

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität
München
Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

**Interaktionen des humanpathogenen Schimmelpilzes
Aspergillus fumigatus mit Wirtszellen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Kathrin Luther
aus
Saarbrücken

München 2007

**Interaktionen des humanpathogenen Schimmelpilzes
Aspergillus fumigatus mit Wirtszellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von:
Dipl.-Biol. Kathrin Luther
aus Saarbrücken

Dekan	Prof. Dr. Jürgen Soll
Erstgutachter	PD Dr. Daniele Zink
Zweitgutachter	Prof. Dr. Michael Schleicher
Sondergutachter	PD Dr. Frank Ebel

Eingereicht am: 28.03.07

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.07

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

Ort,

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2004 bis Februar 2007 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. F. Ebel erstellt.
Die Arbeit wurde betreut und von der biologischen Fakultät vertreten durch PD Dr. Daniele Zink (Institut für Humangenetik, Department II für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München).

Meiner Familie
und
meinem Ehemann
Thorsten

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Publikationen:

Luther, K., M. Rhode, J. Heesemann, and F. Ebel.

Quantification of phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages using a novel antibody-independent assay. (2006). *J Microbiol Methods*, 66: 170-3.

Luther, K., A. Torosantucci, A. Brakhage, J. Heesemann, and F. Ebel.

Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. (2007). *J Cell Microbiology*, 9(2): 368-81.

Luther, K., and F. Ebel.

Toll-like receptors: recent advances, open questions and implications for aspergillosis control. (2006). *Medical Mycology*, 44, Suppl. 219-227.

Luther, K., R. Rohde, K. Sturm, J. Heesemann, and F. Ebel.

Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. (2007). Manuskript eingereicht

Tagungsbeiträge:

Luther, K., K. Sturm, M. Rhode, J. Heesemann, F. Ebel.

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 26.-29. September 2004 in Münster.

Poster: "Characterization of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine and human macrophages".

Luther, K., M. Rhode, J. Heesemann, Ebel F.

Tagung der DGHM Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“, Statusworkshop vom 25.- 26. Februar 2005 in Jena.

Vortrag: „Charakterisierung der Phagozytose von *Aspergillus fumigatus* durch Makrophagen“.

Publikationen

Luther, K., M. Rhode, J. Heesemann, F. Ebel.

Gemeinsamer Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung Allgemeiner und Angewandter Mikrobiologie (VAAM) vom 25.- 28. September 2005 in Göttingen.

Poster: „Quantification of phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages using a novel antibody-independent assay “.

Luther, K., J. Heesemann, F. Ebel.

Tagung der DGHM Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“, Statusworkshop in München, Februar 2006.

Vortrag: „Phagozytose von *Aspergillus fumigatus* Konidien durch murine Makrophagen benötigt die Erkennung von β 1-3 glucan über dectin-1 und die Anwesenheit von Toll-like Rezeptor 2“.

Luther, K., J. Heesemann, F. Ebel.

Tagung “Advances Against Aspergillosis” in Athen, Februar 2006

Poster: “Efficient phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages requires recognition of β 1-3 glucan by dectin-1 and the presence of Toll-like receptor 2”.

Luther, K., A. Torosantucci, A. Brakhage, J. Heesemann, F. Ebel

Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 01. - 04. Oktober 2006 in Würzburg.

Vortrag: „Efficient phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages requires recognition of β 1-3 glucan by dectin-1 and the presence of Toll-like receptor 2 “.

Luther, K., A. Torosantucci, A. Brakhage, J. Heesemann, F. Ebel.

Tagung “First meeting of yeasts and filamentous fungi” in Frankfurt 19. - 21. Oktober 2006.

Poster: „ Receptors involved in the phagocytosis of *Aspergillus fumigatus*“.

Inhaltsverzeichnis

A	Adenin
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
Acc.No.	Accession Number
AG 18	Tyrphostin
Ak	Antikörper
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimal Medium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Auskeimende Sporen
Asp f	Allergene von <i>Aspergillus fumigatus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BCS-Assay	Biotin Calcofluor staining Assay
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Toluidin Salz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C.	<i>Candida</i>
C.	<i>Cryptococcus</i>
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalzium-Chlorid
CA-Filter	Celluloseacetat-Filter
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
Cyt D	Cytochalasin D
D	Asparagin
DAB	3,3`Diaminobenziden
Dectin-1	dentritic-cell-associated C-type lectin-1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme linked ImmunoSorbent Assay
<i>et al.</i>	und andere
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanidin-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hypoxanthin Azaserin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
His ₆	rekombinant hergestelltes 6x Histidin gekoppeltes Protein

Inhaltsverzeichnis

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICL	Isocitratlyase
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IgA	Ig der Klasse A
IgG	Ig der Klasse G
IL	Interleukin
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITAM	Tyrosine-based Activation Motif
K	Lysin
Kan	Kanamycin
KCl	Kalium-Chlorid
kDa	Kilodalton
kVh	Kilovolt-Stunden
LAMP-1	Lysosomal membrane protein 1
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry
LP	zytosolisches Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mA	milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser desorption ionization-time of flight
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MG	molekulares Gewicht
MIP2	macrophage inflammatory protein 2
min	Minute
mM	milli-molar
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mPa	mega-Pascal
mRNA	messenger RNA
MTT	[3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid]
μ m	Mikrometer
<i>N.</i>	<i>Neurospora</i>
nm	nanometer
NOD	Nucleotide-bindende Oligomerisations Domäne
Nr.	Nummer
N-terminal	amino-terminal
OD ₂₈₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280nm
ORF	offener Leserahmen
<i>P.</i>	<i>Paracoccidiosis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP	Probenpuffer
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PTX	Pentraxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

Inhaltsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
SAP	Serum Amyloid Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunden
SIGN	specific ICAM3-grabbing non-integrin
SP	Surfactant Protein
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS(-T)	Tris gepufferte Salzlösung (+Tween)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TIGR	The Institute for Genomic Research
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifugation
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumen/ Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse/ Volumen
WT	Wildtyp
x g	vielfache Erdbeschleunigung
YG _{dial}	dialysiertes Hefe-Glukose-Medium
YG-Medium	Hefe-Glukose-Medium
ZfP	Zentrallabor für Proteomanalyse
α	Anti
Ω	Ohm

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
II	INHALTSVERZEICHNIS	IV
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.1.	Morphologie und Taxonomie.....	1
1.1.2.	Lebenszyklus.....	2
1.1.3.	Sporenhülle und Zellwand.....	3
1.1.4.	Medizinische Relevanz.....	5
1.1.5.	Diagnostik und Therapie	6
1.2.	DAS IMMUNSYSTEM.....	7
1.2.1.	Die Phagozytose	8
1.2.2.	Einteilung der „Pathogen Recognition Receptors (PRRs)“	8
1.2.3.	Die Toll-like Rezeptoren (TLR).....	10
1.2.3.1.	Entdeckung von Toll	10
1.2.3.2.	Toll-like Rezeptoren der Wirbeltiere	11
1.2.3.3.	Die MyD88-abhängige Signaltransduktionskaskade	12
1.2.3.4.	Die MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskade	13
1.3.	Dectin-1, ein „non-TLR pattern recognition receptor“	14
1.3.1.	Syk-abhängiger Signalweg von Dectin-1	15
1.3.2.	Syk- unabhängiger (MyD88-abhängiger) Signalweg von Dectin-1	16
1.4.	Eliminierung von <i>A. fumigatus</i> mit Hilfe der angeborenen Immunität .	16
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1.	Chemikalien.....	20
2.2.	Gerätenachweis.....	20
2.3.	Verwendete <i>Aspergillus</i>-Stämme, Mausstämme und Zelllinien.....	21

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	<i>Aspergillus</i> -Stämme	21
2.3.2.	Mausstämme.....	22
2.3.3.	Primäre Zellkulturen	22
2.3.4.	Zelllinien	22
2.4.	Oligonukleotide	23
2.5.	Expressionsvektoren.....	24
2.6.	Beads	24
2.7.	Antikörper.....	24
2.7.1.	Primäre Antikörper	24
2.7.2.	Sekundäre Antikörper.....	25
2.7.3.	Fluoreszenzmarkierte Moleküle	26
2.8.	Inhibitoren.....	26
2.9.	Mikrobiologische Methoden.....	27
2.9.1.	Kultivierung und Ernte der <i>Aspergillus</i> -Stämme.....	27
2.9.2.	Kultivierung in Flüssigmedien.....	28
2.9.3.	Ernte der Sporen	29
2.9.4.	Bestimmung der Sporenzahl	29
2.9.5.	Analyse der Sporenauskeimung	29
2.9.6.	Biotinylierung von Sporen	30
2.10.	Zellbiologische Methoden	30
2.10.1.	Isolierung von Peritonealmakrophagen.....	30
2.10.2.	Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand.....	31
2.10.3.	Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	31
2.10.4.	Isolierung und Kultivierung von Alveolarmakrophagen	31
2.10.5.	Isolierung und Kultivierung der humanen Primärmakrophagen	32
2.10.6.	Isolierung muriner neutrophiler Granulozyten	33
2.10.7.	Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	33
2.10.8.	Kultivierung der murinen Primärmakrophagen und Zelllinien	34
2.10.9.	Umsetzen der Zelllinien.....	34
2.10.10.	Bestimmung der Zellzahl.....	34
2.10.11.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.10.12.	Infektion von Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	35

2.10.13.	Herstellung von Laminarin-gekoppelten Beads.....	35
2.10.14.	Messung des „Oxidativen Burst“	36
2.10.15.	Transfektion von Zellen	36
2.11.	Molekulargenetische Methoden.....	37
2.11.1.	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen	37
2.11.1.1.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.11.1.2.	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.11.1.3.	Klonierung der amplifizierten Gene in einen Expressionsvektor	39
2.11.1.4.	„Colony“- Screening mit Hilfe der PCR.....	39
2.11.1.5.	Herstellung elektrokompenter Bakterien	40
2.11.1.6.	Elektroporation	40
2.11.1.7.	Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung	41
2.11.1.8.	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen	41
2.11.1.9.	Induktionskulturen	42
2.11.1.10.	Bakterienanzucht.....	42
2.11.1.11.	Aufschluss der Bakterien mit Hilfe der French-Press	42
2.11.1.12.	Reinigung der rekombinanten Proteine über die TALON-Matrix	43
2.11.1.13.	Reinigung unlöslicher Proteine.....	43
2.11.1.14.	Herstellung von Melanin- „Ghosts“ (Youngchim <i>et al.</i> , 2004).....	44
2.11.2.	Herstellung monoklonaler Antikörper	45
2.11.2.1.	Verwendete Antigene	45
2.11.2.2.	Immunisierung der Mäuse.....	45
2.11.2.3.	Fusion.....	46
2.12.	Proteinchemische Methoden	47
2.12.1.	Durchmusterung der Hybridom-Überstände in der SDS-PAGE.....	47
2.12.2.	ELISA	47
2.12.3.	Isolierung von Hüllproteinen von <i>A. fumigatus</i> mit Hilfe des Ultraschalls....	48
2.12.4.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	49
2.12.4.1.	Färbung mit Coomassie Brillant Blau G250	50
2.12.5.	Nachweis von Proteinen durch Antikörper	51
2.12.5.1.	Western Blot.....	51
2.12.5.2.	Immunfärbung von Western Blots	52
2.13.	Zytologische Methoden	53
2.13.1.	Durchmusterung der Hybridom-Überstände in der Immunfluoreszenz	53
2.13.2.	Assay zur Quantifizierung der Phagozytose	53

2.13.3.	Färbung mit Antikörpern.....	54
2.13.3.1.	Färbung mit V5-Antikörper	55
2.13.4.	Durchflusszytometrie.....	55
2.14.	Mikroskopische Untersuchungen.....	56
2.14.1.	Elektronenmikroskopie.....	56
2.14.2.	Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop (2D).....	56
2.14.3.	Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop (3D).....	57
2.14.4.	„Live-Cell“ Mikroskopie.....	57
3.	ERGEBNISSE.....	58
3.1.	Etablierung einer geeigneten Methode für die Quantifizierung der Phagozytose von <i>Aspergillus fumigatus</i>-Sporen	58
3.1.1.	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen <i>A. fumigatus</i> -Sporen	58
3.1.1.1.	Isolierung von Hüllproteinen von <i>A. fumigatus</i> -Sporen	59
3.1.1.2.	Klonierung und Expression von Hydrophobin B	60
3.1.1.3.	Herstellung von Melanin-„Ghosts“	61
3.1.1.3.1.	Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Melanin-„Ghosts“.....	63
3.1.2.	Der „Biotin-Calcofluor-Staining (BCS)“-Assay.....	66
3.1.3.	Einfluss der „Biotinylierung“ auf das Verhalten von Sporen.....	68
3.1.3.1.	Einfluss auf die Auskeimung	68
3.1.3.2.	Einfluss auf die Zelladhäsion.....	68
3.1.3.3.	Vergleich zwischen der Phagozytose biotinylierter und Antikörpergefärbter Sporen.....	70
3.1.3.4.	Biotinylierung und Färbung von unterschiedlichen <i>Aspergillus</i> -Stämmen	71
3.1.3.5.	Biotinylierung und Färbung von <i>Candida albicans</i>	73
3.1.3.6.	Phagozytose von Sporen unterschiedlicher klinischer <i>A. fumigatus</i> -Isolate	74
3.2.	Untersuchungen der Phagozytose von <i>Aspergillus fumigatus</i>-Sporen	75
3.2.1.	Charakterisierung der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen	75
3.2.1.1.	Effekte der Inhibitoren auf die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	76
3.2.1.1.1.	Konzentrationsabhängige Inhibierung der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen in J774-Zellen mit Hilfe von Cytochalasin D ..	78
3.2.2.	Charakterisierung der Aufnahme von Sporen in der Immunfluoreszenz.....	79

3.2.2.1. Die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen zeigt aktinreiche Aufnahmestrukturen	80
3.2.2.2. Tyrosin-phosphorylierte Proteine befinden sich in den Aufnahmestrukturen	80
3.2.2.3. Untersuchungen der Aufnahmestrukturen durch Elektronenmikroskopie	81
3.2.2.3.1. EM-Aufnahmen zeigen sog. „Ruffles“, die darauf deuten, dass <i>A. fumigatus</i> -Sporen durch einen „Trigger“-Mechanismus aufgenommen werden	81
3.2.2.3.2. EM-Aufnahmen deuten darauf hin, dass <i>A. giganteus</i> -Sporen durch einen „Zipper“-Mechanismus aufgenommen werden	83
3.2.2.4. Die Aufnahme von <i>A. fumigatus</i> -Sporen gleicht Makropinozytose und führt zur Bildung großer Vakuolen	84
3.2.3. Einfluss von GTP-bindenden Rho-Proteinen auf die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	85
3.2.3.1. Einfluss des Rho-spezifischen Inhibitors Edin B	85
3.2.4. Rolle des Komplementsystems bei der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	86
3.3. Rezeptoren der Phagozytose von <i>Aspergillus fumigatus</i>-Sporen....	88
3.3.1. Inhibierung der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> mit verschiedenen Zuckern... ..	88
3.3.2. Phagozytose lässt sich durch Laminarin blockieren.....	89
3.3.3. Phagozytose lässt sich durch einen „Limulus“-Extrakt blockieren	92
3.3.4. Lokalisation des β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von <i>Aspergillus</i> -Sporen	93
3.3.5. Die Menge an β 1-3 Glucan ist entscheidend für die Phagozytoseeffizienz	95
3.3.6. Lokalisation von β 1-3 Glucan auf der Oberfläche der <i>pksP</i> -Mutante.....	96
3.3.7. Phagozytoseeffizienz der <i>pksP</i> -/ und der weißen UV-Mutante	98
3.3.8. Phagozytose der <i>rodA</i> -Mutante.....	98
3.3.9. Lokalisation von β 1-3 Glucan-positiven <i>A. fumigatus</i> -Sporen während der Infektion von Makrophagen.....	99
3.3.10. Inhibierung der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen durch einen anti-Dectin-1 Antikörper.....	101
3.3.10.1. Dectin-1 wird für eine effiziente Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen benötigt	101
3.3.10.2. Einfluss auf die Zelladhäsion.....	102
3.3.10.3. Lokalisierung des Dectin-1 in der Immunfluoreszenz.....	103
3.3.10.4. Rekrutierung von Dectin-1 in infizierten Makrophagen.....	105

3.3.11.	Syk-abhängige Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen	105
3.3.11.1.	Effekte von Piceatannol und PP2	106
3.3.11.2.	Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen in Syk-defizienten Makrophagen 107	
3.3.12.	Die Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> - Sporen.....	107
3.3.12.1.	TLR2, aber nicht TLR4 wird für eine effiziente Phagozytose benötigt.....	108
3.3.12.2.	Adhäsion von <i>A. fumigatus</i> -Sporen an TLR-defizienten Makrophagen...	109
3.3.12.3.	Phagozytose von biotinylierten BSA-Beads in Peritonealmakrophagen (C3H HeN) nach 3 h	110
3.3.12.4.	Die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen durch Peritonealmakrophagen lässt sich mit einem TLR2-spezifischen Antikörper blockieren	112
3.3.13.	Die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen ist abhängig von MyD88	113
3.3.14.	P ₃ CSK ₄ -Stimulation zeigt keinen Effekt auf die Phagozytose	113
3.3.15.	Adhäsion von Sporen an transfizierten HEK293-Zellen	114
3.3.16.	Der Einfluss von TLR2 auf die Phagosomen-Reifung	115
3.3.17.	Ein synergistischer Effekt zwischen Dectin-1 und TLR2?	117
4.	DISKUSSION	119
4.1.	Etablierung des BCS-Assays zur Quantifizierung der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i>-Sporen	119
4.2.	Die Aufklärung der Phagozytoseprozesse von <i>Aspergillus fumigatus</i>- Sporen durch Makrophagen	123
4.2.1.	Die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen lässt sich durch verschiedene Inhibitoren blockieren	123
4.2.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	127
4.2.3.	Die GTPase Rho wird für eine effiziente Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> - Sporen benötigt.....	129
4.3.	Dectin-1 und TLR2 werden für eine effiziente Phagozytose von <i>A.</i> <i>fumigatus</i>-Sporen benötigt	130
4.3.1.	Die Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen ist Syk-abhängig	137
4.3.2.	Die Rolle von TLR2 bei der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Sporen.....	139

Inhaltsverzeichnis

4.3.2.1. TLR2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der frühen Phagolysosomenreifung	140
4.4. Schlussfolgerung	141
5. ZUSAMMENFASSUNG	143
6. LITERATURVERZEICHNIS	145
7. DANKSAGUNG	164
8. LEBENSLAUF	165

1. Einleitung

Schimmelpilze sind ein natürlicher Teil unserer belebten Umwelt. Sie sind eukaryontische Lebewesen und zeichnen sich, anders als beispielsweise Bakterien, durch das Vorhandensein eines echten Zellkerns aus, die DNA wird also von einer Membran umgeben. Den benötigten Energiebedarf decken die Pilze durch den Abbau organischer Substanzen, ein Vorgang der als Heterotrophie bezeichnet wird.

Es gibt ungefähr 100.000 bis 250.000 verschiedene Arten von Pilzen, doch nur etwa 50 Arten rufen beim Menschen Erkrankungen hervor. Ein saprophytisch lebender Vertreter ist der Pilz der Gattung *Aspergillus*. Dieser ist in der Lage, in verschiedenen Organen des menschlichen Körpers zu gedeihen und dort parasitär gefährliche Mykosen zu verursachen (Ainsworth, 1966).

1.1. *Aspergillus fumigatus*

1.1.1. Morphologie und Taxonomie

Die Spezies *Aspergillus fumigatus* wurde das erste Mal 1863 von Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben. *A. fumigatus* ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz. Seine natürliche Nische ist der Boden, wo er sich von organischem Material ernährt (Mullins *et al.*, 1976). *A. fumigatus* siedelt sich auch häufig außerhalb dieses Lebensraumes an, wie z.B. in Nassbereichen, feuchten Wänden und Kellern, defekten Belüftungssystemen oder Topfpflanzen. Charakteristisch für seine Morphologie sind seine grünen echinulaten Sporen, auch Konidien genannt, die es dem Pilz ermöglichen, auch in schlechten Umweltbedingungen zu überleben. Sie haben einen Durchmesser von 2-3 µm und entstehen als lange Sporenketten an den Konidiophoren (Latge, 1999). Die Konidiophoren werden aus einer Fußzelle gebildet, die dem Nährmyzel entspringt und dienen der Fortpflanzung des Pilzes. Bei *A. fumigatus* sind diese etwa 500 µm lang und erzeugen am Ende ein birnenförmiges Bläschen (Konidiophorenvesikel). Diesem Vesikel sitzen nach allen Seiten hin Konidien-bildende Phialiden auf (siehe Abbildung 1).

Den Namen *A. fumigatus* („rauchender *Aspergillus*“) verdankt dieser Schimmelpilz wohl der starken „Rauchentwicklung“ beim Ablösen der Sporen von den Konidiophoren. Jede Konidiophore ist in der Lage, Tausende von Sporen zu bilden, die durch leichte Luftbewegungen abgelöst werden und so in die Umwelt gelangen, wo sie über große Entfernungen hinweg transportiert werden können (Reiß, 2006).

Aspergillus-Arten sind allgemein Wärme liebend, so kann *A. fumigatus* noch bei Temperaturen von bis zu 55 °C wachsen und bis zu Temperaturen von 70 °C überleben (Raper und Fenell, 1965).

Schimmelpilze werden den Klassen der Zygomycetes, der Ascomycetes und Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) zugeordnet. Da bis heute für *A. fumigatus* keine sexuellen Fortpflanzungsstadien gefunden wurden, wird er zur künstlichen Gruppe der Deuteromycota (Fungi Imperfecti) gezählt (Samson, 1999).

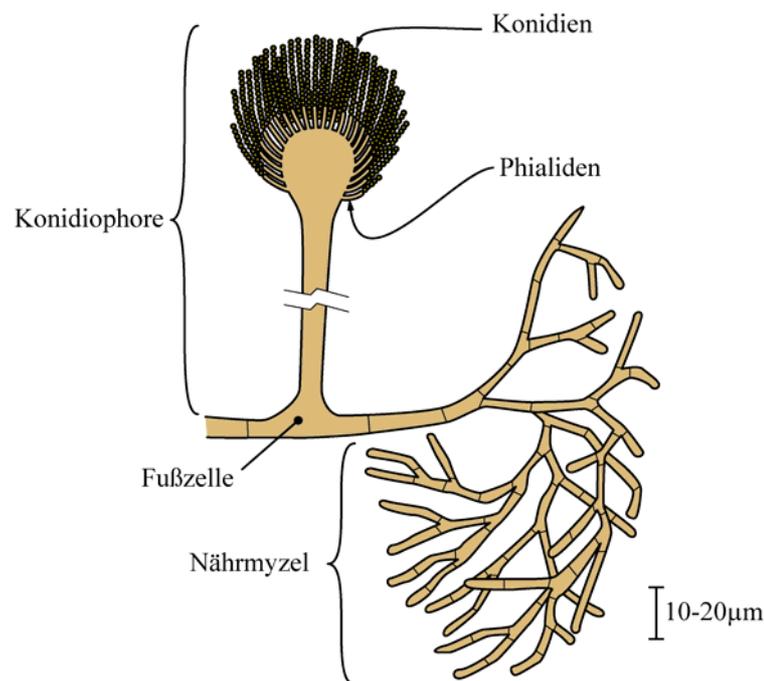


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Morphologie von *A. fumigatus* (Schwienbacher, 2005).

1.1.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus beginnt mit der Auskeimung ruhender Sporen (siehe Abbildung 2). Sporen bilden bei *Aspergillus*-Infektionen das infektiöse Agens.

Für die Auskeimung der ruhenden Sporen ist die Anwesenheit von Zuckern, Aminosäuren und anorganischen Salzen notwendig (Carlie, 2006). Bei der Auskeimung kommt es zu einer Reihe von metabolischen Aktivitäten im Inneren der Zelle, wie z.B. dem Zellwandumbau, der Proteinbiosynthese und dem Abbau des Reservezuckers Trehalose (Schmit und Brody, 1976; d'Enfert und Fontaine, 1997).

Ist die Auskeimung ausgelöst, beginnt das Anschwellen der Sporen (isotropes Wachstum) und es kommt zu einer Umorganisation der Zellwand (Griffin, 1994). Wenige

Stunden später erscheinen die ersten Keimschläuche, die durch ein polarisiertes Wachstum gekennzeichnet sind. Dieses Wachstum führt zur Hyphenbildung und letztendlich zur Myzelbildung. Bei direktem Kontakt zur Luft wachsen manche Verzweigungen zu einer Konidiophore heran, die dann wiederum Konidien abschnüren.

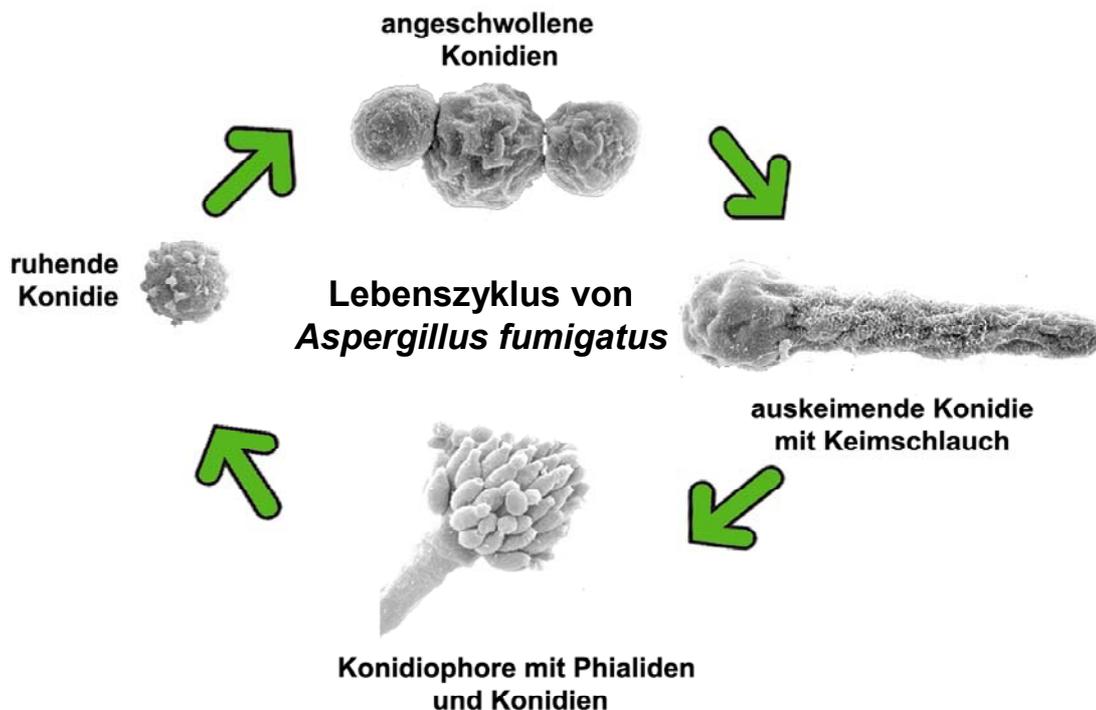


Abbildung 2: Lebenszyklus von *A. fumigatus* (schematische Darstellung). Die von den Phialiden gebildeten Konidien können durch die Luft in die Umwelt gelangen. Mit dem Vorhandensein von geeigneten Nährstoffen und anderen Faktoren, wie z.B. Wasser, schwellen die Konidien an und bilden schließlich Keimschläuche, die zu einer Hyphe heranwachsen. Viele Hyphen bilden das Myzel. Es kommt nun schließlich zur Myzel- und Konidiophorenbildung, deren Phialiden bilden dann wiederum die nächste Generation von Konidien.

1.1.3. Sporenhülle und Zellwand

A. fumigatus-Sporen besitzen eine äußere proteinreiche Schicht, die als „Rodlet-Struktur“ bezeichnet wird (Paris *et al.*, 2003). Diese „Rodlet-Struktur“ findet sich auch bei anderen Pilzen, sie ist stark hydrophob (Wosten und de Vocht, 2000) und besteht hauptsächlich aus Hydrophobin A und Hydrophobin B (Paris *et al.*, 2003). Die Hydrophobinschicht stellt einen Schutz des Pilzes gegen schädigende Umwelteinflüsse und auch gegen die Zellen des Immunsystems dar. Die Hydrophobinschicht besteht nur bei ruhenden Sporen, welche einen Durchmesser von 2-3 μm besitzen. Die baumrindenähnliche „Rodlet-Struktur“ wird aber im Zuge des Auskeimungsprozesses

abgeworfen (Rohde *et al.*, 2002). Mutante Konidien mit einer Deletion des *rodA*-Gens, das eine essentielle Komponente der „Rodlet-Struktur“ kodiert, erwiesen sich als weniger resistent gegenüber Alveolarmakrophagen (Paris *et al.*, 2003). *A. fumigatus*-Sporen besitzen unter ihrer „Rodlet-Struktur“ eine Zellwandstruktur, die während des Anschwellvorgangs zum Vorschein kommt (Tronchin *et al.*, 1995). Dieser Vorgang ist ein wesentlicher Schritt im Germinationsprozess und kann auch innerhalb von Makrophagen passieren (Philippe *et al.*, 2003). Angeschwollene Sporen besitzen einen Durchmesser von ungefähr 5 µm und verfügen über eine glatte Oberfläche (Rohde *et al.*, 2002). Die Oberflächenstruktur ähnelt denen der Hydrophobin A-Mutante und der *pksP*-Mutante (Jahn *et al.*, 2000; Paris *et al.*, 2003), die im Verlauf dieses Abschnittes noch näher erläutert wird.

Die Zellwand von *A. fumigatus* ist eine komplexe Struktur, die aus Polysacchariden besteht (Latge *et al.*, 1993). Das häufigste Polysaccharid in der Zellwand ist β 1-3 Glucan, das sozusagen als Anker anderer Polysaccharide wie Galactomannan und Chitin dient (Yuen *et al.*, 2001). Die komplexe Zusammensetzung der Sporenzellwand ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt (Bernard und Latge, 2001). Elektronenmikroskopische Studien haben aber gezeigt, dass sich gewisse Oberflächenmoleküle in den ersten 10-20 µm der Keimlinge zu finden sind, aber nicht auf Hyphen. Dies bedeutet, dass *A. fumigatus* seine Oberfläche während des Auskeimungsvorgangs verändert.

Die Sporen schützen *A. fumigatus* vor schädlichen Umwelteinflüssen. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass *A. fumigatus*-Sporen Pigmente, sogenannte Melanine, besitzen, die zu diesem Schutz beitragen (Langfelder *et al.*, 2003). Die genaue Lokalisation dieses Pigments ist noch nicht genau bestimmt. Man weiss jedoch, dass es Bestandteil der Zellwand ist, welches oft als distinkte und genau abgegrenzte Außenschicht erkannt wird. Einige Melanine werden sogar in Assoziation mit der fibrillären Matrix gefunden, die aus den Zellen einiger Pilze austreten (Langfelder *et al.*, 2003). In der Vergangenheit nahm man an, dass Melanine lediglich als Schutz vor heißen Säuren und Basen, UV-Strahlung und auch extremen Temperaturen dienen (Casadevall *et al.*, 2000). Heute weiß man, dass die Melanin-Synthese auch als einer von mehreren Virulenzfaktoren von *A. fumigatus* angesehen werden kann (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Wheeler und Bell, 1988; Jacobson, 2000; Hamilton und Gomez, 2002; Langfelder *et al.*, 2003). *A. fumigatus*-Sporen produzieren ein blau-grünes Pigment, welches für seine Produktion den Dihydroxynaphtalene (DHN-) Pathway verwendet. Zwei Gene, die an der Biosynthese von Dihydroxynaphtalen-Melanin beteiligt sind, *alb1* (kodiert für eine Polyketid-Synthase) und *arp1* (kodiert für eine Scytalone-Dehydratase), sind kloniert worden (Tsai *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Watanabe *et*

al., 2000). Einige Studien belegen, dass Sporen, die dieses Pigment aufgrund eines Defekts des Polyketide Synthase Gens *pksP* nicht besitzen, eine reduzierte Virulenz im Mausmodell zeigen (Jahn *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998; Langfelder *et al.*, 2003).

1.1.4. Medizinische Relevanz

Insgesamt kennt man etwa 180 in der Umwelt vorkommende *Aspergillus*-Arten (Samson, 1999). Davon ist die Art *Aspergillus fumigatus* für ungefähr 90 % aller *Aspergillus*-Infektionen verantwortlich (Denning, 1998; Latge, 1999).

A. fumigatus ist in der Lage, sowohl Allergien als auch schwere Infektionen auszulösen. Zu den allergischen Erkrankungen, von denen auch immunkompetente Menschen betroffen sein können, gehören Asthma, allergische Sinusitis und die allergische Alveolitis. In diesen Fällen kommt es allerdings nicht zu einer Kolonisierung des Wirtes, und als Therapie reicht oft die Vermeidung des Kontakts mit *A. fumigatus*.

Als wesentlich dramatischer anzusehen sind dagegen die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), das Aspergillom (Pilzball) und die invasive Aspergillose (IA). ABPA ist die schwerwiegendste allergische Lungenkomplikation, die durch *A. fumigatus* verursacht werden kann. Sie tritt meist bei Personen auf, die an atopischem Asthma und cystischer Fibrose leiden (Basich *et al.*, 1981; Krasnick *et al.*, 1995; Kataoka *et al.*, 2002). Das Aspergillom wird aufgrund seiner Erscheinungsform häufig auch als "Pilzball" bezeichnet.

Nach akuten Krankheiten, wie z.B. Tuberkulose, kann es zu einer Infektion und Wucherung von Schimmelpilzmyzel in den krankheitsbedingten Höhlungen des Atemtraktes kommen sowie in den Nasennebenhöhlen, Stirnhöhlen oder anderen Erweiterungen des Atemtraktes. Das Schimmelpilzgeflecht wächst zu einer kugeligen Struktur, hüllt sich in eine Eiweißschicht ein und bildet Sporen an der Oberfläche aus, welche sich weiter verteilen können.

Die ABPA und das Aspergillom treten meist in immunkompetenten Personen auf, wohingegen die IA hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten zu beobachten ist (Denning, 1998).

Das Auftreten invasiver Mykosen hat in den letzten beiden Jahrzehnten erheblich zugenommen (Beck-Sague und Jarvis, 1993; Latge, 1999; Edmond *et al.*, 1999). In Europa sind die klinisch wichtigsten opportunistischen Mykosen *Aspergillus*- und *Candida*-Infektionen. Die Anzahl invasiver-Aspergillose-Patienten vervierfachte sich zwischen 1987 und 1999 (Latge, 1999). Zurückzuführen ist dies auf die steigende Zahl von Patienten mit Immundefizienz, verursacht durch Chemotherapie oder

Infektionskrankheiten wie HIV. Die invasive Aspergillose ist die vorherrschende und schwerste Form der Aspergillosen in immunsupprimierten Patienten (Denning, 1998; Latge, 1999).

Bei der invasiven Aspergillose kommt es – wie auch bei anderen Mykosen – anfangs lediglich zu einem Wachstum des Pilzes innerhalb der Atemwege. Anschließend nimmt die Erkrankung einen invasiven Verlauf, welcher zur Infiltrierung von Parenchymenten, der Penetration von anatomischen Barrieren sowie zur Invasion von Blutgefäßen mit nachfolgender hämatogener Streuung des Erregers führt (Reichard *et al.*, 1995).

1.1.5. Diagnostik und Therapie

Oberstes Gebot einer erfolgreichen Therapie aller *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen ist die frühzeitige Erkennung. Die späte Diagnose einer invasiven Aspergillose ist verbunden mit einer Sterblichkeitsrate von 80 %. Dagegen führt die frühe Diagnose und die rechtzeitige Initiierung einer aktiven Therapie zur Senkung der Sterblichkeitsrate auf 29 % (Herbrecht *et al.*, 2002).

Ein großes Problem ist die Tatsache, dass die meisten Patienten nicht alle Krankheitssymptome aufweisen bzw. sie nicht alle zur selben Zeit erfüllen (Greenberger und Patterson, 1987; Greenberger *et al.*, 1993). Hinzu kommt, dass zuverlässige Nachweisverfahren, gerade für eine invasive Aspergillose, derzeit noch nicht auf dem Markt sind bzw. noch nicht etabliert worden sind. Es existieren zwar einige Tests, wie z.B. ein ELISA-Test zur Bestimmung von Antikörpern gegen Galactomannan der Pilzzellwand sowie ein weiterer Test zum Nachweis von β 1-3 Glucan. Die Anwesenheit von β 1-3 Glucan in der Zellwand von anderen klinisch relevanten Pilzen wie z.B. *Candida albicans*, *Pneumocystis jiroveci* und *Fusarium* sowie das Vorhandensein in anderen Organismen limitiert die Bedeutung des letztgenannten Assays in der spezifischen Diagnose einer Aspergillose (Roilides, 2006).

Ein weiteres Problem bei der Behandlung einer invasiven Aspergillose ist die Tatsache, dass *Aspergillus* zu den Eukaryonten gehört und somit einige Ähnlichkeiten mit den biologischen Prozessen in menschlichen Zellen bestehen. Deshalb sind die meisten Medikamente schädlich, wenn sie für eine längerfristige Therapie eingesetzt werden (Odds *et al.*, 2003). Zurzeit stehen für die Behandlung einer invasiven Aspergillose die zwei Antimykotika Amphotericin B und Itraconazol zur Verfügung.

Das Polyenmakrolid Amphotericin B greift Ergosterol, einem Bestandteil der Pilzzellmembran, an und führt so zu Störungen der Membranfunktion. Bleibt diese Therapie ohne Erfolg, wird häufig auf Itraconazol zurückgegriffen. Die Wirksamkeit ist ähnlich gut wie bei Amphotericin B (Denning *et al.*, 1989).

Itraconazol, ein Triazol mit breiten antifungalen Wirkspektren, hemmt Cytochrom P-450-abhängige Enzyme, verhindert so die Ergosterolsynthese und führt zu Membranfunktionsstörungen der Pilzzelle (Denning *et al.*, 1989). *In vitro* wurden mit Amphotericin B und Itraconazol gute Ergebnisse erzielt, *in vivo* ist jedoch der Erfolg nur sehr gering, was auch die hohe Sterblichkeitsrate von Patienten mit invasiver Aspergillose erklärt (Latge, 1999). Neben den altbekannten Wirkstoffen Amphotericin B oder Itraconazol sind vor kurzem Voriconazol (Azole) und Caspofungin (Kandine) für eine Therapie eingesetzt worden (Jeu *et al.*, 2003). Kandine hemmen die β 1-3 Glucan-Synthase, wodurch die Pilzzellwand nicht vollständig gebildet werden kann.

In den letzten Jahren lag auch der Focus immer mehr auf der Immuntherapie. Erst kürzlich ist es Torosantucci im Tiermodell gelungen, mit Hilfe von Immunisierung mit β -1 3 Glucan der pilzlichen Zellwand, Mäuse vor einer *Aspergillus*-Infektion zu schützen (Torosantucci *et al.*, 2005). Diese Versuche stehen jedoch erst am Anfang und es muss sich zeigen, ob sie sich auf eine erfolgreiche Therapie beim Menschen übertragen lassen.

1.2. Das Immunsystem

Die Aufgabe des menschlichen Immunsystems ist es, eindringende Mikroorganismen zu bekämpfen. Das Immunsystem höherer Vertebraten gliedert sich in zwei Hauptsysteme, die angeborene Immunität („Innate immunity“) und die erworbene Immunität („adaptive immunity“) (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997).

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch verwandt und es existiert wahrscheinlich in allen multizellulären Organismen, wohingegen das erworbene Immunsystem wahrscheinlich 500 Millionen Jahre alt ist und nur in Vertebraten gefunden wird. Diese zwei verschiedenen Arme benutzen zwei sehr unterschiedliche Systeme, um einen Erreger zu bekämpfen. Die angeborene Immunität beruht auf einem Satz von keimbahnkodierten Rezeptoren, die in einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden – insbesondere Effektorzellen wie Makrophagen und Neutrophile – so wie auch Oberflächenepithelzellen, die sich an den physikalischen Barrieren zur Umwelt befinden. Im Gegensatz hierzu verwendet die adaptive Immunantwort ein großes Repertoire von Rezeptoren, die von rekombinierenden Genen codiert werden.

Obwohl die Erforschung der angeborenen Immunität bis ins 19. Jahrhundert zurückreicht, als Elie Metchnikoff seine ersten Beobachtungen an der Phagozytose einer Seesternlarve im Jahre 1884 machte, wissen wir heute noch nicht alles über die molekularen Mechanismen der angeborenen Immunität und über die daran beteiligten Rezeptoren (Medzhitov und Janeway, Jr., 2000b).

1.2.1. Die Phagozytose

Zellen haben eine Reihe an Strategien entwickelt, um Partikel und Flüssigkeiten aufzunehmen. Zu nennen sind die Pinozytose, die Rezeptor-abhängige Endozytose und die Phagozytose (Aderem und Underhill, 1999). Die Phagozytose ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität und nimmt eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung eines Mikroorganismus ein. Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind als professionelle Phagozyten bekannt und sind sehr effizient in der Aufnahme von Partikeln (Aderem und Underhill, 1999). Um zwischen fremd und eigen unterscheiden zu können, haben Makrophagen eine Reihe an Rezeptoren entwickelt, die die konservierten Strukturen eines Erregers erkennen (siehe 2.2) (Aderem und Underhill, 1999). Professionelle Phagozyten haben als Aufgabe, den eingedrungenen Mikroorganismus in einem Membran-gebundenen Kompartiment einzuschließen, das als Phagosom bezeichnet wird. Diese phagozytische Aktivität benötigt die Zusammenlagerung von Aktinmonomeren zu Aktinfilamenten. Diese befinden sich unter der Plasmamembran und sind an der Kontaktstelle mit dem phagozytierten Partikel lokalisiert (Greenberg *et al.*, 1990; Aderem und Underhill, 1999). Neben der Eigenschaft Partikel zu internalisieren, haben Makrophagen und neutrophile Granulozyten bestimmte Granula, die sogenannten Lysosomen. Sie enthalten Enzyme, Proteine und Peptide. Durch das Verschmelzen von Phagosom mit einem oder mehreren Lysosomen entsteht das Phagolysosom. Hier wird der Inhalt des Lysosoms ausgeschüttet und der Erreger kann zerstört werden (Frank und Fries, 1991). Bei der Phagozytose erzeugen professionelle Phagozyten eine Menge an weiteren toxischen Produkten. Zu ihnen gehören Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen (O_2^-) und Stickstoffoxid (NO). Erzeugt werden diese toxischen Produkte u.a. von lysosomalen NADPH-Oxidase während eines Prozesses, den man als respiratorische Entladung („respiratory burst“) bezeichnet (Cooper, 1985).

1.2.2. Einteilung der „Pathogen Recognition Receptors (PRRs)“

Gelingt es einem Krankheitserreger in den Wirtsorganismus einzudringen, wird dieser durch die unmittelbare angeborene Immunreaktion mit Hilfe von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und dem Komplementsystem bekämpft (Aderem und Underhill, 1999). Hierzu muss jedoch der Erreger vom Immunsystem erkannt werden. Die angeborene Immunität verfügt aber nur über eine begrenzte Anzahl an genetisch festgelegten Rezeptoren. Dem steht die sehr heterogene und zahlenmäßig äußerst umfangreiche Gruppe der Krankheitserreger

gegenüber, die zudem meist noch eine hohe Mutationsrate aufweisen. Daher ist ein wichtiges Prinzip der angeborenen Immunität, nicht jedes mögliche Antigen, sondern nur wenige, hoch konservierte Antigenstrukturen zu erkennen (Medzhitov und Janeway, Jr., 2000a). Diese durch den kürzlich geprägten Terminus „pathogenassoziierte molekulare Muster“ („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) bezeichneten Moleküle sind beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA (Aderem und Ulevitch, 2000; Medzhitov und Janeway, Jr., 2000a) und β -Glucan (Schroder *et al.*, 2000). Diese Strukturen sind chemisch sehr unterschiedlich, weisen aber bestimmte Gemeinsamkeiten auf: Sie werden nur von Mikroorganismen und nicht vom Wirt gebildet, sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus und sie kommen bei einer großen Anzahl der Pathogene vor (Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov *et al.*, 2000a). Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die PAMPs erkennen, werden als mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) bezeichnet und werden u.a. auf verschiedenen antigenpräsentierenden Effektorzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert (Janeway, Jr., 1989; Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Zu den derzeit bekanntesten Rezeptoren gehören die Toll like Rezeptoren, die die unterschiedlichsten PAMPs wie z.B. LPS gram negativer Bakterien, Flagellin, Zymosan und virale Erreger erkennen (siehe Abbildung 3). Gordon Brown unterscheidet einmal die „TLR-PRR“ (siehe Tabelle 1) und die „non TLR-PRR“ (Brown, 2006). Die „non TLR“-Rezeptoren, zu denen z.B. die Komplementrezeptoren, Pentraxin und noch viele weitere zählen (siehe Tabelle 1), unterteilt er in drei weitere Kategorien: abhängig von ihrer Lokalisierung in der Zelle, ob sie in Gewebs- oder Serumflüssigkeit vorkommen oder ob sie sich in der Membran oder im Zytoplasma befinden. Diese unterteilt er wiederum abhängig von Struktur und Funktion. In Tabelle 1 sind einige PRR-Rezeptoren aufgeführt. Leukozyten nutzen zellgebundene Rezeptoren, um den Pathogen direkt zu erkennen (nicht opsonisierte Erkennung), und lösliche Rezeptoren für eine indirekt „opsonisierte“ Erkennung. Nach der Erkennung steuern einige PRRs die Aufnahme des Mikroorganismus durch den Aktin-abhängigen Prozess, der Phagozytose (Brown, 2006). Der Mechanismus, den sich solche Rezeptoren wie z.B. die TLR (Doyle *et al.*, 2004; Blander und Medzhitov, 2004), die Mannoserezeptoren (Ezekowitz *et al.*, 1990), die Komplementrezeptoren (Brown, 1991), Scavenger Rezeptoren (Elomaa *et al.*, 1995; Peiser *et al.*, 2000) und Dectin-1 (Herre *et al.*, 2004b) zu eigen machen, scheint sehr speziell zu sein und wurde noch nicht genau charakterisiert (Brown, 2006). Im Folgenden werden einige PRRs, die für die Erkennung von *A. fumigatus* relevant sind, näher beschrieben.

Einleitung

Tabelle 1: Einteilung der „non-TLR Pattern Recognition Receptors“ (modifiziert nach Brown *et al.*, 2006)

Familie	Mitglieder	Einige Mikroorganismen oder PAMPs
Serum oder Gewebsflüssigkeit		
Komplementrezeptoren	C3, C1q	Oberfläche von Mikroorganismen, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Escherischia Coli</i> , HIV
Kollektine	SP-A, SP-D, MBL	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Influenza A Virus</i> , <i>Herpes simplex virus</i> , HIV,
Pentraxin	PTX3, SAP, CRP	Zyosan, <i>C. albicans</i> , LPS
Membran		
Klassische C-Typ-Lektine	Mannose Rezeptor, DC-SIGN, L-SIGN	<i>C. albicans</i> , Zyosan, HIV
Nicht-klassische C-Typ Lektine	Dectin-1	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> ,
Cytoplasma		
NLR	NOD1, NOD 2	Muramyl dipeptide, <i>Shigella flexneri</i>

Abkürzungen: **MBL**= Mannose-bindendes Lektin; **PTX3**= Pentraxin; **SAP**= Serum Amyloid Protein; **CRP**= C-reaktives Protein

1.2.3. Die Toll-like Rezeptoren (TLR)

1.2.3.1. Entdeckung von Toll

Zu den bekanntesten PRRs, welche mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden die angeborene Immunität aktivieren, zählt die Familie der Toll-like Rezeptoren. Entdeckt wurde der Rezeptor Toll 1984 in der Fruchtfliege *Drosophila melongaster*. *Drosophila* Toll wurde als Genprodukt identifiziert, welches die Kontrolle der dorso-ventralen Achse während der Embryogenese steuert (Anderson und Nusslein-Volhard, 1984). Dass es einen Zusammenhang zwischen Toll und der Immunabwehr gibt, erkannte man erst viel später. Durch die Entdeckung von Homologien zwischen dem *Drosophila*-Signalweg und dem IL-1 Signalweg in Säugetieren konnte der Zusammenhang zwischen Toll und dem Immunsystem dieser Fliegen hergestellt werden. Toll und IL1-Rezeptor besitzen eine homologe Domäne, die sogenannte TIR Domäne („Toll IL1-Rezeptor Domäne“). Die Bedeutung von Toll für das Immunsystem der Fruchtfliege wurde mit einer Toll-

mutanten Fruchtfliege bewiesen. Diese starb viel schneller an einer Infektion mit *A. fumigatus* als der Wildtyp (Lemaitre *et al.*, 1996).

1.2.3.2. Toll-like Rezeptoren der Wirbeltiere

Erst dreizehn Jahre später hat man in Wirbeltieren Homologe zu den Toll Proteinen aus *Drosophila* gefunden, die Toll-like Rezeptoren genannt wurden (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Medzhitov und seine Mitarbeiter fanden im Jahre 1997 das erste humane Toll-Homolog, welches später als TLR4 benannt wurde. Er und seine Kollegen zeigten, dass konstitutiv aktive TLR4-Mutanten NFkappaB-abhängige Gene für verschiedene Zytokine und kostimulierende Moleküle aktivieren, und bewiesen so deren Bedeutung für die angeborene Immunität (Medzhitov *et al.*, 1997). Es dauerte aber nicht lange, bis weitere humane Toll-like Rezeptoren identifiziert und deren Homologie zu *Drosophila* Toll und der IL-1 Rezeptor Familie aufgezeigt wurden. Diese TLRs sind transmembrane Proteine mit Leucin-reichen extrazellulären Domänen („leucin-rich repeats“), die wahrscheinlich die Ligandenerkennung vermitteln (Chaudhary *et al.*, 1998; Rock *et al.*, 1998).

Inzwischen wurden 11 Mitglieder der TLR-Rezeptoren in Säugern identifiziert, wobei TLR10 bisher nur im humanen System nachgewiesen werden konnte und TLR11 nur im murinen (Zhang *et al.*, 2004). Jeder dieser Toll-like Rezeptoren bindet spezifisch konservierte Strukturen verschiedener Pathogene (Medzhitov *et al.*, 2000b; Takeda *et al.*, 2003a). Abbildung 3 gibt einen Überblick über einige der bisher identifizierten spezifischen Liganden einiger Toll like Rezeptoren.

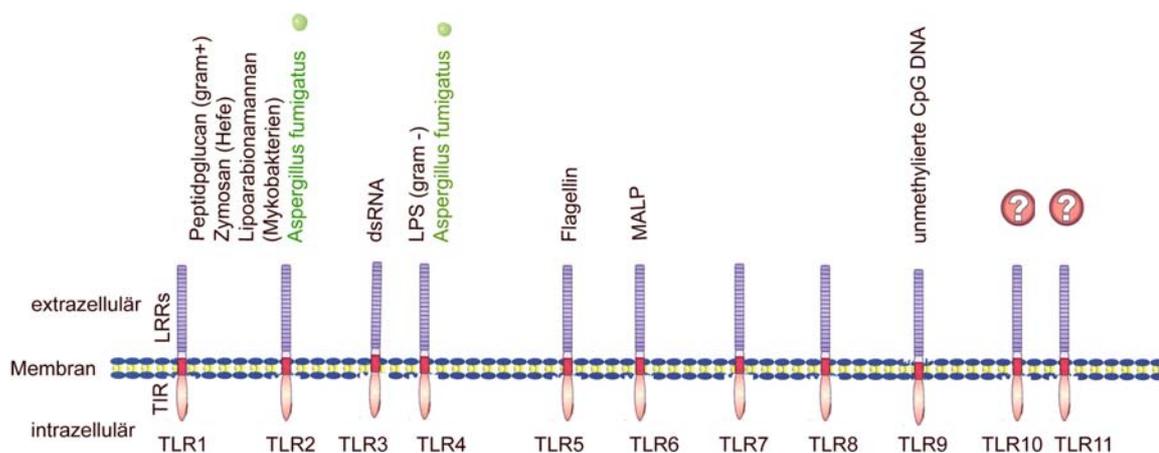


Abbildung 3: Toll-like Rezeptoren 1-11 und ihre Liganden

Eine Vielzahl der durch TLR2 erkannten Strukturen wird unter anderem durch Bildung von Heterodimeren mit anderen Rezeptoren erreicht: So interagiert TLR2 mit TLR6 zur Erkennung von PGN und Zymosan (Ozinsky *et al.*, 2000), während TLR1/TLR2-Heterodimere z.B. löslichen Faktoren aus *N.meningitidis* erkennen (Wyllie *et al.*, 2000)

1.2.3.3. Die MyD88-abhängige Signaltransduktionskaskade

Der Signalweg der Toll-like Rezeptoren wurde zuerst im Zusammenhang mit der Zellstimulation durch IL-1 charakterisiert. Die „klassische“ Signaltransduktionskaskade wurde anhand von TLR4 aufgedeckt und zeigt Ähnlichkeiten mit der Toll-Signalkaskade in *Drosophila* (Medzhitov *et al.*, 1998). In Abbildung 4 ist dieser Weg dargestellt und wird auch im weiteren Textverlauf erläutert. Bei der intrazellulären Signaltransduktionskaskade führen unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen von und durch Proteinkinasen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Transkription der für eine immunologische Antwort wichtigen Gene. Das zentrale Adaptorprotein der meisten TLR ist der „myeloid differentiation factor“ (kurz: MyD88). Dieses lösliche Protein besitzt ebenfalls eine TIR Domäne, die mit der intrazellulären TIR Domäne des TLR assoziiert. Mithilfe der Todesdomäne interagiert das gebundene Adaptorprotein mit einer anderen Todesdomäne in einer Serin/Threonin Kinase, der sogenannten „IL-1R-associated kinase“ (kurz: IRAK) (Muzio *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1998). Diese löst eine Kinase-Aktivierungskaskade aus, wodurch die beiden Kinasen I κ B α und I κ B β aktiviert werden und ein Dimer bilden (I κ B), welches das inhibitorische Protein I κ B phosphoryliert. Dieses Protein ist im Zytosol in einem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B gebunden und hemmt dessen Wirkung, indem es ihn dort festhält. Wird I κ B phosphoryliert, dissoziiert es von diesem Komplex und wird rasch von Proteasomen abgebaut. Nachdem I κ B beseitigt ist, dringt NF κ B in den Zellkern ein und bindet an verschiedene Promotoren. Durch diesen Prozess werden Gene aktiviert, die an der erworbenen Immunantwort und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt sind. Darüber hinaus wird auch das Gen für I κ B aktiviert, sodass das Protein schnell synthetisiert wird und das NF κ B inaktiviert wird (Muzio *et al.*, 2000; Medzhitov *et al.*, 2000b).

