Phosphomannoproteine oder Phosphopeptidomannane beziehen sich auf die komplexe Verbindung des Zuckers mit Phosphorgruppen und den Zellwandproteinen. Diese Proteine werden ihrerseits im periplasmatischen Raum oder der Zellwand selbst noch modifiziert. Hierzu zählen die beschriebene Glykosylierung mit Mannan und die Phosphorylierung. Weiterhin findet teilweise eine Verankerung mit Glykanosylphosphatidylinositol (GPI) und kovalent die Bindung von Ubiquitin, einem eukaryontisch hochkonservierten Polypeptid unklarer Funktion, an Lysin statt [15]. Diese Vielfalt an möglichen Modifikationen bedingt eine Komplexität der Zellwand, die immer noch nicht vollständig untersucht ist.

1.1.4 Pharmakotherapie und antimykotische Forschung

Für die Behandlung von Kandidosen steht ein großes therapeutisches Armamentarium mit hoher Effizienz zur Verfügung [8]. Die Art der Therapie richtet sich nach der Lokalisation, der Akuität (akut oder chronisch), der Ausdehnung und der Tiefe der Infektion (oberflächlich oder tief) und nach der Kontagiosität [45,46,87]. Chemisch werden Antimykotika folgendermaßen unterteilt:

- Polyene (Amphotericin B, Nystatin, Natamycin)
- Azole Imidazolderivate (z.B. Clotrimazol, Sertaconazol),
Triazolderivate (z.B. Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol)
- Allylamine (Terbinafin, Naftifin)
- Morpholine (Amorolfin)
- Pyridone (Ciclopiroxolamin)
- Antimetabolite (5-Fluorocytosin)

Im folgenden soll aus der obigen Übersicht nur auf die Polyen- und die Azol-Antimykotika eingegangen werden, da in der vorliegenden Arbeit für die Inaktivierung von *C. albicans* ein Gemisch aus Amphotericin B, Nystatin und Itraconazol verwendet wurde.

Zu den Polyen-Antimykotika, deren Grundstruktur ein makrozyklischer Lactonring mit 4 bis 7 Doppelbindungen bildet, gehören die fungiziden Substanzen Amphotericin B und Nystatin sowie das fungistatische Natamycin. Aufgrund ihrer amphiphilen

Molekülstruktur interagieren diese Substanzen mit dem Ergosterol der Zellmembran und bilden Komplexe, was in der Folge zur Entstehung von Poren führt, durch die zytoplasmatische Bestandteile austreten können. Dadurch werden die Fähigkeit zur Erhaltung des Protonengradienten und an diesen gekoppelte Transportprozesse, z.B. solche für Kalium, blockiert. Die ausschließlich parenterale Applikation von Amphotericin B darf wegen der schweren Nebenwirkungen nur nach strenger Indikationsstellung durchgeführt werden. Besonders zu beachten ist die Nephrotoxizität, die durch Infusion physiologischer Kochsalz-Lösung gesenkt werden kann. Sie ist bei Gabe einer Fettemulsion, vor allem aber bei liposomalen Zubereitungen von Amphotericin B (Ambisome®) geringer als bei der normalen Lösung [28]. Amphotericin B wird sehr häufig in Kombination mit 5-Fluorocytosin (Flucytosin) verwendet. Als synthetisch fluoriniertes Pyrimidinanalogon greift dieser Antimetabolit inhibierend in die fungale RNA-Synthese ein. Nebenwirkungen treten bei dieser Therapie selten auf, jedoch entwickeln sich schnell Resistenzen gegenüber diesem Antimykotikum [75].

Alle Azol-Antimykotika wirken durch Hemmung der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen, fungistatisch. Der Angriff erfolgt an dem Enzym Lanosteroldemethylase, welches zur Gruppe der pilzspezifischen Cytochrom-P-450-Isoenzyme gehört. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Lanosterol und zu einem Mangel an Ergosterol in der Pilzmembran, wodurch die normale Membranfunktion und insbesondere die Funktion membranständiger Enzyme beeinträchtigt wird. Dies gilt z.B. für die Chitinsynthase, die für Zellwachstum und -teilung von Pilzen unverzichtbar ist [91].

Zur therapeutischen Verwendung stehen z.B. Imidazolderivate wie Clotrimazol, Bifonazol, Econazol, Fenticonazol, Isoconazol, Oxiconazol, Sertaconazol, Tioconazol, Miconazol und Ketoconazol zur Verfügung. Die neueren Substanzen wie Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol sowie Posaconazol und Ravuconazol enthalten anstelle des Imidazolrings einen Triazolring, wodurch die metabolische Stabilität und die Affinität an das fungale Cytochrom P-450 erhöht wird.

Ein zunehmendes Problem stellt das gehäufte Auftreten klinisch relevanter Resistenzen von *C. albicans* gegenüber zahlreichen Pharmaka dar. Die vermehrte Expression von Membran-Transporter-Genen wie z.B. die *Candida* drug resistance Gene *CDR1* und *CDR2* sowie das Multidrug resistance Gen *MDR1* führt unter

anderem zu einem verstärktem Efflux der Antimykotika aus der Zelle [67,110,116]. Zur Resistenzentwicklung vieler *Candida*-Stämme kommt es ebenfalls durch Mutationen der Lanosteroldemethylase, wodurch die Affinität des Enzyms zum Antimykotikum herabgesetzt wird. Ferner kann eine Überexpression des Gens *ERG11*, welches für die Lanosteroldemethylase kodiert, zur Resistenz des Keimes führen [80].

Aufgrund dieser Resistenzproblematik ist eine Reihe von Medikamenten in der Entwicklung bzw. klinischen Erprobung [76]. Zu den erfolgsversprechenden neuen Antimykotika gehören die Echinocandine und die Pneumocandine (CANCIDAS® von MSD Sharp and Dohme), welche das Enzym β -(1,3)-Glukan-Synthase hemmen. Dieses Enzym synthetisiert den wichtigen Zellwandbestandteil Glukan. Das Antimykotikum Nikkomycin blockiert die Synthese von Chitin, welches ebenfalls ein wichtiger Baustein der Zellwand ist. Da die Zellwand essentiell für das Überleben der Hefen ist und zudem eine pilzspezifische Struktur darstellt, sind diese Ansätze besonders attraktiv. Substanzen, die auf die Proteinbiosynthese inhibitorisch wirken sollen, sind Sordarin, ein Tetrahydrofuranderivat, welches durch Bindung an den Elongationsfaktor EF2 die Translation verhindert.

Wie bereits vorhin erwähnt, sind die Saps von *C. albicans* ein weiterer möglicher Angriffspunkt, zumal bisher alle Antimykotika auf eine Hemmung der Stoffwechselprozesse abzielen und nicht direkt in die Virulenz eingreifen. Seit der Einführung von hochwirksamen HIV-Protease-Hemmern konnten Erkenntnisse über die Wechselwirkung dieser Inhibitoren mit *C. albicans* erarbeitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Modellsubstanz Pepstatin A auch die HIV-Proteaseinhibitoren Saquinavir und Indinavir die Sap-Aktivität *in vitro* dosisabhängig reduzieren können [47,86]. Ein Indiz dafür ist auch, dass mit der Einführung der HIV-Proteaseinhibitoren die Prävalenz der oralen Kandidose als die vormals am häufigsten diagnostizierte Infektionskrankheit bei HIV-Patienten deutlich reduziert wurde [32]. Die Erforschung der Röntgenkristallstrukturen aller zehn Sap-Isoenzyme sollte ermöglichen, gezieltere Proteaseinhibitoren gegen die Saps zu entwickeln, die in dem jeweiligen Infektionsstadium und –ort von Bedeutung sind.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch verschiedene Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Bei höheren Vertebraten

unterscheidet man die angeborene Immunität („innate immunity“) von der erworbenen Immunität („adaptive immunity“) [36]. Das erworbene Immunsystem entstand vor ca. 450 Millionen Jahren. Es erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei der darauffolgenden Infektion und bot damit einen Selektionsvorteil. Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität, von der Formen in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen zu finden sind, blieb jedoch erhalten [33]. Wesentliche Unterschiede beider Formen der Abwehr liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung.

1.2.1 Die erworbene Immunantwort

Haupteffektoren der adaptiven Immunität sind die T- und B-Lymphozyten. Anstelle mehrerer verschiedener Rezeptoren, von denen jeder ein konserviertes Oberflächenmolekül eines Krankheitserregers erkennt, trägt jede ungeprägte T- oder B-Zelle nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese werden durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus festgelegt, welcher während der Entwicklung dieser Zellen im Knochenmark und im Thymus abläuft [35]. Die große Anzahl der T- und B-Zellen in der Gesamtpopulation bewirkt ein fast unbegrenztes Repertoire an Antigenrezeptoren. Die darauffolgende somatische Selektion umfasst verschiedene Mechanismen, in denen autoreaktive Lymphozyten eliminiert und relevante Effektorzellen ausgewählt werden [35]. Somit scheint die angeborene Immunität für die Vermeidung von Immunität gegen Selbstantigene (Autoimmunkrankheiten) und nichtpathogene Umweltantigene (Allergien) von Bedeutung zu sein [36].

Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind zur Induktion der adaptiven Immunantwort erforderlich. Die Antigenpräsentation auf sogenannten Haupthistokompatibilitätsantigenen (major histocompatibility complex II, MHC II) und die gleichzeitige Expression kostimulierender Proteine bewirken die Aktivierung der zu diesem Antigen passenden nativen CD4-T-Lymphozyten, die für die Aktivierung von B-Zellen, CD8-T-Zellen und weiterer Makrophagen benötigt werden [35].

1.2.2 Die angeborene Immunantwort

Wenn Krankheitserreger eine Epithelbarriere überwinden, werden sie sofort von Phagozyten erkannt. Darauf folgend werden durch die unmittelbare, angeborene

Immunreaktion, mit Hilfe von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und des Komplementsystems, die eindringenden Mikroorganismen bekämpft [1]. Diese Reaktion kann schon ausreichen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Anderenfalls steuern die Immunzellen durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen und durch die Expression kostimulierender Moleküle die weitere angeborene und erworbene Immunantwort [35].

Betrachtet man speziell die Immunabwehr bei Candidainfektionen, so haben neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten eine entscheidende Funktion (Kapitel IV.16 in [13]). Neutrophile Granulozyten können *Candida*-Zellen phagozytieren und mit Hilfe ihres lytischen Potentials abtöten. Zusätzlich können T-Lymphozyten über die Freisetzung stimulierender Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) Gewebemakrophagen aktivieren und diese dadurch bei System- und Schleimhautkandidosen zur potenteren Phagozytose und Elimination der Pilzzellen befähigen [37,111]. Die humorale Immunität spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Generell ist die Gruppe der mikrobiellen Pathogene sehr heterogen und weist eine hohe Mutationsrate auf. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität besteht daher darin, nicht jedes mögliche Antigen, sondern bestimmte, in der Evolution hoch konservierte Strukturen zu erkennen [36]. Beispiele dieser Strukturen, auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) genannt, sind Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan (PGN), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glukane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA [2,36]. Diese chemisch sehr verschiedenen Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten: Sie werden von Mikroorganismen, jedoch nicht vom Wirt selbst gebildet; sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus, und sie kommen in einer Vielzahl der Pathogene vor [33,36].

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannte mustererkennende Rezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs), werden auf verschiedenen Antigen präsentierenden Zellen (APZ), wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert [56]. Diese Effektorzellen haben Rezeptoren mit einheitlicher Spezifität. Pathogene können also gleichzeitig von einer großen Anzahl dieser Zellen erkannt werden, und die von ihnen hervorgerufene Antwort erfolgt ohne

vorherige Proliferation sofort. Funktionell können die mustererkennenden Rezeptoren (PRRs) in drei Klassen unterteilt werden [36]:

- Sezernierte PRRs, z.B. Mannan-bindendes Lektin
- Endozytierende PRRs, z.B. Mannose-Rezeptor und Scavenger-Rezeptoren
- Signaltransferierende PRRs

Die letzte Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren besitzt die Fähigkeit, die Information der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterzuleiten und daraufhin die Expression verschiedener Gene der Immunantwort zu induzieren. Die kürzlich entdeckten Toll-like Rezeptoren (TLRs) scheinen hierfür eine bedeutende Rolle zu spielen [57].

1.2.3 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

TLRs zeigen, wie ihr Name bereits vermuten lässt, eine große Homologie zum Rezeptor Toll in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Zunächst als relevantes Gen für die Etablierung der dorso-ventralen Achse während der Embryogenese beschrieben, wurde etwas später die Funktion von Toll bei der Immunantwort auf Pilzinfektionen in der ausgewachsenen Fliege gezeigt [50]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind zehn Mitglieder dieser Familie in Säugetieren identifiziert worden (TLRs 1-10). Strukturell sind die TLRs transmembrane Rezeptoren, bestehend aus einer extrazellulären Leucin-reichen (LRR-)Domäne sowie einer intrazellulären TIR (Toll/IL-1 Rezeptor) Domäne, die eine große Sequenzhomologie zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) aufweist [36].

Für einige TLRs wurden stimulierende Liganden identifiziert, die die Spezifität der einzelnen Rezeptoren in der Erkennung mikrobieller Produkte unterstreicht (Abb. 1). Die Erkennung von *C. albicans* erfolgt sowohl über TLR2 und TLR4 [78] und soll in der vorliegenden Arbeit noch genauer untersucht werden.

TLR2 kann zahlreiche unterschiedliche mikrobielle Pathogene binden. Diese reichen von Peptidoglykan (PGN), diversen Zellwandbestandteilen Gram-positiver Bakterien, mykobakteriellem Lipoarabinomannan, MALP (mycoplasma macrophage activated lipopeptide) und atypischem LPS von *Porphyromonas gingivalis* bis zu Zymosan, einem Zellwandbestandteil der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [99]. Eine Erklärung für die Fähigkeit des Rezeptors, ein so unterschiedliches Spektrum an PAMPs binden zu können, liegt darin, dass TLR2 mit anderen TLRs heterodimerisiert [72]. So konnten Heterodimere aus TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6 nachgewiesen werden.

Zymosan und MALP werden beispielsweise von einem Heterodimer aus TLR2 und TLR6 gebunden, ein triacyliertes Lipoprotein von *Borrelia burgdorferi* durch ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1 [44]. Das breite Ligandenspektrum unterstreicht die Bedeutung von TLR2 für die Induktion der primären Immunantwort im Säugetierorganismus.

TLR4, der als erstes charakterisierte TLR [77], ist essentiell für die Erkennung von LPS Gram-negativer Bakterien. Außerdem wird er durch das Hitzeschockprotein Hsp60, das unter Stressbedingungen von der Wirtszelle selbst produziert wird, aktiviert [99]. TLR4 assoziiert zur Signalweiterleitung mit dem Protein MD-2 und wird – im Gegensatz zu TLR2 – als Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die Beteiligung von TLR2 und TLR4 an der Erkennung von *C. albicans* wurde erstmals durch Netea *et al.* während der Anfertigung dieser Arbeit beschrieben [65]. Nach Stimulation von Mausmakrophagen mit *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass in TLR4-defizienten Mäusen die Sekretion der Chemokine KC (keratinocyte-derived chemokine) und MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) sowie die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu Wildtyp-mäusen deutlich reduziert war. Die Stimulation humaner mononukleärer Zellen (z.B. Lymphozyten), auf deren Oberfläche der TLR2 mit einem spezifischen Antikörper blockiert wurde, ergab hingegen eine verminderte Induktion der Zytokine TNF- α und IL-1 β . Während somit beide Rezeptoren die Immunantwort nach einer Candidainfektion beeinflussen, werden isolierte Zellwandbestandteile von *C. albicans* wie die meisten mikrobiellen PAMPs lediglich durch einen einzelnen TLR erkannt: Neueren Untersuchungen zufolge bindet nur TLR4 das Polysaccharid Mannan [98], während modifizierte Formen wie z.B. das Glykolipid Phospholipomannan ein Ligand von TLR2 sind [38].

Obwohl TLRs als hauptsächliche PAMP-erkennende Rezeptoren bei der Erkennung von *C. albicans* diskutiert werden, sei darauf hingewiesen, dass kürzlich weitere Rezeptorsysteme entdeckt wurden, die bei der Erkennung von *C. albicans* mit den TLRs kollaborieren. Hierzu zählen z.B. der

- (1) Mannose-Rezeptor, der zusammen mit TLR2 und TLR4 die Immunabwehr gegenüber *C. albicans* in Keratinozyten reguliert [74,97], und der
- (2) Lektin-Rezeptor Dectin-1, der zusammen mit TLR2 β -Glukan-Komponenten aus der Zellwand von *C. albicans* in dendritischen Zellen sowie Monozyten/Makrophagen detektiert [11,24].

Diese gleichzeitige Aktivierung mehrerer PRRs durch ein einziges PAMP zeigt, dass die angeborene Immunität durch ein „Netzwerk“ aus mehreren unterschiedlichen Rezeptoren in der Lage ist, ein Pathogen effektiv zu bekämpfen.

TLR3 ist aufgrund der Erkennung doppelsträngiger RNA (dsRNA) in die Immunantwort bei manchen viralen Infektionen involviert. TLR5 wird in Gegenwart von Flagellin, einem in der Geißel von Bakterien vorkommenden Protein, aktiviert. TLR9 erkennt CpG-DNA Motive, die sehr häufig im Bakteriengenom, jedoch nicht im Säugetiergenom auftreten [99]. Die physiologischen Liganden von TLR7 und TLR8 sind derzeit nicht bekannt. Pharmakologisch von Bedeutung ist jedoch, dass ein Teil der Wirkung der antiviral wirksamen Imidazochinoline Imiquimod (Aldara®) und Resiquimod (R-848) über eine Aktivierung dieser Rezeptoren erklärt werden kann.

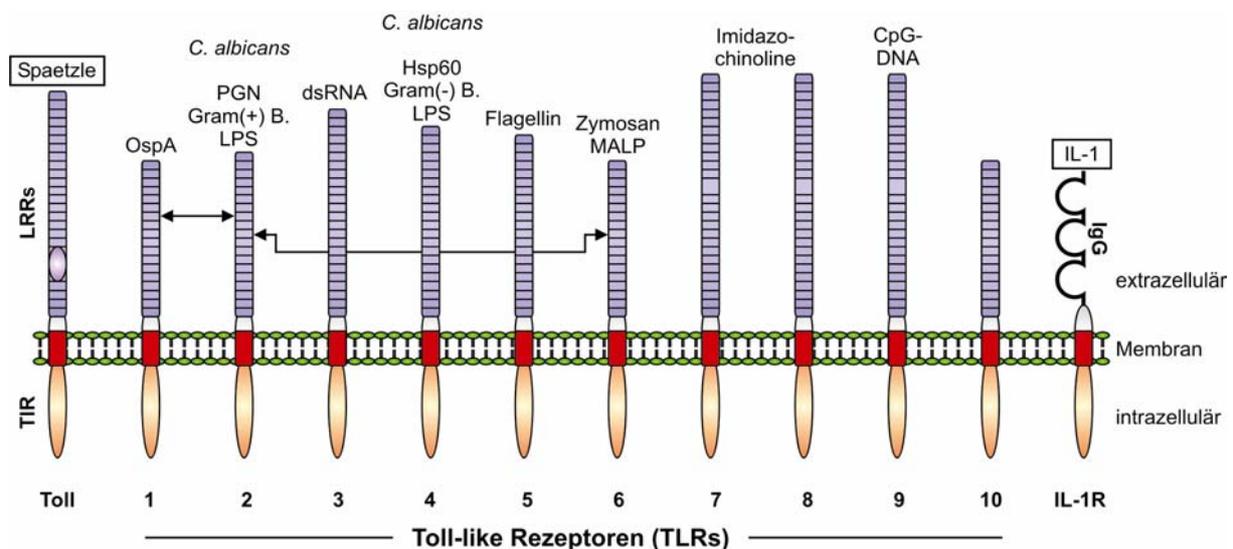


Abbildung 1: TLRs und ihre Liganden (in Anlehnung an [78]). Dargestellt sind *Drosophila* Toll, die 10 humanen TLRs sowie der IL-1 Rezeptor. Die waagrechten Pfeile weisen auf die Heterodimerisierung von TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6 hin. Spaetzle ist der natürliche Ligand von *Drosophila* Toll. LRRs: extrazelluläre Leucin-reiche Domänen; TIR: intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor Domäne; OspA: Outer surface protein A (ein triacyliertes Lipoprotein von *Borrelia burgdorferi*); PGN: Peptidoglykan; Gram(+) B.: Gram-positive Bakterien; LPS: Lipopolysaccharid; dsRNA: doppelsträngige RNA; Hsp60: Hitzeschockprotein 60; Gram(-) B.: Gram-negative Bakterien; MALP: mycoplasma macrophage activated lipopeptide; Imidazochinoline: Imiquimod (Ligand von TLR7) und Resiquimod (Ligand von TLR8). Die dargestellte Auflistung zeigt die wichtigsten Liganden und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

1.3 Die intrazelluläre Signaltransduktion

1.3.1 TLR-Signalkaskade

Innerhalb dieser Kaskade führen verschiedene Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Transkription der für die immunologische Antwort notwendigen Gene.

