

**Flowzytometrische Erfassung der
Phagozytose schwarzer Hefen durch humane Granulozyten**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Andreas Platz

aus

Gelsenkirchen

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Dipl.-Biol. Gerhard Haase

Frau Universitätsprofessorin
Dr. med./Univ. Budapest Susanne Markos-Pusztai

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für **Daniel** und **Jannes**,
die nach erfolgreicher Knochenmarktransplantation
wieder ein intaktes Immunsystem
geschenkt bekommen haben.

*„Wir danken dir, o Gott, wir danken dir!
Du bist uns nahe!
Wir erzählen von deinen
wunderbaren Taten.“*

Psalm 75, Vers 2

Abstract

Black yeasts, having been increasingly isolated from patients, may cause a wide range of opportunistic mycotic diseases. Simply cutaneous infections are found as well as severe systemic infections which frequently lead to death. Using flow cytometry we analysed the phagocytic activity of yeast cells by human polymorphonuclear granulocytes (PNG) after co-incubation with heparinized complete blood of healthy donors. To obtain yeast-like growth, all strains were cultured in standardized media. Using fluorescently (BCECF-AM) labelled yeasts we had been able to distinguish yeast-cells that had been phagocytised (or adhered to) by PNG from free (non-phagocytised) yeast cells. The further quantitative analysis focused on human neutrophils participating in phagocytosis.

After a co-incubation time of 60 min, phagocytosis rates were comparable for all species analysed, on an average of 80%. Yeast strains with a frequent pathogenic potential (*Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*), less pathogenic strains (*Exophiala castellanii*, *Exophiala bergeri*, *Hortaea werneckii*, *Phaeoannellomyces elegans*), one non-pathogenic strain (*Exophiala mesophila*) and two non-pigmented strains (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) had been tested. Trying to inhibit phagocytic activity we used murine monoclonal antibodies (mab) against β_2 -integrins (CD11a, CD11b, CD11c alone and in combination with CD18). For all yeast strains tested a significant inhibition of the phagocytic activity of human neutrophils could only be seen after co-incubation with mab CD11b and CD18 (inhibition on an average of 50%). Consequently the granulocytic complement-receptor Mac-1 (CD11b/CD18, CR3) had been identified as an essential receptor for adhesion and final phagocytosis of black yeasts and other medically important fungi.

Zusammenfassung

Schwarze Hefen werden immer häufiger aus klinischem Untersuchungsmaterial isoliert und können ein weites Spektrum an opportunistischen Mykosen verursachen. Dieses erstreckt sich über rein oberflächliche Hauterkrankungen bis hin zu schwersten, häufig letal verlaufenden Infektionen. Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG) im heparinisierten Vollblut gesunder Probanden nach Koinkubation mit den Pilzen wurde durchflußzytometrisch untersucht. Die in standardisierten Nährmedien gewachsenen und überwiegend in der Hefeform vorliegenden Pilze wurden mit einem Fluoreszein-Ester (BCECF-AM) markiert. Phagozytierte, bzw. adhärenzte Hefen konnten somit sicher am Durchflußzytometer von freien Pilzzellen differenziert werden. In der weiteren Analyse konnte eine quantitative Beteiligung der PNG an der Phagozytose ermittelt werden.

Nach 60 min Koinkubationszeit lag der Anteil der an der Phagozytose beteiligten PNG bei allen untersuchten Stämmen durchschnittlich um 80%. Es wurden Arten mit hohem pathogenen Potential (*Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*), schwach pathogene Stämme (*Exophiala castellanii*, *Exophiala bergeri*, *Hortaea werneckii*, *Phaeoannellomyces elegans*) und ein apathogener Keim (*Exophiala mesophila*) sowie zwei unpigmentierte Referenzstämme (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) untersucht. Zur gezielten Blockade der Phagozytose wurden murine monoklonale Antikörper (mAk) gegen β_2 -Integrine eingesetzt (CD11a, CD11b, CD11c alleine und in Kombination mit CD18). Bei allen untersuchten Isolatzen ließ sich die Beteiligung der PNG an der Phagozytose nur durch Koinkubation mit mAk (CD11b und CD18) signifikant blockieren (um durchschnittlich ca. 50%). Somit konnte der granulozytäre Komplementrezeptor Mac-1 (CD11b/CD18, CR3) als wesentlicher Rezeptor für die Adhäsion mit konsekutiver Phagozytose schwarzer Hefen wie auch anderer medizinisch relevanter Pilze identifiziert werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Taxonomie der Schwärzepilze	1
1.3 Mykosen durch Schwärzepilze	4
1.3.1 Oberflächliche Mykosen	4
1.3.2 Subkutane Mykosen	6
1.3.3 Organ- und Systemmykosen	7
1.4 Schwärzepilze als Krankheitserreger	9
1.4.1 <i>Exophiala jeanselmei</i>	9
1.4.2 <i>Exophiala dermatitidis</i>	11
1.4.3 <i>Hortaea werneckii</i>	14
1.4.4 <i>Exophiala mesophila</i>	15
1.4.5 <i>Exophiala bergeri</i>	15
1.4.6 <i>Exophiala castellanii</i>	15
1.4.7 <i>Phaeoannellomyces elegans</i>	15
1.4.8 Sonstige Isolate, die nicht zu den Schwärzepilzen zählen	16
1.5 Pilzinfektionen und die Reaktion des Immunsystems	16
1.5.1 Allgemeines	16
1.5.2 Phagozytose	18
1.5.3 Zellmembranrezeptoren und Adhäsionsmoleküle	20
1.5.4 Defekte phagozytierender Zellen	22
1.6 Fragestellung	23
 2 Material und Methoden	 25
2.1 Untersuchte Pilzarten	25
2.2 Stammhaltung	28
2.3 Kultur der Hefen	28
2.3.1 Verwendete Nährmedien und Puffer	28
2.3.2 Herstellung der Flüssignährmedien	30
2.3.3 Herstellung der Agarplatten	31
2.3.4 Sterilisation	31
2.4 Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)	31
2.5 Verwendetes Fluorochrom als Marker der Hefezellen	32

2.6 Prinzip der Durchflusszytometrie	32
2.6.1 Allgemeines	32
2.6.2 Physikalische Grundlagen	33
2.6.3 Aufbau eines analytischen Durchflusszytometers	34
2.6.4 Verwendetes Messgerät	35
2.6.5 Verwendetes Messprogramm	35
2.7 Vorbereitung der Zellen für den Messvorgang	36
2.7.1 Versuchsvorbereitungen	36
2.7.2 Versuchsansatz	38
2.7.3 Messvorgang	39
2.9 Bearbeitung und Darstellung der Rohmessdaten	40
2.10 Statistische Verfahren	43
3 Versuchsergebnisse	44
3.1 Prinzip der Auswertemethodik	44
3.1.1 Auswertemodalität A	45
3.1.2 Auswertemodalität B	48
3.2 Färbung der untersuchten Pilzstämmen	50
3.3 Bindung und Phagozytose	52
3.4 Vergleich der Phagozytose bei verschiedenen Schwärzepilzen	53
3.5 Einsatz monoklonaler Antikörper (mAk) zur Phagozytoseblockade	54
3.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Phagozytoseblockade	64
4 Diskussion	66
4.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	66
4.1.1 Auswahl der Pilzisolat	66
4.1.2 Auswahl des fluorochromen Markers	67
4.1.3 Heparinisiertes Vollblut	68
4.1.4 Verfahren zur Bestimmung und Einstellung der Zahl der Hefen	70
4.1.5 Verfahren zum Ansetzen des Phagozytose-Assays	71
4.1.6 Verfahren der Durchflusszytometrie	72
4.2 Vergleich der Versuchsergebnisse mit der aktuellen Literatur	75
4.2.1 Ausmaß der Phagozytose bezogen auf verschiedene Pilzisolat	75
4.2.2 Eingesetzte monoklonale Antikörper (mAk) zur Phagozytoseblockade	81

5 Zusammenfassung und Ausblick	86
6 Literaturverzeichnis	88
7 Anhang	104
7.1 Verwendete Geräte	104
7.2 Verwendete Abkürzungen	105
7.3 Bisherige Veröffentlichungen partieller Studienergebnisse	107
7.4 Danksagung	108
7.5 Lebenslauf	109

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Allgemeines

Der Begriff „schwarze Hefen“ („leveduras pretas“), erstmalig im deutschsprachigen Raum Ende des 19. Jahrhunderts erwähnt [Marpmann, 1886], wurde im heutigen Bedeutungsumfang 1959 durch den Portugiesen Ulson [Ulson, 1959] eingeführt und ist seitdem in der medizinischen Mykologie ein etablierter Begriff für die Beschreibung einer großen heterogenen Gruppe klinisch relevanter Pilze [McGough, 1993]. Zum besseren Verständnis dieser Gruppe wird eine taxonomische Einordnung der Organismen vorangestellt, mit denen sich die vorliegende Studie beschäftigt.

1.2 Taxonomie der Schwärzepilze

Die taxonomische Einordnung höherer Pilze (Eumyzeten) erfolgt nach der Art der sexuellen Sporenbildung :

- Zygomyzeten (Jochpilze)
- Ascomyzeten (Schlauchpilze)
- Basidiomyzeten (Ständerpilze)

In der Regel gehören die schwarzen Hefen wie nahezu alle humanpathogenen Pilze zu den Fungi imperfecti (Deuteromyzeten), einer Formklasse der Pilze, denen das sexuelle (perfekte) Stadium fehlt oder bei denen es noch nicht nachgewiesen worden ist [de Hoog, 2000b]. Aufgrund des Zellwandaufbaues, der Art des Septums und der molekularen Phylogenese bestehen teleomorphe Beziehungen teils zu den Ascomyzeten, teils zu den Basidiomyzeten.

Ein wesentliches, wenn auch „artifizielles“ Leitkriterium bei der Einordnung von imperfekten Pilzen in sogenannte Formgattungen basiert auf der beobachteten Konidienbildung (Konidiogenese) [Hawksworth, 1995]. Hierbei wird die Ontogenese der Konidien sowie die Morphologie der zum Teil hochdifferenzierten konidiogenen Zellen beurteilt. Die Konidienbildung erfolgt beispielsweise durch de novo Wachstum nach Ruptur der äußeren Zellwand am Apex der konidiogenen Zelle. Dabei ist eine sogenannte Kragenbildung (Collarette) zu beobachten. Die Konidien werden in Haufen- oder Kettenform abgegliedert und ein Längenwachstum der konidiogenen Zelle nicht beobachtet. Ähnlich verläuft die annellidische Konidienbildung, jedoch erfolgt eine Zunahme des Längsdurchmessers der konidiogenen Zellen bei der Bildung jeder einzelnen Konidie. Es entstehen ringförmige Strukturen am Apex der konidiogenen Zelle, sogenannte Annelliden, die den Ablösungszonen

der einzelnen Konidien entsprechen. Bei der phialidischen Konidienbildung sind solche Anellationen nicht vorhanden oder durch das Collarette verdeckt. Strukturen wie Anelliden sind charakteristisch für die Gattungen *Phaeoannellomyces* und *Exophiala*, phialidische Konidienbildung ist ein typisches Merkmal der Gattung *Phialophora* [Dixon, 1991].

Die Deuteromyzeten werden wiederum in die Coelomyzeten und die Hyphomyzeten unterteilt. Charakteristisch für die Coelomyzeten ist die Beobachtung, dass die Konidien von konidiogenen Zellen an einer distinkten Stelle im Myzel gebildet werden, während diese bei den Hyphomyzeten zufällig verteilt im Myzel zu finden sind. Innerhalb der Hyphomyzeten findet man Pilze, die ein schwarzes Pigment (i. d. R. Melanin) bilden und dieses in der Zellwand des Myzels und/oder der Konidien einlagern (Dematiaceae). Zu den Dematiaceae (= Schwärzepilze) gehören nach dieser Definition u. a. die Gattungen *Aureobasidium*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea* und *Phialophora*. Die Schwärzepilze stellen eine umfangreiche Gruppe von Organismen dar, die rein makroskopisch durch ihre dunkel pigmentierten (dunkelbraun, olivfarben oder schwarz) Kolonien auffallen. Diese Pigmentierung schützt den Pilz sowohl in der Natur als auch im Menschen vor Schädigungen wie Hyperoxygenierung und enzymatischem Abbau [Jacobson, 1995] und trägt somit zur Virulenz dieser Organismen bei [Polak, 1990; Feng, 2001].

Schwärzepilze sind polymorph wachsende Pilze, die sowohl als reine Hefen wachsen als auch gleichzeitig Myzel bilden können und Konidien in unterschiedlicher Weise ausbilden [de Hoog, 1994]. Die Tatsache, dass in einer Kultur mehrere Wachstumsformen nebeneinander zu beobachten sind [Szaniszlo, 1993], erschwert die taxonomische Zuordnung des jeweiligen Isolates und hat in der Vergangenheit zu einer verwirrenden nomenklatorischen Vielfalt geführt. Ferner ist die Art der Konidiogenese bei vielen Spezies abhängig von Wachstumsparametern wie Temperatur, Licht, Feuchtigkeit, pH-Wert etc. [Karuppaiyil, 1997], doch gibt es bisher keine eindeutige Prozedur, um eine definierte Konidiogenese zu induzieren, die dann zur sicheren Spezifizierung eines unbekannten Isolates herangezogen werden kann.

Grundsätzlich kann es bei den Pilzen geschlechtliche (teleomorphe) sowie ungeschlechtliche (anamorphe bzw. bei mehreren ungeschlechtlichen Formen sogenannte synanamorphe) Fortpflanzungsarten geben. Werden bei einem Pilz sowohl die teleomorphe als auch die anamorphe bzw. synanamorphe Wachstumsform beobachtet, so bezeichnet man diese Form als holomorph, was für Deuteromyzeten (Fungi imperfecti) nicht zutrifft. Bei polymorphen Pilzen (mehrere synanamorphe Formen gleichzeitig vorhanden) ist die zahlenmäßig führende anamorphe Form namensgebend, die anderen Formen werden dann als synanamorph bezeichnet [Hawksworth,

1995]. Mutanten einiger Stämme bilden unabhängig von den Wachstumsbedingungen lediglich eine einzige anamorphe Wachstumsform aus, die dann namensgebend für dieses Isolat ist. So existieren Stämme, bei denen nur die Hefephase ausgebildet ist und die Sprossung annellidisch mono- bzw. bipolar erfolgt. Dies hat am Beispiel von *Exophiala* zur Einführung der synanamorphen Gattungen *Phaeococcomyces* (monopolar) bzw. *Phaeoannellomyces* (bipolar) geführt.

Neben den mikromorphologischen Eigenschaften von Pilzen sind ihre physiologischen und biochemischen Eigenschaften Grundlage ihrer Differenzierung. Dabei werden sie anhand ihrer Fähigkeit verschiedene Nährstoffe zu assimilieren identifiziert. Getestet wird in diesem Zusammen-hang u. a. die Hydrolyse von Kohlenstoffen, die Proteolyse verschiedener Eiweiße, aber auch pH- und Salztoleranz [Espinel Ingroff, 1988 & 1989; Steadham, 1986; Gugnani 1989; Dixon, 1991; de Hoog, 1993a & 1995b].

Nur unter Berücksichtigung des Polymorphismus sind die zahlreichen Umbenennungen einzelner Spezies aus der sehr heterogenen Gruppe der schwarzen Hefen und die andauernde Diskussion über die taxonomische Zuordnung in eine Gattung zu verstehen. Die Vielfalt der verschiedenen Namen wird beispielhaft an *Exophiala dermatitidis* weiter unten erörtert. Möglicherweise können neuere molekularbiologische Untersuchungsmethoden wie z. B. die PCR (Polymerase Chain Reaction) oder die RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) zur weiteren Klärung der taxonomischen Einordnung führen [Spatafora, 1995; Uijthof, 1994 & 1995 & 1996 & 1998; Shaoxi, 1996; Haase 1996a & 1999].

1.3 Mykosen durch Schwärzepilze

Von den Schwärzepilzen sind bisher mehr als hundert verschiedene Arten als kausale Agenzien für verschiedene Infektionen beschrieben worden [Ajello, 1981; Fothergill 1996]. In Tabelle 1.1 werden einige typische dematiöse Pilze im Zusammenhang unterschiedlicher klinischer Bilder aufgelistet.

Tabelle 1.1: Mykosen verursacht durch zum Formenkreis der schwarzen Hefen gehörenden Pilze

Lokalisation	Erkrankung	Typischer Erreger
Oberflächlich	Tinea nigra	<i>Hortaea werneckii</i>
Kutan/subkutan	Myzetom	<i>Exophiala jeanselmei</i>
	Chromoblastomykose	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
	kutane/subkutane Phaeohyphomykose	<i>Exophiala dermatitidis</i> <i>Exophiala spinifera</i>
Zentrales Nervensystem	zerebrale Phaeohyphomykose	<i>Exophiala dermatitidis</i> <i>Cladophialophora bantiana</i>
Andere innere Organe	tiefe Phaeohyphomykose mit Endokarditis, Sepsis, Peritonitis etc.	<i>Exophiala dermatitidis</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i>

1.3.1 Oberflächliche Mykosen

Klassisches Krankheitsbild einer superfiziellen Hauterkrankung durch einen Schwärzepilz stellt die **Tinea nigra** dar; die flachen, dunkelpigmentierten und meist symptomlosen Herde, die manchmal differentialdiagnostisch einem Melanom ähneln [Babel, 1986], sind auf das Stratum corneum beschränkt, wachsen sehr langsam und sind vorwiegend an Handinnenflächen (**Tinea nigra palmaris**; klinisches Beispiel in Abbildung 1.1) und seltener an Fußsohlen (**Tinea nigra plantaris**) lokalisiert. In der Regel erfolgt keine Gewebspenetration. Die Erkrankung findet man überwiegend in wärmeren und tropischen/subtropischen Regionen (Nord- und Südamerika [z. B. Conti-Diaz, 1984], Asien, Afrika), wird aber auch gelegentlich, meist dann als „Import“ aus oben genannten Regionen, in Europa beobachtet [Gupta, 1997].



Abbildung 1.1:* Tinea nigra palmaris verursacht durch *Hortaea werneckii*

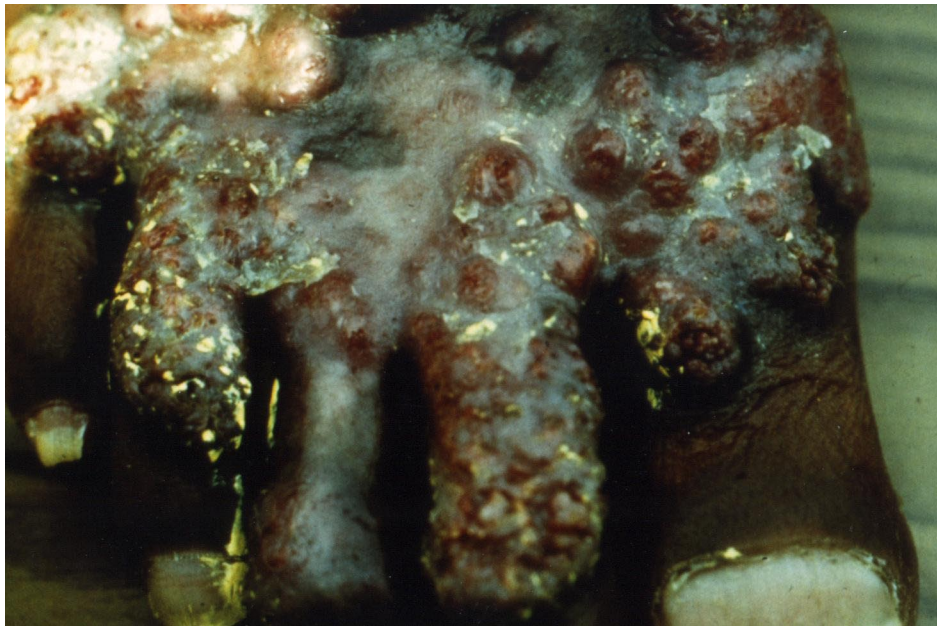


Abbildung 1.2:* Chromoblastomykose des Vorfußes verursacht durch *Phialophora verrucosa*

* Quelle Abb. 1.1 - 1.2: „Kaminiski’s teaching slides on Medical Mycology“, D. Ellis, Adelaide

1.3.2 Subkutane Mykosen

Bei den subkutanen Mykosen handelt es sich überwiegend um Verletzungsmykosen, die häufig an den unteren Extremitäten lokalisiert sind. Trotzdem können auch andere Körperregionen befallen sein, die nach erfolgtem Trauma eine Inokulation der Pilze begünstigen.

Die **Chromoblastomykose** ist eine chronische Pilzinfektion mit der Entwicklung von zunächst Papeln und Pusteln, bei weiterem Fortschreiten verruköse, trockene Hautveränderungen, die im Extremfall ganze Gliedmaßen, v. a. die unteren Extremitäten (klinisches Beispiel siehe Abbildung 1.2), befallen können [Elgart, 1996]. In der Regel ist die Infektion auf die Epidermis und das Korium begrenzt, in manchen Fällen tritt eine Spontanheilung ein, die atrophische Narben hinterlässt. Am Ort der Verletzung kommt es nach Inokulation der Pilze zu Mikroabszessen und einer Fremdkörper-Riesenzell-Reaktion. Histopathologisch finden sich charakteristische Sklerotial-zellen (sclerotic bodies), wobei die Erreger sich als rundliche, 5-12 µm große, dick- und dunkelwandige Zellen im Gewebe darstellen [Fader, 1988]. Eine Besonderheit dieser Pilzelemente ist eine mögliche Wandbildung als eine oder mehrere Längs- und Quersepten innerhalb der Zellen, auch als muriforme Zellen bezeichnet. Im Verlauf von Monaten und Jahren führt eine massive pseudoepitheliomatöse Hyperplasie zu hyperkeratotischen blumenkohlartigen Tumoren, die aufgrund ihres unscharf begrenzten Wachstums auch an einen langsam wachsenden Tumor anderer Genese denken lassen. Die Krankheit kommt weltweit vor (v. a. in den tropischen bzw. sub-tropischen Regionen Afrikas und Amerikas), tritt gelegentlich in Asien auf [Naka, 1986] und gilt in Europa als eine eher seltene Erkrankung [Mayser, 1996]. Betroffen sind in der Regel Männer aus ländlichen Gebieten. Therapeutisch kommt in der Frühphase die chirurgische Intervention in Frage [Naka, 1986], eine antimykotische Therapie mit Amphotericin B, Itraconazol und Flyctosin gilt als erfolgversprechend [Tintelnot, 1997].

Eine weitere chronische, pseudotumoröse und granulomatöse Infektion ist das **Myzetom** [Magana, 1989]. Die Krankheit wurde zum ersten Mal in der Gegend von Madura in Indien beschrieben und wird deshalb auch „Madurafuß“ genannt [Kwon-Chung, 1992]. Auch bei Hunden, Katzen, Kühen und Pferden ist dieses Krankheitsbild beschrieben worden [Matsumoto, 1991]. Eumyzetome werden durch Pilze verursacht, wohingegen Aktinomyzetome durch Bakterien ausgelöst werden [Kwon-Chung, 1992]. Neben dem Befall von Haut und subkutanem Fettgewebe dringt die Infektion im Laufe der Jahre immer tiefer ins Gewebe und kann sowohl Muskelgewebe als auch Knochen zerstören. Der progrediente Verlauf kann zu einer Osteitis führen und sogar eine Amputation der betroffenen Extremität notwendig machen. Diese vor allem auf tropische Regionen beschränkte Krankheit zeigt aufgrund des extrem langsamen

Wachstums nicht selten Verläufe über Jahrzehnte, insbesondere in Gegenden ohne oder nur mit geringer medizinischer Versorgung. Häufig findet man das Myzetom bei Arbeitern in der Landwirtschaft oder bei Waldarbeitern. Die Reaktion im menschlichen Körper ist bei den ätiologisch heterogenen Erregern ähnlich: Um die inokulierten Pilzzellen entsteht ein Abszess, in dem sich das Myzel in kleinen Granula (Grains) unterschiedlicher Konsistenz zusammenballt und in eine eosinophile Masse eingebettet ist. Aus für Myzetome charakteristischen Fistelgängen (klinisches Beispiel siehe Abbildung 1.3) entleert sich Eiter und seröses Sekret mit schwarzen, braunen, roten, gelben oder weißen Granula, je nach Pilzart. Chemotherapeutisch kommt u.a. Amphotericin B und Azolderivate (z. B. Miconazol) zum Einsatz [Venugopal, 1993], bei einer bakteriellen Erkrankung oder Mischinfektion Streptomycin, Cotrimoxazol und Rifampicin [Venugopal, 1993; Tintelnnot, 1997].

1.3.3 Organ- und Systemmykosen

Die Bezeichnung **Phaeohyphomykose** ist eigentlich ein Sammelbegriff und umfasst alle Mykosen, bei denen Erreger aus der Formfamilie der Dematiaceae im Gewebe dunkelwandige, septierte Myzelien ausbilden. Die für die Chromoblastomykose charakteristischen muriformen Zellen und Sklerotialzellen existieren bei der Phaeohyphomykose nicht [Fader, 1988]. Ebenso fehlen die für die Eumyzetome typischen Granula. McGinnis unterteilt Phaeohyphomykosen gemäß ihrer Lokalisation in oberflächliche, korneale, kutane, subkutane [Mirza, 1993] und systemische Phaeohyphomykosen [Hiruma, 1993] auf, wobei bei letzterer die Prognose z. T. infaust ist [Matsumoto, 1993; McGough, 1993]. Somit lassen sich systemische (disseminierte) Phaeohyphomykosen von Organ-Phaeohyphomykosen (z. B. pulmonale, zerebrale, gastro-intestinale u. a. Formen) differenzieren [Sudduth, 1992; Matsumoto, 1994]. Vorzugsweise sind ältere Erwachsene betroffen [Fader 1988], doch ist diese Form der Mykose auch schon bei einem Neugeborenen beschrieben worden [Bryan, 2000].

Eine allgemeingültige Therapieempfehlung gibt es zur Zeit nicht, doch gehört zur chirurgischen Behandlung (Resektion in toto), falls möglich, parallel eine längerfristige pharmakologische Therapie mit u. a. Itraconazol, Flucytosin oder Voriconazol [Schwinn, 1993; Whittle, 1995; Chuan, 1995; Tintelnnot, 1997; Li, 1999; Meletiadiis, 2000; Chua, 2001; Boisseau-Garsaud, 2002].

* Quelle Abb. 1.3 - 1.4: „Kaminiski’s teaching slides on Medical Mycology“, D. Ellis, Adelaide



Abbildung 1.3:* Myzetom mit typischen Fistelgängen im Sprunggelenkbereich, verursacht durch *Exophiala jeanselmei*



Abbildung 1.4:* Phaeohyphomykose des Gesichts, verursacht durch *Exophiala dermatitidis*

1.4 Schwärzepilze als Krankheitserreger

Im Folgenden soll eine ausführliche Literaturübersicht insbesondere über die in dieser Arbeit untersuchten Schwärzepilze gegeben werden.

1.4.1 *Exophiala jeanselmi*

Aus der Gattung *Exophiala* wird *Exophiala jeanselmi* am häufigsten als Erreger von Mykosen beim Menschen isoliert [Dixon, 1991]. Das Spektrum der durch diese Spezies ausgelösten Erkrankungen erstreckt sich von rein kutanen Mykosen [Hironaga, 1982; Padhye, 1987; Ronan, 1993; Hayashi, 1994] über kutan-subkutane [Monroe, 1981], rein subkutane Phaeohyphomykosen [Allred, 1990; Chuan, 1995] und dem Myzetom als häufigste klinische Erscheinung [Thammayya, 1980; Hemashettar, 1986]. Ferner wurde der Befall diverser Organe durch *E. jeanselmi* beobachtet, wie z. B. der Nebenhoden [Flynn, 1999].

Der Pilz wurde wiederholt als Verursacher einer Endophthalmitis isoliert. Nach einer perforierenden Augenverletzung mit einem Nagel erblindete der Patient auf dem betreffenden Auge [Hammer, 1983], in zwei weiteren Fällen wurde nach einer Kataraktoperation eine schwere Endophthalmitis beschrieben [Hofling-Lima, 1999].

Bei einem Mann saudiarabischer Herkunft führte ein pilzbedingter Hornhautabszess zur Entwicklung eines sekundären Glaukoms [Al-Hedaithy, 1993]. Die gleiche Spezies wurde auch mehrfach im Glaskörperinhalt des Auges nachgewiesen [Potel, 1984]. Darüber hinaus wurde *E. jeanselmi* als Kontaminante einer weichen Kontaktlinse ohne Übergriff auf das Auge isoliert [Hurtado, 1989]. Ein weiterer Patient erlitt nach einem Bagateltrauma durch eine Zwiebelscheibe eine durch *E. jeanselmi* verursachte Keratitis [Ben-Simon, 2002].

In drei Fällen war der Keim Erreger einer mykotischen Ösophagitis, bei zweien davon kam es zu einer Spontanheilung [Sautter, 1984]. Pepe und Vigolo gelang 1986 die erste Isolation von *E. jeanselmi* aus einem dentalen Granulom [Pepe, 1986]. In einem weiteren Fall war *E. jeanselmi* Erreger einer Arthritis und Endokarditis [Roncoroni, 1988]. Der Patient bekam wiederholt intraartikuläre Steroidinjektionen zur Behandlung einer chronischen Gonarthrit. Einige Jahre später wurde der Pilz bei der Autopsie sowohl in der Lunge als auch am Herzen entdeckt.

Ein anderer Patient konnte an einer durch *E. jeanselmi* verursachten Lungenentzündung erfolgreich mit Ketoconazol behandelt werden [Manian, 1993].

Bei einem weiteren Patienten mit Niereninsuffizienz kam es zu einer mykotischen Peritonitis durch *E. jeanselmi* [Kerr, 1983]. Der Pilz-Peritonitis war eine bakterielle Peritonitis mit nachfolgender Antibiotikabehandlung vorausgegangen. Trotz intravenöser und intraperitonealer antimykotischer Therapie starb der Patient. In einem zweiten Fall konnte die Pilz-Peritonitis als

Komplikation nach mehrjähriger ambulanter Peritonealdialyse (CAPD) bei einer jungen Frau erfolgreich therapiert werden [Agarwal, 1993]. Eine Pilz-Peritonitis ist nach langjähriger Peritonealdialyse keine Seltenheit [Remon, 1996].

Erstmalig wurde eine durch *E. jeanselmei* verursachte Onychomykose bei einem Mann nach Nierentransplantation beschrieben, die wirksam mit Itraconazol therapiert werden konnte [Boisseau-Garsaud, 2002]. In Brasilien ließ sich bei 19 Patienten mit einer Fungämie innerhalb weniger Monate *E. jeanselmei* isolieren. Als Ursache dieser nosokomialen Infektionen wurde kontaminiertes Trinkwasser bzw. destilliertes Wasser aus der Krankenhausapotheke gefunden [Nucci, 2002].

Wie aus den Beispielen ersichtlich, lagen in den meisten Fällen lokale und/oder systemische prädisponierende Faktoren vor. Zu den lokalen Faktoren zählen Verletzungen [Sindhuphak, 1985] einschließlich Splitterinokulationen [Iwatsu, 1984; Kawachi, 1995]. Als systemische Vorschädigungen sind zu nennen:

- Organtransplantation [Sudduth, 1992; Sabbaga, 1994; Kinkead, 1996; McCown, 1997; Satoris 1999; Chua, 2001; Liou, 2002]
- ein systemischer Lupus erythematoses [Chuan, 1995]
- Diabetes mellitus [Zackheim, 1985; Manian, 1993; Whittle, 1995]
- Kortikosteroidtherapie [Hachisuka, 1990; Schwinn, 1993; Ronan, 1993]
- Tuberkulose [Neumeister, 1995; Kim, 1998]
- HIV-Infektion [N'Doye, 1997]

Wie die meisten schwarzen Hefen, insbesondere die humanpathogenen, ist auch *Exophiala jeanselmei* in der Natur auf Pflanzenmaterial (Mais, Holz, Rinde, Vogelnester) zu finden [Dixon, 1980; Middelhoven, 1990]. In Japan wurde der Pilz aus Badewasser und Badewannenabflüssen isoliert [Nishimura, 1987], auch ließ er sich in verdorbenen Lebensmitteln nachweisen [Matsumoto, 1987]. Gelegentlich findet man den Erreger als Auslöser diverser Infektionen auch bei Tieren [Bostock, 1982; Vakili, 1993; Helms, 2000; Kano, 2000].