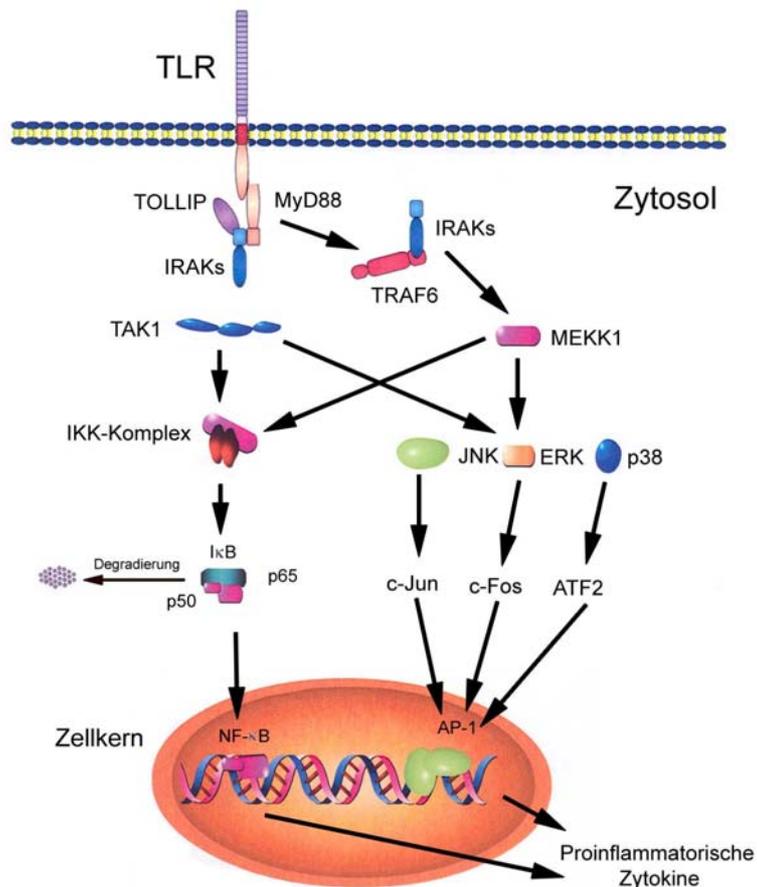


Abbildung 4: MyD88-abhängige Signaltransduktionskaskaden der Toll like Rezeptoren.

1.2.3.4. Die MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskade

Wie schon weiter oben beschrieben, ist der MyD88-abhängige Signalweg essentiell für die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen. In MyD88-defizienten Zellen ist nach der Stimulation der Toll like Rezeptoren keine oder eine nur sehr schwache Aktivierung vorhanden. Es konnte aber gezeigt werden, dass bei einer TLR4-vermittelten Stimulation durch LPS eine zeitverzögerte Aktivierung von NFκB in MyD88-defizienten Zellen möglich ist (Kawai *et al.*, 2001). Dieses macht deutlich, dass es – obwohl die LPS induzierte Produktion von proinflammatorischen Molekülen von MyD88 abhängig ist – noch einen Signalweg geben muss, der im Falle von TLR4 unabhängig von MyD88 eine proinflammatorische Antwort induziert. Der MyD88-unabhängige Signalweg wurde bisher nur für TLR4 und TLR3 beschrieben (Takeda und Akira, 2003b).

1.3. Dectin-1, ein „non-TLR pattern recognition receptor“

Dectin-1 ist ein „non-TLR pattern recognition receptor“ der angeborenen Immunität und wurde 2001 entdeckt (Brown und Gordon, 2001). Dectin-1 erkennt lösliches und partikuläres β 1-3 und/oder β 1-6 Glucan (Brown, G. D. und Gordon, 2001). Diese sind Kohlenhydratpolymere mit immunmodulatorischer Aktivität, die hauptsächlich in der Zellwand von Pilzen, aber auch einiger Pflanzen zu finden sind. Eine kürzlich publizierte Studie belegt, dass Dectin-1 auch bei der Erkennung von Mykobakterien eine Rolle spielt. Die Struktur, die aber in diesem Fall von Dectin-1 erkannt wird, ist noch nicht bekannt (Yadav und Schorey, 2006). Dectin-1 ist ein Typ II Transmembranrezeptor und besitzt die typische Aminosäuresequenz eines C-Typ Lektins (Ariizumi *et al.*, 2000; Willment *et al.*, 2001; Sobanov *et al.*, 2001). Ursprünglich nahm man an, dass Dectin-1 spezifisch auf dendritischen Zellen zu finden sei, woher der Name „**dendritic-cell-associated C-type lectin-1**“ auch stammt (Ariizumi *et al.*, 2000). Heute weiß man jedoch, dass der Rezeptor auf vielen anderen Zelltypen, wie z.B. Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und eine Reihe von T-Zellen, zu finden ist (Taylor *et al.*, 2002). Der Aufbau des Dectin-Rezeptors ist in Abbildung 5 zu sehen. Dectin-1 besitzt eine Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD), welche β -Glucan erkennt. Wie die Erkennung über die CRD stattfindet, ist bis heute noch nicht aufgeklärt (Brown, 2006). Die CRD wird durch eine Stängelregion von der Transmembranregion getrennt, die in zwei Splicevarianten in der Maus und im Menschen vorkommt (Brown, 2006).

Dectin-1 besitzt eine dem „Tyrosine-based Activation Motif“ ITAM-ähnliche Region, die die Aminosäuresequenz YXXL enthält (Aderem *et al.*, 1999). Dieses ITAM Motiv kann phosphoryliert werden und eine eigene intrazelluläre Signalkaskade auslösen (Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005). Der Dectin-1-Rezeptor ist das erste Beispiel eines „non-TLR“, der seine eigene intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslösen kann. Nach der Bindung von β 1-3 Glucan, wie z.B. Zymosan, ist Dectin-1 in der Lage, die Produktion verschiedenster Zytokine und Chemokine freizusetzen, eingeschlossen Tumornekrosefaktor (TNF), „macrophage inflammatory protein 2“ (MIP2), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 12 (IL-12) (Ariizumi *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002; Gantner *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005). Er kann ebenfalls die respiratorische Entladung („respiratory burst“) auslösen (Gantner *et al.*, 2003; Underhill *et al.*, 2005) und die Aufnahme von Partikeln durch Phagozytose vermitteln (Herre *et al.*, 2004b; Underhill *et al.*, 2005)

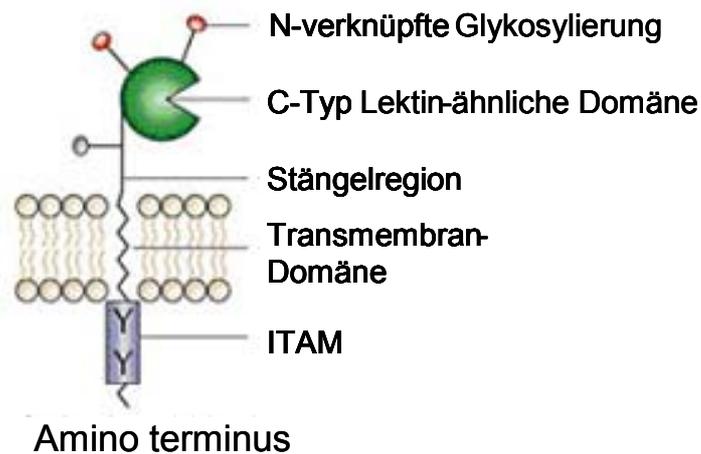


Abbildung 5: Struktur des Dectin-1 Rezeptors. Dectin-1 ist ein Typ II Transmembran-NK-Zell-Rezeptor mit einer einzigen extrazellulären C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne (Kohlenhydraterkennungsdomäne). Diese CRD wird durch eine Stängelregion von der Transmembranregion getrennt, welche in zwei funktionellen Isoformen im Menschen und wahrscheinlich auch in der Maus vorkommt. Der cytoplasmatische Teil des Dectin-1 enthält ein „Immunoreceptor tyrosine based“ ITAM-ähnliches Motiv, welches den intrazellulären Signalweg steuert (Brown, 2006).

1.3.1. Syk-abhängiger Signalweg von Dectin-1

Der Signalweg von Dectin-1 ist, wie bereits erwähnt, abhängig von dem ITAM-ähnlichen Motiv, welches auch in anderen Rezeptoren, wie z.B. DAP12 (Lanier *et al.*, 1998), FC Rezeptoren (Van den Herik-Oudijk *et al.*, 1995) und Lymphozyten Antigen-Rezeptor Komplexen (Pitcher und van Oers, 2003) zu finden ist. Die traditionellen ITAM-Sequenzen bestehen aus Tandem-Wiederholungen von YXXI/L Sequenzen (wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt; Y= Tyrosin; I = Isoleucin und L= Leucin) welche – wenn es zur Ligandenbindung und zur Rezeptorzusammenlagerung kommt – durch Src-Kinasen Tyrosin-phosphoryliert werden. Dies führt zur Aktivierung der „Spleen Tyrosinkinase“ (SYK) und zur Initiierung einer Signaltransduktionskaskade, die die Aktivierung von Zellen einleitet (u.a. Phagozytose) (Turner *et al.*, 1995). Die Abhängigkeit von Syk für die Funktion von Dectin-1 ist limitiert und Zelltyp-spezifisch. In Makrophagen ist gezeigt worden, dass Syk für die respiratorische Entladung („respiratory burst“) benötigt wird (Underhill *et al.*, 2005). In dendritischen Zellen hingegen hat Syk einen Einfluss auf die Phagozytose und ist essentiell für die Produktion von IL-2 und IL10 (Rogers *et al.*, 2005).

Obwohl der cytoplasmatische Teil von Dectin-1 im Zuge der Ligandenbindung Tyrosin-phosphoryliert wird, variiert die Sequenz der ersten distal gelegenen amino-terminalen

Membran-Wiederholung von dem traditionellen ITAM-Motiv (YXXXI in der Maus ; YXXXL im Menschen). Normalerweise werden zwei Phosphotyrosinreste benötigt, um eine Interaktion mit SYK zu ermöglichen. Unerwarteterweise reicht die Phosphorylierung des einen ITAM-Motivs aus, um eine Interaktion mit SYK zu ermöglichen (Underhill *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass es einen neuen und noch unbekanntem Signalweg der angeborenen Immunität geben muss, der möglicherweise auch von anderen PRR genutzt wird, die ähnliche einfache cytoplasmatische Wiederholungssequenzen besitzen wie sie auch bei vielen Mitgliedern der C-Typ Lektine gefunden werden (Cambi und Figdor, 2003).

1.3.2. Syk- unabhängiger (MyD88-abhängiger) Signalweg von Dectin-1

Es gibt einige Hinweise darauf, dass es, ausgehend von Dectin-1, einen Syk-unabhängigen Signalweg geben muss (Brown, 2006). Es wird angenommen, dass hierfür eine Zusammenarbeit mit TLR2 erforderlich ist. Mit Hilfe von Syk -/- Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die von Dectin-1 gesteuerte Produktion von TNF α und IL12, Syk- unabhängig ist. Dies wurde auch für dendritische Zellen erkannt (Rogers *et al.*, 2006). Wie allerdings der Dectin-1- und der TLR2-Signalweg miteinander zusammenarbeiten, ist bisher noch ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass Dectin-1 mit einer Kinaserekrutierung und einer daraus resultierenden TLR2 Phosphorylierung und Aktivierung beteiligt ist (Arbibe *et al.*, 2000).

1.4. Eliminierung von *A. fumigatus* mit Hilfe der angeborenen Immunität

Jeder Mensch atmet pro Tag mindestens einige hundert *Aspergillus*-Sporen ein (Hospenthal *et al.*, 1998). Die nicht-spezifische oder angeborene Immunität spielt bei der Abwehr des Wirtes gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* die größte Rolle. Die natürliche Immunität besitzt drei Abwehrlinien gegen *A. fumigatus*. Die anatomischen Barrieren bilden die erste Linie. Bleibt diese Abwehr erfolglos, kommen die humoralen Faktoren und die phagozytierenden Zellen zum Einsatz (Schaffner *et al.*, 1982).

Bei der anatomischen Barriere werden *A. fumigatus*-Sporen, die eingeatmet werden, mit Hilfe der Zilien des mucosalen Epitheliums (Flimmerepithel) aus den Atemwegen entfernt (siehe Abbildung 6). *A. fumigatus* hat jedoch einen Mechanismus entwickelt, mit dem er diese Barriere überwinden kann. Er ist in der Lage, toxische Moleküle zu produzieren, wie z.B das Gliotoxin oder Proteasen, die das Epithel angreifen (Robinson *et al.*, 1990; Amitani *et al.*, 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sporen von

Epithel- und Endothelzellen aufgenommen werden und diese selbst einen Infektionsherd darstellen können (DeHart *et al.*, 1997; Thurston *et al.*, 1979).

Gelangen die Sporen jedoch in die Lunge, so bilden Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten nach den anatomischen Barrieren zwei unabhängige Verteidigungslinien gegen eine *A. fumigatus*-Infektion (Schneemann und Schaffner, 1999). Mit Hilfe der Alveolarzelllinie MH-S konnte gezeigt werden, dass *A. fumigatus*-Sporen phagozytiert und abgetötet werden können, aber einige Sporen auch in der Lage sind, intrazellulär auszukeimen (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Neutrophile Granulozyten sind ebenfalls in der Lage, Sporen aufzunehmen und abzutöten, falls diese dem Makrophagenangriff entgangen sind (Sturtevant und Latge, 1992). Ihre Hauptaufgabe besteht allerdings in der Bekämpfung von Pilzhyphen, welche für eine Phagozytose zu groß sind. Dabei führt ein Angriff aus ROS kombiniert mit der Entleerung von Granulaeinheiten zur Schädigung der Pilzhyphen (Levitz *et al.*, 1986).

Die Erkennung von *A. fumigatus* in murinen Makrophagen erfolgt durch die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 (Meier *et al.*, 2003). Die Signaltransduktionskaskade, die ausgelöst wird, resultiert unter anderem in einer Zytokin-Produktion, die der Verteidigung gegen den eingedrungenen Organismus dient. Einige erst kürzlich veröffentlichte Studien haben bewiesen, dass die TLRs nicht die einzigen PRRs sind, die bei der Erkennung und Phagozytose von *A. fumigatus* und anderen Pilzen eine Rolle spielen. Es wurde auch gezeigt, dass der dendritische-Zell-spezifische intrazelluläre „adhesion molecule- 3-grabbing nonintegrin“-Rezeptor (DC-SIGN) die Bindung und Internalisierung von *A. fumigatus*-Sporen durch dendritische Zellen steuert. DC-SIGN ist ein TypII C-Typ Lektin und die Bindung von *A. fumigatus*-Sporen kann durch *A. fumigatus* Galactomannan- und Mannanpräparationen aus anderen Pilzen blockiert werden (Serrano-Gomez *et al.*, 2004). Einige Studien belegen jedoch, dass Dectin-1 eine ganz entscheidende, wenn nicht sogar die wichtigste Rolle bei der Bindung, Erkennung und Internalisierung von Pilzen (Brown, 2006) und möglicherweise auch von *A. fumigatus* spielt. Dabei erkennt der Rezeptor β 1-3 Glucan der pilzlichen Zellwand (Herre *et al.*, 2004a):

Die Veränderung der Oberfläche (siehe 1.3), die zwangsläufig mit der Auskeimung einer Spore verbunden ist, stellt ein Problem bei der Erkennung durch die angeborene Immunität dar. Es wird auch vermutet, dass *A. fumigatus* durch seine hydrophobe Hülle eine Strategie entwickelt hat, dem Immunsystem zu „entkommen“ (Brown, 2006).

Neben diesen „direkten“ Erkennungs- und Eliminierungsmechanismen gibt es noch eine Reihe „indirekter“. Eine indirekte Erkennung körperfremder Bestandteile funktioniert in der Regel über Opsonisierung. So wurde z.B. gezeigt, dass Surfactant Proteine eine Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen spielen (Reid, 1998). So bindet SP-D und SP-A

Einleitung

an *A. fumigatus*-Sporen (Allen *et al.*, 1999) und steigert damit deren Phagozytose sowie die Abtötung durch Leukozyten und alveolare Makrophagen (Mason *et al.*, 1998).

Pentraxin-3 (PTX3) ist ein löslicher PRR, der an Galaktomannan auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Sporen bindet. PTX-Bindung resultiert in einer verstärkten Phagozytoserate durch Alveolarmakrophagen und es zeigte sich, dass PTX-defiziente Mäuse sehr anfällig für eine *A. fumigatus*-Infektion sind (Garlanda *et al.*, 2002).

In weiteren Studien wurden die humoralen Komponenten, also die Wechselwirkung von Komponenten aus dem Serum mit *A. fumigatus*, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer invasiven Aspergillose die Konzentration an Fibrinogen im Serum, das *A. fumigatus* binden kann, ansteigt. Die genaue Rolle dieses Moleküls bei der Invasion ist allerdings noch nicht geklärt (Tronchin *et al.*, 1995; Caillot *et al.*, 1997). Das C-reaktive Protein, ein Akute-Phase-Protein, das die Komplementkaskade auszulösen vermag, kann *A. fumigatus* binden. Wahrscheinlich besitzen die verschiedenen *A. fumigatus*-Germinationsstadien unterschiedliche Mechanismen, um die Komplementkaskade auszulösen. Dies ist allerdings bisher nicht im Detail untersucht worden.

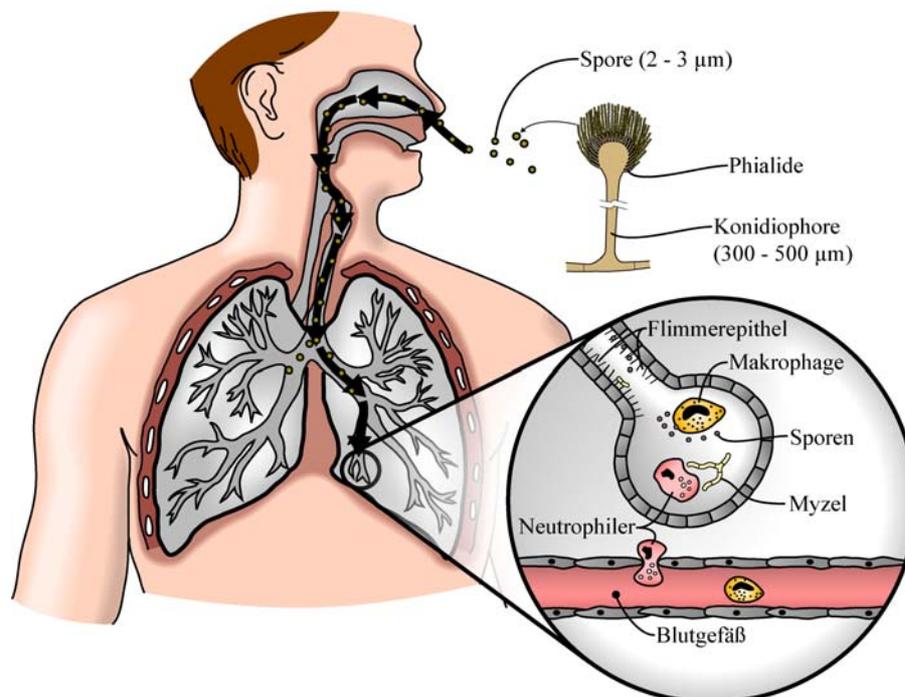


Abbildung 6: Infektionsweg von *A. fumigatus*-Sporen (Schwienbacher 2004).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die angeborene Immunität spielt bei der schnellen Erkennung und Eliminierung von *A. fumigatus* eine zentrale Rolle. Wie bereits erwähnt, ist die Phagozytose ein initialer Schritt bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Aus diesem Grund war das wichtigste Ziel dieser Arbeit, die Interaktionen von murinen und humanen Makrophagen mit *A. fumigatus* genauer zu untersuchen.

Um die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zu analysieren, musste eine Methode etabliert werden, die die Quantifizierung der Phagozytose ermöglicht. Des Weiteren sollte die Oberfläche der *A. fumigatus*-Sporen analysiert werden und es sollte gezeigt werden, welche Moleküle (seitens des Erregers) und welche Rezeptoren (seitens des Wirtes) für eine erfolgreiche Phagozytose benötigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien im Reinheitsgrad zur Analyse „p.a.“ bzw. „reinst“ der Firmen Biomol, BioRad, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco, ICN, Biomedicals, Merck, Roth, Serva und Sigma verwendet.

2.2. Gerätenachweis

CO ₂ -Brutschrank	Nunc
Drehrad	Bachofer
Densitometer GS 800	BioRad
Digitalkamera	Kodak
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser II
ELISA Reader	Tecan, Tecan Sunrise Reader
French-Press	SLM-Aminco
Gelkammer	BioRad, Mini Protean2
Kühlgerät	Thermo Haake
Luminometer	(Berthold Technologies)
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001 K
Mikrobiologische Brutschränke	Heraeus, function line
Mikroskope	
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM LB
Konfokales Lasermikroskop	Leica, TCS NT
Live Cell Mikroskop	Nicon Eclipse TE300 Lichtmikroskop
Mikrowelle	Privileg
Massenspektrometer	Applied Biosystems, QStarXL
PCR Geräte	Biometra, T Gradient Biometra, Personal Cycler
pH-Meßgerät	Mettler, Toledo 320
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Schüttler	GFL, 3014
Schüttelinkubator	B.Braun Biotech, Certomat HK
Spannungsquelle	BioRad, Power pac 1000
Sterilbank	Heraeus, Hera safe

Material und Methoden

SpeedVac	Savant, Speed Vac Concentrator
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschall	Labsonic M, Braun
Ultraschallbad	Sonorex RK 100H, Bandelin
Ultrazentrifuge	Du Pont Instruments, Sorvall Optima LE-80, Beckman Coulter Optima TL, Beckman Coulter
Vortexer	Scientific Instruments
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Sigma 1-13, 1K15, 6K15 Heraeus, Megafuge 1.0R Roth, Micro Centrifuge

2.3. Verwendete *Aspergillus*-Stämme, Mausstämme und Zelllinien

2.3.1 *Aspergillus*-Stämme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus*- Stämme.

Wildtyp-Stamm	American Typ Culture Collection	Bezugsquelle
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 46645	Stämme wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 737	
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826	
<i>Aspergillus giganteus</i>	DSM 1146	
<i>Aspergillus nidluans</i>	DSM 820	
<i>Aspergillus oryzae</i>	DSM 1862	
<i>Aspergillus flavus</i>	Stammsammlung des MvP	
<i>pksP</i> -Mutante <i>Aspergillus fumigatus</i>		Axel Brakhage, Hannover
<i>Rod A</i> -Mutante		Sophie Paris, Institut Pasteur, Paris

2.3.2. Mausstämme

Tabelle 3: Mausstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zelllinien	Alter	Bezugsquelle
C3H/HeN	10 Wochen	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)
C3H/HeJ	10-12 Wochen	Carsten Kirschning, TU München
C3H/HeN/TLR2-/-	10-12 Wochen	Carsten Kirschning, TU München
C3H/HeJ/TLR2-/-	10-12 Wochen	Carsten Kirschning, TU München
C57BL6	10-12 Wochen	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)
C57BL6/TLR2-/-	10-12 Wochen	Carsten Kirschning, TU München
C57BL6/MyD88-	10-12 Wochen	Carsten Kirschning, TU München
C57BL6 Syk+	10-12 Wochen	Barbara Walzog, LMU München
C57BL6 Syk-	10-12 Wochen	Barbara Walzog, LMU München

2.3.3. Primäre Zellkulturen

In dieser Arbeit wurden humane und murine Primärzellen verwendet. Zum einen humane Makrophagen, die aus peripheren Blutlymphozyten (PBLC) ausdifferenziert wurden. Das Blut stammte von gesunden freiwilligen Spendern. Zum anderen wurden murine Peritonealmakrophagen, die aus Peritoneallavage gewonnen wurden (siehe 2.10.1), und Alveolarmakrophagen (siehe 2.10.4) benutzt.

2.3.4. Zelllinien

Tabelle 4: Murine und humanen Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zelllinien	Stammnummer	Bezugsquelle
P3-X63-Ag8.653 („Ag8“) Murine Myelomzelllinie	ATCC TIB-132	DSMZ, Braunschweig
J 774.A1 („J 774“) Murine Makrophagen	ATCC TIB-67	DSMZ, Braunschweig
MH-S Murine Alveolarmakrophagen	ATCC CRL-2019	DSMZ, Braunschweig
HEK293	ATCC CRL-1573	Carsten Kirschning, TU München
A 549 Humane Lungenepithelzellen	ATCC CCL-185	Dr. Sven Hammerschmidt, Braunschweig

2.4. Oligonukleotide

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) bezogen.

Name	Sequenz (5' - 3')
Hydrophobin B 5' (Rod B)	ATG AAG TTC CTC GCT GTT GT
Hydrophobin B 3' (Rod B)	TTA GAT GAT AGA GTC GAG AG
Hydrophobin B 5' (Rod B) mit Sal- Schnittstelle (mit Introns)	TTT GTC GAC ATG AAG TTC CTC GCT GTT GT
Hydrophobin B 3' (Rod B) mit Nod- Schnittstelle (mit Introns)	TTT TGC GGC CGC TTA GAT GAT AGA GTC GAG AG
Hydrophobin B 5' (Rod B) mit Sal- Schnittstelle	TTT GTC GAC GGT GTC GTC CAC CCT ACC TTC
Hydrophobin B 3' (Rod B) mit Nod- Schnittstelle	TTT TGC GGC CGC CGG TGA CGG AGA TCT TCT GGC

2.5. Expressionsvektoren

Tabelle 6: Verwendete Expressionsvektoren.

Name	Insert, Eigenschaften	Bezugsquelle
pQE30	Expressionsvektor, N-terminaler (His) ₆ , Amp ^R	Qiagen, Hilden, Deutschland
pTLR2	TLR2 Gen im Expressionsvektor pFlag CMV-1 Amp ^R	Carsten Kirschning, TU München
pDectin-1	Dectin-1-V5-(His)	David Underhill, Universität of Washington, USA
pEGFP 1	Klonierungsvektor mit EGFP	Clontech, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

2.6. Beads

Tabelle 7: Beads, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Eingesetzte Menge	Bezugsquelle
BSA-Beads (4µm)	1 x 10 ⁷	Molecular Probes, Karlsruhe
Polystyrene Microspheres	1 x 10 ⁷	Polysciences, Eppelheim

2.7. Antikörper

2.7.1. Primäre Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
α-RGS-His	1:1000	Qiagen, Hilden
Maus α Human Py99 (anti-Phosphotyrosin)	1:100	Dr. Stefan Linder, München
V5-Antikörper	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
Myosin-X	1:100	Santa Cruz, Sarstedt
Lamp-1	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
α- <i>Aspergillus</i> (Kaninch.)	1:100	Dr. Bouchara, Paris

Material und Methoden

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
Dectin-1 Klon 2A11 (Ratte)	1:100	HyCult Biotechnology, Niederlande
Dectin-1 (Ziege)	1:100	R&D Systems, Wiesbaden
α - TLR2 T2.5	25-50 μ g/ml	Dr. Stefan Linder, München
2G8 (α β 1-3 Glucan((Maus)	1:100	Torosantucci, Italien
Isotyp Kontrolle Ratte IgG _{2B}	1:10	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp Kontrolle Maus IgG ₁	1:10	Becton Dickinson, Heidelberg
CD11c	1:100	Dr. Reinhard Hoffmann, München
α -Phospho-Syk (Kaninchen)	1:100	Cell Signalling Technologies, Waldbronn
α -Phospho-Src (Kaninchen)	1:100	Cell Signalling Technologies, Waldbronn
α – mouse F4/80 PE/TR	1:100	Caltag, Hamburg
α – mouse Ly-6G (1A8) (FITC-gelabelt)	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg

2.7.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege α Maus Cy3	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen Cy3	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen Cy5	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus Alkalische Phosphatase	1:100	Dianova, Hamburg
Rat α Maus Cy 3	1:100	Dr. Reinhard Hoffmann, München

2.7.3. Fluoreszenzmarkierte Moleküle

Tabelle 10: Fluoreszenzmarkierte Moleküle, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Verdünnung/Endkonzentration	Bezugsquelle
Phalloidin Rhodamin	1:100	Dianova
Phalloidin FITC	1:100	Dianova
Calcofluor	1:80	Sigma
Avidin-Cy3	1:100	Dianova
Avidin-FITC	1:100	Dianova
Concanavalin A	1:100	Molecular Probes
Phycoerythrin (PE)	1:100	Dr. Reinhard Hoffmann, Max von Pettenkofer-Institut, München
Zymosan	1 x 10 ⁶	Molecular Probes
Lysotracker	1:100	Molecular Probes

2.8. Inhibitoren

Tabelle 11: Inhibitoren, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Name	Bezugsquelle
Cytochalasin D	Sigma
Wortmannin	Sigma
Genistein	Sigma
Nocodazol	Sigma
Amiloride	Sigma
Laminarin	Sigma
PP2	Calbiochem
C3-ähnliches Exoenzym EDIN (<i>S.aureus</i>)	Dr. Reinhard Hoffmann, Max von Pettenkofer-Institut, München
Glucanase	Sigma
Orthovanadate	Sigma
Piceatannol	Sigma

2.9. Mikrobiologische Methoden

2.9.1. Kultivierung und Ernte der *Aspergillus*-Stämme

Kultivierung der *Aspergillus*-Stämme:

Die Kultivierung der *Aspergillus*-Stämme erfolgte auf Potato-Dextrose-Agar (Difco) bzw. auf Sabourau-Dextrose-Agar (Difco) mit folgender Zusammensetzung:

<u>Potato-Dextrose-Agar:</u>	200 g Kartoffelmehl
	20 g Bacto Dextrose
	15 g Bacto Agar
	<hr/>
	ad 1 l dest. H ₂ O

<u>Sabouraud-Dextrose-Agar:</u>	20 g Neopepton
	40 g Dextrose
	15 g Agar
	<hr/>
	ad 1 l dest. H ₂ O

Die Medien wurden bei 121 °C, 3 bar, 20 min autoklaviert und jeweils 100 ml in Zellkulturflaschen (Nunc Brand Products) mit 175 cm³ Kulturfläche gefüllt. Für die Kultivierung des *A. fumigatus* GFP-Stammes wurde dem Medium noch 100 µg/ml Hygromycin B zugefügt, um eine stabile GFP-Expression zu gewährleisten. Die Nährmedien wurden durch die Verdünnung einer Sporen-Stammesuspension im Verhältnis 1:100 in H₂O beimpft. Von dieser Impflösung wurden 100 µl auf den Agar pipettiert und mit Hilfe von sterilen Glasperlen (Sigma, Ø 4 mm) unter intensivem Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 5-7 Tage. Nachdem sich auf dem Agar ein dichtes, stark sporulierendes Myzel gebildet hatte (die sich als eine samtige Oberfläche mit grüner bis schwarzer Färbung zeigt), wurden die Sporen entweder sofort geerntet (siehe 2.9.1.2.) oder die Flaschen bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

2.9.2. Kultivierung in Flüssigmedien

Für die Anzucht von auskeimenden Sporen wurden folgende Medien verwendet:

<u>Aspergillus Minimal Medium (AMM):</u>	20 ml Salzlösung (nach Cove66) 1 % Glukose 20 mM Ammonium-D-Tartrat
	<hr/> ad 1 l dest. H ₂ O, pH 6,5
<u>Salzlösung (50x):</u>	26 g KCl 26 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 76 g KH ₂ PO ₄ 50 ml Spurenelementlösung
	<hr/> ad 1 l dest. dest. H ₂ O + 1,5 ml Chloroform
<u>Spurenelementlösung (Cove 1966):</u>	40 mg Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O 400 mg CuSO ₄ · 5 H ₂ O 800 mg FePO ₄ · H ₂ O 800 mg MnSO ₄ · 4 H ₂ O 800 mg Na ₂ Mo ₄ · 2 H ₂ O 8000 mg ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
	<hr/> ad 1 l dest. dest. H ₂ O
<u>Hefe-Glukose-Medium (YG_{dial}):</u>	5 g Hefeextrakt 20 g Glukose
	<hr/> ad 1000 ml dest. H ₂ O (Dialyse erfolgte ÜN mit einer Ausschluss- porengröße von 6000-8000 Da; Dialyseschlauch: Spectrum; Spectra/ Por Membrane)

2.9.3. Ernte der Sporen

Zur Ernte wurden pro Flasche 10 ml 0,1 % Tween20 in H₂O auf die Sporen pipettiert. Durch intensives Hin- und Herschwenken und Zugabe steriler Glasperlen wurden die Sporen vom Myzel gelöst. Je nach Bedarf wurde der Vorgang 2-3 mal wiederholt, bis das weiße Myzel sichtbar wurde.

Plastik-Trichter wurden mit einer Lage Miracloth- Filterpapier (Calbiochem) ausgekleidet und autoklaviert. Die Sporensuspension wurde durch das Filterpapier filtriert, um etwaige Myzel- und Agarstücke zu entfernen. Durch Zentrifugation der Sporensuspension für 10min bei 9000xg wurden die Sporen sedimentiert und in 15 ml PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 9000 xg für 5min wurden die Sporen in sterilem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Sporen-Stammsuspension erfolgte in „Falcon“-Röhrchen (Becton Dickinson) bei 4 °C im Kühlschrank.

2.9.4. Bestimmung der Sporenzahl

Nach der Ernte wurde die Sporenzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde aus der Sporen-Stammsuspension eine 1:1000 Verdünnung in sterilem Wasser hergestellt und eine kleine Menge davon in die Zählkammer eingebracht. Es wurden jeweils 5 Gruppenquadrate ausgezählt.

Die Zahl der Sporen pro Milliliter errechnet sich nach folgender Formel:

$\text{Sporen/ml: (Mittelwert aus 4x Großquadrate) } \times 10^4 \times 10^3$

2.9.5. Analyse der Sporenauskeimung

Um die Auskeimung von *A. fumigatus* WT-Sporen und biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen zu vergleichen, wurden 500 µl des AMM Mediums (siehe 2.9.1.1) mit 2×10^7 der jeweiligen *A. fumigatus*-Sporen beimpft und bei 180 rpm bei 37 °C geschüttelt. Über einen Zeitraum von 24 h wurden jeweils 20 µl der Proben herausgenommen, auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen. Es wurden die Zeitpunkte nach 3, 6, 9 und 24 h betrachtet, indem jeweils 120 Sporenmorphotypen mittels eines Mikroskops ausgezählt wurden.

2.9.6. Biotinylierung von Sporen

<u>PBS:</u>	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	<hr/> Ad 1 l dest. H ₂ O

Biotinylierungspuffer: 50 mM NaHCO₃ pH 8.5

Sulfo-NHS-LC-Biotin 25 mg/ml gelöst in Methanol

Für die Biotinylierung der Sporen wurden diese zunächst 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sporen (ungefähr 1×10^8) für 2 h bei 4 °C mit 1 mg ml^{-1} Sulfo-NHS-LC-Biotin (Molecular Probes) im Biotinylierungspuffer (500 µl) inkubiert. Um das überschüssige Sulfo-NHS-LC-Biotin zu blockieren, wurde 1 ml 100 mM Tris-HCL pH 8.0 hinzugegeben und anschließend für weitere 40 min bei 4 °C inkubiert.

2.10. Zellbiologische Methoden

2.10.1. Isolierung von Peritonealmakrophagen

Die Mäuse wurden durch Begasung mit CO₂ getötet. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Maus mit Kanülen auf einem Styroporbrett. Das Fell über der Bauchdecke wurde vorsichtig abpräpariert. Mit einer feinen Kanüle (0,45 µm) wurden 4 ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle injiziert und diese anschließend vorsichtig massiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben, und mit einer feinen Präparierschere wurde ein kleines Loch geschnitten, durch das mit einer sterilen Pasteurpipette die Zellsuspension aus der Bauchhöhle abgezogen werden konnte. Anschließend wurde die Bauchhöhle 3 x mit 4 ml PBS gespült. Die Makrophagen einer Maus wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen auf sterile Glasplättchen ausplattiert und in RPMI-Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.10.2. Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand

Für die Ausdifferenzierung von Knochenmarksmakrophagen wurden die Zellen mit M-CSF stimuliert. Dafür wurden LC 292 Zellen in Kultur genommen und auf fünf Zellkulturflaschen verteilt. Nachdem die Zellen zu ca. 50 % konfluent waren, wurde alle zwei Tage der Überstand gesammelt und frisches Medium auf die Zellen gegeben, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Der gesammelte Überstand wurde zuerst durch einen Faltenfilter, danach durch eine 0,2 µM Sterilfiltermembran filtriert und Aliquots zu 50 ml bei -20 °C eingefroren. Zur Ausdifferenzierung der Makrophagen wurde D-MEM mit 10 % Überstand frisch angesetzt.

2.10.3. Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen

Eine 6-10 Wochen alte Maus wurde mittels CO₂ getötet. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Maus mit Kanülen auf einem Styroporbrett. Das Fell wurde entlang der Hinterläufe mit einer Pinzette angehoben, aufgeschnitten und entfernt. Der Muskelmantel des Oberschenkels wurde an den Ansätzen ober- und unterhalb des Femur sorgfältig mit dem Skalpell abgetrennt. Nachdem der Femur vollständig vom Muskelmantel befreit war, wurde der Knochen kurz vor dem Ansatz des Hüftgelenks und des Kniegelenks mit einer Schere durchtrennt und in eine Petrischale gelegt. Nun wurde das Knochenmark mit einer Spritze mit Kanülen mit PBS aus den Femura in eine zweite Petrischale herausgespült. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und kultiviert. Die Knochenmarkszellen aus einer Maus wurden in 10 ml D-MEM aufgenommen, das zuvor mit dem Kulturüberstand von L929-Zellen angereichert wurde. Bei der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 10 cm Petrischale adhärierte ein Teil der Zellen. Am nächsten Tag wurden die nichtadhärenten Zellen durch mehrfaches pipettieren abgespült und gezählt. Die Zellen wurden mit frischem angereichertem D-MEM verdünnt und mit 1×10^6 Zellen pro well (6-well-Platte) oder $2,5 \times 10^5$ Zellen pro well (24-well-Platte) ausgesät. Fünf Tage nach der Knochenmarksentnahme wurde ein Volumen frisches angereichertes Medium zu den Zellen gegeben. Acht Tage nach der Knochenmarksentnahme sind die Makrophagen ausdifferenziert.

2.10.4. Isolierung und Kultivierung von Alveolarmakrophagen

Eine 6-10 Wochen alte Maus wurde mittels CO₂ getötet. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Maus mit Kanülen auf einem Styroporbrett. Die Bauchhaut wurde

aufgeschnitten und das Fell bis zum Rippenbogen entfernt. Anschließend wurde das Brustbein ventral angehoben und vorsichtig das Zwerchfell mit einer Schere durchstoßen, sodass Luft einströmen konnte. Nach 1 min Wartezeit kollabierte die Lunge in Richtung Rücken. Nun konnte der Brustkorb aufgeschnitten werden ohne dabei Gefahr zu laufen, die Lunge zu beschädigen. Die ventrale Seite der Lunge war jetzt frei zugänglich. Im nächsten Schritt wurden der Thymus und das überschüssige Gewebe oberhalb der Trachea entfernt.

Anschließend wurde ein Faden unterhalb der Trachea eingefädelt und ein loser Knoten gemacht. Mit einer Schere wurde in die Trachea vorsichtig eingeschnitten.

Ein Katheter wurde ungefähr 1 cm von der Spitze aus markiert. Die Trachea wurde mit einer Pinzette fixiert, der Katheter wurde bis zur Markierung durch die Schlinge eingeführt und durch den Knoten fest fixiert. Nun wurde die Vena Cava durchtrennt und es wurden 5-10 ml PBS ins Herz injiziert, um das Blut zu entfernen. Die Flüssigkeit sollte im Peritonealraum erscheinen und die Lunge durch die Spülung möglichst vollständig weiß verfärben. Die restliche Flüssigkeit wurde im Mediastinalraum mit Hilfe eines Tupfers entfernt, um ein eventuell während der Lavage auftretendes Leck des Zwerchfells zu erkennen. Jetzt konnte die eigentliche bronchoalveolare Lavage mit 0.6 ml PBS durchgeführt werden. Dieses Volumen wurde durch den Katheter injiziert. Nach einer Wartezeit von 1 min wurde die Flüssigkeit wieder abgezogen und in ein steriles Röhrchen überführt. Dieser Warteschritt wurde 19 x wiederholt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, gezählt und kultiviert (siehe 2.10.8).

2.10.5. Isolierung und Kultivierung der humanen Primärmakrophagen

Die Isolierung der humanen Primärmakrophagen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Linder am „Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten“ der LMU in München. Periphere humane Blutleukozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Zentrifugation im Ficoll (Biochrom) Dichtegradienten gewonnen. Aus dieser Zellpopulation wurden Monozyten mit Hilfe magnetischer α -CD14 Beads und einer MS+ Säule (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert und auf Cellocate Deckgläschen (Eppendorf) ausgesät.

Die Differenzierung der Monozyten zu humanen Primärmakrophagen erfolgte in RPMI 1640 Medium (Gibco), das mit 20 % autologem Serum supplementiert war.

2.10.6. Isolierung muriner neutrophiler GranulozytenCasein-Lösung:

9 g Casein
100 ml heißes 1x PBS
zum kochen bringen

1 h autoklavieren bei 125 °C
(Lagerung höchstens 1-2 Wochen
bei 4 °C)

Die Casein-Lösung erhält nach dem Autoklavieren eine trübe hellrosa Farbe. Die Lösung sollte auch nur solange verwendet werden, wie diese charakteristische Farbe erhalten ist. Für die Isolierung von neutrophilen Granulozyten wird einer Maus 16 h und 4 h vor der Isolation je 1 ml Casein-Lösung ins Peritoneum gespritzt. Dies bewirkt ein Einwandern der Neutrophilen. Anschließend erfolgt die Isolierung der Peritonealzellen wie unter 2.10.1 beschrieben.

2.10.7. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Lysepuffer: 1 mM CaCl₂,
0,5 mM MgCl₂
0,2 % BSA
0,1 % NP40

Zur Isolierung von frischen humanen Granulozyten wurden einem freiwilligem Spender 15 ml peripheres venöses Blut entnommen und in Li-Heparin Monovetten (Sarstedt) abgefüllt. Das frische Blut wurde anschließend 1/1 mit PBS verdünnt und mit Hilfe einer 50 ml Polypropylene-Pipette auf 15 ml vorgelegte Ficoll-Lösung (INC Biomedicals) in einem 50 ml Falcon aufgeschichtet. Anschließend wurde das Gemisch 20 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei entstanden drei Schichten: eine diffuse Bande unterhalb des Plasmas, eine scharfe Bande ungefähr in der Mitte und ein Pellet aus Erythro- und Granulozyten. Durch das Absaugen der oberen drei Banden konnte die Erythro- und Granulozyten Suspension gewonnen werden. Die Erythrocyten, welche noch im Granulozytensediment enthalten waren, wurden durch kurzes Resuspendieren in kaltem 40 ml Lysepuffer lysiert. Alle weiteren Schritte wurden nun auf Eis durchgeführt. Die Granulozyten wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1000 rpm 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen.

2.10.8. Kultivierung der murinen Primärmakrophagen und Zelllinien

Die murinen Peritonelmakrophagen sowie die Zelllinien A549 und J774 A.1 wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS, Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und (10.000 units/ml) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Gibco) versetzt war.

Die MHS- Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FKS sowie 2 mM L-Glutamin und 0.05 mM 2-Mercaptoethanol (Sigma) gehalten. Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

Die HEK 293 Zellen wurden in DMEM gehalten, welches mit 2 % FCS und 1 % Penicillin 10.000 U/ml und Streptomycin 10.000 ug/ml angereichert wurde.

2.10.9. Umsetzen der Zelllinien

Für das Umsetzen der adhärennten Zellen wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit sterilem PBS (Gibco) gewaschen. Anschließend wurden 3-4 ml Trypsin-EDTA Lösung pro Petrischale zugegeben, um die Zellen vom Boden der Schale abzulösen. Nach ca. 5 min hatten sich die Zellen weitgehend gelöst und wurden mit einem Zellschaber (Falcon) vollständig abgekratzt. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt und die Zellen wurden anschließend bei 300 g 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium aufgenommen, in der Regel wurden 100-200 µl der Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale mit 10 ml vorgelegtem frischem Medium überführt.

2.10.10. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in 1 ml sterilem PBS aufgenommen. Ein kleiner Teil der Zellen wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (Fluka) verdünnt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Membran toter Zellen ist für diesen Farbstoff durchlässig, was zu einer tiefblauen Färbung führt. Lebende Zellen dagegen erscheinen im Mikroskop hell und ungefärbt. Es wurden immer mindestens 2 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter errechnet sich nach folgender Formel:

$\text{Zellen/ml} = (\text{Zellzahl} / \text{Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$
--

2.10.11. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von konfluent bewachsenen Kulturschalen wurden die Zellen abtrypsiniert (siehe 2.10.9) und das Zellpellet je nach Größe in 1-2 ml Einfriermedium (92 % FKS + 8 % Dimethyl Sulfoxid (DMSO) aufgenommen. Aliquots dieser Zellsuspension mit einem Volumen von 0.5 ml wurden in Kryoröhrchen (TPP) pipettiert und diese in mit Isopropanol gefüllten Einfrierdosen (Nalgene) zunächst bei -80 °C gelagert. Nach einem Tag konnten die Kryoröhrchen dann in einen Stickstofflagertank überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte wegen der Toxizität von DMSO möglichst rasch erfolgen. Die Zellen wurden noch halbgefroren in das entsprechende, auf 37°C erwärmte Medium überführt und anschließend für 10 min bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet resuspendiert und mit frischem Kulturmedium in eine neue Kulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte dann wie bereits oben beschrieben.

2.10.12. Infektion von Zellen mit *A. fumigatus*-Sporen

Um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern (Langenbrinck) kultiviert, an die sie adhären konnten. Dazu wurden die Deckgläschen in die Vertiefungen einer 24-well Platte (TPP) gelegt, mit Medium bedeckt und Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 ausgesät.

Die Infektion der Zellen mit biotinylierten und auch nicht biotinylierten Pilzsporen erfolgte in diesen 24-well Platten. Für die Infektionen wurden 2×10^7 Sporen zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde alles gut durchmischt. Danach folgte die Inkubation im CO₂- Brutschrank und am Ende des Versuches die Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd in PBS.

In Kontrollversuchen erfolgte die Infektion der Zellen mit BSA-Beads, Laminarin-Beads und Zymosan, wie gerade beschrieben. Es wurden ebenfalls eine Menge von 2×10^7 Beads bzw. Zymosan-Partikel pro Well eingesetzt.

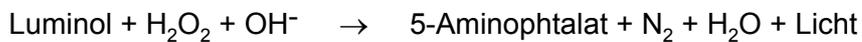
2.10.13. Herstellung von Laminarin-gekoppelten Beads

Hierzu wurden 2×10^8 (10mg/ml) Polystyrene Beads der Firma Microsphere verwendet. Die Beads wurden 2 x mit einem Carbonatebicarbonat-Puffer (Sigma), pH 9,6 gewaschen und anschließend mit 50 µg/ml Laminarin (Sigma) für 1 h bei 37 °C inkubiert (Reaktionsvolumen 1 ml). Anschließend wurden die Beads 2 x mit 5 % BSA in

Carbonatbicarbonat-Puffer und 1 % in 0,5 % BSA in Carbonatbicarbonat-Puffer gewaschen. Die Beads wurden in 1 ml 0,5 % BSA in Carbonatbicarbonat-Puffer aufgenommen und standen für Infektionsversuche zur Verfügung.

2.10.14. Messung des „Oxidativen Burst“

Der „Oxidative Burst“ von neutophilen Granulozyten wurde als Chemilumineszenz in einem Luminometer gemessen. Das chemiluminogene Substrat Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinion, Sigma) wurde genutzt, um die Produktion von ROS während des „Oxidative Burst“ zu messen.



Die Zellen wurden, wie unter 2.10.6 beschrieben, aus C3H/HeN-Mäusen isoliert. 100 µl frisch isolierte Granulozyten (10^6 Zellen/ml) wurden mit 10 µl Luminol (1,5 mM) versetzt und in einer Proben-Platte (Costar) bei 37 °C mit 5 % CO₂ für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurden Sporen mit einer MOI von 10 zugegeben und unmittelbar danach die Lumineszenz mittels eines Luminometers (Berthold Technologies) in Intervallen von 10 Minuten, für je 10 Sekunden gemessen. Die gemessenen Werte wurden in RLU (Relative Light Units) pro Minute dokumentiert.

2.10.15. Transfektion von Zellen

Die Transfektion erfolgte mit Hilfe eines Transfektionskits (Effectgene, Qiagen). Am Abend vor der Transfektion wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen auf Objektgläschen, die sich in 24-well Kulturschalen befanden, ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden die Vektor-DNA (0,1 µg-0,2 µg) in 20 µl EC Puffer gelöst und mit Enhancer versetzt, wobei dieser in einem Verhältnis von 1 (DNA in µg) zu 8 (Enhancer in µl) benutzt wurde. Nach dem Vortexen wurde das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur belassen. In einem nächsten Schritt wurde Effectene (1 µl-5 µl) zugegeben, erneut gevortext und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Zuletzt wurden 500 µl Medium hinzupipettiert und das Gemisch wurde langsam zu den am Vortag ausplattierten Zellen pipettiert. Die Zellkulturschalen mussten erneut über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden, bevor sie am nächsten Tag für weitere Versuche zur Verfügung standen.

2.11. Molekulargenetische Methoden**2.11.1. Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen****2.11.1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) dient der Vermehrung beliebiger DNA-Abschnitte. Hierzu wurden kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) synthetisch hergestellt (Metabion, München), die komplementär zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens waren und sich an diese anlagern konnten. Ausgehend von den Primern konnte die Taq-DNA Polymerase (Roche) eine Strangverlängerung durchführen. Ein Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus der Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strangverlängerung. Als Template wurde jeweils chromosomale DNA oder cDNA von *A. fumigatus* eingesetzt (diese wurden freundlicherweise von Dr. Monika Schwienbacher zur Verfügung gestellt).

Ein PCR-Reaktionsansatz mit dem Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 50 µl setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

<u>Master-Mix:</u>	Für die Reaktionen:	50 µl	20 µl
	Puffer PE	5 µl	2 µl
	dNTPs (je 2 mM)	5 µl	2 µl
	Taq PE	0,5 µl	0,2 µl
	dest. H ₂ O	28,5 µl	11,3 µl

Der Master-Mix wurde jeweils für n +1 Reaktionen angesetzt.

<u>Reaktions-Mix:</u>	Primer A	5 µl	2 µl
	Primer B	5 µl	2 µl
	Master-Mix	39 µl	15,5 µl
	Template	1 µl	0,5 µl
	Gesamtvolumen	50 µl	20 µl

Material und Methoden

Die PCR-Reaktionen wurden in Geräten der Firma Biometra folgendermaßen durchgeführt:

Anfangsdenaturierung	95°C, 10 min
Denaturierung	95 °C, 30 sec
Primer-Anlagerung	55°C, 45 sec
Strangverlängerung	72°C, 3 min
Finale Elongation	72 °C, 6 min
Heizdeckeltemperatur: 105 °C Zahl der Zyklen: 35, danach 4 °C	

2.11.1.2. Agarosegelelektrophorese

<u>TAE-Puffer:</u>	4,84 g Tris
	2 ml 0,5 M EDTA
	1,14 ml Eisessig
	<hr/>
	ad 1000 ml dest. H ₂ O

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Hierzu wurde eine 1 %ige Agaroselösung in TAE-Puffer in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurde die Lösung luftblasenfrei in eine Flachbettgelkammer (Eigenbau Werkstatt) gegossen, anschließend wurde ein Kamm mit Zähnen eingebracht. Nach dem Erhärten des Gels und der Entfernung des Kamms konnten die Proben in die entstandenen Taschen pipettiert werden. Zum Beladen des Gels wurde dieses in eine, mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer (Eigenbau Werkstatt) gelegt. Je 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl „6x Loading Dye“ (MBI Fermentas) versetzt. Als Größenstandard diente „GeneRuler 1kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas), von dem 10 µl aufgetragen wurden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V und dauerte ca. 30 min. Anschließend wurde das Gel 10 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt. Durch ultraviolettes Licht (UV-Licht) wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und im Geldokumentationsgerät (BioRad) fotografiert.

2.11.1.3. Klonierung der amplifizierten Gene in einen Expressionsvektor

Nach der Amplifikation und Reinigung der entsprechenden Gene konnten diese in einen Expressionsvektor kloniert werden. Es wurde das „QIAexpress UA Cloning Kit“ (Qiagen) verwendet, was eine direkte Klonierung von PCR-Produkten ermöglichte. Dieses System macht sich die Tatsache zu Nutze, dass die Taq-Polymerase sowie auch andere Polymerasen ohne „Proofreading“-Aktivität einen A-Überhang an das 3`-Ende der PCR-Produkte anfügen. Die Vektoren lagen bereits linearisiert vor und hatten an jedem 3`-Ende einen U-Überhang. Dies ermöglichte eine schnelle und effiziente Ligation ohne vorherigen Restriktionsverdau. Allerdings konnte mit diesem System keine gerichtete Klonierung durchgeführt werden, d.h. die Orientierung des Inserts im Vektor konnte nach Ligation sowohl richtig als auch falsch sein. Dies konnte jedoch z.B. durch Expression des entsprechenden Gens nach Transformation oder mit Hilfe einer PCR (siehe 2.11.1.4) kontrolliert werden.

Ligationsansatz: 1 µl pQE-30
4 µl PCR Produkt
5 µl 2x Ligationspuffer

Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16 °C inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, musste anschließend die Ligase bei 72 °C für 10 min inaktiviert werden.

2.11.1.4. „Colony“- Screening mit Hilfe der PCR

TTE- Puffer: 24,15 ml H₂O
1 ml Triton x-100 1 %
0,5 ml 1 M Tris- HCl pH, 8,5
0,1 ml 0,5 M EDTA pH, 8,0

Für das „Colony“- Screening wurden zuerst Kolonien gepickt und in 50 µl TTE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Nach dem Aufkochen wurden die Proben 5min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand konnte nun als Template für die PCR verwendet werden.

2.11.1.5. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zuerst wurde eine 2,5 ml *E. coli*- Vorkultur in 250 ml LB- Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 im Schüttelschrank inkubiert. Wurde die entsprechende OD erreicht, wurden die Zellen 15 min in Eiswasser abkühlt. Von hier an wurden alle weiteren Schritte bei 0 °C ausgeführt; die Lösungen und die Zentrifuge sollten bereits vorher gekühlt werden.