Nach Stimulation des TLRs durch das entsprechende PAMP bindet das Adaptermolekül MyD88 (myeloid differentiation marker 88) an den Rezeptorkomplex [3]. Zusammen mit TOLLIP (Toll-interacting protein) interagiert MyD88 über seine N-terminale „death domain“ mit der Serin-Threonin-Kinase IRAK (IL-1R-associated kinase) und rekrutiert diese an den Rezeptorkomplex. IRAK wird anschließend autophosphoryliert, löst sich vom Rezeptorkomplex und bindet das Adapterprotein TRAF6 (TNF receptor associated factor 6).

An TRAF6 teilt sich nun der Signaltransduktionsweg. TRAF6 aktiviert die Kinasen TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase) und MEKK1 (mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase). TAK1 und/oder MEKK1 aktivieren den IKK-(I κ B-kinase-)Komplex und somit letztendlich den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor- κ B) [121].

Über TAK1 und/oder MEKK1 kann es zudem in manchen Zelltypen zur Aktivierung von MAPKs (Mitogen-aktivierten Proteinkinasen) wie JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), p38 und ERK (extracellular related kinase) kommen, was in der Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 (activating protein-1) resultiert (Abb. 2).

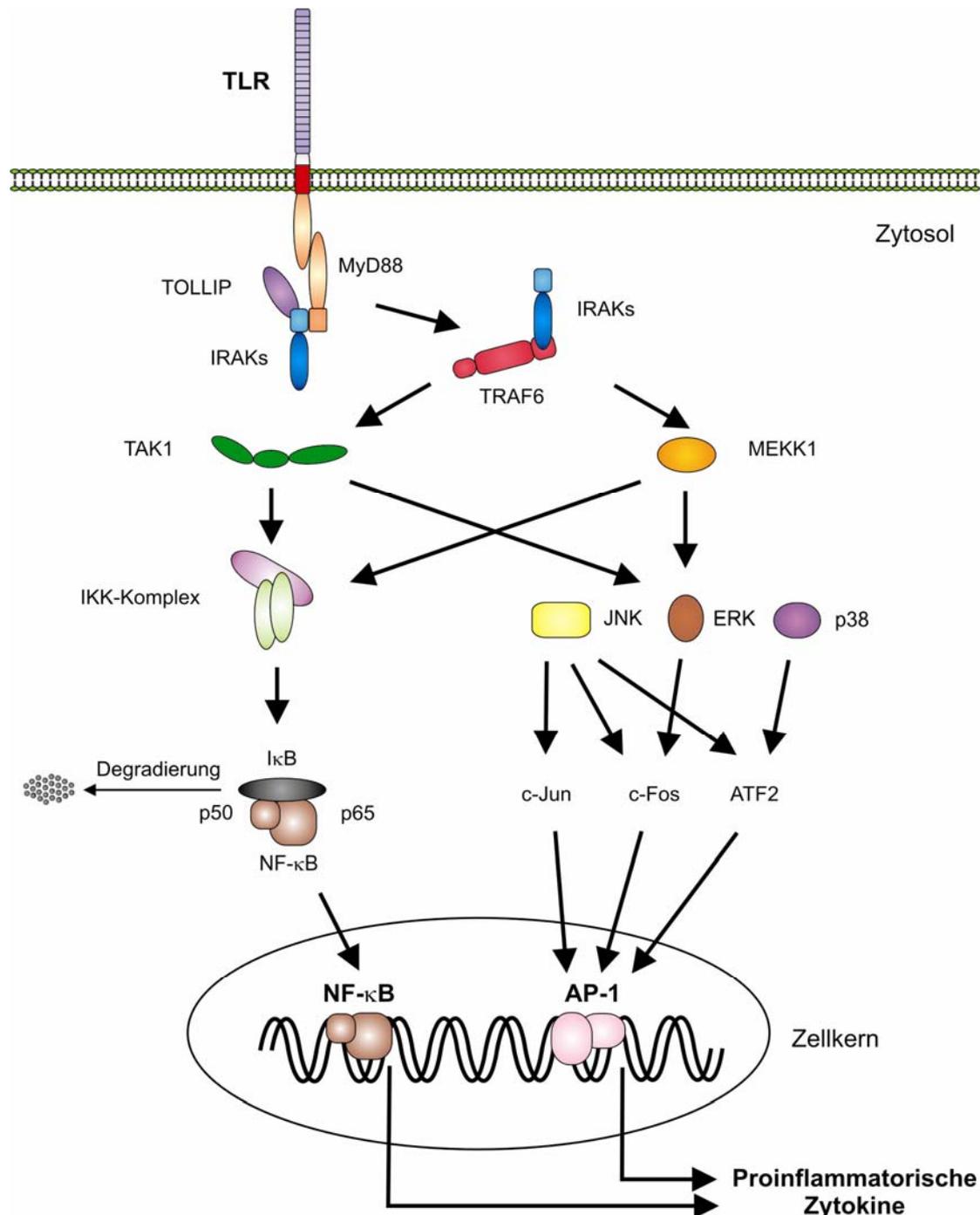


Abbildung 2: Der TLR Signalweg zur Induktion von NF-κB und AP-1 (in Anlehnung an [78]). Der aktivierte TLR assoziiert über seine intrazelluläre TIR Domäne mit MyD88. Unter Rekrutierung von TOLLIP interagiert MyD88 mit IRAK, was zur Aktivierung von TRAF6 führt. Folglich wird über TAK1 und/oder MEKK1 der IKK-Komplex aktiviert. Dies resultiert in der Phosphorylierung bzw. Degradierung von IκB-α, was zur nukleären Translokation von NF-κB führt. Je nach Aktivierung der MAP Kinasen JNK, ERK und p38 durch TAK1 und/oder MEKK1 kann es auch zur Phosphorylierung der Subeinheiten von AP-1 (c-Jun, c-Fos, ATF2) kommen. Das entstandene Homo- oder Heterodimer aus diesen Subeinheiten bewirkt – wie auch die NF-κB-abhängige Transkription – die Produktion proinflammatorischer Zytokine im Zellkern.

1.3.2 NF- κ B

NF- κ B wurde erstmals im Jahre 1986 als konstitutiver Regulator der κ -Leichtkettentranskription in murinen B-Lymphozyten beschrieben [90] und ist im Prinzip ein kollektiver Begriff für strukturell verwandte, homo- und heterodimere Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der Rel-Proteine gehören [7]. Im Nachfolgenden wird mit der Bezeichnung „NF- κ B“ das klassische Dimer p65/p50, bestehend aus RelA und NF- κ B1, gemeint sein.

Im inaktivierten Zustand ist NF- κ B durch Assoziation an das inhibitorische Protein I κ B- α im Zytoplasma lokalisiert. Bei Stimulierung der Zellen kommt es ausgehend von TRAF6 über TAK1 und/oder MEKK1 zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Er besteht aus zwei Kinasen, IKK α und IKK β , sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (NF- κ B essential modulator)/IKK γ) [59]. Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B- α , den Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, an den Serinresten 32 und 36 und leitet dessen Ubiquitinierung und Degradierung durch das 20S-Proteasom ein. Die Degradierung von I κ B- α hat die Demaskierung des Kernlokalisierungssignals von NF- κ B und Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern zur Folge.

NF- κ B wird sowohl in vielen immunologisch kompetenten Zellen als auch in Keratinozyten und Neuronen, ja fast allen Körperzellen durch unterschiedliche Stimuli aktiviert. Diese reichen von physikalischem Stress (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung) über infektiöse Agentien (Viren, Bakterien) und zelluläre Botenstoffe (Zytokine, Hormone) bis hin zu oxidativem Stress, erzeugt durch Ozon, Wasserstoffperoxid, oder Reoxygenierung von Zellen [73,79]. Der Vielfalt an Stimuli steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NF- κ B reguliert werden. Diese reichen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. Interleukin (IL)-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, Tumornekrosefaktor (TNF)- α über Stressproteine wie dem β 1-acid glykoprotein bis hin zu immunmodulierenden Komponenten wie MHC-I- und MHC-II-Molekülen.

1.3.3 Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen und AP-1

Die Kaskaden der MAP Kinasen kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. Sie werden durch Zellstress, Hormone, Neurotransmitter oder Zytokine induziert und regulieren einerseits die Expression von Genen und andererseits zytoplasmatische Aktivitäten. Diese Signalkaskaden bestehen aus MAPK-Kinase-Kinasen (MEKK bzw.

MAPKKK), welche MAPK-Kinasen (MEK bzw. MAPKK) phosphorylieren, die wiederum MAP-Kinasen (MAPK) aktivieren [117].

Zu den MAPKs gehören:

- JNK
- p38
- ERK.

Innerhalb des AP-1 Signaltransduktionsweges kontrollieren JNK und p38 vor allem Stressantworten wie Entzündung und Apoptose, während ERK präferenziell das Zellwachstum und die Differenzierung reguliert [51]. Eine enge Vernetzung und ein wechselseitiger Signalfluss zwischen den Kaskaden finden statt [88].

Die Phosphorylierung von TAK1 und/oder MEKK1 durch TRAF6 führt zu einer Aktivierung des JNK-p38-ERK Signaltransduktionsweges. JNK reguliert die transkriptionelle Aktivität von AP-1 [115]. Die AP-1 Familie besteht aus Homo- und Heterodimeren der Jun-, Fos- oder ATF-Untereinheiten mit c-Jun, c-Fos und ATF2 (activating transcription factor 2) als wesentlichem Bestandteil [41].

JNK ist hauptsächlich verantwortlich bei der Aktivierung von AP-1 und phosphoryliert c-Jun. Während c-Jun durch JNK phosphoryliert wird, kann c-Fos neben JNK auch von ERK phosphoryliert werden. Die AP-1 Untereinheit ATF2 ist wiederum ein Substrat von JNK und von p38. Als Folge dieser Aktivierungen können die Untereinheiten dann als Dimere in verschiedener Kombination ihrerseits als transkriptionell aktiver AP-1-Komplex an spezifische DNA-Sequenzen binden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Bedeutung der TLRs für die angeborene Immunität und insbesondere für die Erkennung von *C. albicans* wurde mehrmals gezeigt [78,99]. Während jedoch viele Forschergruppen die *Candida*-TLR Interaktion über die Freisetzung von Zytokinen am Ende der Signalkaskade beschreiben [65,98], fehlen innerhalb dieser Kaskade noch Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der stromaufwärts befindlichen Transkriptionsfaktoren NF- κ B oder AP-1, welche die Zytokinexpression maßgeblich beeinflussen.

Ein zentraler Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Interaktion von Makrophagen mit *C. albicans* im Hinblick auf die Aktivierung von TLRs und von NF- κ B. Gegenwärtig ist zudem unzureichend geklärt, inwieweit eine veränderte Zellwandstruktur von *C. albicans* die TLR Aktivierung beeinflusst, da bisher nur isolierte Zellwandbestandteile untersucht wurden [38,43,98]. Zur genaueren Charakterisierung wurden daher neben einem lebenden *C. albicans*-Stamm noch 3 weitere Präparationen verwendet, nämlich ein mit den Antimykotika (AM) Amphotericin B, Nystatin und Itraconazol vorbehandelter Stamm, ein durch Hitze inaktivierter Stamm und ein Sap-inaktivierter Stamm.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Fragestellungen bearbeitet:

1. Kommt es nach Stimulation von Wildtyp-Mausmakrophagen durch die *Candida*-Präparationen zu einer Induktion von NF- κ B? Besteht ein quantitativer Zusammenhang zwischen der NF- κ B Regulation und der *Candida*-Dichte?
2. Welche TLRs sind an der NF- κ B Aktivierung beteiligt? Es ist bereits bekannt, dass TLR2 und TLR4 an der Erkennung des lebenden *C. albicans*-Isolats beteiligt sind, doch wie verhält es sich bei den anderen Präparationen? Und welchen Einfluss hat eine Präinkubation der Makrophagen mit dem stimulierenden Zytokin IFN- γ auf die anschließende *Candida*-TLR Interaktion?

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der stromabwärts befindlichen Signaltransduktion in Wildtyp-Makrophagen: Wie erfolgt die Regulation der inhibitorischen Kinase I κ B- α , und werden im zeitlichen Verlauf der Stimulation mit AM-vorbehandelten *C. albicans* auch MAP Kinasen aus der AP-1 Kaskade aktiviert?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete *C. albicans*-Präparationen

2.1.1 Synchronisation von *C. albicans* Wildtyp

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde der lebende *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 verwendet [27]. Die Stammsuspension wurde bei -70°C aufbewahrt. Zu Beginn der Experimente wurden die Stämme synchronisiert, um eine einheitliche morphologische Form der *C. albicans*-Zellen als Hefe zu erreichen.

Zur Synchronisation muss der Stamm zuerst mittels einer Platinimpföse auf eine Sabouraud-Glukose-Agar-Platte (Difco, Detroit, USA) übertragen und anschließend 24 h bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) angezüchtet werden. Von den in der Folge gebildeten Kolonien wurden ca. vier Kolonien mit einem Durchmesser von 3-4 mm abgetragen und in 10 ml 0,9%iger, steriler NaCl-Lösung (Natriumchlorid, Fluka, Buchs, CH) suspendiert. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 1500 U/min (Rotanta/S, Hettich, Tuttlingen; Rotor: 6775064) wurde der Überstand verworfen und erneut in 10 ml NaCl aufgenommen. Dieser Waschvorgang wurde weitere zweimal wiederholt. Nach Beendigung des dritten Waschvorgangs wurde das überschüssige NaCl abgekippt und der Zellrückstand in 5 ml NaCl erneut suspendiert. Anschließend wurde eine Verdünnung von 1:200 hergestellt (1990 μl ddH₂O +10 μl *Candida* Suspension) und in zwei Großquadraten (32 Kleinquadrate) der Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) ausgezählt. Mit der folgenden Formel wurden die Pilze auf die gewünschte Zellzahl pro ml NaCl-Lösung gebracht:

$$(\text{Zellzahl}/2) \times 10^4 \times \text{Vorverdünnung} = \text{Zellzahl pro ml}$$

Anschließend erfolgte das Einimpfen von 1 ml des hergestellten Inokulums in 10 ml YPD-Medium (Yeast-Extract-Peptone-Dextrose, Hefeextrakt-Pepton-Glukose, Difco), das ebenfalls steril hergestellt wurde. Dieser Ansatz musste 24 h lang bei 37°C und 150 U/min in einem Schüttelinkubator inkubiert werden. Am zweiten Tag der Synchronisation fand wie am ersten Tag der dreimalige Waschschrift in NaCl und die Einstellung des Inokulums auf eine Zellzahl von 5×10^9 Zellen pro ml NaCl statt. Die hergestellte Verdünnung wurde erneut in 10 ml YPD-Medium eingebracht und nochmals über Nacht unter denselben Bedingungen wie am Vortag inkubiert.

Am dritten und letzten Tag der Synchronisation wurde der Waschvorgang in PBS (Phosphate-Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Gibco BRL, Karlsruhe) vorgenommen und auf eine Zellzahl von 10^{10} Zellen pro 1,0 ml PBS eingestellt.

Ausgehend von diesem Testansatz wurde für die Herstellung der anderen *Candida*-Präparationen Verdünnungen mit einer Dichte von 10^0 bis 10^9 *Candida*-Zellen pro 100 μ l PBS hergestellt.

Bei allen Inkubationsschritten wurden die Kulturen bei 37°C einer 5%igen CO₂-Atmosphäre und 100%iger Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Sämtliche *Candida*-Präparationen wurden aliquotiert (100 μ l) und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.2 Antimykotika (AM)-vorbehandelte Präparation

Zunächst wurden die Verdünnungen mit einer Dichte von 10^0 bis 10^9 lebenden *Candida*-Zellen pro 100 μ l PBS mit einem Antimykotika-Gemisch (4,5 μ g/ μ l Amphotericin B; 4,5 μ g/ μ l Nystatin und 3,0 μ g/ μ l Itraconazol in Dimethylsulfoxid gelöst) versetzt. Nach 72stündiger Inkubation bei 37°C und 150 U/min im HT-Schüttel-Wärme-Inkubator (Infors AG, Bottmingen, CH) wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS durchgeführt, um die Antimykotika gänzlich zu entfernen. Zur Kontrolle der erfolgreichen Inaktivierung durch die Antimykotika wurden die Zellen anschliessend auf einer Sabouraud-Glukose-Agar-Platte aufgetragen, wobei in Kultur aufgrund der Vorbehandlung keine Lebendkolonien mehr entdeckt werden konnten.

2.1.3 Hitze-inaktivierte Präparation

Die Verdünnungen mit einer Dichte von 10^0 bis 10^9 lebenden *Candida*-Zellen pro 100 μ l PBS wurden 30 min lang bei 90°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Hitze-inaktivierung wurden diese Zellen danach auf einer Sabouraud-Glukose-Agar-Platte aufgetragen, wobei in Kultur aufgrund der Vorbehandlung keine Lebendkolonien mehr entdeckt werden konnten.

2.1.4 Sekretorische Aspartat Proteasen (Sap)-inaktivierte Präparation

Die Verdünnungen mit einer Dichte von 10^0 bis 10^9 lebenden *Candida*-Zellen pro 100 μ l PBS wurden mit dem Proteaseinhibitor Pepstatin A (Sigma, Taufkirchen) in einer Konzentration von 15 μ M versetzt und 6 h lang bei 37°C und 150 U/min im HT-Schüttel-Wärme-Inkubator inkubiert.

2.2 Verwendete Mausmakrophagen

Für die Stimulationsversuche wurden die Makrophagen der folgenden Mausstämme eingesetzt:

Mausstamm	Genetische Eigenschaften	Referenz
C3H/HeN	Wildtyp	[108]
C3H/HeN TLR2 ^{-/-}	TLR2-defiziente Mutante	[114]
C3H/HeJ	TLR4-defiziente Mutante	[108]
C3H/HeJ TLR2 ^{-/-}	TLR2/4-Doppelknockoutmutante	[108]

Für die Überlassung der obigen Mausstämme bin ich Dr. Carsten J. Kirschning (Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München) sehr dankbar.

Zur Gewinnung der Makrophagen wurde den 8 bis 10 Wochen alten Mäusen 2 ml 4% Thioglycolat-Medium (Sifin, Berlin) intraperitoneal injiziert. Nach 5 Tagen wurde den Tieren 10 ml PBS intraperitoneal injiziert und durch die Aspiration desselben die Makrophagen gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach einem identischen zweiten Waschschrift wurden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Makrophagen wurden in einer Dichte von 10^6 Zellen pro 5 ml Medium in Kulturplatten ausgesät.

Als Kulturmedium wurde 500 ml RPMI1640-Medium (Gibco BRL, Karlsruhe) verwendet, welches als weitere Zusätze 500 μ l β -Mercaptoethanol, 50 ml hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 5 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) enthielt.

Sollte eine Vorstimulation der Makrophagen erfolgen, so wurde 18 h vor der eigentlichen Stimulation mit der entsprechenden *Candida*-Präparation das Zytokin IFN- γ (Peprotech, London, UK) in einer Konzentration von 50 ng/ml in die Kulturplatte hinzupipettiert.

2.3 Stimulation der Makrophagen mit den *C. albicans*-Präparationen

Die in dem Medium ausgesäten Wildtyp-Makrophagen (jeweils 10^6 Zellen pro Platte) wurden nach ca. 18 h mit lebenden, Antimykotika-vorbehandelten, Hitze-inaktivierten, und Sap-inaktivierten Keimen in einer Dichte von 10^0 bis 10^9 *Candida*-Zellen pro 100 μ l PBS für eine Dauer von 1 h stimuliert.

Bei erfolgreichem Nachweis einer Induktion von NF- κ B wurden die TLR-defizienten Makrophagen (TLR2- sowie TLR4-Einzelknockouts, TLR2/TLR4-Doppelknockouts) mit der entsprechenden *Candida*-Präparation 1 h lang stimuliert. In einem zweiten, ansonsten identischen Ansatz wurden die Makrophagen 18 h vor der Stimulation mit dem Zytokin IFN- γ (50 ng/ml) vorinkubiert.

Die Positivkontrollen wurden mit PMA (Phorbol-12-Myristat-Acetat, Sigma, Taufkirchen) in einer Konzentration von 50 ng/ml behandelt, da dies rasch zu einer direkten Hyperphosphorylierung von p50 an Serinresten führt und somit die Kerntranslokation des Rel-Proteins ermöglicht. Die Negativkontrollen wurden je nach Stimulation mit der entsprechenden *Candida*-Präparation nur mit PBS, Antimykotika-Gemisch, oder mit Pepstatin A versetzt.