1.4.2 *Exophiala dermatitidis*

Die Art *Exophiala dermatitidis* soll vorab als ein Beispiel für die schwierige taxonomische Einordnung der schwarzen Hefen dienen. Wegen des oben beschriebenen Polymorphismus wurde der Typstamm *Exophiala dermatitidis* 1937 von Kano als *Hormiscium dermatitidis* beschrieben, 1950 von Carrion als *Fonsecaea dermatitidis*, 1954 von Conant als *Hormodendrum dermatitidis*, 1955 von Borelli als *Phialophora gougerotii*, 1958 von Hughes als *Torula dermatitidis*, 1962 von Cooke als *Aureobasidium*, 1963 von Emmons als *Phialophora dermatitidis* und 1968 von Schol-Schwarz als *Rhinocladiella mansonii* [Kwon-Chung, 1992]. 1977 beschrieb McGinnis diesen von Kano isolierten Stamm ATCC 34.100 als Typspezies einer neuen Gattung *Wangiella*, weil seine beobachtete Konidiogenese (phialidisch ohne Kragenbildung) keiner der bekannten Gattungen zuzuordnen war [McGinnis, 1977]. Noch im selben Jahr ordnete de Hoog diesen Stamm der 1967 neugeschaffenen Gattung *Exophiala* zu, da er bei dem Stamm CBS 207.35 eine, wenn auch reduzierte annelidische Konidiogenese beobachten konnte [de Hoog, 1977], die wenige Jahre später elektronenmikroskopisch verifiziert werden konnte [Nishimura, 1983]. In der Folgezeit gab es eine erhebliche Diskussion über die korrekte Einordnung dieses Pilzes, die bis heute anhält [z. B. de Hoog, 1995a; Untereiner, 1995; Haase, 1995 & 1999].

Als Umweltisolate konnte *E. dermatitidis* schon mehrmals aus Pflanzenmaterial [Kazanas, 1986; de Hoog 2000b] isoliert werden. In den USA wurde der Pilz bei der Untersuchung von Holz-, Pflanzen- und Erdbodenproben [Dixon, 1980] und in einer Probe aus einem Gewächshaus nachgewiesen [Espinell Ingroff, 1982]. Bei der Untersuchung von Erdbodenproben aus dem brasilianischen Regenwald wurde neben *Candida*-Spezies sieben „*Wangiella-dermatitidis*“-Isolate gefunden [Conti-Diaz, 1977]. Auch in Europa (Frankreich) konnte der Pilz von einem Buchsbaum isoliert werden [Listemann, 1986].

Exophiala-Spezies scheinen bevorzugt zu wachsen, wo erhöhte Elektrolytkonzentrationen vorliegen [de Hoog, 1993a & 2000b]. In Japan konnte u. a. *E. dermatitidis* in Badewasser, Abflüssen und auf einem Befeuchter gefunden werden [Nishimura, 1982 & 1987]. In Europa wurde der Pilz aus Badezimmern und Saunabereichen isoliert [Matos 2002].

Bei *E. dermatitidis* und anderen Spezies der schwarzen Hefen sind auch tierpathogene Eigenschaften beobachtet worden [Vakili, 1993]. Infektionen wurden bei Reptilien, Amphibien und Säugetieren entdeckt [Reiss, 1979; Mok, 1981; Muotoe-Okafor, 1993; Kano, 2000].

Das Spektrum der Erkrankungen des Menschen durch den ubiquitär vorkommenden Keim *E. dermatitidis* ist sicherlich einzigartig unter den dematiösen Pilzen. Als isolierter Keim in Abstrichen der Haut und Hornhaut offenbar gesunder Probanden [Mok, 1984; Dixon, 1984] liegt die Vermutung nahe, dass der Pilz zur transienten Flora der Haut (Kommensale?) gehören könnte.

Als Erreger einer oberflächlichen Infektion ist *E. dermatitidis* erstmals 1937 von Kano beschrieben worden [Kano, 1937]. Damals handelte es sich um eine Phaeohyphomykose im Gesichtsbereich bei einer sonst gesunden 28-jährigen Frau. Im Laufe der Jahre wurden weitere Phaeohyphomykosen der Haut dokumentiert [Greer, 1979; Hironaga, 1981; Scott, 1986; Crosby, 1989; Hata, 1999]. Die Mehrzahl der anfänglich beschriebenen Fälle stammte aus Japan oder aus dem südostasiatischen Raum (z. B. Korea [Matsumoto, 1990]) und zeigte meist keinerlei Hinweise opportunistische Pilzinfektionen begünstigende Faktoren wie z. B. Verletzungen oder sonstige systemische Erkrankungen. Erst 1983 wurde der erste Hautbefall in den USA beschrieben [Hohl, 1983] und betraf einen Patienten mit einer subkutanen Knieinfektion. Zusätzlich war er Diabetiker und zeigte eine gestörte T-Zell-funktion. Nicht zuletzt trat *E. dermatitidis* auch bei Onychomykosen auf [Matsumoto, 1992] und wurde als Verursacher einer Otitis externa isoliert [Kerkmann, 1999].

Oberflächliche mykotische Keratosen wurden in der Folgezeit neben den Hautinfektionen berichtet. Bei einem an Morbus Recklinghausen leidenden Patienten konnte in einem Kornealabszess „*Wangiella dermatitidis*“ nachgewiesen werden [Pospisil, 1990a]. Ebenfalls verursachte der gleiche Stamm eine Keratitis bei einem Patienten drei Wochen nach einer erfolgreich durchgeführten Keratoplastik, während dieser mit Kortison behandelt wurde [Levenson, 1984]. In Frankreich ist unlängst erstmalig eine intraokulare Infektion mit *E. dermatitidis* nach sekundärer Hornhauttransplantation beschrieben worden [Benaoudia, 1999]. Eine postoperative Endophthalmitis führte bei einer älteren Frau, die an Diabetes mellitus litt und lokale Kortikosteroide benutzte, zu einer Enukleation des betroffenen Auges [Margo, 1990]. Im Tierexperiment tendierte der Krankheitsprozess nach Inokulation der Erreger in die Vorderkammer und in den Glaskörper von Kaninchenaugen zur Spontanheilung [Pospisil, 1990b].

Bis 1984 wurden 10 Fälle von systemischer Phaeohyphomykose beschrieben, in denen die Infektion mit *E. dermatitidis* als gesichert angesehen wird [Matsumoto, 1984]. Seitdem wurden weitere systemische Infektionen mit diesem Pilz bekannt [Cucé, 1986]. 1993 veröffentlichte der gleiche Autor eine Beschreibung von 37 Fällen mit Phaeohyphomykosen, die durch *E. dermatitidis* verursacht waren [Matsumoto, 1993]. Neben drei oberflächlichen und 17 kutanen

Phaeohyphomykosen konnten 17 systemische Verläufe mit unterschiedlicher Organbeteiligung beschrieben werden. Insgesamt verliefen 12 der 37 Fälle letal, was einer Mortalität von 32 % entspricht.

Erstmals wurde 1971 *E. dermatitidis* als Erreger einer Endokarditis isoliert [Engelman, 1971]. Es wurden weitere Berichte von einer letal verlaufenden Endokarditis mit Keimabsiedlung in die Wirbelsäule bei einem drogenabhängigen Patienten [Vartian, 1985] sowie von einer ebenfalls letalen Infektion einer künstlichen Aortenklappe [Ventin, 1987] publiziert.

Weitere Manifestationsorte von *E. dermatitidis*-Infektionen sind durch invasive Maßnahmen wie zentrale Venenkatheter [Blaschke Hellmessen, 1994; Simpson, 1995; Nachman, 1996], einem implantierten Katheter (Port-a-cath) als Injektionsort für Chemotherapeutika bei einem an Leukämie leidenden Jungen [Kabel, 1994], eine Peritonitis aufgrund langjähriger Peritonealdialyse (CAPD) [Lye, 1993; Vlassopoulos, 2001] oder als Folge einer intraartikulären Injektion von Steroiden [Woollons, 1996] beschrieben worden. In Blutkulturen wurde der Pilz mehrfach bei einem hospitalisierten Kind in Frankreich nachgewiesen [Moissenet, 1995].

Die Isolation von *E. dermatitidis* aus Probenmaterial des Respirationstraktes wird in den letzten Jahren gehäuft beobachtet und lässt vermuten, dass neben einer traumatischen Inokulation dieser Pilz auch auf aerogenem Wege in den Menschen gelangen kann. So beschrieb Barenfanger eine Phaeohyphomykose der Lunge, die mit rezidivierenden Hämoptysen und Verschattungen auf der Lunge einherging und erfolgreich therapiert werden konnte [Barenfanger, 1989]. Besonders Patienten mit zystischer Fibrose (CF = cystic fibrosis) scheinen durch ihr chronisches Leiden für den Befall mit *E. dermatitidis* prädisponiert zu sein [Haase, 1990 & 1991; Kusenbach, 1992; Günther, 1994; Rath, 1997]. Es gab sowohl Patienten mit klinischen Zeichen einer Pilzpneumonie [Diemert, 2001] und andere, die trotz Befall keine ausgeprägte Symptomatik zeigten [Blaschke Hellmessen, 1994; Benett, 1997]. Die Besiedlung der Lunge von CF-Patienten mit *E. dermatitidis* ist vielleicht dadurch möglich, dass die Pilze erhöhte Chloridgehalte tolerieren, die durch einen gestörten Elektrolyttransport bei dieser erblichen Erkrankung zustande kommen [de Hoog, 1993b].

Als letzte Gruppe der systemischen Phaeohyphomykosen sind die Infektionen des zentralen Nervensystems, die zwar relativ selten, wegen ihrer hohen Mortalität aber besonders schwerwiegend sind. Der ausgeprägte Neurotropismus von *E. dermatitidis* führt zu der hohen Pathogenität dieser Spezies und ist somit als Virulenzfaktor zu betrachten. De Hoog sieht eine mögliche Erklärung hierfür in dem Bedarf von *E. dermatitidis* an freiem Eisen, welches im Gehirn gegenüber dem im Serum leicht erhöht ist [de Hoog, 1993b]. Tierexperimentelle

Untersuchungen an Mäusen haben die Pathogenität von *E. dermatitidis* näher untersucht. [Polak, 1984]. Nach der intravenösen Injektion einer Pilzsuspension zeigten die Mäuse neben einer hohen Sterblichkeit histologisch granulomatöse Entzündungen und Abszesse mit reichlich Pilzhypen im Gehirn. Ebenfalls am Tiermodell wurde das zellwandgebundene Melanin als Pathogenitätsfaktor bei *E. dermatitidis* untersucht. Hierzu durchgeführte vergleichende Pathogenitätsuntersuchungen des Wildtyps und der melanin-negativen Mutante (mel-) zeigten keine Differenz der Stämme hinsichtlich der Pathogenität. Die melaninproduzierenden Stämme führten allerdings häufiger zu letalen Infektionen, was auf eine größere Virulenz dieser Stämme hindeutet [Dixon, 1987 & 1989 & 1992; Polak, 1990; Feng, 2001]. Dagegen scheint das Vorhandensein des Melanins keinen nennenswerten Einfluss auf die Wirksamkeit von Antimykotika zu haben [Polak, 1989].

Der Befall des zentralen Nervensystems beim Menschen wurde in den letzten Jahren mehrfach beobachtet [Dixon, 1987; Tintelnot, 1991a; Kenney, 1992; Hiruma, 1993; Ajanee, 1996; Horr , 1999; Chang, 2000] und bestätigt damit den ausgeprägten Neurotropismus dieses Erregers. Bislang sind nur wenige Arten mit zerebraler Beteiligung bekannt, neben *E. dermatitidis* zählen dazu u. a. *Cladophialophora bantiana* [Horr , 1999].

1.4.3 *Hortaea werneckii*

Als häufigster Erreger der Tinea nigra [Gupta, 1997] findet man *Hortaea werneckii*  berwiegend in tropischen oder subtropischen Regionen [Severo, 1994]. Aufgrund seiner morphologischen Variabilität [Hardcastle, 1974; Standard, 1988] existieren auch für diesen Pilz eine Fülle an Synonymen (*Cladosporium werneckii*, *Cryptococcus metaniger*, *Cladosporium metaniger*, *Dematium werneckii*, *Pullularia werneckii*, *Aureobasidium mansonii*, *Sarcinomyces crustaceus*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Exophiala werneckii*) [Mittag, 1993]. *H. werneckii* wächst nicht bei 37 C und ist auffallend osmo- [Kane, 1987; Göttlich, 1995] und halotolerant [Zalar, 1999]. Ihre Salzresistenz sowie die Thermolabilität erklärt das Vorkommen auf verschwitzten Händen [de Hoog, 1997] und luftgetrocknetem Salzwasserfisch [Mok, 1982]. Als Hautkommensale haftet *H. werneckii* durch hydrophobe Wechselwirkungen an der menschlichen Haut und assimiliert deren Exkretionsprodukte [Göttlich, 1995]. Neben der Besiedelung menschlicher Haut ohne Auftreten einer Infektion [Mok, 1982] gilt *H. werneckii* als Verursacher von rein oberflächlichen Mykosen [Marks, 1980], meist als Tinea nigra, wohingegen der Erreger bis heute nicht als Auslöser systemischer oder subkutaner Mykosen beschrieben worden ist.

1.4.4 *Exophiala mesophila*

Das Typus-Isolat von *Exophiala mesophila* ist ein Umweltisolat und wurde in Hamburg aus den Silikonfugen eines Duschraums isoliert [Listemann, 1996]. Bisher wurde diese Spezies nicht als Auslöser einer menschlichen Mykose beschrieben.

1.4.5 *Exophiala bergeri*

Der hier untersuchte Stamm *Exophiala bergeri* wurde bei einem Mann in den USA aus einer subkutanen Zyste isoliert [Young, 1953], gilt aber insgesamt als ein eher seltener Vertreter innerhalb der Schwärzepilze hinsichtlich opportunistischer Pilzinfektionen beim Menschen [Haase, 1999]. Ebenfalls als Verursacher einer mykotischen Zyste wurde dieser Pilz bei Patienten in Senegal (1 Patient) und Madagaskar (2 Patienten) identifiziert [Ravisse, 1981].

1.4.6 *Exophiala castellanii*

Seit seiner Erstbeschreibung im Jahre 1905 von Castellani [Castellani, 1905] wurde die Pathogenität von *Exophiala castellanii* im Zusammenhang subkutaner und systemischer Phaeohyphomykosen wiederholt beschrieben [Listemann, 1986; McGough, 1993]. Bei einer immunkomprimierten Patientin wurde vier Jahre nach einer Nierentransplantation der Pilz einmalig als Erreger einer Tenosynovitis isoliert [Collée, 1988]. Im Anschluss an eine Herzoperation und mehreren post-operativen Komplikationen entwickelte ein anderer Patient ein ischämisch bedingtes Gangrän am rechten Bein, aus dem *E. castellanii* nachgewiesen werden konnte. Kardiologische Auffälligkeiten zeigte ein weiterer Patient mit einer mykotischen Endokarditis, die durch den gleichen Pilz verursacht wurde und durch eine kombinierte chirurgische und antimykotische Intervention therapiert werden konnte [Gold, 1994]. Möglicherweise zeigt dieser Keim eine enge Verwandtschaft zu *Exophiala jeanselmei* [Rossmann, 1996], ist aber im Vergleich dazu eher noch seltener Verursacher einer Phaeohyphomykose [Haase, 1996b].

1.4.7 *Phaeoannellomyces elegans*

Dieser Pilz ist durch eine überwiegende annellidische Konidienbildung charakterisiert und ist bisher klinisch nur selten in Erscheinung getreten. Im Jahr 1986 wurde er bei einem 81-jährigen ehe-maligen Landarbeiter aus einer subkutanen phaeomykotischen Zyste am Finger isoliert [Engleberg, 1987]. Nach einer Einteilung von McGinnis und Schell zeigt dieser Keim morphologische Ähnlichkeiten zu *Hortaea werneckii* [McGinnis, 1985], kann aber auch nach den Untersuchungen in dem oben geschilderten Fall leicht mit anderen *Exophiala* Spezies (v. a. *Exophiala lecanii-corni*) verwechselt werden. Bei dem hier untersuchten Pilz handelt es sich um ein Isolat aus einer Onychomykose [McGinnis, 1985].

1.4.8 Sonstige Isolate, die nicht zu den Schwärzepilzen zählen

Zur Erweiterung des mikrobiellen Spektrums wurden zwei weitere unpigmentierte Pilze mit in die Studie aufgenommen, die schon in mehreren durchflusszytometrischen Untersuchungen im Hinblick auf ihre Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und andere phagozytierende Zellen untersucht wurden [Derer, 1983; Wilson, 1985; Hed, 1987; Buschmann, 1989; Martin, 1991; Saresella, 1997; Peltroche-Llacsahuanga, 2000a].

Saccharomyces cerevisiae ist eine in der Lebensmittelindustrie häufig eingesetzte Hefe in Form der Bierbrauer-, Wein- und Bäckerhefe. Folglich hat der Mensch praktisch täglich Kontakt mit diesem Pilz und seinen verschiedenen Bioaren, die in ihrer medizinischen Bedeutung als weitgehend apathogen eingestuft werden können. Gelegentlich wird dieser Pilz als Erreger einer Vaginalmykose isoliert [Kwon-Chung, 1992]. Taxonomisch unterscheidet sich *S. cerevisiae* von den anderen Pilzen dieser Studie dahingehend, dass sie den echten oder ascogenen Hefen (Hemiascomyceten) zugerechnet wird.

Ein weiterer Vertreter der Fungi imperfecti ist *Candida albicans* und wurde ebenfalls als ein fakultativ pathogener Keim in dieser Arbeit berücksichtigt. Dieser in der Medizin sicherlich relevanteste Pilz kommt einerseits saprophytär im menschlichen Körper vor (z. B. im Verdauungstrakt), andererseits kann er bei prädisponierenden Faktoren wie schwere Allgemeinerkrankungen (Tumor, AIDS) oder Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus) von rein oberflächlichen Hautkandidosen bis hin zu systemischen Infektionen führen [Kwon-Chung, 1992].

1.5 Pilzinfektionen und die Reaktion des Immunsystems

1.5.1 Allgemeines

Das menschliche Immunsystem dient der Erkennung und häufig erfolgreichen Abwehr von humanpathogenen Mikroorganismen [Benhaim, 1992]. Neben Bakterien, Viren, Protozoen und Würmern sind nicht zuletzt auch Pilze für Erkrankungen des Menschen verantwortlich. Von den ubiquitär vorkommenden Pilze (ca. 100.000 Pilzarten!!) [Levitz, 1992]) gehören dazu nur wenige Arten.

Dem menschlichen Organismus stehen im Wesentlichen zwei Komponenten der Infektionsabwehr zur Verfügung. Unspezifische Abwehrmechanismen wie z. B. eine intakte (Schleim-)Haut oder phagozytierende Leukozyten (Granulozyten, Makrophagen), die eine angeborene Resistenz gegen viele Mikroorganismen ermöglichen, werden durch spezifische Abwehrmechanismen ergänzt. Dazu gehören u. a. Antikörper-bildende Plasmazellen und

zytotoxische Lymphozyten, die aber erst im Laufe des Lebens nach Kontakt mit einem Erreger für eine spezifische Immunität gegen diesen sorgen. Die folgende Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über wichtige spezifische und unspezifische Mechanismen der Immunität und ihre Bedeutung für die antimikrobielle Infektabwehr [Kaufmann, 1989a; Gemsa, 1997].

Tabelle 1.2: Immunologische Abwehrmechanismen und ihre Bedeutung

System	Funktion
A) Unspezifisch	
Mechanische Faktoren (z. B. Haut und Schleimhaut, Peristaltik im Darm- und Urogenitaltrakt, Ziliarbewegung des Flimmerepithels etc.)	Schutz vor Adhärenz und Invasion
Komplement-Faktoren	Keimabtötung, Opsonierung
Phagozyten (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen)	Phagozytose, Keimabtötung, Antigenpräsentation
B) Spezifisch	
B-Zellen	Antikörpersynthese
T-Zellen	u. a. zytolytische Funktionen

Alle in der Tabelle 1.2 angeführten Abwehrmechanismen lassen sich auch bei der Abwehr von Pilzinfektionen finden [Murphy, 1990]. Eine gute Zusammenfassung speziell der humanen Abwehrmechanismen gegen mykotische Erreger gibt Levitz in seinem Übersichtsartikel [Levitz, 1992]. Demnach wird der Phagozytose eine wesentliche Funktion bei der Abwehr von Pilz-erkrankungen zugeschrieben, doch zeigen neuere Erkenntnisse auch eine direkte antimikrobielle Beteiligung der T-Lymphozyten [Levitz, 1995b]. Humane periphe T-Helferzellen (CD4) können in vitro direkt das Wachstum von *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* deutlich inhibieren [Murphy, 1993; Levitz, 1995a]. Ob T-Helferzellen aber auch bei anderen Pilzspezies eine mögliche antimykotische Rolle spielen, muss noch geklärt werden. Erst kürzlich identifizierten Forsyth und Mathews den Mac-1-Rezeptor (CD18/11b) auf Lymphozyten als wesentliches Adhäsionsmolekül für Hyphen von *Candida albicans* [Forsyth, 2002].

1.5.2 Phagozytose

Die Phagozytose und Abtötung von in den menschlichen Organismus eingedrungenen Krankheitserregern stellt einen ersten und entscheidenden Schritt der Infektabwehr gegen Bakterien, Pilze und Protozoen dar [Kaufmann, 1989b]. Die Keimaufnahme obliegt einer Gruppe spezialisierter Wirtszellen, die auch als „professionelle“ Phagozyten bezeichnet werden. Hierzu zählen die polymorphkernigen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie die als mononukleären Phagozyten zusammengefassten Monozyten und Gewebsmakrophagen.

Tabelle 1.3: Durchschnittliche Größe und Häufigkeit der Leukozyten im peripheren Blut

Zelltyp	%-Anteil der Leukozytensubpopulation	Zellgröße (μm)	Anzahl pro μl /Blut
Granulozyten			
• neutrophile	50-75	12	1800-7500
• eosinophile	2-4	> 12	0-700
• basophile	0-1	10	0-150
Monozyten	2-6	12-20	100-1000
Lymphozyten	25-40	6-8	1500-4000

(Entnommen: Junqueira & Carneiro, 1991. Histologie. Springer-Lehrbuch, Berlin/Heidelberg)

Gelingt Bakterien oder Pilzen eine Kolonisation und anschließende Invasion in den Wirtsorganismus, kommt der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten die größte Bedeutung zu [Levitz, 1992; Stickle, 1996]. Diese Population der Leukozyten ist zahlenmäßig die größte im peripheren Blut (Tabelle 1.3) und auch die zuerst angetroffene am Ort einer akuten Infektion. Sie sind sehr kurzlebig (programmierter Zelltod [= Apoptose] nach 2-3 Tagen [Whyte, 1993]) und sterben nach Aufnahme und Abtöten der pathogenen Mikroorganismen ab.

Charakteristisch für phagozytierende Zellen ist die Fähigkeit der Migration in das extravasale Gewebe [Patarroyo, 1991; Patarroyo, 1994; Yan, 1997]. Dieser Vorgang verläuft in mehreren Stadien:

- Adhäsion am Gefäßendothel [Etzioni, 1999]
- Diapedese in den Extravasalraum [Devreotes, 1988; Sixt, 2001]

- Chemotaxis, ein gerichtetes „Anlocken“ der Phagozyten zum Ort der Infektion bzw. des Gewebeschadens [Springer, 1994; Harler, 1999; Wang, 2002]
- Adhäsion und intrazelluläre Aufnahme des Erregers in den Phagozyten [Berón, 1995]
- intrazelluläres Abtöten des Erregers im Phagolysosom (Killing) [Kagan, 1994]

Die letzten beiden Schritte beschreiben im eigentlichen Sinn den Vorgang der Phagozytose. Zunächst erfolgt eine Adhäsion des Granulozyten an die als fremd erkannte Zelle. Mittels Opsonierung (Coating) der zu phagozytierenden Zelle kann die Bindungsrate an den Granulozyten deutlich gesteigert werden. Bei der Opsonierung lagern sich aktive Komplementfaktoren und/oder Antikörper an die Oberfläche des Pathogens an. Im Falle einer Pilzinfektion erfolgt die Opsonierung primär durch Proteine des Komplementsystems, insbesondere durch das Protein C3 [Deepe, 1990; Levitz, 1992]. Im weiteren Verlauf formieren sich die Aktinfilamente des Granulozyten zu Pseudopodien, welche die fremde Zelle umschließen [Roos, 1991].

Liegt der Pilz in Form invasiver Hyphen vor, gelingt dies nicht. Dann müssen sich mehrere Granulozyten oder die großen Makrophagen an der Inkorporation beteiligen. Teilweise kommt es dabei im extrazellulären Raum zur Bildung zytotoxischer Substanzen durch die Phagozyten. Dies trägt zwar zur Abtötung des Pathogens bei, gleichzeitig wird aber auch körpereigenes Gewebe geschädigt. Das Vorliegen der Hyphen stellt damit einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar, da es neben einer verminderten Phagozytoserate auch noch zu einem lokalen Gewebeschaden führt [Levitz, 1992; Dixon 1992].

Im Falle einer erfolgreichen Phagozytose wird die als fremd erkannte Zelle von der Plasmamembran des Granulozyten vollkommen eingeschlossen und in einer Vakuole, dem sogenannten Phagosom, vom Zytoplasma abgetrennt (Kompartimentierung). Hier beginnt bereits das Abtöten der Keime (Killing) durch das Zusammenwirken verschiedener intragranulozytärer Mechanismen. Einerseits verfügen die Granulozyten über ein Arsenal von Enzymen, z. B. Proteasen, saure Hydrolasen, Defensine [Kagan, 1994] etc., welche auch ohne Sauerstoffverbrauch zur Abtötung beitragen. Auf der anderen Seite führen sauerstoffabhängige Mechanismen (oxidativer Burst) zur Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale [Roos, 1991] wie zum Beispiel Superoxidanion, welches ebenfalls mikrobizide Effekte zeigt, oder zur Bildung von Wasserstoffsuperoxid [Morel, 1991; Miller, 1997].

Bei beiden Mechanismen kommt es zum Prozess der Degranulation, in dem die intrazellulären Granula des neutrophilen Granulozyten mit der Phagosomenmembran verschmelzen und ihren Inhalt in den Raum zwischen Pathogen und der ihn umgebenden Membran entlassen (= Phago-

lysosombildung) [Berón, 1995]. Eine erfolgreiche Phagozytose endet mit dem Tod der pathogenen Zelle und konsekutiv dem Untergang des Phagozyten (= Granulozyten).

1.5.3 Zellmembranrezeptoren und Adhäsionsmoleküle

Leukozyten lassen sich aufgrund ihrer morphologischen Heterogenität (Größe, Granularität, Kern-Plasma-Relation etc.) lichtmikroskopisch gut voneinander abgrenzen (s. Tabelle 1.3). Die Verfügbarkeit einer ständig steigenden Zahl monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Moleküle auf der Membranoberfläche von Leukozyten führte konsekutiv zu einer subtileren Charakterisierung und Differenzierung dieser Zellen. Die Bezeichnung CD (cluster of differentiation) bezieht sich auf Gruppen oder Cluster von monoklonalen Antikörpern, wobei jeder Cluster ganz spezifisch einen Zellmarker bindet. Für alle bereits identifizierten Zelloberflächenmoleküle, auch „Marker“ genannt, wurde eine systematische Nomenklatur entwickelt, das CD-System, in welchem die Marker fortlaufend als CD1, CD2 usw. nummeriert werden.

Eine wichtige Gruppe von Zellmembranmolekülen ist die Familie der **Integrine**, eine Reihe nichtkovalent gebundener, heterodimerer Zelloberflächenrezeptoren, die für die Zelladhäsion verantwortlich gemacht werden [Arnaout, 1992; Hynes, 1992; Hogg, 1993; Etzioni, 1999; Schnitzler 1999b]. Neben dem Vorkommen auf Blutzellen können sie auch auf extrazellulärer Matrix lokalisiert werden und spielen dadurch eine zentrale Rolle in einem breiten Spektrum physiologischer und pathologischer Vorgänge, die auf der Bildung, Aufrechterhaltung oder Auflösung adhäsiver Kontakte beruhen [Springer, 1990; Yong, 1990].

Die Leukozytenadhäsion ist eine essentielle Funktion für die Aggregationen an Gefäßendothelien, Chemotaxis, Zytotoxizität, Lymphozytenproliferation und der Phagozytose [Root, 1989; Gahmberg, 1992; Harler, 1999]. Neben dem physiologischen Vorkommen der Adhäsionsmoleküle findet man eine abnorme Expression dieser Moleküle bei einigen malignen Erkrankungen [Kimby, 1994].

Bei der Phagozytose von Pilzen scheint wesentlich eine weitere Untergruppe der Integrine beteiligt zu sein [Bullock, 1987; Hazen, 1995; Forsyth, 1996; Etzioni, 1999], auch als **β -Integrine** bezeichnet. Diese transmembranösen Proteine bestehen aus einer nichtkovalenten assoziierten großen α -Einheit und einer kleineren β -Untereinheit. Bisher sind drei Rezeptoren dieser Gruppe beim Menschen charakterisiert worden [Dib, 2000].

Die Tabelle 1.4 fasst die wesentlichen Merkmale der β_2 -Integrine zusammen hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus, ihrer Größe und Lokalisation sowie bisher erkannten Funktionen [modifiziert nach Valmu, 1991; Ross, 1993; Etzioni, 1999; Schnitzler, 1999b].

Tabelle 1.4: Molekulare Größe, Vorkommen und Funktion von β_2 -Integrinen

CD	Synonym	α -Einheit (Größe)	β -Einheit (Größe)	Vorkommen	Funktion
CD18/11a	LFA-1*	CD11a (180 KD)	CD18 (95 KD)	Lymphozyten, Phagozyten u. a.	Zelladhäsion Aktivierung der Phagozytose
CD18/11b	Mac-1 ** (CR3)	CD11b (165 KD)	CD18 (95 KD)	Granulozyten, Monozyten u. a.	Opsonisierung, Phagozytose, C3b-Rezeptor
CD18/11c	p150/95 (CR4)	CD11c (150 KD)	CD18 (95 KD)	Makrophagen, Granulozyten u. a.	Opsonisierung C3b-Rezeptor
* Lymphocyte function associated antigen 1				** Macrophage antigen complex 1	

Da β_2 -Integrine nur von Leukozyten exprimiert werden, hat man diese Gruppe der Integrine auch kollektiv unter dem Namen Leukozyten-Integrine zusammengefasst. In der Regel befinden sich diese leukozytenspezifischen Moleküle auf der Oberfläche der weißen Blutzellen. Eine Ausnahme bilden die neutrophilen Granulozyten, die einen Großteil dieser Moleküle in intrazellulären zytoplasmatischen Granula speichert und sie erst nach Aktivierung an die Zelloberfläche transloziert [Gahmberg, 1992]. In vitro lässt sich eine erhöhte Expression der Integrine durch Phorbol ester erzeugen, aber auch physiologisch vorkommende Zytokine wie γ -Interferon, GM-CSF und G-CSF führen zu diesem Effekt [Yong, 1990]. Kürzlich konnten Schnitzler et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen 1 = CD18/11a) zu einer verstärkten und aktivierten Phagozytose von *Streptococcus pyogenes* durch Erhöhung der Mac-1-Expression (= CD18/11b) führt [Schnitzler, 1999b].

1.5.4 Defekte phagozytierender Zellen

Qualitative Defekte professioneller Phagozyten sind eine extrem seltene Erscheinung [Stickle, 1996]. Eine davon ist erstmalig zu Beginn der achtziger Jahre beschrieben worden. Diese betrifft die Leukozytenadhäsion und äußert sich in partiell oder komplett vererbten Defizienzen der Zelloberflächenexpression von CD18 und CD11a-c, die in einer Migrationsunfähigkeit der Granulozyten und damit in rezidivierenden, meist bakteriellen Infektionen resultieren [Majima, 1990; Gresham, 1991]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden die ersten Hinweise über eine Beteiligung der β_2 -Integrine an der adhäsionsabhängigen Stimulierung von Granulozyten bei betroffenen Patienten entdeckt.