Die Probe wurde 15 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde abgossen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit 20 ml Aqua dest. gewaschen. Nun wurde das Pellet vorsichtig in 5 ml Aqua dest. gelöst, anschließend 250 ml bidest. Wasser zugeben und 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgossen und das Zellpellet wurde in dem zurückgebliebenen Wasser resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in zwei 50 ml Falcons verteilt und diese wurden jeweils mit 25 ml 15 % Glycerin/H₂O (dest.) aufgefüllt und erneut 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 - 1 ml 15 % Glycerin aufgenommen und in Kryoröhrchen (TPP) verteilt. Die Zellen wurden dann portionsweise (30 µl) bei -70 °C eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.11.1.6. Elektroporation

Luria Bertani (LB) Medium: 10 g Trypton
 5 g NaCl
 5 g Hefeextrakt

 ad 1000 ml dest. H₂O

LB-Agar: 15 g Agar auf 1000 ml LB Medium
 pro Petrischale ca. 20 ml LB-Agar

Bei der Elektroporation wird eine Suspension von elektrokompetenten Zellen und Plasmid-DNA elektrischen Pulsen ausgesetzt, welche die Membran vorübergehend für große Moleküle durchlässig machen und so das Eindringen von Plasmid-DNA in die Bakterienzelle ermöglichen.

Für die Transformationen wurden die elektrokompetenten Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Für die Elektroporation wurden dann 15 µl der Bakteriensuspension mit 5 µl Ligationsansatz in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Eurogentec) gemischt. Diese wurde anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 200

Ω , 25 μF und 1.8 kV mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad). Um den transformierten Bakterien Erholung und Wachstum zu erleichtern, wurde sofort 300 μl vorgewärmtes Luria Bertani (LB) Medium zugegeben. Danach wurde der Transformationsansatz mindestens 30 min bei 37 °C und 200 U/min geschüttelt. Es folgte die Ausplattierung von jeweils 50 μl und 250 μl auf LB-Agar-Platten, die als Selektionsmarker die Antibiotika Carbpenicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) enthielten. Die LB-Agar-Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation waren nach dieser Zeit Bakterienkolonien gewachsen.

Die transformierten Bakterien erhielten die Carbpenicillin Resistenz durch Aufnahme des pQE-30 Vektors, der das β -Lactamase Gen enthält. Die Kanamycin Resistenz wurde durch das low-copy Plasmid [pRep4] vermittelt, das der verwendete M15 *E. coli*-Stamm bereits enthielt. Außerdem wird von diesem Plasmid konstitutiv der lac-Repressor exprimiert (Farabaugh *et al.*, 1978). Die klonierten Gene standen im pQE-30 Vektor unter der Kontrolle eines T5-Promotor/lac-Operator Systems. Mit Hilfe des gebildeten lac-Repressors konnte die Transkriptionsrate am T5-Promotor reguliert werden.

2.11.1.7. Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung

Aus einer 50 ml ÜN Kultur wurde das pQE-30 Plasmid mit Insert mit Hilfe des „QIAprep Spin Midi Kit“ aufgereinigt. 60 μl der Plasmidlösung wurden an die Firma GATC-Biotech (www.gatc-biotech.de) geschickt, die die Sequenzierung der Plasmid-DNA durchführte.

2.11.1.8. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Plasmid-DNA 1:50 verdünnt und in einem Quarzglas Präzisionsküvette die OD bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 der Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Für die Reinheitsbestimmung der DNA wurde zusätzlich noch die OD bei 280 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} verringert sich mit zunehmend Protein-Verunreinigung und sollte über 1,6 liegen.

2.11.1.9. Induktionskulturen

Um die rekombinanten His₆-Proteine in *E. coli* zu exprimieren, konnte der Regulationsmechanismus des lac-Repressors überwunden werden, indem Isopropyl-β-D-Thiogalaktosidase (IPTG) zugegeben wurde. Der Induktor IPTG bindet das lac-Repressor-Protein und inaktiviert es, wodurch die Transkription des klonierten Gens möglich wird.

Zur Induktion wurden von einigen Einzelkolonien zunächst 3 ml-Kulturen in LB-Medium mit Carbpenicillin und Kanamycin (je 100 µg/ml) angesetzt und üN 3 h bei 37 °C und 200 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG die Expression des rekombinanten Proteins in 200 ml frischem LB-Medium induziert. Nach 4 h bei 37 °C und 250 U/min wurden die Kulturen bei 2000 xg für 10 min abzentrifugiert. Ein Teil des Pellets wurde in 60 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.11.1.10. Bakterienanzucht

Für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde jeweils 20 ml LB-Medium, das zuvor mit 100 µg/ml Carbpenicillin versetzt worden war, mit den entsprechend transformierten *E. coli*-Stämmen angesetzt. Die Inkubation dieser Vorkultur geschah ÜN bei 37 °C und 200 U/min. Am nächsten Tag erfolgten die Zugabe von 200 ml frisches LB-Mediums (mit Carbpenicillin 100 µg/ml). Nach einer halben Stunde wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) hinzugefügt. Die Kultur wurde 5 h bei 37 °C und 250 U/min geschüttelt und anschließend bei 2000 xg für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde zur Erleichterung des Aufschlusses eingefroren. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Extraktionspuffer (siehe 2.11.1.12) resuspendiert und konnte in der French-Press aufgeschlossen werden.

2.11.1.11. Aufschluss der Bakterien mit Hilfe der French-Press

Die Proben wurden zweimal hintereinander mit einem Druck von 275 MPa aufgeschlossen und anschließend bei 3000 xg für 20 min abzentrifugiert. Die beiden Fraktionen (Pellet und Überstand) wurden in der SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, entweder sofort für die Aufreinigung verwendet oder bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.11.1.12. Reinigung der rekombinanten Proteine über die TALON-Matrix

Extraktions-/Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat
300 mM NaCl
pH 7,0

Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat
300 mM NaCl
150 mM Imidazol
pH 7,0

Die verwendete TALON-Matrix (Clontech) besteht aus Sepharosepolymeren, an die positiv geladene Metallionen gekoppelt sind. Die rekombinanten Proteine konnten über eine N-terminale 6xHistidin-Sequenz gereinigt werden, die aus der pQE-30 Vektor-Sequenz stammte.

Unter physiologischem pH binden die Histidine an diese immobilisierten Metallionen, was eine spezifische Aufreinigung von Proteinen unter nativen und denaturierenden Bedingungen ermöglicht. Für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde zunächst 1 ml der TALON-Matrix zweimal mit 5 ml Extraktions-/Waschpuffer gewaschen, durch Resuspension der Matrix und anschließende Zentrifugation bei 4000 xg für 5 min bei 4 °C. Danach wurde der Überstand des French-Press Lysates mit der TALON-Matrix vermischt und diese, zur Bindung des Proteins, 3 h bei 4 °C im Kühlraum auf einem Drehrad gedreht. Anschließend wurde ungebundenes Protein durch dreimaliges Waschen mit Extraktions-/Waschpuffer entfernt.

Es folgte die kompetitive Elution mit Imidazol. Dafür wurde die TALON-Matrix zunächst in 3 ml Elutionspuffer resuspendiert und dann für 2 h bei 4 °C im Kühlraum auf einem Drehrad gedreht. Um das Protein möglichst vollständig zu eluieren, wurde außerdem eine ÜN-Elution mit weiteren 2 ml Elutionspuffer durchgeführt. Die Analyse der Probe erfolgte über SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. Western Blot.

2.11.1.13. Reinigung unlöslicher Proteine

Denaturierender Extraktions-/Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat
300 mM NaCl
6M Guanidin-Hydrochlorid
pH 7,0

Material und Methoden

Denaturierender Elutionspuffer: 45 mM Natriumphosphat
 270 mM NaCl
 5,4 M Guandidin-Hydrochlorid
 150 mM Imidazol

 pH 7,0

Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen ist für schwer lösliche bzw. unlösliche Proteine, die durch Zentrifugation sedimentiert werden, gebräuchlich. Die Durchführung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Punkt 2.11.1.12 beschrieben, die Puffer waren jedoch unterschiedlich. In Anwesenheit von Guanidin-Hydrochlorid können Proteine nicht in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Deshalb muss Guanidin-Hydrochlorid nach der Elution durch Dialyse entfernt werden. Die Dialyse erfolgte ÜN bei 4 °C gegen das 5-fache Probenvolumen Extraktions-/Waschpuffer. Es wurde ein Spectra/Por Dialyseschlauch (Spectrum) mit einer Ausschlussporengröße von 6-8000 Da verwendet, der vor der Dialyse 30 min in destilliertem Wasser äquilibriert wurde.

2.11.1.14. Herstellung von Melanin- „Ghosts“ (Youngchim *et al.*, 2004)

Proteinase K- 10 mM Tris,
Reaktionspuffer: 1 mM CaCl₂
 5 % SDS

 pH 7,8

Für die Herstellung von Melanin-„Ghosts“ wurden $2,5 \times 10^9$ Sporen wie unter 2.9.1.2 beschrieben isoliert. Diese wurden in 4 ml PBS überführt und anschließend 3 x mit PBS und 1 x mit Sobitol und 1 M Natrium Citrat gewaschen (pH 5.5). Im nächsten Schritt wurden die Sporen mit zellwandlysierenden Enzymen (Novozym, Sigma) in einer Konzentration von 10 mg/ml über Nacht bei 30 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die übrig-gebliebenen Partikel wurden dann am folgenden Tag 10 min zentrifugiert und erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die Protoplasten wurden über Nacht mit 4M Guanidin thiocyanat (Sigma) bei Raumtemperatur inkubiert. Die am darauffolgenden Tag übrig-gebliebenen dunklen (bei *A. fumigatus*) bzw. hellen (bei *pksP*- Mutante) Partikel wurden bei 5000 rpm abzentrifugiert und mit 1 mg/ml Proteinase K in Reaktionspuffer bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden diese mit 3 x PBS gewaschen und mit 6 M HCL 1,5 h 100 °C gekocht. Die Melanin-Partikel wurden durch ein Whatmanpapier filtriert und

3 x mit PBS gewaschen. Um das HCl aus den Proben herauszufiltrieren, wurden diese 10 Tage gegen PBS dialysiert. Die Melanin-Partikel wurden anschließend zur Immunisierung von Balb/c Mäusen (siehe 2.11.2.2) verwendet.

2.11.2. Herstellung monoklonaler Antikörper

2.11.2.1. Verwendete Antigene

Für die Herstellung von Antikörpern wurden Mäuse mit Sporenproteinen von *A. fumigatus* mit den sogenannten Melanin-„Ghosts“ (siehe 2.11.2.2) immunisiert.

2.11.2.2. Immunisierung der Mäuse

HEPES-Medium: Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) mit 25 mM HEPES-Puffer (Biochrom)

Zwei Balb/c Mäuse wurden mit dem vorbereiteten Antigen nach folgendem Schema intraperitoneal immunisiert:

- Tag 1: Injektion von 250 µl des jeweiligen Antigens emulgiert mit 250 µl Freund`schem Adjuvans (Sigma).
- Tag 14 : Injektion wie Tag 1.
- Tag 28 : Injektion von 250 µl des jeweiligen Antigens ohne Adjuvans.
- Tag 32 : Entnahme der Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Anschneiden des Organs und anschließendes Durchspülen mit einer Spritze.

Vorab wurde die murine Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 in RPMI 1640-Medium (Gibco) expandiert, so dass zum Zeitpunkt der Fusion 10-12 dicht bewachsene Petrischalen mit Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zur Verfügung standen. Diese hatten eine Dichte von etwa 4×10^8 Zellen. Die Zellen wurden durch kräftiges Resuspendieren von den Schalen abgelöst, in 50 ml-„Falcon“- Röhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in HEPES-Medium gewaschen und nochmal abzentrifugiert. Die Isolierung von Peritonealmakrophagen erfolgte nun im Anschluss (siehe 2.10.1).

2.11.2.3. Fusion

PEG- Lösung: 5 g Polyethylen-Glycol (PEG) 4000 (Merck) wurden bei 60°C (Wasserbad) in 5 ml HEPES-Medium gelöst, der pH auf 7,4 gebracht und die Lösung anschließend durch einen 0,2 µm-Filter (Sartorius) sterilfiltriert.

HA- Selektionsmedium: OPTIMEM-Medium (Gibco) wurde mit 5 % FKS (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und 10000 units/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) versetzt. Zur Selektion wurden außerdem 20 mg/l Hypoxanthin und 1,5 mg/l Azaserin (Sigma) zugegeben.

Die Myelomzellen wurden in HEPES-Medium aufgenommen und auf das Lymphozytensediment gegeben, beide Zelltypen wurden durch Resuspendieren gemischt und zusammen bei 950 U/min (5 min, Heraeus Megafuge 1.0R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment durch leichtes Schütteln des Röhrchens aufgelockert und im Wasserbad auf 37 °C gebracht. Um die Temperatur während des Fusionsvorganges auf 37 °C zu halten, wurde bei den nachfolgenden Schritten das Röhrchen in das Wasserbad gehalten. Innerhalb einer Minute wurde tropfenweise 1 ml PEG 4000 (Polyethylenglycol) auf das Zellsediment gegeben. Bei diesem Vorgang wurde das Röhrchen leicht geschüttelt. Nach einer weiteren Minute wurde das PEG langsam durch Zugabe von HEPES-Medium ausverdünnt: 1 ml in 30 Sekunden, 3 ml in 30 Sekunden und schließlich 16 ml innerhalb einer Minute. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend bei 1000 g 5 min abzentrifugiert, in HA (Hypoxanthin/Azaserin)-Selektionsmedium aufgenommen und auf vorbereiteten 24-Well-Platten ausplattiert. Um die Wachstumsbedingungen für die fusionierten Zellen zu verbessern, enthielten die Kulturen auch murine Peritonealmakrophagen (Isolierung siehe 2.10.1).

Das Selektionsverfahren zwischen Myelom- und Hybridomzellen basiert auf einem Enzymdefekt der Myelomzellen. Durch die Zugabe von Azaserin wird der Hauptsyntheseweg der Purinbasen, die für die Synthese von Nukleinsäuren bereitgestellt werden müssen, blockiert. Normale Zellen verfügen über einen Reserveweg und können deshalb bei Zugabe von Hypoxanthin überleben. Die Myelomzellen können dagegen diesen Reserveweg nicht nutzen, da sie nicht über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase verfügen, so dass sie nach wenigen Tagen absterben. Die Lymphozyten, die nicht fusioniert sind, sind in Kultur

ohne weitere Stimulation nicht lange lebensfähig, so dass nur Zellen überleben, die aus der Fusion einer Myelomzelle (Immortalisierung) und eines Lymphozyten (Kompensation des Stoffwechseldefektes) hervorgegangen sind.

Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Selektionsmedium versorgt, und nachdem sich nach 8-10 Tagen deutlich sichtbare Zellklone entwickelt hatten, wurden die Überstände getestet (siehe 2.12.1). Positive Kulturen wurden auf 6-Loch-Platten expandiert. Sobald sie dort eine ausreichende Dichte erreicht hatten, wurden die fusionierten Zellen eingefroren und die Überstände auf spezifische Antikörper untersucht.

2.12. Proteinchemische Methoden

2.12.1. Durchmusterung der Hybridom-Überstände in der SDS-PAGE

Die Durchmusterung der Hybridomüberstände erfolgte mit Hilfe der SDS-Page (siehe 2.12.4). Dafür wurden SDS-Gele mit speziellen Kämmen verwendet. Die Form der Kämmen war so gestaltet, dass sich im Sammelgel nur zwei Taschen ergaben. Eine kleine diente zum Auftragen des Markers, die große verlief über die restliche Breite des Gels. Nach dem Blotting auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Blot in einer speziellen Testkammer (Miniblotter, Biometra) eingespannt. Vorteil dieser Testkammer ist, dass bis zu 16 Antikörper-Überstände gleichzeitig getestet werden können. In jeden Schlitz der Kammer wurden 200 µl des jeweiligen Antikörper-Überstandes aufgebracht und nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Membran entnommen und 3 x mit TBS-T gewaschen. Die weiteren Schritte wurden wie unter 2.12.5.2 beschrieben durchgeführt.

2.12.2. ELISA

Natriumacetatpuffer: 10 mM pH 5.5

Entwicklungslösung: 1 Tablette Phosphatasesubstrat
in 5 ELISA-Entwicklungspuffer

Entwicklungspuffer: 9,7 ml Diethanolamin
100 µl 1 M MgCl₂

ad 1000 ml dest. H₂O, pH 9,8
+ Sigma 104 Substrat Tablette

Hierfür wurden spezielle ELISA-Platten („Costar´s Carbohydrate binding plates“) verwendet, an deren Oberfläche Zucker binden können. Zuerst wurde Laminarin in einer Konzentration von 0.5 µg/10ml in 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5.5 gelöst. Anschließend wurden 3,2 mg/ml NaJO₄ hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert; pro ELISA-Well wurden 100 µl der zuvor angesetzten Lösung hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die ELISA-Platten 3 x mit TBS/T gewaschen. Die noch freiliegenden Proteinbindungsstellen wurden mit 2 % BSA in 0,5 M Tris Puffer pH 8,2 für 30 Minuten geblockt. Nachdem der Blockpuffer entnommen wurde, wurden 100 µl der zu testenden Überstände in die ELISA-Platten pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den ersten Antikörpern (100 µl Kulturüberstand aus der *A. fumigatus* Antikörperbank) und mit dem Alkalisch Phosphatase konjugierten α-Maus Sekundärantikörper. Die ELISA-Platten wurden erneut 3 x mit TBS/T gewaschen und 200 µl Entwicklungslösung („ein Phosphatase Substrate Tablet“ in 5 ml Entwicklungspuffer, Sigma) für ca. 10 min entwickelt. Nach der Entwicklungszeit erfolgte die Quantifizierung durch Messung der OD bei 405 nm (Referenz OD₆₂₀) auf einem Tecan Sunrise Reader (Tecan).

2.12.3. Isolierung von Hüllproteinen von *A. fumigatus* mit Hilfe des Ultraschalls

Für die Isolierung von Oberflächenproteinen wurden 2 x 10⁹ Sporen isoliert und für 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen und erneut für 5 min bei 10000 g abzentrifugiert. Nun wurden die Sporen wie unter 2.9.2.5 beschrieben biotinyliert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und 1 % Proteaseinhibitor-Coctail hinzugegeben. Die Ultraschallbehandlung erfolgte 2 x 10 min bei 110 Watt. Zwischen den beiden Ultraschallbehandlungen erfolgte eine 5-minütige Pause. Nach dem Ultraschall wurden die Sporen erneut 5 min bei 10000 g abzentrifugiert und der Überstand wurde über Nacht in 10 % TCA bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Probe noch mal abzentrifugiert, das getrocknete Pellet wurde in 40 µl Tris pH 8,8 aufgenommen und auf ein SDS- Gel aufgetragen.

2.12.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Trenngel (für 2 Gele mit 1 mm Spacern):

(=Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid im fertigen Gel)	5 %	6 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	8,6 ml	8,1 ml	7,35 ml	6,1 ml	5,1 ml	3,6 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
30 % Acrylamid	2,5 ml	3,0 ml	3,75 ml	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
25 % Ammoniumpersulfat (APS)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Sammelgel (für 2 Gele mit 1 mm Spacern):

H ₂ O	2,9 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 µl
30 % Acrylamid	850 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl
TEMED	10 µl
25 % APS	10 µl

2x Probenauftragspuffer:

25 % Glycerin	25 ml
8 % SDS	8 g
100 mM Tris	1,2 g
4 β-Mercaptoethanol	4 ml
0,02 % Bromphenolblau	ca. 20 mg

ad 100 ml dest. H₂O, pH 6,8

10x Elektrophoresepuffer:

0,1 % SDS	10 g
0,025 M Tris	30,3 g
0,192 M Glycin	144 g

ad 1000 ml dest. H₂O

Wasser-gesättigtes 2-Butanol: 100 ml dest. H₂O mit 300 ml 2-Butanol schütteln, nach der Phasentrennung das überschüssige 2-Butanol abdekantieren.

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet optimal an durch Hitze denaturierte Proteine. Da sich die SDS-Moleküle proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide anlagern, ist eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht durch das netzartige Polyacrylamidgel möglich. Die verwendeten Molekulargewichtsstandards waren „Precision Plus Protein Standard All Blue“ bzw. „Unstained“ der Firma BioRad.

Für die Elektrophorese wurde ein Elektrophoresesystem mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Zwischen zwei fixierten Gelplatten wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das 2-Butanol sorgfältig mit dest. Wasser abgespült. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurde über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Die Proteine wandern darin schnell und ohne Auftrennung als scharfe Bande. Erst durch den Eintritt in das Trenngel erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesteckt, wodurch sich Taschen ausbilden. Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer (Biometra) überführt, die mit SDS-Elektrophoresepuffer befüllt war.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 2 x in Probenauftragspuffer verdünnt und 10 min bei 95 °C aufgekocht. Danach wurden sie auf Eis gekühlt und für 15 min bei 15000 xg 4 °C abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Kamms aus dem Sammelgel wurde der Überstand in die Taschen des Sammelgels pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bis zum Eintritt in das Trenngel bei 120 V (ca. 15 min), nach dem Eintritt in das Sammelgel bei 200 V (ca. 45 min) durchgeführt.

2.12.4.1. Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G250

Kolloidale Coomassie- Färbelösung : 0,08 % (w/v) Coomassie G250 in 1,6 % (v/v)
Phosphorsäure
8 % (w/v) Ammoniumsulfat
20 % (v/v) Methanol (erst kurz vor Gebrauch
zugeben und kräftig rühren).

Die Gele wurden nach der Elektrophorese aus den Gelplatten entnommen und direkt in die kolloidale Coomassie-Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgte unter langsamem Schwenken auf einem Schüttler für mindestens 6 h. Intensivere Färbungen wurden

durch längere Inkubationszeiten erreicht. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch Spülen der Gele in dest. Wasser, optimale Kontraste wurden durch die komplette Entfärbung des Hintergrunds erreicht.

2.12.5. Nachweis von Proteinen durch Antikörper

2.12.5.1. Western Blot

<u>Transferpuffer:</u>	50 mM Tris	3,03 g Tris
	39 mM Glycin	14,4 g Glycin
	20 % (v/v) Methanol	200 ml Methanol
		<hr/>
		ad 1000 ml dest. H ₂ O
<u>10x Ponceau-S Rot Lösung:</u>		2,5 g Ponceau-S Rot
		400 ml Methanol
		150 ml Eisessig
		<hr/>
		450 ml dest. H ₂ O

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamid-Matrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran – (z.B. Polyvinylidendifluorid (PVDF)- (Immobilon P, Millipore) oder Nitrocellulosemembran) – transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Durch hydrophobe Wechselwirkung werden die Proteine an die PVDF-Membran gebunden. Für den elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Verfahren im Einsatz, das „Tankblotsystem“ und das „Semidryblotsystem“. In dieser Arbeit erfolgte der Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Membran in einem „Semidrylot System“ (BioRad).

Die Blotmembran und die zurechtgeschnittenen Blotpapiere wurden vor dem Transfer in Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 100 mA für 2 h. Anschließend wurde durch eine Ponceau-Färbung kontrolliert, ob der Transfer erfolgreich war.

2.12.5.2. Immunfärbung von Western Blots

<u>Entwicklungspuffer</u> pH	100 mM Glycin
<u>7.4:</u>	1 mM ZnCl ₂ 1 mM MgCl ₂
<u>Entwicklungslösung:</u>	0,5-1 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) frisch angesetzt in Entwicklungspuffer.
<u>Blockierlösung:</u>	3,0 g BSA (Rinderserumalbumin) 100 ml TBS- Tween Puffer
<u>20x TBS-Tween</u>	96,8 g Tris
<u>(TBS-T):</u>	318,9 g NaCl 20 ml Tween
	<hr/> ad 2000 ml dest. H ₂ O, pH 7,6

Nach dem elektrophoretischen Transfer des Proteins auf eine PVDF-Membran müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Da Antikörper Proteine sind, würden sie sich ohne diese Maßnahme an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Das Blockieren freier Bindungsstellen wird mit einem nicht für die Antikörper erkennbaren Protein durchgeführt. In dieser Arbeit erfolgte die Blockierung der Membran durch Inkubation in 3 % BSA-TBS-Tween (Rinderserumalbumin in TBS-T) für mindestens 1 h. Anschließend wurde der abgesättigte Blot mit dem primären Antikörper (z.B. α -RGS-His-Antikörper) in 10 ml Blockierlösung oder in unverdünntem Hybridom-Überstand 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Alternativ wurde die Membran in ein 50 ml „Falcon“-Röhrchen überführt und mit 2 ml Antikörperlösung überschichtet. Diese Methode wurde angewendet, wenn nur ein geringes Volumen Antikörperlösung zur Verfügung stand. Das „Falcon“-Röhrchen wurde auf einem Roll-Inkubator (Stuart-Scientific) für 1 h bewegt, danach wurde der Blot dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (z.B. Ziege α -Maus Immunglobulin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) in 10 ml TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal 5 min mit TBS-T und einmal 5 min mit Entwicklungspuffer gewaschen und der Blot mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Toluidin Salz (BCIP) entwickelt. Die Reaktion konnte durch Zugabe von Wasser oder 2 % Essigsäure abgestoppt werden.

2.13. Zytologische Methoden

2.13.1. Durchmusterung der Hybridom-Überstände in der Immunfluoreszenz

Hierzu wurden „Multiwell“- Objektträger verwendet. Bevor die Melanin-„Ghosts“ und die Sporen auf die Objektträger pipettiert werden konnten, wurden 15 µl Poly-L-Lysine 5 min auf jedes Well der Objektträger pipettiert. Anschließend wurden diese 3x mit aqua dest gewaschen und getrocknet. Jetzt konnten 15 µl der Melanin-„Ghosts“ bzw. der Sporensuspension auf die Wells pipettiert werden. Die Suspensionen wurden nach einer 10minütigen Inkubation wieder abgenommen. Anschließend wurden die Objektträger in -20 °C kaltem Methanol für 30 sec fixiert. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie mit dem Primärantikörper 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x in PBS gewaschen und danach mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch erneutes Waschen mit PBS konnten die überschüssigen Antikörper entfernt und die Deckgläschen anschließend eingebettet werden. Als Einbettmedium diente FluoroGuard™ Antifade Reagent (BioRad). Nach wenigen Minuten wurden die Deckgläschen am Rande mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

2.13.2. Assay zur Quantifizierung der Phagozytose

Um die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in Makrophagen quantifizieren zu können, muss man zwischen intra- und extrazellulären Sporen unterscheiden. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, die nicht auf die Anwesenheit von Antikörpern angewiesen ist.

Hierzu wurden Zellen kultiviert und auf Deckgläschen mit einer Dichte von 5×10^5 ein Tag vor der Infektion ausgesät. Die Infektion erfolgt in 24-well Platten und mit 1×10^7 biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen pro well. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Deckgläschen mit den infizierten Zellen entnommen, 10 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen.

Alle Färbungen erfolgten bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Extrazelluläre biotinylierte Sporen wurden mit Cy3-Avidin (Cy3-Av) (Dianova, Hamburg) angefärbt (1:100 in PBS). Die Färbung von intra- und extrazellulären Sporen erfolgte mit Calcofluor weiß für 15 min (1:80 in PBS). Die Makrophagen wurden mit Hilfe von Concanavalin A-FITC gefärbt (1:100 in PBS). Die Deckgläschen wurden anschließend auf Objektträger gebracht und

um ein Ausbleichen zu verhindern wurden sie in 10 µl FluoroGuard™ Antifade Reagent (BioRad) eingebettet. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurden die Ränder mit Nagellack versehen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Leitz RBE Fluoreszenzmikroskops (Leica, Bensheim, Germany) welches mit der MetaMorph software (Visitron Systems, Puchheim) ausgestattet ist.

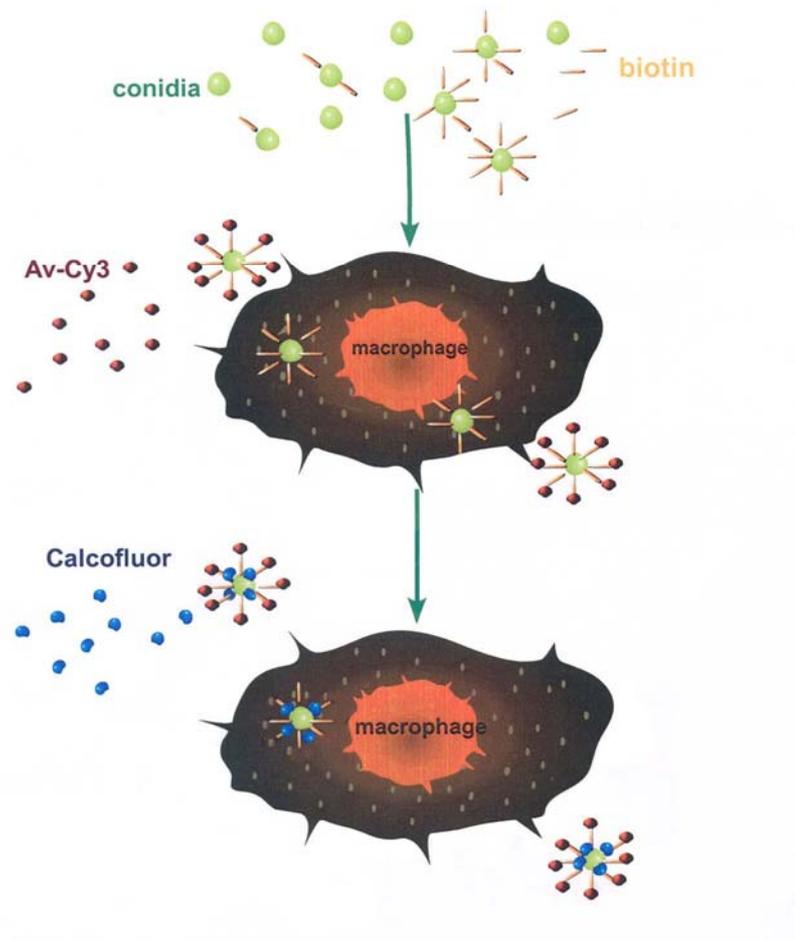


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen.

2.13.3. Färbung mit Antikörpern

Die zu untersuchenden Zellen wurden (wie unter 2.10.8 beschrieben), kultiviert und infiziert (siehe 2.10.12). Nach der Infektion wurden sie zum gewählten Zeitpunkt mit 3,7 % Formaldehyd 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Formaldehyd entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die folgende einminütige Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 machte die Membran durchlässig für die folgende Antikörperfärbung.

Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x in PBS gewaschen und danach

mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch erneutes Waschen mit PBS konnten die überschüssigen Antikörper entfernt und die Deckgläschen anschließend auf Objektträgern (Langenbrinck) eingebettet werden. Als Einbettmedium diente FluoroGuard™ Antifade Reagent (BioRad). Nach wenigen Minuten wurde mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Die Auswertung erfolgte entweder an einem Leitz RBE Fluoreszenzmikroskop (Leica, Bensheim, Germany) oder an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica dm LB). Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

2.13.3.1. Färbung mit V5-Antikörper

Der α -V-5 Antikörper kann eingesetzt werden um Fusionsproteine zu erkennen, die das V5-Epitop besitzen. Zuerst wurden die zu färbenden Zellen in 1-3 % frisch angesetztem Paraformaldehyd 15 min fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen 3 x mit PBS gewaschen und mit 0,2 % Triton X-100 in PBS 5 min permeabilisiert. Nachdem die Präparate erneut 3 x in PBS gewaschen worden waren, wurden sie in 1 % BSA in PBS für 30 min inkubiert.

Nach dem Blocken wurde der V5-Antikörper (Invitrogen, 1:200 in Blockingpuffer) auf die Zellen gegeben und für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS. Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus Cy3-Antikörper, welcher in 1 % BSA PBS verdünnt worden war. Nachdem der Zweitantikörper mit PBS heruntergewaschen worden war, wurden die Präparate eingedeckelt und mit Nagellack luftdicht versiegelt.

2.13.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel (Zellen). Grundlage ist die Antigen- Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet, der den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Die Emission, die sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper verhält, wird durch einen Photodetektor registriert. Somit kann eine Aussage über die Expression z.B. von

Oberflächenmolekülen gemacht werden. Durch Lichtbeugung und -streuung erhält man zusätzlich Informationen über Kerngröße und Granularität der Zellen.

Mit Hilfe des FACS- Gerätes wurde die Menge an Zuckern gemessen, welche sich auf der Oberfläche von neu isolierten, alten Sporen und angeschwollenen Sporen befindet. Hierzu wurden die Zellen mit Concanavalin A in einer Konzentration von 1:200 in PBS 30 min gefärbt und anschließend 1 x in PBS gewaschen und im entsprechenden Durchflusszytometer-Kanal gemessen.

2.14. Mikroskopische Untersuchungen

2.14.1. Elektronenmikroskopie

Cacodylatpuffer: 0,1 M Cacodylat
0,09 M Saccharose
0,01 M CaCl₂
0,01 M MgCl₂

ad 1000 ml dest. H₂O pH, 7,4

Fixierpuffer: Cacodylatpuffer pH 7,4 mit
5 % (v/v) Formaldehyd
2 % (v/v) Glutaraldehyd

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Manfred Rhode an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig mit Hilfe eines „Zeiss DSM 962 Gemini field-emission scanning microscope“ durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 auf Deckgläschen ausgesät. Die Infektion erfolgte in 24-well Platten mit den jeweiligen *Aspergillus*-Sporen. Die MOI betrug 50:1.

Nach Infektion wurden die infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf Eis fixiert. Nach 1 h wurden die Deckgläschen mit Cacodylatpuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.14.2. Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop (2D)

Hier wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (Micro-Max), gesteuert durch die Software Metamorph (Universal Imaging, Version 4.5), Bilder der Präparate aufgenommen. Es

wurde ein Plan-Apochromat 100x / N.A.1,40 Oil Objektiv verwendet. Die weitere Bildbearbeitung und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Adobe Photoshop 6.0.

2.14.3. Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop (3D)

Das Gerät besitzt einen Argon-Krypton-Laser mit den Wellenlängen 488, 568 und 647 nm, die für die Anregung von FITC, Propidiumjodid und Cy5 verwendet wurden. Mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil) wurden Serien von 8 Bit-TIFF-Bildern mit 256 x 256 Pixeln aufgenommen. Die Pixelgröße betrug 100x100 nm, der Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen 250 nm.

2.14.4. „Live-Cell“ Mikroskopie

Beim Live Cell Imaging arbeitet man mit einem Nikon Eclipse TE300 Lichtmikroskop, das mit der UltraView Software ausgestattet ist. Die Präparate wurden während der Beobachtungsphase, die sich über mehrere Stunden bis zu einem Tag hinziehen kann, mit 5 % CO₂ und begast und bei 37 °C temperiert. Während des Versuchs konnten pro Minute beliebig viele Bilder aufgenommen werden. Anschließend wurden diese Bilder zusammengefügt, sodass sich ein Zeitrafferfilm ergab, in dem die Zellbewegungen sichtbar wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung einer geeigneten Methode für die Quantifizierung der Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Sporen

A. fumigatus ist ein humanpathogener Pilz, der in immunsupprimierten Menschen schwere systemische Infektionen verursachen kann. Sporen bilden das infektiöse Agens und sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet. Alveolar Makrophagen bilden die erste Abwehrlinie in der Lunge, indem sie die Sporen phagozytieren (Latge, 1999). Somit stellen die Erkennung und die sich anschließende Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen einen zentralen Schritt bei der Bekämpfung von *Aspergillus*-Infektionen dar und das Verstehen dieses Prozesses ist daher von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Interaktionen von murinen und humanen Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen untersucht werden. Die Fragestellung umfasste zwei Perspektiven. Zum einen sollte die Oberfläche der *A. fumigatus*-Sporen analysiert und gezeigt werden, welche Strukturen für die Interaktion mit Makrophagen wichtig sind. Zum anderen wurden die Prozesse der Phagozytose aus der Perspektive der Makrophagen näher untersucht. Hierfür musste zunächst ein effizienter Phagozytoseassay etabliert werden.

In Anlehnung an die Doppelimmunfluoreszenz-Methode, die schon 1985 von Heesemann und Laufs zur Differenzierung zwischen intrazellulären und extrazellulären Bakterien in einer Zellkultur etabliert wurde (Heesemann und Laufs, 1985), sollte eine ähnliche Methode für *A. fumigatus* etabliert werden. Bei dieser Methode wird eine sukzessive Doppelimmunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern eingesetzt, um Bakterien vor und nach der Permeabilisierung der Wirtszellmembran zu färben. Ähnliche Protokolle wurden auch bei *A. fumigatus*-Infektionsversuchen verwendet, jedoch ist man hier auf das Vorhandensein geeigneter Antikörper angewiesen (Wasylnka und Moore, 2002; Lopes Bezerra und Filler, 2004).

3.1.1. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *A. fumigatus*-Sporen

Um die Methode zur Quantifizierung extrazellulärer und intrazellulärer Sporen in Phagozyten zu etablieren, wurde in einem ersten Experiment versucht, monoklonale Antikörper gegen die Hüllschicht von *A. fumigatus*-Sporen zu generieren.

In früheren Versuchen waren bereits drei Balb/C-Mäuse parallel dreimal in einem Abstand von 14 Tagen mit abgetöteten Sporen immunisiert worden, und das Serum

wurde auf vorhandene Antikörper getestet (Katrin Sturm, 2003). Diese Versuche ergaben polyklonale Seren, die aber mit ruhenden Sporen kaum reagierten. Daher wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, um geeignete Antikörper zu generieren. Hierzu wurden zunächst in Anlehnung an Paris *et al.*, 2003 die Hüllproteine von *A. fumigatus*-Sporen mittels Ultraschall isoliert, um so eventuell Proteine zu finden, die für weitere Immunisierungen geeignet sind (Paris *et al.*, 2003).

3.1.1.1. Isolierung von Hüllproteinen von *A. fumigatus*-Sporen

Für die Isolierung von Hüllproteinen von *A. fumigatus*-Sporen wurden die Oberflächenproteine von frisch isolierten Sporen zunächst mit Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert. Nach dem Markieren wurden die Zellen 2 x 10 min beschallt. Die nach Zentrifugation in Überständen vorhandenen Oberflächenproteine wurden anschließend mit TCA gefällt und auf zwei SDS-Gele aufgetragen. Ein Gel wurde mit Hilfe von Coomassie Blau angefärbt, in einem weiteren Gel wurden die biotinylierten Proteine im Western-Blot mittels Streptavidin detektiert. Abbildung 8 zeigt die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der durch Ultraschall gewonnenen Oberflächenproteine. Die zwei am stärksten gefärbten Banden, die sich im Blot ebenfalls mit Streptavidin nachweisen ließen, wurden herausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert. Bei den beiden Proteinen handelt es sich um das 14 kDa große Hydrophobin A (ROD A) und das 15 kDa große Hydrophobin B (ROD B). Beide Proteine sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Paris *et al.*, 2003). Hydrophobin A und Hydrophobin B sind charakteristisch für ruhende *A. fumigatus*-Sporen und bilden gemeinsam die hydrophobe Hüllschicht (Paris *et al.*, 2003).

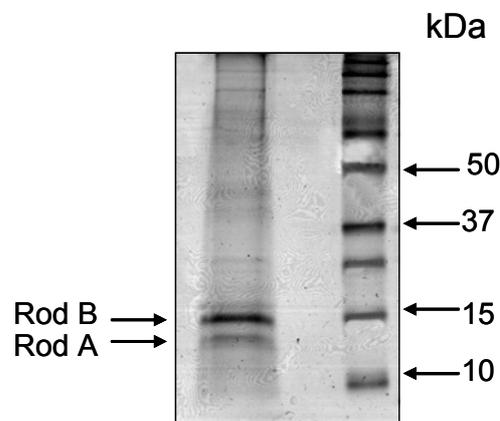


Abbildung 8: SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der ultraschallbehandelten Oberflächenproteinen, die durch Coomassiefärbung detektiert wurden.

3.1.1.2. Klonierung und Expression von Hydrophobin B

Da die Immunisierung mit ganzen Sporen nicht die erwarteten Ergebnisse lieferte, wurde alternativ versucht, das Hydrophobin B rekombinant herzustellen, um so weitere Immunisierungen zu ermöglichen und oberflächenspezifische Antikörper generieren zu können. Das Hydrophobin B-Gen wurde mittels der PCR amplifiziert. Als Template diente cDNA aus *A. fumigatus*-Sporen (die freundlicherweise von Frau Dr. Schwienbacher zu Verfügung gestellt wurde). Der 5'-Primer wurde so ausgewählt, dass es auch zu einer Amplifikation der am 5'-Ende lokalisierten Signalsequenz kam. Das Molekulargewicht des Hydrophobin B-Gens hat eine Größe von 430 Basenpaaren. In Abbildung 9 ist das PCR-Produkt passender Größe dargestellt.

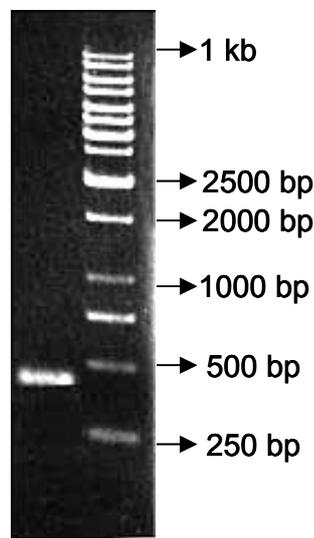


Abbildung 9: Elektrophoretische Auftrennung des Hydrophobin B PCR-Produkts.

Anschließend wurde das amplifizierte Hydrophobin B-Gen in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert. Dieser Vektor liegt bereits linearisiert vor und besitzt an den 3'-Enden poly U-Überhänge. Eine gerichtete Klonierung ist mit diesem Vektor nicht möglich. Die PCR-Produkte können sowohl in richtiger als auch in falscher Orientierung in den Vektor integriert werden. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Am nächsten Tag konnte der elektrokompente *E. coli* Stamm M15 [pRep] mit den ligierten Plasmiden transformiert werden. Die transformierten Bakterien wurden nach 30-minütiger Inkubation in LB-Medium auf LB-Agar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte mit Hilfe der Antibiotika Carbpenicillin und Kanamycin. Der elektrokompente Stamm M15 [pRep] trägt auf dem pRep-Plasmid eine Kanamycinresistenz. Der pQE-30 Vektor hingegen vermittelt eine Carbpenicillin-Resistenz.

Ergebnisse

Von den erhaltenen Klonen wurden über Nacht Flüssigkulturen in LB-Medium angesetzt. Das Hydrophobin B-Gen stand in diesem Vektorsystem unter der Kontrolle eines lac-Operator Systems und konnte am folgenden Tag durch die Zugabe von IPTG induziert werden. Mit Hilfe eines SDS-Gels wurde die Expression der verschiedenen Klone überprüft. Zusätzlich wurde von den Klonen ein Colonyscreening durchgeführt. Abbildung 10 zeigt ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit den induzierten Klonen 1-8. Im Gel konnte keine differentiell exprimierte Bande gefunden werden.

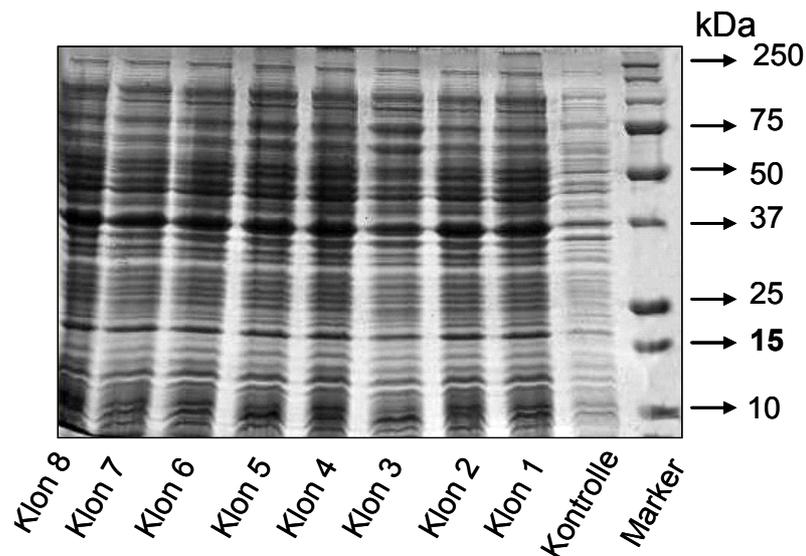


Abbildung 10: SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der Zelllysate von positiven Klonen nach IPTG-Induktion.

Von den Proteinen, die sich in der Kontroll-PCR als positiv erwiesen hatten, wurde willkürlich ein Klon ausgewählt und das pQE-30 Plasmid dieses Klones im Bereich der Insertionsstelle sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass das Hydrophobin B Gen in richtiger Orientierung im Vektor vorlag und dass die Sequenz keine Mutationen aufwies. Als nächstes wurden unterschiedliche Temperaturen, unterschiedliche Fragmentgrößen des Gens (z.B. mit und ohne Signalsequenz), verschiedene Konzentrationen von IPTG und unterschiedlich lange Induktionszeiten erprobt. Leider war es auch nach Variationen dieser unterschiedlichen Bedingungen nicht möglich, das Hydrophobin B überzuexprimieren.

3.1.1.3. Herstellung von Melanin-„Ghosts“

Viele Pilzarten produzieren Pigmente, welche grün-blau, schwarz-braun, schwarz oder weiß sein können. Die Melanin-Synthese wurde bei vielen humanpathogenen Pilzen wie z.B. bei *Aspergillus fumigatus* (Jahn *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998; Langfelder *et al.*, 1998), *Cryptococcus neoformans* (Nosanchuk *et al.*, 2000) und *Sporothrox schenkii*

(Romero-Martinez *et al.*, 2000; Moris-Jones *et al.*, 1993) als Virulenzfaktor beschrieben. Melanine haben z.B. bei *C. neoformans* die Fähigkeit, die Pilze gegen das Antimykotikum Amphotericin B, gegen die Phagozytose durch Makrophagen und gegen mikrobiologische Peptide und ultraviolettes Licht zu schützen.

A. fumigatus produziert ein blau-grünes Pigment, das so genannte Dihydroxynaphtalen-Melanin. Die Produktion verläuft über den Dihydroxynaphtalen (DHN-) Signalweg. Zwei Gene, die an der Biosynthese des DHN-Melanins beteiligt sind, *alb1* und *arp1*, welche für eine Polyketid-Synthase bzw. für eine Scytalon-Dehydratase codiert, sind kloniert worden (Tsai *et al.*, 1997, 1998, 1999; Langfelder *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2000). Einige Studien belegen, dass Sporen, die dieses Pigment aufgrund eines Defekts des Polyketide Synthase Gens *pksP* nicht besitzen, eine reduzierte Virulenz im Mausmodell zeigen (Jahn *et al.*, 1997; Langfelder *et al.*, 1998, Tsai *et al.*, 1998, 1999). Sie binden deutlich besser an das Komplement und weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika auf. Melanin hemmt offenbar die oxidative Antwort der humanen Phagozyten, was die intrazelluläre Überlebensrate der Sporen in den Phagozyten erhöht (Jahn *et al.*, 2002).

Wang *et al.* ist es 1996 gelungen, die leere Pigmenthülle von *C. neoformans* zu isolieren, die sie Melanin-„Ghosts“ genannt haben (Wang *et al.*, 1996). Die Herstellung beruhte auf der Beobachtung, dass das Melanin auf den Zellen nach Behandlung mit Guanidin Thiocyanat und HCL noch erhalten blieb. Youngchim *et al.* stellten 2004 Melanin-„Ghosts“ von *Aspergillus fumigatus* her, immunisierten Balb/C- Mäuse damit und generierten Antikörper gegen die Melanin-Partikel. Diese Antikörper reagieren mit der Oberfläche der Sporen (Youngchim *et al.*, 2004).

Da es ein Ziel dieser Arbeit war, Antikörper zu generieren, die gegen die Hüllschicht von *A. fumigatus*-Sporen gerichtet sind, wurden so genannte Melanin-„Ghosts“ hergestellt, mit welchen anschließend zwei Balb/C-Mäuse immunisiert wurden. Hierzu wurden WT-Sporen sowie Sporen der *pksP*-Mutante isoliert, mit Zellwand-lysierten Enzymen (Novozyme) behandelt und mit Guanidin Thiocyanat über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie mit Proteinase K bei 37 °C inkubiert und zum Schluss mit 6 M HCL 1,5 Stunden bei 100 °C gekocht (siehe auch 2.11.1.14). In Abbildung 11 sind vier Eppendorf-Gefäße dargestellt, die zum einen die Sporen des WT (in A) und der *pksP*-Mutante vor der Behandlung darstellt (in B) und zum anderen die jeweiligen -„Ghosts“ (in A' und B'). Suspension aus A' wurde zur Immunisierung verwendet. Die Abbildung zeigt, dass die Menge der „Ghost“-Suspensionen im Vergleich zur Ausgangssuspension abnimmt (A', B'), dass aber die Pigmentierung erhalten bleibt (A', B').

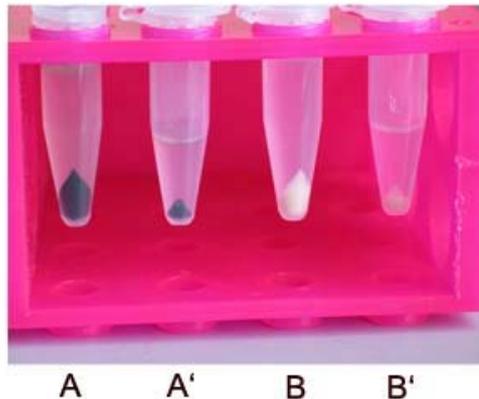


Abbildung 11: WT-Sporen (A) und der *pksP* Mutante-Sporen vor (B) und nach der Behandlung mit Enzymen und denaturierender heißer Säure (A' und B').

3.1.1.3.1. Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Melanin-„Ghosts“

Mit den in Abbildung 11 dargestellten WT Melanin-„Ghosts“ wurden Balb/C-Mäusen am Tag 1, Tag 14 und Tag 28 immunisiert, die Lymphknoten wurden am 32. Tag entnommen und zerkleinert und eine Einzelzellsuspension wurde hergestellt. Die B-Zellen wurden mit Myelomzellen fusioniert und die so entstandenen Hybridomzellen auf positive Antikörpersekretion in der Immunfluoreszenz getestet (siehe Material und Methoden 2.13.1). Es wurden insgesamt 240 Überstände in der Immunfluoreszenz mit WT-Ghosts auf positive Antikörper getestet. Insgesamt zeigten 7 Antikörper eine Reaktion. Einer der Antikörper ist in Abbildungen 12 dargestellt. Abbildung 12 zeigt die Bindung des Antikörpers auf WT-„Ghosts“ und WT-Sporen. Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus Cy3-konjugierter Antikörper. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist der anti-Melanin Antikörper in der Lage *A. fumigatus*-Sporen (Abb. 12 G-H) und auch Ghosts (C-D) zu erkennen. Die Färbung ist jedoch nicht sehr homogen, denn einige Sporen wurden sehr stark (Abb.12 H), andere wiederum sehr schwach oder gar nicht angefärbt (Abb.12 F). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der anti-Melanin Antikörper ebenfalls die Sporen der Negativkontrolle, also die *pksP*-Sporen, anfärbt (siehe Abbildung 13 C-D).

In weiteren Versuchen wurde außerdem untersucht, ob der anti-Melanin Antikörper auch andere *Aspergillus*-Arten erkennt: Getestet wurde der Antikörper auf *A. fumigatus* WT- (A-B), *pksP*-Mutante- (C-D), pigmentlose, weiße UV-Mutante- (E-F), *A. terreus*- (G-H) *A. flavus*- (I-J) *A. giganteus*- (K-L), *A. niger*- (M-N) und *A. nidulans*- (O-P) Sporen.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dargestellt. Es stellte sich heraus, dass der Antikörper nicht für die Erkennung von *A. fumigatus*-Sporen geeignet ist. Ein weiterer

Ergebnisse

Nachteil ist die Tatsache, dass er auch nicht für die Erkennung von unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen geeignet ist.

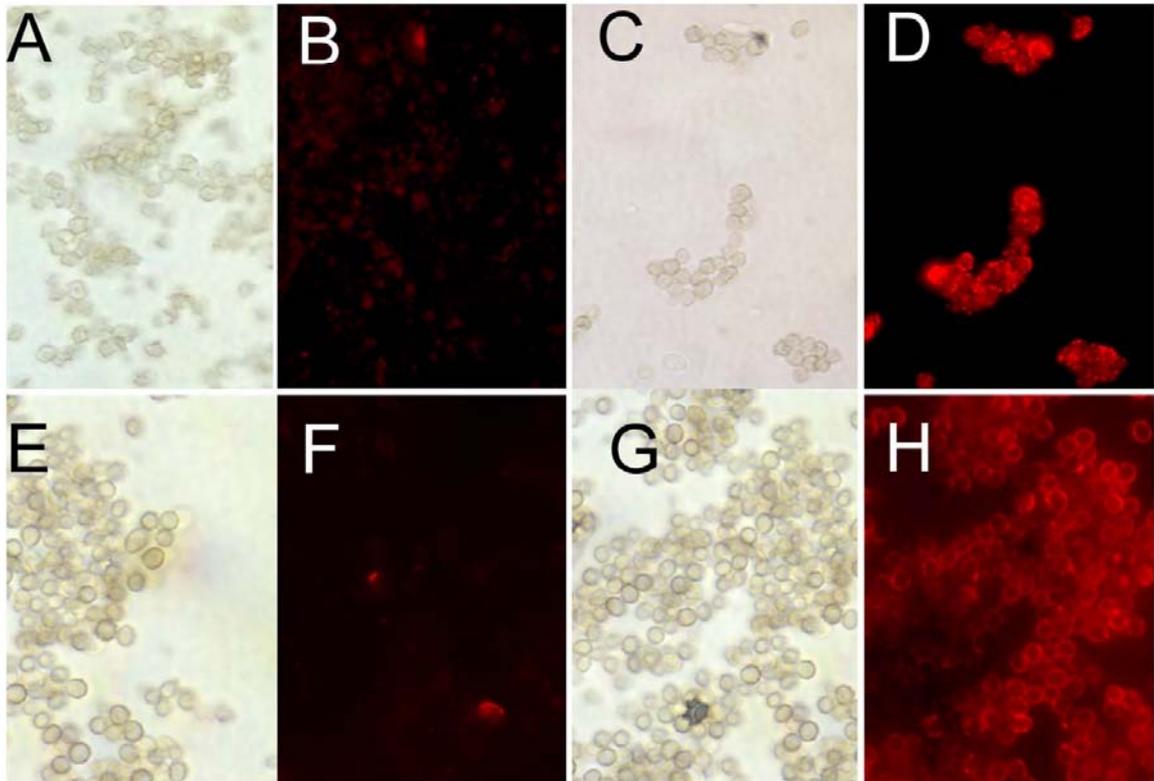


Abbildung 12: Hellfeld-/ und Immunfluoreszenzbilder von *A. fumigatus*-Melaninpartikeln (C-D) und *A. fumigatus*-Sporen (G-H), die mit Hilfe des anti-Melanin Antikörpers gefärbt wurden. In A-B und E-F sind die jeweiligen Kontrollfärbungen mit dem anti-Maus Cy3-konjugierter Sekundärantikörper dargestellt.