Zur Untersuchung der Signaltransduktion wurden Wildtyp-Makrophagen mit dem Antimykotika-vorbehandelten Isolat kokultiviert und nach 0, 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min Proben für die anschließende Proteinextraktion entnommen.

2.3.1 Gewinnung der nukleären Proteine

Für die Proteintotalextraktion wurde im Anschluss an die Stimulation das Kulturmedium abgesaugt. Die Zellsuspension wurde dreimal mit jeweils 2 ml eiskaltem, sterilem PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Darauf folgend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst, in ein autoklaviertes 1,5-ml-Eppendorfgefäß pipettiert, und bei 4°C mit 15000 U/min für die Dauer von 15 min abzentrifugiert (Rotanta/S, Tuttlingen, Berlin; Rotor: 6775064). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 50 μ l frisch vorbereitetem, eiskaltem Lyse-Puffer

resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Eine weitere Zentrifugation zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile für 5 min bei 15000 U/min und 4°C folgte. Die erhaltenen Überstände enthielten die nukleären Proteine, wurden in ein autoklaviertes 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Langzeitkonservierung bei -80°C aufbewahrt.

Der für die Proteinextraktion verwendete Lyse-Puffer enthält 20mM HEPES, 0,35 M NaCl, 20% Glycerol, 1% Nonidet P-40, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Natriumvanadat und 50 mM Natriumfluorid. Unmittelbar vor der Anwendung wurde 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1mM Dithiothreitol (DTT) und eine „EDTA-freie Cocktailltablette mit Proteaseinhibitoren“ (Roche, Mannheim) zugegeben.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte nach Bradford [10], da diese Methode sich am besten für Proteinkonzentrationen im Bereich von 10 bis 100 µg/ml eignet. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 reagiert dabei spezifisch mit Proteinen und bildet Komplexe aus, die ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm aufweisen. Der ungebundene Farbstoff zeigt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Als Standard dienten Verdünnungen von BSA (Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin, Sigma, Taufkirchen) in PBS. Zur Herstellung einer Eichgerade wurden je 20 µl BSA (1 mg/ml) in einer Verdünnungsreihe von 10-100 µg/ml pipettiert. Von der zu messenden Probe wurde eine geeignete Verdünnung des Proteinextraktes in einer Küvette 1:1 mit Bradford Reagenz (Bio-Rad, München) versetzt. Nach 2 min wurde die Extinktion der Proteine mit dem Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei 595 nm gemessen und die Konzentration durch den Vergleich der Extinktion mit der Eichgerade ermittelt. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die *Candida*-induzierte Degradation von IκB-α führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern, wo er an eine DNA-Konsensussequenz bindet.

Mit dem electrophoretic mobility shift assay (EMSA) kann die Aktivierung von NF- κ B durch dessen Bindung an Promotersequenzen untersucht werden: Die Proteinlysate werden zusammen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid (DNA-Sonde) aus einer konservierten, für NF- κ B spezifischen Promotersequenz inkubiert. Befindet sich aktives NF- κ B im Proteinextrakt, so bilden sich DNA-Proteinkomplexe mit dem Oligonukleotid. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wird BSA zum Blockieren von proteinbindenden DNA-Sequenzen neben der markierten Sonde und Poly-[dIdC] (Polydesoxyinosindesoxyctidinsäure, Sigma, Taufkirchen) zum Abfangen von unspezifischen DNA-bindenden Proteinen hinzugefügt. Bei der anschließenden Auftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) unter nativen nicht-denaturierenden Bedingungen haben die DNA-Protein-Komplexe ein höheres Molekulargewicht als die freie Sonde und laufen deshalb langsamer im Gel. Sie bilden eine retardierte Bande, welche autoradiographisch visualisiert wird.

2.4.1 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Es wurden folgende doppelsträngige Oligonukleotide einer für NF- κ B spezifischen Konsensussequenz aus dem Enhancer des κ -Leichtketten-Gens verwendet (Promega, Mannheim):

sense 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

antisense 5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3'

Der Transfer des Betastrahlers ^{32}P vom γ -Phosphat des ATP-Moleküls auf den 5'OH-Terminus des verwendeten Oligonukleotids erfolgte mittels der Polynukleotidkinase T_4 (New England Biolabs, Frankfurt) [14].

Der Markierungsansatz ist im Isotopenlabor auf Eis herzustellen und enthält 36 μl ddH $_2\text{O}$, 5 μl 10xKinasepuffer, 2 μl Polynukleotidkinase T_4 , 2 μl NF- κ B spezifisches Oligonukleotid und 5 μl radioaktives γ -(^{32}P)-dATP (3000 Ci pro mmol).

Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37°C in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß inkubiert. Es folgte die Aufreinigung der markierten Oligonukleotide mittels einer Gelfiltrationssäule, um freies γ -(^{32}P)-dATP abzutrennen.

2.4.2 EMSA-Mix

Zur Bildung der DNA-Protein-Komplexe wurden 5 µl des Proteinextraktes (ca. 10-15 µg) mit 15 µl EMSA-Mix für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der EMSA-Mix besteht aus folgenden Komponenten:

- 4 µl ddH₂O
- 2 µl BSA (10 µg/µl)
- 2 µl Poly-[dIdC] (1µg/µl)
- 2 µl Puffer D+
- 4 µl 5x Ficoll Puffer
- 1 µl γ-(³²P) markiertes Oligonucleotid

Der Puffer D+ enthält 20 mM HEPES, 20% Glycerin, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,25% Nonidet P-40, 2 mM DTT und 0,1 mM PMSF.

Der 5fache Ficoll Puffer setzt sich aus 20% Ficoll 400, 100 mM HEPES, 300 mM KCl, 10 mM DTT und 0,1 mM PMSF zusammen.

Dieser Reaktionsansatz wurde in die Geltaschen von einem frisch hergestellten, 4%igen Polyacrylamid-Gel pipettiert. Zur Herstellung dieses Geles wurden 60 ml ddH₂O in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt und unter ständigem Rühren 10 ml Acrylamid (30%), 3 ml 10x TBE Puffer und 400 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS, Merck, Darmstadt) als Radikalstarter sowie 40 µl TEMED (Tetramethyldiamin, Sigma, Taufkirchen) als Radikalstabilisator hinzugegeben. Anschliessend wurde das Reservoir mit 0,5xTBE Puffer aufgefüllt und die Proteine bei 200 V aufgetrennt.

Danach wurde das Gel auf 3MM Whatman-Papier (Schubert & Weiss, München) für 60 min bei 80°C vakuumgetrocknet (Bio-Rad, München) und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham, Braunschweig) bei -80°C für 4-24 h exponiert.

2.4.3 Supershift

Der Supershift dient der weiteren Spezifikation des zu untersuchenden DNA-bindenden Proteins. Bindet ein hinzugegebener Antikörper spezifisch an den DNA-Protein-Komplex, hat dieser größere Komplex eine langsamere Laufgeschwindigkeit im Gel, so dass die Bande nach oben „geshiftet“ wird. Ist der Antikörper gegen die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors gerichtet, kann es zur

vollständigen Aufhebung der DNA-Protein Interaktion kommen, und die Bande im EMSA verschwinden.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Supershifts 2 µg Protein mit 2 µl Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in einer Konzentration von 200 µg/ml für 1 h bei 4°C vor Zugabe des EMSA-Mix inkubiert.

2.4.4 Kompetitionsassay

Dieser Assay dient dem Nachweis der Spezifität der Bindung des Transkriptionsfaktors an das markierte Oligonukleotid. Hierbei wird dem Bindungsmix 1 µl 100x konzentriertes (1,75 pmol/µl), nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid hinzugegeben. Handelt es sich um das gleiche Oligonukleotid wie das radioaktiv markierte, sollte die spezifische Bande im EMSA durch kompetitive Hemmung verschwinden.

2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Da Antikörper mit hoher Spezifität an ihre Antigene binden, wurden Testverfahren entwickelt, die auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe basieren. Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunnachweis) ist ein geeignetes Testsystem, um festzustellen, ob ein Antikörper sein Zielmolekül gebunden hat.

Für die Bestimmung der Konzentration von TNF-α wurden die Makrophagen (10^6 Zellen pro Napf) in zwei parallelen Ansätzen in 96-Napf-Platten (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde mit PBS gewaschen, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde ein Ansatz mit IFN-γ (50 ng/ml) bei 10 U/min für eine Dauer von 18h vorstimuliert. Am nächsten Morgen wurden sowohl vorstimulierte als auch unbehandelte Zellen mit dem lebenden *C. albicans*-Isolat in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro 100 µl PBS stimuliert, und die Zellkulturüberstände nach 48 h gewonnen. Die Konzentration von TNF-α wurde anschließend mit den kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (R & D Systems, München) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei wurde TNF-α von dem spezifischen Antikörper auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und durch einen Detektionskomplex nachgewiesen. Der Komplex wurde mit Hilfe einer Farbreaktion am ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg) quantitativ über den

Vergleich mit einer Standardreihe ausgewertet. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert.

2.6 Western-Blotting

Beim Western-Blot (Immunoblot) wird ein einzelnes Protein aus dem Proteingemisch über seine Größe aufgetrennt und mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Methode stellt eine Kombination dar aus der

- Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) zum Auftrennen der Proteinextrakte unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodecylsulfat (SDS, Roth, Karlsruhe), und der
- Immundetektion der gesuchten Proteinbande mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein. Die Immundetektion erfolgt in zwei Stufen: Nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran erkennt ein erster Antikörper das Protein, der zweite Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, ist mit einem Marker bestückt. In dieser Arbeit wurden Zweitantikörper verwendet, die mit HRP (Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase) markiert waren, und so mittels Chemilumineszenz detektiert werden konnten.

2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die lineare Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe ist es wichtig, die Ladungen der Seitenketten, die ansonsten mit der in der Gelelektrophorese angelegten Spannung interferieren, zu egalisieren. SDS ist ein Detergens, das an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet und sie denaturiert. Die stark negative Ladung bewirkt, dass alle Proteine negativ geladen vorliegen und ihre Eigenladung zu vernachlässigen ist. Das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld wird dadurch nicht beeinflusst. Der Marker sowie gleiche Mengen an Proteinlysaten (ca 30 µg) wurden für 5 min bei 95°C im Laemmli-Ladepuffer denaturiert. Dieser Ladepuffer besteht aus 200 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 40% Glycerol, 8% SDS, 400 mM DTT und einer Spatelspitze Bromphenolblau [49].

Aufgrund der geringen Proteinmengen wurden für die Elektrophorese Minigele verwendet (10 cm x 8 cm x 1,5 mm). Das eingesetzte Gel unterteilte sich in ein

oberes, niederprozentiges Sammelgel (1/3) und ein unteres, höherprozentiges Trenngel (2/3). Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit ddH₂O überschichtet, um die sauerstoffempfindliche Polymerisation ungestört ablaufen zu lassen. Nach einer Polymerisationsdauer von ca. 30 min wurde das Wasser abgesaugt, das Sammelgel in die verbleibende Kammer gegossen, und ein Kamm eingesetzt. Im Sammelgel wird der in die Ladetasche gegebene Proteinextrakt auf eine dünne Bande fokussiert, im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe.

Zur Herstellung des Trenngels werden 3,3 ml ddH₂O vorgelegt und unter ständigem Rühren 2 ml 4x Trennpuffer (= 500 mM TRIS-HCl und 0,4% SDS), 2,7 ml Acrylamid (30%), 50 µl APS und 4 µl TEMED hinzupipettiert.

Zur Herstellung des Sammelgels werden 2,5 ml ddH₂O vorgelegt und unter ständigem Rühren 1 ml 4x Sammelpuffer (= 1500 mM TRIS-HCl und 0,4% SDS), 0,5 ml Acrylamid (30%), 40 µl APS und 4 µl TEMED hinzugegeben.

Das polymerisierte Gel wurde in eine Vertikalapparatur (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt und das Reservoir mit Laufpuffer (= 125 mM TRIS, 1000 mM Glycin und 0,5% SDS) aufgefüllt. Anschließend wurden die denaturierten Proteine auf dem frisch hergestellten Gel bei 110 mA für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt.

2.6.2 Proteintransfer

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, so dass die Gele mittels Semi-dry-blotting auf eine Membran transferiert werden konnten [103]. Dazu wurde das Gel, eine in Methanol aktivierte Nitrocellulose-Membran (Invitrogen, Karlsruhe) und sechs Whatman-Papiere für ca. 10 min in Transferpuffer äquilibriert.

Die Semi-dry Blotapparatur wurde wie folgt aufgebaut:

(-) Kathodenplatte (-)
3 Lagen Whatman-Papier
Gel
Nitrocellulose-Membran
3 Lagen Whatman-Papier
(+) Anodenplatte (+)

Beim Aufbau dieses Blotsandwichs sollte darauf geachtet werden, dass er luftblasenfrei ist. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt, die Transferzelle mit Transferpuffer (20 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% Methanol) aufgefüllt und die Spannung angelegt. Geblottet wurde mit einer Stromstärke von 2-3 mA/cm² Gel (ca. 170 mA pro Minigel) für 1 h.

Mittels reversibler Ponceaurot-Färbung (Sigma, Taufkirchen) wurde der Transfer überprüft und die Markerbanden zur dauerhaften Markierung gekennzeichnet. Die Entfärbung erfolgte durch einen nachfolgenden dreimaligen Waschschrift mit ddH₂O.

2.6.3 Immundetektion

Bei erfolgreichem Transfer wurde die Membran anschließend zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blocking-Lösung (= 5% Trockenmilchpulver in TBST – Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 – gelöst) geschwenkt und danach 2 h mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in TBST gewaschen und für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Wieder folgte ein dreimaliger Waschschrift in TBST und dann die Detektion durch Chemilumineszenz.

Zur Herstellung von TBST wurden 20 mM TRIS/HCl zusammen mit 137 mM NaCl, 1mM EDTA sowie 0,5% Tween 20 in 1 Liter ddH₂O gelöst.

Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem Sekundärantikörper. Hierbei wird Luminol, ein cyclisches Diacylhydrazid, unter alkalischen Pufferbedingungen durch die Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid oxidiert und dabei in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Übergang in den Grundzustand wird ein Lichtquant emittiert, welches autoradiographisch detektiert werden kann. Zur Durchführung wird die Membran 30 s mit einer 1:1 Mischung der beiden Luminol-Lösungen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) unter Schwenken überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde der Blot in eine Frischhaltefolie eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Die Primär- und Sekundärantikörper wurden folgendermaßen verdünnt:

- Primärantikörper (New England Biolabs, Frankfurt):
1:1000 in Blocking-Lösung
Ausnahme: β -Actin (Sigma, Taufkirchen) 1:5000 in Blocking-Lösung
- Sekundärantikörper (New England Biolabs, Frankfurt):
Anti-rabbit secondary antibody 1:2000 in Blocking-Lösung
Anti-biotin antibody 1:1000 in Blocking-Lösung
Ausnahme: Anti-mouse IgG secondary antibody für β -Actin (Sigma, Taufkirchen) 1:80000 in Blocking-Lösung

2.6.4 Stripping

Um einen Blot ein zweites Mal mit Antikörpern zu dekorieren, wurden die gebundenen Antikörperkomplexe durch dreimaliges Waschen in Stripping Buffer – zusammengesetzt aus 62,5 mM TRIS, 100 mM β -Mercaptoethanol sowie 2% SDS – bei 50°C abgewaschen. Anschliessend wurde die Membran wieder in Blocking-Lösung inkubiert und dann erneut mit Antikörpern inkubiert.

2.7 Statistische Auswertung und benutzte Software

Alle gezeigten Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die Abbildungen der NF- κ B-Gelshifts und der Western Blots wurden mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Excel 2000 (Microsoft Corp., Redmond, USA) berechnet und graphisch dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Induktion von NF- κ B in Wildtyp-Makrophagen

Eine Vielzahl der unterschiedlichsten Stimuli führt zur Aktivierung von NF- κ B. Darunter fallen Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, LPS, Viren und virale Produkte, oxidativer Stress, Chemotherapeutika und Phorbol ester.

Zuerst sollte untersucht werden, ob die hergestellten *Candida*-Präparationen ebenfalls in der Lage sind, die Translokation von NF- κ B in murinen Wildtyp-Makrophagen zu induzieren. Die Makrophagen wurden in serumhaltigem Medium ausplattiert und danach mit den verschiedenen *Candida*-Präparationen versetzt. Nach 1stündiger Kokultivierung der Zellen mit den unterschiedlichen *Candida*-Stämmen wurden nukleäre Zellproteinextrakte gewonnen und auf DNA-Bindungen mit Hilfe des EMSA untersucht.

Des Weiteren war es für die nachfolgenden Versuche wichtig, über eine Titration der *Candida*-Präparationen herauszufinden, ab welcher *Candida*-Dichte NF- κ B *in vitro* erstmals aktiviert wird. Hierfür wurden die Wildtyp-Makrophagen mit 10^0 bis 10^9 lebenden sowie 10^0 bis 10^9 AM-vorbehandelten *C.albicans*-Keimen pro 100 μ l PBS stimuliert. Ausgehend von den Resultaten dieser Titration wurden anschließend die TLR-defizienten Makrophagen mit den relevanten *Candida*-Dichten stimuliert.

Bei der Etablierung des NF- κ B EMSA ergaben sich folgende Schwierigkeiten:

1. In unstimulierten Makrophagen war NF- κ B konstitutiv aktiviert, so dass eine mögliche zusätzliche Aktivierung durch die *C. albicans*-Isolate verdeckt wurde.
2. Durch enzymatische Abspaltung von Phosphatgruppen kann die Bindungsaffinität von NF- κ B an die DNA erhöht werden und so im EMSA zu hohen Hintergrundwerten führen.

Ad (1)

Zu hohe Zelldichten können Stress für die Zelle bedeuten und so zur Aktivierung von NF- κ B führen. Überdies gehen nach zu langer Kultivierung die Zellen in den apoptotischen Zustand über, was zuvor die Aktivierung von NF- κ B als Reaktion auf dieses Stresssignal zur Folge hat (Daten nicht gezeigt). Daher ist das Zeitfenster, in dem die Zellen langsam in die G_0 -Ruhephase übergehen, aber noch nicht in „Apoptose-Stress“ geraten, begrenzt. Die beste Stimulierbarkeit ergab sich bei einer Zellzahl von 10^6 Makrophagen pro Zellkulturschale nach ca. 18-stündiger

Kultivierung in dem in 2.2 beschriebenen Medium, was sich in allen Experimenten bestätigte. Werden die Makrophagen länger und in höherer Zahl kultiviert, steigt zum einen die Hintergrundaktivität von NF- κ B an, gravierender noch aber nimmt die Stimulierbarkeit der Zellen ab.

Ad (2)

Wird NF- κ B durch unspezifische Phosphatasen, die sich in jeder Zelle befinden und bei der Erstellung der Zellextrakte ihre Wirkung an den NF- κ B Molekülen entfalten können, dephosphoryliert, erhöht sich dadurch die DNA-Bindungsaffinität von NF- κ B. Eine Inhibition der Phosphatasen wurde zum einen durch Kühlung der Zellkulturschalen direkt nach Beendigung des Stimulationversuches für die Zeit der Proteingewinnung auf Eis erreicht. Zudem wurde die enzymatische Aktivität durch Zugabe der Phosphataseinhibitoren Natriumfluorid und Natriumvanadat zum Lyse-Puffer (siehe 2.3.1) gesenkt.

3.1.1 Der lebende und der AM-vorbehandelte Stamm aktivieren NF- κ B

Die Kokultivierung von Wildtyp-Makrophagen mit dem lebenden Stamm führte – nach Herstellen der Zellextrakte und Analyse im EMSA – zu einer dichteabhängigen NF- κ B Aktivierung, die mit der Induktion durch die Positivkontrolle PMA vergleichbar war (Abb. 3). Während im Bereich von 10^0 bis 10^5 *Candida*-zellen pro 100 μ l PBS die NF- κ B Induktion ausblieb, war bei einer Dichte von 10^6 und 10^7 lebenden Keimen pro 100 μ l PBS eine deutliche Hochregulation von aktiviertem NF- κ B zu verzeichnen.