Der **Typ I** dieses inzwischen gut untersuchten Krankheitsbildes, auch **Leukozytenadhärenz-Proteindefekt (LAD)** genannt, manifestiert sich klinisch mit folgenden Symptomen: verzögertes Abfallen der Nabelschnur, Omphalitis, periumbilikale zystische Pseudomonasinfekte, Sepsis, Leukozytose, Unfähigkeit zur Eiterbildung [Gemsa, 1997]. Der derzeit einzige kurative Ansatz bei der Behandlung von LAD ist eine frühzeitige Knochenmarktransplantation, da sonst die betroffenen Kinder schon in den ersten Lebensjahren an einer Infektion versterben. Diese autosomal rezessiv vererbte Krankheit ist durch einen Defekt in dem Gen für die Kodierung der gemeinsamen β -Untereinheit (= CD18) charakterisiert und führt, bedingt durch die mangelhafte Expression aller drei Integrine, auch zu einer hochgradigen Störung der Phagozytose [Lopez Rodriguez, 1993]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben einer mangelnden Expression der Integrine es auch Patienten gab, bei denen trotz einer ausreichenden Expression eine deutliche Funktionseinschränkung der Integrine beobachtet wurde [Hogg, 1999; Shaw, 2001].

Kürzlich wurde noch ein weiterer Leukozytenadhärenz-Proteindefekt **Typ II** beschrieben. Kinder mit diesem Proteindefekt fallen neben einer erhöhten Infektanfälligkeit noch zusätzlich durch eine mentale Retardierung auf [Gemsa, 1997]. Bunting et al. konnten zeigen, daß bei diesem Typ sowohl Expression als auch Funktion der Integrine nicht pathologisch verändert sind [Bunting, 2002], jedoch der molekulare Aufbau der Selectinliganden.

Weiterhin gibt es andere seltene immunologische Defektsyndrome, bei denen primär weniger der Vorgang der Phagozytose gestört ist als das intrazelluläre Abtöten (Killing) der Krankheitserreger [Gemsa, 1997]. Dazu gehören:

- Infantile septische Granulomatose
- Chediak-Higashi-Syndrom
- Hereditärer Myeloperoxidasedefekt

1.6 Fragestellung

Die Phagozytose von pathogenen Pilzen ist bisher weitestgehend exemplarisch an den bekannten Pathogenen *Aspergillus fumigatus* [Schaffner, 1986]; *Blastomyces dermatitidis* [Sixbey, 1979]; *Candida albicans* [Diamond, 1993; Peltroche-Llacsahuanga, 2000a], *Cryptococcus neoformans* [Kozel, 1993; Chaka 1995] und *Histoplasma capsulatum* [Bullock, 1987 & 1993; Brummer, 1991] untersucht worden. Nach den bisherigen Erkenntnissen sind (neutrophile) Granulozyten die wesentlichen primären Effektorzellen in der Abwehr von Pilzinfektionen. Über einen Einfluß der β_2 -Integrine auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten gegenüber Sprosspilzen konnte bislang nur spekuliert werden. Die wenigen Erkenntnisse über die granulozytären Rezeptoren, die an der Phagozytose der Pilze beteiligt sind, fokussieren dabei auf den Komplementrezeptor Mac-1 (CD18/11b) als wesentlichen Rezeptor für die Bindung von *Histoplasma capsulatum* [Bullock, 1987 & 1993] und *Candida albicans* [Forsyth, 1996 & 2000] mit nachfolgender Phagozytose.

Innerhalb der Schwärzepilze wurden solche Untersuchungen mit Ausnahme von *Exophiala dermatitidis* [u. a. Schnitzler, 1999a] bisher nicht durchgeführt. Wie bereits weiter oben angeführt, zeigt diese Pilzgruppe ein im Reich der Pilze einmaliges und extrem breites Spektrum von Wirt/Keim-Interaktionen. Dieses erstreckt sich über rein oberflächliche Hauterkrankungen bis hin zu schwersten, teilweise letal verlaufenden Erkrankungen. Andererseits findet man die ubiquitär vorkommenden Schwärzepilze gelegentlich als transiente Keime (Kommensalen?) des Menschen mit zu postulierenden, häufigen Kontakten ohne Erkrankung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die vergleichende Untersuchung der Interaktion (= Phagozytose) verschiedener schwarzer Hefen mit humanen Granulozyten im heparinisierten Vollblut mittels Durchflusszytometrie. Dabei interessierte insbesondere eine mögliche Korrelation zwischen Phagozytoseausmaß und Pathogenität der einzelnen Isolate sowie, bei nachweisbarer Phagozytose, die granulozytären Rezeptoren für diese Pilze .

In Tabelle 1.5 wird der Versuch unternommen, die untersuchten Isolate nach steigender Pathogenität zu ordnen. Die teilweise subjektive Abschätzung der Pathogenität, also der Fähigkeit Krankheit hervorzurufen, orientierte sich zum einen an für den jeweiligen Keim typische Erkrankungen als auch an der Häufigkeit der in der Literatur beschriebenen Fälle (= Frequenz/ Häufigkeit).

Tabelle 1.5: Untersuchte Isolate: Vorkommen - Klinik - Pathogenität

Spezies	GHP Nr. *	Vorkommen / typische Erkrankungen	Frequenz Häufigkeit	Pathogenität
<i>S. cerevisiae</i>	983	Lebensmittel	äußerst gering	- (?)
<i>E. mesophila</i>	968	Umweltisolat	bisher nicht	- (?)
<i>H. werneckii</i>	47	Tinea nigra	gelegentlich	+
<i>P. elegans</i>	108	Onychomykose / subkutane Phaeohyphomykose	sehr selten	++
<i>E. bergeri</i>	959	subkutane Zyste	sehr selten	++
<i>E. castellanii</i>	34	Phaeohyphomykose	sehr selten	+++
<i>E. jeanselmei</i>	916	Myzetom, Phaeohyphomykose	gelegentlich	+++
<i>E. dermatitidis</i>	195	Phaeohyphomykose	gelegentlich	++++
<i>C. albicans</i>	869	oberflächliche/ systemische Mykosen	häufig	++++(+)

* Pilzstammsammlungsnummer, Labor Haase, Institut für Medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte Pilzarten

Bei den neun in dieser Arbeit untersuchten Pilzen handelt es sich in erster Linie um in der Regel gut beschriebene ex Typus- bzw. Referenzstämme (Tabelle 2.1). Diese wurden aus den Stammsammlungen des CBS (Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande), der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA) und der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen und in die Pilzstammsammlung (GHP) des Institutes für Medizinische Mikrobiologie (RWTH Aachen) aufgenommen (siehe Tabelle 1.5).

Andere typische Schwärzepilze mit klinischer Relevanz wie *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium mackenziei* oder *Cladophialophora trichoides* konnten wegen insuffizienter Anfärbung mit BCECF-AM und/oder einer nicht in der Hefephase vorliegenden Wachstumsform, auch nach mehrfachen, unterschiedlichen Kultivierungstechniken, nicht in die Studie aufgenommen werden.

Tabelle 2.1: Alphabetische Liste der untersuchten Stämme mit zur Zeit gültiger Nomenklatur (entsprechend dem CBS Katalog im Internet [URL: <http://www.cbs.knaw.nl>], Stand 12/2002). Soweit die Informationen zugänglich waren, ist der Name des Erstisolierers, des Isolationsortes, des Datums der Isolation und das Substrat, von dem der Pilz isoliert wurde, angegeben. Falls es sich um ein klinisches Isolat handelt, wurde zusätzlich, soweit verfügbar, der entsprechende Fallbericht zitiert. Außerdem sind die Nummern der einzelnen Stammsammlungen für die jeweiligen Pilzspezies angegeben.

SCHEMA

<u>Pilzstamm mit z. Z. gültiger Speziesbezeichnung</u>				
Autor - Literaturzitat				
Sammlungsnummer	Substrat, von dem der Stamm isoliert wurde	Isolationsort	Isoliert von... Datum...	Literaturzitat
GHP ...				
DMS ...				
CBS ...				
ATCC ...				
Jetziger taxonomischer Status des Isolats				

<u>Exophiala castellanii</u>				
Iwatsu, Nishimura & Miyaji - Mycotaxon, 1984, 20 : 307				
GHP 34 CBS 158.58 ATCC 18657	Haut (Tinea nigra?)	Sri Lanka	A. castellanii 1905 (?)	Castellani, 1905
Ex neotypus				

<u>Exophiala bergeri</u>				
Haase & de Hoog - Stud Mycol 1999, 43 : 80				
GHP 959 (= GHP 256) CBS 526.76	Subkutane Zyste Handgelenk	Memphis USA	Sutter (?) vor 1953	Young & Ulrich 1953
Ex typus				

<u>Exophiala dermatitidis</u>				
(Kano) de Hoog - Stud Mycol, 1977, 15 : 188				
GHP 195 CBS 207.35	Phaeohyphomycose Gesicht	Nagoya Japan	Kano 1934 (?)	Kano 1937
Ex typus				

<u>Exophiala jeanselmei</u>				
(Langeron) McGinnis & Padhye / var. <i>jeanselmei</i> de Hoog - Stud Mycol, 1977, 15 : 108				
GHP 916 CBS 664.76 ATCC 34123	Myzetom Fußrücken	Paris Frankreich	Jeanselmei 1928	Jeanselmei et al. 1928
Ex typus <i>Torula jeanselmei</i> Langeron				

<u>Exophiala mesophila</u>				
Listemann & Freiesleben - Mycoses, 1996, 39 : 2				
GHP 968 CBS 402.95 ATCC 200542	Silikonfuge Dusche	Hamburg Deutschland	H. Listemann 1993 (?)	Listemann & Freiesleben 1996

<u>Hortaea werneckii</u> (Horta) Nishimura & Miyaji - Jpn J Med Mycol, 1984, 25 : 145				
GHP 47 CBS 107.67 ATCC 36317	Tinea nigra Handinnenfläche	Lissabon Portugal	M. Figueiredo	
Ex neotypus				

<u>Phaeoannellomyces elegans</u> McGinnis & Schell - Sabouraudia, 1985, 23 : 182				
GHP 108 CBS 122.95	Phaeohyphomykose Fußnagel	Toronto Kanada	J. Kane	McGinnis & Schell, 1985
Ex typus				

<u>Saccharomyces cerevisiae</u> Bowman – Antibiot Chemother, 1957, 7 : 639-640				
GHP 983 DSM 1333 CBS 5900/2978 ATCC 9763	Brauereihefe	USA	Deponiert durch NCYC (National Center for Yeast Collection, USA)	

<u>Candida albicans (Robin) Berkhout (<i>Serogruppe A</i>)</u> Mackinnon - J Infect Dis, 1940, 66 : 59				
GHP 869 CBS 2718 ATCC 10261	Klinisches Isolat (Paronychie)	USA	J. E. Mackinnon 1939	Tsuchiya et al. 1955

2.2 Stammhaltung

Im Labor der Mikrobiologie erfolgte die Langzeitaufbewahrung der Pilzisolat mit Hilfe des sogenannten Microbank™-Systems (Mast, Reinbeck, Deutschland). In diesem System wird die Mikroorganismen enthaltende Flüssigkeit nicht direkt eingefroren, sondern es werden ca. 3 mm große Keramikkügelchen in dieser Pilzzellsuspension „getränkt“. Nach Adsorption wird die Kulturflüssigkeit dekantiert und etwa 20 solcher Keramikkügelchen, die alle die gleiche Keimsuspension enthalten, in einem 1,5 ml fassenden Röhrchen eingefroren und bei einer Temperatur von -70°C gelagert. Diese Technik ermöglicht die Entnahme einzelner Kügelchen, ohne das gesamte Röhrchen jeweils auftauen zu müssen.

Zur Anlage einer vegetativen Kultur wurde eine einzelne Kugel ausgefroren und auf einen Sabouraud-Chloramphenicol-Agar (= SCA; 20g/l Glukose, 10g/l Spezialpepton, 0,05% Chloramphenicol, 15% Agar, pH = 5,4; Oxoid, Wesel, Deutschland) übertragen und bei 30°C inkubiert. Nach Bebrütung wurden bewachsene SCA-Platten im Kühlschrank bei 4°C gelagert und für längstens 6 Wochen verwendet. Für den jeweiligen Testansatz erfolgte die Passage in einem flüssigen Medium (siehe 2.3.2). Dazu wurde eine Kolonie von der SCA-Platte in eine Gewebekulturschale (75 ml, Polystyren, Corning Costar®, Cambridge, USA) mit 40 ml Nährlösung unter sterilen Bedingungen überführt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch (100 rpm, Biometra®, Göttingen, Deutschland) inkubiert.

2.3 Kultur der Hefen

2.3.1 Verwendete Nährmedien und Puffer

Zur Anzuchtung und Aufbewahrung der Pilze dienten Platten mit Sabouraud-Chloramphenicol-Agar (= SCA).

Für die Erstellung der verschiedenen Flüssigmedien (Tabelle 2.2) wurden die folgenden Substanzen benutzt:

- Yeast Nitrogen Base (YNB-Difco, Detroit, USA)
- Hefeextrakt (YNB-Difco, Detroit, USA)
- D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- EDTA Na₂ = Triplex® III (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Citronensäuremonohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der synthetischen Nährmedienbasen (mg/l)

Komponenten	Medium I	Medium II	Medium III
Stickstoffquelle			
• Ammoniumsulfat	5000	5000	5000
Glukose	20000	20000	20000
Aminosäuren			
• LD-Methionin	20	20	20
• LD-Tryptophan	20	20	20
• L-Histidinmonohydrochlorid	10	10	10
Vitamine			
• Inositol	2,0	2,0	2,0
• Ca-Pantothenat	0,4	0,4	0,4
• Nicotinsäure	0,4	0,4	0,4
• Pyridoxinhydrochlorid	0,4	0,4	0,4
• Thiaminhydrochlorid	0,4	0,4	0,4
• Para-Aminobenzoessäure	0,2	0,2	0,2
• Riboflavin	0,2	0,2	0,2
• Biotin	0,002	0,002	0,002
• Folsäure	0,002	0,002	0,002
Spurenelemente			
• Borsäure	0,5	0,5	0,5
• Mangansulfat	0,4	0,4	0,4
• Zinksulfat	0,4	0,4	0,4
• Eisenchlorid	0,2	0,2	0,2
• Natriummolybdat	0,2	0,2	0,2
• Kaliumjodid	0,1	0,1	0,1
• Kupfersulfat	0,04	0,04	0,04
Anorganische Salze			
• Kaliumphosphat	1000	1000	1000
• Magnesiumsulfat	500	500	500
• Kalziumchlorid	100	100	100
• Natriumchlorid	100	100	100
Hefeextrakt	50000	50000	50000
MOPS Salz (0,0825M)	19,07	19,07	
MOPS Säure (0,0825M)	17260	17260	
Citronensäure-Monohydrat (0,09M)			18910
Dinatriumphosphat (0,02M)			3560
EDTA (0,0025M)		930	
pH-Wert $\pm 0,1$ bei 25°C	7,4	7,4	3,5

Zur Pufferung diente MOPS (= Good'scher Puffer, bestehend aus einem 1:1 Gemisch 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure / 3-(N-Morpholino)-propansulfonnatriumsalz [SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland], bzw. ein Phosphatpuffer, bestehend aus di-Natriumhydrogenphosphat und Citronensäure-Monohydrat [Merck, Darmstadt, Deutschland]).

In Tabelle 2.3 wird für jeden in dieser Arbeit untersuchten Keim das optimale Kulturmedium aufgeführt, bei dessen Verwendung überwiegendes Wachstum in der Hefeform erreicht wird. Die Auswahl geeigneter Nährmedien orientierte sich an Wachstumsstudien mit diversen Schwärzepilzen, in denen ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsform (Hefen, Hyphen) und variablen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Ca-Gehalt, pH-Wert) nachgewiesen wurde [Szaniszlo, 1993; Karuppayil, 1997].

Tabelle 2.3: Optimale kulturabhängige Wachstumsbedingungen bei Raumtemperatur (20°C)

Spezies	GHP Nr. (+)	Medium I [#] (pH 7,4)	Medium II [#] (pH 7,4)	Medium III [#] (pH 3,5)
<i>P. elegans</i>	108			++
<i>H. werneckii</i>	47		++	
<i>E. mesophila</i> (*)	968		++	
<i>E. jeanselmei</i>	916		++	
<i>E. dermatitidis</i>	195	++		
<i>E. bergeri</i>	959	++		
<i>E. castellanii</i>	34	++		
<i>C. albicans</i>	869	++		
<i>S. cerevisiae</i>	983	++		

(*) *E. mesophila* wuchs am besten bei 30°C [#] Zusammensetzung siehe Tabelle 2.2

(+) Pilzstammsammlungsnummer, Labor Haase, Institut für Medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen

2.3.2 Herstellung der Flüssignährmedien

Die benötigten Substanzen (Tabelle 2.2) wurden in jeweils einem Liter Aqua bidest. durch kontinuierliches Rühren auf einem Magnetrührer vollständig gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter (PHM 82, Standard pH-Meter, Radiometer A/S, Kopenhagen,

Dänemark) bestimmt und ggf. auf den gewünschten pH-Wert (Tabelle 2.3) eingestellt. Danach wurde das Medium 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlung bis zu maximal drei Wochen bei +4°C zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.3.3 Herstellung der Agarplatten

Für den Sabouraud-Chloramphenicol-Agar (= SCA) wurden 91 g Nährbodenbasis abgewogen und in zwei Liter destilliertem Wasser auf einem heizbaren Magnetrührgerät unter ständigem Rühren und Aufkochen vollständig gelöst. Das Medium wurde dann 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und anschließend in sterile Petrischalen ausgegossen. Die Platten wurden dann nach Abkühlung bis zu maximal zwei Wochen bei +4°C zur Verwendung aufbewahrt.

2.3.4 Sterilisation

Alle Gebrauchsgegenstände wie Mullkompressen, Eppendorfgläser, Glasgeräte und Pipettenspitzen wurden 20 Minuten lang bei 120°C autoklaviert, sofern sie nicht bereits durch den Hersteller steril geliefert wurden.

2.4 Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)

Zur systematischen Blockade der CD18/11-Adhäsionsmoleküle (β_2 -Integrine) wurden murine monoklonale Antikörper (mAk) einzeln oder in Kombination eingesetzt. Alle mAk wurden von der Firma Becton Dickinson (San Jose, USA) bezogen (s. Tabelle 2.4), in 2 ml phosphatgepufferter Lösung (100 μ g gereinigten mAk) geliefert und zwischen 2° und 8°C gelagert.

Tabelle 2.4: Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)

CD-Zahl	Klon *	Zielmolekül *	Antikörper (Ak)
CD11a	G-25.2	LFA-1 (α -Kette)	Anti-CD11a-Ak
CD11b	D 12	Mac-1 (α -Kette)	Anti-CD11b-Ak
CD11c	S-HCL-3	gp150/95 (α -Kette)	Anti-CD11c-Ak
CD18	L 130	β -Kette	Anti-CD18-Ak

* laut Herstellerangaben

Anti-CD11b und Anti-CD11c standen sowohl unkonjugiert wie auch konjugiert mit R-Phycoerythrin (PE) zur Verfügung. Die mit PE markierten Antikörper werden häufig in der Durchflusszytometrie eingesetzt und eignen sich zur Differenzierung einzelner Zellsubpopulationen. Der Fluoreszenzfarbstoff weist ein Absorptionsmaximum von 488 nm auf und lässt sich daher gut durch den Argonlaser des in dieser Studie benutzten FACScan-Durchflusszytometers anregen. Das dabei emittierte Licht (= Fluoreszenz) hat eine Wellenlänge von 578 nm (rot-orange) und kann durch spezielle Photodetektoren im Durchflusszytometer spezifisch erkannt werden.

2.5 Verwendetes Fluorochrom als Marker der Hefezellen

Für die Untersuchungen der Phagozytose wurde als fluoreszierender Marker von den hier untersuchten Pilzen BCECF-AM (2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-penta-acetoxymethyl-ester) eingesetzt. Ubiquitäre Esterasen setzen dann das eigentliche Fluorochrom BCECF (2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) durch intrazelluläre Spaltung in vitalen Zellen frei. Die Pilzzellen erscheinen somit in der Durchflusszytometrie als fluoreszierende Partikel. Nach erfolgreicher Phagozytose durch (ungefärbte) Granulozyten werden diese dann konsekutiv zu fluoreszierenden Partikeln und können somit in der weiteren Analyse selektiv detektiert werden (Einzelheiten siehe Kapitel 2.6, 2.8 & 2.9).

In Anlehnung an die Produktinformation des Herstellers (Roche Bioscience, Mannheim, Deutschland) wurde BCECF-AM wie folgt portioniert und gelagert. Das Lyophilisat (1 mg) wurde in 0,2 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka, Buchs, CH) gelöst, in 10 Portionen zu 20 µl in sterilen Polypropylenröhrchen (2 ml, Falcon 2063, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgeteilt und maximal 18 Monate bei -70°C zum Gebrauch gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung und zum jeweiligen Gebrauch wurde eine dieser Portionen mit 60 µl DMSO verdünnt und als Arbeitslösung bei -20°C für maximal 2 Monate gelagert. Die Reaktionsgefäße wurden dabei mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Photoaktivierung des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

2.6 Prinzip der Durchflusszytometrie

2.6.1 Allgemeines

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht im Wesentlichen in einer simultanen Messung und Analyse optischer Signale unterschiedlicher Qualität wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Diese Signale entstehen beim Durchfluss eines Partikels durch einen Lichtstrahl. Im vorliegenden Fall handelt es sich um in einer Flüssigkeit suspendierter Pilze und/oder Leukozyten. Diese suspendierten Partikel werden durch einen Ansaugstutzen in das Durchflusszytometer hinein-

gesaugt und dann im Gerät durch eine Trägerflüssigkeit derart hydrodynamisch fokussiert, dass die Partikel quasi im „Gänsemarsch“ zu einem Analysepunkt geleitet werden. Hier werden sie dann von einem Laserstrahl (Argonlaser, 488 nm, blau) erfasst. Je nach den Partikeleigenschaften wird das Licht des Lasers modifiziert, d. h. es wird gestreut. Befinden sich am oder im Partikel fluorogene Substanzen, die von Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden, so kommt es zusätzlich zur Emission von Fluoreszenzlicht. Das optische Detektionssystem und die Elektronik im Durchflusszytometer quantifizieren die Fluoreszenz- und Streulichtemission jeder einzelnen Zelle. Eine Analyse besteht demnach aus der Summe vieler schnell aufeinanderfolgender Einzelzellmessungen. Im Gegensatz zu einem statischen Fluorimeter, welcher die Summation von Fluoreszenz z. B. in einer Kavität einer Mikrotiterplatte ermittelt, beruhen die Ergebnisse auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter von jeweils einer einzelnen Zelle.

2.6.2 Physikalische Grundlagen

Unter Fluoreszenz versteht man die gegebenenfalls rasch abklingende Lichtemission von Stoffen (Molekülen) nach Absorption energiereicherer Strahlung (Abbildung 2.1).

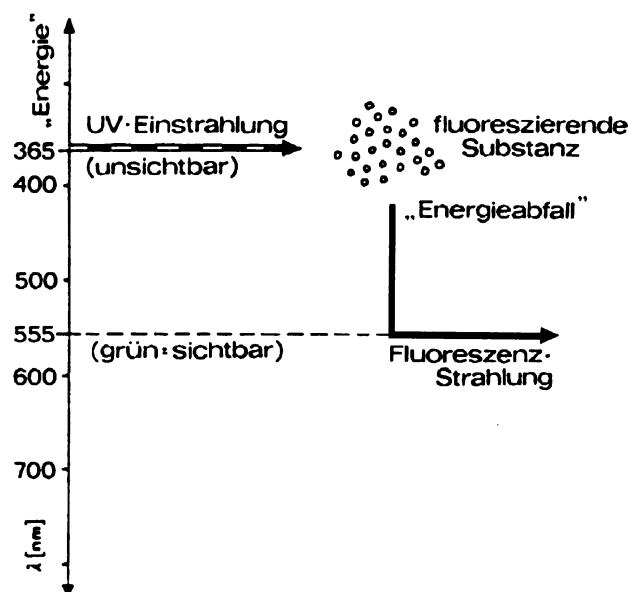


Abbildung 2.1: Schema zur Entstehung von Fluoreszenzstrahlung

Neben einer schwachen primären Fluoreszenz, die man als Autofluoreszenz als Eigenschaft vieler Substanzen kennt, spielt für die Durchflusszytometrie vor allem die Sekundärfluoreszenz eine Rolle, ausgelöst durch angelagerte sogenannte Fluorochrome. Diese fluoreszierenden Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen vergleichsweise weiten, für sie jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich. Diese Energie hebt bestimmte Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser Strahlungsvorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Fluorochrome besitzen ein charakteristisches Anregungsspektrum bzw. Exzitationsspektrum, also einen Frequenzbereich, der diese fluoreszierende Verbindung anregen kann. Dieser stimmt weitgehend mit dem Absorptionsspektrum überein. Bei der Rückkehr zum Grundniveau geht ein Teil der Energie in Form von Wärme verloren. Aus diesem Grund ist das gebildete Licht (Emissionsspektrum) energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht.

Neben der Messung von Fluoreszenz ist die Messung und Analyse von Streulicht ein weiteres Merkmal der Durchflusszytometrie. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Zelleigenschaften wie die Querschnittsfläche (Zellgröße), die Struktur der Membran (Fältelung) oder intrazelluläre Bestandteile (Granula, Vakuolen) beeinflussen die Lichtstreuung. Dabei wird das Licht nicht in alle Richtungen gleich gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ($0 - 10^\circ$) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, FSC = Forward-Scatter-Light), ein geringer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, SSC = Sideward-Scatter-Light). Das Vorwärtsstreulicht ist u. a. abhängig von der Größe des Partikels, das Seitwärtsstreulicht von seiner Granularität.

2.6.3 Aufbau eines analytischen Durchflusszytometers

Prinzipiell läßt sich ein Durchflusszytometer in folgende drei Bauteile gliedern [Schmitz, 1994]:

1. Ein **Flüssigkeitssystem** dient dem Transport der zu untersuchenden Zellen vom Probenröhrchen hin zur Messkammer und weiter in den Abfallbehälter. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auftrennen und die Zellen aneinandergereiht wie Perlen einer Perlenkette sequentiell den Analysepunkt (Kapillare) erreichen. Hier trifft der Lichtstrahl des Lasers die Zellen im Bruchteil einer Sekunde. Das erfasste Signal kann dann weiter analysiert und zur weiteren Datenverarbeitung klassifiziert werden.
2. Das **optische System** gliedert sich in einen Anregungsteil, der Lichtquelle, und in einen aus mehreren Baugruppen bestehenden Detektionsteil. Die einzelnen Fluoreszenzfarben sowie

das Streulicht werden durch spezielle Lichtfilter und Spiegel aufgetrennt und in verschiedenen Detektoren gemessen.

3. Im System der **Signalverarbeitung** findet eine Umwandlung der registrierten Lichtintensitäten statt und eine Weiterleitung der aufgenommenen Daten an eine dem Durchflusszytometer angeschlossene Datenauswerteeinheit. Näheres dazu wird weiter unten erklärt.

2.6.4 Verwendetes Messgerät

In der vorliegenden Arbeit kam das FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA) als Messgerät zum Einsatz. Dies ist ein mit einem luftgekühlten Argon-Ionenlaser arbeitendes Tischdurchflusszytometer für maximal fünf erfassbare Parameter (drei Fluoreszenzkanäle, Vorwärts- und Seitwärtsstreuung). Der als Lichtquelle dienende Laser (Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation) erzeugt monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und befindet sich damit im Exzitationsbereich des hier in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrom (BCECF-AM).

2.6.5 Verwendetes Messprogramm

Sowohl die Messung und Speicherung der Rohdaten wie auch die Darstellung und weitere Analyse der Messergebnisse erfolgte durch ein Programm der Firma Becton Dickinson (Cellquest™-Software Version 3.1f., 1997, San Jose, USA).

Alle im Durchflusszytometer gemessenen Lichtintensitäten müssen zunächst einmal digitalisiert werden und im angeschlossenen Computer gespeichert werden. Dies geschieht folgendermaßen: Photodetektoren der jeweils zu erfassenden Parameter konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korrelieren. Ein Analog-/Digitalwandler wandelt dann die in Volt registrierte Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft in eine Klassenzahl (Kanalzahl) um, die in unserem Fall eine Klassenauflösung von 1024 Klassen ermöglicht. Die digitalisierten Werte einer Messung können Klassenwerte von 0 bis 1023 einnehmen.

Das dazu geeignete Speicherungsformat der gewonnenen Rohdaten wird als Listendatei (List-Mode) bezeichnet und erfolgt nach dem derzeit gültigen und herstellerunabhängigen „FSC-2.0“-Standard (Data File Committee of the Society for Analytical Cytology, 1990). Hierbei speichert der Computer (Mac™ OS Computer, 1997, Systemsoftware D1-7.6) die Messwerte der Zellen - immer vier Parameter - in der gleichen Reihenfolge, in der die Zellen den Analysepunkt passieren, als Werteliste (Abbildung 2.2). In dieser Werteliste ist der gesamte Messvorgang Zelle für Zelle dokumentiert, was eine wiederholte Datenauswertung nach unterschiedlichsten Kriterien auch noch nach Jahren erlaubt.

1. Zelle				2. Zelle				3. Zelle			
FSC	SSC	FL1	FL2	FSC	SSC	FL1	FL2	FSC	SSC	FL1	FL2
82	43	12	315	75	41	10	498	14	79	11	33

Abbildung2.2: Schematische Darstellung einer Werteliste für 3 Zellen und 4 Messparameter (weitere Erklärungen s. Text)

2.7 Vorbereitung der Zellen für den Messvorgang

2.7.1 Versuchsvorbereitungen

Die in den Gewebekulturschalen gewachsenen Keime wurden zunächst mikroskopisch bei 500-facher Vergrößerung (Mikroskop: Leitz Dialux 22EB, Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Einerseits sollte eine bakterielle Kontamination und sonstige Verunreinigungen erkannt und ausgeschlossen werden, andererseits sollte in der Pilzsuspension morphologisch ein überwiegend monozelluläres Wachstum in Form von Hefezellen vorkommen (Anteil an Einzelzellen mindestens 80%). Beim Vorliegen dieser Voraussetzungen wurden 10 ml Pilzsuspension in ein steriles Probenröhrchen (13 ml, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) pipettiert und für 5 Minuten (1400 g, +4°C) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die sedimentierten Keime in 6 ml NaCl-Lösung (0,9%, DELTA-Pharma, Berlin, Deutschland) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde gut gemischt (Vortex) und 1 ml für die Bestimmung der optischen Dichte (= OD) entnommen.

Gemessen wurde mit einem Zweistrahlphotometer (Ultrospec III®-Photometer, Pharmacia Biotech, München, Deutschland) bei 600 nm ($\Rightarrow$ OD₆₀₀). Als Referenz diente eine wässrige NaCl-Lösung (0,9%). Die OD₆₀₀ galt als ein Maß für die Zellkonzentration in der jeweiligen Pilzsuspension. Physikalisch gesehen ist die optische Dichte die (Pseudo)absorption einer Zellsuspension bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und in erster Näherung proportional zur Zellkonzentration im Medium.

In mehreren Vorversuchen wurden für jeden untersuchten Keim eine annähernd optimale OD₆₀₀ bestimmt, so dass in den Phagozytoseansätzen jeweils ein Pilz/Granulozyten-Verhältnis von 1,5 bis 2,5 : 1 bestand (siehe Tabelle 2.5). Voraussetzung dafür war die Anzucht der einzelnen Keime unter immer identischen Bedingungen hinsichtlich des Kulturmediums, der Temperatur und der Anzuchtdauer (siehe Tabelle 2.3 & 2.5). In anderen Studien mit *Candida albicans*

konnte diese Ratio Pilz/Granulozyt für durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten im Vollblut bestätigt werden [Martin, 1991].

Die Pilzsuspension wurde solange mit NaCl 0,9% in 1-ml-Schritten verdünnt und Portionen von jeweils 1 ml für die Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen, bis der spezifische OD₆₀₀-Wert erreicht war. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml NaCl 0,9% aufgenommen und mit 3 µl BCECF-AM bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Ablauf der 60 Minuten wurde die so „gefärbte“ Pilzsuspension durch zweimaliges Waschen mit 5 ml NaCl 0,9% von sich noch im Überstand befindenden BCECF-AM getrennt, zentrifugiert, das Sediment in 1 ml NaCl 0,9% aufgenommen und lichtgeschützt im Eiswasserbad gelagert.