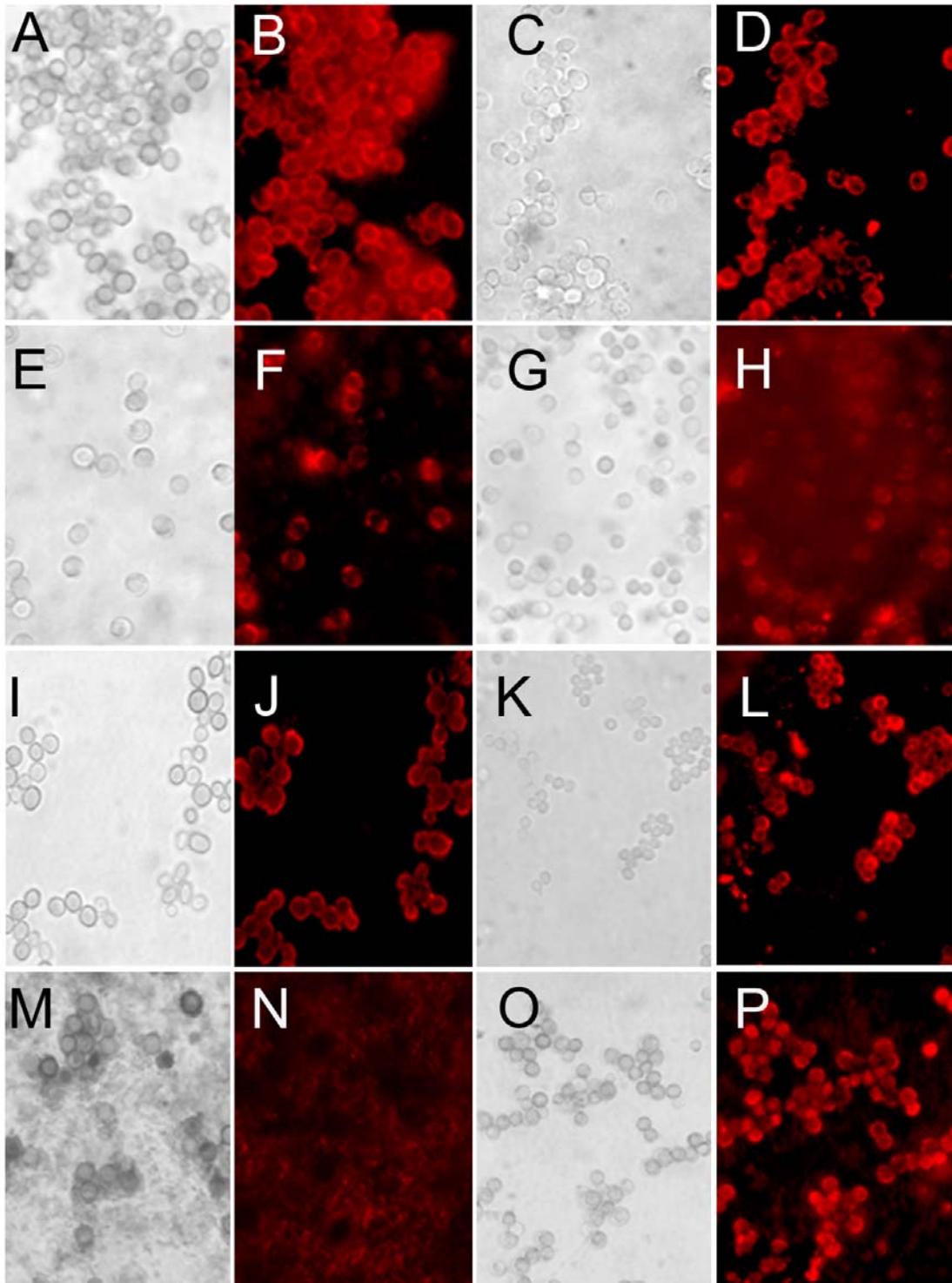


Abbildung 13: Hellfeld-/ und Immunfluoreszenzbilder von unterschiedlichen *Aspergillus*-Arten, die mit Hilfe des anti-Melanin Antikörpers gefärbt wurden. (A-B *A. fumigatus*; C-D *pksP*-Mutante; E-F UV-Mutante, *A. terreus*; G-H Laccase Mutante, I-J *A. flavus*; K-L *A. giganteus*; M-N *A. niger*; O-P *A. nidulans*)

3.1.2. Der „Biotin-Calcofluor-Staining (BCS)“-Assay

Die Herstellung von spezifischen Anti-*Aspergillus* Antikörpern erwies sich, wie oben beschrieben, als recht schwierig. Außerdem ist ein Nachteil von Anti-*Aspergillus* Antikörpern, dass ihre Anwendung begrenzt ist und sich häufig nicht auf andere *Aspergillus*-Arten und Pilzarten übertragen lässt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der schnelle und einfache BCS-Assay etabliert, bei dem man zwischen phagozytierten und nicht phagozytierten Sporen unterscheiden kann, ohne auf die Anwesenheit von Antikörpern angewiesen zu sein (siehe Material und Methoden 2.13.2).

Um diese Methode durchführen zu können, wurden Zellen einen Tag vor der Infektion auf Deckgläschen kultiviert und mit biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen infiziert (siehe Material und Methoden 2.10.12). Anschließend wurden die infizierten Zellen fixiert und gefärbt. Extrazelluläre biotinylierte Sporen wurden mit Cy3-Streptavidin angefärbt, ein Farbstoff, der membranundurchlässig ist und damit nur an das Biotin der extrazellulären Sporen binden kann. Anschließend erfolgte die Färbung von intra- und extrazellulären Sporen mit Calcofluor. Dieser Farbstoff kann auch die Zellmembran nicht permeabilisierter Zellen durchdringen. Die Zellmembran der Wirtszelle lässt sich mit Hilfe von Concanavalin A-FITC anfärben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskop mikroskopiert, und mit Hilfe der Metamorph-Software ließen sich die einzelnen Fluoreszenzen übereinander lagern und anschließend auswerten. Bei der Auswertung der Präparate mit dem Mikroskop kann sofort zwischen extra- (blau-rot gefärbt) und intrazellulären (nur blau gefärbt) Sporen unterschieden werden, so dass die Präparate differenziert ausgezählt werden können. In Abbildung 14 A-C sind beispielhaft die einzelnen Färbungen dargestellt. In Abbildung 14 A sind alle extrazellulären Sporen dargestellt, die Streptavidin-Cy3 gefärbt wurden. Die Gesamtheit der Calcofluor gefärbten Sporen ist in 14 B wiedergegeben. Abbildung C zeigt die Concanavalin A gefärbten Zellen in grün. Abbildung D zeigt die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbilder aus 14 A-C.

Mit Hilfe des BCS-Assays ist es möglich, die Phagozytoseeffizienz von unterschiedlichen Zelltypen zu ermitteln. In Abbildung 15 ist eine Zeitreihe der Infektion von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Zellen und MHS-Zellen nach 1, 3 und 6 h dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, dass mit der Dauer der Infektionszeit eine Zunahme in der Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen zu beobachten ist. Nach 1 h sind 22,4 % (+/- 4,2) Sporen in den MHS-Zellen phagozytiert worden, nach 6 h sind es 34,4 % (+/- 3,3) Sporen. J774-Zellen zeigten eine geringere Phagozytosebereitschaft, hier waren nach 1 h 14,8 % (+/- 5,9) Sporen intrazellulär, nach 6 h waren es 26,7 % (+/- 13,1) Sporen. Insgesamt wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt. Aufgetragen wurde der

Ergebnisse

Anteil der intrazellulären Sporen in der Gesamtheit aller zellassoziierten Sporen in Prozent.

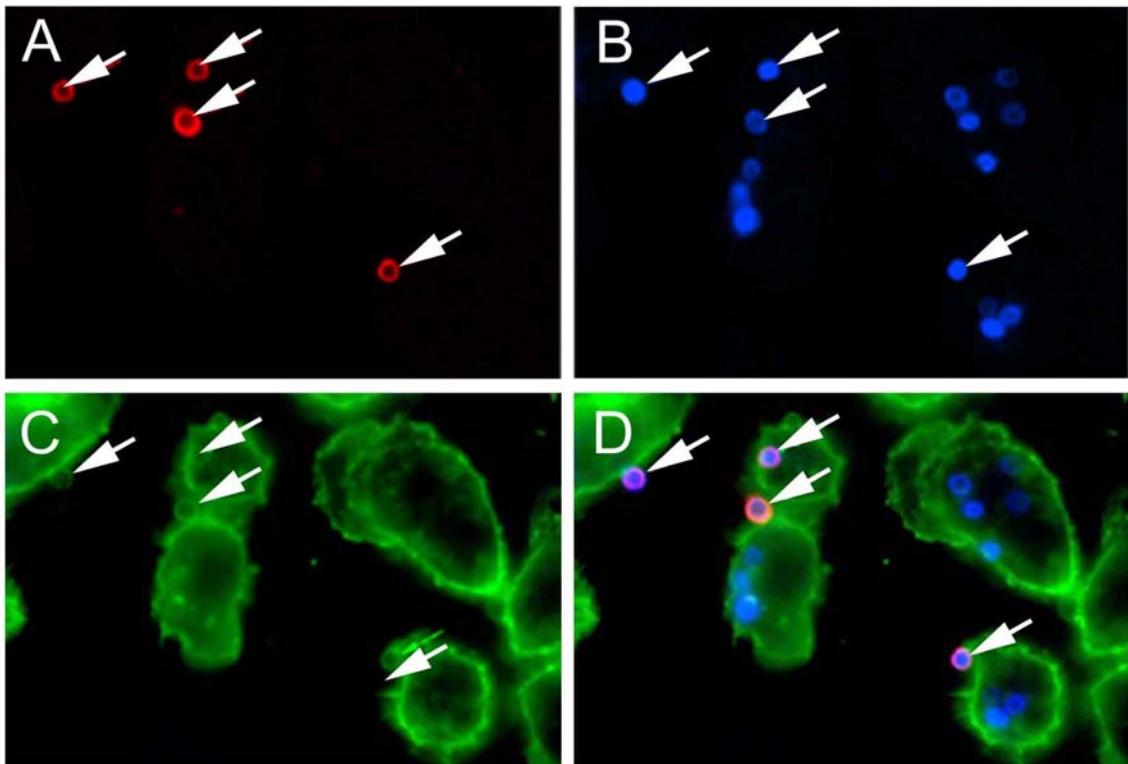


Abbildung 14: Phagozytose von biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen durch J774-Zellen nach 1 h Infektion. In A) sind alle extrazellulären Sporen dargestellt (detektiert mit Streptavidin-Cy3 [rot], siehe weiße Pfeile). In B) sind alle intra- und extrazellulären Sporen mit Calcofluor angefärbt [blau]. C) J774-Zellen wurden mit Concanavalin A visualisiert [grün]. In D) ist die Überlagerung von allen Fluoreszenzen gezeigt.

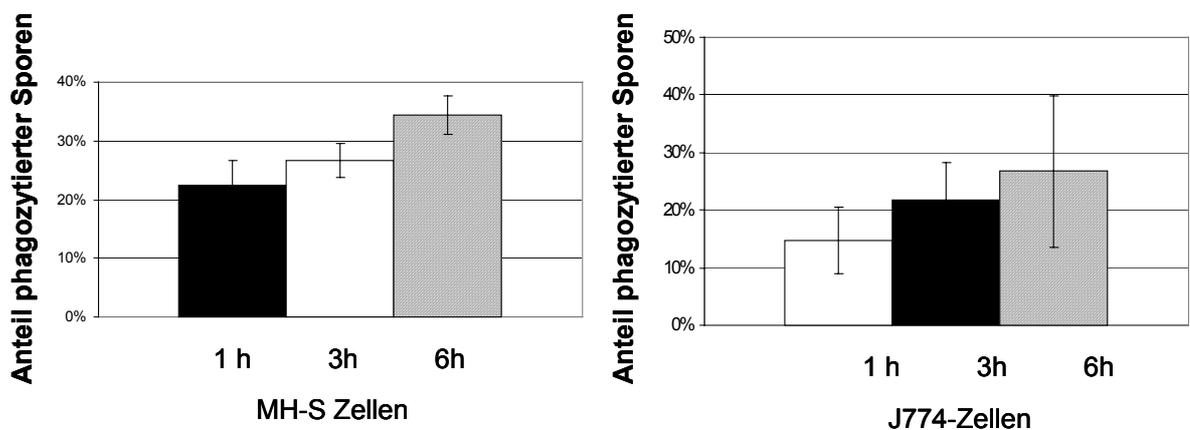


Abbildung 15: Phagozytoseraten von *A. fumigatus*-Sporen durch MH-S Zellen und J774-Zellen 1, 3 und 6 h Postinfektion. Die Phagozytoseraten wurden mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt. Insgesamt wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

3.1.3. Einfluss der „Biotinylierung“ auf das Verhalten von Sporen

3.1.3.1. Einfluss auf die Auskeimung

Um zu überprüfen, ob die Biotinylierung einen Einfluss auf Sporen hat, wurde zunächst die Auskeimung untersucht. Hierzu wurden biotinylierte- und nicht-biotinylierte Sporen 24 h in AMM-Medium inkubiert, ihr Auskeimungsverhalten wurde beobachtet, und verglichen. Anschließend wurden zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h, 9 h und 24 h Sporen aus der Kultur entnommen und unter dem Mikroskop wurde das Entwicklungsstadium analysiert. In Abbildung 16 ist der Anteil ausgekeimter Sporen dargestellt. Der Graph zeigt, dass sowohl die mit Biotin-markierten als auch die unmarkierten Sporen ein ähnliches Auskeimungsverhalten besitzen. Biotinylierte sowie nicht-biotinylierte Sporen keimten in den ersten 9 h nur mit einem sehr geringen Prozentsatz aus. Das Auskeimungsmaximum lag bei den biotinylierten Sporen nach 9h bei 9,2 % und bei den nicht-biotinylierten Sporen bei 9,1 %. In den folgenden Stunden stieg die Auskeimungsrate dann allerdings rapide an und erreichte bei den biotinylierten Sporen nach 24 h 66,7 % und bei den nicht-biotinylierten Sporen 59,2 %. Insgesamt wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

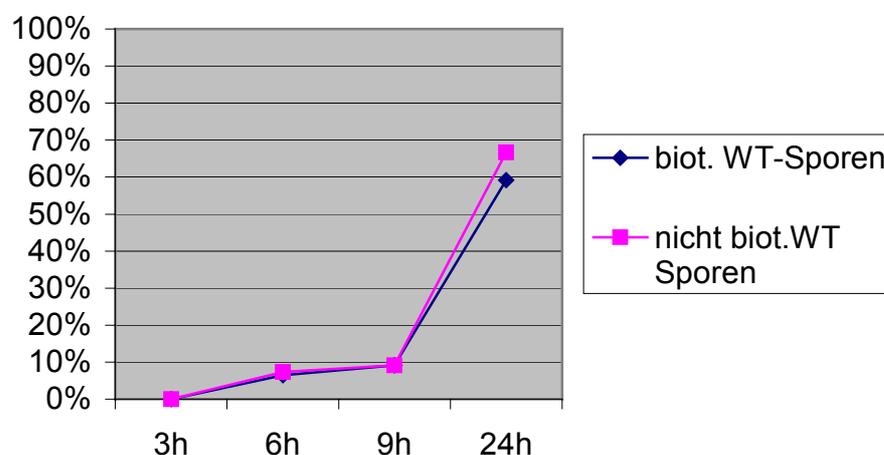


Abbildung 16: Quantifizierung der Germination von biotinylierten und nicht biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen während eines Wachstums in Minimal Medium (AMM) und einer Zeitspanne von 24 h.

3.1.3.2. Einfluss auf die Zelladhäsion

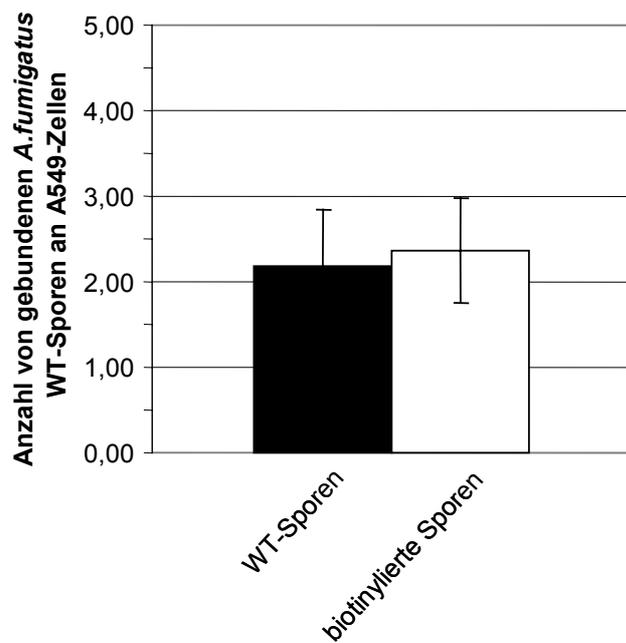
Des Weiteren wurde untersucht, ob die Biotinylierung von Sporen einen Einfluss auf die Bindung an Zellen hat. Hierzu wurden in zwei Experimenten biotinylierte und nicht-biotinylierte Sporen mit A549-Zellen, die am Vorabend auf Deckgläschen kultiviert

Ergebnisse

worden waren, für 1 h inkubiert, fixiert und anschließend gefärbt. Die A549-Zellen wurden mittels Concanavalin A, die Sporen mit Calcofluor in blau angefärbt. Anschließend wurde aus beiden Experimenten die Menge an gebundenen Sporen pro Zelle ausgezählt. In Abbildung 17 A ist die Quantifizierung der Bindung von biotinylierten und nicht biotinylierten Sporen an die A549-Zellen graphisch dargestellt. Insgesamt wurden 100 Zellen pro Experiment gezählt.

Die Auszählung ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl gebundener Sporen. Die entsprechenden Immunfluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 17 B gezeigt. Auch hier erkennt man keinen Unterschied an der Anzahl von nicht biotinylierten (B.a) und biotinylierten (B.b) *A. fumigatus*-Sporen, die an den A549-Zellen adhären.

A



B

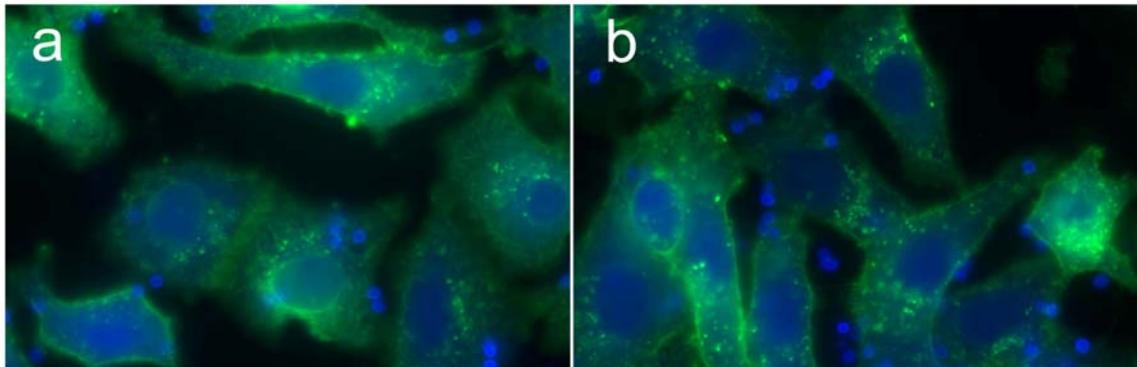


Abbildung 17: A) Quantifizierung der Bindung von biotinylierten und nicht biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen. B) Fluoreszenzaufnahme der Bindung von biotinylierten (a) und nicht biotinylierten (b) *A. fumigatus*-Sporen an A549-Zellen. Die Sporen wurden mit Calcofluor blau angefärbt, die Zellen wurden mit Concanavalin A in grün angefärbt.

3.1.3.3. Vergleich zwischen der Phagozytose biotinylierter und Antikörper-gefärbter Sporen

Um sicher zu gehen, dass durch die Biotinylierung die Oberfläche der *A. fumigatus*-Sporen nicht verändert wird und somit vielleicht die Phagozytose beeinflusst, wurde die Phagozytose von biotinylierten Sporen und unbehandelten Sporen, die anschließend mit einem anti-*Aspergillus* Antikörper (der freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bouchara aus Paris zur Verfügung gestellt wurde) gefärbt wurden, gegenübergestellt. Für die Darstellung der biotinylierten Sporen in rot diente Streptavidin-Cy3, die WT-Sporen konnten mit Hilfe von einem anti-Kaninchen Sekundärantikörper, der Cy3 markiert war, angefärbt werden. Biotinylierte WT-Sporen wurden mit einer Effizienz von 18,3 % (+/-1,3 %) aufgenommen. Die Sporen, die mit dem Antikörper gefärbt wurden, zeigten eine Phagozytoserate von 21,03 % (+/-1,0 %). Aus dem Vergleich geht hervor (siehe Abbildung 18), dass die biotinylierten Sporen genauso effizient phagozytiert werden wie die nicht biotinylierten Sporen. Es wurden insgesamt zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

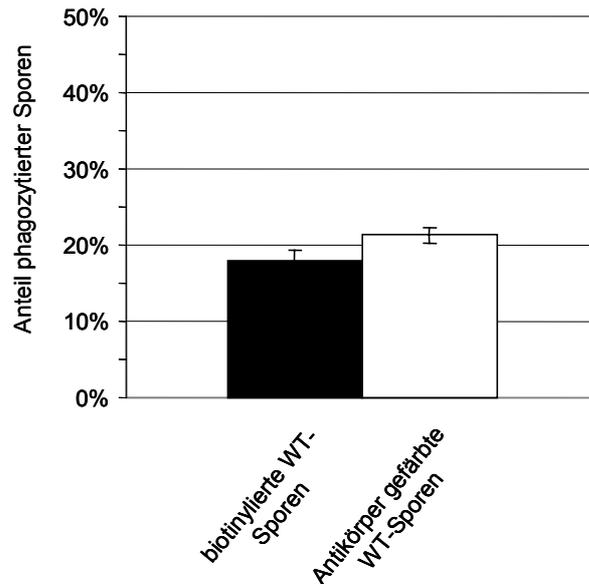


Abbildung 18: Vergleich der Phagozytoseraten von biotinylierten Sporen und Sporen, die mit einem anti-*Aspergillus* Antikörper gefärbt wurden. Es wurden insgesamt zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.1.3.4. Biotinylierung und Färbung von unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen

Ein großer Vorteil des BCS-Assays ist die Tatsache, dass die Phagozytose von unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen und sogar von anderen Pilzarten untersucht werden kann, ohne passende Antikörper generieren zu müssen. Um dies zu verdeutlichen, wurden Sporen von fünf *Aspergillus*-Stämmen isoliert und biotinyliert. Bei den Stämmen handelte es sich um *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. flavus* und *A. giganteus*. In Abbildung 19 sind die Sporen der fünf biotinylierten *Aspergillus*-Stämme dargestellt, die mit Hilfe des Streptavidin-Cy3 gefärbt wurden. Zusätzlich zeigt die Abbildung elektronenmikroskopische Aufnahmen der jeweiligen *Aspergillus*-Sporen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen, dass sich alle *Aspergillus*-Stämme trotz unterschiedlicher Morphologien in gleicher Weise anfärben lassen.

Zusätzlich wurden J774-Makrophagen auf Deckgläschen kultiviert und mit den fünf biotinylierten *Aspergillus*-Stämmen für 1 h infiziert, anschließend Formaldehyd fixiert und gefärbt. Abbildung 20 zeigt die Phagozytoseraten für die fünf unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämme in J774-Makrophagen. Aus Abbildung 20 geht hervor, dass *A. fumigatus* mit 33,7 % (+/- 0,4 %) am effizientesten phagozytiert wurde. *A. nidulans* erzielte Phagozytoseraten von 22,8 % (+/- 1,6 %), *A. flavus* 18,8 % (+/- 0,0 %) und *A. terreus* 13,0 (+/- 1,4 %) zeigten dazwischenliegende Phagozytoseraten während *A.*

Ergebnisse

giganteus mit 4,2 % (+/- 2,4 %) am schlechtesten phagozytiert worden ist. Es wurden insgesamt zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

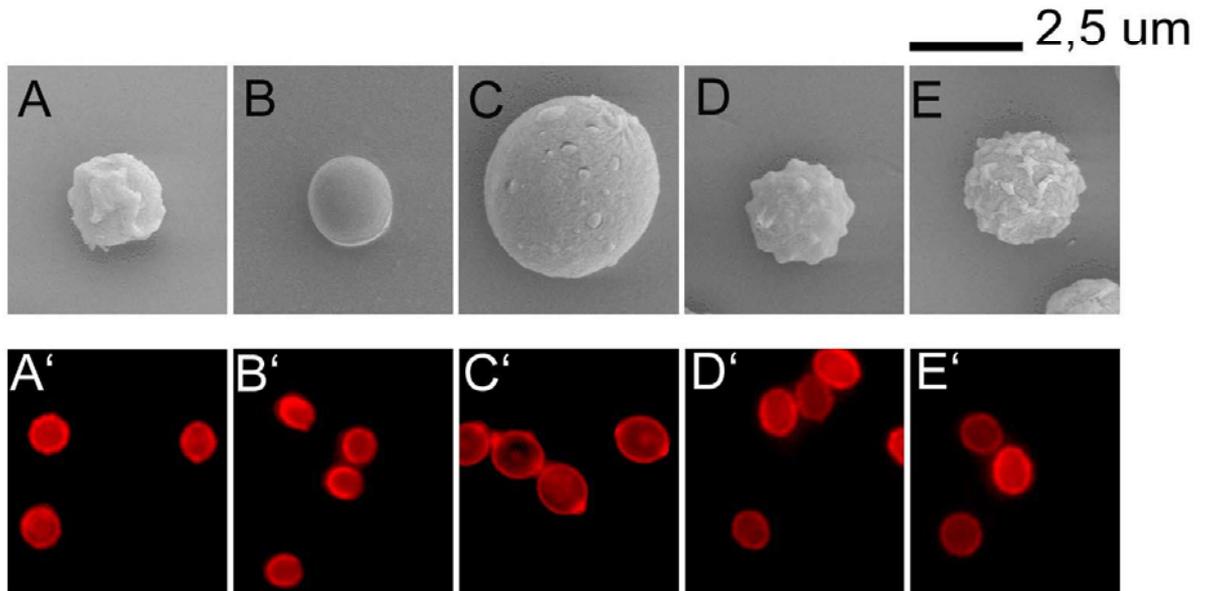


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (A-E) und Anfärbung biotinylierter Sporen (A'-E'). Sporen der folgenden fünf *Aspergillus*-Stämme wurden isoliert, biotinyliert und mit Streptavidin Cy3 angefärbt: *A. fumigatus* (A und A'), *A. terreus* (B und B'), *A. flavus* (C und C'), *A. nidulans* (D und D') und *A. giganteus* (E und E'). Maßstab (2,5 µm gilt für A-E).

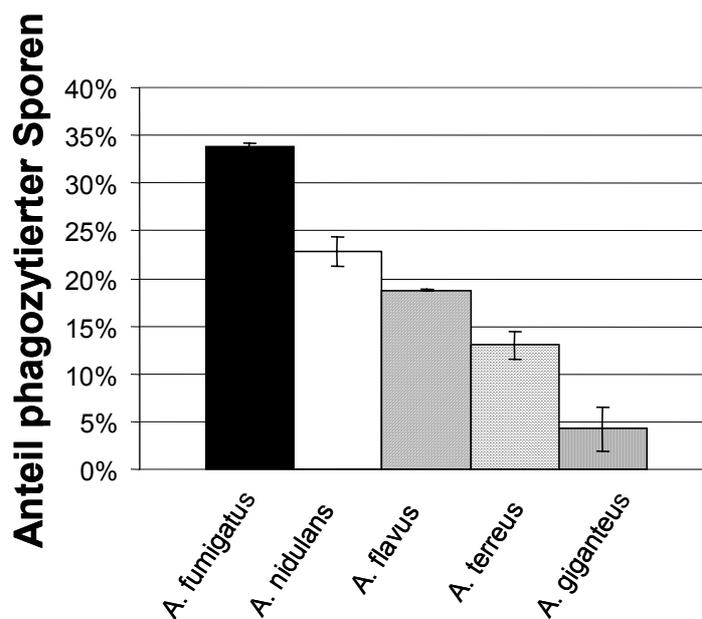


Abbildung 20: Phagozytoserate fünf unterschiedlicher *Aspergillus*-Arten 1 h nach Infektion in J774-Makrophagen (1 h). Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt. Es wurden insgesamt zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.1.3.5. Biotinylierung und Färbung von *Candida albicans*

Um die breitere Einsetzbarkeit der Biotinylierungs-Methode zu zeigen, wurden *C. albicans* Hefen biotinyliert und der BCS-Assay durchgeführt. *C. albicans* ist eine humanpathogene Hefe, die neben *A. fumigatus* den häufigsten Erreger systemischer Pilzinfektionen darstellt.

Abbildung 21 zeigt die Infektion von J774-Zellen mit biotinylierten *C. albicans* Hefen nach 1 h Infektion. In A sind alle extrazellulären *C. albicans*-Sporen zu sehen, die Streptavidin-Cy3 gefärbt wurden. Alle Hefen wurden mit Hilfe von Calcofluor blau angefärbt (siehe B). Die infizierten Makrophagen wurden mit Concanavalin A gefärbt (siehe C); in D sind alle Färbungen übereinandergelagert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Methode, wie bereits für *A. fumigatus*, prinzipiell auch zur Quantifizierung der Phagozytose von anderen Pilzspezies eingesetzt werden kann.

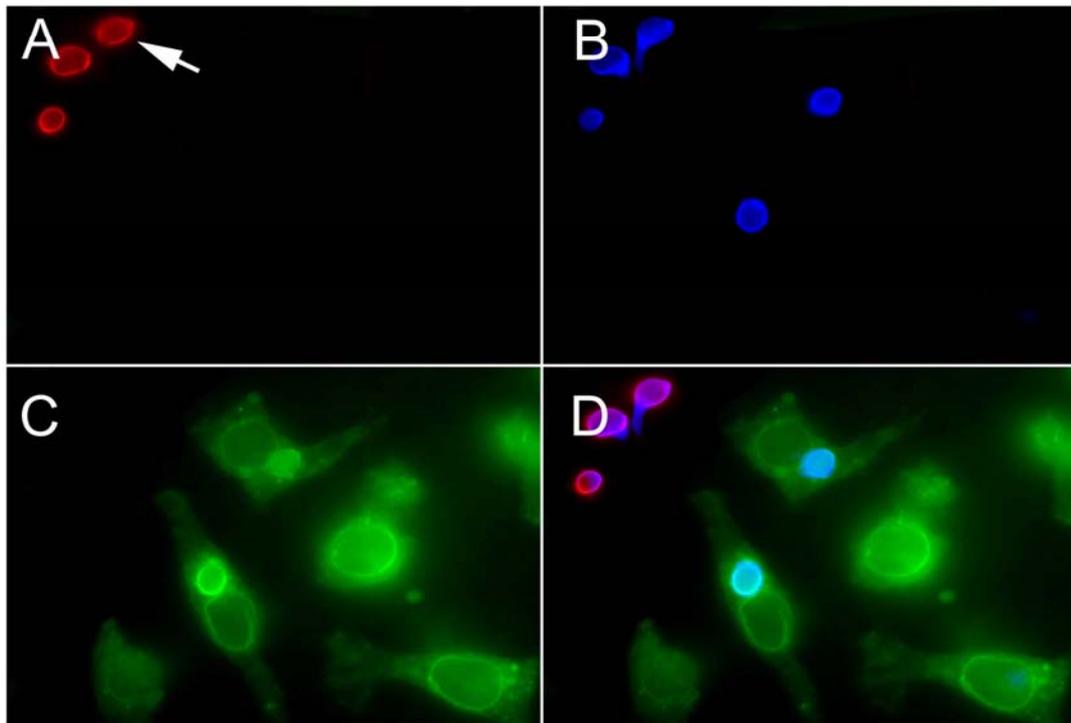


Abbildung 21: Phagozytose von biotinylierten *C. albicans*-Sporen in J774-Zellen nach 1 h Infektion. In A) sind alle extrazellulären Sporen dargestellt (detektiert mit Streptavidin-Cy3 [rot]). In B) sind alle intra- und extrazellulären Sporen mit Calcofluor angefärbt [blau]. J774-Zellen wurden mit Concanavalin A visualisiert [grün]. In C) ist die Überlagerung aller Fluoreszenzen gezeigt.

3.1.3.6. Phagozytose von Sporen unterschiedlicher klinischer *A. fumigatus*-Isolate

Mit Hilfe des BCS-Assays wurden die Phagozytoseraten von Sporen analysiert, die von Patienten isoliert worden waren, die an einer cystischen Fibrose litten. Als Kontrolle wurde der *A. fumigatus*-Stamm ATCC 46645 verwendet, der auch in den übrigen Experimenten untersucht worden war und als etablierter Laborstamm verwendet wird. Der Stamm ATCC 46645 wurde aus der Lunge eines Patienten isoliert, der 1955 an einer invasiven Aspergillose litt (Hearn und Mackenzie, 1980). Der Wert für diesen Referenzstamm wurde auf 100 % gesetzt; die Werte der Phagozytoseraten der Isolate sind im Verhältnis zu diesem Wert in Prozent angegeben (siehe Abbildung 22).

Wenn man die vier Isolate untereinander betrachtet, gibt es keinen deutlichen Unterschied im Bezug auf die Phagozytoserate. Wenn man jedoch die vier Isolate mit dem Referenzstamm vergleicht, kann man erkennen, dass diese mit einer deutlich geringeren Effizienz phagozytiert wurden.

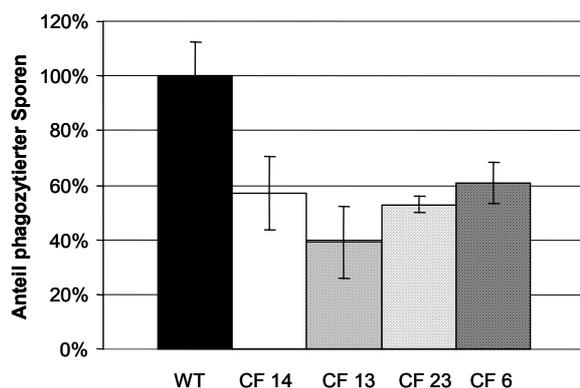


Abbildung 22: J774-Makrophagen wurden mit Sporen infiziert, die aus der Lunge von Patienten isoliert worden waren, die an Cystischer Fibrose litten. Als Kontrolle wurde der ATCC 46645 *Aspergillus*-Stamm eingesetzt. Der Prozentsatz der intrazellulären Sporen nach 1 h wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt. Die Effizienz der Phagozytose wurde in Relation zum Referenzstamm gemessen. Die Daten stammen aus 3 parallelen Ansätzen.

3.2. Untersuchungen der Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Sporen

3.2.1. Charakterisierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Um die Abhängigkeit der Sporen-Phagozytose von Aktin und Mikrotubuli sowie von Effektorproteinen (u.a. Kinasen) zu untersuchen, wurden drei Zelltypen, d.h. humane Makrophagen, die aus peripheren Blutlymphozyten ausdifferenziert wurden, verwendet sowie die murinen Makrophagen Zelllinie J774 und MH-S, wobei letztere Eigenschaften von Alveolarmakrophagen besitzen sollen (Mbawuiké und Herscowitz, 1989). Diese verschiedenen Makrophagentypen wurden jeweils mit acht verschiedenen Inhibitoren behandelt und anschließend mit *A. fumigatus*-Sporen für 1 h infiziert. Bei den Inhibitoren handelte es sich um Cytochalasin D, Nocodazol, 2,3 Butanedion Monoxim, Genistein, PP2, Tyrphostin (AG18), Wortmannin und Amilorid. Die Wirkungsweisen und die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Cytochalasin D ist ein Inhibitor, der an G-Aktin bindet und die Polymerisation der Aktinmonomeren verhindert (Sampath und Pollard, 1991).

Um die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Phagozytose zu untersuchen, wurde Nocodazol eingesetzt. Nocodazol bewirkt eine Depolymerisation der Mikrotubuli (Cheung und Terry, 1980).

Neben Nocodazol wurde 2,3 Butanedion Monoxim eingesetzt. 2,3 Butanedion Monoxim ist ein Inhibitor der Myosin/Aktin Interaktionen (Swanson *et al.*, 1999).

Wortmannin ist ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3 Kinase) und der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Um Partikel internalisieren zu können, kommt dort, wo der Partikel phagozytiert werden soll, zur Aktinpolymerisation sowie zur Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pi-3 Kinase) (Rupper *et al.*, 2001).

Da Tyrosin-Phosphorylierungen von Effektorproteinen wichtige Bestandteile vieler Signaltransduktionskaskaden u.a. für den Phagozytoseprozess sind, wurden drei Tyrosin-Kinase Inhibitoren eingesetzt. Die Inhibitoren Genistein und AG 18 inhibieren Tyrosin-Kinasen im Allgemeinen (Akiyama *et al.*, 1987), und PP2 ist ein spezifischer Inhibitor der Scr-Kinasen (Gutwein *et al.*, 2000).

Außerdem kam der Inhibitor Amilorid zum Einsatz. Amilorid inhibiert Makropinozytose (Sarkar *et al.*, 2005). Dieser Prozess bezeichnet die Aufnahme größerer Flüssigkeitsmengen. Dies geschieht durch Ausstülpungen der Zellmembran, die durch das Aktinzytoskeletts gebildet werden.

Ergebnisse

Die Makrophagen wurden 30 min (bzw. 4 h für AG 18) vor der Infektion mit den jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert, und anschließend erfolgte die Infektion mit den Sporen, wobei eine MOI von 10 eingesetzt wurde. Das Medium mit den zugesetzten Inhibitoren wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht gewechselt. Nach 1 h erfolgte die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd. Anschließend wurde der BCS-Assay durchgeführt und die Zellen wurden mikroskopisch untersucht und ausgewertet. Als Positivkontrolle diente jeweils ein Präparat ohne zugesetzten Inhibitor. Insgesamt wurden zwischen 150 und 400 Sporen ausgezählt.

Tabelle 12: Eingesetzte Konzentration und Wirkungsweisen der verwendeten Inhibitoren.

Inhibitoren	Wirkungsweise	Eingesetzte Konzentrationen
Cytochalasin D	bindet an +-Enden und verhindert damit die Polymerisation von Aktinmonomeren	2 μ M
Nocodazol	bewirkt Depolymerisation der Mikrotubuli	5 μ M
2,3 Butanedion Monoxim	Inhibitor der Myosin/Aktin Interaktionen	10 mM
Genistein	Tyrosin-Kinase Inhibitor	250 μ M
AG 18 (Tyrphostin)	Tyrosin-Kinase Inhibitor (Tyrphostin)	0,2 μ M
Wortmannin	Spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3) und der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK)	1 μ M
PP2	spezifischer Inhibitor der Scr-Kinasen	25 μ M
Amilorid	Inhibitor der Makropinocytose	200 μ M

3.2.1.1. Effekte der Inhibitoren auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Abbildung 23 zeigt die Phagozytoseraten von *A. fumigatus*-Sporen in unbehandelten Zellen (Kontrollen) und mit Inhibitoren behandelten Zellen. Es wurden jeweils drei Auszählungen vorgenommen. Die Auswahl der infizierten Zellen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Werte der Kontrollen (ohne Inhibitor) wurden auf 100 % gesetzt, die inhibitorischen Effekte sind im Verhältnis zu dem Wert der Kontrolle angegeben.

Den geringsten Effekt auf die Phagozytose zeigte Nocodazol. Hier wurde mit einer Endkonzentration von 5 μ M eine Phagozytoserate von 75,8 % (+/- 3,4) in humanen Zellen, 71,1 % (+/- 0,4) in MHS-Zellen und 72,8 % (+/- 6,3) in J774-Zellen erzielt. Dieses

Ergebnisse

Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass das Mikrotubuli-System eine untergeordnete Rolle spielt.

Einen stärkeren Einfluss hingegen zeigt Cytochalasin D. Mit einer Konzentration von 2 μM wurde die Phagozytose um 65,9 % in humanen Zellen, 69,7 % in MHS-Zellen und 51,7 % in J774-Zellen blockiert. Somit scheint Aktin bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen eine wichtige Rolle einzunehmen.

Einen ähnlichen inhibitorischen Effekt zeigt Butanedion Monoxim. Nach 1 h Infektion und 10 mM Butanedion Monoxime-Einsatz liegen die Phagozytoseraten bei 42,2 % (+/- 0,5) in humanen Zellen, 22,2 % (+/- 2,7) in MHS-Zellen und 8,0 % (+/- 4,4) in J774-Zellen.

Den stärksten inhibitorischen Effekt verursachen die Inhibitoren Wortmannin und Genistein. Unter dem Einfluss des Inhibitors Wortmannin sind nach 1 h in den humanen Zellen lediglich 2,4 % (+/- 0) der Sporen intrazellulär. In J774-Makrophagen sind 4 % (+/- 2,9) und in den MHS-Zellen sind 3,0 % (+/- 0,5) der Sporen phagozytiert worden. Auch durch Behandlung mit dem Inhibitor Genistein lässt sich die Phagozytose um 81,1 % in humanen Zellen, 87,3 % in MHS-Zellen und 87,2 % in den J774-Zellen, hemmen.

Die Kinase-Inhibitoren PP2 und AG 18 sind in der Lage, die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in allen drei Zelltypen ebenfalls sehr effizient zu inhibieren. Im Hinblick auf die Behandlung mit PP2 lässt sich bei einer Endkonzentration von 25 μM die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen auf 35,2 % (+/- 10,8) in humanen Zellen, 25,9 % (+/- 3,9) in MHS-Zellen und 31,3 % (+/- 0,4) in J774-Zellen inhibieren. Unter dem Einfluss von AG 18 und bei einer Konzentration von 0,2 μM , sind insgesamt 14,9 % der Sporen (+/- 2,2) in humanen Zellen, 34,9 % (+/- 0,6) der Sporen in MHS-Zellen und 30,9 % (+/- 3,6) der Sporen in J774-Zellen intrazellulär. Diese Effekte unterstreichen die wichtige Rolle Tyrosin-phosphorylierter Proteine für das Zustandekommen einer effizienten Phagozytose

Amilorid kann die Phagozytose in MHS-Zellen um 67,56 % reduzieren. In den humanen Zellen und J774-Zellen wurde die Phagozytose durch Amilorid kaum beeinträchtigt. Dort zeigen sich Phagozytoseraten von 78,5 % (+/- 1,5) für humane und 87,2 % (+/- 3,2) für J774-Makrophagen. Amilorid wurde in allen Versuchen mit einer Konzentration von 200 μM eingesetzt.

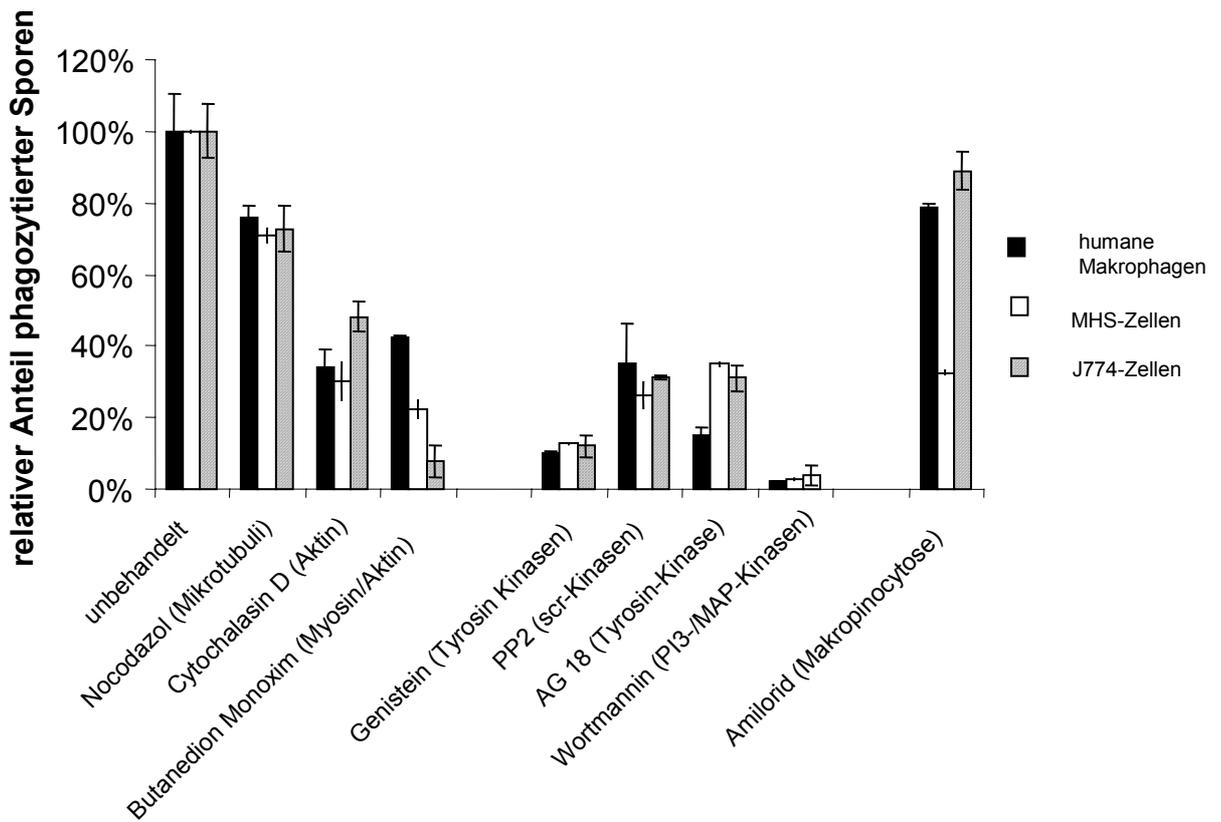


Abbildung 23: Quantifizierung der Aufnahme von biotinylierten *A. fumigatus* WT-Sporen in verschiedenen Zelltypen nach 1 h Infektion. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Inhibitoren 30 min (AG 18 für 4 h) vorbehandelt und anschließend mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Die Zellen wurden dann fixiert und der BCS-Assay wurde durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Makrophagen. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt; die inhibitorischen Effekte sind im Verhältnis zu der Kontrolle angegeben.

3.2.1.1.1. Konzentrationsabhängige Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Zellen mit Hilfe von Cytochalasin D

Wie Abbildung 23 zeigt, hemmt das Aktin-Mikrofilament depolymerisierende Cytochalasin D (Cyt D) die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Dieser Effekt wurde mit einer Konzentration von 2 μ M Cyt D erzielt. In einem nächsten Experiment wurde untersucht, ob sich die Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen mit einer höheren Konzentration von Cytochalasin D noch weiter blockieren lässt. Hierzu wurden J774-Zellen mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h in der Anwesenheit von 2 μ M, 4 μ M oder 6 μ M Cyt D infiziert, die Phagozytoserate wurde mittels BCS-Assay ermittelt. Die verschiedenen Konzentrationen von Cyt D wurden 30 min vor der Infektion hinzugegeben und während der gesamten Versuchsdauer nicht entfernt. Als Positivkontrolle diente erneut ein Präparat ohne zugesetzten Inhibitor. Es wurden

Ergebnisse

insgesamt 150-300 Sporen ausgewertet. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, lässt sich die Phagozytoserate abhängig von der eingesetzten Konzentration des Inhibitors Cytochalasin D reduzieren. Der größte inhibitorische Effekt wurde bei der eingesetzten Höchstkonzentration von 6 μM Cyt D erzielt. Bei dieser Konzentration waren nur 3,87 % \pm 2,9 % der Sporen intrazellulär, die Phagozytose konnte bei dieser Konzentration fast vollständig blockiert werden. Die Abbildung zeigt die absoluten Phagozytosewerte.

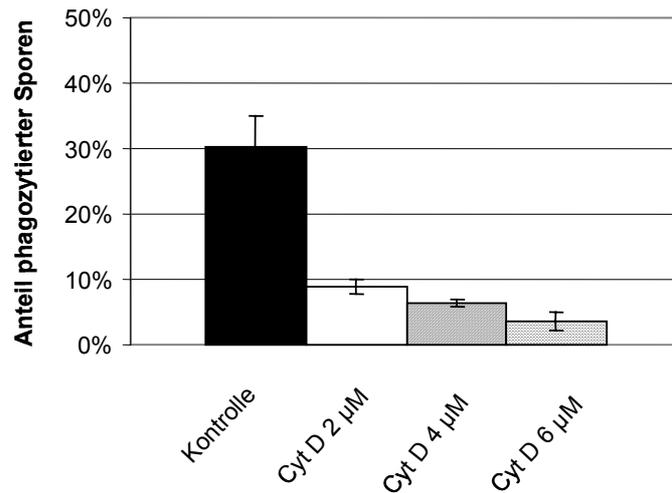


Abbildung 24: Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen des Aktin-Mikrofilament depolymerisierenden Toxins Cytochalasin D (CytD) auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Die Phagozytose wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

3.2.2. Charakterisierung der Aufnahme von Sporen in der Immunfluoreszenz

Um einige der Ergebnisse aus Abbildung 23 zu bestätigen, wurden diverse Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurden Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert und die infizierten Zellen mit Formaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran und dem Absättigen der Fc-Rezeptoren konnten die infizierten Zellen mit Rhodamin/Phalloidin inkubiert werden. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper.

3.2.2.1. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zeigt aktinreiche Aufnahmestrukturen

Wie aus den Abbildungen 23 und 24 ersichtlich, ließ sich die Phagozytose mit Cytochalasin D inhibieren. Dies zeigt, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen ein aktinabhängiger Prozess ist. Um die Beteiligung von Aktin bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zu bestätigen, wurden J774-Makrophagen mit GFP-Sporen des Stammes ATCC 46645 infiziert, und das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt. Wie in Abbildung 25 dargestellt, zeigen sich rote Aufnahmestrukturen um die grünen GFP-Sporen. Diese stellen sich als intensiv rote Aktinbereiche dar, die die Sporen vollständig umgeben (siehe weißer Pfeil).

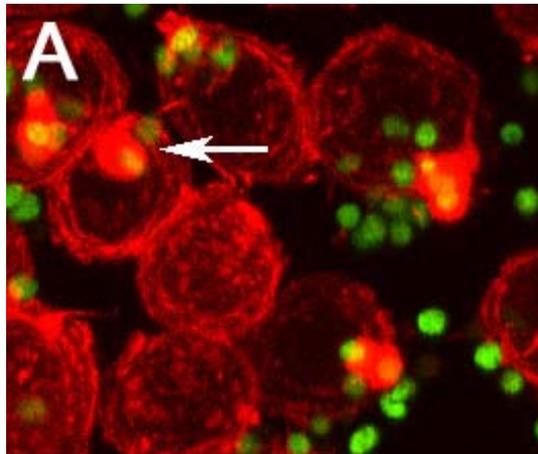


Abbildung 25: Beteiligung von Aktin an der Aufnahme der Sporen. Die Färbung des Aktinzytoskeletts erfolgte mit Phalloidin-Rhodamin. Die Sporen sind durch GFP-Expression grün. Der Pfeil weist auf eine Aufnahmestruktur hin; gelbe Strukturen zeigen die Überlagerung des rot angefärbten Aktins und der grünen Sporen.

3.2.2.2. Tyrosin-phosphorylierte Proteine befinden sich in den Aufnahmestrukturen

Tyrosin-Phosphorylierungen von Effektorproteinen spielen in der Phagozytose und den daraus resultierenden Signaltransduktionsketten eine wichtige Rolle. Die Versuche mit den Kinase-Inhibitoren haben die wichtige Rolle der Tyrosin-Kinasen für die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen verdeutlicht (siehe Abbildung 23). Mit Hilfe des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers PT66 lassen sich fokale Adhäsionskontakte anfärben.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnten Aufnahmestrukturen mit Sporen in MDHM-Zellen beobachtet werden, die deutlich mit Phosphotyrosin (B und C) angereichert waren (rot). Das Aktinzytoskelett ist grün, die Überlagerung von rot und grün ist gelb dargestellt. Die Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen erfolgte für 15 min.

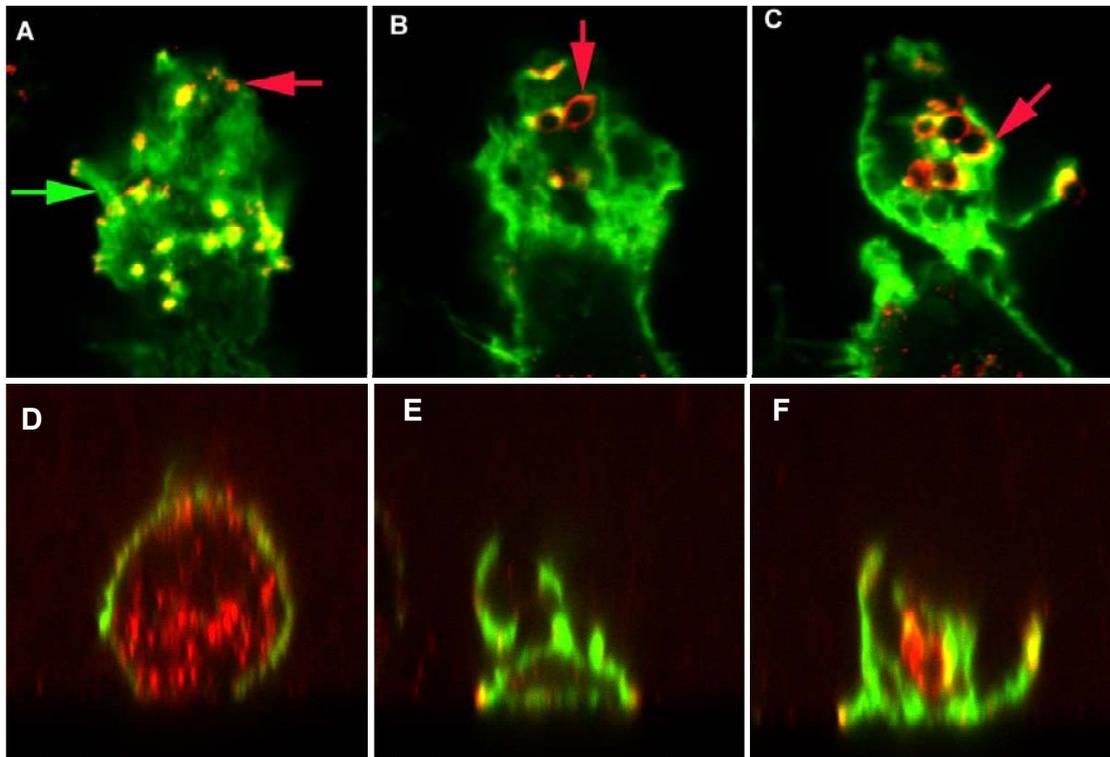


Abbildung 26: Konfokale Aufnahmen der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in MDHM nach einer Infektionszeit von 15 min. Rot: Phosphotyrosin; Grün: Aktinfilamente; gelb: Überlagerung von Grün und Rot. A-C xy- Ansicht. A) basale Ansicht, grüner Pfeil: F-Aktin angereicherte Struktur, roter Pfeil: focal contact, b) und c) rote Pfeile: Sporenaufnahmestrukturen, in denen Tyrosin-phosphorylierte Proteine nachweisbar sind. D-F) xz-Ansicht

3.2.2.3. Untersuchungen der Aufnahmestrukturen durch Elektronenmikroskopie

3.2.2.3.1. EM-Aufnahmen zeigen sog. „Ruffles“, die darauf deuten, dass *A. fumigatus*-Sporen durch einen „Trigger“-Mechanismus aufgenommen werden

Zwei Modelle namens „Trigger“ und „Zipper“ sind bereits beschrieben worden, um die Phagozytose von Mikroorganismen zu beschreiben (Griffin, Jr. und Silverstein, 1974;

Griffin, Jr. *et al.*, 1975; Griffin, Jr. *et al.*, 1976). Beim „Zipper“-Mechanismus („Reißverschlussmechanismus“) besteht ein enger Kontakt zwischen dem Mikroorganismus und der Wirtszelle. Durch kontinuierliche räumliche Ausbreitung der Rezeptor-Liganden Interaktionen wird die Wirtszellmembran um den Mikroorganismus gestülpt, bis dieser völlig eingeschlossen und invaginiert wird.