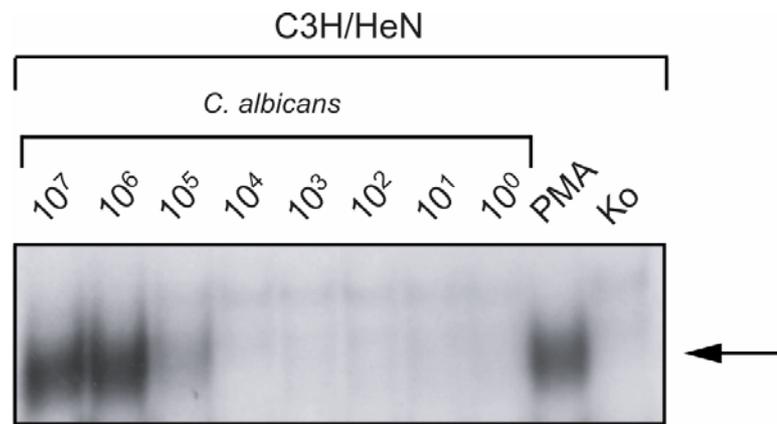


Abbildung 3: Dichteabhängige Induktion von NF-κB durch den lebenden Stamm. Je 10^6 Peritonealexsudatzellen von Wildtyp-Mäusen (C3H/HeN) wurden 1 h mit unterschiedlichen Dichten von dem lebenden Stamm (10^7 bis 10^0 pro 100 μ l PBS) kokultiviert. Als Positivkontrolle erfolgte die Stimulation der Makrophagen durch Zugabe von PMA (50 ng/ml), während als Negativkontrolle unstimulierte Zellen dienten. Nach Lyse der Zellen erfolgte die EMSA-Reaktion mit einem γ -(32 P)-markierten Oligonukleotid aus der NF-κB-Konsensussequenz mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Dargestellt sind die retardierten Banden, die einen Komplex aus Oligonukleotid und gebundenem NF-κB repräsentieren (Pfeil).

In seiner aktiven Form tritt NF-κB als Homo- oder Heterodimer auf, wobei sich die Untereinheiten aus den Proteinen der Rel-Familie rekrutieren. In Säugetieren sind fünf NF-κB/Rel-Proteine bekannt: p50/NF-κB1, p52/ NF-κB2, p65 (RelA), RelB und c-Rel [7]. Die Zusammensetzung des Homo- oder Heterodimers beeinflusst die DNA-Affinität und Spezifität sowie die Transaktivierungsfähigkeit. Um die genaue Zusammensetzung des durch lebende Keime induzierten NF-κB zu bestimmen, wurde eine Supershift-Analyse durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen des vorigen Versuches wurden die Wildtyp-Makrophagen nun mit einer Dichte von 10^7 lebenden Keimen pro 100 μ l PBS stimuliert. Unter Verwendung von p50 und p65-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Komplex aus den NF-κB-Untereinheiten p50 und p65 zusammengesetzt war (Abb. 4). Nach Präinkubation der Zellextrakte mit dem p50-Antikörper konnte eine verstärkte Retardierung der Migration des DNA-NF-κB-Komplexes beobachtet werden, während nach Präinkubation mit dem p65-spezifischen Antikörper die Bindung des NF-κB Komplexes an die DNA deutlich vermindert war. Analog konnte die Spezifität der Bindung dadurch demonstriert werden, dass die Inkubation mit einem 100-fachen

Überschuß an unmarkierten NF- κ B-Oligonukleotid die Bindung an das γ -(32 P)-markierte NF- κ B Nukleotid aufhob. Eine Aktivierung von p52 war nicht zu beobachten (nicht dargestellt).

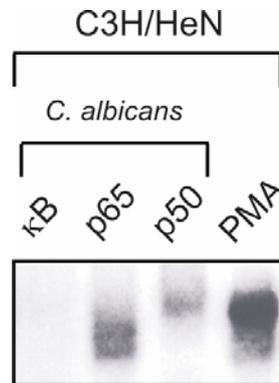


Abbildung 4: Supershift und Kompetitionsanalyse des durch lebende Keime aktivierten NF- κ B. Der Versuch erfolgte mit nukleären Proteinen, die nach 1-stündiger Stimulation von Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen mit dem lebenden Stamm (10^7 Keime pro 100 μ l PBS) durch Zellyse gewonnen wurden. Anschliessend erfolgte die EMSA-Reaktion mit einem γ -(32 P)-markierten Oligonukleotid aus der NF- κ B-Konsensussequenz. Zusätzlich wurden Antikörper gegen die angegebenen NF- κ B-Untereinheiten zugegeben und mit einem Überschuss an unmarkierten NF- κ B-Oligonukleotiden inkubiert. An weiter retardierten Banden (p50) oder inhibierten Banden (p65) erkennt man die Präsenz von NF- κ B-Untereinheiten in den durch *C. albicans* induzierten Komplexen.

Ein ähnliches Bild der dichteabhängigen Induktion von NF- κ B wie in Abbildung 3 ergab sich überraschenderweise auch nach Stimulation der Makrophagen mit dem AM-vorbehandelten Isolat mit einem Maximum der Aktivierung bei 10^7 Keimen pro 100 μ l PBS (Abb. 5). Um das ganze Spektrum einer möglichen NF- κ B Hochregulation abzudecken, wurden daher für die nachfolgenden EMSA-Experimente *Candida*-Dichten von 10^5 bis 10^9 Zellen pro 100 μ l PBS verwendet.

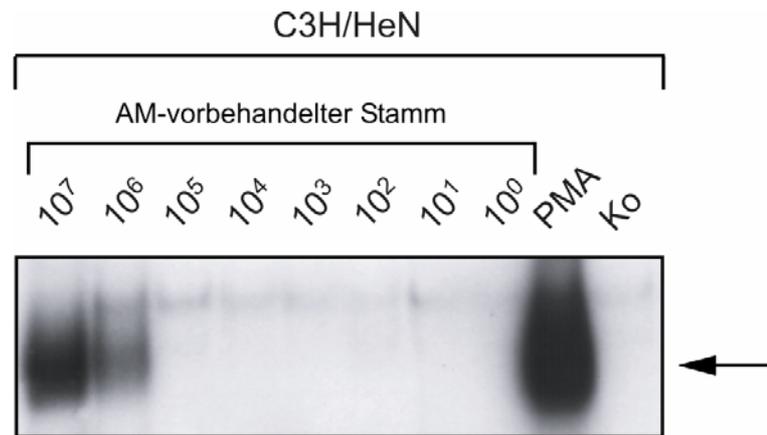


Abbildung 5: Dichteabhängige Induktion von NF-κB durch das AM-vorbehandelte Isolat. Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen wurden 1 h mit unterschiedlichen Dichten des AM-vorbehandelten Isolats (10^7 bis 10^0 Zellen pro 100 μ l PBS) stimuliert. Neben unstimulierten Zellen dienten als weitere Negativkontrolle mit Antimykotika-Gemisch versetzte Makrophagen, um eine potentielle NF-κB Aktivierung durch Antimykotika auszuschliessen. Letzere ist hier aus Layout-technischen Gründen nicht aufgeführt. Nach Lyse der Zellen erfolgte die EMSA-Reaktion mit einem γ -(32 P)-markierten Oligonukleotid aus der NF-κB-Konsensussequenz mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Dargestellt sind die retardierten Banden, die einen Komplex aus Oligonukleotid und gebundenem NF-κB repräsentieren (Pfeil).

3.1.2 Keine NF-κB Aktivierung durch den Hitze-inaktivierten Stamm

Im nächsten Arbeitsschritt sollte die Interaktion von Wildtyp-Makrophagen mit dem Hitze-inaktivierten Stamm im Hinblick auf die Translokation von NF-κB untersucht werden. Im Gegensatz zu dem lebenden und dem AM-vorbehandelten Stamm kam es hier jedoch bei allen eingesetzten *Candida*-Dichten (10^9 bis 10^5 pro 100 μ l PBS) zu keiner Translokation von NF-κB.

Deshalb wurde noch die Induktion von NF-κB in vorstimulierten Makrophagen untersucht. In einem zweiten, ansonsten identischen Ansatz wurden die Makrophagen 18 h vor *Candida*-Stimulation mit IFN- γ (50 ng/ml) vorinkubiert. Dies hatte jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf die Transaktivierungsfähigkeit von NF-κB (Abb. 6). Die fehlende Induktion von NF-κB war hier ebenfalls mit der Negativkontrolle vergleichbar.

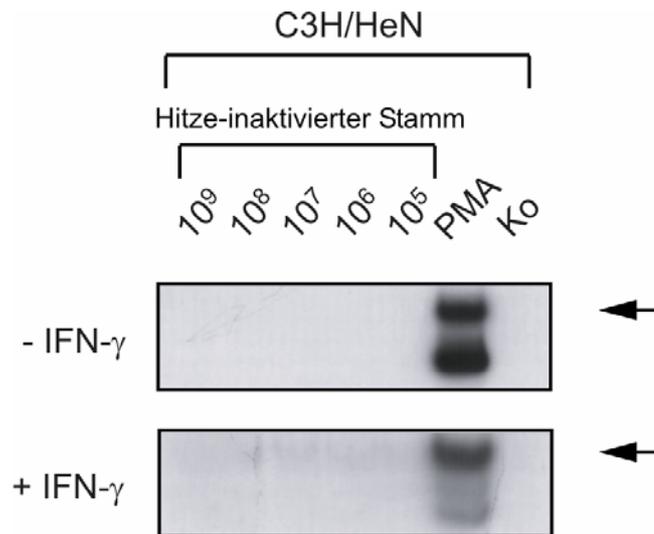


Abbildung 6: Keine Induktion von NF- κ B durch den Hitze-inaktivierten Stamm. Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen wurden für 1 h mit Hitze-inaktivierten Keimen stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die daraus gewonnenen Kernextrakte wurden mit der markierten NF- κ B Sonde inkubiert und im EMSA untersucht. Der untere Shift demonstriert das Resultat mit Makrophagen, die 18 h vor der Kokultivierung mit IFN- γ (50 ng/ml) vorstimuliert wurden.

3.1.3 Der Sap-inaktivierte Stamm aktiviert NF- κ B

Wie bereits in 1.1.2 erwähnt sind die Saps für die Virulenz von *C. albicans* von sehr großer Bedeutung. Als Arbeitshypothese stand daher die Vermutung im Raum, dass eine Reduktion der *Candida*-Virulenz zu einer verminderten oder gar ausbleibenden Aktivierung von NF- κ B führen könnte. Zur Herstellung der Sap-inaktivierten Präparation wurde die proteolytische Aktivität der lebenden Stämme mit dem Proteaseinhibitor Pepstatin A beseitigt. In der anschliessenden Stimulation von unstimulierten und mit IFN- γ vorstimulierten Wildtyp-Makrophagen kam es zu einer unveränderten Induktion von NF- κ B, vergleichbar mit der Induktion durch den lebenden oder den AM-vorbehandelten Stamm (Abb. 7). Im Umkehrschluss hat somit eine Hemmung der Saps keinen Effekt auf die Aktivierung von NF- κ B.

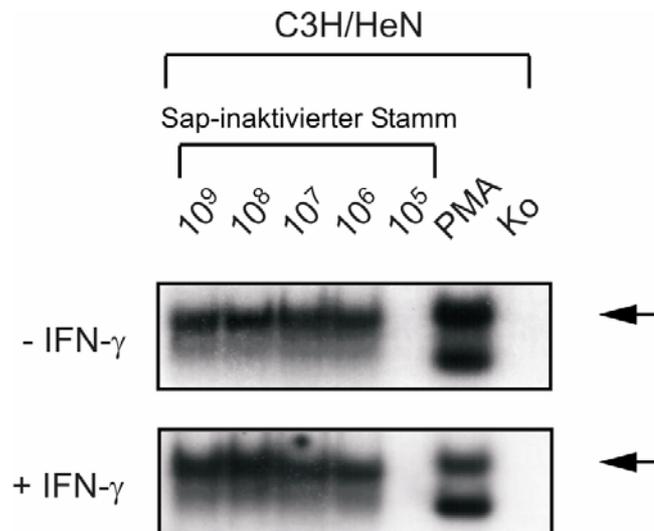


Abbildung 7: Induktion von NF-κB durch den Sap-inaktivierten Stamm. Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen wurden 1 h mit unterschiedlichen Dichten von Sap-inaktivierten Keimen (10^9 bis 10^5 pro 100 μ l PBS) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten mit Pepstatin A (15 μ M) versetzte Zellen, um eine potentielle NF-κB Aktivierung durch den Proteaseinhibitor auszuschliessen. Die daraus gewonnenen Kernextrakte wurden mit der markierten NF-κB Sonde inkubiert und im EMSA untersucht. Der untere Shift demonstriert das Resultat mit Makrophagen, die 18 h vor der Kokultivierung mit IFN- γ (50 ng/ml) vorstimuliert wurden.

Zusammengefasst ist der lebende *C. albicans*-Stamm ab einer Dichte von 10^6 Zellen pro 100 μ l PBS in der Lage, die Translokation von NF-κB in murinen Wildtyp-Makrophagen (10^6 Zellen) zu induzieren. Bei dem AM-vorbehandelten Stamm (10^7 Zellen pro 100 μ l PBS) kommt es im Gegensatz zu dem Hitze-inaktivierten Isolat zu einer NF-κB Induktion, obwohl in Kultur auf der Sabouraud-Glukose-Agar-Platte beide *Candida*-Präparationen aufgrund der entsprechenden Vorbehandlungen keine Lebendkolonien mehr ausbilden konnten (siehe 2.1.2, 2.1.3). Ferner hat eine Reduktion der Virulenz von *C. albicans* durch Inhibition der Saps keine Auswirkung auf die Aktivierung von NF-κB. Da somit die Sap-inaktivierte Präparation im Wildtyp die Induktion von NF-κB nicht beeinflusste, wurde diese Präparation zusammen mit dem Hitze-inaktivierten Stamm bei den folgenden Versuchen mit TLR-defizienten Makrophagen nicht mehr eingesetzt.

3.2 Untersuchung der TLR Aktivierung

3.2.1 TLR2 und TLR4 erkennen den lebenden Stamm

Aufgrund dieser Ergebnisse war nun zu klären, inwieweit die in der Literatur diskutierten TLRs 2 und 4 an der Erkennung der *C. albicans*-Isolate beteiligt sind. Eine potentielle Aktivierung der TLRs wurde erneut über die Bindung von aktiviertem NF- κ B an die DNA von Wildtyp- sowie TLR-defizienten Makrophagen im EMSA untersucht. Die verwendeten C3H/HeN/TLR2^{-/-} Mäuse sind im Gegensatz zu den Wildtyp(C3H/HeN)-Mäusen defizient für TLR2, während die C3H/HeJ Mäuse eine Punktmutation im TLR4-kodierenden Gen tragen. Makrophagen der C3H/HeJ TLR2^{-/-} Mäuse sind TLR2- und TLR4-defiziente Doppelknockoutmutanten. Die folgende Übersicht gibt schematisch noch einmal Auskunft über den Mausstamm und dessen Besonderheit in Bezug auf die An- bzw. Abwesenheit der TLRs 2 und 4.

<u>Mausstamm</u>	<u>Genetische Eigenschaften</u>
C3H/HeN	Wildtyp
C3H/HeN TLR2 ^{-/-}	TLR2-defiziente Mutante
C3H/HeJ	TLR4-defiziente Mutante
C3H/HeJ TLR2 ^{-/-}	TLR2/4-Doppelknockoutmutante

Jeweils 10⁶ Peritonealexsudatzellen von Tieren dieser Stämme wurden analog der anderen Stimulationen mit dem lebenden *C. albicans*-Isolat (10⁹ bis 10⁵ Zellen pro 100 μ l PBS) für 1 h inkubiert. Um zu klären, welchen Einfluss eine Präinkubation der Makrophagen mit IFN- γ auf die anschließende *Candida*-TLR Interaktion hat, wurden auch hier in einem zweiten Ansatz die Makrophagen 18 h vor *Candida*-Stimulation mit diesem Zytokin vorstimuliert. Abbildung 8 zeigt, dass es neben den Wildtyp-Makrophagen lediglich nur noch in den mit IFN- γ präinkubierten, TLR4-defizienten C3H/HeJ-Mäusen zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt. In allen anderen Makrophagen-Typen blieb die NF- κ B Induktion aus.

Demzufolge sind sowohl TLR2 als auch TLR4 für die Erkennung des lebenden *C. albicans*-Stammes von Bedeutung. Eine Vorbehandlung mit IFN- γ ermöglicht jedoch TLR2, unabhängig von TLR4 eine Immunantwort gegenüber dem lebenden Isolat auszulösen.

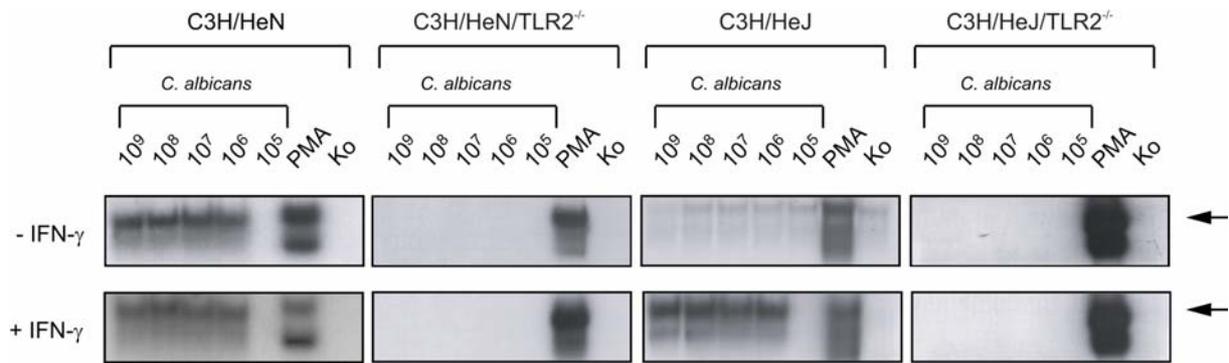


Abbildung 8: Aktivierung von TLR2 und TLR4 durch den lebenden Stamm. Makrophagen von C3H/HeN, C3H/HeN TLR2^{-/-}, C3H/HeJ und C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen wurden entweder mit oder ohne IFN-γ (50 ng/ml) für 1 h mit dem lebenden *C. albicans*-Isolat in einer Dichte von 10⁹ bis 10⁵ Zellen pro 100 μl kokultiviert. Für die Positivkontrolle wurden die Makrophagen durch Zugabe von PMA (50 ng/ml) stimuliert, als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach Lyse der Zellen erfolgte die EMSA-Reaktion mit einem γ-(³²P)-markierten Oligonukleotid aus der NF-κB-Konsensussequenz mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Dargestellt sind die retardierten Banden, die einen Komplex aus Oligonukleotid und gebundenem NF-κB repräsentieren (Pfeil).

3.2.2 TLR2 erkennt den AM-vorbehandelten Stamm

10⁶ Makrophagen von den 4 unterschiedlichen Mausstämmen wurden jeweils für 1 h mit den AM-vorbehandelten Keimen (10⁹ bis 10⁵ Zellen pro 100 μl PBS) kokultiviert. Eine Hochregulation von NF-κB konnte nur beim Wildtyp und bei den TLR4-defizienten C3H/HeJ-Mäusen (mit oder ohne IFN-γ präinkubiert) verzeichnet werden (Abb. 9). In den TLR2-defizienten C3H/HeN TLR2^{-/-} Mäusen und den Doppelknockoutmutanten ist die fehlende Aktivierung von NF-κB mit der Negativkontrolle vergleichbar.

Im Gegensatz zu den Resultaten aus 3.2.1 wird somit der AM-vorbehandelte Stamm nur durch TLR2 erkannt. Eine Beteiligung von TLR4 oder eine Relevanz der Vorstimulation mit IFN-γ kann hingegen ausgeschlossen werden.

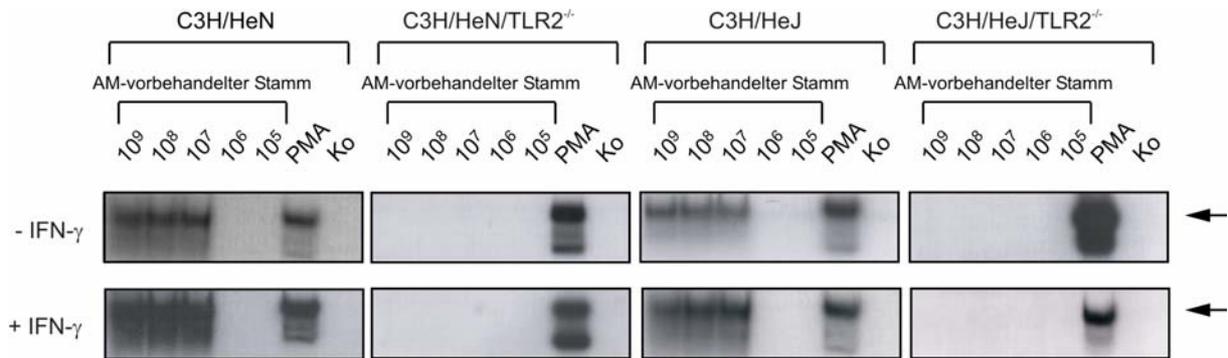


Abbildung 9: Aktivierung von TLR2 durch den AM-vorbehandelten Stamm. Die Peritonealexsudatzellen der 4 Mausstämmen wurden entweder mit oder ohne IFN- γ (50 ng/ml) für 1 h mit AM-vorbehandelten Keimen (10^9 bis 10^5 Zellen pro 100 μ l PBS) stimuliert. Für die Positivkontrolle wurden die Makrophagen mit PMA (50 ng/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen sowie mit Antimykotika-Gemisch versetzte Makrophagen, um eine potentielle NF- κ B Aktivierung durch Antimykotika auszuschliessen. Letzere ist hier aus Layout-technischen Gründen nicht aufgeführt. Die retardierten Banden, die einen Komplex aus Oligonukleotid und gebundenem NF- κ B repräsentieren, demonstrieren, in welchem Makrophagen-Typ NF- κ B aktiviert wurde (Pfeil).