Tabelle 2.5: Spezifische OD₆₀₀-Werte zur Erreichung einer Pilz/Granulozyten-Ratio von 1,5-2,5:1 und durchschnittliche Wachstumszeit (= Inkubationszeit)

Untersuchter Pilz	GHP Nr. (+)	OD ₆₀₀	Durchschnittliche Wachstumszeit
<i>C. albicans</i>	869	0,7-0,8	1 Tag
<i>E. dermatitidis</i>	195	1,0-1,1	1 Tag
<i>S. cerevisiae</i>	983	1,0-1,2	1 Tag
<i>H. werneckii</i>	47	1,2-1,5	4-6 Tage
<i>E. bergeri</i>	959	0,9-1,1	5-7 Tage
<i>E. jeanselmei</i>	916	0,8-1,0	6-8 Tage
<i>E. mesophila</i>	968	0,6-1,0	6-9 Tage
<i>E. castellanii</i>	34	1,2-1,7	10-14 Tage
<i>P. elegans</i>	108	1,0-1,1	13-17 Tage

(+) Pilzstammsammlungsnummer, Labor Haase, Institut für Medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen

Zeitgleich wurden 10 ml Vollblut mittels steriler Punktion einer Armvene von freiwilligen und vom Aspekt her sowie auf Befragen hin offensichtlich gesunden Kontrollpersonen (n = 30, Alter zwischen 20 und 43 Jahren) entnommen. Bereits für die Blutentnahme war in den verwendeten Abnahmespritzen Heparin (Heparin Natrium, Braun, Melsungen, Deutschland) vorgelegt. Dieses Heparin war frei von Konservierungsstoffen und wurde so dosiert, dass im gespendeten Blut eine Endkonzentration von 10 I.E./ml vorlag. Diese relativ geringe Konzentration reichte für eine

effektive Gerinnungshemmung aus. Das heparinisierte Vollblut wurde sofort für einen Versuchsansatz verwendet.

2.7.2 Versuchsansatz

Das frisch gewonnene heparinisierte Vollblut wurde gemischt (Vortex) und auf den Boden des sterilen Eppendorf-Gefäßes (1,5 ml) aliquotiert, 100 µl pro Ansatz. Dabei befanden sich alle Röhrchen auf dem Thermomixer bei 37°C, mit Ausnahme der Nullwerte (Phagozytosezeit = 0), die sich im Eiswasserbad befanden. Anschließend erfolgte die Zugabe der gewünschten Antikörper, 15 µl pro Röhrchen, bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf dem Thermoschüttler (1000 rpm). Unmittelbar vor der Koinkubation der Mikroorganismen im heparinisierten Blut wurde die Pilzsuspension einer Ultraschallbehandlung (Transsonic 460/H, Elma, Singen, Deutschland) bei halbmaximaler Geräteeinstellung beschallt (15 sec). Diese Behandlung führt zu einer Vereinzellung eventuell zusammenhängender Hefen. Anschließend wurden die gut gemixten Hefen (Vortex) zum Vollblut (R1-R20 ohne Nullwerte) pipettiert, jeweils 12,5 µl pro Ansatz auf dem Thermoschüttler.

Einen typischen Versuchsansatz zeigt schematisch die folgende Tabelle:

Tabelle 2.6: Schematische Darstellung eines typischen Versuchsansatzes

Inkubationszeit [min]	ohne mAk	mAk CD18	mAk CD18/11a	mAk CD18/11b	mAk CD18/11c	Vollblut ohne Pilzzugabe
0	R1	R5	R9	R13	R17	R21
10	R2	R6	R10	R14	R18	R22
30	R3	R7	R11	R15	R19	R23
60	R4	R8	R12	R16	R20	R24

(R = Röhrchen, weitere Erklärungen s. Text)

Nach 15 Minuten wurde zu den Nullwerten im Eiswasserbad (R1, R5, R9, R13, R17) ebenfalls 12,5 µl Pilzsuspension pipettiert. Die Phagozytoseansätze wurden für 10, 30 und 60 Minuten auf dem Thermoschüttler (1000 rpm) lichtgeschützt inkubiert. Parallel zu den Phagozytoseansätzen wurde Blut ohne Pilze (R21-R24) mitgeführt. Exakt zum Ende der Inkubationszeit wurden alle Proben zum Stoppen der Phagozytose vom Schüttler ins Eiswasserbad gestellt. Nach Beendigung der längsten Inkubationszeit wurden aus allen nochmals gemixten (Vortex)

Röhrchen 0,1 ml in die jeweils identisch beschrifteten FACS-Röhrchen pipettiert, dann 2 ml frisch angesetzte eiskalte FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in jedes Röhrchen gegeben und für 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyselösung lysiert aufgrund ihrer geringen Osmolarität die im Blut befindlichen Erythrozyten und inaktiviert bzw. fixiert aufgrund eines Paraformaldehydgehaltes von 2 % die Leukozyten. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die lysierten Proben erneut durchmischt (Vortex) und zentrifugiert (5 min, 1.150 rpm, +4°C). Zuletzt wurden die Proben noch zwei Mal mit NaCl (0,9%) gewaschen, um durch wiederholte Zentrifugation die intakten Leukozyten und Mikroorganismen von den Erythrozytenfragmenten zu trennen. Das Pellet wurde anschließend in 300 µl NaCl (0,9%) aufgenommen und lichtgeschützt auf Eis für maximal 30 Minuten bis zur Messung am Durchflusszytometer aufbewahrt.

Zur Kontrolle einer intragranulozytären Lage der Pilze wurden repräsentative Proben (v. a. Proben mit 30- und 60-minütiger Inkubationszeit) mit einem Epifluoreszenz-Interferenzkontrastmikroskop (Leitz, DM RB, Leica, Wetzlar) untersucht. Aufgrund der Phasenkontrastverschiebung ist in diesem Verfahren eine Fokussierung immer nur in einer Schnittebene möglich, so dass sich - im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie - Schnittebene und Bildebene entsprechen. Daher entspricht die Präsenz von z. B. Pilzen innerhalb der granulozytären Plasmamembran in einer Bildebene einer intrazellulären Lokalisation der Pilze. Durch die simultane Verwendung der Epifluoreszenzmikroskopie können die BCECF-gefärbten Pilze eindeutig von intrazellulären, granulozytären Organellen diskriminiert werden.

2.8 Messvorgang

Jedes einzelne Probenröhrchen wurde unmittelbar vor der Messung gut geschüttelt (Vortex). Pro Messung (= Probenröhrchen) wurden jeweils 10.000 Zellen (= Events) registriert und die gewonnen Messdaten in regelmäßigen Abständen auf einer CD-ROM gesichert.

Für alle Messreihen wurden die Verstärkereinstellungen am FACScan-Durchflußzytometer für Streulichtsignale linear eingestellt, für Fluoreszenzintensitäten dagegen logarithmisch. Die Tabelle 2.7 gibt eine Übersicht über die gewählten Geräteeinstellungen in Anlehnung an Schmitz & Rothe [Schmitz, 1994] und aufgrund regelmäßig durchgeführter Kalibrierungen des FACScan-Durchflusszytometers.

Die gewünschten Verstärkereinstellungen wurden so gewählt, dass sowohl die relativ großen Granulozyten als auch die Hefen klar trennbar zur Darstellung kamen. Zu diesem Zweck wurde der Schwellenwert des Vorwärtstreulichtes (Forward-Scatter-Light, FSC) auf den relativen Wert von 52 eingestellt. Dieser Wert verhindert die Messung zu kleiner Partikel wie etwa mikrobieller oder blutzellulärer Trümmer. Die Detektorpositionen betrugen für das Vorwärtstreulicht E00,

für das Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter-Light, SSC) 414, für den ersten Fluoreszenzkanal (Fluorescence 1, FL1) 672 und für den zweiten Fluoreszenzkanal (Fluorescence 2, FL2) 690.

Tabelle 2.7: Verstärkereinstellungen am FACScan-Durchflusszytometer

Detektor	Spannung	Spannung	Datenmodus	Threshold	Compensation
FSC	E00	2.30	Linear	52	
SSC	414	1.00	Linear		
FL1	672	1.00	Logarithmisch		FL1 - 0.6% FL2
FL2	690	1.00	Logarithmisch		FL2 - 21.5%FL2
FL3	150	1.00	Logarithmisch		inaktiv

2.9 Bearbeitung und Darstellung der Rohmessdaten

Zur graphischen Dokumentation der Messergebnisse werden in dieser Arbeit prinzipiell zwei Darstellungsformen verwendet. Eine einfache Art der Messdatendarstellung ist die Einparameterdarstellung in Form einer Histogramm- oder Häufigkeitsverteilung. In diesen Abbildungen werden die Partikel nach den relativen Werten eines Parameters sortiert. Dieser Parameter wird auf der X-Achse aufgetragen. Auf der Y-Achse wird die Anzahl der Partikel eines Wertes (Zellzahl) für jeden relativen Wert dargestellt. Die so entstehenden Verteilungsmuster werden als Hüllkurven gezeichnet. Die digitalisierten Werte einer Messung können bei einer Auflösung von 1024 Klassen Klassenwerte von 0 bis 1023 einnehmen, die im Histogramm auf der Abszisse erscheinen. Auf der Ordinate erscheint dann die Anzahl der Zellen. Abbildung 2.3 zeigt die Größe (FSC-H) einzelner Leukozytensubpopulationen nach Erythrozytenlyse als Histogramm. Entsprechend umfasst die Hüllkurve im Bereich geringer Größe die Lymphozyten und im Bereich großer Partikel die Granulozyten und Monozyten.

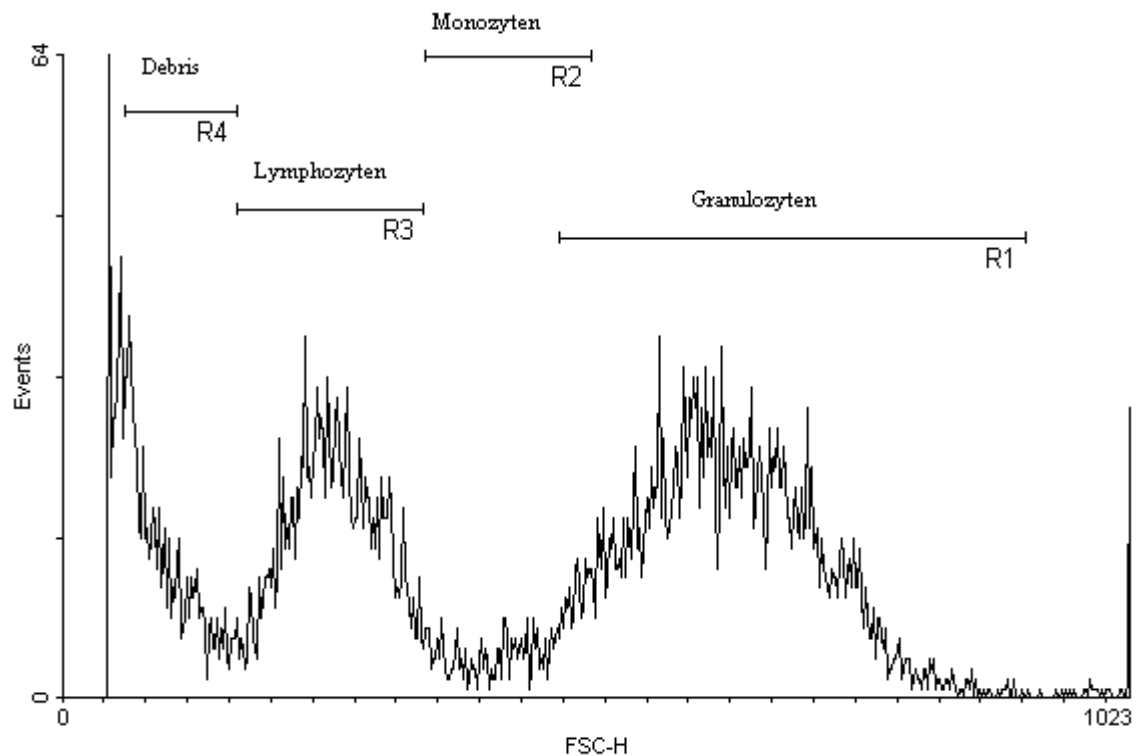


Abbildung 2.4: Typisches Histogramm peripherer Leukozyten nach Erythrozytenlyse im FACSscan-Durchflusszytometer

Eine weitere und in dieser Arbeit hauptsächlich benutzte Form der Datenauswertung ist die korrelierte Zweiparameterdarstellung. Hierbei wird die Relation zwei verschiedener Eigenschaften (= Parameter) einer Zelle zueinander angezeigt. Die graphische Darstellung kann als Zweiparameter-Punkthistogramm (Dot-plot) erfolgen und jeder Punkt steht dann für mindestens eine bestimmte Zelle mit ihren beiden gemessenen Eigenschaften.

In Abbildung 2.4 sind als Beispiel die Leukozyten in lysiertem Vollblut nach ihrer Größe (FSC-H, X-Achse) und ihrer Granulität (SSC-H, Y-Achse) dargestellt. Auf diese Weise lassen sich große, granulierende Zellen (Granulozyten) von großen, wenig granulierenden Zellen (Monozyten) und kleine, kaum granulierende Zellen (Lymphozyten) gut abgrenzen. Unizelluläre Mikroorganismen und Zelltrümmer (insbesondere Erythrozytenfragmente) stellen sich sehr klein und wenig granuliert dar.

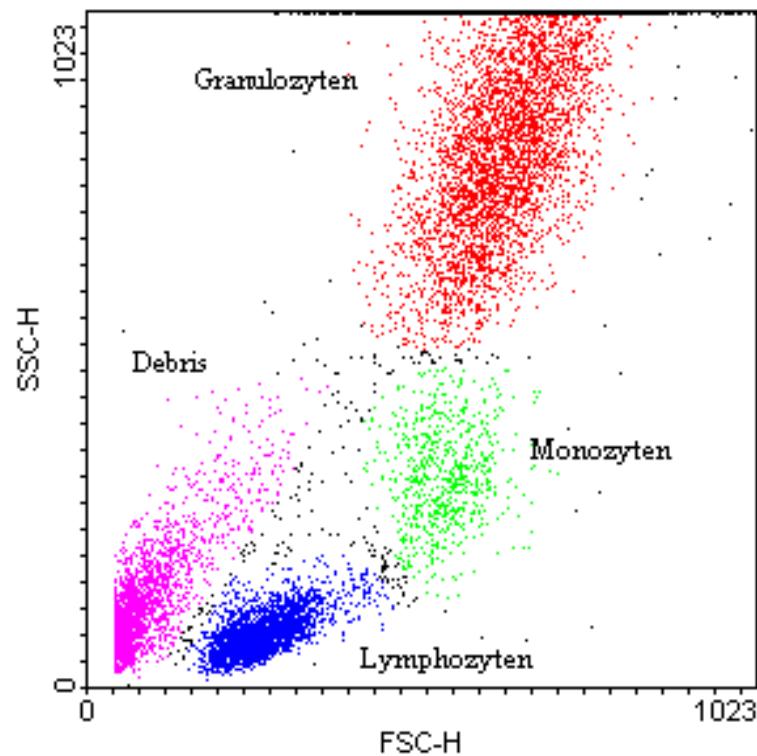


Abbildung 2.4: Typischer Dot-plot verschiedener Subpopulationen von Leukozyten eines gesunden Probanden im Zweiparameter-Punkthistogramm (FSC-H gegen SSC-H)

Neben der in Abbildung 2.4 gezeigten Korrelation von Größe (FSC-H) mit Granularität (SSC-H) kann jeder registrierte Parameter im Durchflusszytometer mit einem weiteren korreliert werden, so z. B. die Grünfluoreszenz (FL1-H) mit der Granularität (SSC-H) oder auch mit der Rotfluoreszenz (FL2-H), je nach Fragestellung und eingesetzten Fluorochromen. Ein Nachteil von Punkthistogrammen ist die schwierige visuelle Abschätzung der Quantität der Populationen in den einzelnen Punktwolken bei einer hohen Zahl gemessener Zellen. Sowohl in den Dot-plots als auch in den Histogrammen können alle gemessenen Partikel dargestellt werden. Bei der Datenauswertung in dieser Arbeit galt das Hauptinteresse den Granulozyten und ihrer prozentualen Beteiligung an der Phagozytose aller untersuchten Pilze. Die Software des FACScan-Durchflusszytometers ermöglicht alternativ eine Abgrenzung der interessierenden Zellen von Debris (Aggregaten und Zelltrümmern) und anderen Zellarten durch das Definieren

von Auswertefenstern (= Gating). Hierbei kann dann z. B. nur um die initial nicht-fluoreszierenden Granulozyten ein Messfenster gezogen werden. Nach 60-minütiger Koinkubation mit fluoreszierenden Hefezellen und erfolgreicher Phagozytose können dann alle an der Phagozytose beteiligten Granulozyten selektiv bezüglich ihrer grünen Fluoreszenz als Dot-plot oder als Histogramm dargestellt werden. Die Fluoreszenzzunahme der Granulozyten kann dann als Maß der Phagozytose interpretiert werden. Beispiele dazu folgen im Kapitel 3 (Versuchsergebnisse).

Neben der graphischen Darstellung ermöglicht die CellQuest-Software eine detaillierte quantitative Auswertung. So können in jedem Dot-plot oder Histogramm von den dargestellten Messwerten die Mittelwerte, die Mediane und die Spitzenwerte berechnet werden. Dabei kann das Programm alle Messwerte (= Events) seinen Berechnungen zugrunde legen oder frei wählbare Regionen (= Gates) als Rechenbasis verwenden. In den Dot-plots geschieht Letzteres über die Festlegung von Quadranten, in den Histogrammen über die Festlegung von Markern.

Die in dieser Arbeit dargestellten Dot plots und Histogramme wurden mit der WinMDI-Software (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometrie, Version 2.8) erstellt.

(Freeware-Software, <http://facs.scripps.edu/software.html>).

2.10 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programmsystem SAS (Statistical Analysis System - Version 6.11, Institute Inc., Cary, NC, USA) auf einem PC mit dem Betriebssystem Windows 95 durchgeführt.

Als Signifikanztest für den Vergleich zweier Stichproben bei metrischen Daten wurde der **Student-t-Test** gewählt. Dieser ermöglicht den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen sowohl für unabhängige als auch für abhängige Gruppen. Geprüft wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Zur Signifikanzberechnung der Differenzen der einzelnen Antikörperkombinationen gegenüber den Kontrollwerten (d. h. ohne Antikörperzugabe) wurde der verbundene t-Test für abhängige Stichproben verwendet.

Beim Vergleich zwischen dem Phagozytoseausmaß der einzelnen Isolate und der durch sie vorgegebenen Pathogenität wurde der unverbundene t-Test für unabhängige Stichproben gewählt.

3 Versuchsergebnisse

3.1 Prinzip der Auswertemethodik

Bei durchflusszytometrischen Messungen wird von jeder Einzelzelle bzw. jedem Zellaggregat gleichzeitig Fluoreszenz, Granularität und Größe erfasst. Jedes Messereignis wird also durch diese drei Messparameter genau definiert. Eine dreidimensionale Darstellung der Messereignisse ist mit Hilfe der Cellquest-Software grundsätzlich möglich. Da sich verschiedene Zelltypen aber häufig nur in einem dieser drei Parameter voneinander unterscheiden, erschien es sinnvoller, jeweils nur zwei der drei gemessenen Parameter gegeneinander aufzutragen. In der vorliegenden Arbeit wurden Diagramme mit einer Auftragung von Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H) [z.B. Abbildung 3.1] und Granularität (SSC-H) gegen Grünfluoreszenz (FL1-H) [z. B. Abbildung 3.2] zur Auswertung eingesetzt. Dabei werden die einzelnen gemessenen Ereignisse (Einzelzellen, Zellaggregate) eines Versuchsansatzes im Diagramm als Punktwolken dargestellt. Diese Art der graphischen Darstellung wird im weiteren Verlauf als Dot-plot (Zweiparameter-Punkthistogramm) bezeichnet.

Mit den Parametern Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H) konnten in dem untersuchten Zellgemisch verschiedene Subpopulationen von Zellen identifiziert werden (z.B. Abbildung 3.1). Zellen eines Typs haben ähnliche Eigenschaften, d. h. sie stimmen in ihrer Größe bzw. Granularität gut überein und stellen sich daher als sogenannte Punktwolken dar. Die Software des FACScan-Durchflusszytometers ermöglicht eine Abgrenzung dieser Punktwolken durch Bildung von entsprechenden Polygonen (= Auswertefenster), die die interessierenden Subpopulationen „gated“. Bei der Markierung einer eingegrenzten Subpopulation (= Gate) fasst der Rechner alle Messpunkte (Zellen bzw. Zellaggregate) zusammen, deren Parameterwerte (Größe (FSC-H)/ Granularität (SSC-H)) im markierten Bereich liegen. Die so eingegrenzte Subpopulation wird entsprechend farbig markiert. Dabei werden im Rechnerhintergrund auch die zugehörigen Fluoreszenzwerte in der Datenmatrix erfasst und entsprechend markiert. Die Markierung der Subpopulation bleibt daher auch bei Veränderungen der Parameterkombination bestehen (Abbildung 3.1 & 3.2).

In der Auftragung von Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H) kann durch ein entsprechend gesetztes Auswertefenster (= Gate) die Population der Granulozyten selektiv eingegrenzt und markiert werden. Eine Veränderung der Parameterkombination (Granularität (SSC-H) gegen Grünfluoreszenz (FL1-H)) bietet dann die Möglichkeit, die Fluoreszenzzunahme der Granulozyten nach erfolgter Phagozytose der Pilzzellen quantitativ zu erfassen (Abbildung 3.3).

3.1.1 Auswertemodalität A

An den Abbildungen 3.1 – 3.3 wird am Beispiel von *Exophiala jeanselmei* die Vorgehensweise der Datenauswertung schrittweise erläutert.

Ausgangswert für die Definition des Auswertefensters (Gate) waren in der jeweiligen Messreihe die Nullwerte (Phagozytosezeit = 0 Minuten), bei denen in der Darstellung Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H) für die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Pilze eine deutliche Abgrenzung der jeweiligen Pilzpopulation (R2) von der Granulozytenpopulation (R1) möglich war (Abbildung 3.1). Im Gate R2 wurden die Hefen entsprechend ihrer geringen relativen Granularität detektiert. Dieses Gate R2 ist hier aber nur zur Veranschaulichung gesetzt, um die Lokalisation der Pilze und ihre Abgrenzung gegen die Granulozytenpopulation zu verdeutlichen. Der besseren Übersichtlichkeit halber wurden die Monozyten und Lymphozyten hier nicht gesondert markiert. Bezüglich ihrer Abgrenzung wird auf die Abbildung 2.4 (Kapitel „Material und Methoden“) verwiesen.

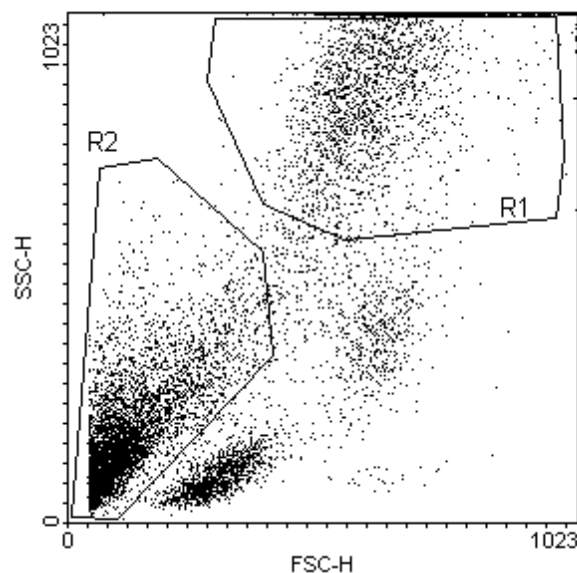


Abbildung 3.1: Abgrenzung (= Gating) der Granulozyten (R1) und Pilze (R2) im Dot-plot-Diagramm (Koinkubationszeit = 0 min)

Setzt man nur ein Gate um die Punktwolke der Granulozyten (R1), bleibt bei einer Veränderung der Parameter die Markierung der Subpopulation bestehen. Die Auftragung von Granularität

(SSC-H) gegen Fluoreszenz (FL1-H) ermöglicht nun eine gezielte Erfassung eventueller Veränderungen in der Punktwolke der Granulozyten (Abbildung 3.2).

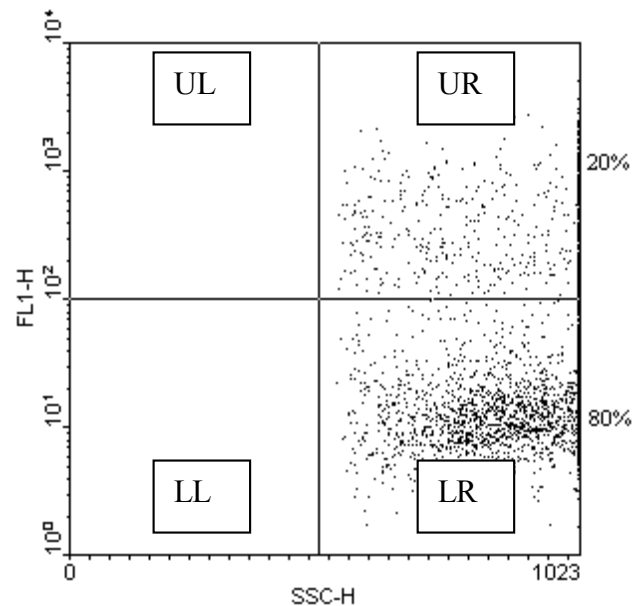


Abbildung 3.2: Selektive Dot-plot-Darstellung der Granulozyten durch Festlegung von Quadrantengrenzen (Koinkubationszeit = 0 min), LR = Granulozyten ohne phagozytierte Hefezellen (keine Fluoreszenzzunahme), UR = Granulozyten mit phagozytierten Hefezellen (deutliche Fluoreszenzzunahme)

Durch Aufteilung des Diagramms in definierte Quadranten können fluoreszierende und nicht fluoreszierende Granulozyten voneinander getrennt werden. Normalerweise zeigen humane Granulozyten keine oder nur eine sehr geringe grüne Autofluoreszenz (FL1-H) und erscheinen in der hier gezeigten Darstellung aufgrund ihrer relativen Granularität (SSC-H) überwiegend im unteren rechten Bildquadranten (LR = lower right). Ein bestimmter Anteil (20 % in Abbildung 3.2) der Granulozyten ist jedoch schon an der Phagozytose beteiligt und zeigt daher eine erhöhte Fluoreszenz. Die aktiven Granulozyten befinden sich also im oberen rechten Quadranten (UR = upper right).

Die mit BCECF markierten Pilze stellen sich durch ihre Grünfluoreszenz hauptsächlich im linken oberen Quadranten (UL = upper left) dar und sind damit deutlich abgrenzbar gegenüber den Granulozyten (in Abbildung 3.2 nicht dargestellt). Die Assoziation von Granulozyten mit den markierten Mikroorganismen resultiert in einer grünen Fluoreszenz und einer leichten Granularitätszunahme der primär ungefärbten Granulozyten. Während in Abbildung 3.2 noch

die Mehrheit der Granulozyten (= 80 %) im unteren rechten Quadranten liegt, erscheinen diese Zellen nach 60-minütiger Phagozytose überwiegend im oberen rechten Quadranten (UR = upper right) infolge der Inkooperation von Hefezellen (Abbildung 3.3).

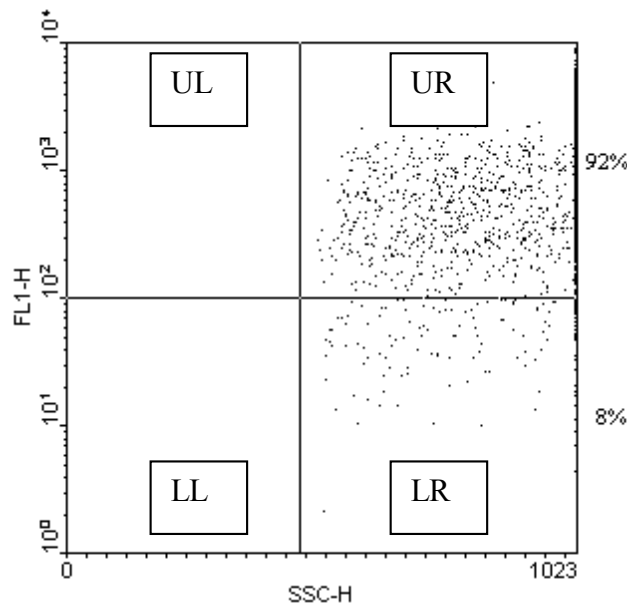


Abbildung 3.3: Selektive Dot-plot-Darstellung der Granulozyten (Koinkubationszeit = 60 min.)
LR = Granulozyten ohne phagozytierte Hefezellen (keine Fluoreszenzzunahme),
UR = Granulozyten mit phagozytierten Hefezellen (deutliche Fluoreszenzzunahme)

Mit der Quadrantenanalyse der CellQuest-Software ließ sich genau berechnen, wie viele Punkte, also Zellen (oder Zellaggregate), sich in den jeweiligen Quadranten befanden und welchen Anteil sie in Bezug auf die Gesamtheit der markierten Punkte (= Gate) ausmachten. Diese Arbeitsschritte wurden für alle Inkubationszeiten durchgeführt. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Fluoreszenz der Granulozyten stetig zu und die Zellpopulation „wandert“ in den oberen rechten Quadranten.

Diese Form der Datenauswertung ist schon in anderen Arbeiten verwendet worden [z. B. Schnitzler, 1999a] und zeigt für Bakterien eine gute Korrelation im Vergleich zu dem klassischen direkten Bakterizidie Assay (DBA) nach Lancefield [Schnitzler, 1995].

3.1.2 Auswertemodalität B

Einige der untersuchten Schwärzepilze (*E. castellanii*, *E. bergeri*, *H. werneckii*) ähneln in ihrer Granularität stark den Granulozyten und bilden z. T. Zellaggregate, die die Größe eines Granulozyten erreichen. In diesen Fällen kommt es somit zu einem Überlagerungsphänomen von Pilzen und Granulozyten bei der Darstellung Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H). Dies erforderte die Entwicklung einer weiteren Form der Datenauswertung.

Unter der Voraussetzung, dass ein zahlenmäßiger Zellverlust der fixierten Blut- und Pilzzellen sowie ein relevantes Wachstum der Pilzzellen während der gesamten Versuchsdauer nicht eingetreten sind, beruht die relative Zunahme von Lymphozyten mit fortschreitender Inkubationszeit einerseits auf der gleichzeitigen Abnahme der freien Pilzzellen, andererseits auf der parallelen Abnahme der Granulozyten im unteren rechten Quadranten (LR = lower right).

Beispielhaft soll das Vorgehen anhand der Versuchsergebnisse mit der Pilzspezies *Hortaea werneckii* erklärt werden. Bei den mitgeführten Kontrollproben (Vollblut ohne Pilzzugabe) wurde zunächst die relative Zellzahl der Lymphozyten sowie der Granulozyten bestimmt, welche dann zueinander in Relation gesetzt wurden.

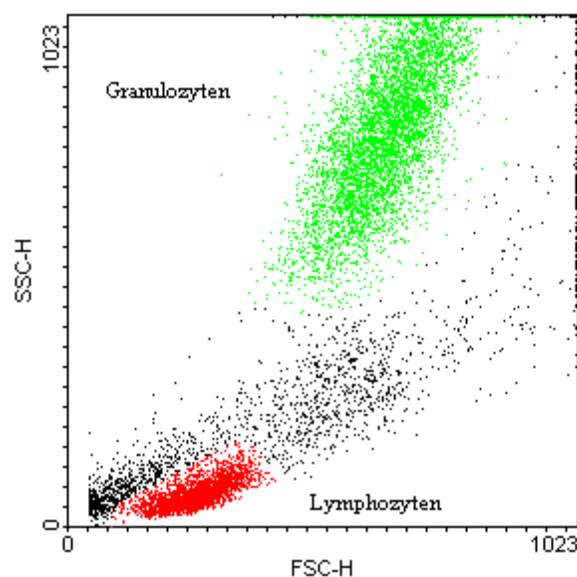


Abbildung 3.4: Farbliche Markierung durch entsprechendes Gating der Granulozyten (grün) und der Lymphozyten (rot) in einer Kontrollprobe (Vollblut ohne Pilzzugabe)

Mittels der CellQuest-Software wurde dann die absolute Zahl der markierten Zellpopulationen ermittelt. Hier in dem Beispiel wurde die Zahl der Granulozyten (grün, 5915 Messereignisse) durch die Zahl der Lymphozyten (rot, 2366 Messereignisse) geteilt und ein probanden-spezifischer **Relationsfaktor R** mit **G/L** (2,5) ermittelt. Unter der Annahme, dass das Verhältnis Granulozyten/Lymphozyten in allen Röhrchen und auch zu den unterschiedlichen Phagozytosezeiten konstant bleibt, konnte **R** bei allen Phagozytosezeiten zur Ermittlung der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten herangezogen werden.