Bei dem „Trigger“-Mechanismus („Auslöse-Mechanismus“) ist kein enger Kontakt zwischen Mikroorganismus und Wirtszelle nötig. Als klassisches Beispiel ist hier *Salmonella* zu erwähnen. Denn man nimmt an, dass von dem Mikroorganismus Invasine ins Medium sezerniert werden und durch Bindung an Wirtszellrezeptoren die Bildung von faltenförmigen Ausstülpungen der Plasmamembran induzieren, welche zellnahe Pathogene einschließen und vakuolisieren. Beim „Trigger“-Mechanismus kommt es zu einer starken Umordnung des Aktinzytoskeletts, die zur Internalisierung des Mikroorganismus über Makropinozytose führen (Francis *et al.* 1993, Ménard *et al.*, 1996).

Abbildung 27 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774- und MH-S Makrophagen. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden mit *A. fumigatus*-Sporen für 1 h infiziert und mit Cacodylatpuffer fixiert (Siehe Material und Methoden 2.14.1). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Manfred Rohde an der GBF-Braunschweig durchgeführt.

Die Aufnahmen zeigen, dass sowohl J774- (siehe A und B) als auch MH-S Zellen (siehe C und D) blütenblattartige Strukturen um die Sporen bilden. Diese Strukturen sind auch unter dem Namen „Ruffles“ bekannt und charakteristisch für den so genannten „Trigger“- Mechanismus.

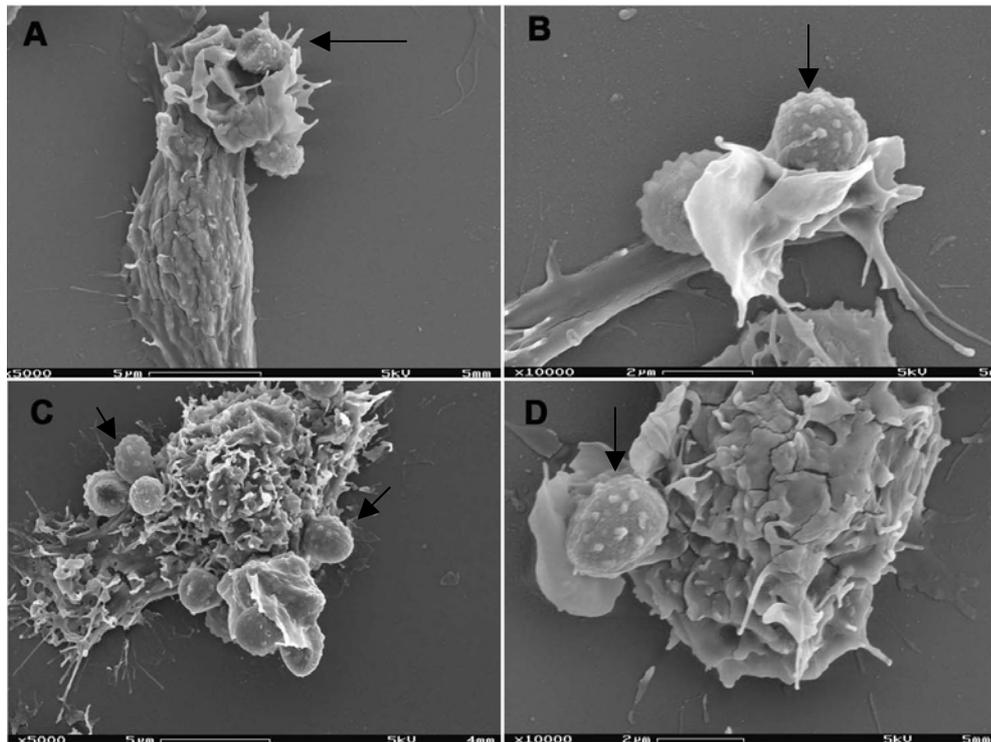


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Darstellung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Zellen (A,B) und MHS-Zellen (C,D). Die Pfeile zeigen die *A. fumigatus*-Sporen.

3.2.2.3.2. EM-Aufnahmen deuten darauf hin, dass *A. giganteus*-Sporen durch einen „Zipper“-Mechanismus aufgenommen werden

Im Gegensatz zu den Aufnahmen von *A. fumigatus*, zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von der Phagozytose von *A. giganteus* einen Mechanismus der dem Zipper-Mechanismus ähnelt. Wie Abbildung 28 zeigt, besteht ein Kontakt zwischen den Makrophagen und den Sporen. Hierbei stülpt sich die Plasmamembran der Zellen um die Sporen, bis diese vollständig umschlossen sind.

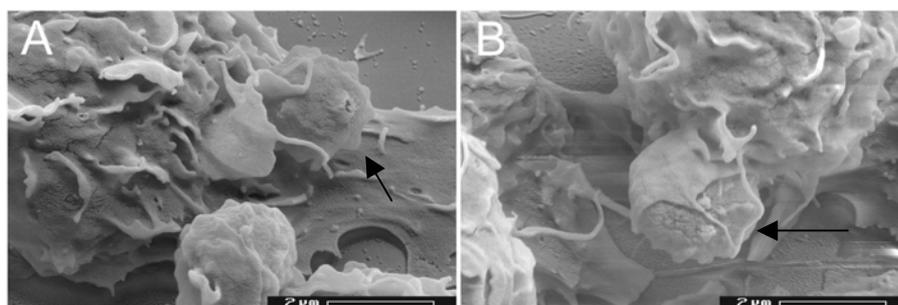


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Darstellung der Phagozytose von *A. giganteus*-Sporen in J774-Zellen. Die Pfeile zeigen die *A. giganteus*-Sporen.

3.2.2.4. Die Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen gleicht Makropinozytose und führt zur Bildung großer Vakuolen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen deuten darauf hin, dass *A. fumigatus*-Sporen über einen Makropinozytose-ähnlichen Mechanismus aufgenommen werden. Zudem war es möglich, die Phagozytose von *A. fumigatus* mit Hilfe des Inhibitors Amilorid in humanen und murinen Zellen zumindest teilweise zu blockieren (siehe Abbildung 23). Um weitere Belege zu erhalten, wurden J774-Zellen mit GFP-*A. fumigatus*-Sporen in Gegenwart von Cy3-Dextran infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert und einem konfokalen Mikroskop analysiert. In Abbildung 29 ist der Versuchsverlauf schematisch dargestellt. Die GFP-leuchtenden Sporen liegen in großen Vakuolen, die sich durch die gleichzeitige Anwesenheit des Cy3-Dextran im Medium rot darstellen ließen (Abbildung 30).

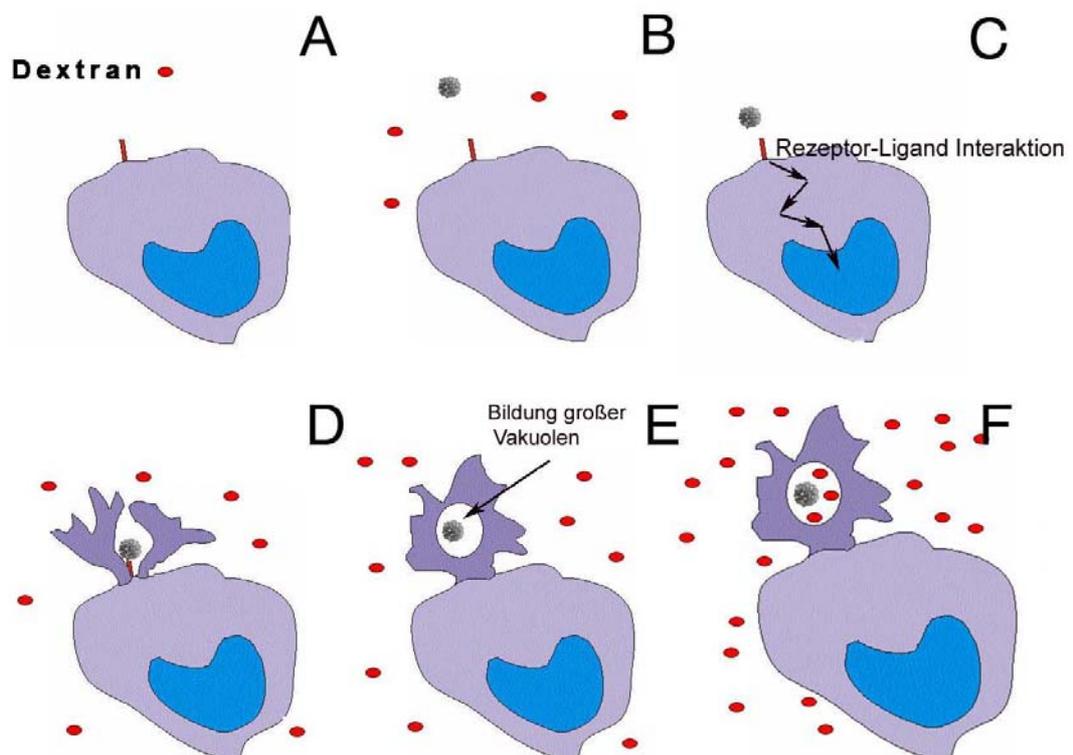


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Bildung großer Vakuolen um die Sporen. *A. fumigatus*-Sporen werden von dem Makrophagen erkannt (A-B). Es erfolgt eine Rezeptor-Ligand Interaktion: die Zelle erhält das Signal, die Spore zu phagozytieren (C-D). Die Membran stülpt sich um die Sporen und es bilden sich große Vakuolen um die Sporen, die mit Hilfe des Dextran-Cy3 rot leuchten (siehe auch Abbildung 30).

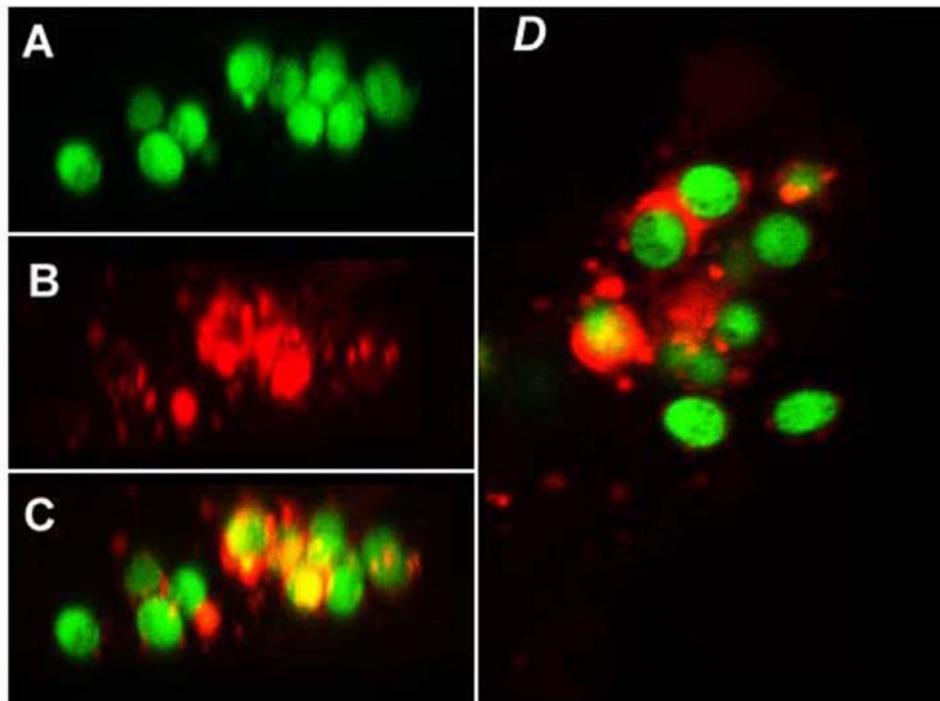


Abbildung 30: Die Phagozytose von *A. fumigatus* GFP-Sporen in J774-Makrophagen gleicht einer Aufnahme durch Makropinozytose und führt zur Bildung großer Vakuolen. A) grün: GFP-Sporen; B) rot: Cy3-markiertes Dextran; C) gelb: Überlagerung von grün und rot (XY-Ansicht); D) XZ-Ansicht zeigt, dass sich Cy3-markiertes Dextran in großen Vakuolen um die GFP-Sporen anreichert (rot).

3.2.3. Einfluss von GTP-bindenden Rho-Proteinen auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Rho, Rac und CDC42 sind Mitglieder der Ras-Superfamilie monomerer, kleiner GTP-bindender Proteine (Takai *et al.*, 2001). Initial wurden sie als zentrale Regulatoren des Mikrofilamentsystems beschrieben (Hall, 1998). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass sie als molekulare Schalter auch andere bedeutende Zellfunktionen steuern (Kjoller und Hall, 1999; Takai *et al.*, 2001), so auch die Phagozytose von Mikroorganismen (Hackam *et al.*, 1997).

3.2.3.1. Einfluss des Rho-spezifischen Inhibitors Edin B

Um zu untersuchen, ob Rho einen Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen hat, wurden J774-Makrophagen in der An- bzw. Abwesenheit des Rho-spezifischen Inhibitors Edin B für 3 h infiziert. Bei Edin B handelt es sich um ein

Exotoxin aus *Staphylococcus aureus* (Czech *et al.*, 2001). Der Inhibitor wurde 30 min vor der Infektion hinzugegeben und wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht heruntergewaschen. Die Phagozytose wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

Abbildung 31 zeigt, dass Edin B die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen auf 3,9 % blockiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Rho möglicherweise bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist.

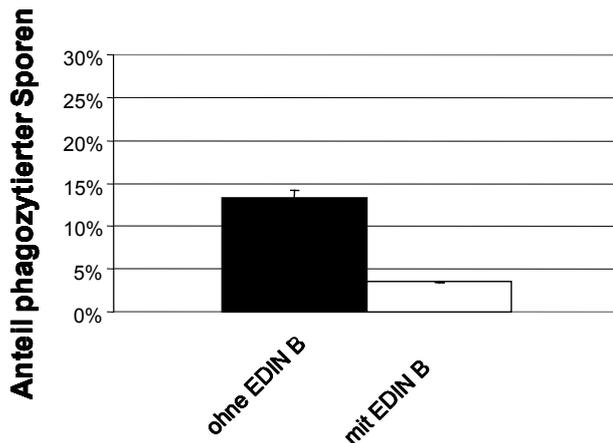


Abbildung 31: Einfluss des Rho-spezifischen Inhibitors Edin B auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch J774-Makrophagen nach 3 h Infektion. Die Phagozytose wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

3.2.4. Rolle des Komplementsystems bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Um zu untersuchen, ob *A. fumigatus*-Sporen über Fc γ -vermittelte Phagozytose oder Komplement-vermittelte Phagozytose aufgenommen werden, wurde die Infektion von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Zellen in der Anwesenheit von nicht hitzeinaktiviertem Serum und hitzeinaktiviertem Serum durchgeführt (3 h). Durch die Wärmebehandlung des Serums auf 55 °C für 30 min wird das Komplementsystem inaktiviert, so dass eine Phagozytose über Komplementrezeptoren ausgeschlossen werden kann. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Infektion der Sporen erfolgte in J774-Zellen für 1 h (schwarze Balken) und für 3 h (weiße Balken). Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt. Für die Infektion wurden 150-300 Sporen ausgewertet. Wie Abbildung 32 zeigt, liegt die Phagozytoserate bei den Zellen, die in Anwesenheit des hitzeinaktivierten Serums mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert wurden, nach 1 h bei 16,3 % (+/- 1,1) und nach 3 h bei 20,9 % (+/-1,2). Die Zellen, die in Anwesenheit des

Ergebnisse

nicht hitzeinaktivierten Serums mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert wurden, besitzen nach 1 h eine Phagozytoseeffizienz von 9,42 % ($\pm 4,16$) und nach 3 h von 15,99 % ($\pm 4,80$).

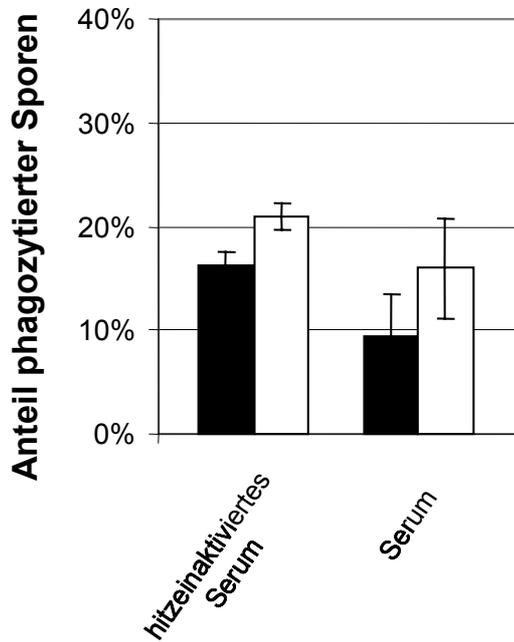


Abbildung 32: Phagozytose von *A. fumigatus* in J774-Makrophagen in der Anwesenheit des hitzeinaktivierten Serums und nicht hitzeinaktivierten Serums nach 1 h (schwarze Balken) und nach 3 h (weiße Balken). Die Ermittlung der Phagozytoseeffizienz erfolgte mit Hilfe des BCS-Assays. Es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.3. Rezeptoren der Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Sporen

Betrachtet man den Infektionsweg von *A. fumigatus*-Sporen, so gelangen diese durch die Atmung bis in die Alveolen der Lunge, wenn sie nicht vorher von physikalischen Barrieren wie z.B. dem Flimmerepithel wieder hinaustransportiert wurden. In den Alveolen bilden Makrophagen die erste Verteidigungslinie indem sie die Sporen phagozytieren. Für die Erkennung und Phagozytose steht der angeborenen Immunantwort nur eine begrenzte Anzahl an Rezeptoren zur Verfügung. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die mikrobielle Strukturen erkennen können, werden als mustererkennende Rezeptoren („Pattern Recognition Receptors“ (PRRs)) bezeichnet und auf verschiedenen antigenpräsentierenden Effektorzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert (Janeway, Jr., 1989).

Dectin-1, ein PRR, der bei der Erkennung von Pilzen eine Rolle spielt, wurde kürzlich von Brown und Gordon (2000) entdeckt.

Die im Moment bekanntesten PRR sind wahrscheinlich die Rezeptoren der Toll-like Familie, die so genannten Toll-like Rezeptoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TLR2 und TLR4 für die Erkennung von *A. fumigatus* eine Rolle spielen (Meier *et al.*, 2001).

Betrachtet man die Zellwand von *A. fumigatus*, so befinden sich unter der hydrophoben Hüllschicht, die vermutlich auch die Melanine enthält, Galactomanan, β 1-3 Glucan und β 1-6 Glucan. Glucane sind fibrilläre Elemente von Glucose-Polymeren in 1-3- β oder 1-6- β -Bindung (Bernhardt und Knoke, 2004).

In dem folgenden Abschnitt der Ergebnisse wurde untersucht, welche Rezeptoren an der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen beteiligt sind, und es wurde nach den Liganden gesucht, die eine effiziente Phagozytose ermöglichen.

3.3.1. Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus* mit verschiedenen Zuckern

Um zu sehen welche Rezeptoren und welche Bestandteile der pilzlichen Zellwand bei der Phagozytose beteiligt sein könnten, wurden primäre humane Makrophagen und Zellen der MH-S Zelllinie mit vier verschiedenen Zuckern für 30 min vorinkubiert und anschließend mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert. Die Zucker wurden während der Versuchsdauer nicht entfernt. Bei den Zuckern handelte es sich um häufig vorkommende Zucker wie Glucose, Mannose, Fructose und Galactose, welche selbst Bestandteile der pilzlichen Sporenzellwand sind (Persat *et al.*, 2003). Um die

Ergebnisse

Phagozytoseeffizienz zu bestimmen, wurde der BCS-Assay durchgeführt, und es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt. In Abbildung 33 sind die Phagozytoseraten von *A. fumigatus*-Sporen in humanen Makrophagen und MH-S-Zellen dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass Mannose bei einer Konzentration von 165 mM die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in humanen Zellen um 17,99 %, Fructose bei einer Konzentration von 165 mM um 17,09 % und Galactose bei einer Konzentration von 125 mM um 10,86 % blockiert. In MH-S-Zellen zeigt nur Galactose einen Effekt auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen (Konzentration von 125 mM). Hier wird eine Phagozytoseeffizienz von 13,95 % +/- 1,95 % erreicht.

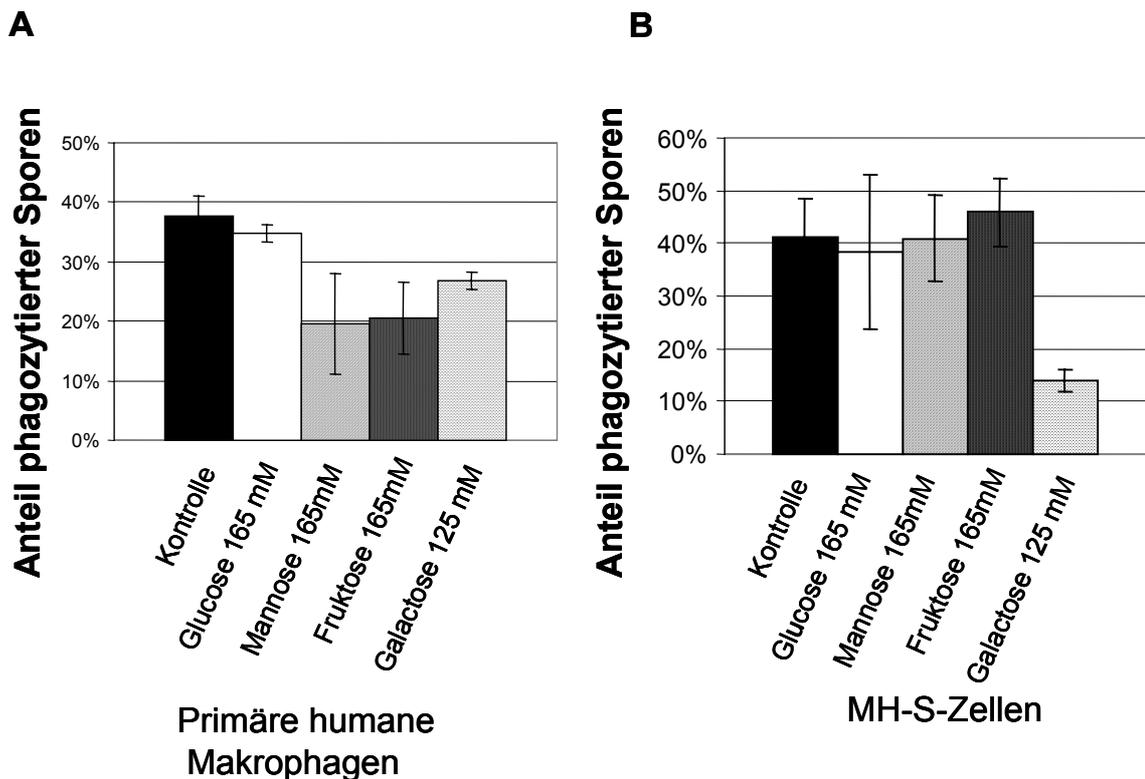


Abbildung 33: Primäre humane Makrophagen und MH-S-Makrophagen wurden in der An-/Abwesenheit von Glucose (165 mM), Mannose (165 mM), Fructose (165 mM) und Galaktose (125 mM) infiziert (3 h). Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt. Es wurden insgesamt zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.3.2. Phagozytose lässt sich durch Laminarin blockieren

Die Zucker des vorherigen Versuchs hatten keinen deutlichen Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Da es sich bei den Zuckern um kleine Mono- und Disaccharide handelt, wurde in einem nächsten Versuch getestet, ob Laminarin, ein Polysaccharid, die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beeinflusst. Bei Laminarin

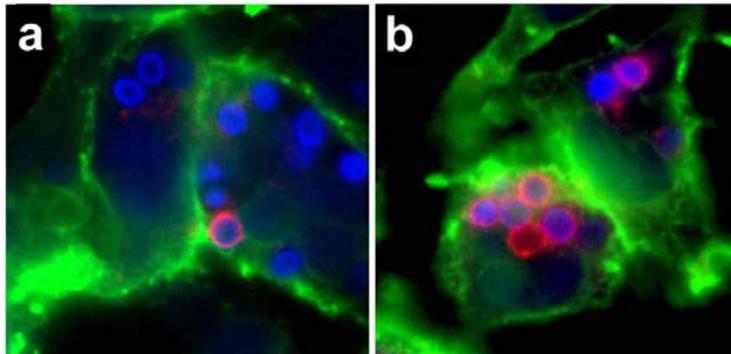
handelt es sich um eine β 1-3 Glucan Präparation aus der Braunalge *Laminaria digitata* (Read *et al.*, 1996).

Um die Rolle des β 1-3 Glucan während der Phagozytose zu charakterisieren, wurden Makrophagen in der An- bzw. Abwesenheit von unterschiedlichen Laminarinkonzentrationen mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert, anschließend wurde die Phagozytoseeffizienz mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt. Für die Auswertung wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

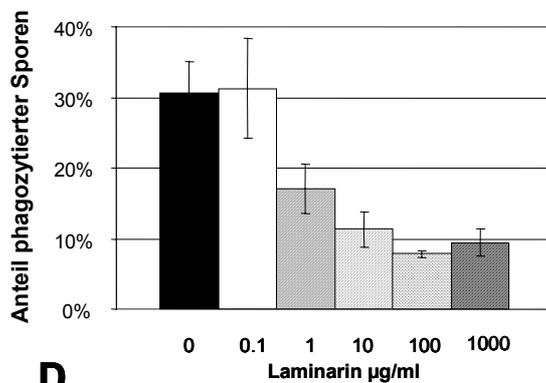
Wie in Abbildung 34 dargestellt ist, blockiert Laminarin die Phagozytose von J774-Makrophagen. In Abbildung 34 A sind infizierte J774-Makrophagen in der (a) Ab- bzw. (b) Anwesenheit von Laminarin in der Immunfluoreszenz dargestellt. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Zellen, die vorher mit Laminarin inkubiert wurden (b), *A. fumigatus*-Sporen weniger effizient phagozytieren als die Zellen ohne Laminarin (a). Abbildung 34 B zeigt, dass Laminarin die Phagozytose in J774-Makrophagen abhängig von der eingesetzten Konzentration blockiert. Die Phagozytose wird bei einer Konzentration von 100 μ g/ml Laminarin um 34 % blockiert. Diese Konzentration wurde auch in anderen Studien eingesetzt (Brown *et al.*, 2002; Gantner *et al.*, 2004). Da der größte inhibitorische Effekt mit dieser Konzentration erzielt werden konnte, wurde sie als Standardkonzentration für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Ähnliche Ergebnisse wie mit den J774-Makrophagen wurden auch mit murinen Peritonealmakrophagen erzielt (Abbildung 34 D). Hier wurde die Phagozytose um 38 % gehemmt. Einen ähnlichen Einfluss hat Laminarin auch auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in MH-S und primären murinen Alveolarzellen (siehe Abbildung 34 E). Zur Kontrolle wurde dieser Infektionsversuch in Peritonealmakrophagen unter den gleichen Bedingungen parallel mit Kontrollbeads durchgeführt. Laminarin hat hier keinen Einfluss auf die Phagozytose (siehe Abbildung 34 C). Die Phagozytoseeffizienz lag bei den unbehandelten Makrophagen bei 83,2 %, bei den mit Laminarin behandelten bei 83,4 %. Die Opsonisierung durch Komplement kann diese Versuche nicht beeinflussen, da alle Versuche mit hitzeinaktiviertem Serum durchgeführt wurden.

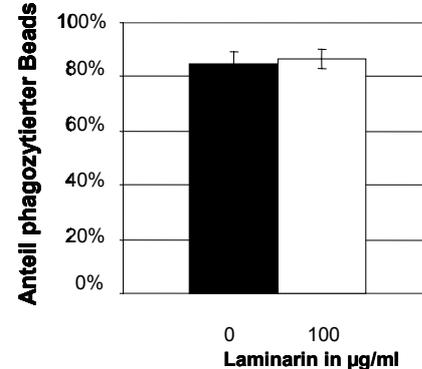
A



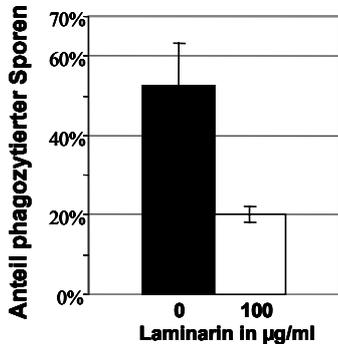
B



C



D



E

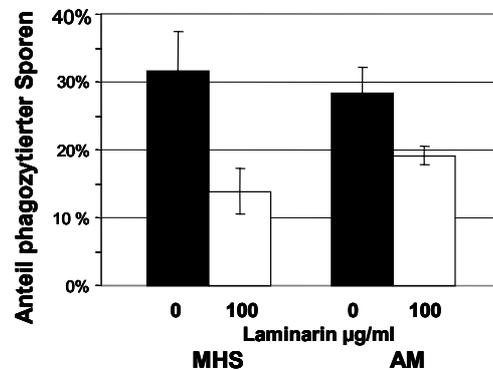


Abbildung 34: β 1-3 Glucan-abhängige Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen. Makrophagen wurden mit biotinylierten *A. fumigatus*-Sporen für 3 h in der An-/Abwesenheit von unterschiedlichen Laminarinkonzentrationen infiziert. Anschließend wurde der BCS-Assay durchgeführt. Für jeden Versuch wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt. A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Phagozytose von *A. fumigatus* durch J774-Makrophagen in der (a) Ab- und (b) Anwesenheit von Laminarin (100 $\mu\text{g/ml}$). Makrophagen wurden mit Concanavalin A-FITC grün angefärbt, extra- und intrazelluläre Sporen sind mit Hilfe von Calcofluor in blau visualisiert, extrazelluläre Sporen in rot (Streptavidin Cy3). B-E) Quantitative Analyse der Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen und Beads durch verschiedene Makrophagen. B) J774-Makrophagen wurden in der An-/ Abwesenheit von unterschiedlichen Laminarinkonzentrationen infiziert (3 h). C) Peritonealmakrophagen wurden mit biotinylierten Kontrollbeads in der An-/Abwesenheit von Laminarin infiziert (3 h) (100 $\mu\text{g/ml}$). D) Peritonealmakrophagen wurden in der An-/Abwesenheit von Laminarin infiziert (3 h) (100 $\mu\text{g/ml}$). E) MH-S murine Alveolarmakrophagen und primäre Alveolarmakrophagen wurden in der An-/ Abwesenheit von Laminarin infiziert (3 h) (100 $\mu\text{g/ml}$).

3.3.3. Phagozytose lässt sich durch einen „Limulus“-Extrakt blockieren

Um unabhängig von Laminarin die bedeutende Rolle des β 1-3 Glucan der pilzlichen Zellwand für die Phagozytose zu zeigen, wurden Makrophagen mit Sporen infiziert, die zuvor mit einem speziellen Limulus-Extrakt vorinkubiert wurden. Bei dem Limulus Extrakt handelt es sich um ein Produkt der Firma Fungitell, welches den β 1-3 Glucan spezifischen Faktor G enthält, während das LPS-bindende Protein entfernt wurde (Seki *et al.*, 1994). Durch eine Vorinkubation der Sporen mit dem Faktor G sollten die β 1-3 Glucane auf der Sporenoberfläche „maskiert“ werden. Im Anschluss an diese „Maskierung“ erfolgte die Infektion. Um die Phagozytoseeffizienz quantifizieren zu können, wurde der BCS-Assay durchgeführt. Wie man aus Abbildung 35 erkennt, lässt sich die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Makrophagen abhängig von der eingesetzten Konzentration des Limulus Extraktes hemmen. Die größte Inhibierung wurde mit einer 1:1 Verdünnung erzielt. Hier ließ sich die Phagozytose um 62 % hemmen, was etwa der Inhibition durch 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Laminarin entspricht.

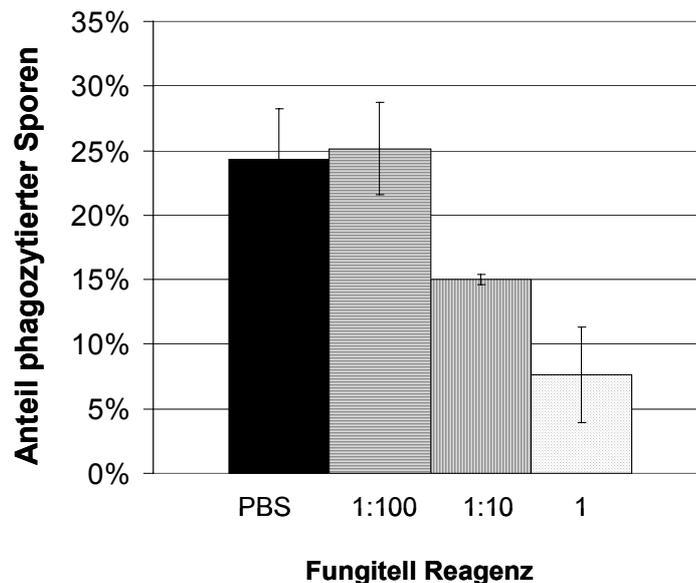


Abbildung 35: Beteiligung von β 1-3 Glucan an der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen. Ruhende Sporen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des Fungitell-Reagenz in PBS für 30 min bei RT 30 min vorinkubiert, bevor die Infektion mit *A. fumigatus* in J774-Makrophagen erfolgte (3 h). Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

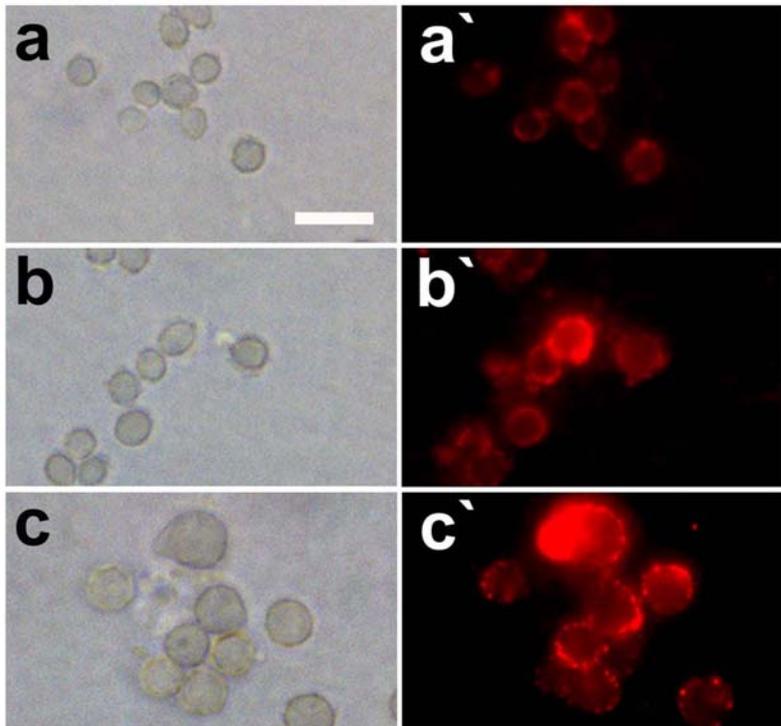
3.3.4. Lokalisation des β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von *Aspergillus*-Sporen

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers ist bereits gezeigt worden, dass β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von angeschwollenen, aber nicht auf ruhenden Sporen zu finden ist (Hohl *et al.*, 2005; Gersuk *et al.*, 2006). Mit Hilfe eines löslichen Dectin-1 Proteins entdeckte man, dass die Menge an β 1-3 Glucan während der Auskeimung wesentlich größer ist als die Menge an β 1-3 Glucan auf ruhenden Sporen (Steele *et al.*, 2005).

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mab 2G8-A (Torosantucci *et al.*, 2005), welcher spezifisch gegen β 1-3 Glucan gerichtet ist, wurde die Verteilung des β 1-3 Glucans auf der Oberfläche der Sporen während des Auskeimungsvorgangs analysiert. In unserem Versuch wurde eine Zeitreihe gewählt, die die Sporen von ihrem Ruhestadium bis zu ihrem Anschwellstadium zeigen. Der Anschwellvorgang erfolgte in YG-Medium bei 37 °C und 150 RPM. Es wurden die Zeitpunkte 0 h, 4 h und 6 h gewählt. Die Sporen wurden gemäß Standardprotokoll (siehe 2.13.3) behandelt und mit dem mab 2G8-A und dem entsprechenden anti-Maus Cy3-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Wie aus Abbildung 36 A (a und a`) zu erkennen ist, lassen sich ruhende Sporen nach 0 h nur sehr schwach mit dem 2G8 Antikörper anfärben: In a sind ruhende Sporen im Hellfeld dargestellt, in a` sind die entsprechenden 2G8-gefärbten Sporen in der Immunfluoreszenz zu erkennen.

Nach 4 h Inkubation in YG-Medium sind ungefähr 10 % der Sporen sehr stark angefärbt (Abbildung 36 A (b und b`)), was darauf hindeutet, dass die Konzentration an β 1-3 Glucan auf der Oberfläche zugenommen hat. Diese Sporen zeigen aber immer noch einen kleinen Durchmesser von ungefähr 2 μ m. Nach 6 h Inkubation sind die Sporen bereits angeschwollen, ihr Durchmesser hat sich ungefähr auf das Doppelte vergrößert (siehe Abbildung 36 A (c und c`)). Waren hier ebenfalls nicht angeschwollene Sporen anwesend, wiesen diese eine starke homogene Anfärbung auf. Die meisten angeschwollenen Sporen zeigten eine „gepunktete“ Färbung (siehe Abbildung 29 A (c und c`) und Abbildung 36 B (a und a`)). In Abbildung 36 B (a und a`) wurden die Aufnahmen der angeschwollenen Sporen mit Hilfe des konfokalen Mikroskops genauer untersucht. In a ist eine konfokale Schnittebene dargestellt, in a` die Überlagerung aller Schnittebenen. Der Pfeil in B (a) zeigt auf eine sehr stark angefärbte, aber noch kleine Spore. Bei einigen angeschwollenen Sporen, die bereits anfangen Keimschläuche zu bilden, wurde eine sehr starke Immunfluoreszenz im Bereich der Keimschlauchbildung sichtbar (siehe Abbildung 36 A (c und c`), 36 B (b) weiße Pfeile).

A



B

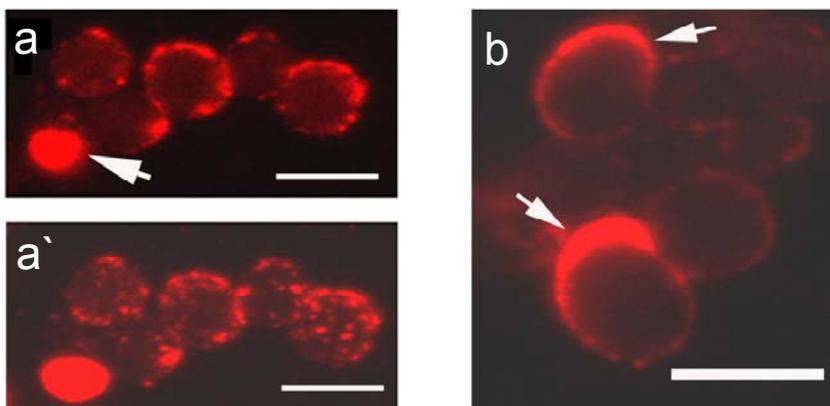


Abbildung 36 A: Lokalisation von β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Sporen. Oberflächen- β 1-3 Glucan wurde mit Hilfe des 2G8 Antikörpers detektiert. a-c zeigen Sporen im Hellfeld, in a'-c' sind die entsprechenden Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt. Ruhende Wildtyp-Sporen sind in A (a und a') dargestellt, Sporen die in YGf -Medium 4 h inkubiert worden sind, werden in A (b und b') gezeigt und Sporen, die 6 h in YGf -Medium inkubiert wurden, sind in A (c und c') dargestellt. Der Balken in A (a) repräsentiert 5 μ m und ist gültig für a-c.

In B (a und a') werden entsprechende Aufnahmen, die am konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden, gezeigt. In a ist ein einziges Bild, in a' ist die Überlagerung aller Bilder dargestellt. Der Pfeil in B (a) zeigt auf eine sehr stark angefärbte, aber kleine Spore. Bei einigen angeschwollenen Sporen, die bereits anfangen Keimschläuche zu bilden, wurde eine sehr starke Immunfluoreszenz im Bereich der Keimschlauchbildung sichtbar (36 B (b) weiße Pfeile). Balken in B repräsentieren 5 μ m.

3.3.5. Die Menge an β 1-3 Glucan ist entscheidend für die Phagozytoseeffizienz

Da ruhende Sporen und angeschwollene Sporen unterschiedliche Mengen an β 1-3 Glucan aufweisen, wurde getestet, ob sie entsprechend unterschiedliche Phagozytoseeffizienzen besitzen. Hierzu wurden J774-Makrophagen für 3 h mit ruhenden und angeschwollenen Sporen infiziert, dann wurde der BCS-Assay durchgeführt. Es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet. Da isolierte Sporen öfters über mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden, interessierte es auch, ob diese Langzeitlagerung die Phagozytoseeffizienz beeinflusst, indem sie z.B. auf die Intaktheit der hydrophoben Hüllschicht einwirkt. Deshalb wurden neben den ruhenden frisch isolierten Sporen auch 6 Monate alte Sporen für den Infektionsversuch verwendet. Die Ergebnisse dieses Versuchs werden in Abbildung 37 dargestellt. Man kann erkennen, dass angeschwollene Sporen mit 48,0 % wesentlich besser phagozytiert werden als ruhende Sporen (22,3 % und 20,9 %). Die Langzeitlagerung im Kühlschrank bei 4 °C hingegen hat keinen bedeutenden Einfluss auf die Phagozytoseeffizienz.

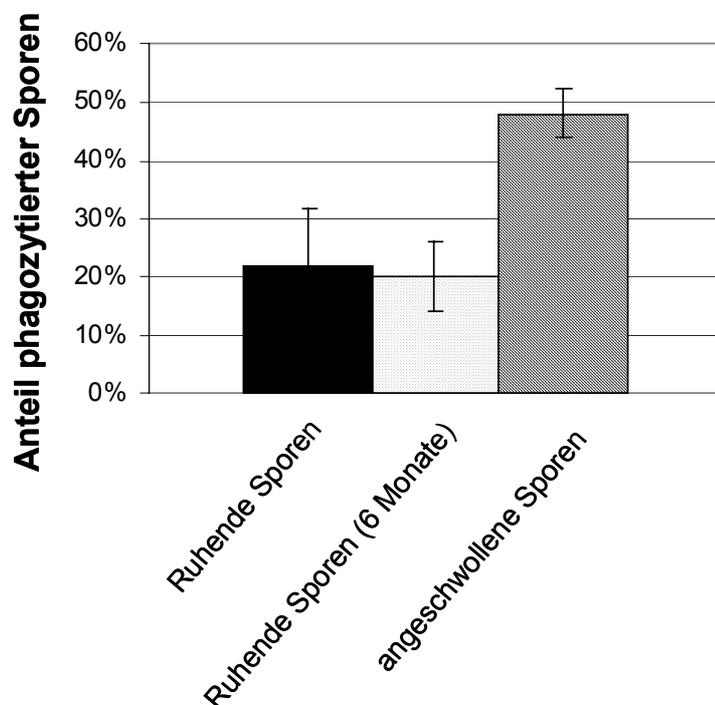


Abbildung 37: Infektion von J774-Makrophagen mit frisch isolierten Sporen, ruhenden 6 Monate gelagerten Sporen und frisch isolierten angeschwollenen Sporen. Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

3.3.6. Lokalisation von β 1-3 Glucan auf der Oberfläche der *pksP*-Mutante

Um erneut zu überprüfen, ob die Menge an β 1-3 Glucan entscheidend ist für die Phagozytoseeffizienz, wurde die Lokalisation des β 1-3 Glucan auf einer *A. fumigatus*-Mutante getestet. Es handelte sich hierbei um die *pksP*-Mutante (Jahn *et al.*, 1997). Der *pksP*-Mutante fehlt ein essentielles Gen, welches für die Synthese des Dihydroxynaphtalen (DHN)-Melanin verantwortlich ist. Der Verlust dieses Gens zeigt sich in einer weißen Spore mit einer charakteristischen glatten Oberfläche (Jahn *et al.*, 1997). In Abbildung 38 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der *pksP*-Mutante im Vergleich zur WT-Spore dargestellt.

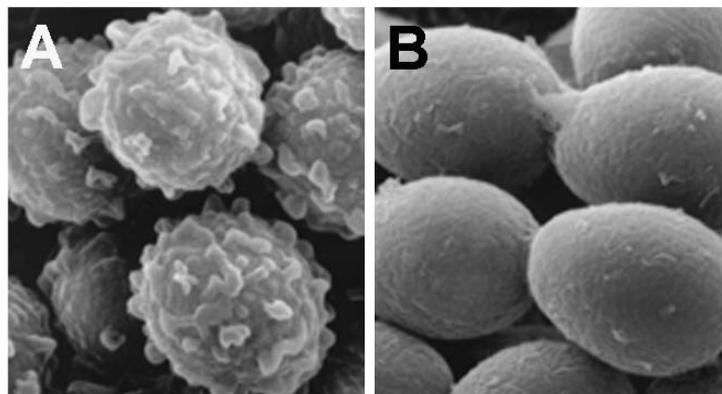
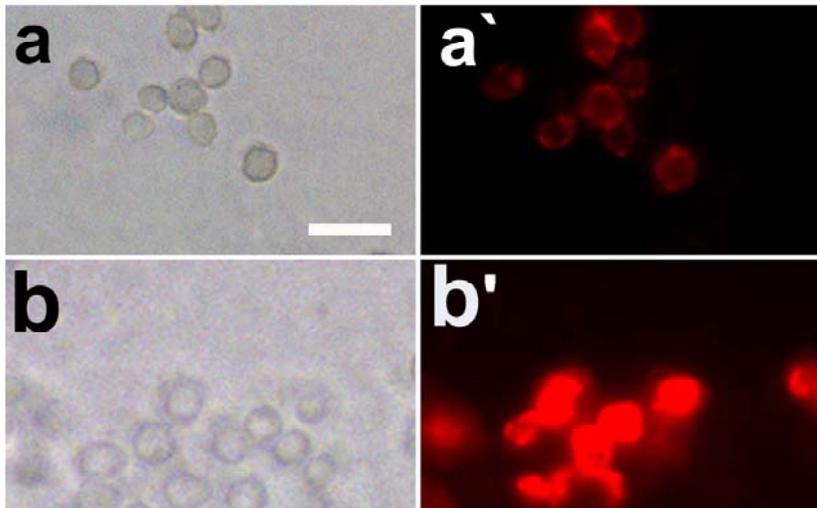


Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme der ATCC 46645 *A. fumigatus* WT-Sporen (A) im Vergleich zur *pksP*-Mutante dieses Stammes (B). Die *pksP*-Mutante besitzt im Vergleich zum WT eine glatte Oberfläche (aus Jahn *et al.*, 2000).

Wie aus Abbildung 39 A (b und b') zu erkennen ist, zeigen die Immunfluoreszenzaufnahmen, dass die meisten Sporen der *pksP*-Mutante eine sehr starke Anfärbung mit dem β 1-3 Glucan spezifischen monoklonalen Antikörper 2G8 zeigen, wohingegen die WT-Sporen nur eine geringe Färbung zeigen (Abbildung 39 A (a und a')).

Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der FACS Analyse bestätigt. Hier konnte ebenfalls eine geringe Menge an β 1-3 Glucan mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 2G8 auf ruhenden *A. fumigatus* WT-Sporen gemessen werden (siehe Abbildung 39 (orange Linie)) im Vergleich zu den Kontrollen, die nur mit dem anti-Maus Cy3-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert worden waren (siehe Abbildung 39 (rote Linie)). Eine beachtlich größere Menge konnte hingegen auf der *pksP*-Mutante gemessen werden (siehe Abbildung 39; blaue Linie im Vergleich zur Kontrolle (grüne Linie)).

A



B

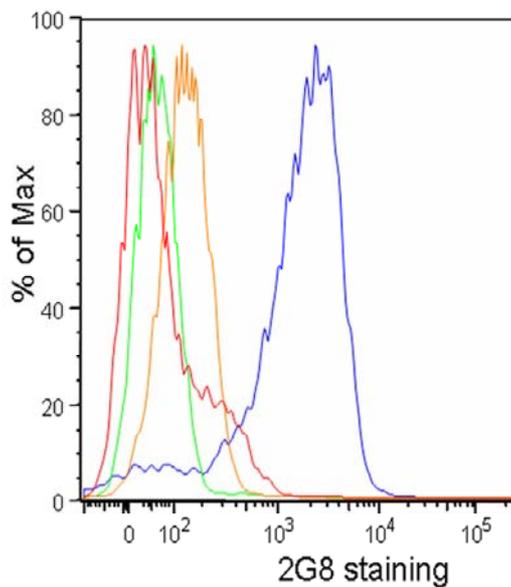


Abbildung 39: A) Lokalisation von β 1-3 Glucan auf ruhenden WT-Sporen (a und a') und der *pksP*-Mutante (b und b'); a und b zeigen Hellfeldaufnahmen, a' und b' die entsprechenden Immunfluoreszenzaufnahmen. **B)** FACS-Analyse von ruhenden Sporen und ruhenden Sporen der *pksP*-Mutante. Die orange Kurve zeigt Wildtyp-Sporen, die mit dem monoklonalen Antikörper 2G8 angefärbt wurden die entsprechende Kontrolle mit dem sekundären Antikörper ist grün dargestellt; die blaue Kurve zeigt *pksP*-Sporen, die mit dem mab2G8 angefärbt wurden; die entsprechende Kontrolle mit dem sekundären Antikörper ist rot dargestellt.

3.3.7. Phagozytoseeffizienz der *pksP*-/ und der weißen UV-Mutante

Des Weiteren wurde getestet, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an β 1-3 Glucan auf der Oberfläche der *pksP*-Sporen und der Phagozytoseeffizienz gibt. Es wurde neben der *pksP*-Mutante noch eine UV-Mutante von *A. fumigatus* getestet. Bei der UV-Mutante handelt es sich, wie bei der *pksP*-Mutante, um nichtpigmentierte weiße Sporen. Für diese Mutante konnte durch Einbringen des *pksP*-Gens ein WT-Phänotyp wiederhergestellt werden (Langfelder *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1998). Es wurden J774-Makrophagen mit WT-Sporen und Sporen beider Mutanten für 3 h infiziert, der BCS-Assay wurde durchgeführt und zwischen 150 und 300 Sporen wurden ausgewertet. Wie aus Abbildung 40 zu sehen ist, werden die *pksP*- und die UV-Mutante nach 3 h mit 59,2 % und 54,1 % wesentlich effizienter phagozytiert als die WT-Sporen mit 26 %.

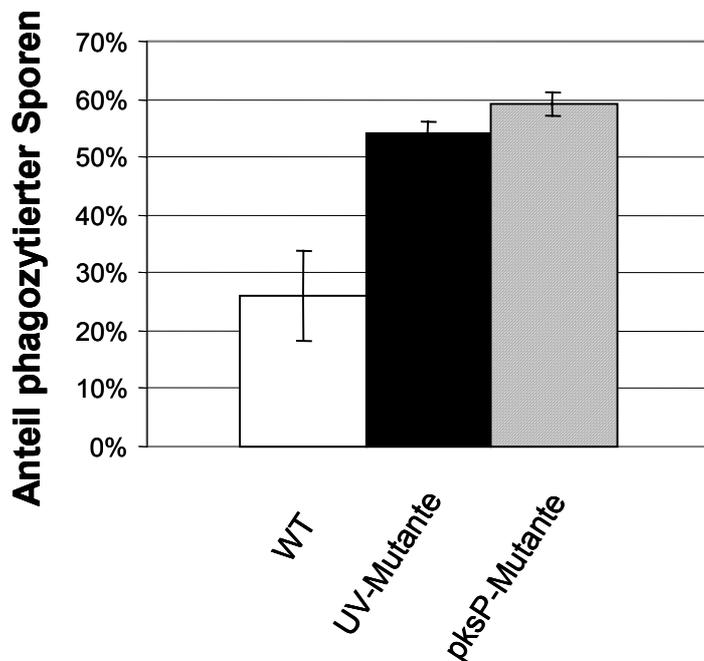


Abbildung 40: Infektion von J774-Makrophagen mit ruhenden WT-Sporen, Sporen der UV-Mutante und Sporen der *pksP*-Mutante. Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt, indem zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet wurden.

3.3.8. Phagozytose der *rodA*-Mutante

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die äußerste Zellwand von *A. fumigatus*-Sporen aus der so genannten „Rodlet“-Struktur besteht (Rohde *et al.*, 2002). Diese setzt sich aus Hydrophobin A (Rod A) und Hydrophobin B (Rod B) zusammen (Paris *et al.*, 2003).

A. fumigatus-Sporen der *rodA*-Mutante fehlt die äußere „Rodlet“-Struktur. Die Sporen besitzen wie die *pkpP*-Mutante, eine glatte Oberfläche (Thau *et al.*, 1994). Die Phagozytosebereitschaft der Sporen der *rodA*-Mutante in J774-Zellen nach 3 h sind in Abbildung 41 dargestellt. Die Rod A-Sporen werden mit 91,7 % (+/- 0,4 %) wesentlich effizienter phagozytiert als die WT-Sporen mit 55,8 % (+/-5,9 %).