3.2.3 Der lebende Stamm induziert TNF- α in Wildtyp- und TLR4-defizienten Makrophagen nach Vorstimulation mit IFN- γ

Um die Rolle von TLR2 und TLR4 in der Zellaktivierung und insbesondere in der Zytokinproduktion durch *C. albicans* weiter zu überprüfen, wurde die Induktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α untersucht. Die zur Verfügung stehenden Wildtyp- sowie TLR-defizienten Makrophagen wurden mit dem lebenden *C. albicans*-Isolat in einer Dichte von 10^7 Zellen pro 100 μ l PBS stimuliert, und es wurden die TNF- α -Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Bei den Makrophagen wurde zwischen Zellen, die mit IFN- γ präinkubiert wurden, und nicht vorstimulierten Zellen unterschieden.

Bei den unstimulierten Makrophagen kam es nur in den Wildtyp(C3H/HeN)-Mäusen zu einem mit der Positivkontrolle vergleichbaren Effekt auf die TNF- α -Sekretion. In den mit IFN- γ vorbehandelten Makrophagen zeigte sich hingegen sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den TLR4-defizienten (C3H/HeJ)-Makrophagen eine signifikante Zytokinexpression (Abb. 10). Diese Ergebnisse bestätigen die vorherigen Daten der EMSA-Experimente (in 3.2.1), die nach Vorstimulation der Makrophagen mit IFN- γ für den TLR2 eine TLR4-unabhängige Zellaktivierung nahe legten.

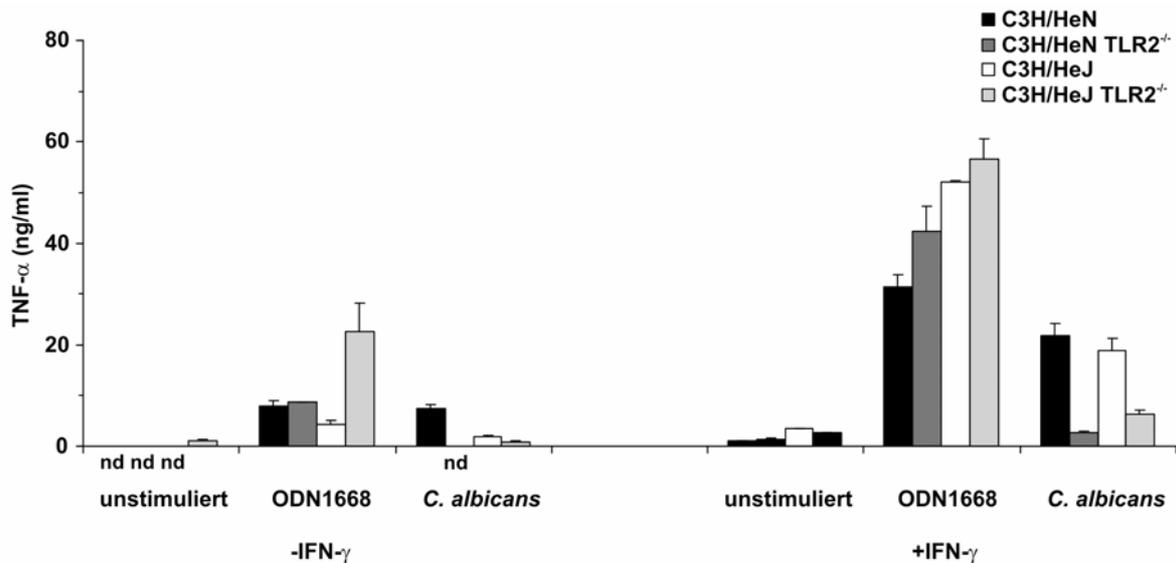


Abbildung 10: Die Induktion von TNF- α durch den lebenden Stamm. Je 10^6 Makrophagen von C3H/HeN, C3H/HeN TLR2^{-/-}, C3H/HeJ und C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen wurden mit 10^7 lebenden *C. albicans*-Keimen pro 100 μ l PBS stimuliert. Bei der Positivkontrolle wurde mit dem Oligonukleotid ODN1668 (0,75 mM) stimuliert, die Negativkontrolle blieb unstimuliert. Die Hälfte der Ansätze wurde 18 h vor Stimulationsbeginn mit IFN- γ (50 ng/ml) präinkubiert. Die Stimulation mit lebenden *C. albicans* wurde nach 48 h abgebrochen und die TNF- α -Konzentration in den Zellüberständen mit Hilfe eines ELISA ermittelt. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, jeweils mit Dreifachwerten. nd = Nicht detektierbar

3.3 Untersuchung der Signaltransduktion

3.3.1 Der AM-vorbehandelte Stamm aktiviert I κ B- α

Die Aktivierung von NF- κ B wird durch Serinphosphorylierung und nachfolgende Degradation der inhibitorischen I κ B-Moleküle induziert. Diese Familie von Proteinen wird durch die Moleküle I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine p100 und p105 repräsentiert [7]. I κ B- α , das am längsten und besten charakterisierte I κ B-Protein, ist ein 40 kD großes Protein und besteht aus einer N-regulatorischen Domäne, einer langen Domäne mit sechs Ankyrin-Wiederholungen, und einer kurzen C-terminalen Domäne mit einer PEST-Region (Prolin-, Glutaminsäure-, Serin-, Threonin-reiche Region). Mit seinen Ankyrin-Wiederholungen und seiner PEST-Region kann I κ B- α ausgedehnte Kontakte zu den Rel-Homologiedomänen von p50 und p65 ausbilden, was die hohe Bindungsaffinität von I κ B- α zu NF- κ B erklärt [59].

Da die vorigen Versuche eine Aktivierung von NF- κ B durch dem AM-vorbehandelten Stamm ergaben, sollte im Folgenden I κ B- α hinsichtlich seines Aktivierungsmechanismus durch diese *Candida*-Präparation näher charakterisiert werden. Die Degradation von I κ B- α wird durch die schnelle Phosphorylierung der Serinreste 32 und 36 vermittelt, die den Ubiquitin-Proteasomkomplex aktiviert. Um zu überprüfen, ob dies auch hier zutrifft, wurden Makrophagen von Wildtyp(C3H/HeN)-Mäusen mit 10^7 AM-vorbehandelten Keimen pro 100 μ l PBS stimuliert. Zur näheren Beschreibung der Kinetik wurde die Stimulation jeweils nach 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min beendet und die gewonnenen Proteinlysate durch Immunblots untersucht. Hierbei wurde ein phosphospezifischer Antikörper verwendet, der nur das an Serin32 phosphorylierte I κ B- α -Molekül erkennt.

Abbildung 11 zeigt, dass I κ B- α bereits nach 5 min nicht mehr nachweisbar ist, und dass dementsprechend die serinphosphorylierte Form bei 5 min erscheint. Diese ist wiederum nach einer Stimulationsdauer von 15 min komplett degradiert. Das Ergebnis belegt, dass das AM-vorbehandelte *C. albicans*-Isolat den raschen Abbau von I κ B- α induziert, was für eine sehr schnelle Aktivierung von NF- κ B unerlässlich ist.

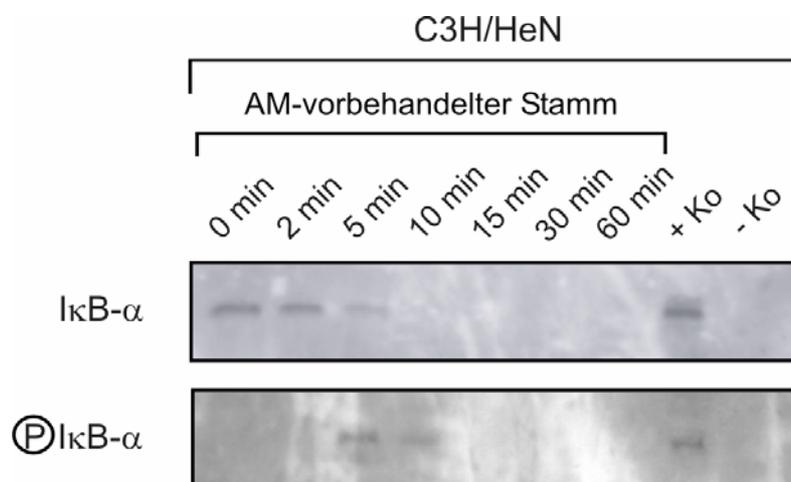


Abbildung 11: Kinetik der Degradation von I κ B- α durch den AM-vorbehandelten Stamm in Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen. Je 10^6 Peritonealexsudatzellen von Wildtyp-Mäusen wurden mit 10^7 AM-vorbehandelten Keimen kokultiviert. Die Stimulation wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min beendet. Als Kontrollen wurden die Extrakte aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot entweder mit einem spezifischen Antikörper gegen unphosphoryliertes I κ B- α (oberer Blot) oder gegen an Serin32 phosphoryliertes I κ B- α (unterer Blot) detektiert.

3.3.2 Der AM-vorbehandelte Stamm aktiviert MAP Kinasen

Verschiedene MAP Kinase Kaskaden, u.a. der ERK, der p38 und der JNK Signaltransduktionsweg, spielen in der Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 eine wichtige Rolle (siehe 1.3.3). Um zu klären, inwieweit neben NF- κ B noch ein anderer Transkriptionsfaktor in die *Candida*-vermittelte Immunantwort involviert ist, wurde die Signalkaskade von AP-1 näher untersucht.

Der direkte Nachweis, ob der AM-vorbehandelte Stamm eine bestimmte Signalkaskade aktiviert, ist durch den Immunblot möglich. Da neben der potentiellen Aktivierung der MAP Kinasen auch die Kinetik von Interesse war, wurden Wildtyp-Makrophagen (10^6 Zellen) mit AM-vorbehandelten Keimen (10^7 Zellen pro 100 μ l PBS) kokultiviert und nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (2, 5, 10, 15, 30, 60 min) die Zellextrakte erstellt. Anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad der Enzyme im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gemessen. Da die Aktivität der MAP Kinasen exklusiv über die Phosphorylierung des Thr-X-Tyr Motivs reguliert wird, kann der Aktivitätszustand der MAP Kinasen durch entsprechende phosphospezifische Antikörper bestimmt werden. Zum Nachweis, dass bei allen Experimenten gleiche Mengen an eingesetztem Protein vorlagen, wurden zusätzlich Western Blots mit einem spezifischen Antikörper für in der Zelle konstitutiv vorkommendes β -Actin durchgeführt (Abb. 12).

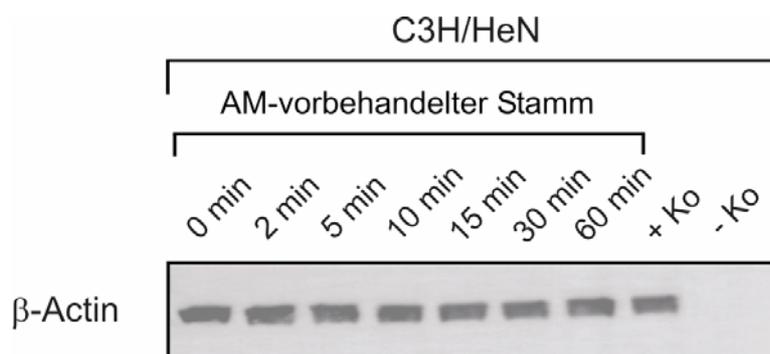


Abbildung 12: Nachweis von β -Actin zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Je 10^6 Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen wurden mit 10^7 AM-vorbehandelten *C. albicans*-Keimen stimuliert. Die Inkubation wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min beendet. Positiv- und Negativkontrolle wurden aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit einem Antikörper analysiert, der spezifisch konstitutives β -Actin erkennt.

3.3.2.1 Aktivierung und Kinetik der extracellular related kinase (ERK)

ERK, bestehend aus ERK1 (p44) und ERK2 (p42), ist verantwortlich für die Aktivierung der AP-1 Subeinheit c-Fos [41]. Die Beeinflussung der Kinaseaktivität von ERK durch AM-vorbehandelte Stämme wurde ebenfalls mit der Western-Blot Technik untersucht. Der Phosphorylierungsgrad von ERK in den Proteinlysaten wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ von aktivem ERK gemessen. Als Ladekontrolle diente die Detektion der unphosphorylierten ERK-Kinase.

Wie erwartet konnte der AM-vorbehandelte Stamm ebenfalls die Phosphorylierung von ERK induzieren, wobei die maximale Aktivierung zwischen 15 und 60 min nach Stimulationsbeginn zu verzeichnen war (Abb. 13, unterer Blot). Eine Aktivierung von ERK über eine längere Zeit als 60 min mag durchaus möglich sein, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Die dargestellte Ladekontrolle (oberer Blot) zeigt annähernd gleiche Beladungen der Geltaschen an.

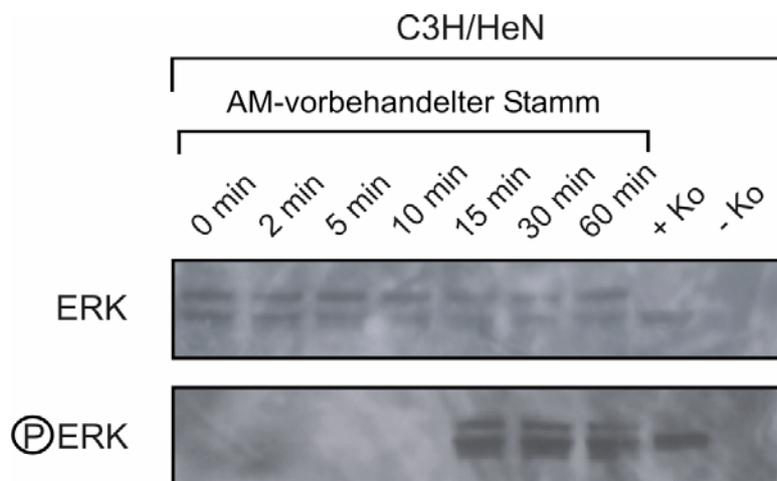


Abbildung 13: AM-vorbehandelte *C. albicans*-Keime bewirken ERK Aktivierung in Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen. Je 10^6 Peritonealexsudatzellen wurden mit 10^7 AM-vorbehandelten Keimen pro 100 μ l PBS inkubiert. Die Proteinextraktion wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60-minütiger Stimulation durchgeführt. Positiv- und Negativkontrollen wurden aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinlysate wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen an Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ phosphoryliertes ERK detektiert (unterer Blot). Als Ladekontrolle diente die Detektion der unphosphorylierten ERK-Kinase (oberer Blot).

3.3.2.2 Aktivierung und Kinetik von p38

Die Phosphorylierung von p38 führt zu einer Aktivierung dieser Kinase, die wiederum ihrerseits ATF2, eine Untereinheit von AP-1, phosphoryliert und damit aktiviert [88]. Die Untersuchung der Proteinextrakte, mit denen auch der zeitliche Verlauf für die AP-1 Aktivierung charakterisiert wurde, erfolgte im Western Blot mit einem Antikörper gegen Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² von aktivem p38.

Mit AM-vorbehandelten Keimen kokultivierte Makrophagen wiesen eine deutliche Phosphorylierung von p38 auf (Abb. 14, unterer Blot). Die höchste Aktivität von phospho-p38 wurde nach 2-15 min erreicht. Für den Nachweis, dass sich in jeder Spur gleiche Mengen an p38 befanden, der Unterschied der Banden also tatsächlich verschiedene Phosphorylierungs-/Aktivierungslevels repräsentierte, wurde der Blot gestrippt und mit einem Antikörper gegen unphosphoryliertes p38 kokubiert. Der obere Blot zeigt, dass im gesamten zeitlichen Verlauf der Stimulation unphosphoryliertes, konstitutives p38 nachgewiesen werden konnte.

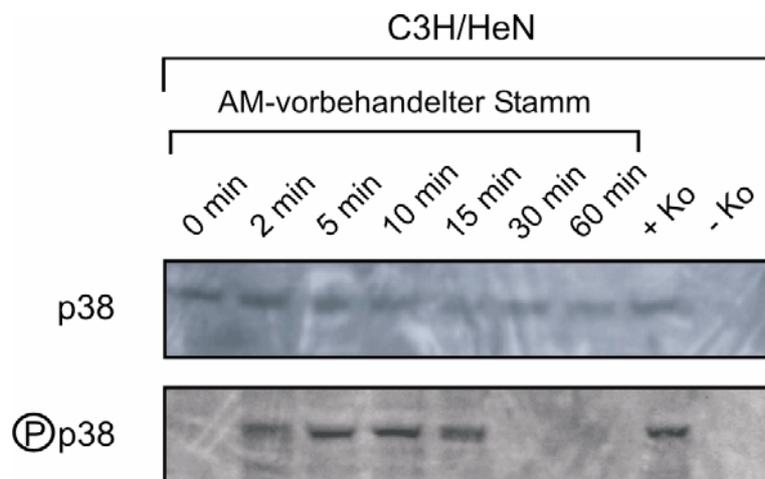


Abbildung 14: Der AM-vorbehandelte Stamm bewirkt p38 Aktivierung in Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen. Je 10^6 murine Makrophagen wurden mit 10^7 AM-vorbehandelten Keimen pro 100 μ l PBS kokultiviert. Die Stimulation wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min beendet. Positiv- und Negativkontrollen wurden aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit einem Antikörper analysiert, der spezifisch phosphoryliertes p38 erkennt (unterer Blot). Der Blot wurde gestrippt und mit einem spezifischen Antikörper gegen unphosphoryliertes p38 kokubiert (oberer Blot).

3.3.2.3 Aktivierung und Kinetik der c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)

JNK ist hauptsächlich verantwortlich für die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 und kann durch Phosphorylierung die Transaktivierungspotenz der Untereinheiten c-Jun, c-Fos und ATF2 entscheidend zu erhöhen [115]. Die Proteinextrakte aus der Stimulation der murinen Wildtyp-Makrophagen mit dem AM-vorbehandelten Stamm wurden im Immunblot mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen aktives JNK analysiert.

Der AM-vorbehandelte Stamm stimulierte JNK innerhalb von 15 min (Abb. 15, unterer Blot). Diese Aktivierung schien transient zu sein. Der Peak wurde nach 15 bis 30 min erreicht, nach 60 min war die Menge an aktiviertem JNK deutlich reduziert. Um sicherzustellen, dass in allen Spuren gleiche Mengen an JNK vorhanden waren, wurde der Blot gestrippt und mit einem nicht phosphospezifischen Antikörper gegen JNK koinkubiert (oben).

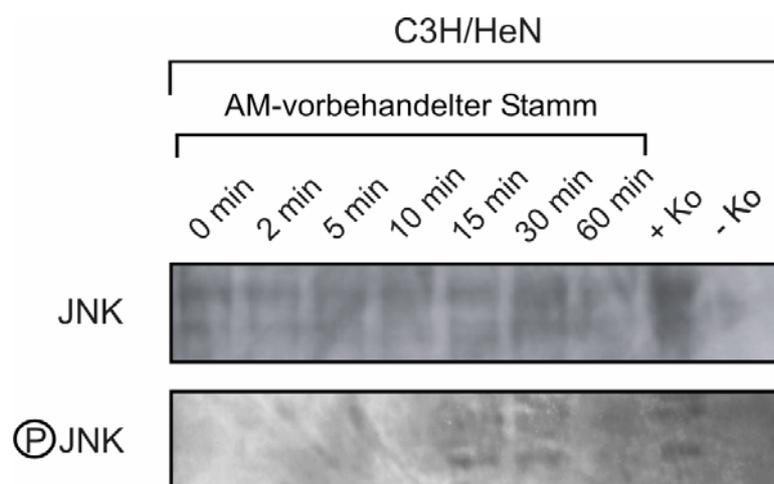


Abbildung 15: Der AM-vorbehandelte Stamm bewirkt JNK Aktivierung in Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen. Je 10^6 Wildtyp-Makrophagen wurden mit 10^7 Keimen vom AM-vorbehandelten Stamm stimuliert. Die Inkubation wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min beendet. Positiv- und Negativkontrolle wurden aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit einem Antikörper analysiert, der spezifisch phosphoryliertes JNK erkennt (unterer Blot). Der Blot wurde gestrippt und mit einem nicht phosphospezifischen Antikörper gegen JNK koinkubiert (oberer Blot).