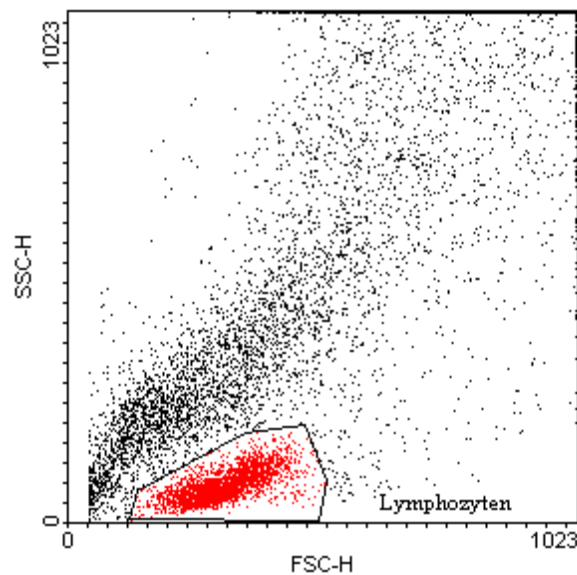


Abbildung 3.5: Markierung (= Gating) der Lymphozytenpopulation, hier im Beispiel 2245 Messereignisse (Koinkubationszeit = 60 min)

Während in diesem Versuchsansatz beim Null-Minutenwert die Zahl der Messereignisse im Auswertefenster (Lymphozyten-Gate) bei 912 (Lymphozyten) lag (nicht als Dot-plot-Darstellung abgebildet), konnten dann beim 60-Minutenwert mehr als doppelt so viele Messereignisse im gleichen Gate (2245) ermittelt werden (Abbildung 3.5).

Die Zahl der Granulozyten ohne Beteiligung an der Phagozytose konnte in der Darstellung Granularität (SSC-H) gegen Grünfluoreszenz (FL1-H) im unteren rechten Quadranten (LR) erfasst werden (wie in Abbildung 3.3 gezeigt) und lag in diesem Beispiel bei 568

Messereignissen. Multipliziert man nun die Zahl der Lymphozyten mit dem oben beschriebenen probandenspezifischen Relationsfaktor **R**, ergibt sich folgende Granulozytenanzahl:

$$(\text{Lymphozyten}) 2245 \bullet 2,5 (\mathbf{R}) = 5612 (\text{Granulozyten}_R)$$

Da 568 Messereignisse (Granulozyten) keine Fluoreszenzzunahme zeigen und somit nicht an der Phagozytose der Pilzzellen beteiligt sind, ist die Differenz aus der Gesamtsumme der Granulozyten_R (5612) und den ermittelten 568 Messereignissen (Granulozyten) im unteren rechten Quadranten (UR) ein relatives Maß für das Ausmaß der Phagozytose ($5044 = 89,9\%$).

Beim Vergleich der beiden Auswertemethoden zeigte sich eine gute Übereinstimmung in den ermittelten Ergebnissen. Für die Stämme *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei* und *Phaeoannellomyces elegans* wurde eine Auswertung mit beiden Methoden exemplarisch durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Daten hier nicht dargestellt).

3.2 Färbung der untersuchten Pilzstämme

Alle Stämme wurden, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, mit dem Fluoreszein-Ester BCECF-AM gefärbt. Nach 60-minütiger Färbezeit zeigten alle untersuchten Isolate eine effektive Fluoreszenzzunahme (Abbildung 3.6). Eine Stabilität dieser Fluoreszenz konnte bei allen Pilzen stichprobenartig auch noch eine Stunde nach Beendigung des jeweiligen Versuchsansatzes nachgewiesen werden. Somit war die Fluoreszenzintensität der Pilze zumindest in der ersten Stunde bei weitem ausreichend, um eine Detektion der jeweiligen Pilze (auch intragranulozytär) in der Durchflusszytometrie zu gewährleisten.

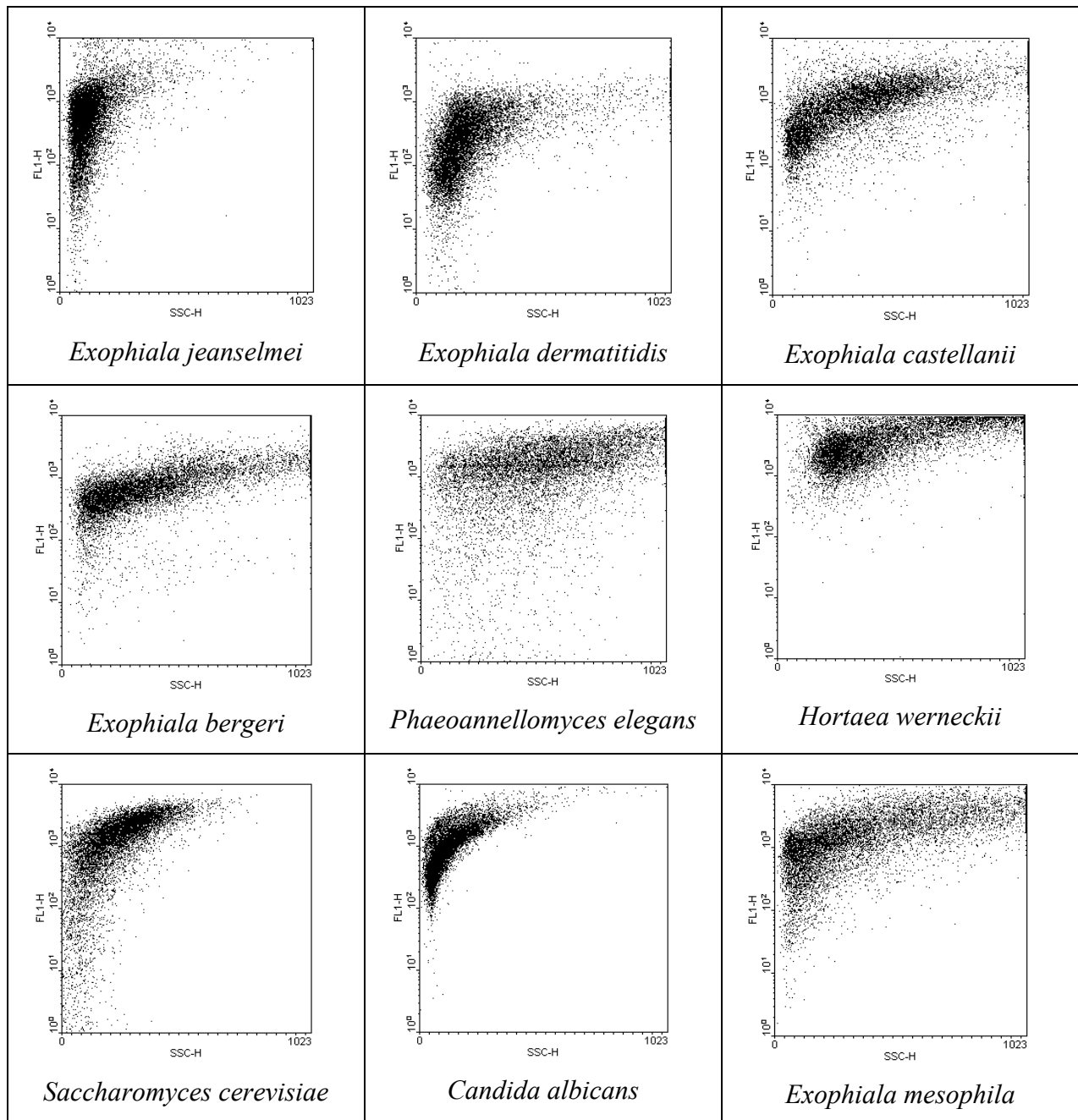


Abbildung 3.6: Dot-plot-Darstellungen (Granularität [SSC-H] gegen Grünfluoreszenz [FL1-H]) aller untersuchten BCECF-AM-markierten Pilze im FACScan-Durchflusszytometer nach 60-minütiger Färbezeit

3.3 Bindung und Phagozytose

Jede Form der Assoziation fluoreszenzmarkierter Pilze mit den ungefärbten Granulozyten führt flowzytometrisch zu einer deutlich messbaren Zunahme der Grünfluoreszenz der Granulozyten, daneben auch zu einer geringfügigen Steigerung der Granulation und Größe dieser Zellen. In der durchflusszytometrischen Messung kann dabei nicht zwischen einer oberflächlichen Bindung (leichte Adhäsion) der Pilze bis hin zur echten Phagozytose (= Internalisation) unterschieden werden. Aus diesem Grunde wurden von repräsentativen Proben, die zur Messung im Durchflusszytometer bestimmt waren, gleichzeitig eine Epifluoreszenz-/Interferenzkontrastmikroskopie zur Bestimmung der Lage der Pilze durchgeführt. Trotz verschiedener Kultivierungsmethoden und einer aufwändigen Vorbehandlung der Pilzsuspensionen (Kultivierung in Spezialmedien, Ultraschallbehandlung der Kulturen, Vortex etc.) konnte das Auftreten von Zellaggregaten und Pseudomyzel (Abbildung 3.7) nicht vollständig verhindert werden. Im Durchflusszytometer werden solche Zellaggregate nur als ein Messereignis (= eine Zelle) erfasst.

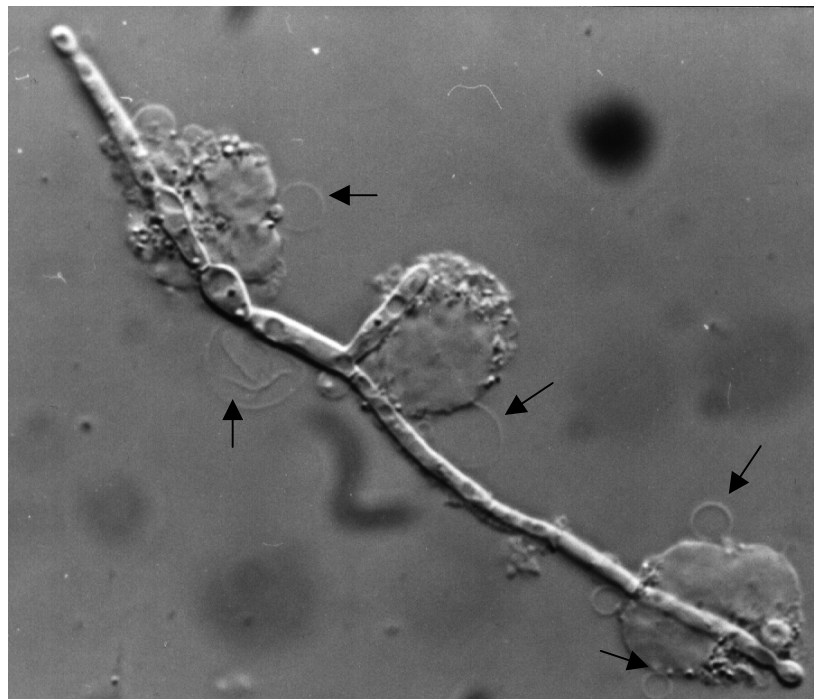


Abbildung 3.7: Phagozytierende Granulozyten an einer Pilzhyphe (*Exophiala jeanselmei*) nach 60-minütiger Koinkubationszeit mit typischen „Bleps“ (Pfeile), charakteristisch für Apoptose (Interferenzkontrastmikroskopie, Vergrößerung ca. 1:1200)

3.4 Vergleich der Phagozytose bei verschiedenen Schwärzepilzen

Die untersuchten Schwärzepilze sind im Diagramm (Abbildung 3.8) gemäß ihrer beobachteten Pathogenität (vgl. Tabelle 1.5) in aufsteigender Reihenfolge aufgetragen (von links nach rechts). Die Wertesäulen für die mituntersuchten unpigmentierten Hefen *Saccharomyces cerevisiae* befinden sich zu den unterschiedlichen Inkubationszeiten jeweils ganz links, die für *Candida albicans* jeweils ganz rechts in der Darstellung.

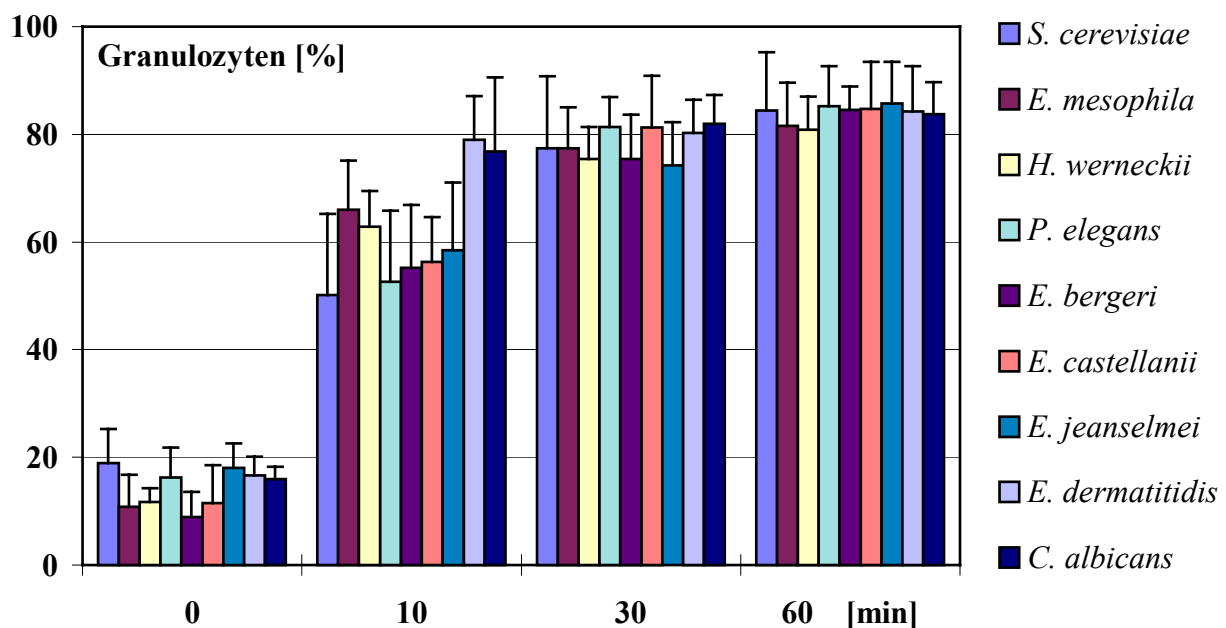


Abbildung 3.8: Vergleichende Darstellung der Phagozytoserate [%] aller untersuchten Pilzstämmen bei Koinkubation mit humanen Granulozyten (nach 10, 30, 60 min Inkubationszeit keine signifikanten Unterschiede, $n = 8$, $p > 0,05$)

Abbildung 3.8 zeigt, dass die Granulozyten bereits zu Beginn des Versuches (Nullminuten-Ansatz) eine geringe Voraktivierung aufweisen. Da diese Aktivierung für alle verwendeten Pilzstämmen auf einem durchschnittlichen Niveau von ca. 15 % liegt, bleibt eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Stämme weitestgehend erhalten. Allerdings fanden sich bei den Blutspendern interindividuelle Unterschiede sowohl bezogen auf die Voraktivierung der Granulozyten als auch in der weiteren Phagozytosekinetik.

Nach einer 10-minütigen Koinkubationszeit liegt der Anteil der phagozytierenden Granulozyten bei mindestens 50 % (maximal fast 80 % für *Exophiala dermatitidis*) und steigt nach einer

Inkubationszeit von 30 Minuten auf 75 – 80 % an. Damit ist beinahe der Maximalwert erreicht, da nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit (60-Minuten-Wert) der Anteil der phagozytierenden Granulozyten nur noch um ca. 10 % auf nahezu 80 – 85 % ansteigt. Trotz eines deutlichen Überschusses an Pilzzellen im Vergleich zu den Granulozyten ist bei keinem untersuchten Pilzstamm eine annähernd 100-prozentige Beteiligung der Granulozyten an der Phagozytose beobachtet worden.

Die größten Abweichungen zwischen den Werten für die einzelnen untersuchten Isolate finden sich nach einer 10-minütigen Koinkubationszeit. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die Standardabweichungen mit bis zu 15 % relativ hoch. Ansonsten liegen die Werte aller Pilzstämmen eng beieinander. In der weiteren statistischen Analyse konnten keine signifikanten Abweichungen bezüglich der jeweiligen Messzeitpunkte festgestellt werden. Eine Standardabweichung von 5 – 10 % (30-/60-Minuten-Wert) weist außerdem auf eine gute Reproduzierbarkeit der ermittelten Ergebnisse hin. Eine Ausnahme bilden die 30-Minuten-Werte von *Saccharomyces cerevisiae*, bei denen sich eine relativ hohe Standardabweichung von 13,5 % fand. Dies ist wahrscheinlich auf interindividuelle Unterschiede der Blutspender zurückzuführen.

3.5 Einsatz monoklonaler Antikörper (mAk) zur Phagozytoseblockade

Zur systematischen Blockade der auf Granulozyten exprimierten β_2 -Integrine wurden murine monoklonale Antikörper (mAk) verwendet, die bereits schon in anderen Phagozytosestudien eingesetzt wurden [z. B. Schnitzler, 1999a]. Dabei wurde das Ausmaß der Phagozytoseblockade folgender Koinkubationsansätze (Pilzzellen – humane Granulozyten) vergleichend untereinander untersucht:

- Versuchsansatz ohne mAk
- Versuchsansatz mit mAk gegen die gemeinsame β -Einheit der β_2 -Integrine (CD18)
- Versuchsansatz mit mAk gegen das β_2 -Integrin LFA-1 (CD18/11a)
- Versuchsansatz mit mAk gegen das β_2 -Integrin Mac-1 bzw. CR3 (CD18/11b)
- Versuchsansatz mit mAk gegen das β_2 -Integrin gp150/95 bzw. CR4 (CD18/11c)

Jede Pilzart wurde mit dem Blut von mindestens vier verschiedenen Probanden ($n = 4$) untersucht. Die folgenden Diagramme zeigen die Mittelwerte der einzelnen Messungen im Vergleich der Proben ohne mAK mit den verschiedenen antikörperhaltigen Proben jeweils zu den vier verschiedenen Inkubationszeiten (Null-Minuten-/10-Minuten-/30-Minuten-/60-Minuten-Wert). Dabei wird in dem Säulendiagramm immer der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten dargestellt. Wie in Kapitel 3.4 bereits ausgeführt, ist nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit (60-Minuten-Wert) in der in der vorliegenden Arbeit

gewählten Versuchsanordnung keine 100%ige Beteiligung der Granulozyten an der Phagozytose beobachtet worden, obwohl die Pilzzellen immer im Überschuss vorlagen. Daher wird bei der Auswertung eine signifikante Phagozytosehemmung immer als eine Differenz (in %-Punkten) angegeben im direkten Vergleich zu den Proben ohne mAk.

Die Reihenfolge der Versuchsergebnisse und der dargestellten Diagramme orientiert sich im Folgenden an der Pathogenitätsabstufung, die im ersten Kapitel näher beschrieben wurde (siehe Tabelle 1.5 und Abbildung 3.8). Die Versuchsergebnisse der einzelnen Isolate werden in aufsteigender Pathogenität (bzw. klinischer Relevanz) demonstriert.

Der als weitgehend apathogen eingestufte Pilz *Saccharomyces cerevisiae* (Abbildung 3.9) wird nur durch die gezielte Blockade des granulozytären Rezeptormoleküls Mac-1 (CD18/11b, CR3) deutlich weniger phagozytiert. Bereits nach 30-minütiger Koinkubationszeit wird dabei eine sig-

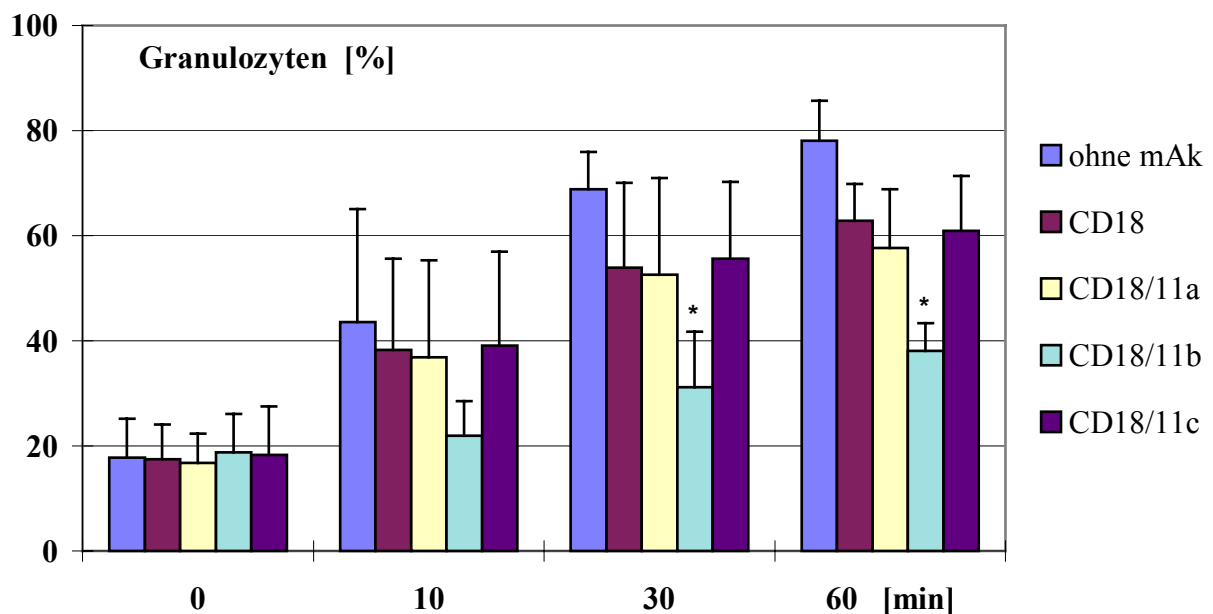


Abbildung 3.9: Inhibition der Phagozytose von *S. cerevisiae* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

nifikante Hemmung der Phagozytose um durchschnittlich ca. 40%-Punkte erreicht. Monoklonale Antikörper, gegen die β -Kette allein gerichtet (CD18), wie auch in der Kombination gegen die

anderen beiden β_2 -Integrine LFA-1 (CD18/11a) und gp150/95 (CD18/11c), beeinflussen nur marginal das Phagozytoseverhalten der Granulozyten (durchschnittlich ca. 15%-Punkte). Die in dem Diagramm angedeutete Phagozytoseblockade dieser Epitope ist nicht signifikant.

Die schwarze Hefe *Exophiala mesophila* (Abbildung 3.10), bisher nur als apathogenes Umweltisolat beschrieben, wird nach 10-minütiger Koinkubationszeit in allen antikörperhaltigen Blutproben signifikant weniger phagozytiert bei geringen Standardabweichungen (< 11). Diese anfängliche Verzögerung der Phagozytose (zwischen 25%- und 50%-Punkte) wird zum Ende der Versuchsdauer nur noch als signifikante Phagozytoseblockade durch die gegen das Mac-1-Molekül (CD18/11b) gerichteten mAk (ca. 30%-Punkte) beobachtet. Monoklonale Antikörper gegen das gp150/95-Molekül (CD18/11c) bewirken dagegen eine deutlich weniger stark ausgeprägte Blockade (ca. 10%-Punkte).

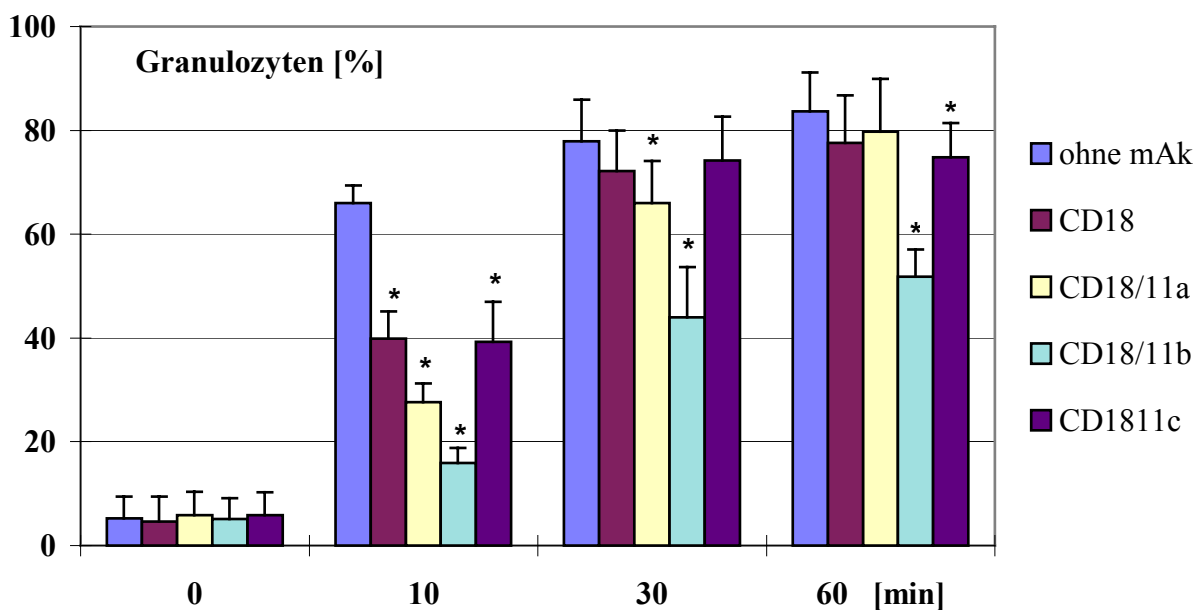


Abbildung 3.10: Inhibition der Phagozytose von *E. mesophila* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind ($n = 4$, $*p < 0,05$)

Der 10-Minuten-Wert zeigte bereits beim Vergleich der Phagozytose aller in dieser Arbeit untersuchten Pilze die höchsten Schwankungen auf (vgl. Kapitel 3.4). Dieses Phänomen scheint in erster Linie durch interindividuelle Unterschiede der Blutspender erklärbar zu sein und findet sich auch noch in anderen Darstellungen (z. B. Abbildung 3.15 oder 3.17). Die Phagozytose-

kinetik zeigt bei allen untersuchten Pilzen einen logarithmischen Verlauf und demzufolge zu Beginn aller Koinkubationsansätze relativ starke Schwankungen.

Als Verursacher von oberflächlichen Hautmykosen zeigt *Hortaea werneckii* (Abbildung 3.11) bereits beim Nullwert eine unterschiedliche Voraktivierung der Granulozyten. Eine Vorinkubation der Granulozyten mit mAk gegen das LFA-1-Molekül (CD18/11a) und mAk gegen das Mac-1-Molekül (CD18/11b) hemmen die Voraktivierung am stärksten, mAk gegen das gp150/95-Molekül zeigen dagegen keinen Effekt. Am Ende der Koinkubationszeit (60-Minuten-Wert) lässt sich dann eine signifikante Phagozytoseblockade durch den Einsatz mAk gegen alle drei β_2 -Integrine beobachten. Dabei bewirken mAk gegen das Mac-1-Molekül die deutlichste Phagozytosehemmung (ca. 40%-Punkte). Wie aus dem Diagramm weiter zu erkennen ist, führt die alleinige Verwendung mAk (CD18) gegen die gemeinsame β -Kette der β_2 -Integrine zu einer

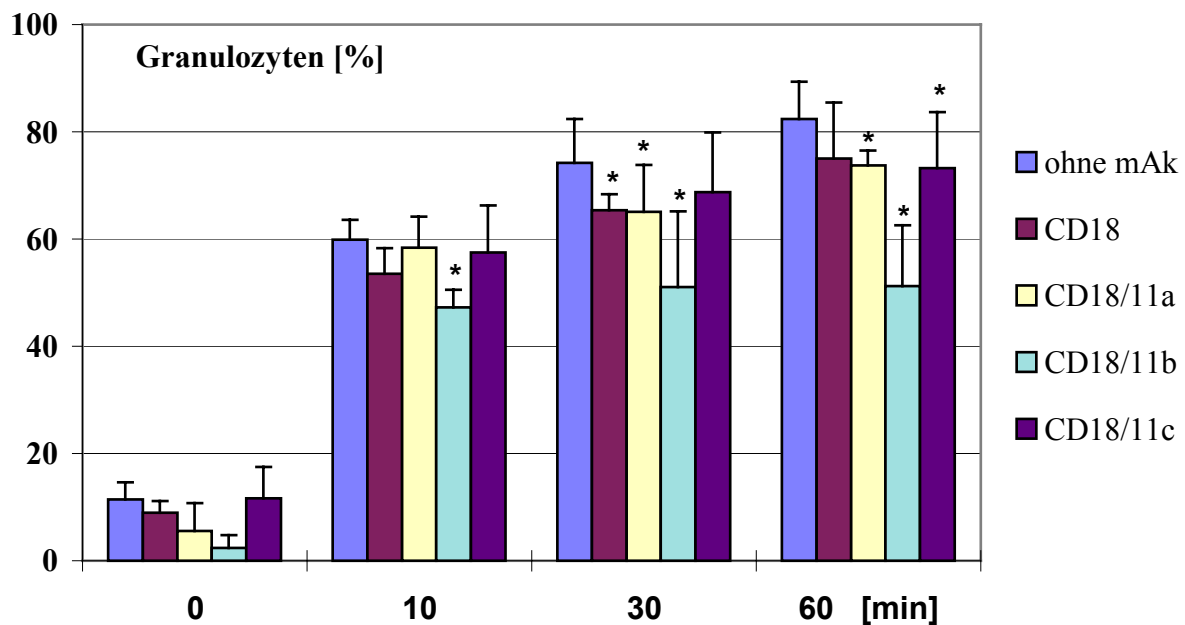


Abbildung 3.11: Inhibition der Phagozytose von *H. werneckii* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

nicht signifikanten Phagozytoseblockade (Ausnahme: 30-Minuten-Wert). Im direkten Vergleich zu der Vorinkubation der Granulozyten mit Antikörpern gegen die Zellepitope CD18/11a bzw. CD18/11c ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Phaeoannellomyces elegans (Abbildung 3.12) ist eine schwarze Hefe, die klinisch bisher nur sehr selten in Erscheinung getreten ist. Bereits nach 30 Minuten Koinkubation lässt sich die Phagozytose dieser Hefe durch mAk gegen alle drei β_2 -Integrine auf den Granulozyten signifikant inhibieren um durchschnittlich ca. 30%-Punkte. Zum Ende der Koinkubationszeit zeigen alle antikörperhaltigen Proben eine signifikante Reduktion der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten weiterhin um durchschnittlich ca. 30%-Punkte. Eine noch deutlichere Phagozytosehemmung wird durch mAk (CD18/11b) gegen den granulozytären Mac-1-Rezeptor erreicht. Hierbei kann sogar eine Reduktion der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten um ca. 40% beobachtet werden.

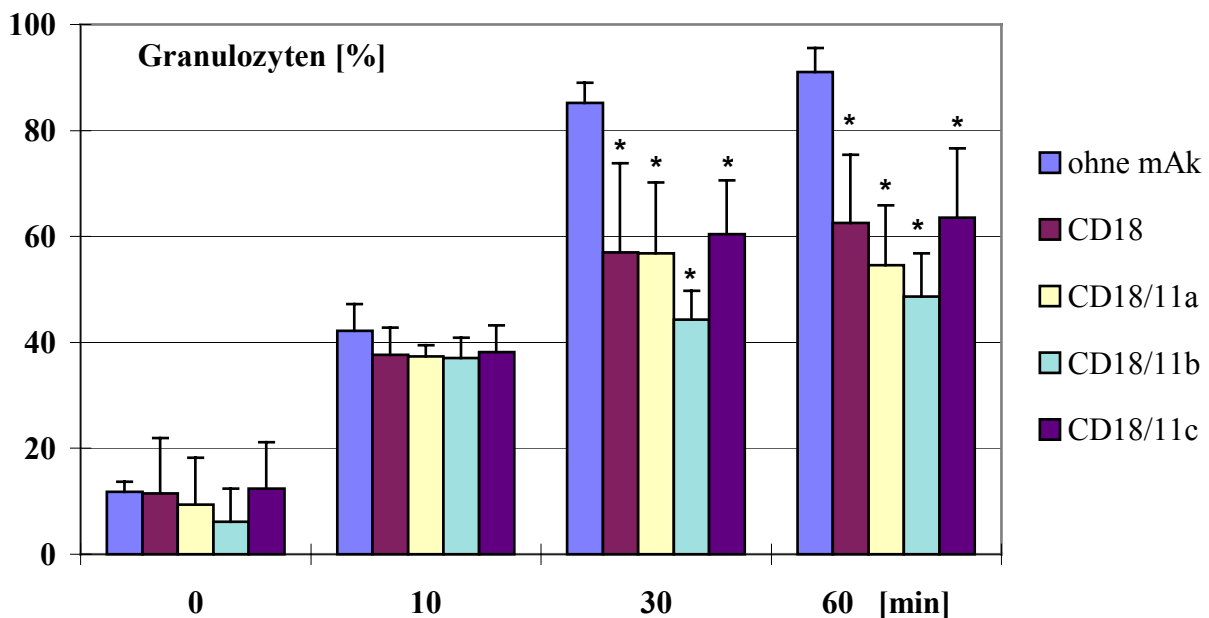


Abbildung 3.12: Inhibition der Phagozytose von *P. elegans* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

Exophiala bergeri (Abbildung 3.13) gilt eher als ein seltener Vertreter innerhalb der Schwärzepilze hinsichtlich opportunistischer Pilzinfektionen beim Menschen. Bei diesem Pilz bewirkt die Vorinkubation der Granulozyten mit mAk (CD18), die allein gegen die β -Einheit der β_2 -Integrine gerichtet sind, beim 10-Minuten-Wert die stärkste Hemmung der Phagozytose um ca. 25%-Punkte. Nach 30-minütiger Koinkubation (wie auch beim 10-Minuten-Wert) zeigen alle antikörperhaltigen Proben noch eine signifikante Phagozytoseblockade (20%- bis 30%-Punkte), teilweise aber mit großen Standardabweichungen. Am Ende der Koinkubationszeit wird dann nur noch eine signifikante Inhibition der Phagozytose durch mAk (CD18/11b) gegen das Mac-1-Molekül beobachtet.