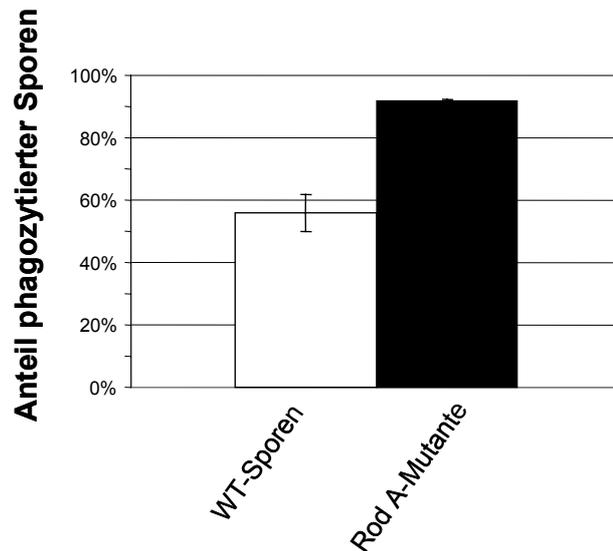


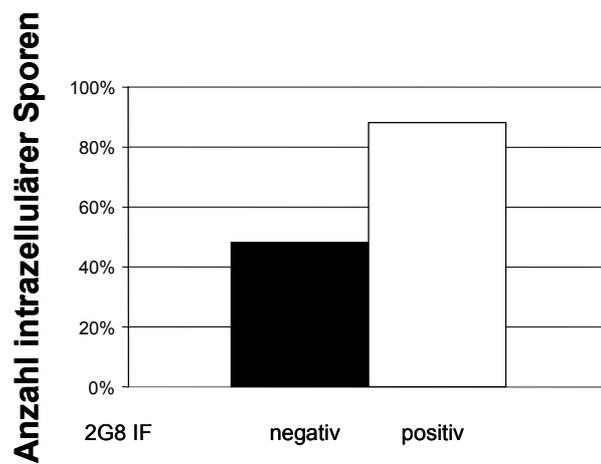
Abbildung 41: Infektion von J774-Makrophagen mit ruhenden WT-Sporen (A) und Sporen der *rodA*-Mutante nach 3 h Infektion. Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt, indem zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet wurden.

3.3.9. Lokalisation von β 1-3 Glucan-positiven *A. fumigatus*-Sporen während der Infektion von Makrophagen

Um zu sehen, ob β 1-3 Glucan positive Sporen bevorzugt phagozytiert werden, wurden J774-Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und gefärbt. Die Färbung der extrazellulären Sporen erfolgte mit dem anti-*Aspergillus* Antikörper (siehe Abbildung 42 B (d)), nach der Permeabilisierung ließ sich β 1-3 Glucan mit dem mab2G Antikörper anfärben (a). Alle Sporen sind mit Calcofluor (b), die Oberfläche der Makrophagen ist mit Concanavalin A angefärbt (c).

Während der Infektion von J774-Makrophagen mit ruhenden *A. fumigatus*-Sporen konnten β 1-3 Glucan positive Sporen mit dem monoklonalen Antikörper 2G8 nach 30 min noch nicht detektiert werden. Die ersten β 1-3 Glucan positiven Sporen traten nach 1 h auf. Wie in Abbildung 42 (A) dargestellt, wurden die 2G8-positiven Sporen nach 3 h mit 86 % effizienter aufgenommen als die restlichen Sporen.

A



B

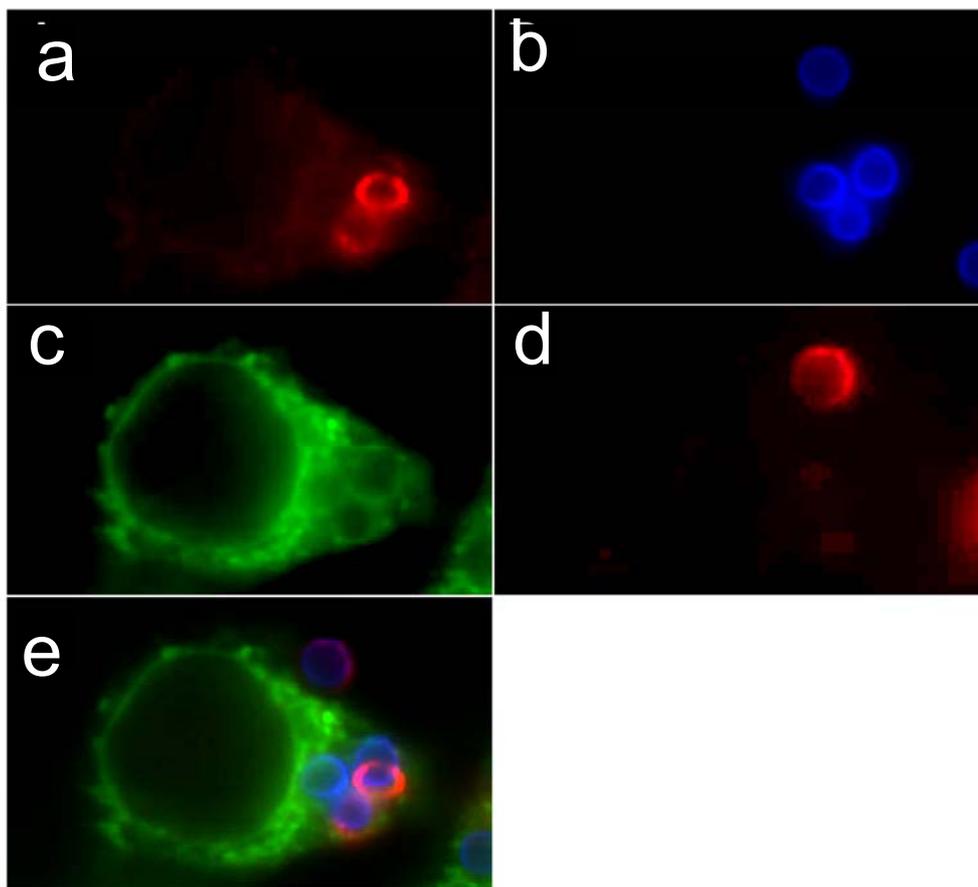


Abbildung 42: A) Infektion von J774-Makrophagen mit ruhenden *A. fumigatus*- Sporen nach 3 h. B) a: β -Glucan angefärbte Sporen mit mab2G8 und anti Maus Cy3-Sekundärantikörper, b: alle Sporen gefärbt mit Calcofluor, c: Makrophagen gefärbt mit Concanavalin A d: extrazelluläre Sporen gefärbt mit einem anti-*Aspergillus* Antikörper und einem Kaninchen-Cy5 Sekundärantikörper, e: Überlagerung von a-d.

3.3.10. Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch einen anti-Dectin-1 Antikörper

3.3.10.1. Dectin-1 wird für eine effiziente Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen benötigt

Die Erkennung von β 1-3 Glucan erfolgt über Dectin-1, einen auf dendritischen Zellen und Makrophagen zu findenden Rezeptor (Brown *et al.*, 2002). Es ist bereits gezeigt worden, dass die Bindung von β 1-3 Glucan an Dectin-1 eine proinflammatorische Antwort induziert (Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2003), und es stellte sich heraus, dass Dectin-1 auch für die Phagozytose von Zymosan wichtig ist (Herre *et al.*, 2004a) und für *Candida albicans* (Gantner *et al.*, 2005). Zymosan ist ein Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae* und gilt schon seit 50 Jahren als Modellorganismus für die Phagozytose und Inflammation *in vivo* und *in vitro* (Di Carlo und Fiore, 1958).

Aufgrund dieser Ergebnisse war es interessant herauszufinden, welche Bedeutung Dectin-1 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen hat. Um dies zu untersuchen, wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der die extrazelluläre Domäne von Dectin-1 erkennt und somit auch seine Aktivität blockiert (Brown *et al.*, 2002). Hierzu wurden J774-Makrophagen und primäre Zellen mit *A. fumigatus* in der Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen des anti-Dectin-1-Antikörpers (2A11) für 1 h oder 3 h infiziert. Die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays gemessen, indem zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet wurden. Der Antikörper war während der gesamten Versuchsdauer im Ansatz vorhanden.

Wie in Abbildung 43 dargestellt, blockierte der 2A11-Antikörper die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Makrophagen (A) und in Peritonealmakrophagen des Mausstammes C3H7HeN (B) abhängig von der eingesetzten Konzentration. Der Antikörper inhibierte die Phagozytose der *A. fumigatus*-Sporen auf 4,6 % in J774 und auf 21 % in den primären C3H/HeN Makrophagen, während die entsprechenden Isotypkontrollen keinen Einfluss gehabt hatten (D). Dagegen wurde bei der Infektion der Peritonealmakrophagen mit Kontrollbeads keine Reduktion der Phagozytose beobachtet (C). Die größte Hemmung erfolgte bei einer Antikörper-Konzentration von 10 μ g/ml sowohl für J774-Makrophagen als auch für die primären Zellen (A und B).

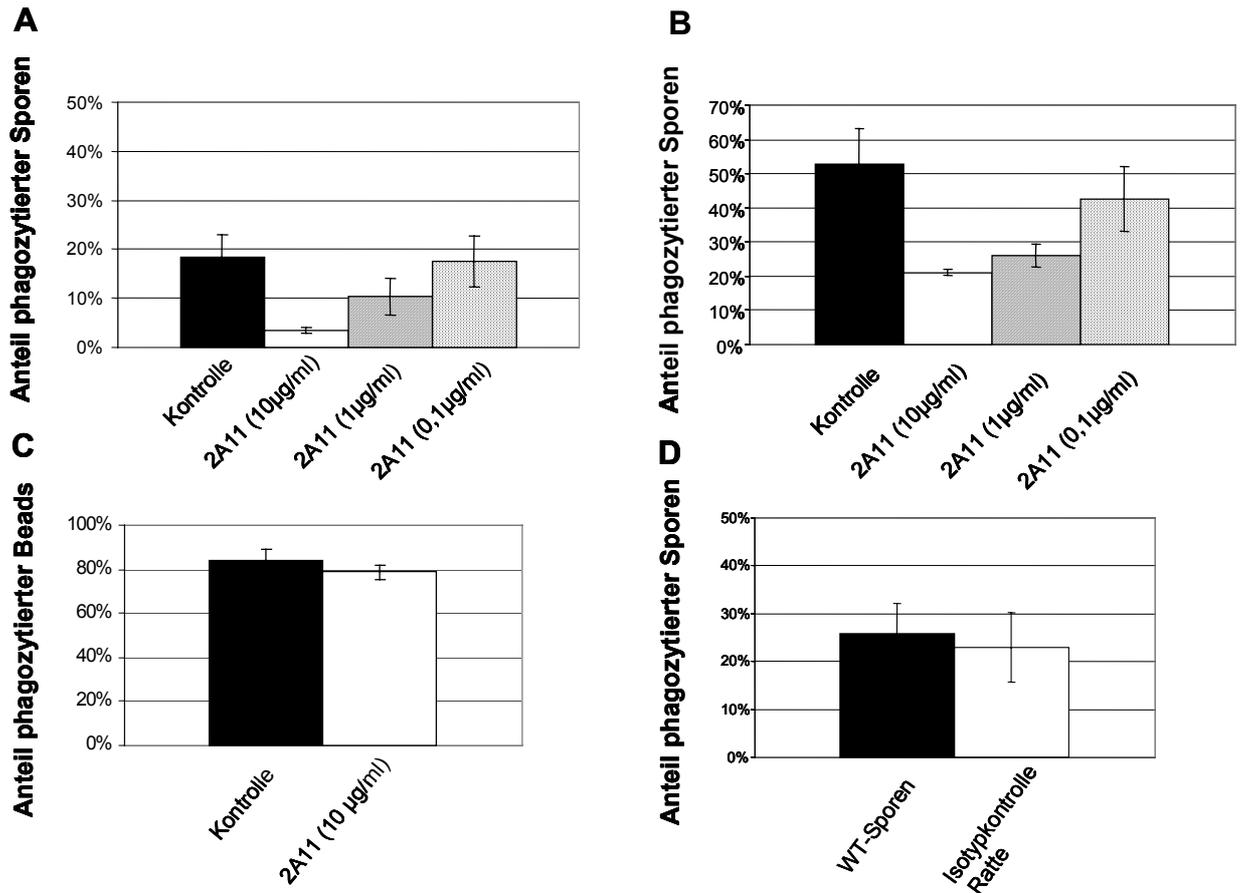


Abbildung 43: J-774 Makrophagen (A) und Peritonealmakrophagen C3H/HeN Makrophagen (B) wurden mit *A. fumigatus*-Sporen mit einer MOI von 10 in der An- und Abwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen anti-Dectin-1 Antikörper 2A11 infiziert (3 h). C) Kontrollinfektion mit BSA-Beads in der An- und Abwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen des 2A11 (3 h), D) Isotypkontrolle Ratte IgG. Der Prozentsatz der intrazellulären Sporen wurde mit Hilfe der BCS Methode bestimmt. Alle Ergebnisse dokumentieren Daten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

3.3.10.2. Einfluss auf die Zelladhäsion

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der monoklonale Dectin-1-Antikörper 2A11 einen Effekt auf die Adhäsion von *A. fumigatus*-Sporen an Makrophagen hat. Wie aus Abbildung 44 hervorgeht, konnte eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der Sporen an die Peritonealmakrophagen beobachtet werden, die vorher mit dem Antikörper inkubiert worden waren (~7,8 Sporen im Vergleich zu ~4,3 Sporen bei nichtbehandelten Zellen). Dies deutet darauf hin, dass Dectin-1 schon bei der initialen Interaktion zwischen Sporen und Makrophagenoberfläche beteiligt ist.

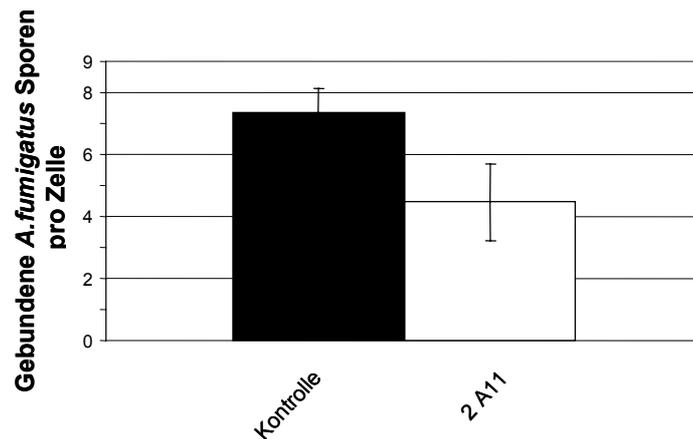


Abbildung 44: Quantifizierung der Adhäsion von *A. fumigatus*-Sporen an Makrophagen in der An- bzw. Abwesenheit des Dectin-1 mab 2A11.

3.3.10.3. Lokalisierung des Dectin-1 in der Immunfluoreszenz

Dectin-1 ist funktionell mit der Erkennung und der Phagozytose von β 1-3 Glucan enthaltenen Partikeln in Verbindung zu bringen. Die Rekrutierung dieses Rezeptors in Phagozytosevakuolen wurde bereits in transfizierten Zellen und primären Makrophagen gezeigt (Herre *et al.*, 2004; Gantner *et al.*, 2005; Hohl *et al.*, 2005). Mit Hilfe des mab 2A11- und eines spezifischen polyklonalen anti-Dectin-1 Antikörpers wurde in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation des Dectin-1 in J774 und in murinen Peritonealmakrophagen vor und nach der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen untersucht. Nach der Permeabilisierung nicht infizierter Zellen wurde Dectin-1 in bestimmten intrazellulären Strukturen sichtbar (siehe Abbildung 45 A), wohingegen vor einer Permeabilisierung mit Hilfe des polyklonalen anti-Dectin-1 Antikörpers eine nur sehr schwache Färbung zu sehen war (Daten nicht gezeigt).

In den Zellen, die mit *A. fumigatus* GFP-Sporen infiziert worden sind, ist die Rekrutierung von Dectin-1 in Phagosomen in einigen Zellen zu sehen. Die Phagosomen tauchen erst nach einer Infektionszeit von 1 h auf (siehe B und B'). Ein ähnliches Muster wird allerdings auch nach 3 h gefunden (siehe C und C').

Es traten jedoch auch intrazelluläre Sporen auf, bei denen keine Rekrutierung von Dectin-1 sichtbar wurde (Daten nicht gezeigt).

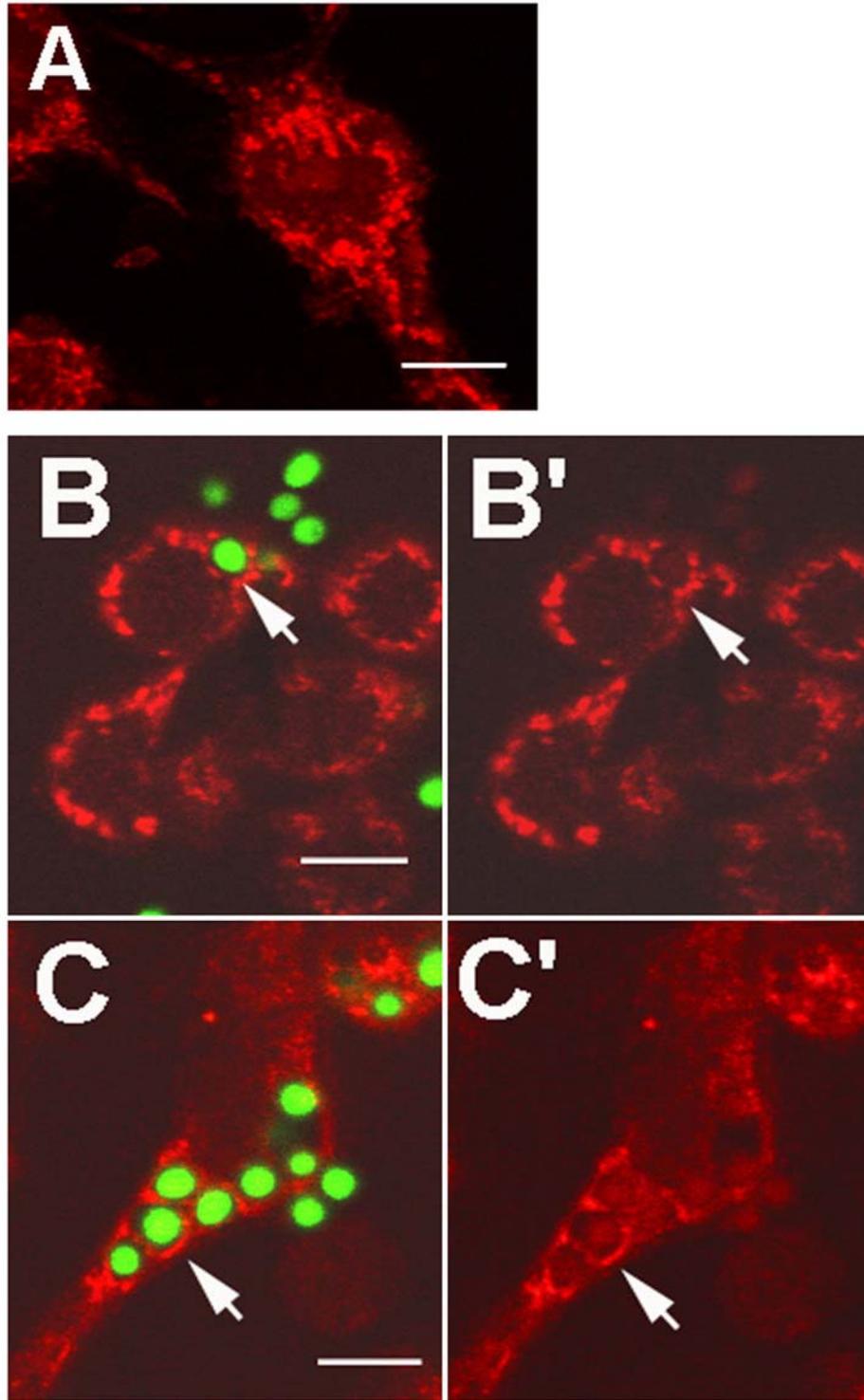


Abbildung 45: Lokalisation von Dectin-1 in infizierten und nicht infizierten Makrophagen:
A) Nach der Permeabilisierung nicht infizierter Zellen ist Dectin-1 in bestimmten intrazellulären Strukturen sichtbar. J774 wurden mit GFP *A. fumigatus*-Sporen 1 h (B und B') und 3 h (C und C') infiziert, fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Dectin-1 wurde mit Hilfe des 2A11-Antikörpers und mit Cy3-konjugiertem Zweitantikörper gefärbt (rot). Die Pfeile in B' und D' zeigen die Rekrutierung des Dectin-1 um die Sporen.

3.3.10.4. Rekrutierung von Dectin-1 in infizierten Makrophagen

In einem weiteren Experiment wurden J774-Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert, und die fixierten Zellen wurden sowohl mit dem monoklonalen β 1-3 Glucan Antikörper 2G8 als auch mit dem anti-Dectin-1 Antikörper angefärbt. Wie aus Abbildung 46 ersichtlich, zeigten sich in einigen Zellen um die β 1-3 Glucan positiv angefärbten Sporen (B) auch eine Rekrutierung des Dectin-1 (A, C).

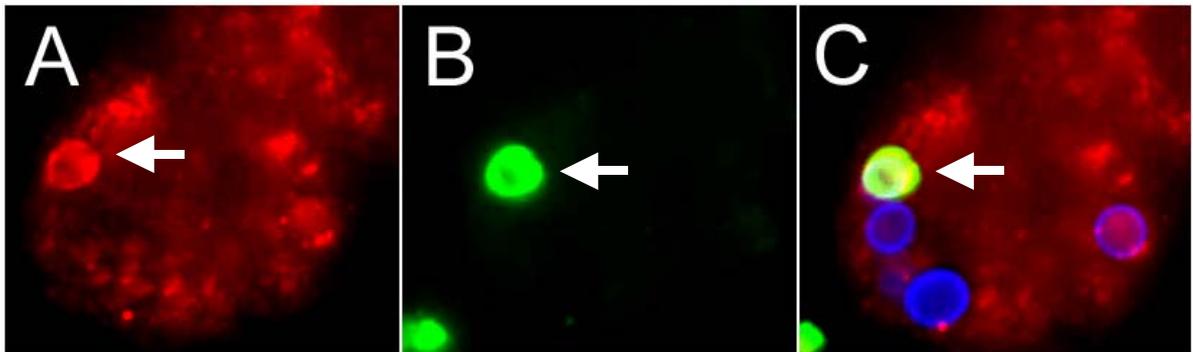


Abbildung 46: J774-Makrophagen wurden mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert. A) Immunfluoreszenz mit anti-Dectin-1. B) β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von Sporen wurde mit Hilfe des mab 2G8 angefärbt. C) Überlagerung aus A und B. Die Sporen wurden zusätzlich mit Calcofluor angefärbt.

3.3.11. Syk-abhängige Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Im Gegensatz zu den TLR ist über die Signaltransduktionskaskade von Lektin-Rezeptoren erst wenig bekannt. Für dendritische Zellen ist gezeigt worden, dass es einen Syk-abhängigen und einen Syk-unabhängigen Signalweg gibt (Rogers *et al.*, 2005).

Dectin-1 verfügt über ein ITAM-ähnliches Motiv. Es wurde bereits gezeigt, dass Dectin-1 der erste „non-TLR“ ist, der seine eigene intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslösen kann (Brown, 2006). Beteiligt hierbei ist die „spleen tyrosine kinase“ Syk.

In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob Syk auch bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen involviert ist.

3.3.11.1. Effekte von Piceatannol und PP2

Um zu überprüfen, ob die Syk-Kinase bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist, wurden J774-Makrophagen 30 min in der An-/ und Abwesenheit von 50 μ M des Syk-spezifischen Tyrosin-Kinase Inhibitors Piceatannol vorinkubiert und anschließend mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert. Der Inhibitor wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht heruntergewaschen.

Da Syk-Kinasen typischerweise von Kinasen der Src Familien aktiviert werden (Underhill *et al.*, 2005), wurde zusätzlich untersucht, ob PP2 als spezifischer Inhibitor der Scr-Familie einen Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen hat. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls 30 min vor der Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen ohne oder mit 15 μ M PP2 vorbehandelt. Als positive Kontrolle erfolgte die Infektion in An-/ und Abwesenheit beider Inhibitoren zusätzlich mit Zymosan. Zur Bestimmung der Phagozytoseeffizienz wurde der BCS-Assay durchgeführt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigt sich, dass sich mit Hilfe von PP2 die Phagozytose von Zymosan auf 7,58 % reduzieren lässt und mit Piceatannol auf 20,86 %. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Infektion der J774-Zellen erzielt. Hier ließ sich die Phagozytose mit PP2 auf 6,79 % und mit Piceatannol auf 4,73 % reduzieren.

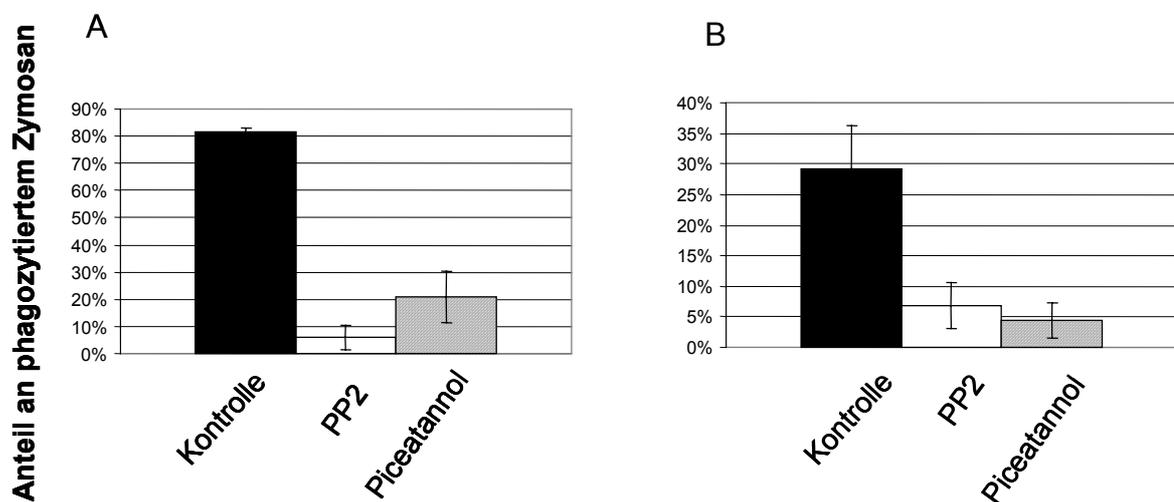


Abbildung 47: J774-Makrophagen wurden in der An-/ bzw. in der Abwesenheit von 15 μ M PP2 oder 50 μ M Piceatannol mit Zymosan (A) oder *A. fumigatus*-Sporen (B) für 3 h infiziert und die Phagozytoseeffizienz mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt. Es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.3.11.2. Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in Syk-defizienten Makrophagen

Mit Hilfe der Inhibitoren PP2 und Piceatannol ließ sich die Syk-abhängige Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen blockieren. Um weitere Evidenz der Beteiligung der Syk-Kinase bei der Phagozytose zu erhalten und um potentiell unspezifische Effekte auf die Zellen auszuschließen, wurden aus Knochenmarkschimären-Mäusen die Syk^{-/-} monozytären Zellen (Mocsai *et al.*, 2002) isoliert und mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert (3 h). Die Phagozytoseeffizienz wurde wie bei den vorherigen Versuchen mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt. Als positive Kontrolle wurde die Infektion mit Zymosan durchgeführt.

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigt sich, dass die Phagozytose von Zymosan (A) in den Syk-defizienten Makrophagen um 14,67 % reduziert ist. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen wurde um 24,04 % gehemmt (B).

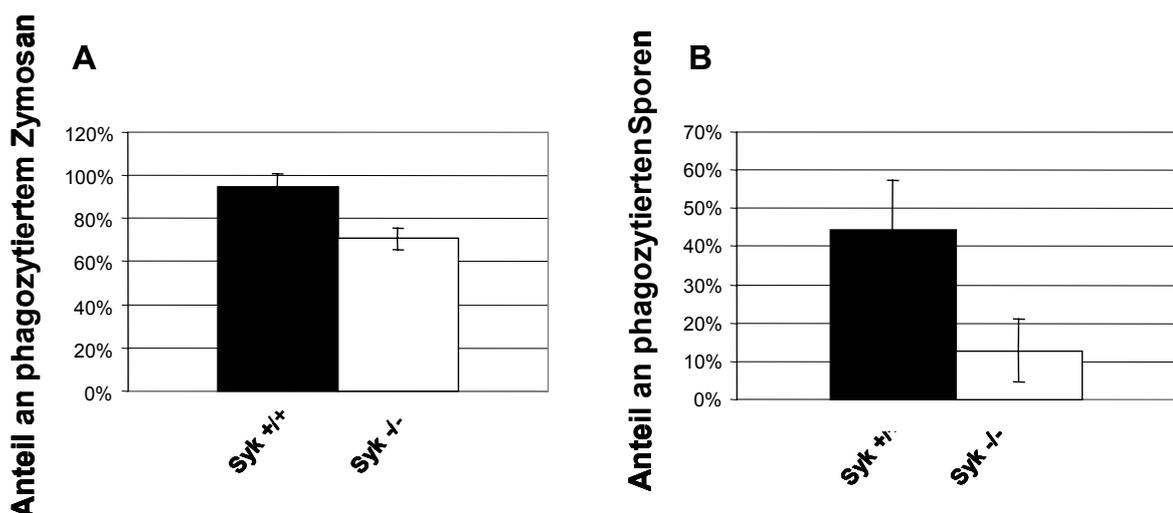


Abbildung 48: Phagozytoseeffizienz von Zymosan (A) und *A. fumigatus*-Sporen (B) in Syk-defizienten Makrophagen. Die Infektion erfolgte in Knochenmarksmakrophagen für 3 h und die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt und es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.3.12. Die Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der Phagozytose von *A. fumigatus*- Sporen

Es wurde bereits berichtet, dass es eine synergistische Interaktion zwischen Dectin-1 und TLR2 in Bezug auf die proinflammatorische Antwort von Makrophagen auf Zymosan (Gantner *et al.*, 2003) und die pathogenen Pilze *A. fumigatus* und *Coccidioides* gibt (Gersuk *et al.*, 2006; Hohl *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2003; Viriyakosol

et al., 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass *A. fumigatus*-Sporen und Hyphen von TLR2 und TLR4 erkannt werden (Meier *et al.*, 2003). Ferner zeigen die Versuche mit Laminarin und in den Syk-/-Makrophagen eine verminderte, aber keine absolute Inhibition der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Dies deutet darauf hin, dass neben Dectin-1 weitere Rezeptoren bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen eine wichtige Rolle spielen könnten.

3.3.12.1. TLR2, aber nicht TLR4 wird für eine effiziente Phagozytose benötigt

Um zu untersuchen, ob TLR2 und TLR4 auch einen Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus* haben, wurden Peritonealmakrophagen aus C3H/HeN Wildtypmäusen (TLR2+/+, TLR4+/+), C3H/HeJ-Mäusen (TLR2+/+, TLR4d/d), C3H/HeN TLR2-/-Mäusen (TLR2-/-, TLR4+/+) und C3H/HeJ TLR2-/-Mäusen (TLR2-/-, TLR4d/d) isoliert und mit *A. fumigatus*-Sporen für 1 h oder 3 h infiziert. Anschließend wurde der BCS-Assay durchgeführt, um die Phagozytoserate zu bestimmen.

Wie in Abbildung 49 gezeigt, hat das Fehlen von TLR2 einen deutlichen Einfluss auf die Phagozytose nach 1 h und nach 3 h Infektion (A). Kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Phagozytoseeffizienz wurde bei den TLR4-defizienten Mäusen gesehen. Die Doppeldefizienten Mäuse zeigten eine ähnliche Phagozytoserate mit 23,3 % (+/-0,1 %) wie die TLR2 defizienten Mäuse, was wiederum darauf hindeutet, dass TLR4 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen nicht beteiligt ist.

Die Bedeutung des TLR2 für die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen ließ sich in mehreren Versuchen bestätigen. Auch Mäuse, die einen anderen genetischen Hintergrund aufwiesen, zeigten ähnliche Ergebnisse. In Abbildung 49 (B) wurde derselbe Versuch mit C57/Bl6-Mäusen durchgeführt. Allerdings waren hier die maximalen Phagozytoseraten mit 12,5 % (+/-0,05 %) nach 1 h und 14,1 % (+/-3,1 %) nach 3 h deutlich niedriger als bei den C3H/HeN-Mäusen. Bei den TLR2-Makrophagen lagen die Phagozytoseraten bei 3,38 % (+/-0,25 %) nach 1 h und 4,4 % (+/-1,5 %) nach 3 h Infektion.

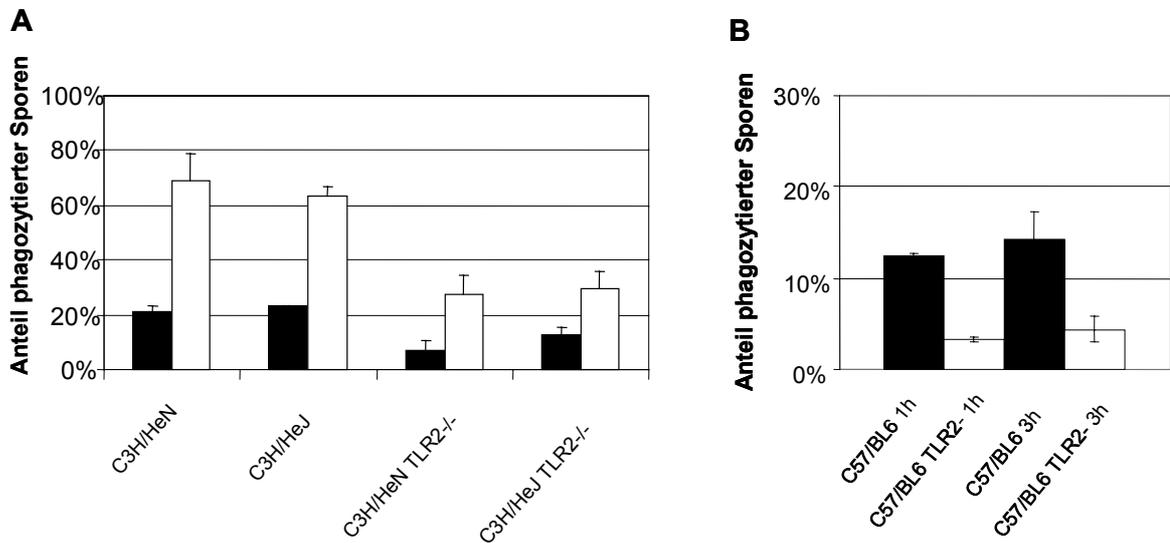


Abbildung 49: A) Peritonealmakrophagen aus C3H/HeN Wildtyp-Mäusen (TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+}), C3H/HeJ Mäusen (TLR2^{+/+}, TLR4^{d/d}), C3H/HeN TLR2^{-/-}-Mäusen (TLR2^{-/-}, TLR4^{+/+}) und C3H/HeJ TLR2^{-/-} Mäusen 1 h oder 3 h (weiße Balken) infiziert. B) Peritonealmakrophagen aus C57/BL6 2^{-/-} Mäusen wurden ebenfalls mit *A. fumigatus*-Sporen für 1 h und 3 h infiziert. Der Anteil der intrazellulären Sporen wurde mit Hilfe der BCS-Assays bestimmt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet. Die Daten stammen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.3.12.2. Adhäsion von *A. fumigatus*-Sporen an TLR-defizienten Makrophagen

Um zu sehen, ob TLR2 und TLR4 bei der initialen Bindung von *A. fumigatus*-Sporen an Makrophagen eine Rolle spielt, wurden in weiteren Versuchen die Adhäsion der *A. fumigatus*-Sporen an TLR-defiziente Makrophagen untersucht. Hinsichtlich der Adhäsion von *A. fumigatus*-Sporen an Makrophagen war kein Unterschied in Bezug auf das Fehlen von TLR2 und/oder TLR4 zu erkennen (siehe Abbildung 50). An allen Zellen hatte ungefähr die gleiche Anzahl von *A. fumigatus*-Sporen gebunden. Dies deutet darauf hin, dass beide Rezeptoren nicht an der initialen Interaktion zwischen Sporen und den Rezeptoren der Makrophagenoberfläche involviert sind.

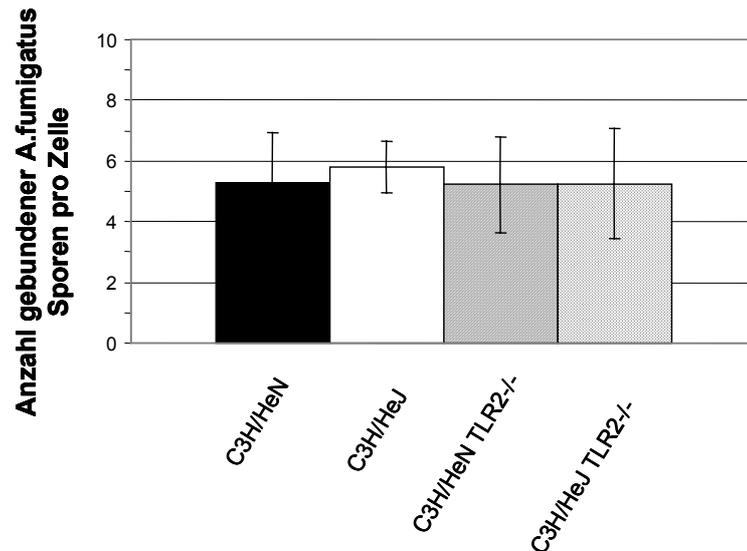
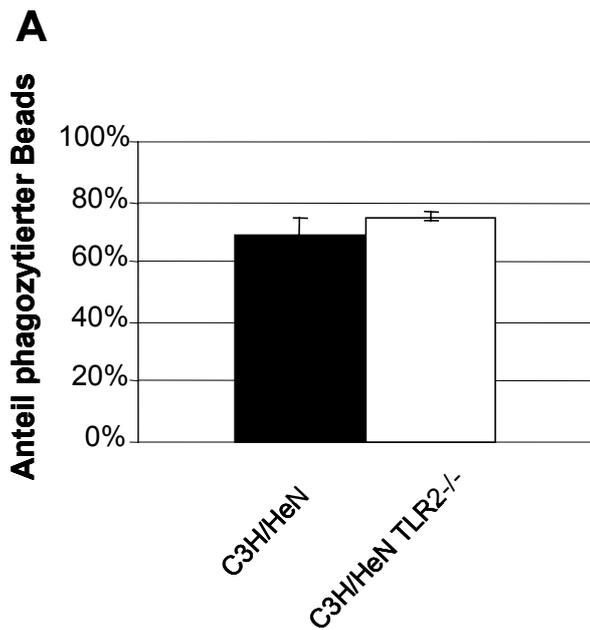


Abbildung 50: Anzahl der durchschnittlichen Menge an gebundenen Sporen pro C3H/HeN Makrophage (TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+}), C3H/HeJ Makrophage (TLR2^{+/+}, TLR4^{d/d}), C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophage (TLR2^{-/-}, TLR4^{+/+}) und C3H/HeJ TLR2^{-/-} Makrophage (TLR2^{-/-}, TLR4^{d/d}).

3.3.12.3. Phagozytose von biotinylierten BSA-Beads in Peritonealmakrophagen (C3H HeN) nach 3 h

Um zu zeigen, dass C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen (TLR2^{-/-}, TLR4^{+/+}) nicht generell schlechter phagozytieren als WT C3H/HeN Makrophagen (TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+}), wurden C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen (TLR2^{-/-}, TLR4^{+/+}) und WT C3H/HeN Peritonealmakrophagen (TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+}) mit biotinylierten BSA-Kontrollbeads inkubiert. Anschließend wurde der BCS-Assay durchgeführt. In Abbildung 51 (A) ist zu erkennen, dass zwischen den C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen (TLR2^{-/-}, TLR4^{+/+}) und den WT C3H/HeN Makrophagen (TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+}) kein Unterschied in der Phagozytoseeffizienz besteht: Dies zeigt, dass TLR2^{-/-} Makrophagen nicht generell schlechter phagozytieren als die WT-Makrophagen und dass es sich bei der TLR2-abhängigen Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen um einen spezifischen Effekt handelt. Exemplare Beispiele der Immunfluoreszenz-Daten, die als Basis für die graphische Darstellung des BCS-Assays dienen, sind in Abbildung 51 (B) dargestellt. Die phagozytierten BSA-Beads sind in blau angefärbt, die extrazellulären in blau und rot.



B

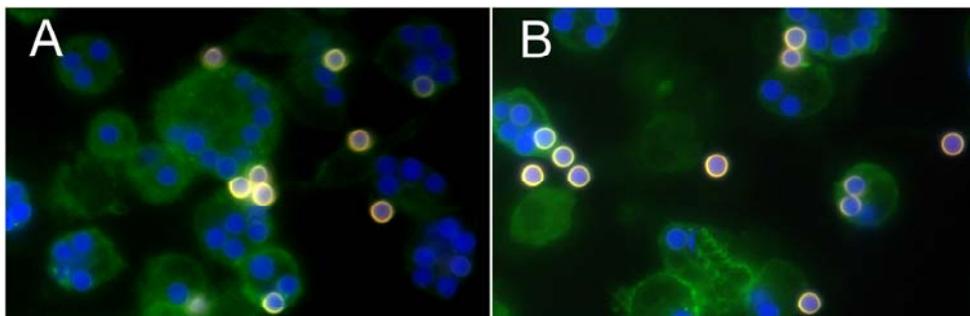


Abbildung 51: A) Kontrollexperiment mit BSA-gekoppelten Beads. C3H/HeN Makrophagen und C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen wurden mit biotinylierten BSA-Beads für 3 h inkubiert; die Phagozytoseeffizienz wurde gemessen. Der Anteil der intrazellulären Beads wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt. B) Immunfluoreszenzaufnahmen der C3H/HeN Makrophagen (A) und der C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen (B); die Zellen wurden mit Concanavalin A grün angefärbt, extrazelluläre Beads mit Streptavidin Cy3 in rot, intra- und extrazelluläre BSA-Beads mit Calcofluor (blau).

3.3.12.4. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Peritonealmakrophagen lässt sich mit einem TLR2-spezifischen Antikörper blockieren

Um weitere Belege für die Relevanz von TLR2 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zu erhalten, wurden Zellen für 30 min mit dem TLR2 spezifischen mAb T2.5 Antikörper (Meng *et al.*, 2004) geblockt. Anschließend erfolgte die Infektion für 3 h, der Antikörper wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht heruntergewaschen.

Zellen, die mit dem Antikörper behandelt worden waren, zeigten eine reduzierte Phagozytose (B), wohingegen die entsprechende Isotypkontrolle keinen Effekt zeigt (C). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Diese Daten bestätigen wiederum und unabhängig von den TLR2-defizienten Makrophagen, dass TLR2 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist.

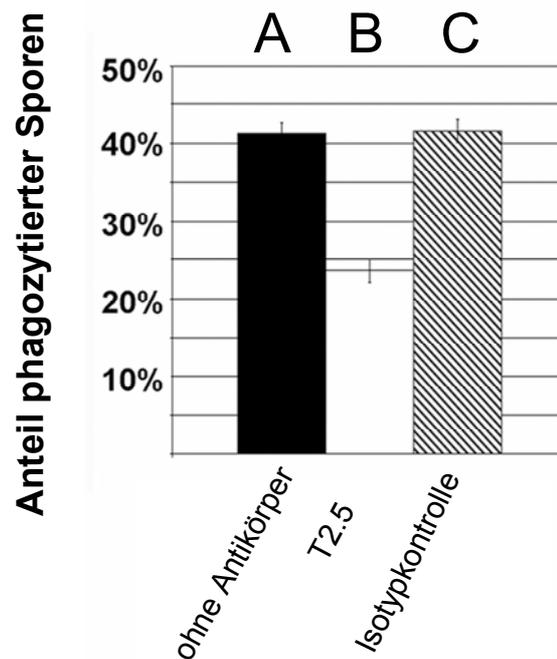


Abbildung 52: Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in Peritonealmakrophagen (C3H/HeN) mit Hilfe eines TLR2-Antikörpers (T2.5). Peritonealmakrophagen wurden mit einer MOI von 10 in der (A) Ab- und (B) Anwesenheit eines anti-TLR2 monoklonalen Antikörpers T2.5 (50 µg/ml) und in der (C) Anwesenheit einer Isotypkontrolle infiziert. Der Anteil der intrazellulären Sporen wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgewertet.

3.3.13. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen ist abhängig von MyD88

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Signalkaskade bei der TLR2-abhängigen Phagozytose über MyD88 verläuft. MyD88 ist ein Adaptorprotein, welches bei einer Ligandenerkennung von TLR2 rekrutiert wird (Medzhitov *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 53 zu erkennen ist, zeigten die MyD88-defizienten Mäuse mit 11,9 % (+/- 0,17 %) eine reduzierte Phagozytoserate im Vergleich zum Wildtyp mit 22,3 % (+/- 2,9 %). Die Aufnahme der MyD88-defizienten Makrophagen aus C57/Bl6-Mäusen entsprach ungefähr der Aufnahme der TLR2-defizienten Makrophagen mit 7,23 % (+/- 1,9 %).

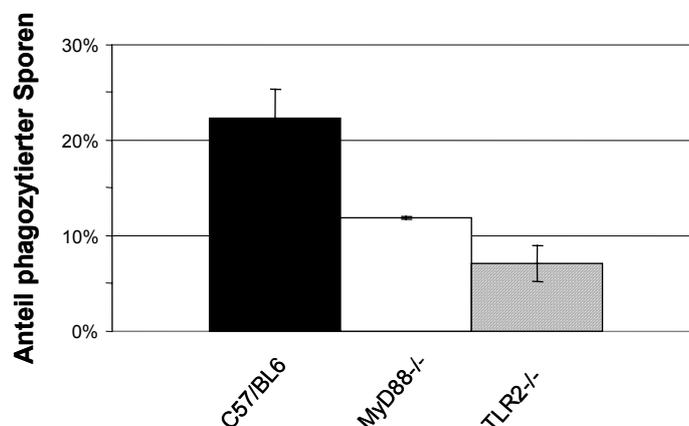


Abbildung 53: Peritonealmakrophagen (C57/Bl6, schwarze Säule) und die entsprechende MyD88-defizienten und TLR2-defizienten Makrophagen (graue bzw. weiße Säule) wurden mit *A. fumigatus*-Wildtypsporen mit einer MOI von 10 für 3 h infiziert. Der Prozentsatz der phagozytierten Sporen wurde mit Hilfe des BCS-Assays bestimmt.

3.3.14. P₃CSK₄-Stimulation zeigt keinen Effekt auf die Phagozytose

P₃CSK₄ ist ein synthetischer tri-palmitoyliertes bakterielles Lipopeptid (Ozinsky *et al.*, 2000). Die Aktivierung von TLR2 durch P₃CSK₄ steuert die Aktivierung von NFκB abhängig von MyD88. Makrophagen wurden mit P₃CSK₄ vorbehandelt um zu sehen, ob eventuell auch eine Stimulation von TLR2 durch einen anderen Liganden die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beeinflusst. Wie in Abbildung 54 zu erkennen ist, verstärkt P₃CSK₄ nicht die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Die P₃CSK₄ vorbehandelten Makrophagen erreichen nach 3 h Infektion eine Phagozytoserate von 22,3 % (+/- 5,1 %) im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen mit 24,9 % (+/- 2,1 %).

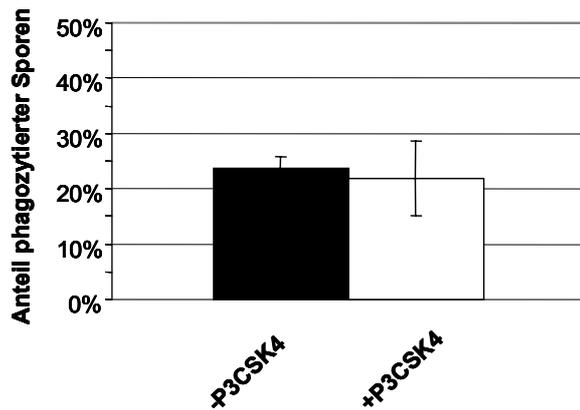


Abbildung 54: J774-Makrophagen, die mit dem TLR2-spezifischen Liganden P₃CSK₄ vorstimuliert wurden, und nicht vorstimulierte J774-Zellen wurden *A. fumigatus*-Sporen mit einer MOI von 10 für 3 h infiziert. Der Anteil der intrazellulären Sporen wurde über den BCS-Assay bestimmt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

3.3.15. Adhäsion von Sporen an transfizierten HEK293-Zellen

Um die Ergebnisse aus 3.3.10.2 und 3.3.12.2 noch einmal bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Adhäsion der *A. fumigatus*-Sporen und TLR2 oder Dectin-1 an Zellen zu bestätigen, wurden HEK293-Zellen mit einem Plasmid, das GFP alleine codiert (Kontrolle), oder in Kombination mit einem Plasmid, welches entweder Dectin-1 oder TLR2 codiert, cotransfiziert (siehe Material und Methoden 2.10.15). HEK293-Zellen besitzen weder den Dectin-1- noch den TLR2- Rezeptor (Gantner *et al.*, 2003). In Abbildung 55 ist zu erkennen, dass HEK293-Zellen, die nur mit GFP transfiziert wurden, eine geringe Bindung von Sporen aufweisen. Ungefähr ebenso viele Sporen adhäreren an den HEK293-Zellen, die mit GFP und TLR2 transfiziert wurden. Lediglich die Zellen, die mit GFP und Dectin-1 transfiziert wurden, zeigen eine verstärkte Zelladhäsion.

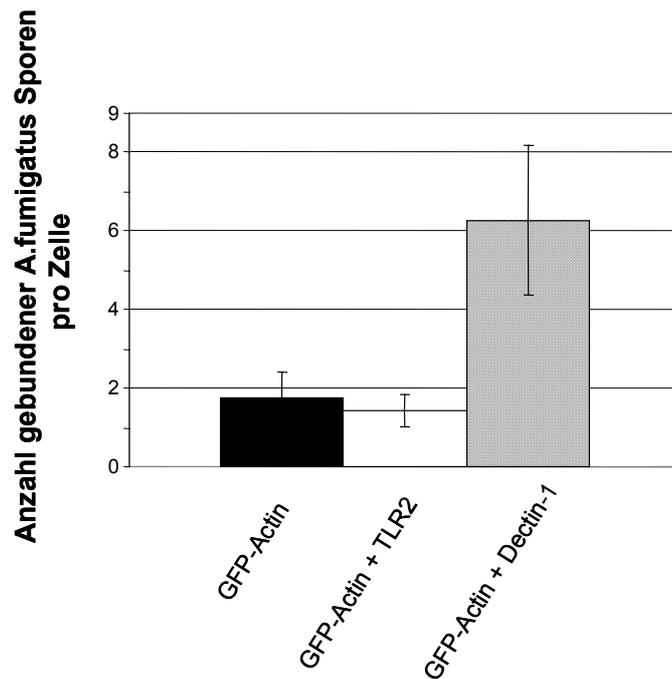


Abbildung 55: Zelladhäsion von *A. fumigatus*-Sporen an transfizierte HEK293-Zellen. HEK293-Zellen, die mit Dectin-1 und GFP cotransfiziert wurden, können die größte Menge an *A. fumigatus*-Sporen binden.

3.3.16. Der Einfluss von TLR2 auf die Phagosomen-Reifung

Bei der Phagozytose werden Partikel in einem Aktin-abhängigen Prozess aufgenommen, und es bildet sich ein Phagosom. Das Phagosom verschmilzt mit dem sauren Lysosom zu einem Phagolysosom. In diesem sauren Milieu sind proteolytische Enzyme wie Hydrolasen aktiv und bewerkstelligen den Abbau des phagozytierten Materials (Alberts *et al.*, 1997).

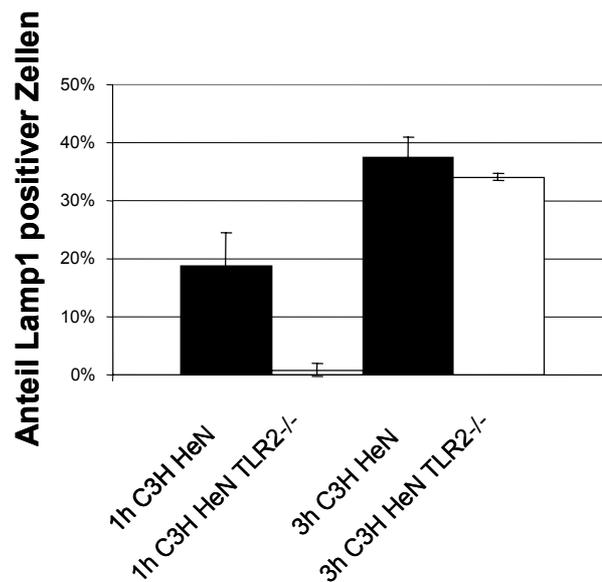
Mit Hilfe des lysosomalen Markers Lamp-1, der als Marker für frühe Phagolysosomen dient, ließ sich untersuchen, ob in Makrophagen, denen TLR2 fehlt (C3H/HeN TLR2^{-/-}), die phagozytierten Sporen einen ähnlichen Weg einschlagen wie in den WT-Makrophagen (C3H/HeN). Hierzu wurden Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen das "Lysosomal membrane protein (Lamp-1)" durchgeführt und die Anzahl der positiven Lamp-1 Vakuolen nach 1 h und nach 3 h gezählt. Es wurden insgesamt 100-200 Vakuolen ausgezählt. In Abbildung 56 A ist der Anteil Lamp-1 positiver Vakuolen um *A. fumigatus*-Sporen in C3H/HeN (schwarze Balken) und C3H/HeN TLR2^{-/-} Zellen (weiße Balken) nach 1 und 3 h dargestellt. Man erkennt, dass nach 1 h deutlich weniger Lamp-1-Vakuolen in den TLR2^{-/-} Zellen mit 1,89 % (+/- 2,13 %) im Vergleich zu den C3H/HeN Zellen mit 29,93 % (+/- 4,56 %) zu sehen sind. Nach 3 h hingegen steigt die Anzahl an Lamp-1 positiven Vakuolen in den TLR2^{-/-} Zellen rapide an, und es sind im

Ergebnisse

Vergleich zu den C3H HeN-Zellen mit 33,23 % (+/- 2,01), 39,23 % (+/- 3,4 %) an Lamp-1 positiven Vakuolen erkennbar.

Die Immunfluoreszenz-Daten zu dem soeben beschriebenen Versuch zeigt Abbildung 56 B. Dabei ist Lamp-1, das sich um die Sporen rekrutiert, rot (Cy3) visualisiert. Die Sporen leuchten mit Hilfe von Calcofluor blau, die Zellmembran ist mit Concanavalin A grün dargestellt. Die Aufnahmen zeigen, dass nach 1 h wesentlich weniger Lamp-1 Vakuolen in den TLR2-Makrophagen (a) im Vergleich zu den WT-Makrophagen (b) gefunden werden können. Nach 3 h nimmt die Anzahl an Lamp-1 positiven Vakuolen in den TLR2-defizienten Makrophagen deutlich zu (d). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TLR2 möglicherweise bei der sehr frühen Phagolysosomenreifung eine Rolle spielt, und dass dieser Einfluss auf die Phagolysosomenreifung aber nach 3 h nicht mehr nachweisbar ist.