3.3.3 Der AM-vorbehandelte Stamm bewirkt c-Jun Transkription

AP-1 tritt als Homo- oder Heterodimer auf, wobei sich die Subeinheiten aus den Protoonkogenen Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und ATF (ATF2, ATF3, B-ATF) rekrutieren [41]. c-Jun wird sowohl transkriptionell wie posttranslational durch Phosphorylierung von der MAP Kinase JNK reguliert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der durch AM-vorbehandelte Keime induzierte AP-1 Komplex c-Jun als eine mögliche Untereinheit enthält. Hierfür wurden die Makrophagen zu den üblichen Stimulationszeiten mit der *Candida*-Präparation inkubiert. Die Proteinextrakte wurden im Western Blot mit einem phosphospezifischen Antikörper für c-Jun (Ser⁶³) auf Phosphorylierung an dieser Stelle getestet.

Im zeitlichen Verlauf konnte eine Phosphorylierung/Aktivierung von c-Jun mit einem Peak zwischen 30 und 60 min gefunden werden (Abb. 16, oben). Aus kinetischen Aspekten korreliert dies mit der maximalen Aktivierung von JNK zwischen 15 und 30 min (3.3.2.3), da durch diese MAP Kinase die Phosphorylierung von c-Jun reguliert wird. Eine weitere Aktivierung von c-Jun über 60 min hinaus mag durchaus möglich sein, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Anschließend wurde der Blot gestriipt und mit einem Antikörper gegen c-Jun neu dekoriert. Alle Proben zeigten eine vergleichbare Menge an c-Jun, was darauf hinweist, dass das AM-vorbehandelte *C. albicans*-Isolat c-Jun durch Phosphorylierung und nicht transkriptionell aktiviert.

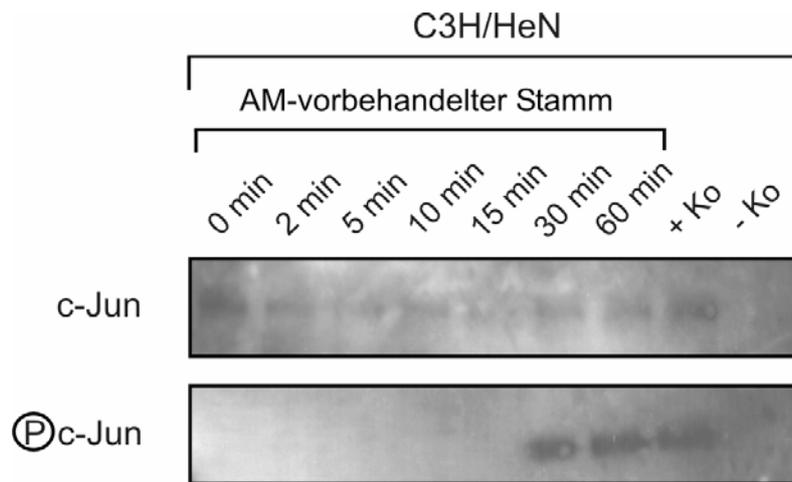


Abbildung 16: Der AM-vorbehandelte Stamm bewirkt c-Jun Aktivierung in Wildtyp(C3H/HeN)-Makrophagen. Je 10^6 Peritonealexsudatzellen wurden mit 10^7 AM-vorbehandelten Keimen pro 100 μ l PBS kokultiviert. Die Proteinextraktion wurde jeweils nach 0 (also unstimulierte Zellen), 2, 5, 10, 15, 30 und 60-minütiger Stimulation durchgeführt. Positiv- und Negativkontrolle wurden aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinlysate wurden mit einem Antikörper analysiert, der spezifisch an Ser63 phosphoryliertes c-Jun (Ser⁶³) bindet (unterer Blot). Der Blot wurde gestriipt und mit einem spezifischen Antikörper gegen unphosphoryliertes c-Jun detektiert (oberer Blot).

4. DISKUSSION

Als opportunistischer Erreger stellt *C. albicans* aufgrund der großen Anzahl abwehrgeschwächter Patienten eine klinisch ernstzunehmende Gefahr dar [23]. In Abhängigkeit des Immundefektes sind verschiedene Verlaufsformen dieser Pilzkrankung zu beobachten und reichen von oberflächlichen Schleimhauterkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen tiefen Organmykosen. Im Rahmen der angeborenen Immunität sind TLRs in der Lage, durchaus unterschiedliche, in der Evolution konservierte PAMPs zu erkennen und über den Transkriptionsfaktor NF- κ B als zentrale Schaltstelle die primäre Immunantwort einzuleiten [121]. Neben Wirtsdisposition und Aktivierung des Immunsystems haben die Virulenzfaktoren von *C. albicans*, insbesondere die Saps, eine entscheidende pathogenetische Bedeutung [62].

Da der Rezeptor Toll in *Drosophila* eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegenüber fungalen Infektionen spielt, ist die Erkennung von Pilzen und deren PAMPs durch TLRs in Mammalia ein integraler Bestandteil der gegenwärtigen mykologischen Forschung [78]. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass die Zytokinexpression nach einer Candidainfektion sowohl durch TLR2 und TLR4 reguliert wird [65]. Isolierte Zellwandkomponenten wie Mannan werden hingegen nur durch TLR4 erkannt [38], während modifizierte Formen dieses Polysaccharids, wie z.B. Phospholipomannan, wiederum nur durch TLR 2 detektiert werden [98].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals neben der TLR Aktivierung auch die Translokation von NF- κ B nach Infektion von Makrophagen mit unterschiedlichen *C. albicans*-Präparationen analysiert. In dieser Arbeitshypothese sollte geklärt werden, ob eine Veränderung der Zellwandstruktur (durch Antimykotika oder durch Hitze) oder der Virulenz (durch Sap-Inhibition) im Vergleich zum lebenden *C. albicans*-Isolat einen Einfluss auf die NF- κ B und TLR Induktion hat.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit das erste Mal untersucht, ob neben dem Transkriptionsfaktor NF- κ B auch noch diverse MAP Kinasen aus dem AP-1 Signaltransduktionsweg eine relevante Rolle bei der *Candida*-induzierten Immunabwehr in Makrophagen spielen.

4.1 Die Bedeutung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) in *C. albicans* für die TLR-vermittelte Aktivierung von NF- κ B

Es ließ sich zunächst zeigen, dass die Kokultivierung von murinen Wildtyp-Makrophagen sowohl mit lebenden als auch mit AM-vorbehandelten Keimen zur Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B – bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65 – führt. Die maximale DNA Bindeaktivität konnte beim lebenden Stamm ab einer Dichte von 10^6 Zellen pro 100 μ l PBS, und beim AM-vorbehandelten Stamm ab einer Dichte von 10^7 Zellen pro 100 μ l PBS jeweils nach einer Stimulationsdauer von 1 h erreicht werden.

Interessanterweise sind somit AM-vorbehandelte Keime trotz der Tatsache, dass sie auf der Sabouraud-Glukose-Agar-Platte keine Lebendkolonien mehr ausbilden können, in der Lage, in Makrophagen eine Immunantwort auszulösen. Das Gegenteil konnte jedoch beim Hitze-inaktivierten Stamm beobachtet werden: Hier kam es über den gesamten Dichtebereich – und selbst nach Vorstimulation der Makrophagen mit dem Zytokin IFN- γ – zu keiner Aktivierung von NF- κ B. Überraschend war auch, dass eine Reduktion der Virulenz durch Hemmung der Saps keinen Einfluss auf die Regulation von NF- κ B hatte: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors wurde durch Sap-Inhibition nicht beeinträchtigt und war mit der vorhandenen Aktivierung durch den lebenden und den AM-vorbehandelten Stamm vergleichbar.

Die fehlende Aktivierung von NF- κ B durch das Hitze-inaktivierte *C. albicans*-Isolat deckt sich mit anderen Versuchen der hiesigen Arbeitsgruppe [84]. Hier wurde ein rekonstituiertes humanes Schleimhautmodell einmal 12 und einmal 36 h lang mit dem identisch hergestellten, Hitze-inaktivierten Stamm stimuliert, und die Expression der Zytokine IL-1, IL-8 und TNF quantifiziert. Im Vergleich zur Infektion mit den lebenden Keimen kam es hier zu keiner Zytokinexpression. Zwar wurden in der Publikation andere Zellen (Keratinocyten) und eine andere Methode (Quantitative Real-time RT-PCR) als in der vorliegenden Arbeit verwendet, die Ergebnisse sind jedoch ähnlich und demonstrieren, dass Hitze-inaktivierte Keime hinsichtlich der NF- κ B Aktivierung (in Makrophagen) und der Zytokinexpression (in Keratinocyten) offensichtlich keine Immunantwort mehr induzieren. Durch diese Behandlung der Zellen werden wohl bestimmte konservierte Strukturen (PAMPs) von *C. albicans* denaturiert – die TLR-induzierte Aktivierung von NF- κ B bleibt somit aus.

Der Name „sekretorische Aspartatproteasen“ beschreibt die zwei wichtigsten Eigenschaften dieser Enzyme: Sie wirken extrazellulär und sind Proteasen. Neben dieser Aufgabe in der Bereitstellung niedermolekularer Stickstoffquellen durch den proteolytisch bedingten Eiweissabbau werden ihnen andere wichtige Aufgaben während der Infektion zugeschrieben. Hierzu gehören eine Beteiligung an der Adhärenz der Pilzzellen an Wirtsoberflächen [112], der Zerstörung von Wirtsbarrieren während der Invasion von Geweben [17,61] und der Evasion des Immunsystems durch Abbau von Immunglobulinen und Komplementmolekülen [39]. Saps sind daher für die Virulenz von *C. albicans* von großer Relevanz. Offensichtlich führt jedoch eine Inhibition der Saps zu keiner Beeinträchtigung der Aktivierung von NF- κ B, da trotz Sap-Inhibition die NF- κ B Induktion aufrechterhalten blieb. Daraus könnte man schlussfolgern, dass eine Reduktion der Virulenz durch Hemmung dieser extrazellulären Enzyme keinen Einfluss auf die Aktivierung von TLRs hat, sondern es primär auf die Anwesenheit von konservierten Strukturen (PAMPs), z.B. in der Zellwand, ankommt. Die Detektion der Saps als mögliche PAMPs durch TLRs darf ausgeschlossen werden.

4.2 Kollaboration von TLR2 und TLR4 in der Erkennung des lebenden Stammes

Die Stimulation der unterschiedlichen Makrophagen (Wildtyp, TLR2- bzw. TLR4-defizient, Doppelknockout) mit den lebenden Keimen zeigte, dass dieser Erreger sowohl durch TLR2 sowie TLR4 detektiert wird, da nur in Wildtyp-Makrophagen NF- κ B induziert wurde und nicht in den respektiven Einzel- und Doppelknockoutmutanten.

Dieses Resultat bestätigt die bereits publizierten Ergebnisse, in denen die Zytokinexpression in Makrophagen nach erfolgter *Candida*-Stimulation charakterisiert wurde [65]. Die Studie ergab, dass TLR4 maßgeblich an der Chemokinsekretion und der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beteiligt ist, während die Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β hauptsächlich durch TLR2 reguliert wird.

Man könnte einerseits behaupten, dass die Aktivierung von TLR2 und TLR4 möglicherweise durch die Erkennung unterschiedlicher PAMPs von *C. albicans* (z.B. Mannane, Glukane, Mannoproteine, Glykolipide) erklärbar, und somit durch die hohe Komplexität der Zellwand mit ihren zahlreichen, unterschiedlichen Komponenten

bedingt ist. Dies würde jedoch im EMSA bei den entsprechenden TLR-Einzelknockouts zumindest eine verminderte Induktion von NF- κ B ergeben und nicht – wie in unseren Resultaten – einen kompletten Verlust der NF- κ B Translokation.

Ein überzeugenderes Argument ist wohl die Möglichkeit der simultanen Aktivierung der TLRs durch einen einzigen Erreger: Wie bereits in 1.2.3 erwähnt, ist beispielsweise TLR2 durch die Ausbildung von Heterodimeren mit anderen TLRs (TLR1, TLR6) in der Lage, ein sehr breites Spektrum an unterschiedlichen PAMPs zu binden [44,72]. TLR2 und TLR4 bilden zwar keine Heterodimere, werden jedoch beide nach *Candida*-Stimulation aktiviert, so dass durch die Beteiligung beider Rezeptoren die NF- κ B Aktivierung (vorliegende Arbeit) sowie die Zytokin- und Chemokinsekretion [65] bestmöglichst induziert wird. Im vorliegenden Fall dient die Kollaboration von TLR2 und TLR4 somit einer möglichst gut „organisierten“ und fein abgestimmten Immunabwehr im Wirtsorganismus. Wichtig ist dabei die Präsenz beider TLRs, da in Abwesenheit von TLR2 oder von TLR4 die Aktivierung von NF- κ B völlig ausbleibt. Diese gleichzeitige Involvierung von TLR2 und TLR4 zur Feinregulation der Immunantwort gegenüber dem Erreger wurde unter anderem auch bei der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* [58], den Mannuronsäurepolymeren von *Pseudomonas aeruginosa* [22] und bei den Hitzeschockproteinen (HSP)70 und HSP Gp96, welche als Alarmsignale aus sterbenden Zellen freigesetzt werden und das Immunsystem unspezifisch aktivieren, beobachtet [6,108].

Neu war die Beobachtung, dass die Vorstimulation der Makrophagen mit dem Zytokin IFN- γ dazu führte, dass TLR2 den lebenden Stamm unabhängig von TLR4 erkennt, da es nach Inkubation mit den lebenden Keimen

- (1) nur in vorstimulierten Wildtyp- und TLR4-defizienten Makrophagen zu einer Translokation von NF- κ B kam,
- (2) diese jedoch in den vorstimulierten TLR2- und in TLR2/4-defizienten Makrophagen ausblieb,
- (3) und im ELISA die Sekretion von TNF- α nur in vorstimulierten Wildtyp- und TLR4-defizienten Makrophagen signifikant erhöht war.

Eine Erklärung hierfür könnte die Hochregulation von TLR2 unter IFN- γ -Einfluss sein. Die immunmodulierende Wirkung von IFN- γ würde somit zu einer vermehrten Expression von TLR2 führen, so dass der Rezeptor unabhängig von TLR4 die Translokation von NF- κ B induzieren kann. Die Hochregulation von TLR2 in

neutrophilen Granulozyten wurde bereits durch den Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) beschrieben [48]. Desweiteren wird in dieser Publikation auch über eine vermehrte Expression von CD14 berichtet. Dieses Molekül fungiert unter anderem als Co-Rezeptor bei der TLR2-vermittelten Erkennung von PAMPs wie Peptidoglykan oder Zymosan, einer Zellwandkomponente von *S. cerevisiae* [99]. Die Präinkubation mit IFN- γ und TNF- α führt in Nierenepithelzellen zu einer Hochregulation von TLR2 und TLR4 [118], während in oralen Epithelzellen IFN- γ die Expression von TLR2, TLR4 und dem Co-Faktor MD-2 fördert [107]. Da es speziell für *Candida*-stimulierte Makrophagen noch keine publizierten Daten gibt, darf hier nur spekuliert werden, dass neben der Hochregulation von TLR2 eventuell auch eine vermehrte Expression des Co-Rezeptors CD14 oder des Co-Faktors MD-2 diese TLR4-unabhängige Erkennung des lebenden *C. albicans*-Isolats erklären könnte.

4.3 Die Rolle von TLR2 in der Erkennung des AM-vorbehandelten Stammes

Es ließ sich in dieser Arbeit anhand der Aktivierung von NF- κ B zeigen, dass nur TLR2 – unabhängig von TLR4 oder IFN- γ -Präinkubation – bei der Erkennung von AM-vorbehandelten Keimen impliziert ist.

Dies steht in starkem Kontrast zu der fehlenden NF- κ B Induktion bei Hitze-inaktivierten *Candida*-Zellen. Obwohl nämlich beide Präparationen auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten keine Lebendkolonien mehr ausbilden konnten, sind die AM-vorbehandelten Keime noch in der Lage, die angeborene Immunität über den TLR2 zu induzieren. Da TLRs nicht den Erreger als Ganzes, sondern nur bestimmte, in der Evolution hoch konservierte Strukturen eines mikrobiellen Pathogens binden können, sind wohl in der AM-vorbehandelten Präparation derartige PAMPs noch vorhanden und aktivieren die Zellen des angeborenen Immunsystems.

Betrachtet man den Wirkmechanismus der eingesetzten Antimykotika (Itraconazol, Amphotericin B, Nystatin), so sind die möglichen PAMPs in der Zellwand oder dem Zytosol von *Candida* zu vermuten. Itraconazol hemmt die Synthese von Ergosterol, wodurch zunächst die Membranfunktion gestört wird, und nachfolgend die Struktur der Zellwand verloren geht (siehe 1.1.4). Die Polyene Amphotericin B und Nystatin komplexieren das Ergosterol der Zellmembran, wodurch es zur Entstehung von Poren und Kanälen in der Membran und zu einem verstärkten Efflux von Ionen und zytosolischen Substanzen kommt.

Durch diese deutlichen Beeinträchtigungen der Zellwandstruktur und der Membranintegrität lässt sich vermuten, dass PAMPs von *C. albicans* entweder aus der Zellwand oder aus dem Zellinneren freigesetzt, und anschliessend von TLR2 gebunden werden. Eventuell bewirken auch die Komplezierungen durch Amphotericin B und Nystatin, dass Zellwand- und Membrankomponenten in ihrer Struktur verändert werden und erst dadurch als PAMP durch TLR2 erkannt werden. Unsere Resultate weisen somit auf einen zweiten Wirkmechanismus der eingesetzten Antimykotika hin: Neben den oben beschriebenen direkten Effekten auf *C. albicans* aktivieren die Pharmaka die angeborene Immunität über eine TLR2-vermittelte Stimulation von Makrophagen.

In der Literatur wurden bisher nur 2 Komponenten der Zellwand von *C. albicans* als potentielle TLR-Liganden diskutiert: In humanen Monozyten wird Mannan durch TLR4 detektiert [98], während das Glykolipid Phospholipomannan in murinen Makrophagen ein Ligand von TLR2 ist [38]. Die Zellwand von *C. albicans* ist jedoch durch eine sehr hohe Komplexität und Diversität gekennzeichnet. Sie besteht unter anderem aus Glukanen, Mannanen, Chitin, Mannoproteinen, Glykolipiden und deren Derivaten, die durch Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Ubiquitinierung entstehen [15,64]. In Anbetracht dieser Mannigfaltigkeit an biochemisch unterschiedlichen Komponenten dürfte die Zellwand noch mehrere PAMP-Strukturen beherbergen; der Kreis der möglichen PAMPs in dem AM-vorbehandelten *C. albicans*-Isolat kann daher nicht genauer eingegrenzt werden.

Kürzlich wurde die Bedeutung von TLR2 und CD14 in der Aktivierung von Makrophagen durch Amphotericin B publiziert [81]. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Herstellung der AM-vorbehandelten Präparation nach Inkubation der *Candida*-Zellen mit den drei Antimykotika diese in einem dreimaligen Waschschrift mit PBS entfernt. Desweiteren zeigen die EMSA-Ergebnisse innerhalb der *Candida*-Dichten von 10^0 bis 10^6 Keimen pro 100 μ l PBS keine Aktivierung von NF- κ B. Überdies dienten – neben unstimulierten Zellen – als weitere Negativkontrolle die mit Antimykotika-Gemisch versetzten Makrophagen (je nach Stimulation Wildtyp-, TLR2- oder TLR4-defiziente sowie TLR2/4-doppelfeziente Zellen), um eine potentielle NF- κ B Aktivierung durch Antimykotika auszuschliessen. Da in allen Fällen keine Translokation von NF- κ B zu beobachten war, und alle Experimente mehrfach in voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt wurden, kann diese behauptete Stimulation von TLR2 durch Amphotericin B in der vorliegenden Arbeit jedenfalls

ausgeschlossen werden. Über die Ursache dieses scheinbaren Widerspruches kann man bis jetzt nur spekulieren. Mögliche Erklärungsansätze bieten z.B. die unterschiedlichen Stimulationszeiten, d.h. 1 h in der vorliegenden Arbeit versus 5 bzw. 18 h in [81].

4.4 I κ B- α als Knotenpunkt in der Stress-induzierten Aktivierung von NF- κ B

Die Regulation der Genexpression findet auf der Ebene der Transkription und der Translation statt. Der Transkriptionsvorgang wird durch die RNA-Polymerase II und TATA-Box-assoziierte Faktoren gewährleistet. Das An- und Abschalten der Transkription wird durch Transkriptionsfaktoren veranlasst, die an Enhancer- oder Silencer-Sequenzen binden und die Transaktivierung auslösen.