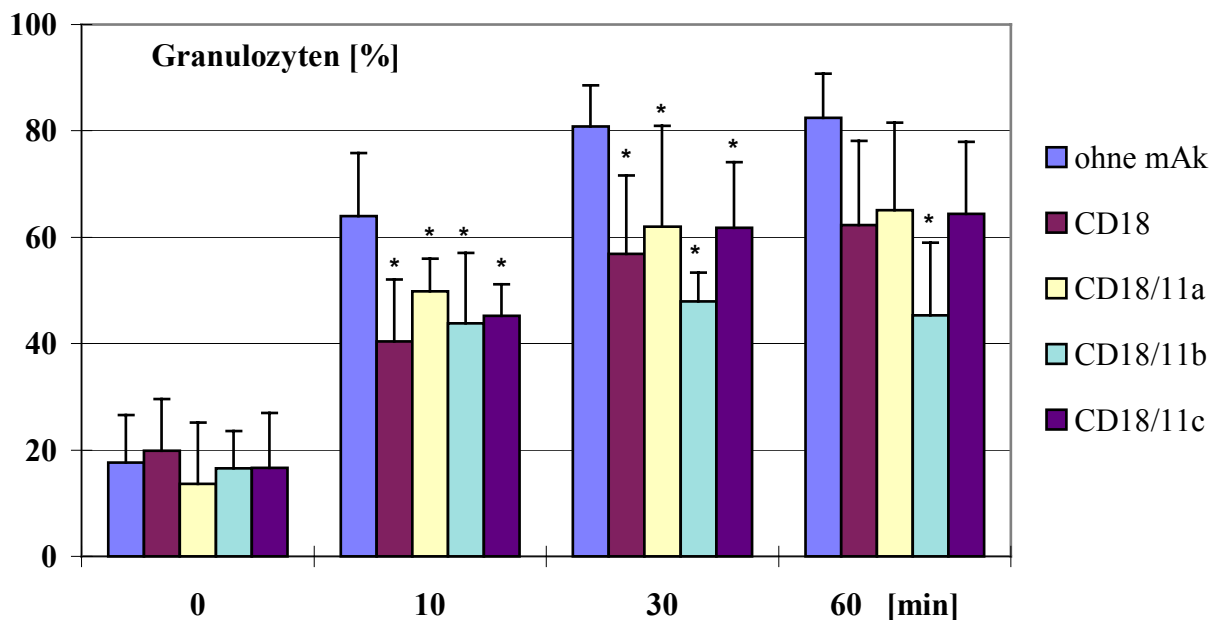


Abbildung 3.13: Inhibition der Phagozytose von *E. bergeri* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

Der untersuchte Stamm *Exophiala castellanii* (Abbildung 3.14) wurde bisher eher selten als Verursacher von Phaeohyphomykosen beim Menschen isoliert. In allen antikörperhaltigen Koinkubationsansätzen zeigte der 10-Minuten-Wert eine signifikante Phagozytoseblockade um durchschnittlich ca. 20%-Punkte. Im weiteren Verlauf wird der Blockadeeffekt aber deutlich geringer, so dass die größte Hemmung der Phagozytose durch den Einsatz mAk (CD18/11b) gegen das Mac-1-Molekül um ca. 30%-Punkte sowohl nach 30- wie auch nach 60-minütiger Koinkubationszeit zu beobachten ist.

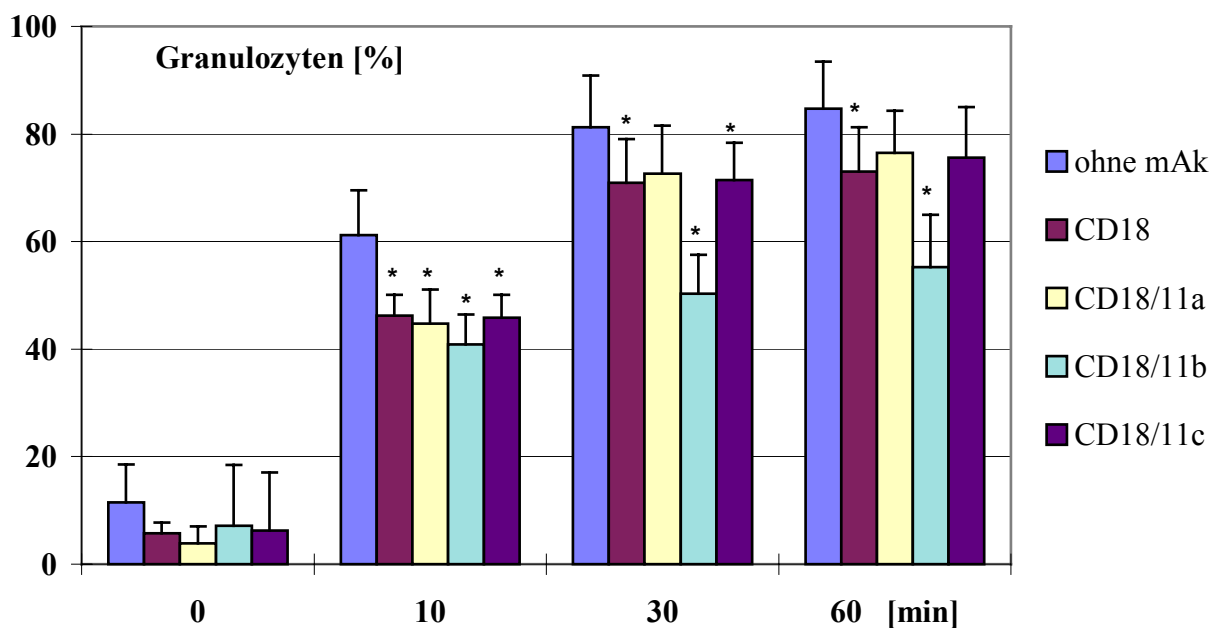


Abbildung 3.14: Inhibition der Phagozytose von *E. castellanii* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

Von den Schwärzepilzen wird *Exophiala jeanselmi* mit am häufigsten als Erreger von Mykosen beim Menschen isoliert. Eine signifikante Hemmung der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten wird nach 10-minütiger Koinkubation mit humanen Granulozyten nur durch mAk (CD18/11b) gegen das Mac-1-Molekül erreicht (Abbildung 3.15). Die Blockade des Mac-1-Rezeptors führt zu einer progredienten Inhibition der Phagozytose von anfangs ca. 35%-Punkte (10-Minuten-Wert) auf zuletzt ca. 45%-Punkte. Antikörper gegen die beiden anderen β_2 -Integrine auf den Granulozyten bewirken am Ende der Koinkubationszeit auch eine signifikante Blockade der Phagozytose. Diese ist aber deutlich geringer ausgeprägt (nur ca. 15%-Punkte).

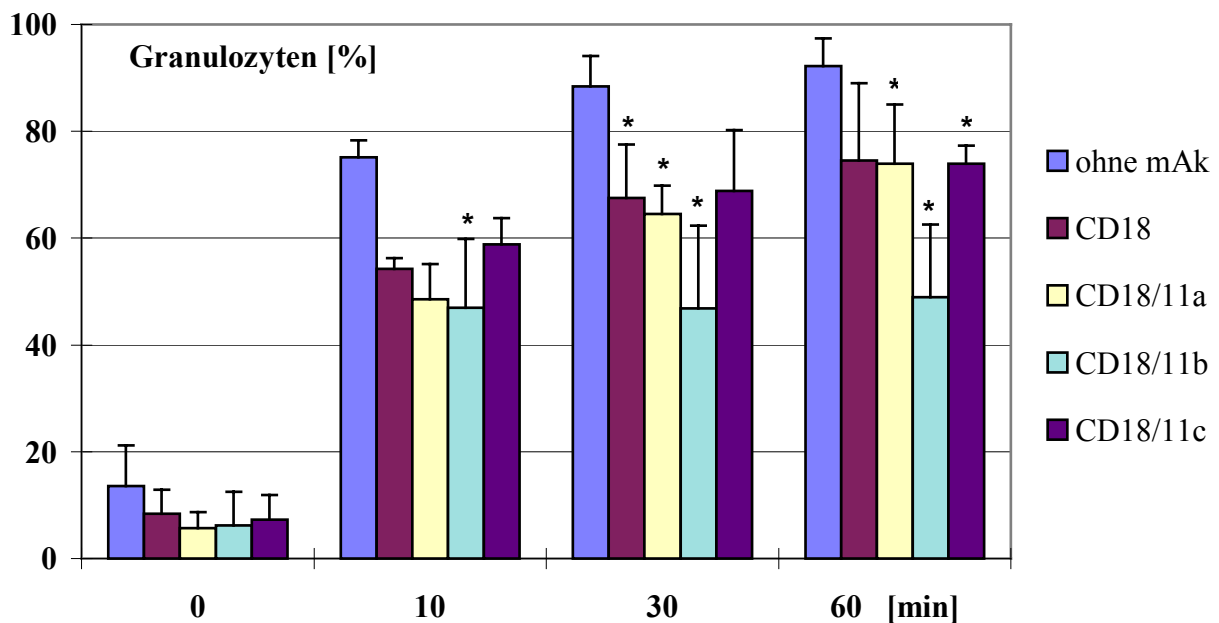


Abbildung 3.15: Inhibition der Phagozytose von *E. jeanselmi* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

Das Spektrum der Erkrankungen des Menschen, verursacht durch *Exophiala dermatitidis* (Abbildung 3.16), reicht von rein oberflächlichen bis hin zu häufig letal verlaufenden systemischen Infektionen. Die Phagozytose dieser Spezies wird ausschließlich durch Vorinkubation humaner Granulozyten mit mAk (CD18/11b) gegen den Mac-1-Rezeptor signifikant gehemmt. Bereits nach 10-minütiger Koinkubation beteiligen sich nur ca. 35 % aller Granulozyten an der Phagozytose, beim 30- bzw. 60-Minuten-Wert steigt dieser Wert auf maximal 40 %. Im Vergleich dazu steigt dieser Wert in den Ansätzen ohne mAk von 75 % (10-

Minuten-Wert) kontinuierlich auf über 80 % (60-Minuten-Wert). Durchschnittlich wird eine signifikante Hemmung der Phagozytose um 40- bis 45%-Punkte beobachtet. Wie aus dem Diagramm ersichtlich, scheinen die mAk gegen das LFA-1-Molekül (CD18/11a) bzw. gegen das gp150/95-Molekül (CD18/11c) beim 30- und 60-Minuten-Wert tendenziell eine leichte Aktivierung der Phagozytose zu bewirken. Dieser Effekt wurde nur in den Versuchsreihen mit *E. dermatitidis* beobachtet, ist aber statistisch nicht signifikant.

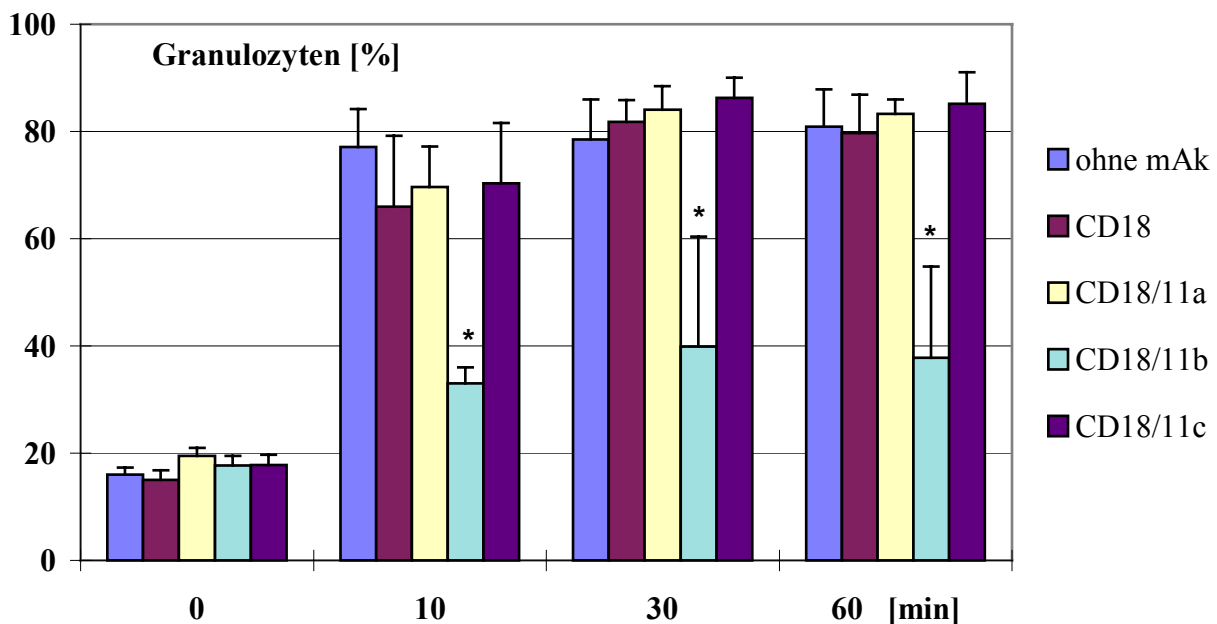


Abbildung 3.16: Inhibition der Phagozytose von *E. dermatitidis* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

Die unpigmentierte Hefe *Candida albicans* (Abbildung 3.17) ist ein fakultativ pathogener Keim und wird von allen humanpathogenen Pilzen am häufigsten isoliert. In der hier vorliegenden Phagozytosestudie werden in allen antikörperhaltigen Proben beim 10-Minuten-Wert eine Inhibition der Phagozytose um mindestens 20%-Punkte erreicht. Eine signifikante Hemmung wird zu diesem Zeitpunkt nur für mAk (CD18) gegen die β -Kette der β_2 -Integrine und mAk (CD18/11a) gegen das LFA-1-Molekül beobachtet. Eine Blockade des granulozytären Mac-1-Rezeptors durch mAk (CD18/11b) führt allerdings bereits schon nach einer 10-minütigen Koinkubation zu einer noch deutlicheren (signifikanten) Hemmung der Phagozytose um ca. 45%-Punkte. Während des 30- und 60-Minuten-Wertes wird dann nur noch eine signifikante

Inhibition der Phagozytose durch mAk (CD18/11b) gegen das Mac-1-Molekül gesehen (jeweils ca. 40%-Punkte).

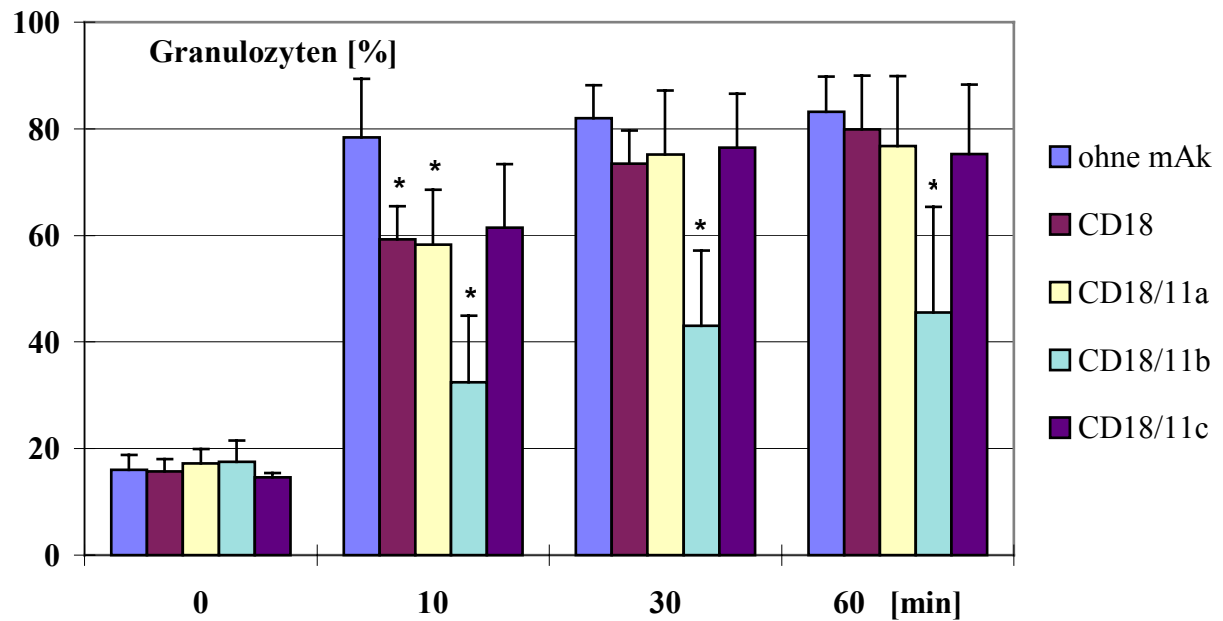


Abbildung 3.17: Inhibition der Phagozytose von *C. albicans* durch Vorinkubation mit mAk, die gegen verschiedene Epitope auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten gerichtet sind (n = 4, *p < 0,05)

3.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Phagozytoseblockade

Zu Beginn des Versuches (Null-Minuten-Wert) zeigen die Granulozyten aller Ansätze eine geringe Voraktivierung. Dieses Phänomen wurde bereits in Kapitel 3.4 diskutiert und liegt auf einem durchschnittlichen Niveau von ca. 10-15 %. In der Regel finden sich dabei geringe Standardabweichungen (< 10 %), so dass die ermittelten Ergebnisse auf eine gute Reproduzierbarkeit hinweisen.

Bei einigen Versuchsreihen wird diese Voraktivierung der Granulozyten durch Vorinkubation mit mAk deutlich gehemmt (z. B. Abbildung 3.14). Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit liegt der Anteil der phagozytierenden Granulozyten bereits zwischen 45 – 75 %. Dabei lässt sich bei fast allen Pilzstämmen eine signifikante Blockade der Phagozytose durch mAk erzielen, am häufigsten durch die Kombination mAk (CD18 und CD11b). Dieser Trend setzt sich mit zunehmender Inkubationszeit fort, so dass bei allen Isolaten zum Ende der 60-minütigen Koinkubationszeit eine signifikante Blockade des granulozytären Rezeptors MAC-1 (CD18/11b) erreicht wird (Tabelle 3.1). Diese signifikante Blockade wird auch schon durchgehend bei allen Pilzen bereits nach 30-minütiger Koinkubation beobachtet.

Wie aus den Diagrammen in den Abbildungen 3.9 – 3.17 zu erkennen ist, findet man insbesondere bei den Versuchsansätzen mit Blockade der β_2 -Integrine durch mAk Standardabweichungen bis ca. 20 % (10, 30, 60 min). Diese starken Schwankungen, die in den Ansätzen zur Erfassung des Phagozytoseausmaßes so nicht feststellbar waren (vgl. Kapitel 3.4), können auf folgenden Ursachen beruhen:

- (i) Bei den offensichtlich gesunden Blutspendern findet sich immer eine variable Anzahl von Granulozyten (ca. 1800 – 7500/ μ l Blut [vgl. Tabelle 1.3]) im Blut.
- (ii) Die Expression granulozytärer Rezeptoren ist keine statische Größe und hängt von verschiedenen stimulierenden Faktoren ab [Springer, 1990].
- (iii) Obwohl mAK immer im Überschuß vorlagen, scheint die individuelle Immunantwort der einzelnen Blutspender stark zu variieren. Eine damit verbundene unterschiedliche Kinetik der Phagozytose, zumindest in den ersten 60 Minuten nach erfolgter Koinkubation, könnte eine mögliche Erklärung der oben genannten Schwankungen bezüglich der Standardabweichung sein.

Tabelle 3.1: Anteil der phagozytierenden Granulozyten an den Gesamtgranulozyten bezogen auf die untersuchten Stämme ohne und mit Mac-1-Antikörper (CD18/11b) nach 60-minütiger Koinkubation (signifikante Phagozytoseblockade mit $\alpha < 0,05$; n = 4)

Spezies	Anteil phagozytierender Granulozyten (%) (absoluter Wert)		Phagozytoseinhibition (%) (relativer Wert) *
	ohne mAK (MW $\pm$ STAW)	mAK (CD11b/CD18) (MW $\pm$ STAW)	
<i>S. cerevisiae</i>	78,1 $\pm$ 7,5	38,1 $\pm$ 5,9	51
<i>E. mesophila</i>	84,4 $\pm$ 7,4	47,6 $\pm$ 5,2	44
<i>H. werneckii</i>	82,4 $\pm$ 7,0	51,2 $\pm$ 11,3	38
<i>P. elegans</i>	91,1 $\pm$ 4,4	48,6 $\pm$ 14,3	47
<i>E. bergeri</i>	84,0 $\pm$ 8,3	45,0 $\pm$ 13,5	47
<i>E. castellanii</i>	84,7 $\pm$ 8,7	55,3 $\pm$ 9,6	35
<i>E. jeanselmei</i>	92,2 $\pm$ 5,2	49,0 $\pm$ 13,5	47
<i>E. dermatitidis</i>	80,9 $\pm$ 6,9	37,9 $\pm$ 16,9	53
<i>C. albicans</i>	83,2 $\pm$ 6,6	45,6 $\pm$ 19,8	45

MW = Mittelwert (n = 4) STAW = Standardabweichung

* Wert ohne mAK = 100 %, Phagozytoseinhibition darauf bezogen

4 Diskussion

4.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Phagozytose verschiedener Pilzarten aus der Gruppe der ascomycetalen schwarzen Hefen. Um das Phagozytoseausmaß der untersuchten Stämme und die für die Phagozytose notwendigen granulozytären Rezeptoren verlässlich und reproduzierbar zu bestimmen, waren in der vorliegenden Arbeit folgende Voraussetzungen von grundlegender Bedeutung:

1. Die Untersuchung einer Stichprobe von Schwärzepilzen, die ein möglichst breites, repräsentatives Spektrum klinischer Erkrankungen bis hin zum primär ubiquitären Vorkommen abdecken sollte.
2. Eine hinreichende Blockade der für die Phagozytose in Frage kommenden granulozytären Rezeptoren (aus der Gruppe der β_2 -Integrine).
3. Eine möglichst weitgehende Standardisierung bei der Versuchsdurchführung.

4.1.1 Auswahl der Pilzisolat

Bei der Auswahl der Schwärzepilze sollten sich die verwendeten Stämme möglichst nur in ihrer Pathogenität unterscheiden, um so eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Stämme zu gewährleisten. Zu der Gruppe der hochpathogenen Pilze gehörten dabei *Exophiala dermatitis* und *Exophiala jeanselmei*, die als klinische Isolate bisher am häufigsten in Erscheinung getreten sind. Beide Spezies sind Erreger der Phaeohyphomykose, die sowohl subkutane als auch systemische Infektionen mit massivem Organbefall hervorrufen kann [Kwon-Chung, 1992]. Als eher schwach pathogene Erreger wurden *Exophiala castellanii*, *Exophiala bergeri*, *Phaeoannellomyces elegans* und *Hortaea werneckii* untersucht. Als klinische Isolate sind sie mit Ausnahme von *H. werneckii* eher eine Rarität, in den bisher bekannt gewordenen Fälle traten lediglich oberflächliche kutane und subkutane Mykosen auf (vgl. Kapitel 1.4). Aus der Gruppe der Umweltisolate wurde *Exophiala mesophila* untersucht, die bislang nicht als Krankheitserreger beschrieben ist [Listemann, 1996].

Die als Referenzstämme eingesetzten weißen Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* sind zwar nicht mit den Schwärzepilzen verwandt, wurden aber in zahlreichen Studien sehr gut untersucht [z. B. Martin, 1991; Schnitzler, 1999; Rotstein, 2000]. Anhand von *C. albicans* konnten so die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit denen der Literatur

verglichen werden. Auf diese Weise ließ sich die Aussagekraft der hier verwendeten Methoden überprüfen.

Neben dem Spektrum der oben aufgeführten Pathogenität spielten auch morphologische Eigenschaften eine wichtige Rolle. Ein Kriterium für die Auswahl geeigneter Pilzisolates bestand in der Möglichkeit, ein identisches hefeförmiges Wachstum unter Laborbedingungen zu erzielen, d. h. primär und überwiegend in der Hefeform vorliegende, homogene Pilzsuspensionen mit möglichst wenigen Hyphen bzw. Myzelien zu kultivieren. Regelmäßige mikroskopische Untersuchungen aller in Frage kommenden Zellsuspensionen dienten sowohl zur Kontrolle der erwünschten Wachstumsform als auch der Erkennung einer möglichen bakteriellen Kontamination.

Das unizelluläre Vorkommen der Pilze ist absolut notwendig für durchflusszytometrische Untersuchungen zur Erlangung quantitativ eindeutiger, reproduzierbarer Ergebnisse. Bei der Untersuchung von Hefezellen (u. a. *C. albicans* [Chang, 1998]), insbesondere aber auch für die schwarzen Hefen *Exophiala dermatitidis* und *Exophiala jeanselmei* wurde die Durchflusszytometrie bereits als ein Verfahren zur Differenzierung beider Keime mit Erfolg eingesetzt [Taguchi, 1988].

Andere klinisch relevante Schwärzepilze wie *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium mackenziei* oder *Cladophialophora bantiana* erfüllten die oben genannten Bedingungen leider nicht und konnten auch nach mehrfacher Anwendung unterschiedlicher Kultivierungstechniken nicht vergleichend mituntersucht werden.

4.1.2 Auswahl des fluorochromen Markers

1982 wurde erstmalig BCECF-AM (2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-pentaacetoxymethyl-ester) von Rink und Tsien [Rink, 1982] beschrieben und als Indikator für intrazelluläre pH-Messungen eingesetzt. Sein häufiger Einsatz ist u. a. in folgenden Eigenschaften begründet:

- Die Eigenschaft, Zellwände und zytoplasmatische Membranen zu permeieren, ermöglicht ein nichtinvasives „Beladen“ unterschiedlicher Zellsuspensionen.
- Durch einen pKa Wert von 7,0 wird eine lineare Fluoreszenzemission gewährleistet. Auch passt dieser pKa Wert zu den physiologischen Schwankungen des zytoplasmatischen pH (6.5-7.5).

- BCECF-AM selbst ist nicht fluoreszierend. Die intrazelluläre Spaltung durch ubiquitäre zytoplasmatische Esterasen in das fluoreszierende BCECF-Molekül ist somit Indikator für die Vitalität der Zellen.
- Das intrazelluläre BCECF kann aufgrund seiner negativen Ladung die zytoplasmatische Membran nicht permeieren und wird dadurch in den Zellen zurückgehalten.
- BCECF hat ein pH-abhängiges Absorptionsmaximum von etwa 500 nm.

Alle hier verwendeten Stämme wurden wie beschrieben mit BCECF-AM gefärbt. Mehrere Untersucher haben schon BCECF-AM als fluoreszierenden Marker von Bakterien [z. B. Schnitzler, 1995; Podbielski, 1996] und Pilzen [z. B. Martin, 1991; Polacheck, 1995; Schnitzler, 1999a & b] in verschiedenen Phagozytoseansätzen eingesetzt. Dabei zeigte die Substanz selbst keinen Einfluss auf die Phagozytose im Vergleich zu nicht markierten Mikroorganismen. In den bisher durchgeführten Studien konnte auch eine Beeinträchtigung der Vitalität der jeweiligen Mikroorganismen nicht beobachtet werden.

Schnitzler [Schnitzler, 1995] und Podbielski [Podbielski, 1996] konnten in ihren Untersuchungen eine annähernd gleich bleibende Fluoreszenzintensität bei Bakterien für mehrere Stunden nach erfolgter Färbung nachweisen. Auch bei einer durchflusszytometrischen Untersuchung mit *Exophiala dermatitidis* zeigte die schwarze Hefe nach erfolgter Färbung mit BCECF-AM keine Abnahme der Fluoreszenzintensität während der ersten 60 Minuten [Schnitzler, 1999a]. Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Allerdings weisen die melaninhaltigen Schwärzepilze eine etwas geringere Fluoreszenzintensität auf als die hier mituntersuchten und unpigmentierten Pilzstämme (*C. albicans*, *S. cerevisiae*). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf den abschirmenden Effekt des in der Zellwand eingelagerten Melanins zurückzuführen. Melaninablagerungen in der Zellwand können sowohl die Anregung des BCECF durch den Argonlaser als auch die Emission des Fluorochroms behindern [Schnitzler, 1999a]. Trotz dieses Effektes ließ sich auch bei den melaninhaltigen schwarzen Hefen mit BCECF-AM eine stabile Grünfluoreszenz erzeugen, deren Intensität problemlos im Durchflusszytometer zu detektieren war (siehe Abbildung 3.6). Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass der als Lichtquelle eingesetzte Argonlaser im FACScan-Durchflusszytometer seinen Emissionspeak (488 nm) im Absorptionsbereich des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs BCECF (460 - 508 nm) hat [Schmitz, 1994].

4.1.3 Heparinisiertes Vollblut

In vielen älteren Studien wurden isolierte Granulozyten für die Untersuchung der Phagozytose verwendet [z. B. Martin 1991]. Häufig wurde dabei eine Dichtegradientenseparation (z. B. Dextran-Sedimentation) durchgeführt, wobei dafür relativ große Blutvolumina benötigt wurden.

Diese zeitaufwändige Methode führte jedoch zu einer artifiziellen und im Ausmaß wenig kontrollierbaren Voraktivierung der Granulozyten und beeinflusste damit erheblich die Interaktion von Mikroorganismen und Granulozyten [Podbielski, 1995; Schnitzler, 1995]. Um diese Voraktivierung der Granulozyten zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit Vollblut vom Aspekt her und auf Befragen hin gesunder Spender gearbeitet. Der Einsatz von Vollblut führt nur zu einer geringen Manipulation der Blutzellen und schafft dadurch annähernd physiologische Bedingungen [Gabrilovich, 1991; Perticarari, 1994].

Für jeden Versuchsansatz wurde unter sterilen Kautelen durch Punktion einer Armvene Blut zur sofortigen Weiterverarbeitung (Antikörperzugabe und Koinkubation mit den gefärbten Pilzzellen) eingesetzt. Bereits bei der Blutentnahme war in den verwendeten Abnahmespritzen Heparin vorgelegt, um eine Gerinnung zu verhindern. Salih und seine Mitarbeiter konnten einen inhibitorischen Effekt des Heparins auf das Ausmaß der Phagozytose nachweisen, der allerdings stark konzentrations-abhängig ist und erst ab einer Menge von 50 I.E./ml Blut wirksam wird [Salih, 1997]. Da in dieser Studie alle Blutproben mit einer deutlich geringeren und immer gleichen Menge Heparin (10 I. E. Heparin/ml) versehen worden sind und der Wirkstoff durchweg vom gleichen Hersteller stammte, kann der inhibitorische Einfluss des Heparins als minimaler, systemischer Fehler akzeptiert werden.