A



B

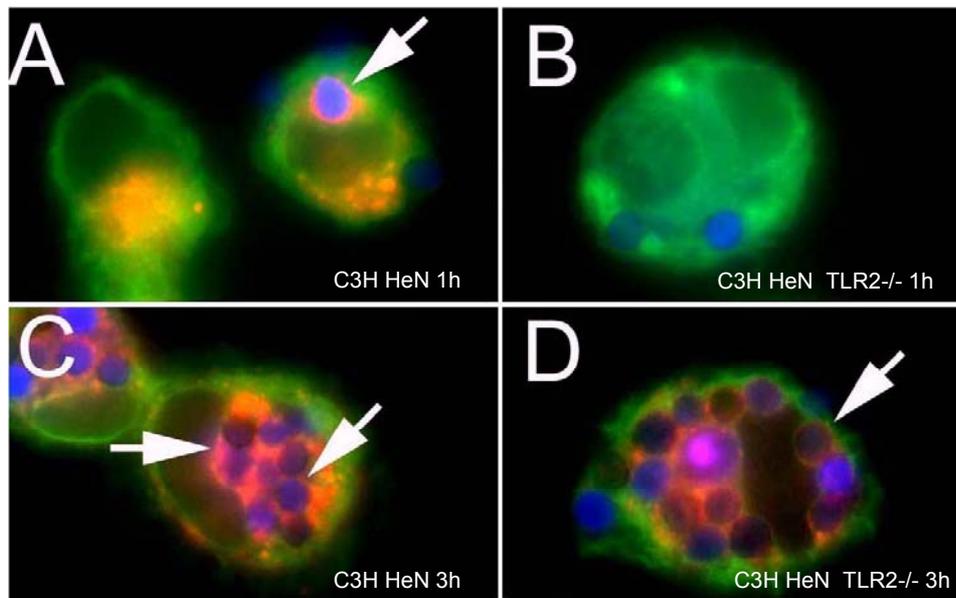


Abbildung 56: A) Anteil Lamp-1 positiver Vakuolen um *A. fumigatus*-Sporen in C3H/HeN (schwarze Balken) und C3H/HeN TLR2^{-/-} Zellen (weiße Balken) nach 1 h und 3 h. B) Lokalisation von Sporen in Lamp-1 positiven Vakuolen. C3H/HeN-Makrophagen und C3H/HeN TLR2^{-/-} Makrophagen wurden mit *A. fumigatus*-Sporen für 1 h und 3 h infiziert, permeabilisiert und mit einem anti-Lamp-1 Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein anti-Kaninchen Cy3. Die Sporen sind mit Hilfe von Calcofluor (blau), die Zellen mit Concanavalin A (grün) angefärbt.

3.3.17. Ein synergistischer Effekt zwischen Dectin-1 und TLR2?

Gantner und seine Kollegen (2003) haben herausgefunden, dass Dectin-1 und TLR2 in Bezug auf eine proinflammatorische Antwort auf Zymosan zusammenwirken.

Um zu zeigen, dass Dectin-1 und TLR2 möglicherweise bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zusammenarbeiten, wurden C3H/HeN Mäusen und C3H/HeN TLR2^{-/-} Mäusen die Peritonealmakrophagen isoliert und mit *A. fumigatus*-Sporen für 3 h infiziert. Zeitgleich wurde ein Infektionsversuch durchgeführt, bei dem die TLR2-Makrophagen in der Anwesenheit des anti-Dectin-1 Antikörpers (2A11) infiziert wurden. Die Phagozytoserraten wurden wie bereits in den früheren Versuchen, mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 57 graphisch dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass die TLR2-Makrophagen, die zeitgleich mit dem anti-Dectin-1 Antikörper infiziert wurden, eine reduzierte Phagozytoserrate von 9,7 % im Vergleich zu den WT-Makrophagen besaßen. Eine ähnliche Reduktion auf 10,3 % zeigten die TLR2-Makrophagen, die ohne den Dectin-1 Antikörper infiziert wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es unter diesen experimentellen Bedingungen

Ergebnisse

keinen synergistischen Effekt zwischen Dectin-1 und TLR2 bezüglich der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen gibt.

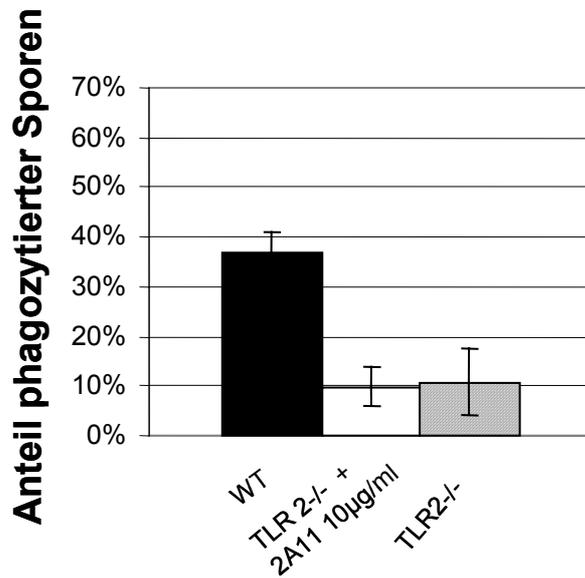


Abbildung 57: Peritonealmakrophagen aus C3H/HeN Mäusen (TLR2+/+, TLR4+/+) und C3H/HeN TLR2-/- Mäusen (TLR2-/-, TLR4+/+) wurden für 3 h mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert. C3H/HeN TLR2-/- Makrophagen wurden zusätzlich in Gegenwart des Dectin-1 spezifischen Antikörpers (2A11) infiziert. Die Phagozytoseraten wurden mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt; es wurden zwischen 150 und 300 Sporen ausgezählt.

4. Diskussion

Durch die Atmung gelangen täglich eine Vielzahl von Partikeln aus der Umwelt in die Lunge, wozu eine Reihe von Mikroorganismen, wie etwa Pilzsporen, gehören. Während die meisten Mikroorganismen harmlos sind, gibt es unter ihnen auch manche potentiell gefährliche, wie z.B. einige Pilzspezies. Nur sehr wenige Pilzarten sind für den Menschen gefährlich. Die Gesamtzahl aller Pilzarten wird auf ca. 1,2 Millionen geschätzt. Von bislang 150.000 benannten Pilzarten sind nur ca. 150-250 humanpathogene Arten bekannt.

Aspergillus fumigatus gehört zu den meist verbreiteten Pilzspezies auf der Erde und findet sich durchweg von der Antarktis bis zur Sahara. *A. fumigatus* ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der in immunsupprimierten Personen schwere systemische Mykosen verursachen kann (Latge, 1999). Es wird angenommen, dass man pro Tag mehrere hundert *A. fumigatus*-Sporen einatmet (Hospenthal *et al.*, 1998). Aufgrund ihres pathogenen Potentials gilt es, *A. fumigatus*-Sporen schnell zu erkennen und zu eliminieren.

Die Sporen von *A. fumigatus* gelangen bis in die Alveolen der Lunge, wenn sie nicht bereits vorher von physikalischen Barrieren (wie z.B. dem Flimmerepithel) hinaus transportiert wurden. Alveolare Makrophagen sind in erster Linie verantwortlich für die Eliminierung inhalierter Sporen, da sie die Sporen phagozytieren und töten. Somit ist die Phagozytose von Sporen ein frühes und wichtiges Ereignis in der Abwehr einer *A. fumigatus*-Infektion (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Bis jetzt scheiterte die Analyse des Mechanismus der Phagozytose, die durch Makrophagen und andere Wirtszellen durchgeführt wird, da geeignete und generell einsetzbare Methoden fehlten, um die Sporenaufnahme quantifizieren zu können. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, eine Methode zur Unterscheidung von phagozytierten und nicht-phagozytierten Sporen zu etablieren.

4.1. Etablierung des BCS-Assays zur Quantifizierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits einige Methoden zur Unterscheidung von intra- und extrazellulären Mikroorganismen beschrieben worden. So wurde z.B. von Heesemann und Laufs eine Doppelimmunfluoreszenzmethode zur Identifizierung intrazellulärer Yersinien entwickelt, bei der man allerdings auf das Vorhandensein von Antikörpern angewiesen ist (Heesemann und Laufs, 1985). Lopez Bezerra und Filler

entwickelten 2004 eine ähnliche Methode für *A. fumigatus* (Lopes Bezerra und Filler, 2004).

Da aber Anti-*Aspergillus* Antikörper kommerziell noch nicht erhältlich sind, hatte diese Arbeit zunächst die Aufgabe, geeignete Antikörper zu generieren, die gegen die hydrophobe Hülle von *A. fumigatus*-Sporen gerichtet sind. In einer früheren Arbeit wurden bereits drei Balb/C-Mäuse parallel mit abgetöteten *A. fumigatus*-Sporen immunisiert, wonach das Serum auf vorhandene Antikörper getestet wurde (Sturm, 2003). Diese Versuche ergaben polyklonale Seren, die aber mit ruhenden Sporen kaum reagierten. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die Methode von Paris und seinen Mitarbeitern, mittels Ultraschall nach weiteren Oberflächenproteinen gesucht, die für eine Immunisierung in Frage kommen könnten (Paris *et al.*, 2003) (siehe 3.1.1.1). Hierbei wurden Sporen biotinyliert, beschallt und mittels Streptavidin im Western Blot detektiert. Bei der Isolation von Hüllproteinen waren zwei Oberflächenproteine im Western Blot von ganz besonderem Interesse. Bei der Charakterisierung dieser beiden Proteinbanden mittels MALDI-TOF stellte sich heraus, dass es sich um die zwei Hydrophobine Hydrophobin A (Rod A) und Hydrophobin B (Rod B) handelte, die bereits in der Literatur beschrieben worden sind (Paris *et al.*, 2003). Diese Hydrophobine sind kleine, etwa 100 Aminosäuren umfassende sekretierte Proteine, die durch acht konservierte Cystein-Reste charakterisiert sind. Sie bilden *in vivo* eine hydrophobe „Rodlet“-Struktur, wie sie auch für das Sc3p Hydrophobin des Basidiomyceten *Schizophyllum commune* gezeigt werden konnte (Wosten *et al.*, 1993; Wosten und de Vocht, 2000). Sobald es zur Auskeimung der *Aspergillus*-Sporen kommt, wird die „Rodlet“-Hülle abgeworfen und ein Keimschlauch gebildet (Rohde *et al.*, 2002; Tronchin *et al.*, 1995). Die Hydrophobinschicht schützt *Aspergillus* vor schädigenden Umwelteinflüssen und der angeborenen Immunität (Brown, 2006).

In dieser Arbeit wurde versucht, Hydrophobin B rekombinant herzustellen, um geeignete Antikörper zu gewinnen (siehe 3.1.1.2). Die durchgeführten Versuche ergaben aber, dass sich das Hydrophobin B trotz richtiger Gensequenz in *E. coli* auch unter verschiedenen Bedingungen nicht überexprimieren ließ. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass das gebildete Protein toxisch für *E. coli* ist oder dass das Expressionskonstrukt in der Zelle nicht stabil exprimiert wurde.

Alternativ wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, geeignete Oberflächenantikörper zu erhalten. Neben den Hydrophobinen befindet sich das blaugrüne so genannte Dihydroxynaphtalen-Melanin auf den Sporen von *A. fumigatus*. Wang und seinen Mitarbeitern ist es 1996 gelungen, die leere Pigmenthülle von *Cryptococcus neoformans* zu isolieren, die sie als Melanin-„Ghosts“ bezeichneten. Die Herstellung beruhte auf der Beobachtung, dass das Melanin auf den Zellen nach

Behandlung mit Guanidin Thiocyanat und HCL noch erhalten blieb (Wang *et al.*, 1996). Youngchim und Kollegen stellten 2004 Melanin-„Ghosts“ von *A. fumigatus* her, immunisierten Balb/C-Mäuse damit und generierten Antikörper gegen die Melanin-Partikel. In Anlehnung an die genannten Ergebnisse wurden in dieser Arbeit so genannte Melanin-„Ghosts“ von *A. fumigatus*-Sporen hergestellt und damit zwei Balb/C-Mäuse immunisiert (siehe 3.1.1.3). Das Durchmustern der Hybridomüberstände in der Immunfluoreszenz ergab kein eindeutiges Ergebnis. Zum einen waren die anti-Melanin Ghost-Antikörper in der Lage, die Sporen der pigmentlosen, weißen *pksP*-Negativkontrolle anzufärben und zum anderen ließen sich einige Sporen des Wildtyps mit dem Antikörper überhaupt nicht anfärben: Somit waren diese Antikörper für den Phagozytoseassay nicht geeignet. Deshalb wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, *A. fumigatus*-Sporen in der Immunfluoreszenz zu detektieren, um Phagozytoseraten quantifizieren zu können. So wurde in dieser Arbeit der so genannte „**Biotin-Calcofluor-Staining Assay (BCS)**“ entwickelt (siehe 3.1.2). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass man keine Antikörper benötigt. Der BCS-Assay ist eine einfache und verlässliche Methode zur Unterscheidung zwischen extrazellulären und bereits phagozytierten Sporen. Die Methode benötigt keine sporenspezifischen Antikörper, sondern basiert auf der Tatsache, dass sich die Sporen biotinylieren lassen und anschließend mit Streptavidin-Cy3 angefärbt und visualisiert werden können. Da Streptavidin-Cy3 die Wirtszellmembran ohne Permeabilisierung nicht durchdringen kann, werden nur extrazelluläre Sporen angefärbt. Im Gegensatz dazu kann Calcofluor durch sein kleines Molekulargewicht die Wirtszellmembran ohne vorherige Permeabilisierung durchqueren und so intra- und extrazelluläre Sporen anfärben. Diese Arbeit zeigt, dass die Biotinylierung der Sporen eine milde Methode ist, die die Lebensfähigkeit der Sporen nicht beeinträchtigt (siehe 3.1.3.1). So waren biotinylierte Sporen im Vergleich zu nicht biotinylierten Sporen ebenfalls in der Lage, in AMM-Medium gleichermaßen auszukeimen (siehe 3.1.3.1). Des Weiteren wurde auch die Adhäsionsfähigkeit nicht beeinflusst (siehe 3.1.3.2), d.h. es wurde kein Unterschied in der Adhäsion von biotinylierten und nichtbiotinylierten Sporen an humanen A549 Epithelzellen festgestellt. Die Daten dieser Arbeit bestätigen, dass die Phagozytoserate die mit dieser Methode erzielt worden sind, vergleichbar waren mit denjenigen, die mit Hilfe eines anti-*Aspergillus* Antikörpers und der „Inside out staining“-Methode erzielt wurden (siehe 3.1.3.3) (Heesemann und Laufs 1985). Um die breitere Anwendungsmöglichkeit der BCS-Methode im Vergleich zur Antikörper-basierenden Doppelimmunfluoreszenzmethode zu zeigen, wurden unterschiedliche *Aspergillus*-Isolate, unterschiedliche Zelltypen, unterschiedliche *Aspergillus*-Stämme und unterschiedliche Pilze getestet. Der Stamm ATCC46645 wurde aus der Lunge

eines Patienten isoliert, der 1955 an einer invasiven Aspergillose litt (Hearn und Mackenzie, 1980). Dieser Stamm gilt als etablierter Laborstamm und wurde für die meisten Versuche in dieser Arbeit verwendet. Um die Phagozytose dieses Stammes mit weiteren erst kürzlich isolierten Stämmen zu vergleichen, wurden Isolate aus der Lunge von Patienten, die an einer Mukoviszidose litten, untersucht und mit dem Stamm ATCC46645 verglichen (siehe 3.1.3.6). Interessanterweise waren die Phagozytoseraten der fünf untersuchten Stämme unterschiedlich, wenn auch sehr ähnlich. Am besten wurde der Stamm ATCC46645 phagozytiert. Warum unterschiedliche Phagozytoseraten erzielt wurden, lässt sich nicht eindeutig klären. Die Daten zeigen jedoch, dass es deutliche Unterschiede zwischen *A. fumigatus*-Isolaten geben kann und dass mit dem BCS-Assay die Phagozytoseeffizienz der unterschiedlichen *Aspergillus*-Isolate bestimmt werden konnte.

Des Weiteren konnte mit der BCS-Methode die Phagozytosebereitschaft unterschiedlicher Zelltypen bestimmt werden (siehe 3.1.2). Es zeigte sich, dass die Phagozytoseraten in den einzelnen Zelltypen unterschiedlich groß waren, dass sich aber die Ergebnisse in denselben Makrophagentypen gut reproduzieren ließen und auch mit den Daten anderer Arbeitsgruppen verglichen werden konnten (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). So lagen z.B. die Phagozytoseraten bei der Zelllinie J774-Zellen nach Infektion von *A. fumigatus* nach 1 h bei 22,4 % und bei der gleichen Infektionszeit bei der MH-S Makrophagen-Zelllinie bei 34,4 %. Auch die Versuche in den primären Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmakrophagen zeigten (siehe 3.3.2), dass bestimmte Zelltypen nach der selben Infektionszeit unterschiedlich große Phagozytoseraten aufwiesen. So wurden *A. fumigatus*-Sporen in Knochenmarksmakrophagen effizienter aufgenommen als in Peritonealmakrophagen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Zelltyp und der Mausstamm, aus denen die Zellen isoliert worden sind, entscheidend sind für die ermittelten Phagozytoseraten von *A. fumigatus*-Sporen.

Ein großer Vorteil des BCS-Assays ist die Tatsache, dass er eine anpassungsfähige Methode darstellt. So konnte gezeigt werden, dass sich auch andere *Aspergillus*-Stämme und auch andere Pilzarten problemlos markieren lassen, ohne auch hier die jeweiligen Antikörper generieren zu müssen. Um dies zu verdeutlichen, wurden Sporen aus fünf verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen isoliert (siehe 3.1.3.4). Bei den Stämmen handelte es sich um *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* und *A. giganteus*. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die charakteristischen Unterschiede in Hinblick auf Größe und Oberflächenbeschaffenheit (siehe 3.1.3.4). Trotz dieser Unterschiede war es möglich, alle Stämme zu biotinylieren und den BCS-Assay durchzuführen. Die Quantifizierung der Phagozytose durch J774-Makrophagen zeigte

auch Unterschiede in der Aufnahme der fünf verschiedenen Stämme. Die größte Phagozytoseeffizienz wurde mit dem *A. fumigatus*-Stamm ATCC46645 erzielt. Dagegen wiesen *A. flavus*, *A. terreus* und *A. nidulans* Isolate, Stämme mit einer reduzierten Pathogenität, geringere Phagozytoseraten auf. Die geringste Phagozytoserate wurde für den nichtpathogenen Stamm *A. giganteus* erzielt. Dies könnte auf eine spezielle Inhibierung der Phagozytose durch *A. giganteus* hindeuten. Es könnte jedoch auch ein inverser Zusammenhang zwischen der Phagozytoseeffizienz und der Pathogenität bestehen. Allerdings wäre hier eher zu erwarten gewesen, dass die pathogenen Stämme- wie z.B. *A. fumigatus* und *A. flvus*- geringere Phagozytoseraten aufweisen, um so besser einer frühen Immunantwort entkommen zu können.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen *Aspergillus*-Stämme zeigten unterschiedliche Morphologien für die einzelnen Sporen (siehe 3.1.3.4). Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Phagozytoseraten könnte sein, dass die Oberflächen der verschiedenen *A. fumigatus*-Stämme auf unterschiedliche Weise erkannt und phagozytiert werden.

Um die breite Einsetzbarkeit des BCS-Assays zu zeigen, wurden auch Sporen des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* biotinyliert und in J774-Zellen infiziert (siehe 3.1.3.5). Es konnte gezeigt werden, dass sich auch die Hefen von *C. albicans* anfärben lassen und eine Unterscheidung von intra- und extrazellulären Hefen möglich war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der BCS-Assay eine innovative, schnelle und flexible Methode ist, um die Phagozytose von *A. fumigatus*, aber auch anderen *Aspergillus*-Isolaten, *Aspergillus*-Stämmen und Pilzspezies in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen. Hierbei ist man nicht auf das aufwendige und kostenspielige Generieren von Antikörpern angewiesen, die zunächst auch nur in begrenzten Mengen verfügbar sind.

4.2. Die Aufklärung der Phagozytoseprozesse von *Aspergillus fumigatus*-Sporen durch Makrophagen

4.2.1. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen lässt sich durch verschiedene Inhibitoren blockieren

Die Mechanismen der Phagozytose sind komplex und für jeden Organismus unterschiedlich. In immunkompetenten Patienten sind Alveolarmakrophagen die wichtigsten phagozytierenden Zellen in der Lunge. Diese sind in der Lage, Sporen von *A. fumigatus* sowie anderer Eindringlinge zu bekämpfen (Latge, 1999). In

immunsupprimierten Menschen, speziell in Organtransplantierten, sind Sporen dagegen oft in der Lage auszukeimen. Dabei durchdringt das sich bildende Myzel anschließend das Lungengewebe. Die daraus resultierende invasive Aspergillose verläuft in den meisten Fällen tödlich.

Über die Aufnahme und das Abtöten von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen in immunkompetenten Menschen ist bisher wenig bekannt. Deshalb ist es wichtig, die Prozesse der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen besser zu verstehen, um so dem Überleben der Sporen bei immunsupprimierten Menschen therapeutisch entgegenwirken zu können.

Nachdem in dieser Arbeit eine geeignete Methode zur Quantifizierung der Phagozytose etabliert worden war, sollten in einem nächsten Schritt die Mechanismen der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe des BCS-Assays näher untersucht werden. Hierbei wurden die J774-, MH-S Makrophagenzelllinien und primäre humane Makrophagen in der Anwesenheit von acht verschiedenen Inhibitoren mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert; die Phagozytoseeffizienz wurde mit Hilfe des BCS-Assays ermittelt (siehe 3.2.1). Bei den Inhibitoren handelte es sich um Cytochalasin D, Genistein, PP2, Tyrphostatin (AG18), Wortmannin, Nocodazol, 2,3 Butanedion Monoxim und Amilorid.

Cytochalasin D ist ein Inhibitor, der an G-Aktin bindet und die Polymerisation der Aktinmonomeren verhindert (Sampath und Pollard, 1991). Ibrahim-Granet und ihre Kollegen zeigten bereits, dass sich die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe von Cytochalasin D blockieren lässt (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Die wichtige Rolle des F-Aktins bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Mit einer Konzentration von 2 μM konnte die Phagozytose der *A. fumigatus*-Sporen in humanen Zellen, in MHS-Zellen und in J774-Zellen bis zu 70 % blockiert werden (siehe 3.2.1.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist (siehe 3.2.1.1.1). So wurde mit einer Konzentration von 6 μM Cyt D die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Makrophagen beinahe vollständig blockiert. Die Immunfluoreszenzaufnahmen bestätigen die Annahme, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen ein aktinabhängiger Prozess ist. Es zeigten sich deutliche F-Aktin-reiche Aufnahmestrukturen nach 1 h Infektion mit *A. fumigatus* GFP-Sporen in J774-Zellen (3.2.2.1).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit Wortmannin eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3-K) und der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) (Arcaro und Wymann, 1993). PI3-K sind die Hauptregulatoren der Aktinorganisation während unterschiedlichster zellulärer Prozesse. Bis heute ist die PI3-Kinase die wichtigste Phosphatidylinositol Kinase. Um Partikel internalisieren zu können, kommt es an der Stelle, an der der Partikel

phagozytiert werden soll, zur Aktinpolymerisation sowie zur Aktivität der Pi-3 Kinase (Rupper *et al.*, 2001).

Wortmannin ist bekannt dafür, dass es die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in MH-S-Zellen blockieren kann, wie die Daten einer anderen Arbeitsgruppe bereits zeigen konnten (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Auch in unseren Versuchen war Wortmannin in der Lage, die Phagozytose in humanen Makrophagen und in den Zelllinien MH-S- und J774-Zellen nahezu vollständig zu blockieren: Somit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die funktionelle Rolle der PI3-Kinasen ist für die Fc γ -gesteuerte Phagozytose (Araki *et al.*, 1996) und Komplement-vermittelte Phagozytose (Cox *et al.*, 2001) in Makrophagen bereits untersucht worden. PI3-Kinasen scheinen nicht für die initiale Aktinpolymerisation während der Phagozytose verantwortlich zu sein, denn diese kann normal ablaufen, wenn PI-3 Kinasen inhibiert sind. Vielmehr scheinen sie das Schließen der Phagosomen zu bewirken (Araki *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999).

Neben Aktin repräsentieren Mikrotubuli ein weiteres wichtiges Element im Zytoskelett eukaryotischer Zellen. Mikrotubuli bestehen aus Tubulinuntereinheiten. Außer einer strukturellen Funktion besitzen sie auch eine dynamische Rolle in der Zelle (Harrison und Grinstein, 2002). Sie spielen z.B. in zellulären Prozessen wie Pseudopodienbildung oder Zellbewegungen eine Rolle (Nabi, 1999). Es ist auch bekannt, dass Mikrotubuli bei der Phagozytose involviert sein können. So ergaben elektronenmikroskopische Studien, dass sich die Mikrotubuli zusammen mit Aktin um phagozytierte Partikel anreichern (Reaven und Axline, 1973). Die Rolle der Mikrotubuli während der Phagozytose von Mikroorganismen wird jedoch als nicht ausschlaggebend angesehen (Kuhn, 1998).

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Mikrotubuli bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe des Inhibitors Nocodazol untersucht (siehe 3.2.1.1). Es wurde eine Konzentration gewählt, die bereits in vielen anderen Studien eingesetzt wurde (Yoshinobu *et al.*, 2004). Nocodazol bewirkt eine Depolymerisation der Mikrotubuli (Cheung und Terry, 1980). Von allen getesteten Inhibitoren zeigte Nocodazol den geringsten Effekt auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass das Mikrotubuli-System eine nicht so wichtige Rolle bei der Phagozytose von *A. fumigatus* in murinen und humanen Zellen spielt.

Die Literatur beschreibt, dass die Aktinpolymerisation nicht alleine ausreicht, um Partikel zu internalisieren. Es werden zusätzlich so genannte Motormoleküle benötigt. Myosine bilden eine große Familie von Motorproteinen, die durch die Hydrolyse von ATP in Gegenwart von filamentösen Aktin gerichtete Bewegungen erzeugen können. Es konnte gezeigt werden, dass sie u.a. bei der Phagozytose eine Rolle spielen können (Mermall *et al.*, 1998). So ist seit längerem bekannt, dass sich Myosin II an den Aktinringen von Makrophagen und Neutrophilen anlagert, die zuvor Pilze internalisiert haben. Dies

könnte ein Hinweis darauf sein, dass Myosin II als mechanischer Motor während der Aufnahme fungiert (Stendahl *et al.*, 1980). Myosin I, Myosin V und Myosin IX lagern sich ebenfalls an dem F-Aktin sich bildender Phagosomen an, was darauf hindeutet, dass sie auch bei der Internalisation beteiligt sind (Allen und Aderem, 1995; Swanson *et al.*, 1999). Neben diesen Kollokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass der breit wirkende Myosin-Inhibitor Butanedion-Monoxim (BDM) die Phagozytose von Pilzen verhindert (Swanson *et al.*, 1999). Diese Beobachtung deckt sich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe von Butanedion Monoxim in humanen, in MH-S und in J774-Makrophagen um 60-90 % inhibiert werden kann, d.h. dass Myosin bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen involviert ist.

Neben den Inhibitoren, die einzelne Komponenten des Zytoskeletts inhibieren, wurden verschiedene Kinase-Inhibitoren eingesetzt, um ihre Rolle während der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen zu untersuchen. Tyrosin-Phosphorylierungen von Effektorproteinen spielen in der Phagozytose und den daraus resultierenden aktivierten Signaltransduktionsketten eine wichtige Rolle. Zudem können zahlreiche Proteine des Aktinzytoskeletts Tyrosin-phosphoryliert vorliegen.

Um die Rolle der Kinasen für den Phagozytoseprozess zu untersuchen, kamen die Inhibitoren Genistein, AG 18 und PP2 zum Einsatz (siehe 3.2.1.1). Dabei sind Genistein und AG18 (Tyrphostatin) breit wirkende Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (Akiyama *et al.*, 1987) und PP2 ein spezifischer Inhibitor der scr-Kinasen (Gutwein *et al.*, 2000). Die meisten scr-Kinasen werden in fokalen Adhäsionskontakten gefunden. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation von Integrin-vermittelten Signaltransduktionskaskaden und können an Aktin und Integrine binden (Parson und Parson, 1987).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Genistein und AG 18 die Phagozytose abhängig vom untersuchten Zelltyp zwischen 70 % und 90 % inhibieren konnten. PP2 konnte die Sporen-Phagozytose ebenfalls um 70 % inhibieren. Diese Effekte unterstreichen die wichtige Rolle Tyrosin-phosphorylierter Proteine für das Zustandekommen einer effizienten Phagozytose. Auch scr-Kinasen sind an diesem Prozess beteiligt, wie der inhibitorische Effekt von PP2 zeigen konnte.

Weitere Belege für die Beteiligung von Tyrosin-Kinasen konnten mit Hilfe von Immunfluoreszenzbildern gefunden werden. Mit Hilfe des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers PT66 lassen sich fokale Adhäsionskontakte anfärben. In Einklang mit den inhibitorischen Effekten von Genistein, AG18 und PP2 konnten in dieser Arbeit Aufnahmestrukturen mit Sporen in primären „monocyte derived human macrophages“ (MDHM)-Zellen beobachtet werden, die deutlich mit Phosphotyrosin angereichert waren (siehe 3.2.2.2).

4.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Es gibt zwei Modelle, namens „Trigger“ und „Zipper“, um die Phagozytose von Mikroorganismen zu beschreiben (Griffin, Jr. und Silverstein, 1974; Griffin, Jr. *et al.*, 1975; Griffin, Jr. *et al.*, 1976). In Abbildung 49 ist eine schematische Darstellung beider Mechanismen zu sehen.

Beim „Zipper“-Mechanismus („Reißverschlussmechanismus“) besteht ein enger Kontakt zwischen dem Mikroorganismus und der Wirtszelle. Durch kontinuierliche räumliche Ausbreitung der Rezeptor-Liganden Interaktionen wird die Wirtszellmembran um den Mikroorganismus gestülpt, bis dieser völlig eingeschlossen und invaginiert wird. Im Gegensatz dazu besteht beim „Trigger“-Mechanismus („Auslöse-Mechanismus“) kein enger Kontakt zwischen Mikroorganismus und der Wirtszelle. Dieser Mechanismus wird von verschiedenen Bakterien, wie Salmonella oder Shigellenspezies, benutzt (Adam *et al.*, 1995; Alpuche-Aranda *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1993). Hier wird angenommen, dass von dem Mikroorganismus Invasine sezerniert werden und durch Bindung an Wirtszellrezeptoren die Bildung von faltenförmigen Ausstülpungen der Plasmamembran induzieren, welche zellnahe Pathogene einschließen und vakuolisieren.

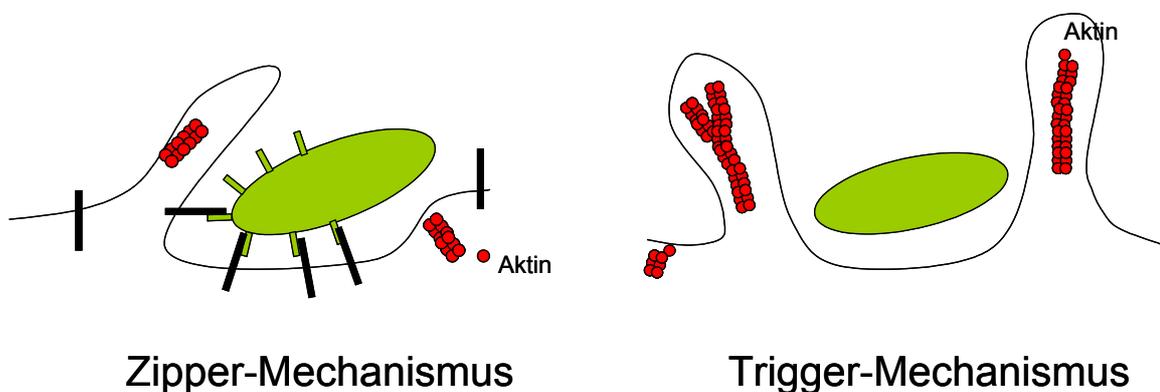


Abbildung 49: Schematische Darstellung des „Zipper“- und des „Trigger“-Mechanismus (Erläuterung siehe Text)

Beim „Trigger“-Mechanismus kommt es zu einer starken Umordnung des Aktinzytoskeletts, die zur Internalisierung des Mikroorganismus über Makropinozytose führt (Francis *et al.*, 1993). Dieser Prozess bezeichnet die Aufnahme größerer Flüssigkeitsmengen. Dies geschieht durch dynamische Ausstülpungen der

Zellmembran, die durch das Aktinzytoskeletts gebildet werden. Bei dem „Trigger“-Mechanismus bilden sich blütenartige Strukturen, die auch als „Ruffles“ bezeichnet werden.

In dieser Arbeit konnten solche Makropinozytose-Vakuolen mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Dextran, welches sich im Medium befand, detektiert werden (siehe 3.2.2.6). Es zeigten sich Vakuolen um die Sporen, die neben den Sporen größere Mengen an fluoreszenzmarkiertem Dextran enthielten. Diese Darstellung bestätigt die Annahme, dass *A. fumigatus*-Sporen über einem Makropinozytose-ähnlichen Prozess aufgenommen werden.

Betrachtet man zudem die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *A. fumigatus* in MH-S-Zellen und MDHM-Zellen (siehe 3.2.2.4), so gleicht der Aufnahmemechanismus von *A. fumigatus*-Sporen dem so genannten „Trigger“-Mechanismus (Dramsı und Cossart, 1998).

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen liefern weitere Belege und auch Aufnahmen am Live-Cell Mikroskop zeigten diese dynamischen, blütenartigen „Ruffle“-Strukturen (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass sich die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe von Amilorid in einem Zelltyp inhibieren ließ (siehe 3.2.1.1). Bei Amilorid handelt es sich um einen Inhibitor der Makropinozytose (Sarkar *et al.*, 2005). Dieser Effekt wurde allerdings nur in MH-S-Makrophagen gefunden.

Die Beobachtung, dass *A. fumigatus* über den „Trigger“-Mechanismus aufgenommen wird, deckt sich mit Ergebnissen von Ibrahim-Granet (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Dort wurden beim Eintreten von *A. fumigatus*-Sporen in Alveolarmakrophagen Hinweise auf einen „Trigger“-Mechanismus beobachtet. Eine ähnliche morphologische Aufnahme und Aktinreorganisation wurde bereits für den humanpathogenen Pilz *C. albicans* in Peritonealmakrophagen (Kaposzta *et al.*, 1999) und Epithelzellen (Tsarfaty *et al.*, 2000) beschrieben.

Ganz im Gegensatz zu der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen, zeigte die Phagozytose von *A. giganteus*-Sporen unter dem Elektronenmikroskop einen „Zipper-ähnlichen“ Mechanismus (siehe 3.2.2.5): Somit kann es unterschiedliche Aufnahmeprozesse innerhalb der *Aspergillus*-Stämme geben.

4.2.3. Die GTPase Rho wird für eine effiziente Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen benötigt

Aus der Rho-Familie der kleinen GTPasen sind bisher ca. 22 Proteine bekannt. Zu dieser Familie gehören auch Rho A/B/C, Rac 1/2 und CDC42. Sie haben gezeigt, dass sie das Aktinzytoskelett als Antwort auf eine Vielzahl extrazellulärer Signale regulieren (Hall, 1998). Dabei ist CDC42 bei der Bildung von Filopodien und bei der Aktivierung von Rac beteiligt: Rac stimuliert das Membranruffling, und Rho stimuliert die Bildung der fokalen Adhäsionskontakte und der Stressfasern (Ridley *et al.*, 1992). Es gibt einige Belege, dass die Mitglieder der Rho Familie auch bei der Phagozytose beteiligt sind (Hackam *et al.*, 1997). Obwohl diese Proteine jedoch in Aufnahmestrukturen lokalisiert werden konnten (Caron und Hall, 1998), ist ihre Bedeutung für die Phagozytose noch nicht endgültig geklärt.

In dieser Arbeit konnte die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774-Makrophagen mit dem Rho-spezifischen Inhibitor EDIN B inhibiert werden. Bei EDIN B handelt es sich um ein sezerniertes Toxin von *Staphylococcus aureus*, das Rho A, B und C durch ADP-Ribosylierung eines spezifischen Asparaginrestes inaktiviert (Aktories *et al.*, 2005). Die Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe dieses Toxins lässt vermuten, dass Rho bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe 3.2.2.4) zeigen, dass *A. fumigatus*-Sporen über „Ruffles“ aufgenommen werden. Folgt man der klassischen Zuordnungen der Funktionen der GTPasen, würde dies eher für eine Beteiligung von CDC42 und Rac sprechen. In der Literatur finden sich aber auch Daten, die zeigen, dass durch die Beteiligung von Rho eine Aufnahme über „Ruffles“ erfolgen kann. Dies wurde für die Aufnahme von Shigellen in Epithelzellen gezeigt (Adam *et al.*, 1996).

Um aber eine genaue Aussage über die Beteiligung von Rho bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen machen zu können, werden weitere Versuche benötigt. Dies könnte z.B. durch Rho-Mutanten erfolgen. Punktmutationen können durch Ausschalten der GTPase-Aktivität entweder eine konstitutive Aktivierung bewirken oder eine permanente Inaktivierung durch Verringerung der Nukleotid-Affinität. Durch Überexpression solcher veränderter Proteine lassen sich GTPase-abhängige Signalkaskaden spezifisch modulieren. Diese Mutanten könnten in weiteren Versuchen eingesetzt werden, um die Rolle von Rho bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen näher zu beschreiben.

4.3. Dectin-1 und TLR2 werden für eine effiziente Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen benötigt

Makrophagen, welche die erste Linie der Verteidigung gegen eine *A. fumigatus*-Infektion darstellen, müssen zwischen eigenen und fremden Strukturen unterscheiden können. In diesem Prozess spielen die sogenannten „Pattern Recognition Receptors (PRRs)“ eine wichtige Rolle, und speziell in den vergangenen Jahren standen die Mitglieder der Toll-like Rezeptor Familie und ihr Mitwirken bei der Erkennung und Bekämpfung verschiedenster Mikroorganismen im Interesse der Wissenschaft. Es ist bereits gezeigt worden, dass TLR2 und TLR4 bei der Erkennung einer *A. fumigatus*-Infektion *in vivo* und *in vitro* beteiligt sind, was in der Aktivierung von Makrophagen, der Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen und einer Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Infektion resultiert (Braedel *et al.*, 2004; Mambula *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001). Weitere Studien belegten die Bedeutung von TLR2 (Balloy *et al.*, 2005) und TLR4 (Bellocchio *et al.*, 2004) in murinen Infektionsmodellen einer invasiven Aspergillose.

Einige erst kürzlich veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass die TLRs nicht die einzigen PRRs sind, die bei der Erkennung von *A. fumigatus* und anderen Pilzen eine Rolle spielen. Pentraxin-3 (PTX3) ist ein löslicher PRR, der an Galaktomannan auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Sporen bindet. Eine PTX-Bindung resultiert in einer verstärkten Phagozytoserate durch Alveolarmakrophagen, und es stellte sich heraus, dass PTX-defiziente Mäuse sehr anfällig für eine *A. fumigatus*-Infektion sind (Garlanda *et al.*, 2002). Es wurde auch gezeigt, dass der dendritische-Zell-spezifische „adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin“ (DC-SIGN) die Bindung und Internalisierung von *A. fumigatus*-Sporen bei dendritischen Zellen steuert. DC-SIGN ist ein Typ II C-Typ Lektin, dessen Bindung an *A. fumigatus*-Sporen durch *A. fumigatus* Galactomannan und Mannanpräparationen aus anderen Pilzen blockiert werden kann (Serrano-Gomez *et al.*, 2004).

Des Weiteren ist bekannt, dass das surfactant Protein D, ein lösliches C-Typ Lektin, an β 1-6 Glucanreste auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Sporen bindet (Allen *et al.*, 2001) und so eine verstärkte Phagozytose bewirkt (Madan *et al.*, 1997). Andere Kohlenhydrate- wie z.B. β 1-4 Glucan und Galactomannan- sind bei der Bindung von *A. fumigatus*-Sporen an Makrophagen, dendritischen Zellen oder Langerhans Zellen beteiligt (Kan und Bennett, 1991; Persat *et al.*, 2003; Serrano-Gomez *et al.*, 2004), was darauf hindeutet, dass Kohlenhydrate auf der Sporenoberfläche vorhanden sind und Zielstrukturen für PRR darstellen.

Betrachtet man die pilzliche Zellwand, so fällt auf, dass diese zu 50-60 % aus β 1-3 und/oder β 1-6 Glucan zusammengesetzt ist (Klis *et al.*, 2002). Somit ist das β 1-3 Glucan eine reichlich vorhandene und charakteristische Komponente der pilzlichen Zellwand. Kataoka und seine Mitarbeiter zeigten 2002, dass β 1-3 Glucan in der Lage ist, Makrophagen zu aktivieren und proinflammatorische Moleküle zu produzieren und freizusetzen (Kataoka *et al.*, 2002). Später ist gezeigt worden, dass die Erkennung von β 1-3 Glucan durch Makrophagen über Dectin-1 erfolgt, ein C-Typ Lektin Oberflächenrezeptor (Brown *et al.*, 2002). Dectin-1 wurde 2001 von Brown und seinen Mitarbeitern entdeckt (Brown und Gordon, 2001) und es erwies sich, dass Dectin-1 u.a. als Phagozytoserezeptor von *C. albicans* (Gantner *et al.*, 2005) und Zymosan-Partikel, einer in der immunologischen Forschung breit eingesetzten Zellwandpräparation aus *S. cerevisiae*, fungiert (Brown *et al.*, 2002). Dectin-1 erkennt lösliches und partikuläres β 1-3 und/oder β 1-6 vernetztes Glucan (Brown und Gordon, 2001). Eine erst kürzlich publizierte Studie belegt, dass Dectin-1 auch bei der Erkennung von Mykobakterien eine Rolle spielt. Die Struktur, die aber in diesem Fall von Dectin-1 erkannt wird, ist allerdings noch nicht bekannt (Yadav und Schorey, 2006).

Über die Rezeptoren, die an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt sind, ist einiges publiziert worden. Im Gegensatz dazu ist über die Phagozytoserezeptoren und über die „PAMPs“ von *A. fumigatus*-Sporen noch nicht so viel bekannt. Diese Frage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von verschiedenen Ansätzen genauer untersucht.

Um zu sehen, welche Rezeptoren und welche Bestandteile der pilzlichen Zellwand bei der Phagozytose beteiligt sein könnten, wurden in ersten Versuchen primäre humane Makrophagen und Zellen der MH-S-Zelllinie mit vier verschiedenen Zuckern vorinkubiert und anschließend mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Bei den Zuckern handelte es sich um die häufig vorkommenden Zucker Glucose, Mannose, Fructose und Galactose, welche selbst Bestandteile der pilzlichen Sporenzellwand sind (Persat *et al.*, 2003). Um die Phagozytoseeffizienz zu bestimmen, wurde der BCS-Assay durchgeführt. Von allen getesteten Zuckern zeigten lediglich Galactose in MH-S-Zellen und Mannose in den primären Makrophagen einen geringen Effekt auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen.

Da die kleinen Mono- und Disaccharide keinen markanten Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen hatten, wurde in einem nächsten Versuch geklärt, ob das Polysaccharid Laminarin einen Einfluss auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen besitzt. Bei Laminarin handelt es sich um eine β 1-3 Glucan-Präparation aus der Braunalge *Laminaria digitata* (Read *et al.*, 1996). Hierzu wurden Makrophagen in der

An- bzw. Abwesenheit von unterschiedlichen Laminarinkonzentrationen inkubiert und mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert.

Laminarin konnte die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen sowohl in den J774- und MH-S-Makrophagen-Zelllinien als auch in den primären Peritoneal- und Alveolarmakrophagen konzentrationsabhängig blockieren (siehe 3.3.2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das lösliche β 1-3 Glucan Laminarin den Dectin-1 Rezeptor besetzt und dadurch die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen verhindert wird.

Um unabhängig von Laminarin die bedeutende Rolle des β 1-3 Glucan der pilzlichen Zellwand für die Phagozytose zu zeigen, wurden Makrophagen mit Sporen infiziert, die zuvor mit einem speziellen Limulus-Extrakt vorinkubiert worden waren. Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* besitzt ein primitives Immunsystem, um Bakterien und Pilzinfektionen bekämpfen zu können. Zwei Lektine werden in der Lymphflüssigkeit gefunden und sind wichtige PRRs: Faktor C, welches spezifisch für LPS ist, und Faktor G, welches β 1-3 Glucan erkennt. Bei dem Limulus-Extrakt handelt es sich um ein Produkt der Firma Fungitell, welches den β 1-3 Glucan spezifischen Faktor G enthält, während das LPS-bindende Protein entfernt wurde (Seki *et al.*, 1994). Durch eine Vorinkubation der Sporen mit dem Faktor G sollten die β 1-3 Glucane auf der Sporenoberfläche „maskiert“ werden. Im Anschluss an diese „Maskierung“ erfolgte die Infektion. Die Vorinkubation der Sporen mit dem β 1-3 Glucan-spezifischen Lektin Faktor G von Limulus hemmte ebenfalls die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen entsprechend der eingesetzten Konzentration (siehe 3.3.3). Durch die Vorinkubation mit dem Limulus-Extrakt wurde das β 1-3 Glucan der Sporenoberfläche „maskiert“; somit konnten die Sporen von dem Dectin-1 Rezeptor nicht mehr erkannt und phagozytiert werden.

In weiteren Versuchen konnte in dieser Arbeit geklärt werden, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in J774- und primären Peritonealmakrophagen mit einem anti-Dectin-1-spezifischen monoklonalen Antikörper blockiert werden kann (siehe 3.3.10). Es konnte außerdem eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der Sporen an Peritonealmakrophagen beobachtet werden, die mit dem monoklonalen Dectin-1-Antikörper 2 A11 inkubiert worden waren. Zudem konnten HEK293-Zellen, die weder den Dectin-1- noch den TLR2- Rezeptor besitzen (Gantner *et al.*, 2003), nach Transfektion von Dectin-1 eine größere Anzahl an *A. fumigatus*-Sporen binden. Dies bedeutet, dass Dectin-1 schon bei der initialen Interaktion zwischen Sporen und Makrophagenoberfläche beteiligt ist.

Die Rekrutierung des Dectin-1 um internalisierte Sporen ließ sich ebenfalls mit diesem Antikörper in der Immunfluoreszenz detektieren (siehe 3.3.10.3). Allerdings waren nur

wenige ringförmige Dectin-1-Phagosomen um die Sporen sichtbar, was darauf hindeutet, dass Dectin-1 trotz seiner Beteiligung an der Phagozytose in phagozytischen Vakuolen transient ist. Es konnte beobachtet werden, dass die Kolo-kalisation von Dectin-1 um einige intrazelluläre Sporen nach 1 h Infektion begann, zu einem Zeitpunkt, als auch β 1-3 Glucan positive Sporen sichtbar wurden (siehe 3.3.10.4). Die Versuche mit Laminarin, dem Fungitell Reagenz und dem monoklonale Dectin-1-Antikörper 2 A11 zeigten die Beteiligung von Dectin-1 und β 1-3 Glucan bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen beweist eine Studie von Gersuk und seiner Kollegen, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Keimlingen durch Laminarin oder spezifische Antikörper inhibiert werden kann (Gersuk *et al.*, 2006). Laut unseren Daten konnte die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Laminarin oder dem anti-Dectin-1-Antikörper nicht vollständig blockiert werden. Dies lässt noch weitere Arten der Phagozytose erwarten, die unabhängig von β 1-3 Glucan verlaufen. Die Opsonisierung durch das Komplement sollte keine Rolle für die beobachtete restliche Phagozytose spielen, da in allen Experimenten hitzeinaktiviertes Serum verwendet wurde. Es ist auch bekannt, dass es eine Interaktion zwischen Makrophagenrezeptoren und anderen Sporenkohlenhydraten als β 1-3 Glucan gibt. Dies könnte ein Grund für die Laminarin-resistente Aufnahme sein (Kan und Bennett, 1991; Persat *et al.*, 2003; Serrano-Gomez *et al.*, 2004). So belegt eine neue Studie, dass die Erkennung und die Phagozytose von *C. albicans* über drei Erkennungssysteme verläuft, abhängig von der momentanen Zellwandbeschaffenheit des Pilzes (Netea *et al.*, 2006). Involviert dabei sind der Mannoserezeptor, TLR4 und Dectin-1 und/oder TLR2. Da *A. fumigatus* ebenfalls eine morphologische Veränderung der Zellwand bei der Infektion durchmacht- von der inhalierten Spore zur angeschwollenen Spore und vom Keimling zur fertigen Hyphe (siehe 3.3.4)-, ist ein solches Phänomen durchaus auch hier denkbar, denn entsprechend dem jeweiligen morphologischen Zustand werden ebenfalls verschiedene Oberflächenstrukturen sichtbar. Und auch in der vorliegenden Arbeit liefern die Inhibierung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch die Zucker Galactose in MH-S-Zellen und Mannose in den primären humanen Zellen weitere Belege für die These, dass die Erkennung von β 1-3 Glucan über Dectin-1 nicht für alle Phagozytoseprozesse entscheidend ist.

Ein weiterer Beleg, dass β 1-3 Glucan sehr wichtig ist für eine Immunantwort auf eine *A. fumigatus*-Infektion ist, wurde erst kürzlich von Torosantucci und ihrerer Kollegen erbracht (Torosantucci *et al.*, 2006). Diese Studie konnte zeigen, dass die Immunisierung von Mäusen mit Laminarin eine humorale Immunantwort auslöst, welche sie vor einer systemischen Infektion mit *A. fumigatus* schützt. Dieser Effekt wurde

dadurch erklärt, dass die Anlagerung des Antikörpers an Hyphen ihr Wachstum verhindert.

Da *A. fumigatus*-Sporen in der Lage sind, während der Infektion auszukeimen, wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mab 2G8-A (Torosantucci *et al.*, 2005), welcher spezifisch gegen β 1-3 Glucan gerichtet ist, die Verteilung des β 1-3 Glucans auf der Oberfläche der Sporen während des Auskeimungsvorgangs analysiert.

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers ist bereits gezeigt worden, dass β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von angeschwollenen, aber nicht auf ruhenden Sporen zu finden ist (Hohl *et al.*, 2005; Gersuk *et al.*, 2006). Mit Hilfe eines löslichen Dectin-1-Proteins fanden Steele und seine Mitarbeiter heraus, dass die Menge an β 1-3 Glucan während der Auskeimung wesentlich größer ist als die Menge an β 1-3 Glucan auf ruhenden Sporen (Steele *et al.*, 2005). Für *C. albicans* wurde gezeigt, dass die Erkennung über Dectin-1 auf die Hefeform beschränkt ist. Mit Hilfe eines löslichen Dectin-1 wurden deutliche Mengen an β 1-3 Glucan nur auf Hefen und den so genannten „birth scars“ („Sprossungsnarben“), aber nicht auf der Oberfläche von Hyphen detektiert (Ganter *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zeitreihe gewählt, die die *A. fumigatus*-Sporen von ihrem Ruhestadium bis zu ihrem Anschwellstadium zeigten. Der Anschwellvorgang erfolgte in YG-Medium; es wurden die Zeitpunkte 0 h, 4 h und 6 h gewählt.

Die Ergebnisse zeigen, dass nur eine geringe Menge an β 1-3 Glucan auf der Oberfläche von ruhenden Sporen (0 h) detektiert werden konnte (siehe 3.3.4). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass während eines frühen Zeitpunkts der Germination (2 h), ein Teil der Sporen sehr stark mit dem mab 2G8 Antikörper angefärbt werden konnten. Diese Sporen besaßen noch einen Durchmesser, welcher mit dem der ruhenden Sporen vergleichbar war (siehe 3.3.4). Nach 6 h, als die meisten Sporen bereits angeschwollen waren, waren ebenfalls noch einige dieser stark angefärbten Sporen mit dem kleinen Durchmesser zu finden.

Elektronenmikroskopische Daten belegen, dass ruhende Sporen im Zuge der Auskeimung ihre hydrophobe Hülle abwerfen (Rhode *et al.*, 2002). Dies resultiert in einer glatten Oberfläche (Rhode *et al.*, 2002). Die Aufnahmen zeigen, dass diese Sporen denen der *pksP*-Mutante und der *Rod A*-Mutante ähneln (Jahn *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 2003).

Die Immunfluoreszenzaufnahmen und FACS-Analysen (siehe 3.3.6) zeigen, dass die meisten Sporen der *pksP*-Mutante eine sehr starke Anfärbung mit dem β 1-3 Glucan-spezifischen monoklonalen Antikörper 2G8 im Vergleich zu den WT-Sporen aufwiesen. Ein Vergleich zwischen den Sporen der *pksP*-Mutante und der WT-Sporen, die nach 2 h und teilweise nach 6 h gefunden werden konnten, zeigten eine ähnlich intensive

Anfärbung mit dem 2G8-Antikörper. Diese kleinen intensiv angefärbten WT-Sporen waren wahrscheinlich solche Sporen, die ihre hydrophobe Hülle bereits abgeworfen hatten. Die darunter liegende β 1-3 Glucan Struktur wurde dadurch sichtbar und von dem β 1-3 Glucan Antikörper detektiert. Interessanterweise erwies sich die Anfärbung von angeschwollenen Sporen in dieser Arbeit mit dem anti β 1-3 Glucan-Antikörper als unregelmäßig, wenn auch sehr stark (siehe 3.3.4). Ein Wechsel zwischen stark angefärbten Bereichen und weniger stark angefärbten Bereichen konnte beobachtet werden, woraus ein gepunktetes Färbemuster entstand. Die Bereiche, die sich mit dem β 1-3 Glucan-spezifischen Antikörper sehr stark anfärben ließen, könnten die originale Sporenoberfläche repräsentieren: Dann müsste die neue Oberfläche, die durch das sphärische Wachstum zum Vorschein kommt, kleinere Mengen an β 1-3 Glucan enthalten.