NF- κ B stellt hier einen Konvergenz- und Integrationspunkt vieler Signale für die Synthese von an Entzündungen beteiligten Proteinen dar [121]. Beispielsweise wird durch NF- κ B die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder auch von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) und Chemokinen wie zum Beispiel IL-6 vermittelt. Nach Stimulation der TLRs durch einen spezifischen PAMP kommt es im Zytoplasma durch Serinphosphorylierung zur Degradation der inhibitorischen I κ B-Moleküle. Darauf folgend bilden die Subeinheiten von NF- κ B Dimere, wandern in den Zellkern ein, und binden dort an regulatorische Promotersequenzen von genomischer DNA. Somit wird die Transkription von Genen, die diese Sequenzen enthalten, unterstützt.

In der vorliegenden Arbeit ist für NF- κ B das Heterodimer aus p50 und p65 als transkriptionell aktiv beschrieben worden. Die inhibitorische Subeinheit I κ B- α ist hinsichtlich seines Aktivierungsmechanismus an Serinresten das am besten charakterisierte Protein der inhibitorischen I κ B-Familie [26,120]. Die Western Blots zeigten, dass I κ B- α auch nach Stimulation mit dem AM-vorbehandelten Stamm zur schnellen Translokation von NF- κ B benutzt wurde. Dies ist im Einklang mit dem Konzept, dass I κ B- α bei Stress-induzierter Aktivierung von NF- κ B die relevanteste Untereinheit aus der I κ B-Familie darstellt [9]. Hierbei induziert die transiente Aktivierung über I κ B- α vor allem ein kurzfristiges Stress-Signal, das vermutlich auch bei einer durch *C. albicans* verursachten Entzündungsreaktion von Bedeutung ist und zu einer raschen Hochregulation von NF- κ B führt: Wurden die Makrophagen diesem Stimulus ausgesetzt, so war I κ B- α bereits nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar.

Die Immunblotuntersuchungen ergaben weiterhin, dass es unmittelbar im Anschluss an die Stimulation zu einer Phosphorylierung von I κ B- α kommt, wobei Serin32 als eine mögliche Phosphorylierungsstelle (neben Serin36) identifiziert werden konnte. Bei dieser serinphosphorylierten Form war ebenfalls eine rasche Degradation zu beobachten. Die zeitliche Limitierung dieses Signals belegt, dass die Aktivität von NF- κ B im vorliegenden Fall einem streng regulierten Prozess unterliegt. Sie wird durch die NF- κ B-vermittelte Transkription von I κ B- α im Sinne einer negativen Rückkopplung ermöglicht. So ist bei zahlreichen anderen aktivierenden Stimuli bereits bekannt, dass NF- κ B seinerseits effektiv die Resynthese von I κ B- α fördert [96]. Neues I κ B- α wird daraufhin in den Zellkern transportiert und kann dort aufgrund seiner hohen Affinität zu NF- κ B den Transkriptionsfaktor wieder von der DNA entfernen [5]. Der neu gebildete I κ B- α /NF- κ B-Komplex gelangt anschliessend zurück ins Cytoplasma.

Der Grund für diese vorübergehende, zeitlich eng begrenzte Induktion eines Stresssignals liegt wohl darin, dass eine länger andauernde Aktivierung von NF- κ B vermieden werden soll. Durch die schnelle Resynthese des inaktiven I κ B- α /NF- κ B-Komplex wird eine konstitutive Induktion von NF- κ B und somit eine permanent veränderte Zytokinfreisetzung verhindert. Eine überschießende, permanente Aktivität von NF- κ B und die daraus erfolgende, dauerhafte Veränderung des Genexpressionsprofils ist mit einer Reihe von pathologischen Prozessen verbunden, die bei Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen, Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen und Asthma, aber auch bei Hauterkrankungen wie Psoriasis vulgaris, dem atopischen Ekzem oder der Incontinentia pigmenti eine Rolle spielen [42].

4.5 Zusätzliche Aktivierung von AP-1 durch den AM-vorbehandelten Stamm

In dieser Arbeit wurde erstmals die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch AM-vorbehandelte *C. albicans*-Keime gezeigt. Für die Regulation von AP-1 sind die MAP Kinase Signaltransduktionswege von entscheidender Bedeutung. In Zellen von Säugetieren sind mittlerweile drei verschiedene MAP Kinasen beschrieben: ERK, p38 und JNK. Nach Stimulation muriner Wildtyp-Makrophagen mit AM-vorbehandelten Keimen wurden im zeitlichen der Infektion diese 3 Kinasen alle aktiviert.

ERK ist das physiologische Substrat von MEKK1 und ist konsekutiv an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Die Kokultivation von murinen Wildtyp-Makrophagen mit dem AM-vorbehandelten Stamm bewirkte eine Aktivierung von ERK, welche im Western Blot mit einem für aktives ERK spezifischen Antikörper gezeigt wurde.

Die JNK Signalkaskade ist mit der Signalweiterleitung durch extrazelluläre Stressoren assoziiert und wird unter anderem durch UV-Bestrahlung, Hitzeschock und Zytokine wie IL-1 und TNF- α aktiviert [60]. *In vivo* ist JNK mit der Apoptose-Induktion verbunden [34]. Die MAP Kinase p38 ist wie JNK ebenfalls primär an der Kontrolle von Stressantworten wie Entzündung und Apoptose beteiligt.

JNK kann Transkriptionsfaktoren der Jun Familie, so unter anderem c-Jun, an den Seitenketten Ser63 und Ser73 phosphorylieren und damit dessen transkriptionelle Aktivität entscheidend verstärken. Darüber hinaus ist es an der Induktion von c-Fos und von ATF2 beteiligt [60]. Neben JNK kann auch p38 durch Phosphorylierung ATF2 aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit kam es nach Stimulation mit dem AM-vorbehandelten Stamm zu einer Phosphorylierung von JNK, wobei das Maximum nach 30-45 min erreicht wurde und sich dann langsam wieder zurück bildete. Für p38 ergab sich ebenfalls eine transiente Aktivierung mit einem Peak zwischen 2-15 min. Des Weiteren induzierten die AM-vorbehandelten Keime die Phosphorylierung von c-Jun an der Seitenkette Ser63, wodurch dessen transkriptionelle Aktivität potenziert wird.

Die ERK Kaskade wird oft im Zusammenhang mit Proliferation und Differenzierung von Zellen beschrieben, so dass man sie nicht primär mit der Pathogenese einer fungalen Infektion in Verbindung bringen würde. Anders dagegen die Signalwege von JNK und p38, die zuerst als Mediatoren auf UV-Bestrahlung entdeckt wurden [30], heute aber allgemeiner als Signalwege für extrazellulären Stress wie Hitzeschock oder auch als Entzündungsmediatoren eingeordnet werden [60]. Beide Signalwege bewirken die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und so zum einen die Expression von Genen, die für Zellproliferation und Differenzierung wichtig sind, zum anderen – insbesondere in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B – die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8, IL-6 und TNF- α . Ähnlich der Stress-induzierten, schnellen Aktivierung von NF- κ B lässt sich damit

auch die Induktion von AP-1 primär mit der Akutreaktion des Wirtes auf AM-vorbehandelte Keime assoziieren.

Zusammengefasst scheint AP-1 somit neben NF- κ B ein weiterer wichtiger Konvergenzpunkt der durch AM-vorbehandelte *C. albicans*-Keime induzierten Signaltransduktionskaskade – stromabwärts der TLRs – zu sein.

4.6 Cross-Talk zwischen NF- κ B und AP-1

Zyklooxygenase-2 (COX-2), ein NF- κ B-reguliertes Enzym, ist verantwortlich für die erhöhte Produktion von Prostaglandinen, Prostazyklin und Thromboxan bei entzündlichen Erkrankungen. Kürzlich wurde gezeigt, dass nach der Stimulation von TLR2 und TLR4 durch *C. albicans* die Expression von Cox-2 in einer humanen Epithelzelllinie sowohl durch NF- κ B als auch durch p38 reguliert wird [18]. Die Experimente einer anderen Studie ergaben, dass es in murinen dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS zu einer TLR-vermittelten Aktivierung von NF- κ B und von ERK sowie p38 kommt [4]. Diese Publikationen weisen zusammen mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die *C. albicans*-induzierte Signaltransduktion nicht linear erfolgen muss. Im zeitlichen Verlauf werden die NF- κ B und die AP-1 Kaskade simultan aktiviert, wobei diese sich wiederum untereinander beeinflussen könnten („Cross-Talk“).

Für ein mögliches Zusammenspiel von NF- κ B und AP-1 gibt es zahlreiche Hinweise aus anderen Studien:

- (1) Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich die zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führenden Signaltransduktionswege überlappen, da die Signalkaskade bis zu TRAF6 gemeinsam verläuft. Eine Überexpression von TRAF6 resultierte in der Aktivierung von JNK [93].
- (2) Ferner war in Fibroblasten von IRAK-defizienten-Mäusen die Aktivierung von NF- κ B, p38 und JNK durch IL-1 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark reduziert [40].
- (3) Auf der Ebene von NF- κ B selbst wird eine Modulation des Aktivierungspotentials von NF- κ B durch ERK, p38 und JNK angenommen [105,109].

- (4) Es kann am Promoter der regulierten Gene zur Interaktion der Transkriptionsfaktoren kommen. Diese kann entweder in Form einer Kompetition um Bindestellen geschehen, wie für den humanen TNF Promoter gezeigt [106], oder eine synergistisch transaktivierende Wirkung haben. Dies wurde am GM-CSF Promoter [101] und am HIV-1 long terminal repeat gefunden [119]. Beschrieben wurde auch eine synergistisch wirkende Interaktion der Dimerisierungsregion von c-Fos und c-Jun mit der Domäne von p65/RelA [94].
- (5) Es besteht die Möglichkeit der Induktion von Genen durch einen der beiden Transkriptionsfaktoren, die inhibierend auf die Signaltransduktionskaskade des anderen Transkriptionsfaktors wirken. So wird beispielsweise bei der Regulation der Apoptose die pro-apoptotische Aktivität von JNK durch NF- κ B aktivierte Gene inhibiert [100].

Obwohl der Cross-Talk in dieser Arbeit nicht experimentell verifiziert wurde, so weisen obige Daten zusammen mit der simultanen Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren während der ersten 60 min nach Stimulation mit dem AM-vorbehandelten *C. albicans*-Isolat darauf hin. Über die Bedeutung dieses Cross-Talk zwischen NF- κ B und AP-1 darf ebenfalls nur spekuliert werden. Ähnlich wie bei der Kollaboration von TLR2 und TLR4 in der Erkennung der lebenden *C. albicans*-Keime dürfte diese gegenseitige Wechselwirkung von NF- κ B und AP-1 jedoch zu einer möglichst spezifischen und fein regulierten Zytokinexpression im Rahmen der kurzen, Stress-induzierten Immunantwort des Wirtes führen.

4.7 Strategien zur therapeutischen Hemmung von NF- κ B und der TLRs

Trotz dieser Komplexität, bedingt durch die Zusammenarbeit der TLRs mit anderen Rezeptoren (siehe 1.2.3) und dem Cross-Talk zwischen NF- κ B und AP-1, ist die Bindung der TLRs durch *C. albicans* sehr spezifisch, und die Aktivität von NF- κ B zeitlich streng reguliert. So wurde gezeigt, dass NF- κ B und AP-1 in Makrophagen in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Die transiente Induktion beider Transkriptionsfaktoren ermöglichte diesen Zellen, auf einen pathogenen und Stress-induzierenden Stimulus wie *C. albicans* mit einer fein regulierten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zu reagieren.

Eine Abschwächung oder Unterdrückung der stromabwärts befindlichen Zytokinexpression durch Inhibition von NF- κ B und/oder AP-1 in diesen Prozessen ist somit ein sinnvoller Angriffspunkt therapeutischer Strategien. Während die Hemmung von AP-1 bisher noch relativ spärlich untersucht wurde, gibt es für die Inhibition von NF- κ B mehrere Ansatzpunkte zur Intervention.

Glukokortikoide hemmen beispielsweise die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoidrezeptors mit p50 und p65 und stabilisieren die inhibitorische Subeinheit I κ B- α . Für nichtsteroidale antiinflammatorische Substanzen (NSAIDs) wie Acetylsalicylsäure konnte eine direkte Inhibition von IKK β gezeigt werden. Auch andere Substanzen zur Behandlung von chronischen Entzündungen oder Tumoren verwendete Substanzen wie Sulfasalazin, Methotrexat oder Curcumin inhibieren die Aktivität des IKK-Komplexes [52].

Alle angeführten Substanzen sind jedoch keine spezifischen NF- κ B-Inhibitoren, sondern haben weitere, zusätzliche Angriffspunkte in der Zelle. Außerdem hemmen sie NF- κ B (in Abhängigkeit ihrer Applikation) häufig nicht nur in betroffenen Geweben, sondern ebenfalls an anderer Stelle im Organismus, was aufgrund der Bedeutung des Transkriptionsfaktors für viele physiologische Prozesse zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Darüber hinaus ist noch nicht eindeutig geklärt, ob der IKK-Komplex neben den I κ B-Proteinen noch andere Substrate phosphoryliert, so dass ein Eingriff an dieser Stelle auch Nebeneffekte zur Folge haben könnte.

Einen spezifischeren Ansatz würde die Inhibition von NF- κ B durch Oligonukleotide darstellen. So wurde nach Verabreichung von p65/RelA-Antisense-Konstrukten eine Verminderung der Symptome in einem Mausmodell von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet [66]. In einer alternativen Strategie wurden sogenannte Decoy-Oligonukleotide angewendet, die mehrere NF- κ B-Bindungsstellen enthielten. Mit diesen konnte in einem Kollagen induzierten Arthritis-Modell in Ratten die Produktion von IL-1 und TNF- α in den Gelenken inhibiert werden [102]. Es bleibt zu klären, inwieweit derartige Strategien auch bei systemischen Kandidosen fruchtbar sind. Weitere *in vivo* Studien zur Überprüfung der Effizienz und Reproduzierbarkeit des intrazellulären Imports von Oligonukleotiden wären hierfür sehr hilfreich.

Ein weiteres, vielversprechendes therapeutisches Target sind die TLRs, die den Anfang der Signaltransduktionskaskade bilden, so dass man bei einer Beeinflussung dieser Rezeptoren alle stromabwärts vorkommenden Signale steuern könnte. Bisher gibt es drei denkbare Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie:

- (1) Entwicklung von Peptiden, die innerhalb der Signalkaskade wichtige Enzyme wie IRAK oder anderer Protein-Protein-Interaktionen blockieren. Auf dieser Ebene könnte jedoch eine verminderte Selektivität aus den bereits genannten Gründen wieder zu Nebenwirkungen führen.
- (2) Entwicklung von Adjuvantien, die agonistisch am TLR wirken und aufgrund ihrer stimulatorischen Wirkung das Immunsystem gegenüber einer drohenden Infektion stärken. Beispiele hierfür sind das antiviral wirksame Imiquimod (Agonist an TLR7) [29], und der Bazillus Calmette-Guérin (BCG), ein Impfstoff gegen Tuberkulose, der auch als Immunstimulans bei Blasenkrebs eingesetzt wird und dabei agonistisch an TLR2 und 4 bindet [104].
- (3) Entwicklung von Antikörpern, die spezifisch an den entsprechenden TLR binden und somit eine Bindung des Pathogens – und eine nachfolgende Induktion der angeborenen Immunität – verhindern [71].

Vor allem die letzte Strategie scheint vielversprechend zu sein, zumal für die meisten TLRs bereits zahlreiche Liganden identifiziert wurden (1.2.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die TLR2 und TLR4 in der Erkennung des lebenden, und TLR2 in der Erkennung des AM-vorbehandelten Stammes implizierten, dürften im Rahmen der zukünftigen antimykotischen Therapie von Bedeutung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der opportunistisch humanpathogene Hefepilz *Candida albicans* gehört bei vielen gesunden Menschen zur mikrobiellen Schleimhautflora, kann jedoch bei abwehrgeschwächten Patienten oberflächliche Infektionskrankheiten sowie lebensbedrohliche Organmykosen verursachen. Obwohl der Immunstatus des Wirtes für eine Infektion mit diesem Erreger von entscheidender Bedeutung ist, trägt auch eine Reihe von Virulenzfaktoren, insbesondere die sekretorischen Aspartatproteasen (Saps), zur Pathogenität von *C. albicans* bei.

Die angeborene Immunität ist in der Lage, derartige Pathogene schon beim Erstkontakt zu erkennen und zu bekämpfen. Haupteffektoren dieser schnellen, angeborenen Immunantwort sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

Mitglieder der Toll-Proteinfamilie, sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLRs), wurden kürzlich als Rezeptoren auf diesen Immunzellen in Säugern identifiziert. Sie erkennen unterschiedliche Erreger anhand von in der Evolution hoch konservierten Strukturen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Freisetzung von Zytokinen führt. Sowohl TLR2 als auch TLR 4 wurden kürzlich für die Erkennung von *C. albicans* diskutiert.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Interaktion von Makrophagen mit *C. albicans* im Hinblick auf die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren und die nukleäre Translokation von NF- κ B zu untersuchen. Neben dem lebenden *C. albicans*-Isolat wurden zudem drei weitere Präparationen untersucht: Mit den Antimykotika (AM) Amphotericin B, Nystatin und Itraconazol vorbehandelte Keime, durch Hitze inaktivierte Keime sowie Sap-inaktivierte Keime.

Die Zellstimulationsexperimente wurden mit murinen Wildtyp-Makrophagen, TLR2- bzw. TLR4- defizienten Einzelknockoutmutanten und mit TLR2/4-Doppelknockoutmutanten durchgeführt. Die TLR-vermittelte Aktivierung von NF- κ B wurde mit Gelshifts (EMSA) nachgewiesen. Mit Western Blots wurden die intrazellulären Signaltransduktionswege untersucht.

Der Hitze-inaktivierte Stamm bewirkte keine Translokation von NF- κ B in Wildtyp-Makrophagen. Eine Inhibition der Saps bewirkte keine Abschwächung der NF- κ B Induktion, so dass im Umkehrschluss dieser bedeutende Virulenzfaktor die TLR-vermittelte NF- κ B Aktivierung nicht beeinflusst.

Der lebende Stamm benutzte sowohl TLR2 als auch TLR4 für die Induktion von NF- κ B. Nach Vorstimulation der Makrophagen mit Interferon- γ ließ sich jedoch eine klare TLR2-Abhängigkeit – unabhängig von TLR4 – in der Aktivierung von NF- κ B und in der Induktion von TNF- α zeigen. In beiden Fällen wurden die Makrophagen erst ab einer *Candida*-Dichte von 10^6 Zellen pro 100 μ l PBS stimuliert.

Für den AM-vorbehandelten Stamm ergab sich eine deutliche TLR2-Abhängigkeit in der Regulation von NF- κ B, welche durch die Präinkubation der Makrophagen mit IFN- γ nicht beeinflusst wurde. AM-vorbehandelte Keime konnten NF- κ B in den Makrophagen erst ab einer Dichte von 10^7 Zellen pro 100 μ l PBS aktivieren.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass lebende und AM-vorbehandelte Keime im Gegensatz zur Hitze-inaktivierten Präparation und zu den Saps relevante PAMP-Strukturen für eine TLR-vermittelte NF- κ B Hochregulation besitzen.

Die Beteiligung beider Rezeptoren, TLR2 und TLR4, belegt beim lebenden Stamm das Konzept, dass immunkompetente Zellen sich mehrerer TLRs bedienen, um die Immunantwort möglichst spezifisch und fein zu regulieren. Beim AM-vorbehandelten Stamm scheint den Antimykotika Amphotericin B, Nystatin und Itraconazol eine besondere Rolle zuzukommen, da diese die Integrität der Pilzmembran stören und somit TLR2-aktivierende PAMPs aus Zellwand und/oder Zytosol freisetzen. Neben dem direkten Effekt auf die Pilzmembran kommt es somit zusätzlich zu einer indirekten, TLR2 vermittelten Stimulation der Makrophagen.