Zur Vermeidung probandenabhängiger Effekte wurden für Messungen zu einer Spezies stets verschiedene Spender herangezogen. Diese wurden nicht auf das Vorliegen spezifischer Antikörper untersucht, da für die meisten hier eingesetzten schwarzen Hefen entsprechende Antikörpertests bisher nicht zur Verfügung stehen. Für *Exophiala dermatitis* konnte aber gezeigt werden, dass im Blut gesunder Erwachsener in der Regel keine nachweisbare Konzentration von spezifischen Antikörpern gegen diesen Pilz vorliegt [Haase, 1997]. Man kann jedoch aufgrund der geringen Erkrankungsrate der Bevölkerung und dem bisher bekannten Vorkommen von *Exophiala dermatitis* davon ausgehen, dass im Blut eines gesunden Erwachsenen keine bzw. nur eine sehr geringe Konzentration von spezifischen Antikörpern gegen die schwarzen Hefen vorliegt. Eine erhebliche Beschleunigung der Phagozytose einzelner Pilzstämmen durch erhöhte Antikörperkonzentrationen und die damit verbundene Beeinträchtigung der Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsergebnisse kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass durch die Verwendung des Blutes offensichtlich gesunder Spender keine systematische Beeinflussung der Versuchsergebnisse auftritt.

4.1.4 Verfahren zur Bestimmung und Einstellung der Zahl der Hefen

Für die Untersuchung der Phagozytoserate war die Relation von Pilzzellen zu Granulozyten von entscheidender Bedeutung. In den Versuchsansätzen sollten die Pilzzellen stets im Überschuss vorliegen, da die Granulozyten mehrere Pilzzellen aufnehmen können und so keine Limitierung seitens der Granulozyten vorliegen sollte. Dabei erwies sich ein Verhältnis von 1,5 - 2,5 Pilzzellen pro Granulozyt für die Untersuchung der Phagozytose als besonders geeignet [Wilson, 1985; Martin 1991], da bei diesem Verhältnis statistisch gesehen alle Granulozyten die Möglichkeit zur Phagozytose haben. Auf diese Weise konnten maximale Phagozytoseraten gemessen werden. Gleichzeitig blieb die Auswertbarkeit der Ergebnisse erhalten, da ein zu großer Pilzüberschuss die Population der Granulozyten in der Auswertung überlagern kann und so eine qualitativ gesicherte Analyse der Granulozyten behindert. Umgekehrt wird nur eine sehr geringe Beteiligung der Granulozyten an der Phagozytose der Pilzzellen beim Vorliegen eines deutlichen Granulozytenüberschusses beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) eine homogene Pilzsuspension für jeden Versuchsansatz neu hergestellt. Zeitaufwändige Methoden wie die Zählkammer (Bürker-Kammer) wurden zur Bestimmung der Zellzahl/ml Flüssigkeit nicht eingesetzt, dafür kam ein spektrophotometrisches Verfahren, die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}), zum Einsatz. Die OD_{600} gilt als ein relatives Maß für die in einer wässrigen Zellsuspension enthaltene Zellzahl/ml. In mehreren Vorversuchen wurde für jeden verwendeten Keim eine annähernd optimale OD_{600} -Zahl ermittelt, die zu dem gewünschten Pilz-/Granulozyten-Verhältnis führte. Allerdings ist die OD_{600} ein relativ ungenaues Maß. Aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen, Bildung von Aggregaten und ähnlicher Effekte konnte bei mehrfacher Einstellung des gleichen OD_{600} -Wertes bei einer Pilzart eine unterschiedliche Zellzahl resultieren. Zur Vermeidung größerer Zellaggregate und einer möglichen Vereinzelung der Hefezellen wurde jede verwertbare Pilzsuspension einer Ultraschallbehandlung zugeführt. Da nur gesunde Probanden als Blutspender eingesetzt wurden, konnte man von tolerierbaren Schwankungen der Granulozyten/ml Blut (durchschnittlich 4.000 – 6.000/ μ l) zwischen den einzelnen Spendern ausgehen.

Um vergleichbare Ergebnisse für alle untersuchten Pilzstämme zu erzielen, wurden nur solche Messansätze für die statistische Auswertung verwendet, bei denen das Verhältnis von Pilzzellen zu Granulozyten annähernd optimal war. Daher mußten insgesamt ca. 15 Messungen durchgeführt werden, um zehn verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Dazu wurden die sogenannten „Nullproben“ (keine Phagozytose, da die Koinkubation von Vollblut und Hefen auf Eis erfolgte)

im Durchflusszytometer nach erfolgter Messung in der weiteren Analyse auf das gewünschte Pilz/Granulozyten-Verhältnis hin untersucht.

Zur Minimierung dieses Mehraufwandes könnte zukünftig eine andere Zählmethode für die Einstellung der Pilzzellen und die Entwicklung einer schnellen Zählmethode für die Granulozyten beitragen. Mit der strengerer Einhaltung eines immer gleich bleibenden Pilz-/Granulozyten-Verhältnisses könnte zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse weiter verbessert werden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für das Ausmaß der Phagozytose der einzelnen Pilze liegen jedoch so eng beieinander, dass auch mit einer Verbesserung der Methodik keine grundlegende Veränderung der Ergebnisse zu erwarten ist.

4.1.5 Verfahren zum Ansetzen des Phagozytose-Assays

Alle Versuchsansätze wurden stets nach dem gleichen Schema durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und zufällige Fehler zu vermeiden. Die Verwendung gleicher Volumina Vollblut (100 µl), gleicher Volumina monoklonaler Antikörper (15 µl) und gleicher Volumina gefärbter Hefezellen führte zu einer Standardisierung des Reaktionsansatzes. Jedes Röhrchen wurde anhand eines für jeden Versuchsansatz neu erstellten Protokolls so beschriftet, dass eine eindeutige Identifikation (Phagozytosezeit, Art der zugegebenen Antikörper) gewährleistet wurde. Die mit wasserfester Farbe beschrifteten Röhrchen ermöglichten auch bei der Messung am Durchflusszytometer eine sichere Zuordnung der einzelnen Proben.

Um die benötigte Blutmenge sowie die Menge der verwendeten monoklonalen Antikörper möglichst gering zu halten, wurden die einzelnen Versuchsansätze mit kleinen Volumina in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dadurch wurde außerdem eine hohe Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Granulozyten und Pilzzellen gewährleistet. Die in den Ansätzen vorliegenden Pilzzellen sollten dabei möglichst homogen im Blut verteilt werden. Eine gute Durchmischung kann bei kleinen Volumina aber nur durch Erhöhung der Schüttelfrequenz erreicht werden. Daher wurden alle Ansätze im Thermomixer (37,0°C) bei 1.000 rpm inkubiert.

Martin und Bhakdi konnten in einem ähnlichen Versuchsansatz zeigen, daß in Vollblut inkubierte Mikroorganismen auch nach 60 Minuten Lagerung im Eiswasserbad nicht phagozytiert werden [Martin, 1991]. Da der Vorgang der Phagozytose u. a. temperatur- bzw. energieabhängig ist, wurde durch die Überführung der Proben in ein Eiswasserbad die Phagozytose effizient gestoppt. Auch nach dem Lysieren der nicht in die Auswertung eingehenden Erythrozyten mit eiskaltem Lysispuffer und dem parallelen Fixieren der

Granulozyten und Mikroorganismen, wurden die Proben bis zur unmittelbaren Messung auf Eis gelagert. Nach Angaben des Herstellers lysiert der Lysispuffer die Erythrozyten aufgrund seiner geringeren Osmolarität und inaktiviert aufgrund eines Paraformaldehyd-Gehaltes von 2 % die Granulozyten und nicht-phagozytierten Pilzzellen.

Um einen Verlust der Fluoreszenzintensität der gefärbten Mikroorganismen zu vermeiden, wurden vom Zeitpunkt der Färbung der Hefen bis hin zur Messung am Durchflusszytometer alle Arbeitsschritte durch Abdunklung der die Keime enthaltenden Gefäße durchgeführt.

Die zur Blockade der Adhäsionsmoleküle eingesetzte Menge an monoklonalen Antikörpern (mAk) richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers (Becton Dickinson), die sich bereits in ähnlichen Studien bewährt haben [z. B. Schnitzler, 1995 & 1999a]. Nach den Angaben in der Literatur besitzen die mAk gegen CD18 und CD11a-c von Becton Dickinson eine hinreichende Spezifität [Shapiro, 1995]. Alle vier eingesetzten mAk zeigen eine hohe Affinität zu den Zielepitopen und führen bei guter Durchmischung mit den Blutproben innerhalb weniger Minuten zu einer homogenen Bindung.

4.1.6 Verfahren der Durchflusszytometrie

Die multiparametrische Durchflusszytometrie fand Anfang der 70er Jahre ihren Eingang in die Forschung [Schmitz, 1994]. Durch eine ständige Verbesserung der Geräte und der dazugehörigen Software hat sich dieses Verfahren weltweit etabliert und wird mittlerweile in der routinemäßigen Patientendiagnostik eingesetzt (z. B. Staging in der HIV-Diagnostik). Zur durchflusszytometrischen Untersuchung sind Zellen jeder Herkunft geeignet, sofern sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen, wie z. B. Blutzellen, Tumorzellen, Mikroorganismen oder synthetische Mikrokügelchen (= Beads). Neben der Voraussetzung einer monodispersen Partikelsuspension ist eine zweite, wesentliche Bedingung für bestimmte Untersuchungen das Vorhandensein spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe, deren Fluoreszenz mit der Lichtquelle des Durchflusszytometers angeregt und deren Emission mit dem gleichen Gerät gemessen werden kann [Schmitz, 1994].

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Phagozytoseaktivität humaner Granulozyten hat in den letzten 20 Jahren zu einer Vielzahl unterschiedlicher Untersuchungsverfahren geführt [z. B. Derer, 1983; Bjerknes, 1984; Buschmann, 1989; Fattorossi, 1989; Giaimis, 1994; Perticarari, 1994; Chaka, 1995; Egido, 1997; Zielinska, 1997; Heinzelmann, 1999].

Eine Übersicht verschiedener Phagozytose-Assays geben Hampton und Winterbourn in ihrer Arbeit [Hampton, 1999].

Ein wesentlicher Vorteil der Durchflusszytometrie ist das sichere Erfassen einer großen Anzahl von Zellen/Partikeln innerhalb weniger Sekunden bei einer gleichzeitig vorhandenen hohen Reproduzierbarkeit. Für jede einzelne Zelle, die während der Messung hydrodynamisch an einem Messpunkt vorbeigeführt wird, können simultan verschiedene Parameter objektiv gemessen werden. Ältere Methoden wie das mikroskopische Auszählen von mit Mikroorganismen beladenen Phagozyten sind sehr zeitaufwändig und auch stark untersucherabhängig [Derer, 1983].

Bei der **Probenvorbereitung** für die Durchflusszytometrie müssen zwei wesentliche Bedingungen erfüllt sein, um nach erfolgter Messung eine möglichst genaue und objektive Datenauswertung zu erhalten:

1. Nur monodisperse Partikelsuspensionen, wozu alle Blutzellen und Hefezellen zählen, führen zu befriedigenden Ergebnissen.
2. Eine ausreichende Färbung einzelner oder mehrerer Subpopulationen in dieser Partikelsuspension mit einem fluorochromen Marker (z. B. BCECF-AM) erleichtert bei der Datenauswertung eine sichere Detektion dieser Gruppe von Zellen.

Beide Voraussetzungen gelten nach den weiter oben beschriebenen Erörterungen in dieser Arbeit als erfüllt, wobei die Probenvorbereitung und die Effektivität der Färbung wesentlich zu Ergebnisschwankungen beitragen. Durch eine Standardisierung der präanalytischen Versuchsansätze (siehe Kapitel 2) konnte in dieser vorliegenden Studie die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Messungen geschaffen werden.

Die eigentliche **Messung** am Durchflusszytometer gilt nach dem heutigen Stand der Technik als unproblematisch und zuverlässig [Schmitz, 1994]. Da in der vorliegenden Arbeit immer am gleichen Gerätetyp (FACScan-Durchflusszytometer) mit gleicher Software (Cellquest-Software Version 3.1f., 1997) alle Untersuchungen durchgeführt wurden, lassen sich diese auch untereinander weitgehend miteinander vergleichen. Vor jeder einzelnen Messung wurde jedes Probenröhrchen gut durchmischt (Vortex), um eine interzelluläre (leichte) Adhärenz und Aggregation möglichst zu verhindern bzw. wieder aufzuheben. Pro Messung wurden immer 10.000 Partikel erfasst und ermöglichten so eine sichere quantifizierende Auswertung.

Es muß jedoch kritisch angemerkt werden, dass während der Messung keine nähere Differenzierung zwischen einer Einzelzelle, einer sprossenden Zelle, Zellaggregationen oder intrazellulären Zellansammlungen (= mehrere intragranulozytäre Hefen) gemacht werden. Das

Detektionssystem im Durchflusszytometer erkennt jede dieser Formen als ein einzelnes Ereignis (Event) und misst die gewünschten Parameter (Zell- bzw. Partikelgröße [FSC], Granularität [SSC], Fluoreszenzen [FL1/FL2]). So können Zellaggregate in der Größenordnung eines Granulozyten liegen und in der Auftragung von Größe (FSC-H) gegen Granularität (SSC-H) fälschlicherweise in der Region (Gate) der Granulozytenpopulation miterfasst werden.

Die Stabilität der Geräteeinstellungen und die äußerst einfache Bedienung des FACScan-Durchflusszytometer können daher eher beim Anwender (z. B. Probenverwechslung, falsch gewählte Geräteeinstellungen etc.) zu Fehlern führen als in der eigentlichen Datengewinnung. Eine regelmäßige Präzisionskontrolle erfolgte semi-automatisch in Form einer Kalibrierung des FACScan-Durchflusszytometer mit Hilfe von Standardpartikeln, und vor jeder neuen Messreihe wurden die gewünschten Geräteeinstellungen kontrolliert bzw. neu eingestellt. Bei der sich dann anschließenden Messung wurde während der Datenaufnahme die korrelierende Darstellung SSC-H (Granularität) gegen FL1-H (Grünfluoreszenz) sowie FSC-H (Größe) gegen SSC-H (Granularität) auf dem Monitor angezeigt und diente als ein weiteres Kontrollinstrument zur Überprüfung der Geräteeinstellungen. Der Schwellenwert (Threshold) des Vorwärtstreulichtes (FSC) wurde so gewählt, dass Zelltrümmer weitgehend ausgeschlossen wurden.

Bei der **Datenauswertung** wurde die manuelle Auswertung einer reinen, automatisierten, softwaregesteuerten Analyse vorgezogen. Dabei gingen nur die Versuchsreihen in die weiteren Berechnungen ein, in denen sich eine klare Abgrenzung der Granulozyten und auch eine ausreichende Fluoreszenz der gefärbten Keime zeigten. Das wurde gemacht, um dadurch Fehlinterpretationen zu verhindern. Weiterhin wurden ausschließlich Versuchsreihen mit einem Pilz/Granulozyten-Verhältnis von etwa 1,5 : 1 bis 2,5 : 1 zur weiteren Datenanalyse berücksichtigt. Die ermittelten Werte wurden in eine Excel-Datei (Excel 7.0 für Windows 95) eingegeben und standen somit einer statistischen Analyse jederzeit zur Verfügung.

Mit Hilfe der statistischen Auswertung sollten die in der Durchflusszytometrie gewonnenen Werte der einzelnen Pilzstämme auf signifikante Unterschiede hin untersucht werden. Da die Werte in der Regel nicht der Normalverteilung unterlagen, wurde der verteilungsunabhängige (nicht-parametrische) Student-t-Test eingesetzt. Dieser ermöglicht sowohl den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen sowohl für unabhängige als auch für abhängige Gruppen. Für die Ablehnung der Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($\alpha = 0,05$) gearbeitet. Die statistische Bearbeitung wurde mit einem gängigen Statistikprogramm (SAS) auf einem PC durchgeführt, so dass Fehler bei der Berechnung ausgeschlossen werden können.

4.2 Vergleich der Versuchsergebnisse mit der aktuellen Literatur

4.2.1 Ausmaß der Phagozytose bezogen auf verschiedene Pilzisolat

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass humanpathogene Pilze auch von den Phagozyten gesunder Probanden in einem unterschiedlichen Umfang phagozytiert werden [Diamond, 1993; Lyman, 1994]. Lyman et al. konnten in ihrer Studie einen signifikanten Unterschied zwischen dem Ausmaß der Phagozytose opsonierter *Candida* ssp. und *Cryptococcus neoformans* und *Trichosporum beigelii* zeigen. Die beiden letzteren Spezies wurden deutlich weniger phagozytiert.

Das vergleichende Ausmaß der Phagozytose verschiedener Pilzspezies durch humane Granulozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Alle entsprechenden Untersuchungen haben sich fast ausschließlich auf einen Stamm (v. a. *Candida albicans*) konzentriert [Bjerknes, 1984; Wilson, 1985; Fattorossi, 1989; Martin, 1991; Saresella, 1997] oder aber mehrere Mutanten einer Spezies untersucht [Schnitzler, 1999a].

Bei der vergleichenden Phagozytose der hier untersuchten Pilzstämme durch humane Granulozyten konnte keine signifikante Abweichung zwischen den einzelnen Stämmen festgestellt werden. Demnach haben weder die beobachtete Pathogenität der Pilze noch die Pigmentierung (Melanin) der schwarzen Hefen im Vergleich zu den hier mituntersuchten unpigmentierten Hefen einen Einfluss auf die Phagozytoseleistung der Granulozyten. Sowohl der als primäres Umweltisolat untersuchte Keim *Exophiala mesophila* wird in einem signifikant nicht unterschiedlichen Ausmaß phagozytiert wie die relativ häufig isolierten Schwärzepilze und in ihrer größeren Pathogenität eingestuften Spezies *Exophiala dermatitidis* und *Exophiala jeanselmei*.

Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit liegt der Anteil an der Phagozytose beteiligter Granulozyten für alle untersuchten Pilzisolat bei ca. 80 %. Die durchschnittliche Standardabweichung von 10 % weist zudem auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin. Hinsichtlich *Candida albicans* als dem klassischen Modellorganismus in der medizinischen Mykologie kamen Martin und Wilson zu ähnlichen Ergebnissen (ca. 80 %) [Wilson, 1985; Martin, 1991]. In beiden Studien wurde aber kein Vollblut, sondern isolierte Leukozyten mit einer definierten Menge Serum eingesetzt. Beide Autoren benutzten das gleiche Verhältnis an Pilzzellen zu Granulozyten (Verhältnis 2:1) wie auch in der hier durchgeführten Arbeit. Auch andere Studien kamen trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden zu ähnlichen Ergebnissen [Hed, 1997; Schnitzler, 1999a & b]. Schnitzler et al. konnten in ihren Phagozytosestudien 1999 erstmalig ähnliche Beobachtungen für die schwarze Hefe *Exophiala dermatitidis* machen.

Offenbar verläuft die Phagozytose dabei im Sinne einer Sättigungskinetik. Das erklärt, warum das Blut verschiedener Spender nur zu Beginn der Koinkubation mit markierten Pilzen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, am Ende der Versuchszeit (60 Minuten) dagegen nahezu identische Ergebnisse liefert.

Die Phagozytoserate wurde in den entsprechenden Versuchsansätzen durch die Fluoreszenzzunahme der Granulozyten detektiert. Mit dem in dieser Arbeit angewendeten Messverfahren ist es jedoch nicht möglich, zwischen der intra- bzw. extragranulozytären Lage der fluoreszierenden Pilzzellen zu unterscheiden. Die Fluoreszenzzunahme der Granulozyten könnte daher z. B. auch auf eine Anlagerung im Sinne interzellulärer Adhärenz und/oder Aggregation an die gefärbten Pilzzellen beruhen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Ansätze aller untersuchten Stämme stichprobenartig mikroskopiert (Epifluoreszenz-/Interferenzkontrastmikroskop). Unter Verwendung dieser Technik konnte dann die intragranulozytäre Lage der Pilze bei durchflusszytometrisch gemessener Assoziation mit den Granulozyten bestätigt werden. Schnitzler *et al.* konnten bei flowzytometrischen Phagozytosestudien mit Streptokokken die überwiegende intrazelluläre Lage der Bakterien auch durch mikroskopische Kontrolluntersuchungen bestätigen, während phagoresistente Stämme fast vollständig weder an Granulozyten adhäriert noch von ihnen phagozytiert wurden [Schnitzler, 1995]. Ähnliche Beobachtungen wurden in weiteren Phagozytosestudien mit *E. dermatitidis* und *C. albicans* gemacht [Schnitzler, 1999a & b].

Eine Alternative zu den epifluoreszenz-/interferenzkontrastmikroskopischen Kontrolluntersuchungen stellt die konfokale Lasermikroskopie dar. Diese Methode erlaubt die dreidimensionale Darstellung der Granulozyten mit den assoziierten, fluoreszierenden Pilzen und somit eine genaue Lagebestimmung der Mikroorganismen. Zum Zeitpunkt der beschriebenen Untersuchungen stand uns diese Methode leider noch nicht zur Verfügung. Bei kürzlich durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Phagozytose anaerober periodonto-pathogener Bakterien konnte aber eine gute Korrelation zwischen der Interferenzkontrastmikroskopie und der konfokalen Lasermikroskopie gezeigt werden [Conrads, 1999].

Bei der Auswertung in dieser Arbeit wurde eine Fluoreszenzzunahme aller Granulozyten aus der Gesamtpopulation der Granulozyten als ein Maß der Phagozytose gewertet. Über das weitere intragranulozytäre „Schicksal“ der phagozytierten Pilzzellen konnte mit der verwendeten Methode keine Aussage getroffen werden. In einer sich anschließenden Studie [Jentsch, 2000] wurde ein ähnliches Spektrum klinisch relevanter Schwärzepilze untersucht und zusätzlich zur

Phagozytose Untersuchungen zum oxidativen Burst und konsekutiven Killing durchgeführt. Durch den Nachweis des oxidativen Burst, einem intragranulozytären und sauerstoffabhängigen Abwehrmechanismus, konnte die Untersucherin einen sicheren Beweis für den Ablauf der Phagozytose, d. h. Internalisierung der Hefezellen und Fusion zum Phagolysosom, erbringen. Jentsch orientierte sich in ihren Phagozytose-Assays (z. T. auch in den Untersuchungen zum oxydativen Burst) fast vollständig an dem in Kapitel 2 beschriebenen Versuchsaufbau bzw. -ablauf. Daher kann man bei der Auswertung die fluoreszierenden Granulozyten von den primär ungefärbten Granulozyten sicher differenzieren und als prozentualen Anteile phagozytischer Granulozyten von der Gesamtgranulozytenpopulation interpretieren (vgl. Kapitel 3.11 & 3.1.32).

Ausgehend von dieser Interpretation lässt sich offensichtlich mit der in dieser Arbeit eingesetzten Methodik kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Phagozytose und der Pathogenität einzelner Isolate zeigen. Zugleich lassen sich keine Aussagen über die Effektivität der intrazellulären Abtötung der einzelnen Erreger machen. Schaffner *et al.* konnten eine Korrelation zwischen dem Abtöten der primär als Pathogene eingestuften Pilze (*Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp.) und den als überwiegend opportunistisch auftretenden Pilzen (*Candida* spp., *Aspergillus* spp.) nachweisen [Schaffner, 1986]. Obwohl beide Gruppen von Pilzen in die Granulozyten aufgenommen wurden, gelang z. B. *Histoplasma capsulatum* eine Art „parasitäres“ Überleben in den Phagozyten. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß dieser Pilz nicht nur die Apoptose der humanen Granulozyten inhibiert, sondern auch zu einer deutlichen Inhibition der Mac-1-Expression führt [Medeiros, 2002]. Während durch eine ineffiziente Phagozytose, wie in diesem Fall von Medeiros geschildert, die Lebensdauer der Phagozyten verlängert wird (anti-apoptotischer Effekt) und somit *H. capsulatum* ein intraphagozytäres Überleben ermöglicht, führt eine erfolgreiche Phagozytose von *C. albicans* zu einer erhöhten Apoptoserate humaner Granulozyten [Rotstein, 2000]. Eine Evasion der intrazellulären Abtötung ist nicht nur für *H. capsulatum* bekannt [Schnur, 1990; Kurita, 1991; Brummer, 1992], sondern eine wichtige Strategie vieler intrazellulärer Erreger [Kaufmann, 1989b; Hof, 1991; Vartivarian, 1992].

Abweichende Ergebnisse treten dagegen in den Untersuchungen der Phagozytose von *Cryptococcus neoformans* durch humane Granulozyten auf. Lyman und Walsh gaben an, dass die neutrophilen Granulozyten im Versuchsansatz mit *C. neoformans* auch nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten keine Phagozytoseaktivität aufwiesen [Lyman, 1994]. Allerdings liegt die Ursache für dieses Ergebnis nicht in der starken Virulenz des Erregers, sondern vielmehr in der Morphologie dieser Spezies begründet. *C. neoformans* besitzt eine dickwandige Schleimkapsel und wird daher nur in Anwesenheit eines speziellen Antikörpers

(2H1) phagozytiert. Lyman und Walsh führten ihre Phagozytose-Assays allerdings ohne diesen Antikörper durch.

Eine andere Studie kam mit der Untersuchung von *C. neoformans* und seiner Albinomutante zu dem Schluss, dass die Phagozytoserate abhängig vom Melaniningehalt ist [Wang, 1995]. Allerdings musste auch in dieser Untersuchung wieder der spezifische Antikörper (2H1) zugegen sein, um überhaupt den Phagozytoseprozess induzieren zu können. Für die Phagozytose der in dieser Arbeit untersuchten Pilzisolat waren dagegen keine spezifischen Antikörper vonnöten.

Ob es eine Korrelation zwischen dem intragranulozytären Killing und der unterschiedlichen Pathogenität einzelner Isolate aus der Gruppe der Schwärzepilze gibt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. In der o. g. Folgearbeit von Jentsch sollten zusätzlich zur Phagozytoserate verschiedener schwarzer Hefen auch das Ausmaß des oxydativen Burst sowie die Killingrate ermittelt werden [Jentsch, 2000]. Grundsätzlich scheint das in der Zellwand der Schwärzepilze eingelagerte Melanin einen relativen Schutz vor dem Abtöten in dem Phagolysosom der neutrophilen Granulozyten zu geben, wie bereits eine Studie an *E. dermatitidis* und einigen melaninlosen Mutanten dieser Spezies zeigte [Schnitzler, 1999a; Feng, 2001]. Die Abhängigkeit der Phagozytoserate vom Melaniningehalt scheint auch für andere Pilze eine wichtige Rolle zu spielen, so dass Melanin als ein wesentlicher Virulenzfaktor zu bewerten ist [Wang, 1995].

Insgesamt entsteht bei der Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Isolate der Eindruck, dass bei keinem dieser Pilze eine Phagozytoseresistenz vorliegt. Die Reaktion humaner Granulozyten gesunder Menschen auf Schwärzepilze zeigt keine nennenswerten Unterschiede, obwohl diese Gruppe von Schwärzepilzen ein weites Spektrum an Krankheitsbildern hervorrufen kann [de Hoog, 1993b]. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Schwärzepilzen generell nicht um primär pathogene Pilze handelt, sondern um Opportunisten. Charakteristisch für opportunistische Pilze und auch andere Mikroorganismen sind bestimmte Eigenschaften, die ihnen ein Überleben in oder auf dem menschlichen Körper ermöglichen [Tintelnot, 1991b]. Dabei können sie ein breites Spektrum an Krankheiten hervorrufen, die Ausdruck einer Besiedlung sind. Der Verlauf und die Schwere eines durch Pilze ausgelösten Krankheitsbildes wird demnach im Fall der opportunistischen Pilze von Wirtsfaktoren (Immunkompetenz, konsumierende Erkrankungen, Traumata etc.) bestimmt.

Neuere Untersuchungen konnten den Zusammenhang zwischen Risikofaktoren beim Wirt und einer herabgesetzten Funktion der Phagozyten bestätigen. Tran *et al.* untersuchten die peri- und postoperative Phagozytenaktivität gegen *Candida albicans* von Patienten aus der Herz- und

Gefäßchirurgie [Tran, 1997]. Sowohl der operative Eingriff als auch die prophylaktische Antibiotikatherapie führten zu einer deutlichen Reduktion der Phagozytenleistung.

Auch resultiert die Immunschwäche bei HIV-positiven Patienten zum Teil in einer gestörten Phagozytose von *Candida albicans* [Tachavanich, 1996]. Die Abnahme der Phagozytoseaktivität korreliert in dieser Studie mit der Intensität der durch das Virus verursachten Erkrankung AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrom). In einer anderen Arbeit konnte eine weitere Korrelation zwischen dem Ausmaß der Erkrankung einerseits und der Phagozytoseleistung bzw. T-Helferzahl (CD4-Zellen) andererseits beobachtet werden [Dobmeyer, 1995].

Stoffwechselerkrankungen wie der Diabetes mellitus gehören auch zu den Risikofaktoren, die opportunistische Infektionen begünstigen. Nach einer Untersuchung von Jakelic *et al.* führt allein die Hypoglykämie zu einer gestörten Funktion der Phagozytose von *Saccharomyces cerevisiae* durch Leukozyten dieser Patienten [Jakelic, 1995].

Betrachtet man die oben erwähnten Studienergebnisse und die zitierten Kasuistiken von Infektionen durch Schwärzepilze (Kapitel 1.4), dann lassen sich für die Mehrzahl der Fälle koexistierende Risikofaktoren finden, besonders bei Infektionen mit systemischen Verläufen. Demnach können Schwärzepilze als opportunistische Pilze in einer großen Vielfalt klinisch in Erscheinung treten. Zusätzlich zeigen diese Pilze eine große morphologische Plastizität und eine bemerkenswerte Anpassungsfähigkeit an extreme Umweltbedingungen, wodurch auch unabhängig von koexistierenden Risikofaktoren beim Wirt ein Überleben bei diesem möglich ist [de Hoog, 1997]. Diese Anpassungsmechanismen der Pilze an extreme Lebensbedingungen können als Virulenzfaktoren aufgefasst werden [de Hoog, 2000a].

Innerhalb der Gruppe der Umweltisolate stellt *Exophiala mesophila* eine Ausnahme dar. Dieser Keim hat eine maximale Wachstumstemperatur von 30°C und könnte aufgrund dieser Eigenschaft lediglich die Körperoberfläche eines Menschen besiedeln. Möglicherweise ist das auch der Grund, warum *E. mesophila* bisher nur sehr selten im Sanitärbereich isoliert wurde und als Erreger einer oberflächlichen Mykose nicht in Erscheinung getreten ist.

Im Gegensatz dazu wurden in Japan mehrere systemische Phaeohyphomykosen durch *Exophiala dermatitidis* bei überwiegend immunkompetenten Patienten mit letalen Verläufen beobachtet [Hiruma, 1993]. Hiruma *et al.* berichteten in dieser Publikation von einem achtzehnjährigen Patienten ohne Grund- oder Vorerkrankung. Ausgehend von einer zervikalen Lymphknotenschwellung kam es trotz einer antimykotischen Therapie (Flucytosin und Amphotericin B) zu einer Erregerausbreitung in den Oberbauch und zuletzt zum Befall des Gehirns. Der Patient verstarb ein Jahr später. Möglicherweise handelt es sich bei der asiatischen Mutante von *E. dermatitidis* um einen primär pathogenen Schwärzepilz - falls man die Existenz zweier genetisch

unterschiedlicher Varianten dieser Spezies voraussetzt. Sichere Indizien dafür gibt es allerdings bisher nicht.

Schnitzler *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass das Melanin von *E. dermatitidis* dem Pilz einen relativen Schutz gegen das Abtöten im Phagolysosom der Granulozyten bietet [Schnitzler, 1999a]. Diese Eigenschaft des Melanins wird auch durch neuere Untersuchungen bestätigt [Feng, 2001]. Andererseits zeigt der Keim eine erhöhte Affinität zum Hirngewebe und scheint dort den Abwehrmechanismen des Wirtes weitestgehend widerstehen zu können [de Hoog, 1993b]. Brush und Money konnten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Melanin und einem invasiven Wachstum in Form von verzweigten Hyphen sehen [Brush, 1999]. Sicherlich trägt dieses invasive Wachstums häufig zum foudroyanten Verlauf der zerebralen Infektion mit *E. dermatitidis* bei.

Am Tiermodell konnte der Neurotropismus dieser schwarzen Hefe bestätigt werden, obwohl auch beim Tier keine einheitlichen Verläufe der Infektion beobachtet wurden [Mok, 1981; Nishimura, 1983; Dixon, 1987 & 1989 & 1992]. Die neurologischen Symptome und die relativ häufige Letalität konnten teilweise durch histologische Befunde (granulomatöse Entzündungen und Abszesse mit reichlich Pilzhypen im Gehirn) erklärt werden. Bei manchen Tieren brachte die histopathologische Untersuchung keinen Hinweis auf eine Pilzinfektion. Dies lässt vermuten, dass die neurologischen Symptome auch auf eine nur passagere Pilzbesiedlung des Gehirns, die Produktion eines Neurotoxins oder eine parainfektologische Immunreaktion zurückzuführen ist.