Ein polarisiertes Wachstum von angeschwollenen Sporen führt zum Erscheinen von stark und homogen angefärbten Gebieten im Bereich des Keimschlauchs. Dies deutet darauf hin, dass diese sich neu gebildete Oberfläche, wie die von Hyphen (Torosantucci *et al.*, 2005), eine große Menge an β 1-3 Glucan aufweist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass β 1-3 Glucan normalerweise in großer Menge auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Sporen vorhanden ist und ein wichtiges generelles „Pilz PAMP“ darstellt. Das β 1-3 Glucan scheint jedoch in ruhenden Sporen durch die Hydrophobinschicht maskiert zu sein und in angeschwollenen Sporen in den Bereichen, in denen sich durch das Wachstum eine neue Oberfläche bildet, weniger exponiert zu sein. Somit könnte die hydrophobe Hüllschicht der ruhenden Sporen einen Schutzmechanismus für *A. fumigatus* darstellen, um einer Erkennung durch den Dectin-1-Rezeptor zumindest zeitweise zu entkommen. Ähnliche Belege werden auch bei anderen Pilzen gefunden. *C. albicans* z.B. ist in der Lage, morphologische Wechsel zwischen einer Hefeform und einer Hyphenform durchzumachen; daher nimmt man an, dass diese Fähigkeit zur Virulenz dieses Pilzes beiträgt (Gale *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass die Hyphenform, im Gegensatz zur Hefeform, einer schützenden Immunantwort entkommt (d'Ostiani *et al.*, 2000). Im Einklang damit besitzen Hyphen kein oberflächenexponiertes β 1-3 Glucan und induzieren *in vitro* keine Dectin-1-gesteuerte Immunantwort (Gantner *et al.*, 2005). Da β 1-3 Glucan auch für *C. albicans* ein essentieller Bestandteil auf den Hyphen ist, lässt sich sagen, dass Hyphen einer Immunerkennung entkommen, indem sie diese Kohlenhydratstrukturen maskieren (Brown, 2006).

Des Weiteren ist bekannt, dass der humanpathogene Pilz *C. neoformans* sein β 1-3 Glucan durch Einkapselung maskiert (Cross und Bancroft, 1995) und dass

Paracoccidioides brasiliensis die Menge an Oberflächen- β 1-3 Glucan während einer Infektion verändert (Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

Da ruhende bzw. angeschwollene Sporen und Sporen der *pksP*-Mutante unterschiedliche Mengen an β 1-3 Glucan aufwiesen, wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an β 1-3 Glucan und der Phagozytoseeffizienz gibt.

Hierzu wurden J774-Makrophagen mit ruhenden, angeschwollenen und *pksP*-Sporen infiziert, und der BCS-Assay wurde durchgeführt. Die Versuche zeigen, dass angeschwollene Sporen und Sporen der *pksP*-Mutante wesentlich effizienter phagozytiert wurden als ruhende Sporen (siehe 3.3.7). Somit scheint die Menge an β 1-3 Glucan auf den *A. fumigatus*-Sporen entscheidend für die Phagozytoseeffizienz zu sein. Dennoch zeigen die Daten, dass- obwohl ruhende Sporen nur eine geringe Menge an β 1-3 Glucan aufweisen- eine Erkennung über Dectin-1 stattfindet. Dies führt letztendlich zur Phagozytose.

Da jeder Mensch einige hunderte *A. fumigatus*-Sporen pro Tag einatmet, muss es Mechanismen geben, die die Produktion von inflammatorischen Molekülen auf eine wirkliche Infektion begrenzen. β 1-3 Glucan positive Zellen sind bereits ausgekeimt und stellen daher eine größere Gefahr da. Eine Regulation der Immunantwort in Abhängigkeit von der Menge an oberflächlich-zugänglichem β 1-3 Glucan könnte eine proinflammatorische Reaktion auf gefährliche Infektionssituationen begrenzen. Die Tatsache, dass ruhende *A. fumigatus*-Sporen phagozytiert wurden (Daten dieser Arbeit), aber keine inflammatorische Antwort zu induzieren vermochten, wie andere Daten zeigten (Gersuk *et al.*, 2006; Hohl *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2003), liefert erste Hinweise für diese Hypothese. Angeschwollene Sporen hingegen werden nicht nur effizienter phagozytiert, sondern induzieren zusätzlich eine inflammatorische Antwort.

Jahn und seine Kollegen fanden heraus, dass die *pksP*-Mutante eine reduzierte Virulenz im Mausmodell besitzt (Jahn *et al.*, 1997). Zudem produzierten Zellen, die mit der *pksP*-Mutante infiziert worden waren, eine im Vergleich zu WT-infizierten Zellen große Mengen an ROS (Langfelder *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sporen der *pksP*-Mutante eine hohe Konzentration an β 1-3 Glucan auf ihrer Oberfläche besitzen. Zudem wurden die Sporen der *pksP*-Mutante wesentlich effizienter phagozytiert als WT- Sporen. Diese verstärkte Phagozytose könnte zu der reduzierten Virulenz im Mausmodell beitragen. Da außerdem die Erkennung von β 1-3 Glucan über Dectin-1 den „Respiratory burst“ auslösen kann (Gantner *et al.*, 2003), könnte dies eine Erklärung liefern, warum Zellen eine große Mengen an ROS bei einer Infektion mit der *pksP*-Mutante produzieren (Langfelder *et al.*, 1998).

4.3.1. Die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen ist Syk-abhängig

Der Dectin-1-Rezeptor ist das erste Beispiel eines „non-TLR“, der seine eigene intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslösen kann (Brown, 2006). Beschrieben worden sind zwei Signalwege ausgehend von Dectin-1, ein Syk-abhängiger und ein Syk-unabhängiger (Rogers *et al.*, 2005). Syk ist eine Proteintyrosinkinase, die eine große Rolle in der angeborenen Immunität spielt.

Der Syk-abhängige Signalweg von Dectin-1 ist, wie bereits erwähnt, abhängig von dem ITAM-ähnlichen Motiv (siehe auch 1.3). Obwohl der cytoplasmatische Teil von Dectin-1 im Zuge der Ligandenbindung Tyrosin-phosphoryliert wird, variiert die Sequenz der ersten distal gelegenen amino-terminalen Wiederholung von dem traditionellen ITAM-Motiv (Brown *et al.*, 2006). Normalerweise werden zwei Phosphotyrosinreste benötigt, um eine Interaktion mit Syk zu ermöglichen. Unerwarteterweise reicht die Phosphorylierung eines ITAM-Motivs aber aus, um eine Interaktion mit Syk zu ermöglichen (Rogers *et al.*, 2005; Underhill *et al.*, 2005). Für den Syk-unabhängigen Signalweg wird angenommen, dass hierfür eine Zusammenarbeit mit TLR2 erforderlich ist (Rogers *et al.*, 2005; Underhill *et al.*, 2005). Wie allerdings die beiden Rezeptoren zusammenarbeiten, ist bisher noch ungeklärt. Über die Beteiligung von Syk bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen sind bisher keine Daten publiziert worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern dazu erste Anhaltspunkte.

Um zu überprüfen, ob die Syk-Kinase bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist, wurde die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in Makrophagen in der An- / und Abwesenheit des Syk-spezifischen Tyrosin-Kinase Inhibitors Piceatannol untersucht. Es wurde eine Konzentration gewählt, die bereits in anderen Studien eingesetzt wurde und spezifisch nur auf Syk wirkt, während höhere Konzentrationen auch src-Kinasen inhibieren können (Underhill *et al.*, 2004). Da Syk-Kinasen typischerweise von Kinasen der src-Familien aktiviert werden (Underhill *et al.*, 2005), wurde parallel untersucht, ob PP2 ein spezifischer Inhibitor der src-Familie, für den bereits in einem früheren Teil der Arbeit ein Effekt auf die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen gezeigt werden konnte (siehe 3.2.1), eingesetzt.

Als Kontrolle erfolgte eine „Infektion“ in An- / und Abwesenheit beider Inhibitoren zusätzlich mit Zymosan. Es zeigt sich, dass sich mit Hilfe von PP2 und Piceatannol die Phagozytose von Zymosan und *A. fumigatus*-Sporen um ungefähr 70 % blockieren ließ (siehe 3.3.11.1). Um weitere Evidenz für eine Beteiligung der Syk-Kinase bei der Phagozytose zu erhalten und um unspezifische Effekte auf andere Wirtszellkinasen auszuschließen, wurden aus Knochenmarkschimären-Mäusen Syk^{-/-} monozytäre Zellen

(Mocsai *et al.*, 2002) isoliert und mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Die Syk-defizienten Makrophagen zeigten ebenfalls eine verminderte Phagozytosebereitschaft sowohl für *A. fumigatus*-Sporen als auch für Zymosan (siehe 3.3.11.2). Allerdings ließ sich die Phagozytose von Zymosan nur um ungefähr 15 % blockieren und von *A. fumigatus*-Sporen um ungefähr 25 %.

Die Tatsache, dass sich die Phagozytose von Zymosan und *A. fumigatus*-Sporen mit Hilfe von Piceatannol und PP2 blockieren ließ, spricht für die Annahme, dass die Phagozytose in beiden Fällen zumindest teilweise über den Syk-abhängigen Signalweg gesteuert wird. Auch die Inhibierung der Phagozytose von Zymosan und *A. fumigatus*-Sporen in den Syk-defizienten Makrophagen bestärken dieses Ergebnis.

In der Literatur finden sich gegensätzlich Daten über die Beteiligung von Syk an der Phagozytose von Zymosan. So wurde für Zymosan eine Syk-unabhängige Phagozytose in Makrophagen gezeigt (Herre *et al.*, 2004; Underhill *et al.*, 2005). Dies wurde ebenfalls mit Hilfe von Piceatannol behandelten Makrophagen untersucht. Die Inkubation mit diesem Inhibitor hatte keinen Effekt auf die Phagozytose von Zymosan, und auch Syk-defiziente Makrophagen waren in der Lage, Zymosan genauso effizient zu phagozytieren wie die WT-Makrophagen (Herre *et al.*, 2004b; Underhill *et al.*, 2005).

Andere Daten hingegen belegen, dass Syk einen Einfluss auf die Phagozytose von Zymosan hat. Rogers und seine Kollegen zeigten, dass in dendritischen Zellen Syk einen geringen Einfluss auf die Dectin-1 gesteuerte Phagozytose besitzt (Rogers *et al.*, 2004). Außerdem konnte Piceatannol die Phagozytose von Zymosan in Dectin-1 exprimierenden NIH-3T3 Fibroblasten inhibieren (Herre *et al.*, 2004b).

Warum so gegensätzliche Ergebnisse gefunden werden konnten, lässt sich aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht genau sagen. Ein möglicher Grund könnten die unterschiedlichen Zelltypen sein, die für die betreffenden Versuche verwendet wurden. So wurde die Syk-unabhängige Phagozytose in Knochenmarksmakrophagen (Underhill *et al.*, 2005) und RAW-Makrophagen (Herre *et al.*, 2004) durchgeführt und die Syk-abhängige Phagozytose in dendritischen Zellen und transfizierten NIH-3T3 Fibroblasten. Die Versuche dieser Arbeit wurden mit J774-Makrophagen durchgeführt. Auch die Literatur beschreibt, dass die Syk-Kinase für die Funktion von Dectin-1 limitiert und zelltypspezifisch ist (Brown, 2006).

Außer bei der Phagozytose über den Dectin-1-Rezeptor spielt Syk auch bei der Phagozytose über Fc γ R- (Crowley *et al.*, 1997) und Komplement-Rezeptoren eine Rolle (Shi *et al.*, 2006) Da die Versuche in der vorliegenden Arbeit mit hitzeinaktiviertem Serum durchgeführt wurden, kann die Beteiligung der Komplementrezeptoren weitgehend ausgeschlossen werden. Auch eine Beteiligung der Fc γ R-Rezeptoren ist eher unwahrscheinlich, da im Serum spezifische anti-*Aspergillus*-Antikörper hätten

vorhanden sein müssen. Eine Beteiligung der Fc γ R-Rezeptoren kann aber aufgrund der momentanen Datenlage nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.3.2. Die Rolle von TLR2 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

Die ersten Hinweise für die Beteiligung der Toll-like Rezeptoren in Bezug auf eine *A. fumigatus*-Infektion gab es im Jahre 1984. Anhand einer TLR-mutanten Fruchtfliege konnte gezeigt werden, dass diese viel schneller an einer Infektion mit *A. fumigatus* starb als der Wildtyp (Lemaitre *et al.*, 1996). Seitdem sind die Toll-like Rezeptoren zunehmend im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen versucht herauszufinden, welche Bedeutung die jeweiligen Toll-like Rezeptoren für die Erkennung von *A. fumigatus* haben. *In vitro* Experimente mit transfizierten Zellen sind durchgeführt worden, und der Einsatz TLR-defizienter Mäuse lieferte erste Hinweise für die Involvierung von TLR2 und/oder TLR4. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden gegensätzliche Ergebnisse gefunden, abhängig von den experimentellen Bedingungen und den verwendeten Makrophagen (Netea *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004; Balloy *et al.*, 2005). Dennoch deuten Infektionsversuche in TLR-defizienten Mäusen darauf hin, dass Toll-like Rezeptor 2 und 4 bei der Erkennung von *A. fumigatus*-Hyphen und Sporen involviert sind (Meier *et al.*, 2003, Luther *et al.*, 2006). Hierbei scheint TLR4 für eine proinflammatorische Antwort wichtiger zu sein als TLR2 (Meier *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde nun der Fragestellung nachgegangen, ob TLR2 und TLR4 vielleicht auch bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt sind. Hierbei wurde in einem ersten Experiment die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Makrophagen untersucht. Die Daten ergaben, dass TLR2 und nicht TLR4 an der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt ist. Das Fehlen von TLR2 in Makrophagen und die Blockierung mit einem anti TLR2 Antikörper führten zu einer reduzierten Phagozytose, hatten aber keinen Einfluss auf die Phagozytose von Kontrollbeads. Die effiziente Aufnahme der Kontrollbeads zeigte, dass die Phagozytosemaschinerie in den TLR2-defizienten Mäusen nicht generell gestört ist und der Effekt spezifisch für *A. fumigatus* ist. Dieses Ergebnis wurde sowohl in Mäusen mit einem C3H/HeN-genetischen als auch mit einem C57/BL6-genetischen Hintergrund beobachtet. Allerdings lagen die Phagozytoseraten der Kontrollmakrophagen bei den C57/BL6-Mäusen deutlich unter denen der C3H/HeN-Mäuse: Solche Stammspezifischen Unterschiede könnten auch einige der unterschiedlichen Daten der verschiedenen Arbeitsgruppen erklären.

In Hinblick auf das Binden von Sporen an Makrophagen konnte kein Einfluss von TLR2 oder TLR4 gezeigt werden. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Überexpression von TLR2 in HEK293 Zellen keine verstärkte Sporenbindung nach sich zieht, wogegen die Überexpression mit Dectin-1 zu einer verstärkten Bindung führte. Obwohl einige Tatsachen dagegen sprechen, dass TLR2 ein direkter Rezeptor der Phagozytose ist (Underhill und Gantner, 2004), erweist sich jedoch, dass die Aktivierung über TLR2 die Phagozytose, die von Dectin-1 oder möglicherweise auch von anderen Rezeptoren ausgelöst wird, stimuliert.

Die Aktivierung von NF- κ B durch TLR2 benötigt das Adapterprotein MyD88. Unserer Beobachtung, dass MyD88-negative Makrophagen eine reduzierte *A. fumigatus*-Phagozytose zeigten, deutet darauf hin, dass ein MyD88-abhängiges „Signalling“ sowohl für die TLR2- gesteuerte NF- κ B Aktivierung als auch für die TLR2-gesteuerte Stimulierung der Sporen-Phagozytose benötigt wird. Für den letzteren Prozess scheint die Erkennung eines speziellen Pilzliganden oder die Erkennung in einem speziellen Umfeld benötigt zu werden, da die Aktivierung der Makrophagen über einen synthetischen TLR2-spezifischen Liganden Pam3Cys keinen Einfluss zeigte. An dieser Stelle werden jedoch noch weitere Studien benötigt, um die Rolle von TLR2 bei der Phagozytose von *A. fumigatus* zu klären und um die Liganden zu finden, die von TLR2 erkannt werden.

Es gibt Belege, dass eine Kooperation zwischen TLR2 und Dectin-1 im Bezug auf eine proinflammatorische Antwort auf Pilze stattfindet (Gantner *et al.*, 2003; Viriyakosol *et al.*, 2005). Außerdem weisen die Daten der vorliegenden Arbeit nach, dass beide Rezeptoren auch bei der Phagozytose von *A. fumigatus* zusammenwirken. Trotz der Tatsache, dass mehrere Studien einen „Cross-talk“ zwischen TLR2 und Dectin-1 belegen können, deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass TLR2 im Gegensatz zu Dectin-1 wahrscheinlich nicht als direkter Phagozytoserezeptor fungiert. Doch auch hier werden weitere Studien nötig sein, um das Zusammenspiel beider Rezeptoren auf molekularer Ebene definieren zu können.

4.3.2.1. TLR2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der frühen Phagolysosomenreifung

Bei der Phagozytose werden Partikel in einem Aktin-abhängigen Prozess aufgenommen; dabei bildet sich ein Phagosom. Das Phagosom verschmilzt mit dem sauren Lysosom zu einem Phagolysosom. In diesem sauren Milieu sind proteolytische Enzyme wie Hydrolasen aktiv und bewerkstelligen den Abbau des phagozytierten Materials (Alberts *et al.*, 1997).

Mit Hilfe des lysosomalen Markers "Lysosomal membrane protein (Lamp-1)", der als Marker für frühe Phagolysosomen dient, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob in Makrophagen, denen TLR2 fehlt (C3H/HeN TLR2^{-/-}), die phagozytierten Sporen einen ähnlichen Weg einschlagen wie in den WT-Makrophagen (C3H/HeN). Hierzu wurden Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen Lamp-1 durchgeführt und die Anzahl der Lamp-1 positiven Vakuolen nach 1 h und nach 3 h gezählt. Es konnte gezeigt werden, dass nach 1 h deutlich weniger Lamp-1-positive Vakuolen in den TLR2^{-/-} Zellen im Vergleich zu den C3H/HeN-Zellen zu sehen waren. Nach 3 h ließ sich dieser Effekt allerdings nicht mehr nachweisen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass TLR2 möglicherweise bei der sehr frühen Phagolysosomenreifung eine Rolle spielt, dass dieser Einfluss auf die Phagolysosomenreifung nach 3 h aber nicht mehr nachweisbar ist.

Underhill und seine Kollegen konnten zeigen, dass Makrophagen TLR2 benötigen, um den Inhalt der Phagosomen zu bestimmen (Underhill *et al.*, 1999). Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten eine Funktion von TLR2 in der frühen Phagosomenreifung an. Aufgrund des Fehlens von TLR2 war in diesen Makrophagen die Bestimmung des Phagolysosomeninhaltes in der ersten Stunde der Infektion noch nicht einwandfrei möglich, könnte aber nach 3 h vielleicht von anderen Rezeptoren übernommen worden sein.

4.4. Schlussfolgerung

Die Phagozytose ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität und dient zur frühzeitigen Erkennung und Beseitigung eines Erregers. Eingeatmete *Aspergillus fumigatus*-Sporen müssen schnell eliminiert werden, um ein Auskeimen des Pilzes in der Lunge zu verhindern. Bei immunkompetenten Menschen wird dies durch Alveolarmakrophagen bewerkstelligt, in immunsuprimierten Menschen dagegen ist dieser Eliminierungs-Prozess gestört. Deshalb ist es von fundamentaler Bedeutung, die molekularen Mechanismen der Phagozytose zu verstehen, um so eventuell bei immunsuprimierten Menschen einer invasiven Aspergillose therapeutisch entgegenwirken zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode etabliert, um die Phagozytoseeffizienz von *A. fumigatus*-Sporen in Makrophagen zu bestimmen. Mit ihr war es möglich, die Prozesse der Phagozytose genauer zu beschreiben.

Diskussion

Neben der Aufklärung der molekularen Phagozytose-Prozesse, wurde nach den beteiligten Rezeptoren der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen β 1-3 Glucan und Dectin-1 ausschlaggebend ist für die Phagozytose von ruhenden und angeschwollenen *A. fumigatus*-Sporen und dass die Menge an β 1-3 Glucan die Phagozytoseeffizienz beeinflusst. Zudem erwies sich, dass Toll-like Rezeptor 2 für eine effiziente Phagozytose benötigt wird.

Da alle Versuche dieser Arbeit *in vitro* durchgeführt wurden, ist es für die Zukunft wichtig, die *in vivo*-Relevanz von Dectin-1 für *A. fumigatus* zu klären. Kürzlich wurde die Herstellung einer Dectin-1 Knockout-Maus publiziert (Tayler *et al.*, 2007). Die Autoren konnten zeigen, dass diese Mäuse empfindlicher gegenüber einer *C. albicans* Infektion sind. Künftig wird also zu klären sein, inwieweit diese *in vivo*-Relevanz auch auf *A. fumigatus* übertragbar ist.

5. Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der ubiquitär in der Umwelt vorhanden ist. Die schwerwiegende Krankheit, die er verursacht, ist die invasive Aspergillose, welche nur bei immungeschwächten Patienten auftritt und bis heute nur sehr schwierig zu diagnostizieren und zu heilen ist. Die Sporen von *A. fumigatus* können aufgrund ihrer geringen Größe bis in die Alveolen der Lunge gelangen. Dort bilden Makrophagen die erste Verteidigungslinie, indem sie die Sporen phagozytieren. Die Phagozytose ist Bestandteil der angeborenen Immunantwort und ein initialer Schritt bei der Bekämpfung von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen. Das Verstehen dieses Prozesses gewinnt durch die stetige Zunahme der Patienten mit invasiver Aspergillose immer größere Bedeutung und ist Gegenstand intensivster Forschung.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Interaktionen von murinen und humanen Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen untersucht. Die Fragestellung wurde aus zwei unterschiedlichen Perspektiven betrachtet. Zum einen wurde die Oberfläche der *A. fumigatus*-Sporen analysiert; zum anderen wurden die Interaktionen von *A. fumigatus* mit phagozytierenden Zellen erforscht.

Um die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in murinen und humanen Zellen genauer charakterisieren zu können, wurde in dieser Arbeit der so genannte „Biotin-Calcofluor Staining Assay“ (BCS-Assay) entwickelt. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, zwischen extra- und intrazellulären Sporen zu unterscheiden, ohne auf die Anwesenheit von Antikörpern angewiesen zu sein.

Mit Hilfe von diversen Inhibitoren konnte der Mechanismus der Phagozytose genauer untersucht werden. So konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen ein Aktin-abhängiger Prozess ist und dass Makrophagen für die Phagozytose die Aktivierung der Phosphoinositid 3 Phosphat-Kinasen und von Tyrosin-Kinasen benötigen, insbesondere diejenigen der *scr* Familie. Butanedion Monoxim, ein Inhibitor der Myosinmotor-Aktivität, blockierte ebenfalls effizient die Sporenaufnahme. Die weiteren Untersuchungen der Phagozytoseprozesse von *A. fumigatus*-Sporen erfolgten u.a. mit Hilfe von Fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

In der Immunfluoreszenz ließen sich Tyrosin-phosphorylierte Proteine in den Aufnahmestrukturen detektieren, und elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Makrophagen zeigten so genannte „Ruffle“-Strukturen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass *A. fumigatus*-Sporen durch einen „Trigger“-ähnlichen Mechanismus aufgenommen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Rezeptoren der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen charakterisiert. Die Ergebnisse von Meier und ihren Kollegen zeigten bereits, dass die Erkennung von *A. fumigatus* durch

Makrophagen mittels Toll-like Rezeptor 2 und TLR4 erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde nun auch der Frage nachgegangen, welche Rolle TLR2 und TLR4 bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen spielen. Hierzu wurden aus den Mausstämmen C3H/HeN (WT), C3H/HeJ (TLR4-), C3H/HeN TLR2-/- (TLR2-) und C3H/HeJ TLR2-/- (TLR2-/4-) murine Peritonealmakrophagen mittels Peritoneallavage entnommen, mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert und mit Hilfe des BCS-Assays ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptor 2 und nicht Toll-like Rezeptor 4 für eine effiziente Phagozytose benötigt wird. Dieses Ergebnis ließ sich wiederum mit Hilfe eines anti TLR2-Antikörpers bestätigen, da dieser auch die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen, aber nicht von Kontrollbeads blockieren konnte.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der von Brown und seinen Mitarbeitern entdeckte Dectin-1 Rezeptor ein potentieller Phagozytoserezeptor von *A. fumigatus*-Sporen ist (Brown *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Laminarin, ein lösliches β 1-3 Glucan, die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen blockierte. Außerdem ließ sich mit einem anti-Dectin-1 Antikörper die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen in Makrophagen hemmen. Zudem ließ sich Dectin-1 mit diesem Antikörper in infizierten Makrophagen in der Immunfluoreszenz detektieren.

Mit einem weiteren Antikörper konnte β -1-3 Glucan, ein wichtiger Bestandteil der pilzlichen Zellwand, auf ruhenden Sporen detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Menge an β 1-3 Glucan eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von *A. fumigatus*-Sporen spielt. Vergleiche zwischen ruhenden und angeschwollenen Sporen zeigten, dass angeschwollene Sporen, welche größere Mengen an β 1-3 Glucan auf ihrer Oberfläche besitzen, effizienter phagozytiert werden können. Auch die *A. fumigatus pksP*-Mutante, welche mehr β 1-3 Glucan auf ihrer Oberfläche besaß, wurde effizienter phagozytiert. Betrachtet man die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, so deuten die Daten darauf hin, dass die Dectin-1-gesteuerte Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen abhängig von der Syk-Kinase verläuft.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Dectin-1 und TLR2 für eine effiziente Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen benötigt werden. Die Ergebnisse legen allerdings nahe, dass außer Dectin-1 und TLR 2 noch weitere Rezeptoren bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen beteiligt sind. Ein genaues Verständnis der bei der Phagozytose ablaufenden Erkennungsprozesse und der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden könnte in Zukunft ausgenutzt werden, um die Effizienz der Phagozytose auch in immungeschwächten Patienten zu erhöhen und sie so zu schützen.

6. Literaturverzeichnis

Adam, T., M. Arpin, M.C.Prevost, P.Gounon, and P.J.Sansonetti. (1995). Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 129: 367-381.

Adam, T., M. Giry, P. Boquet, and P. Sansonetti. (1996). Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *J EMBO* 15 (13) 3315-33121.

Aderem, A. and R.J. Ulevitch, (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.

Aderem, A. and D.M. Underhill, (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol* 17: 593-623.

Ainsworth, G. and, C Sussman. *The Fungi: An Advanced Treatise*. (1966). Volume II. *The Fungal Organism*. (New York, NY.: Academic Press).

Akiyama, T., J. shida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol. Chem* 262: 5592-5595.

Aktories, K., and J.T. Barbieri. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eucayotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3: 397-410.

Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*. Jaenicke L. (Hrsg). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Allen, L.H. and A. Aderem. (1995). A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* 182: 829-840.

Allen, M.J., R. Harbeck, B. Smith, ,D.R. Voelker and R.J Mason. (1999). Binding of rat and human surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 67: 4563-4569.

Allen, M.J., D.R. Voelker, and R.J. Mason. (2001). Interactions of surfactant proteins A and D with *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 69: 2037-2044.

Literaturverzeichnis

- Alpuche-Aranda, C.M., E.L. Racoosin, J.A. Swanson, and S.I. Miller. (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179: 601-608
- Amitani, R., T. Murayama, R. Nawada, W.J. Lee, A. Niimi, K. Suzuki, E. Tanaka, and F. Kuze. (1995). Aspergillus culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium *in vitro*. *Eur. Respir. J.* 8: 1681-1687.
- Anderson, K.V. and C. Nusslein-Volhard. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311: 223-227.
- Arbibe, L., J.P. Mira, N. Teusch, , L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P.J. Godowski, R.J. Ulevitch, and U.G. Knaus. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol* 1: 533-540.
- Araki, N., M.T. Johnson, and J.A. Swanson. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages, *J Cell Biol*: 135, 1249-60
- Arcaro, A., and M.P. Wymann. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil response. *Biochem J* 296 (Pt 2): 297-301.
- Ariizumi, K., G.L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, III, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P.R. Bergstresser, and A. Takashima. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol. Chem* 275: 20157-20167.
- Balloy, V., M. Si-Tahar, O. Takeuchi, B. Philippe, M. A.Nahori, M. Tanguy, M. Huerre, S. Akira, J.P. Latge, and M. Chignard. (2005). Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 73: 5420-5425.
- Basich, J.E., T.S. Graves, M.N. Baz, G. Scanlon, R.G. Hoffmann, R. Patterson, and J.N. Fink. (1981). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 68: 98-102.
- Beck-Sague, C. and W.R. Jarvis. (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 167: 1247-1251.

- Bellocchio, S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S.S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S.M. Levitz, and L. Romani. (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol* 172: 3059-3069.
- Beningo, K.A. and Y.L. Wang. (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* 115: 849-856.
- Bernhardt, H. and M. Knoke. (2004). [Early signals of systemic mycoses--guidelines for therapeutic decisions?]. *Mycoses* 47 Suppl 1: 60-65.
- Bernard, M. and J.P. Latge. (2001). *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 9-17.
- Blander, J.M. and R. Medzhitov. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304: 1014-1018.
- Borges-Walmsley, M.I., D. Chen, X. Shu, and A.R. Walmsley. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 10: 80-87.
- Braedel, S., M. Radsak, H. Einsele, J.P. Latge, A. Michan, J. Loeffler, Z. Haddad, U. Grigoleit, H. Schild, and H. Hebart. (2004). *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br. J Haematol.* 125: 392-399.
- Brown, E.J. (1991). Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol* 3: 76-82.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol* 6: 33-43.
- Brown, G.D. and S. Gordon. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36-37.
- Brown, G.D., J. Herre, D.L. Williams, J.A. Willment, A.S. Marshall, and S. Gordon. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp. Med* 197: 1119-1124.
- Brown, G.D., P.R. Taylor, D.M. Reid, J.A. Willment, D.L. Williams, L. Martinez-Pomares, S.Y. Wong, and S. Gordon. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp. Med.* 196: 407-412.

- Caillot, D., O. Casasnovas, A. Bernard, J.F. Couaillier, C. Durand, B. Cuisenier, E. Solary, F. Piard, T. Petrella, A. Bonnin, G. Couillault, M. Dumas, and H. Guy. (1997). Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 15: 139-147.
- Cambi, A. and C.G. Figdor. (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol* 15: 539-546.
- Cannon, G.J. and J.A. Swanson. (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci* 101 (Pt 4): 907-913.
- Carlie, M. J. and S.C. Watkinson, The fungi. 329-340. (2006). Academic Press Ltd, London.
- Caron, E. and A. Hall. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717-1721.
- Casadevall, A., A.L Rosas and J.D. Nosanchuk. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol* 3: 354-358.
- Castellano, F., P. Montcourrier, and P. Chavrier. 2000. Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 2955-2961.
- Chaudhary, P.M., C. Ferguson, V. Nguyen, O. Nguyen, H.F. Massa, M. Eby, A. Jasmin, B.J. Trask, L. Hood and P.S. Nelson (1998). Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91: 4020-4027.
- Cheung, H.T. and D.S. Terry. (1980). Effects of nocodazole, a new synthetic microtubule inhibitor, on movement and spreading of mouse peritoneal macrophages. *Cell Biol. Int Rep.* 4: 1125-1129.
- Chimini, G. and P. Chavrier. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol* 2: E191-E196.
- Cooper, N.R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol* 37: 151-216.
- Cox, D., P. Chang, Q. Zhang, P.G. Reddy, G.M. Bokoch, and S. Greenberg. (1997). Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* 186: 1487-1494.

Cox, D., C.C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg. (1999). A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274: 1240-1247

Dianne C., B.M. Dale, M. Kashiwada, C.D. Helgason, and S. Greenberg . (2001). Regulatory Role for Src Homology 2 Domain-containing Inositol 5'-Phosphatase (SHIP) in Phagocytosis Mediated by Fc γ Receptors and Complement Receptor 3 (α M β 2; CD11b/CD18). *JEM* 193: 61-72

Cross, C.E. and G.J. Bancroft. (1995). Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and beta-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun* 63: 2604-2611.

Crowley, T., S. Costello, J. Cheryl, M. Turner, F. Meng, C. Lowell, L.J. Tybulewicz, A. DeFranco. (1997). A Critical Role for Syk in Signal Transduction and Phagocytosis Mediated by Fcg Receptors on Macrophages. *J.Exp.Med* 7: 1027-1039

Czech, A., T. Yamaguchi, L. Bader, S. Linder, K. Kaminski, M. Sugai and M. Aepfelbacher. (2001). Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis* 184: 785-788.

DeHart, D.J., D.E. Agwu, N.C. Julian, and R.G. Washburn. (1997). Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes. *J. Infect. Dis* 175: 146-150.

d'Enfert, C. and T. Fontaine. (1997). Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* treA gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol* 24: 203-216.

Denning, D.W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 26: 781-803.

DI CARLO, F.J. and J.V. FIORE. 1958. On the composition of zymosan. *Science* 127: 756-757.

d'Ostiani, C.F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 191: 1661-1674.

Donaldson, K., X.Y. Li, S.Dogra, B.G. Miller, and G.M. Brown. 1992. Asbestos-stimulated tumour necrosis factor release from alveolar macrophages depends on fibre length and opsonization. *J Pathol* 168: 243-248.

Doyle, S.E., R.M. O'Connell, G.A. Miranda, S.A. Vaidya, E.K. Chow, P.T. Liu, S. Suzuki, N. Suzuki, R.L. Modlin, W.C. Yeh, T.F. Lane and G. Cheng. (2004). Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp. Med* 199: 81-90.

Dramsji, S. and P. Cossart. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 14: 137-166.

Edmond, M.B., S.E. Wallace, D.K. McClish, M.A. Pfaller, R.N. Jones and R.P. Wenzel. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 2: 239-244.

Elomaa, O., M. Kangas, C. Sahlberg, J. Tuukkanen, R. Sormunen, A. Liakka, I. Thesleff, G. Kraal and K. Tryggvason. (1995). Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80: 603-609.

Ezekowitz, R.A., K. Sastry, P. Bailly and A. Warner. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp. Med* 172: 1785-1794.

Francis, C.L., T.A. Ryan, B.D. Jones, S.J. Smith, and S. Falkow. (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364: 639-642.

Frank, M.M. and L.F. Fries. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12: 322-326.

Gale, C.A., C.M. Bendel, M. Mc Clellan, M. Hauser, J.M. Becker, J. Berman, and M.K. Hostetter. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* 279: 1355-1358.

Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira and D.M. Underhill. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp. Med* 197: 1107-1117.

Gantner, B.N., R.M. Simmons, and D.M. Underhill. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 24: 1277-1286.

Garlanda, C., E. Hirsch, S. Bozza, A. Salustri, M. De Acetis, R. Nota, A. Maccagno, F. Riva, B. Bottazzi, G. Peri, A. Doni, L. Vago, M. Botto, R. De Santis, P. Carminati, G.

Siracusa, F. Altruda, A. Vecchi, L. Romani, and ,A.Mantovani. (2002). Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420: 182-186.

Gersuk, G.M., D.M. Underhill, L. Zhu, and K.A. Marr. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol* 176: 3717-3724.

Greenberg, S., K. Burridge, and ,S.C. Silverstein. (1990). Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp. Med* 172: 1853-1856.

Greenberger, P.A., T.P. Miller, M. Roberts, and L.L. Smith. (1993). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with and without evidence of bronchiectasis. *Ann Allergy* 70: 333-338.

Greenberger, P.A., and R. Patterson. (1987). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Model of bronchopulmonary disease with defined serologic, radiologic, pathologic and clinical findings from asthma to fatal destructive lung disease. *Chest* 91: 165S-171S.

Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*. 2nd. Wiley-Liss, New York.

Griffin, F.M., Jr., J.A. Griffin, J.E. Leider, and S.C. Silverstein. (1975). Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 142: 1263-1282.

Griffin, F.M., Jr., J.A. Griffin, and S.C. Silverstein. (1976). Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J Exp Med* 144: 788-809.

Griffin, F.M., Jr. and S.C. Silverstein. (1974). Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus. *J Exp Med*. 139: 323-336.

Gutwein, P., M. Oleszewski, S. Mechttersheimer, N. Agmon-Levin, K. Krauss, and P. Altevogt. 2000. Role of Scr Kinases in the ADAM-mediated Release of L1 Adhesion Molecule from Humn Tumor Cells. *J Biol Chem* 275: 15490-15497.

Hackam, D.J., O.D. Rotstein, A. Schreiber, W. Zhang, and S. Grinstein. (1997). Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcgamma receptors in macrophages. *J Exp Med* 186: 955-966.

Literaturverzeichnis

- Hajjeh, R.A. (1999). Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 33: 217-222.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
- Hamilton, A.J., and B.L. Gomez. (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51, 189-191. 37.
- Harrison, R.E. and S. Grinstein. (2002). Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem. Cell Biol* 80: 509-515.
- Hearn, V.M. and D.W. Mackenzie. (1980). Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen* 23: 549-562.
- Heesemann, J., and R. Laufs. (1985). Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* 22: 168-175.
- Herbrecht, R., D.W. Denning, T.F. Patterson, J.E. Bennett, R.E. Greene, J.W. Oestmann, W.V. Kern, K.A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R.H. Rubin, J.R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P.H. Chandrasekar, M.R. Hodges, H.T. Schlamm, P.F. Troke, and B. de Pauw (2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J Med* 347: 408-415.
- Herre, J., S. Gordon, and G.D. Brown. (2004a). Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol. Immunol* 40: 869-876.
- Herre, J., A.S. Marshall, E. Caron, A.D. Edwards, D.L. Williams, E. Schweighoffer, Tybulewicz, V., Reis e Sousa, Gordon, S., and Brown, G.D. (2004b). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104: 4038-4045.
- Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janeway, and R.A. Ezekowitz. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318.
- Hohl, T.M., H.L. Van Epps, A. Rivera, L.A. Morgan, P.L. Chen, M. Feldmesser, and E.G. Pamer. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS. Pathog.* 1: e30.

Hospenthal, D.R., K.J. Kwon-Chung, and J.E. Bennett. (1998). Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol* 36: 165-168.

Ibrahim-Granet, O., B. Philippe, H. Boleti, E. Boisvieux-Ulrich, D. Grenet, M. Stern, and J.P. Latge. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* 71: 891-903.

Jacobson, E.S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13: 708-717.

Jahn, B., F. Boukhallouk, J. Lotz, K. Langfelder, G. Wanner, and A.A. Brakhage. (2000). Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect Immun* 68: 3736-3739.

Jahn, B., A. Koch, A. Schmidt, G. Wanner, H. Gehringer, S. Bhakdi, and A.A. Brakhage. (1997). Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect Immun* 65: 5110-5117.

Jahn, B., K. Langfelder, U. Schneider, C. Schindel, and A.A. Brakhage. (2002). PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* 4: 793-803.

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 54 Pt 1, 1-13.

Jeu, L., F.J. Piacenti, A.G. Lyakhovetskiy, and H.B. Fung. (2003). Voriconazole. *Clin Ther* 25: 1321-1381.

Kan, V.L. and J.E. Bennett. (1991). Beta 1,4-oligoglucosides inhibit the binding of *Aspergillus fumigatus* conidia to human monocytes. *J Infect Dis* 163: 1154-1156.

Kaposzta, R., L. Marodi, M. Hollinshead, S. Gordon, and R.P. da Silva. (1999). Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *J Cell Sci* 112 (Pt 19): 3237-3248.

Kataoka, K., T. Muta, S. Yamazaki, and, K. Takeshige. (2002). Activation of macrophages by linear (1→3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol. Chem* 277: 36825-36831.

Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P.F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167: 5887-5894.

Kjoller, L. and A. Hall. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res* 253: 166-179.

Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26: 239-256.

Koval, M., K. Preiter, C. Adles, P.D. Stahl, and T.H. Steinberg. (1998). Size of IgG-opsionized particles determines macrophage response during internalization. *Exp Cell Res* 242: 265-273.

Krasnick, J., R. Patterson, and M. Roberts. (1995). Allergic bronchopulmonary aspergillosis presenting with cough variant asthma and identifiable source of *Aspergillus fumigatus*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 75: 344-346.

Kuhn, M. (1998). The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D₁ macrophages. *FEMS Microbiology Letters* 160: 1-87.

Kwon-Chung, K.J., I. Polacheck, and T.J. Popkin. (1982). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol* 150: 1414-1421.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner, and A.A. Brakhage. (1998). Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med Microbiol Immunol. (Berl)*, 187: 79-89.

Langfelder, K., M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, and A.A. Brakhage. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol* 38, 143-158.

Lanier, L.L., B.C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J.H. Phillips. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391: 703-707.

Latge, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12: 310-350.

Latge, J.P., J.P. Debeaupuis, J. Sarfati, M. Diaquin, and S. Paris. (1993). Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. *Arch. Med Res* 24: 269-274.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.

Levitz, S.M., M.E. Selsted, T. Ganz, R.I. Lehrer, and R.D. Diamond. (1986). *In vitro* killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis* 154: 483-489.

Lo, H.J., J.R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G.R. Fink. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.

Lopes Bezerra, L.M. and S.G. Filler. (2004). Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood* 103: 2143-2149.

Luther, K. and F. Ebel. (2006). Toll-like receptors: recent advances, open questions and implications for aspergillosis control. *Medical Mycology* 44: S1-S9

Madan, T., P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S.S. Aggrawal, P.U. Sarma, and K.B. Reid. (1997). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun* 65: 3171-3179.

Mambula, S.S., K. Sau, P. Henneke, D.T. Golenbock, and S.M. Levitz. 2002. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol. Chem* 277: 39320-39326.

Mason, R.J., K. Greene and D.R. Voelker. (1998). Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am. J Physiol* 275: L1-13.

Massol, P., P. Montcourrier, J.C. Guillemot, and P. Chavrier. (1998). Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J* 17: 6219-6229.

Literaturverzeichnis

- Mbawuike I.N., and H.B. Herscowitz. (1989). MH-S, a murine alveolar macrophage cell line: morphological, cytochemical, and functional characteristics. *J Leukoc Biol* 46: 119-124.
- Medzhitov, R. and C. Janeway Jr. (2000a). Innate immunity. *N. Engl. J Med* 343: 338-344.
- Medzhitov, R. and C. Janeway Jr. (2000b). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8: 452-456.
- Medzhitov, R. and C.A. Janeway Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C.A. Janeway Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2: 253-258.
- Meier, A., C.J. Kirschning, T. Nikolaus, H. Wagner, J. Heesemann, and F. Ebel. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* 5: 561-570.
- Meng, G., M. Rutz, M. Schiemann, J. Metzger, A. Grabiec, R. Schwandner, P.B. Luppa, F. Ebel, D.H. Busch, S. Bauer, H. Wagner, and C.J. Kirschning. 2004. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113: 1473-1481.
- Mermall V, P.L. Post and M.S.Mooseker. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction *Science*: 279, 527–533.
- Mocsai, A., M. Zhou, F. Meng, V.L. Tybulewicz, and C.A. Lowell. (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16: 547-558.
- Mullins, J., R. Harvey, and A. Seaton. (1976). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy* 6: 209-217.
- Muzio, M., G. Natoli, S. Sacconi, M. Levrero, and A. Mantovani. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp. Med* 187: 2097-2101.

Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V.M. Dixit. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278: 1612-1615.

Muzio, M., N. Polentarutti, D. Bosisio, P.P. Manoj Kumar, and A. Mantovani. (2000). Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem. Soc Trans* 28: 563-566.

Nabi, I.R. (1999). The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 1803-1811.

Netea, M.G., N.A. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R.P. Hobson, G. Bertram, H.B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E.T. Buurman, K. Gijzen, D.L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D.M. MacCallum, F.C. Odds, J.W. Van der Meer, A.J. Brown, and B.J. Kullberg. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116: 1642-1650.

Odds, F.C., A.J. Brown, and N.A. Gow. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11: 272-279.

Ozinsky, A., D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. Smith, K.D. Wilson, Schroeder, L., and 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. U. S A* 97: 13766-13771.

Paris, S., J.P. Debeaupuis, R. Cramer, M. Carey, F. Charles, M.C. Prevost, C. Schmitt, B. Philippe, and J.P. Latge. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol* 69: 1581-1588.

Parson, T.J., and S.J. Parson.. (1997). Src family tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol* 9:187-192

Peiser, L., P.J. Gough, T. Kodama, and S. Gordon (2000). Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions *in vitro*. *Infect Immun* 68: 1953-1963.

Persat, F., N. Noirey, J. Diana, M.J. Gariazzo, D. Schmitt, S. Picot, and C. Vincent. (2003). Binding of live conidia of *Aspergillus fumigatus* activates *in vitro*-generated human Langerhans cells via a lectin of galactomannan specificity. *Clin Exp. Immunol.* 133: 370-377.

Philippe, B., O. Ibrahim-Granet, M.C. Prevost, M.A. Gougerot-Pocidallo, P.M. Sanchez, M.A. Van der, and J.P. Latge. (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar

macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* 71: 3034-3042.

Pitcher, L.A. , and N.S. van Oers. (2003). T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* 24: 554-560.

Raper, K. B. &. and D. Fenell, I. The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company (Baltimore). 38-268. 1965.

Read, S.M., G. Currie, and A. Bacic. 1996. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydr. Res* 281: 187-201.

Reaven, E.P. and S.G. Axline. 1973. Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages. *J Cell Biol* 59: 12-27.

Reichard, U., M. Monod, and R. Ruchel. (1995). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 130: 69-74.

Reid, K.B. (1998). Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim Biophys Acta* 1408: 290-295.

Reiß. Schimmelpilze. (2006). Springer-Verlag, Berlin.

Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410.

Robinson, B.W., T.J. Venaille, A.H. Mendis, and R. McAleer. (1990). Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment. *J Allergy Clin Immunol* 86: 726-731.

Rock, F.L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, and J.F. Bazan. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 95: 588-593.

Rogers, A.J., C.A. Delgado, and H.K. Simon. (2004). The effect of limited English proficiency on admission rates from a pediatric ED: stratification by triage acuity. *Am. J Emerg Med* 22: 534-536.

- Rogers, N.C., E.C. Slack, A.D. Edwards, M.A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D.L. Williams, S. Gordon, V.L. Tybulewicz, G.D. Brown, and Reis e Sousa (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22: 507-517.
- Rohde, M., M. Schwienbacher, T. Nikolaus, J. Heesemann, and F. Ebel. (2002). Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol Lett* 206: 99-105.
- Roilides, E. (2006). Early diagnosis of invasive aspergillosis in infants and children. *Med Mycol.*, 44 Suppl, 199-205.
- Rupper, A., K. Lee, D. Knecht, and J. Cardelli. (2001). Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Aakt, and Rab7 during macropinosome formation in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell* 12: 2813-2824.
- Samson, R.A. (1999). The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib. Microbiol* 2: 5-20.
- Sampath, P., and Pollard. (1991). Effect of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochem* 30: 1973-1980.
- Sarkar, K., M.J. Kruhlak, S.L. Erlandsen, and S. Shaw. (2005). Selective inhibition by rottlerin of macropinosome formation in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 116: 513-524.
- Schaffner, A., C.E. Davis, T. Schaffner, M. Markert, H. Douglas, and A.I. Braude. (1986). In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J. Clin. Invest* 78: 511-524.
- Schaffner, A., H. Douglas, and A. Braude. (1982). Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J. Clin. Invest* 69: 617-631.
- Schmit, J.C. and S. Brody. (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev* 40: 1-41.
- Schneemann, M. and A. Schaffner. (1999). Host defense mechanism in *Aspergillus fumigatus* infections. *Contrib. Microbiol* 2: 57-68.

Schroder, N.W., B. Opitz, N. Lamping, K.S. Michelsen, U. Zahringer, U.B. Gobel, and R.R. Schumann. (2000). Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol* 165: 2683-2693.

Schwienbacher, M. Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden. (2005).

Seki, N., T. Muta, T. Oda, D. Iwaki, K. Kuma, T. Miyata, and S. Iwanaga. (1994). Horseshoe crab (1,3)-beta-D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to beta-glucan-binding proteins. *J Biol. Chem.* 269: 1370-1374.

Serrano-Gomez,D., A. Dominguez-Soto, J. Ancochea, J.A. Jimenez-Heffernan, Leal,J.A., and Corbi,A.L. (2004). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 173: 5635-5643.

Shi, Y., T. Kadono, J. He, S.M. Shahjahan Miah, R. Hazama, C. Tanaka, K. Tohyama, H. Yamamura. (2006). Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood* 107: 4554-4562

Sobanov,Y., A. Bernreiter, S. Derdak, D. Mechtcheriakova, B. Schweighofer, M. Duchler, F. Kalthoff, and E. Hofer. (2001). A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur. J Immunol* 31: 3493-3503.

Steele,C., L. Marrero, S. Swain, A.G. Harmsen, M. Zheng, G.D. Brown, S. Gordon, J.E. Shellito, and J.K. Kolls. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp. Med* 198: 1677-1688.

Stendahl, O.I., J.H. Hartwig, E.A. Brotschi, and T.P. Stossel. (1980). Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol.* 84: 215-224.

Sturtevant, J. and J.P. Latge. (1992). Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis,* 166: 580-586.

Swanson, J.A., M.T. Johnson, K. Beningo, P. Post, M. Mooseker, and N. Araki. 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 112 (Pt 3): 307-316.

Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81: 153-208.

Takeda, K. and S. Akira. (2003a). Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5: 143-153.

Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. (2003b). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol* 21: 335-376.

Taylor, P.R., S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G.D. Brown. (2007). Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunol* 8: 31-37.

Taylor, P.R., G.D. Brown, D.M. Reid, J.A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and S.Y. Wong. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169: 3876-3882.

Thau, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J.P. Latge, and S. Paris. (1994). rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 62: 4380-4388.

Thurston, J.R., S.J. Cysewski, and J.L. Richard. (1979). Exposure of rabbits to spores of *Aspergillus fumigatus* or *Penicillium* sp: survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Am. J. Vet. Res* 40: 1443-1449.

Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli, and A. Cassone. (2005). A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp. Med* 202: 597-606.

Tronchin, G., J.P. Bouchara, M. Ferron, G. Larcher, and D. Chabasse. (1995). Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Can. J Microbiol* 41: 714-721.

Tsai, H.F., Y.C. Chang, R.G. Washburn, M.H. Wheeler, and K.J. Kwon-Chung. (1998). The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* 180: 3031-3038.

Tsai, H.F., R.G. Washburn, Y.C. Chang, and K.J. Kwon-Chung. (1997). *Aspergillus fumigatus* arp1 modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol. Microbiol* 26: 175-183.

Tsai,H.F., M.H. Wheeler, Y.C. Chang, and K.J Kwon-Chung. (1999). A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 181: 6469-6477.

Tsarfaty, I., H.Sandovsky-Losica, L.Mittelman, I.Berdicevsky, and E.Segal. (2000). Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 189: 225-232.

Turner,M., Mee,P.J., Costello,P.S., Williams,O., Price,A.A., Duddy,L.P., Furlong,M.T., Geahlen,R.L., and Tybulewicz,V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378: 298-302.

Underhill, D.M. and B.Gantner. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect* 6: 1368-1373.

Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.

Underhill, D.M., E. Rosnagle, C.A. Lowell, and R.M. Simmons. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106: 2543-2550.

Van den Herik-Oudijk IE, P.J. Capel, B.T. van der, and J.G. Van de Winkel. (1995). Identification of signaling motifs within human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb isoforms. *Blood* 85: 2202-2211.

Viriyakosol, S., J. Fierer, G.D. Brown, and T.N. Kirkland. (2005). Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* 73: 1553-1560.

Wang, J.E., A. Warris, E.A. Ellingsen, P.F. Jorgensen, T.H. Flo, T. Espevik, R. Solberg, P.E. Verweij, and A.O. Aasen. (2001). Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 69: 2402-2406.

Wang, Y., P. Aisen, and A. Casadevall. (1996). Melanin, melanin "ghosts," and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 64: 2420-2424.

Wasylnka, J.A. and Moore,M.M. (2002). Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells *in vitro*: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun* 70: 3156-3163.

Literaturverzeichnis

Watanabe,A., I. Fujii, H. Tsai, Y.C. Chang, K.J. Kwon-Chung, and Y. Ebizuka. (2000). *Aspergillus fumigatus alb1* encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* 192: 39-44.

Wheeler,M.H. and A.A. Bell. (1988). Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr. Top. Med Mycol* 2: 338-387.

Willment,J.A., S. Gordon, and G.D. Brown. (2001). Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol. Chem* 276: 43818-43823.

Wosten, H., O. De Vries, and J. Wessels. (1993). Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *Plant Cell* 5: 1567-1574.

Wosten,H.A. and M.L. de Vocht. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 79-86.

Wyllie,D.H., E. Kiss-Toth, A. Visintin, S.C. Smith, S. Boussouf, D.M. Segal, G.W. Duff, and S.K. Dower. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165: 7125-7132.

Yadav,M. and J.S. Schorey. (2006). The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 108: 3168-3175.

Yoshinobu, F., E. Ohto, E. Katayama, and Y. Atomi. (2004). α B-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. *J Cell Science* 117: 1719-1726.

Yuen,K.Y., C.M. Chan, K.M. Chan, P.C. Woo, X.Y. Che, A.S. Leung, and L. Cao. (2001). Characterization of AFMP1: a novel target for serodiagnosis of aspergillosis. *J Clin Microbiol* 39: 3830-3837.

Zhang, D., G. Zhang, M.S. Hayden, M.B. Greenblatt, C. Bussey, R.A. Flavell, and S. Ghosh. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303: 1522-1526.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, mit deren Unterstützung und Anregung diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.

Ich danke ganz herzlich Frau PD Dr. Daniele Zink für die Übernahme des Erstgutachtens und für die freundliche Bereitschaft, meine Arbeit vor der biologischen Fakultät zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. Frank Ebel für die Bereitstellung des interessanten Themas, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für seine umfangreiche Betreuung und seine tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danke ich, dass ich diese Arbeit in seinem Haus und mit seiner Unterstützung durchführen konnte.

Herrn Dr. Stefan Linder (Institut für Kreislaufkrankheiten, LMU) danke ich für die Bereitstellung der humanen Primärmakrophagen.

Ich danke Dr. Manfred Rhode (GBF, Braunschweig) für die Durchführung der Elektronenmikroskopie

Frau Dr. Marianne Albrecht danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen, die ich während meiner Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut kennengelernt habe. Ganz besonders danke ich Marzena, Moni, KvE, Krischtl, Anela, Leonie, Rike, Tina und Brigitte. Ihr seid richtige Freunde geworden und ich hoffe, dass wir noch viel Spaß auch außerhalb des Labors haben werden☺!!!

Hicham danke ich ganz herzlich für seine Hilfe und seine Diskussionsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön an meine Familie, meinen geliebten Ehemann und unsere kleinen Charlotte, die mir während des Lernens viel Kraft gegeben hat: Danke für euer Verständnis, eure Unterstützung, euren Rückhalt und alles andere sonst...

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kathrin Luther
Geburtsdatum: 16.03.1979
Geburtsort: Saarbrücken

Schulbildung

1989-1998 GYMNASIUM AM ROTENBÜHL, Saarbrücken
1995 Schüleraustausch in den USA (Utah)

Studium

seit 01/ 2004 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Bakteriologie im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, (Prof. Dr. Dr. J. Heesemann), **LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT-München**
Titel: „Interaktionen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* mit Wirtszellen“.

1998-2003 Studium an der **UNIVERSITÄT DES SAARLANDES** (Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Mikrobiologie und Virologie)

04.11.2002-10.09.2003 Diplomarbeit im Fach Humangenetik an der **LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT**, München bei Priv. Doz. Daniele Zink
Titel: „Positionierung und Dynamik von Chromosomalen Loci im Zellkern“

02.10.2000-25.03.2001 Auslandsstudium am **IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY AND MEDICINE**, London

Ort,