Untersuchungen der Signaltransduktion (Stimulation von Wildtyp-Makrophagen mit dem AM-vorbehandelten *C. albicans*-Isolat) ergaben eine vorübergehende, zeitlich eng begrenzte Induktion von NF- κ B, die durch den Inhibitor I κ B- α reguliert wird. Gleichzeitig wurden im zeitlichen Verlauf der Stimulation auch MAP Kinasen (ERK, p38, JNK) und c-Jun, eine Subeinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, phosphoryliert. Diese simultane Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren weist auf eine feinregulierte Immunantwort der Makrophagen gegenüber *C. albicans* hin und legt zudem einen Cross-Talk zwischen NF- κ B und AP-1 nahe.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623
- 2 Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
- 3 Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 38105-38108
- 4 An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J, Qin Z, Cao C (2002) Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106: 38-45
- 5 Arenzana-Seisdedos FJ, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelierie F, Thomas D, Hay RT (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 15: 2689-2696
- 6 Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Biol Chem* 277: 15028-15034
- 7 Baldwin A (1996) The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683
- 8 Bastert J, Schaller M, Korting HC, Evans EG (2001) Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents* 17: 81-91

- 9 Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D (1995) Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* 9: 2736-2746
- 10 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- 11 Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of β -Glucans. *J Exp Med* 197: 1119-1124
- 12 Calderone RA, Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-335
- 13 Calderone RA (2002) *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington, D.C., 1st edition
- 14 Cameron V, Uhlenbeck OC (1977) 3'-Phosphatase activity in T4 polynucleotid kinase. *Biochemistry* 16: 5120-5126
- 15 Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 130-180
- 16 Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kalser MH (1969) Fungal flora of the normal human small and large intestine. *N Engl J Med* 280: 638-641
- 17 Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, DeRepentigny L (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 64: 4514-4519

- 18 Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R, Nigam S (2003) *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappaB. *J Immunol* 171: 3047-3055
- 19 Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999) Nosocomial blood stream infections in United States hospitals: A three-year analysis. *Clin Infect Dis* 29: 239-244
- 20 Felk A, Kretschmar S, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B (2002) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* 70: 3689-3700
- 21 Fidel PL Jr (2002) Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 40: 359-375
- 22 Flo TH, Ryan L, Latz E, Takeuchi O, Monks BG, Lien E, Halaas O, Akira S, Skjak-Braek G, Golenbock DT, Espevik T (2002) Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem* 277: 35489-35495
- 23 Fridkin SK, Jarvis WR (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9: 499-511
- 24 Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197: 1107-1117
- 25 Garber G (2001) An overview of fungal infections. *Drugs* 61: 1-12
- 26 Ghosh S, Baltimore D (1990) Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 344: 678-682

- 27 Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* ura3 and *E.coli* pyrF mutations. Mol Gen Genet 198: 179-182
- 28 Hartsel S, Bolard J (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. Trends Pharmacol Sci 17: 445-449
- 29 Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nature Immunol 3: 196-200
- 30 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev 7: 2135-2148
- 31 Hoegl L, Ollert MW, Korting HC (1996) The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. J Mol Med 74: 135-14
- 32 Hoegl L, Thoma-Greber E, Röcken M, Korting HC (1998) HIV proteinase inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study. Mycoses 41: 321-325
- 33 Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284: 1313-1318
- 34 Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol 10: 205-219
- 35 Janeway CA Jr (1999) The role of self-recognition in receptor repertoire development. Members of the Janeway Laboratory. Immunol Res 19: 107-118

- 36 Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216
- 37 Jensen J, Warner T, Balish E (1994) The role of phagocytic cells in resistance to disseminated candidiasis in granulocytopenic mice. *J Infect Dis* 170: 900-905
- 38 Jouault T, Iyata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel P, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J Infect Dis* 188: 165-172
- 39 Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 63: 984-988
- 40 Kanakaraj P, Schaefer PH, Cavender DE, Wu Y, Ngo K, Grealish PF, Wadsworth SA, Peterson PA, Siekierka JJ, Harris CA, Fung-Leung WP (1998) Interleukin (IL)-1 receptor associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med* 187: 2073-2079
- 41 Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246
- 42 Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Ann Rev Immunol* 18: 621-663
- 43 Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K (2002) Activation of macrophages by linear (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol Chem* 277: 36825-36831
- 44 Kirschning CJ, Schumann RR (2002) TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 121-144

- 45 Korting HC (1991) Allgemeine Mykologie: Pilze. Spezielle Mykologie: Pilzkrankungen. In: Hahn H, Falke D, Klein P (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie. Springer, Berlin Heidelberg, S 846-877
- 46 Korting HC (1995) Dermatotherapie. Springer, Berlin Heidelberg, S 160-165
- 47 Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B (1999) Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 43: 2038-2042
- 48 Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, Finberg RW (2002) Role of Toll-like receptor (TLR)2 in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. Blood 100: 1860-1868
- 49 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- 50 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 86: 973-983
- 51 Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 74: 49-139
- 52 Makarov SS (2000) NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. Mol Med Today 9: 441-448
- 53 Manners, DJ, Masson AJ, Patterson JC (1973) The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucan from yeast cell walls. Biochem J 135: 19-30

- 54 Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC, Björndal H, Lindberg B (1973) The structure of a β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan from yeast cell walls. *Biochem J* 135: 31-36
- 55 McDonald F (1984) Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *J Med Vet Mycol* 22: 79-82
- 56 Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298
- 57 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397
- 58 Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* 5: 561-70
- 59 Messer G, Rupec RA (2001) Nuklearfaktor-kappa-B (NF- κ B). *Hautarzt* 52: 677-685
- 60 Minden A, Karin M (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochem Biophys Acta* 1333: 85-104
- 61 Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 153: 349-355
- 62 Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428
- 63 Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C, Pla J (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 245-268

- 64 Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ (1991) *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. Clin Microbiol Rev 4: 1-19
- 65 Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van der Meer JW, Kullberg BJ (2002) The Role of toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. J Infect Dis 185: 1483-1489
- 66 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschfelde KH, Strober W (1996) Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. Nature Med 2: 998-1004
- 67 Niewerth M, Kunze D, Seibold M, Schaller M, Korting HC, Hube B (2003) Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. Antimicrob Agents Chemother 47: 1805-1817
- 68 Odds FC (1988) *Candida* and Candidosis. Bailliere Tindall, London, 2nd edition
- 69 Odds FC (1994) *Candida* species and virulence. ASM news 60: 313-318
- 70 Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W (1993) Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. Infect Immun 61: 4560-4568
- 71 O'Neill LAJ (2003) Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. Curr Opin Pharmacol 3: 396-403
- 72 Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA 97: 13766-13771

- 73 Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866
- 74 Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgö Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 15: 721-730
- 75 Polak A (1999) Ancotil[®]: Flucytosin – Status quo & Perspektiven. ICN Pharmaceuticals, Herbert Utz Verlag, München, 1st edition, S 6-8
- 76 Polak A (2001) Die antimykotische Therapie zum Beginn des dritten Jahrtausends. ICN Pharmaceuticals, Herbert Utz Verlag, München, 1st edition, S 84-94
- 77 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088
- 78 Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC (2004) Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol* 12: 44-49
- 79 Rupec RA, Baeuerle PA (1995) The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Eur J Biochem* 234: 632-640
- 80 Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J (1998) Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 241-253

- 81 Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM (2003) The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like-receptor- and CD14-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278: 37561-37568
- 82 Schaller M, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen W, Hube B (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34: 169-180
- 83 Schaller M, Schackert K, Korting HC, Januschke E, Hube B (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* 114: 712-717
- 84 Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* 118: 652-657
- 85 Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B (2003) The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 71: 3227-3234
- 86 Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC (2003) Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 52: 247-249
- 87 Schäfer-Korting M, Korting HC (1989) Antimykotika – Pharmakologie und therapeutische Anwendung. *Arzneimittelther* 7: 10-18
- 88 Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19: 2435-2444

- 89 Schofield DA, Westwater C, Warner T, Nicholas PJ, Paulling EE, Balish E (2003) Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J Infect Dis* 188: 591-599
- 90 Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928
- 91 Sheehan DA, Hitchcock CA, Sibley CM (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 40-79
- 92 Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A, Vazquez JA, Rampalo A, HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group (2000) The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 183: 286-293
- 93 Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9792-9796
- 94 Stein B, Baldwin AS Jr, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P (1993) Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potential biological function. *EMBO* 12: 3879-3891
- 95 Sullivan D, Coleman D (1998) Minireview - *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 36: 329-334
- 96 Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Green WC (1993) NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α . Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259: 1912-1915

- 97 Szolnoky G, Bata-Csörgö Z, Kenderessy-Szabó A, Kiss M, Pivarcsi A, Novák Z, Newman KN, Michel G, Ruzicka T, Maródi L, Dobozy A, Kemény L (2001) A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *J Invest Dermatol* 117: 205-213
- 98 Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H (2002) *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 46: 503-512
- 99 Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376
- 100 Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A (2001) Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature* 414: 313-317
- 101 Thomas RS, Tymms MJ, McKinlay LH, Shannon MF, Seth A, Kola I (1997) ETS1, NF- κ B and AP-1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene* 14: 2845-2855
- 102 Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, Yamamoto K, Nakase T, Seki H, Kato K, Kaneda Y, Ochi T (1999) Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transfection of nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 42: 2532-2542
- 103 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

- 104 Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T (2000) Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 68: 6883-6890
- 105 Tuyt LM, Dokter WH, Birkenkamp K, Koopmans SB, Lummen C, Kruijer W, Vellenga E (1999) Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *J Immunol* 162: 4893-4902
- 106 Udalova IA, Kwiatkowski D (2001) Interaction of AP-1 with a cluster of NF-kB binding elements in the human TNF promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 25-33
- 107 Uehara A, Sugawara S, Takada H (2002) Priming of human oral epithelial cells by interferon- γ to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol* 51: 626-634
- 108 Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H (2002) The endoplasmic reticulum resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 277: 20847-20853
- 109 Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273: 3285-3290
- 110 Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol* 36: 119-128

- 111 Vasquez-Torres A, Balish E (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Rev* 61: 170-192
- 112 Watts HJ, Chea FS, Hube B, Sanglard D, Gow NA (1998) Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* 159: 129-135
- 113 Wenzel RP (1995) Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 20: 1531-1534
- 114 Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2: 346-352
- 115 Weston CR, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12: 14-21
- 116 White TC, Marr KA, Bowden RA (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11: 382-402
- 117 Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180
- 118 Wolfs TGAM, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MARC, Hiemstra PS, van't Veer C (2002) In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 168: 1286-1293
- 119 Yang X, Chen Y, Gabuzda D (1999) ERK/MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating cooperative interaction of AP-1 and NF- κ B. *J Biol Chem* 274: 27981-27988

-
- 120 Zabel U, Baeuerle PA (1990) Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61: 255-265
- 121 Zhang G, Ghosh S (2001) Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107: 13-19

7. VERZEICHNIS EINGESETZTER MATERIALIEN

Im Folgenden werden die für diese Arbeit eingesetzten Materialien unter Angaben von Name und Ort des Herstellers aufgelistet.

Geräte

Autoklav	Aigner, München
Blot-Apparatur (für Semi-dry-Verfahren)	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Heraeus, Hanau
Elektrophoreseapparatur	Invitrogen, Karlsruhe
Entwicklungsanlage für Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg
EMSA-Apparatur	Owl Scientific, Cambridge, USA
EMSA-Glasplatten	Schubert & Weiss, München
Geltrockner	Bio-Rad, München
HT-Schüttel-Wärme-Inkubator	Infors AG, Bottmingen, CH
Laminar Air Flow Sterilbank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	WTW, Weilheim
Power Supply (Netzgerät)	Bio-Rad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

3MM Whatman-Papier	Schubert & Weiss, München
Einmalpipetten	TPP, Trasadingen, CH
ELISA-Platten	Greiner, Nürtingen
Gelfiltrationssäulen	Stratagene, Amsterdam, NL
Nitrocellulose-Membran	Invitrogen, Karlsruhe
Pipettenspitzen	PeqLab, Erlangen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Amersham, Braunschweig

Chemikalien

Acrylamid-Lösung, 30% (w/v)	Bio-Rad, München
Amphotericin B	Sigma, Taufkirchen
APS	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
γ -(³² P)-dATP, 3000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
DMSO	Fluka, Buchs, CH
DTT	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EDTA-freie Cocktailltablette mit Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ficoll Typ 400	Amersham, Braunschweig
Glycin	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Gibco BRL, Karlsruhe
Itraconazol	Janssen-Cilag, Neuss
KCl	Merck, Darmstadt
Kinasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt
Luminol-Lösung A und B	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
NaCl	Fluka, Buchs, CH
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
Nystatin	Gibco BRL, Karlsruhe
PBS	Gibco BRL, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen

PMA	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Poly-[dIdC]	Sigma, Taufkirchen
Ponceaurot S	Sigma, Taufkirchen
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Thioglycolat	Sifin, Berlin
TRIS	Sigma, Taufkirchen
Trockenmilchpulver	Fluka, Buchs, CH
T ₄ -PNK	New England Biolabs, Frankfurt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Zellkulturmaterial

FKS	Biochrom AG, Berlin
Interferon- γ	Peprtech, London, UK
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Oligonukleotid ODN1668	Tib Molbiol, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Sabouraud-Glukose-Agar-Platte	Difco, Detroit, USA
YPD-Medium	Difco, Detroit, USA
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg

Antikörper, molekularbiologische Kits, Molekulargewichtstandard

Folgende Antikörper wurden in Form von Western Blot Kits bei New England Biolabs, Frankfurt, bezogen:

I κ B- α (Ser³²) und phospho-I κ B- α (Ser³²) #9240

p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) und phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) #9210

ERK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) und phospho-ERK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) #9100

SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) und phospho-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) #9250

c-Jun (Ser⁶³) und phospho-c-Jun (Ser⁶³) #9260

Akt (Ser⁴⁷³) und phospho-Akt (Ser⁴⁷³) #9270

Anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase #7074

Anti-biotin antibody conjugated to horseradish peroxidase #7075

Folgende Antikörper wurden für die Kontrolle mit β -Actin bei Sigma, Taufkirchen, bezogen:

Anti- β -Actin from mouse	#A5316
Anti-mouse IgG secondary antibody	#A9044

Folgende Antikörper wurden für die Supershifts bei Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, bezogen:

Anti-NF- κ B p50 (H-119) X Supershift antibody	#H012
Anti-NF- κ B p52 (447) X Supershift antibody	#G182
Anti-NF- κ B p65 (H-286) X Supershift antibody	#C272

ELISA-Kit	R & D Systems, München
MagicMark	Invitrogen, Karlsruhe

8. ABKÜRZUNGEN

AP-1:	Activating Protein-1
APS:	Ammoniumperoxodisulfat
ATF2:	Activating Transcription Factor 2
BSA:	Rinderserumalbumin
CD:	Cluster of Differentiation
ddH₂O:	Bidestilliertes Wasser
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGTA:	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMSA:	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK:	Extracellular Related Kinase
FKS:	Fötale Kälber Serum
GM-CSF:	Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HIV:	Humanes Immundefizienz Virus
HRP:	Horseradish Peroxidase
IFN:	Interferon
IκB:	inhibitory κ B
IKK:	I κ B Kinase
IL:	Interleukin
IL-1R:	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK:	Interleukin-1-receptor-associated kinase
JNK:	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kDa:	Kilodalton
LPS:	Lipopolysaccharid
M:	Mol/Liter (Konzentration)
mA:	Milliampere
MALP:	Mycoplasmal macrophage activated lipopeptide
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase

MAPKK:	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK:	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEKK1:	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MHC:	Major histocompatibility complex
Min:	Minuten
MyD88:	Myeloid differentiation marker 88
NEMO:	NF- κ B essential modulator
NF-κB:	nuclear factor κ B
PAGE:	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP:	Pathogen-associated molecular pattern
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEST-Region:	Prolin-, Glutaminsäure-, Serin-, Threonin-reiche Region
PGN:	Peptidoglykan
PMA:	Phorbol-12-Myristat-Acetat
PMSF:	Phenylmethansulfonylfluorid
PNK:	Polynukleotidkinase
PRR:	Pattern-recognition receptor
RNA:	Ribonukleinsäure
RPMI:	Roswell Park Memorial Institut
SAP(s):	Sekretorische Aspartatprotease(n) (Gen)
Sap(s):	Sekretorische Aspartatprotease(n) (Protein)
SDS:	Natriumdodecylsulfat
s:	Sekunden
TAK1:	Transforming growth factor β -activated kinase
TBST:	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
TIR:	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TLR:	Toll-like Rezeptor
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6:	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min:	Umdrehungen pro Minute
V:	Volt

9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. G. Plewig danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu promovieren.

Herrn Professor Dr. H.C. Korting möchte ich für die Auswahl des sehr interessanten Themas, für die ausgezeichnete Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft sehr herzlich danken. Sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine stete, konstruktive Unterstützung trugen auch dazu bei, dass ich als Promotionsstipendiat der Universität München gefördert wurde. Des weiteren bin ich Herrn Prof. Dr. H.C. Korting für die Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren, sehr dankbar.

Herrn PD Dr. M. Schaller sowie Herrn PD Dr. R.A. Rupec danke ich in gleichem Maße ganz besonders für die intensive Betreuung, die fachliche Zusammenarbeit, und die nette, kompetente Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. C.J. Kirschning und Sylvia Fichte von der TU München für vielerlei technischen Rat.

Insgesamt möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die sehr angenehme Laboratmosphäre bedanken, dabei vor allem bei Günther Weindl, Birgit Eckelt, Sylvia Oberbauer, Hagen Tillger, Bernd Rebholz, Frau E. Januschke, Frau J. Laude und Frau A. Kieslinger. Eure Hilfsbereitschaft sowie die technische und moralische Unterstützung ermöglichten mir eine schöne, unvergessliche Zeit. Ein ganz besonderer Dank geht dabei noch mal an meinen Kollegen und Freund Günther Weindl für die vielen guten Gespräche und die Ausdauer in langen Nächten am Computer.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich stets unterstützt und somit mein Studium und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben. Dieser Dank kann jedoch niemals ausdrücken, welche Bedeutung meine Familie für alle Bereiche meines Lebens hat.

10. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name, Vorname	Alexander Roeder
Geburtsdatum, -ort	13.09.1977, Nürnberg
Eltern	Dr. med. Bernd Roeder, Dr. med. Regine Roeder Fachärzte für Innere Medizin

Ausbildungsdaten:

1987 – 1996	Chiemgau-Gymnasium Traunstein Leistungskursfächer: Englisch und Biologie Abschluss: Allgemeine Hochschulreife Note: 1,3
11/1996 – 10/2000	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/1998	Erstes Staatsexamen nach 4 Semestern Note: 2,25
10/2000	Zweites Staatsexamen nach 8 Semestern Note: 1,0
10/2000 – 10/2001	Praktisches Apotheken-Jahr
12/2001	Drittes Staatsexamen Note: 2,0
01/2002	Abschluss: Approbation als Apotheker Gesamtnote: 1,64
02/2002	Beginn der Doktorarbeit als Promotionsstipendiat zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Universität München

Praktika:

Jeweils in den Semesterferien Praktika bei Salus-Haus (Bruckmühl), Heumann Pharma GmbH (Nürnberg), Hexal AG (Holzkirchen), Schering AG (Berlin), Patentanwaltskanzlei Weickmann & Partner (München), Patentanwaltskanzlei Nikaido, Marmelstein, Murray & Oram (Washington DC, USA).

Publikationen:

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC (2004) Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol* 12: 44-49

Roeder A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC (2004) Tazarotene: Therapeutic strategies in the treatment of psoriasis, acne, and photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 111-118

Roeder A, Kirschning CJ, Schaller M, Weindl G, Wagner H, Korting HC, Rupec RA (2004) Induction of nuclear factor- κ B and c-Jun/activator protein-1 via Toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*. *J Infect Dis* 190: 1318-1326

Roeder A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC (2004) Safety and efficacy of fluticasone propionate in the topical treatment of skin diseases. *Skin Pharmacol Physiol* (im Druck)

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC (2004) Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* (im Druck)

Kongressbeiträge (Abstracts):

Tillger H, Roeder A, Schaller M, Korting HC, Rupec RA (2002) Untersuchung zur Aktivierung von NF- κ B in oralen Keratinozyten durch *Candida albicans*. *Mycoses* 45: 229

Roeder A, Schaller M, Korting HC (2003) Untersuchungen zur Regulation der Immunantwort bei Exposition von Makrophagen, Lymphozyten und Keratinozyten gegenüber *Candida albicans*. *Mycoses* 46: 274

Roeder A, Kirschning CJ, Schaller M, Wagner H, Korting HC, Rupec RA (2004) Identification of Toll-like receptors and characterisation of the signal transduction pathway during *Candida albicans* infections. *Arch Dermatol Res* 295: 342

Weindl G, Roeder A, Schaller M, Korting HC, Rupec RA (2004) Identification of Toll-like receptors and characterisation of the signal transduction pathway during *Candida albicans* infections. J Invest Dermatol 123: A26

Roeder A, Weindl G, Schaller M, Korting HC (2004) Untersuchungen zur Interaktion von Makrophagen mit *Candida albicans*: Toll-like Rezeptoren und NF- κ B Aktivierung. Mycoses 47: 386

Vorträge:

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in oralen Keratinozyten durch *Candida albicans*. 36. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., 12.-14. September 2002 in München

Regulation der Immunantwort nach Stimulation von Makrophagen, Lymphozyten und Keratinozyten mit *Candida albicans*. 37. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., 4.-6. September 2003 in Heidelberg