Zusammenfassend können die hier untersuchten Schwärzepilze als opportunistische Pilze eingestuft werden. Ihr Überleben und die Ausbreitung im menschlichen Organismus sind in den meisten Fällen abhängig vom Immunstatus des Wirtes und sonstigen Risikofaktoren. Dem gesunden Organismus scheint nach den hier vorliegenden Erkenntnissen die erfolgreiche Abwehr (Phagozytose) der Keime in aller Regel keine Schwierigkeiten zu bereiten. Dies gilt auch für die vergleichend mituntersuchten unpigmentierten Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Bei der mikroskopischen Betrachtung wurden häufiger Granulozyten mit mehreren Hefen (2-3) intrazellulär beobachtet. Da die Pilze immer im Überschuss vorlagen (Ratio Pilz/Granulozyt 2:1), bestand zumindest theoretisch für jeden einzelnen Granulozyten die Möglichkeit, sich an der Adhäsion und nachfolgender Phagozytose der Pilze zu beteiligen. Hinzu kommt, dass in allen eingesetzten Pilzsuspensionen, unabhängig vom jeweiligen Isolat, eine kleine Menge an Pilzhypen vorkam, die dann als einzelne Hyphe u. U. mehrere Granulozyten binden konnte.

4.2.2 Eingesetzte monoklonale Antikörper (mAk) zur Phagozytoseblockade

Bei der Auswahl der mAk gegen die an der Phagozytose mitwirkenden granulozytären Rezeptoren wurden die Studien berücksichtigt, die sich bereits mit der Adhäsion und/oder Phagozytose humanpathogener Pilze und humaner Leukozyten beschäftigt haben. Die wenigen Erkenntnisse konzentrieren sich auf die Adhäsionsmoleküle CD18/CD11a-c sowie auf die bekannten pathogenen Pilze *Histoplasma capsulatum* und *Candida albicans*.

Schnur *et al.* untersuchten die Phagozytose von nicht opsonierten Hefen von *H. capsulatum* durch isolierte humane Granulozyten und setzte mAk gegen CD11a, CD11b, CD11c und CD18 ein [Schnur, 1990]. Die deutlichste Inhibition der Adhäsion bzw. der Phagozytose wurde durch Anwesenheit mAk gegen das CD18-Molekül erzielt (> 90 %), obwohl auch die anderen eingesetzten mAk zu einer Inhibition der Phagozytose führten (CD11a 46 %, CD11c 73 %, CD11b 83 %).

Auch Bullock und Wright identifizierten die β_2 -Integrine (CD18/11a-c) als wesentliche Rezeptoren für die Phagozytose von *H. capsulatum* durch humane Alveolarmakrophagen [Bullock, 1987; & 1993]. Beide konnten in ihrer Studie die deutlichste Reduktion der Phagozytose ebenfalls durch Zugabe mAk gegen das CD18-Molekül erreichen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Petersen *et al.*, die die Phagozytose von Zellwandbestandteilen (Zymosan, einem Kohlenhydrat in der Zellwand von Hefen) untersuchten [Petersen, 1994]. Insgesamt wurden von vier verschiedenen Herstellern mAk gegen das CD18-Molekül eingesetzt und weitere fünf verschiedene mAk gegen das CD11b-Molekül. Alle mAk gegen das CD18-Molekül führten zu einer Inhibition der Phagozytose, während die mAk gegen das CD11b-Molekül keinen Effekt auf die Phagozytose-leistung humaner Granulozyten zeigten.

Forsyth und Mathews [Forsyth, 1996] suchten in ihrer Arbeit den lymphozytären Rezeptor für die Bindung an *Candida albicans* und identifizierten dabei das Mac-1-Molekül (CD18/11b) als das wesentliche Adhäsionsmolekül. Obwohl die Lymphozyten selbst an der Phagozytose nicht direkt beteiligt sind, scheint eine Subpopulation dieser Zellen (große, granuliert Lymphozyten) an der Wachstumshemmung von *Candida albicans* beteiligt zu sein, nachdem es zu einem Lymphozyt-Pilz-Kontakt gekommen ist. Offenbar richten sich die Lymphozyten primär gegen die verzweigten Hyphen der Pilze und weniger gegen die Hefesporen. Diese Form der lymphozytären Adhäsion an Hyphen von *C. albicans* wurde von Forsyth und Mathews auch in einer kürzlich publizierten Studie näher untersucht. Dadurch wurden im Wesentlichen die 1996 veröffentlichten Ergebnisse bestätigt. [Forsyth, 2002].

In einer anderen Arbeit wurden mAk (CD11b) gegen ein dem Komplementrezeptor ähnliches Molekül (CR3) eingesetzt, welches *Candida albicans* auf seiner Zelloberfläche exprimiert [Gustafson, 1991; Lee, 1997]. Einerseits binden Phagozyten über den Komplementrezeptor an CR3 von *C. albicans*, andererseits verleiht CR3 dem Pilz die Fähigkeit zur Adhäsion an Epithelien und zu einer sich dann anschließenden systemischen Infektion. Die Zugabe von mAk (CD11b) gegen CR3 blockieren effektiv die Adhäsion an Epithelzellen. Weiterhin bewirkt die Gabe dieser Antikörper eine geringere Letalität bei Mäusen mit einer in-vitro induzierten disseminierten Candidainfektion. Offenbar besteht eine Korrelation zwischen der Virulenz von *C. albicans* und der Fähigkeit zur Adhäsion an Epithelien bzw. Endothelien [Polacheck, 1995].

Aber nicht jede Bindung mikrobieller Antigene durch das Mac-1-Molekül führt zu einer konsekutiven Phagozytose. So produziert der Hakenwurm *Ancylostoma caninum* ein 41 kD großes Glykoprotein, den sogenannten „Neutrophil Adhesion Inhibitor“ (NIF). Dieser Inhibitor bindet spezifisch an die A-Domäne des Mac-1-Moleküles und blockiert dadurch die weitere Initiierung neutrophiler Funktionen (Phagotytose > oxidativer Burst > Killing) [Rieu, 1994].

Vergleicht man nun die Ergebnisse der oben aufgeführten Studien mit den in dieser Arbeit gefundenen, dann scheinen die β_2 -Integrine eine Schlüsselfunktion bei der Phagozytose von Pilzen zu haben. Von den in dieser Untersuchung eingesetzten monoklonalen Antikörpern (mAk) führt bei allen untersuchten Isolaten die Kombination CD18/11b (Mac-1-Rezeptor) zur ausgeprägtesten Reduzierung der an der Phagozytose beteiligten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG). Im Durchschnitt konnte die Phagozytose durch PNG um ca. 50 % blockiert werden.

Trotzdem scheinen noch weitere Rezeptoren an der Phagozytose von Pilzen beteiligt zu sein, da trotz ausreichender Antikörpermenge und damit einhergehender Rezeptorblockade nur ein Teil der Gesamtgranulozyten an der Phagozytose gehindert wurde. Für die bekannten pathogenen Pilze *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. wurde Lectin als ein weiterer Rezeptor auf der Zelloberfläche von Phagozyten identifiziert [Diamond, 1993]. Neuere Untersuchungen betrachten dieses Molekül als Lectin-Domäne des Mac-1-Rezeptors, wodurch die Fähigkeit zur Adhäsion neutrophiler Granulozyten reguliert wird [Xia, 2002]. Auch ist ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren für die Identifizierung, Adhäsion und Phagozytose von Mikroorganismen denkbar, obwohl dafür bisher erst wenige Erkenntnisse vorliegen [Mosser, 1994; Ding 1999].

Andererseits wäre aber auch eine Zunahme des granulozytären Komplementrezeptors Mac-1 (CD18/11b) während der Koinkubation mit den Pilzen möglich. Die Zahl der an der Granulozytenoberfläche exprimierten Komplementrezeptoren ist keine statische Größe, sondern

abhängig von stimulierenden Faktoren (z. B. Phorbol ester, Tumornekrosefaktor [Brown, 1991]; Biopolymere [Peltroche-Llacsahuanga, 2000b] etc.). Diese rasante Rekrutierung der Rezeptoren wird durch große intrazelluläre Pools ermöglicht, wodurch sich der einzelne Phagozyt schnell auf eine veränderte Umgebung einstellen kann. Für Makrophagen der Ratte konnte nach Inkubation mit verschiedenen inaktivierten Mikroorganismen eine unterschiedlich starke Expression einzelner Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden [Keller, 1995]. Während der Kontakt mit Bakterien eher eine Zunahme in der Expression vieler Adhäsionsmoleküle bewirkte (CD11a, CD49), führte der Kontakt mit Pilzen (*Aspergillus fumigatus*) und Viren zu einer Abnahme der Expression dieser Moleküle. In der gleichen Arbeit zeigten die untersuchten Mikroorganismen keinen modulierenden Effekt hinsichtlich der Expression von CD11b und CD18.

Schnitzler *et al.* konnten in ihrer Arbeit aber zeigen, dass durch eine Aktivierung des LFA-Moleküls (CD18/11a) durch I-Domänen-spezifische Antikörper eine deutliche Expressionssteigerung des Mac-1-Moleküls zu erzielen ist [Schnitzler, 1999b]. Diese LFA-1-Aktivierung führte zu einer beschleunigten Phagozytose von *Staphylococcus aureus*. Der Pilz *Candida albicans* wurde dagegen nicht signifikant schneller phagozytiert.

Da in der hier vorliegenden Studie ausschließlich Vollblut verwendet wurde, können keine Aussagen über die direkte Beteiligung des Komplements an der Phagozytose gemacht werden. Pilze wie *H. capsulatum* binden auch ohne Komplementvermittlung direkt an den Komplementrezeptor Mac-1 (CD18/11b) [Schnur, 1990]. In der gleichen Studie führte aber das Vorhandensein von Komplement zu einer Beschleunigung und Verstärkung der Phagozytose. Neben Komplement und Antikörpern konnten für die Phagozytose von *C. albicans* weitere opsonisierende Serumbestandteile identifiziert werden wie z. B. Fibronektin, Fibrinogen oder Laminin [Diamond, 1993]. Im Gegensatz zu einigen Bakterien und Viren führt die Inkubation in komplementhaltigem Serum, selbst in der Gegenwart von spezifischen Antikörpern, zu keiner Lyse der Pilze. Dies ist wohl auf die relative Dicke der Pilzzellwand zurückzuführen [Levitz, 1992]. Andererseits tragen Komplement und/oder Antikörper, wie oben bereits erwähnt, zu einer Opsonisierung der Pilze bei und beschleunigen in der Regel den Vorgang der Phagozytose [Deepe, 1990].

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung des Komplementrezeptors Mac-1 (CD18/11b) an der Phagozytose von Pilzen ist eine Untersuchung an peritonealen Makrophagen von Patienten nach langjähriger ambulanter Peritonealdialyse (CAPD) [Carcamo, 1996]. Im Vergleich mit gesunden Probanden ohne Peritonealdialyse zeigten die Makrophagen der Patienten eine reduzierte

Expression (ca. 40 %) der CD11b-Moleküle. Neben der chronischen Wunde durch den Peritonealkatheter und einer ständigen Gefahr der Keimbesiedlung liegt in der geringeren Expression von CD11b ein weiterer Grund für die mögliche Komplikation einer Peritonitis bei diesen Patienten. Obwohl Bakterien die Haupterreger sind, kann man gelegentlich bei den Pilzperitonitiden auch Schwärzepilze finden [u. a. Agarwal, 1993; Lye, 1993; Remon, 1996; Vlassopoulos, 2001]. Am Beispiel von *C. albicans*, dem häufigsten Erreger einer Pilzperitonitis, zeigten Peterson *et al.* eine nur mäßige Abtötung der Candidablastosporen in den Peritonealmakrophagen von Patienten nach langjähriger ambulanter Peritonealdialyse [Peterson, 1986].

Es gibt auch gelegentlich Patienten, die in ihrem Serum u. a. antimembranöse Antikörper gegen den Komplementrezeptor Mac-1 aufweisen, manchmal auch einhergehend mit einer autoimmunen Neutropenie und einer erhöhten Infektionsanfälligkeit [Bartunkova, 1997]. Bartunkova *et al.* testeten die Auswirkung von mAk gegen CD11b- und CD18-Moleküle im Vollblut gesunder Spender hinsichtlich der Phagozytose, dem oxidativen Burst und dem Killing von *C. albicans*. Die deutlichsten Effekte zeigten diese mAk bei den Phagozytoseversuchen und konnten dabei die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten jeweils einzeln als auch in Kombination um ca. 50% inhibieren. Dieser Wert entspricht den Ergebnissen in der hier vorgelegten Arbeit, obwohl es beim Versuchsaufbau und -ablauf einige Unterschiede gibt. Bartunkova benutzte in seiner Studie abgetötete und nicht lebende Erreger, und es wurden nur die Granulozyten als phagozytierend gewertet, die bei der mikroskopischen Betrachtung zwei oder mehr Candida-Hefen aufgenommen hatten. Trotzdem bestätigen seine Beobachtungen an *C. albicans* die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Beteiligung des granulozytären Mac-1-Rezeptors (CD18/11b) an der Phagozytose von *C. albicans* und den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten der Schwärzepilze.

Fallmann *et al.* untersuchten die Phagozytose von komplementopsonierten Hefepartikeln und die Bedeutung der Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD18/11b) auf humanen neutrophilen Granulozyten. Nach ihren Ergebnissen reduzieren mAk gegen das CD35-Molekül überwiegend die Adhäsion zwischen Granulozyt und opsoniertem Partikel, während mAk gegen das CD18/11b-Molekül hauptsächlich die Aufnahme (Uptake) der Partikel in den Granulozyten inhibiert [Fallman, 1993].

Nicht zuletzt muß darauf hingewiesen werden, dass durch die in dieser Arbeit eingesetzten mAK phänotypisch ein Leukozytenadhärenz-Proteindefekt (LAD) *in vitro* imitiert wurde. Bei dieser auch die Granulozyten betreffenden Erkrankung kommt es klinisch hauptsächlich zu bakteriellen Infektionen, die u. a. durch eine defekte Expression der gemeinsamen β -Kette (CD18) der drei Leukozytenintegrine zustande kommt [Bunting, 2002]. Auch gibt es Varianten, bei denen trotz

ausreichender Expression eine bisher noch nicht vollständig geklärte Dysfunktion der β_2 -Integrine beobachtet wurde [Hogg, 1999; Shaw, 2001]. Bei der Untersuchung der Granulozytenfunktion findet sich neben einer Beeinträchtigung der Adhäsion und Chemotaxis auch eine hochgradige Störung der Phagozytose trotz normaler oder erhöhter Leukozytenzahl [Benhaim, 1992; Gresham, 1991]. Auch diese seltene Granulozytenfunktionstörung bestätigt indirekt die essentielle Beteiligung des Komplementfaktors Mac-1 (CD18/11b) an der Phagozytose vieler human-pathogener Mikroorganismen.

Betrachtet man nun zusammenfassend die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit den Angaben in der Literatur, dann ist der Komplementrezeptor Mac-1 (CD18/11b) charakteristisch für phagozytierende Blutzellen und vermittelt auf molekularer Ebene die Adhäsion an körpereigene und fremde Zellen/Partikel. Ferner ist er ein wichtiger Rezeptor, der die Phagozytose von opsonierten Schwärzepilzen, aber auch anderer humanpathogener Pilze und Bakterien vermittelt [Gbarah, 1991; Schnitzler, 1999a; Jentsch, 2000].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Schwärzepilze stellen insgesamt gesehen eine taxonomisch diverse und morphologisch bzw. ökologisch heterogene Gruppe von Pilzen dar. Ihr weit verbreitetes Vorkommen als ubiquitäre Saprophyten einerseits, sowie ein durch sie verursachtes breites Spektrum an opportunistischer Mykosen andererseits, haben das weltweite Interesse vieler Mykologen geweckt. Keine andere Pilzgruppe weist ein so breites Spektrum von Mykosen auf wie das der Schwärzepilze [de Hoog, 1993b].

Von den 8.436 Pilzisolaten aus humanem Kulturmateriale, die zwischen 1977 und 1985 in dem mykologischen Referenzlabor des Centers for Disease Control in Atlanta (USA) zwecks Differenzierung zugesandt wurden, konnten 4 % (326 Isolate) als Schwärzepilze identifiziert werden [Matsumoto, 1987]. Sie bildeten damit die drittgrößte Gruppe der isolierten Pilze und haben in der Humanmedizin in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung gewonnen [de Hoog, 2000a]. Die steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten, zunehmende Möglichkeiten invasiver diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, aber auch ein verstärkter Gebrauch antibakterieller Substanzen führen sowohl zu einer quantitativen Zunahme der Pilzinfektionen als auch zu einer Zunahme des Erregerspektrums. Geht man von einer steigenden Anzahl opportunistischer Pilzinfektionen aus, dann ist auch in der Zukunft mit einer gehäuften Isolierung dematiöser Pilze zu rechnen [Rossmann, 1996].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist nach Etablierung einer standardisierten Vorgehensweise die vergleichende durchflusszytometrische Untersuchung der Phagozytose diverser Schwärzepilze durch humane Granulozyten. Dabei wurden pathogene Arten (*Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*), schwach pathogene Stämme (*Exophiala castellanii*, *Exophiala bergeri*, *Hortaea werneckii*, *Phaeoannellomyces elegans*) und ein apathogener Keim (*Exophiala mesophila*) untersucht. Weiterhin wurden zwei unpigmentierte Referenzstämme (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) zu Vergleichszwecken eingesetzt.

Alle Versuche wurden mittels Koinkubation der verschiedenen Pilzstämme mit heparinisiertem Vollblut von offensichtlich gesunden, freiwilligen Probanden durchgeführt. Das Ausmaß der Phagozytose wurde dabei mit Hilfe spezieller Fluoreszenzfarbstoffe in durchflusszytometrischen Messungen ermittelt. Diese Vorgehensweise ist inzwischen als eine etablierte Methode zu betrachten und wurde bereits für Phagozytose-Assays mit unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt [u. a. Harvath, 1994; Egido, 1997; Schnitzler, 1999a & b; Conrads, 1999; Peltroche-Llacsahuanga 2000a & b]. Damit ist die Durchflusszytometrie eine einfache und zuverlässige Methode für weitere Phagozytoseuntersuchungen [Hannant, 1998].

Trotz unterschiedlicher Pathogenität einzelner Isolate scheint es beim Vergleich der Ergebnisse keine Korrelation zwischen dem Phagozytoseausmaß im Sinne einer intragranulozytären Aufnahme (Uptake) und der Virulenz einzelner Keime zu geben. Bereits nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten sind im Durchschnitt ca. 80 % aller Granulozyten an der Phagozytose der Pilze beteiligt. Die intragranulozytäre Aufnahme von Hefezellen zeigt keine signifikanten Unterschiede bei den in dieser Arbeit untersuchten Keimen.

Im Rahmen dieser Studie konnte jedoch keine Aussage über das weitere „Schicksal“ der Pilzzellen nach erfolgter Aufnahme in die Granulozyten getroffen werden. Im Vergleich der Schwärzepilze mit den hier untersuchten unpigmentierten Hefen scheint das Melanin die Phagozytoseleistung humaner Granulozyten nicht nennenswert zu beeinflussen. Möglicherweise korreliert die Effektivität des Killing im Phago(lyso)som der Granulozyten mit der Pathogenität einzelner Isolate. Erste Hinweise dafür sind schon publiziert worden [Jentsch, 2000], dies müsste aber noch durch weitere Studien verifiziert werden.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit durch Verwendung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die β_2 -Integrine eine Beteiligung des Mac-1-Rezeptors (CD18/11b) bei der Phagozytose (Uptake) nachgewiesen werden. Bei allen Isolaten, auch den unpigmentierten Hefen, ließ sich die Phagozytose durch Zugabe von mAk gegen das Mac-1-Molekül um ca. 50 % reduzieren. Dabei war eine Kombination aus CD18/11b-mAk den Kombinationen CD18/11a-mAk und CD18/11c-mAk sowie der Einzelgabe von CD18-mAk deutlich überlegen.

Diese Ergebnisse sind somit ein weiteres Indiz für eine generelle Beteiligung dieses Komplementrezeptors (CR3, Mac-1) an der Phagozytose vieler humanpathogener Pilze. Ob sich dadurch vielleicht pharmakologische Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer antimykotischer Substanzen ergeben, muss durch weitere grundlegende Studien gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Agarwal, S.; Goodman, N.L. & Malluche, H.H. (1993).** Peritonitis due to *Exophiala jeanselmi* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* **21**, 673-675
- Ajane, N.; Alam, M.; Holmberg, K. & Khan, J. (1996).** Brain abscess caused by *Wangiella dermatitidis*: Case report. *Clin Infect Dis* **23**, 197
- Ajello, L. (1981).** The gamut of human infections caused by dematiaceous fungi. *Jpn J Med Mycol* **22**, 1-5
- Al-Hedaithy, S.S. & A.S. Al-Kaff (1993).** *Exophiala jeanselmi* keratitis. *Mycoses* **36**, 97-100
- Allred, B.J. (1990).** Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Exophiala jeanselmi* in an immuno-suppressed patient: case report. *N Z Med J* **103**, 321-322
- Arnaout, M.A.; M. Michishita, & Sharma, C.P (1992).** On the regulation of beta 2 integrins. *Adv Exp Med Biol* **323**, 171-179
- Babel, D.E.; J.M. Pelachyk, & Hurley, J.P (1986).** Tinea nigra masquerading as acral lentiginous melanoma. *J Dermatol Surg Oncol* **12**, 502-504
- Barenfanger, J.; Ramirez, F.; Tewari, R.P. & Eagleton, L. (1989).** Pulmonary phaeohyphomycosis in a patient with hemoptysis. *Chest* **95**, 1158-1160
- Bartunkova, J.; Araujo, A.; Hrusak, O. & Sediva, A. (1997).** Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Immunol* **17**, 455-461
- Ben-Simon, G.J.; Barequet, I.S. & Grinbaum, A. (2002).** More than tears in your eyes (*Exophiala jeanselmi* keratitis). *Cornea* **21**, 230-231
- Benaoudia, M.; Assouline, M.; Pouliquen, Y.; Bouvet, A. & Guéhos, E. (1999).** *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* keratitis after keratoplasty. *Med Mycol* **37**, 53-56
- Benett, I.; Knouse, C.; Johnson, J.; Meyer, R.L. & Millard, M.W. (1997).** *Wangiella dermatitidis* from a cystic fibrosis patient. *Clin Microbiol Newslet* **19**, 164-166
- Benhaim, P. & T.K. Hunt (1992).** Natural resistance to infection: leukocyte functions. *J Burn Care Rehabil* **13**, 287-292
- Berón, W.; Alvarez-Dominguez, C.; Mayorga, L. & Stahl, P.D. (1995).** Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* **5**, 100-104
- Bjerknes, R. (1984).** Flow cytometric assay for combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans*. *J Immunol Methods* **72**, 229-241
- Bjerknes, R.; Bassoe, C.F.; Sjørnes, H.; Laerum, O.D. & Solber, O.C. (1989).** Flow cytometry for the study of phagocyte functions. *Rev Infect Dis* **2**, 16-29
- Blaschke-Hellmessen, R.; Lauterbach, I.; Paul, K.D.; Tintelnot, K. & Weissbach, G. (1994).** Detection of *Exophiala dermatitidis* (Kano) De Hoog 1977 in septicemia of a child with acute lymphatic leukemia and in patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **1**, 89-96
- Boisseau-Garsaud, A.M.; Desbois, N.; Guillermin, M.L.; Ossondo, M.; Gueho, E. & Cales-Quist, D. (2002).** Onychomycosis due to *Exophiala jeanselmi*. *Dermatology* **204**, 150-152
- Bostock, D.E., Coloe, P.J. & A. Castellani (1982).** Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmi* in a domestic cat. *J Comp Pathol* **92**, 479

- Brown, E.J. (1991).** Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* **3**, 76-82
- Brummer, E.; Kurita, N.; Yosihida, S.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1991).** Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. *J Infect Dis* **164**, 158-162
- Brummer, E.; Kurita, N.; Yosihida, S.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1992).** A basis for resistance of *Blastomyces dermatitidis* killing by human neutrophils: inefficient generation of myeloperoxidase system products. *J Med Vet Mycol* **30**, 233-243
- Brush, L. & Money, N.P. (1999).** Invasive hyphal growth in *Wangiella dermatitidis* is induced by stab inoculation and shows dependence upon melanin biosynthesis. *Fungal Genet Biol* **28**, 190-200
- Bryan, M.G.; Elston, D.M.; Hivnor, C. & Honl, B.A. (2000).** Phaeohyphomycosis in a premature infant. *Cutis* **65**, 137-140
- Bullock, W.E. & Wright, S.D. (1987).** Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med* **165**, 195-210
- Bullock, W.E. (1993).** Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. *Arch Med Res* **24**, 219-223
- Bunting, M.; Harris, E.S.; McIntyre, T.M.; Prescott, S.M. & Zimmermann, G.A. (2002).** Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* **9**, 30-35
- Buschmann, H. & Winter, M. (1989).** Assessment of phagocytic activity of granulocytes using laser flow cytometry. *J Immunol Methods* **124**, 231-234
- Carcamo, C.; Fernández-Castro, M.; Selgas, R.; Jiménez, C.; Molina, S. & Vara, F. (1996).** Long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis reduces the expression of CD11b, CD14, CD16, and CD64 on peritoneal macrophages. *Perit Dial Int* **16**, 582-589
- Castellani, A. (1905).** Tropical forms of pityriasis versicolor. *Br Med J* **2**, 1271-1272
- Chaka, W.; Scharringa, J.; Verheul, A.F.M.; Verhoef, J.; van Strijp, A.G. & Hoepelman, I.M. (1995).** Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**, 753-759
- Chang, C.L.; Kim, D.S.; Park, D.J.; Kim, H.J.; Lee, C.H. & Shin, J.H. (2000).** Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *J Clin Microbiol* **38**, 1965-1966
- Chang, W.L.; van der Heyde, H.C. & Klein, B.S. (1998).** Flow cytometric quantitation of yeast: a novel technique for use in animal model work and in vitro immunologic assays. *J Immunol Methods* **211**, 51-63
- Chua, J.D.; Gordon, S.M.; Banbury, J.; Hall, G.S. & Procop, G.W. (2001).** Relapsing *Exophiala jeanselmei* phaeohyphomycosis in a lung-transplant patient. *Transpl Infect Dis* **3**, 235-238
- Chuan, M.T. & Wu, M.C. (1995).** Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei*: successful treatment with itraconazole. *Int J Dermatol* **34**, 563-566
- Collée, G.; Verhoef, L.H.M.; van't Wout, J.W.; van Brummelen, P.; Eulderink, F. & Dijkmans, B.A.C. (1988).** Tenosynovitis caused by *Exophiala mansonii* in an immunocompromised host. *Arthritis Rheum* **31**, 1213-1214

- Conrads, G.; Herrler, A.; Moonen, I.; Lampert, F. & Schnitzler, N. (1999). Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic periodontopathogenic bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* **34**, 136-144
- Conti-Diaz, I.; Mackinnon, J.E. & Civil, E. (1977). Isolation and identification of black yeasts from the external environment in Uruguay. In Fourth International Conference on the Mycose, pp 109-114. Brasilia: Pan American Health Organization.
- Conti-Diaz, I.A.; Burgoa, F.; Civil, E.; Bonasse, J. & Miller, A. (1984). Tinea nigra. 1st clinical case in Uruguay. *Mycopathologia* **87**, 81-83
- Crosby, J.H.; O'Quinn, M.H.; Steele Jr., J.C.H. & Rao, R.N. (1989). Fine-needle aspiration of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Wangiella dermatitidis*. *Diagn Cytopathol* **5**, 293-297
- Cucé, L. C.; Selebian, A.; Porto, E.; de Melo, N.T. & da Silva Lacaz, C. (1986). Feohifomicose em transplantada renal por *Exophiala dermatitidis* (Kano) de Hoog, 1977. *An bras Dermatol* **61**, 207-211
- de Hoog, G.S. & Hermanides-Nijhof, E.J. (1977). The black yeasts and allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 15. Baarn (NL): Centraalbureau voor Schimmelcultures
- de Hoog, G.S. & Haase, G. (1993a). Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 17-26
- de Hoog, G.S. (1993b). Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, 105-109
- de Hoog, G.S.; Takeo, K.; Yoshida, S.; Gottlich, E.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1994). Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 143-153
- de Hoog, G.S.; Takeo, K.; Gottlich, E.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1995a). A human isolate of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* forming a catenate synanamorph that links the genera *Exophiala* and *Cladophialophora*. *J Med Vet Mycol* **33**, 355-358
- de Hoog, G.S.; Guého, E.; Masclaux, F.; Gerrits van den Ende, A.H.G.; Kwon-Chung, K.J. & McGinnis, M.R. (1995b). Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phaeococcomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**, 43-49
- de Hoog, G.S. (1997). Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses* **40**, 5-8
- de Hoog, G.S.; Queiroz-Telles, F.; Haase, G.; Fernandez-Zeppenfeldt, G.; Attili Angeles, D.; Gerrits van den Ende, A.H.G.; Matos, T.; Peltroche-Llacsahuanga, H.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Rainer, J.; Richard-Yegres, N.; Vicente, V. & Yegres, F. (2000a). Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol* **38**, 243-250
- de Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gené, M.J. & Figueras, M.J. (2000b). Atlas of clinical fungi. 2nd Edition. Baarn (NL): Centraalbureau voor Schimmelcultures
- Deepe, G.S. & Bullock, W.E. (1990). Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**, 567-579
- Derer, M. (1983). A simple and rapid flow cytometric method for routine assessment of baker's yeast uptake by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods* **61**, 359-365
- Devreotes, P.N. & Zigmond, S.H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Ann Rev Cell Biol* **4**, 649-686
- Diamond, R.D. (1993). Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. *Arch Med Res* **24**, 361-369

- Dib, K. (2000).** Beta 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* **5**, 438-451
- Diemert, D.; Kunimoto, D.; Sand, C. & Rennie, R. (2001).** Sputum isolation of *Wangiella dermatitidis* in patients with cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis* **33**, 777-779
- Ding, Z.M.; Babensee, J.E.; Simon, S.E.; Luh, H.; Perrard, J.L.; Bullard, D.C.; Dai, X.Y.; Bromley, S.K.; Dustin, M.L.; Entmann, M.L.; Smith, C.W. & Ballantyne, C.M. (1999).** Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* **163**, 5029-5038
- Dixon, D.M.; H.J. Shadomy & Shadomy, S. (1980).** Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. *Mycopathologia* **70**, 153-161
- Dixon, D.M. ; Graham Jr., C.R.; Schaffer, R.M. & Tarantino, P. (1984).** Fungal flora from diabetic and non-diabetic human donor corneas. *Cornea* **3**, 281-284
- Dixon, D.M.; Polak, A. & Szaniszlo, P.J. (1987).** Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *J Med Vet Mycol* **25**, 97-106
- Dixon, D.M.; Polak, A. & Conner, G.W. (1989).** Mel- mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: evaluation of multiple mouse and fungal strains. *J Med Vet Mycol* **27**, 335-341
- Dixon, D.M. & Polak, A. (1991).** The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses* **34**, 1-18
- Dixon, D.M.; Miglizzo, D.K.; Cooper Jr.; C.R., Solis, O.; Breslin, B. & Szaniszlo, P. (1992).** Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies. *Mycoses* **35**, 17-21
- Dobmeyer, T.S.; Raffel, B.; Dobmeyer, J.M.; Findhammer, S.; Klein, S.A.; Kabelitz, D.; Hoelzer, D.; Helm, E.B. & Rossol, R. (1995).** Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. *Eur J Med Res* **1**, 9-15
- Egido, J.M. & Vinuelas, J. (1997).** Flow cytometric quantitation of phagocytosis in heparinized complete blood with latex particles and *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop* **30**, 441-446
- Elgart, G.W. (1996).** Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* **14**, 77-83
- Engelman, R.M.; Chase, R.M.; Spencer, F.C.; Benjamin, M.V. & Rosenthal, S.A. (1971).** Mycotic infections on prosthetic and homograft heart valves: report of the first case of endocarditis caused by *Hormodendrum dermatitidis*. *Ann Surg* **173**, 455-461
- Engleberg, N.C.; Johnson, J.T.; Bluestein, J.; Madden, K. & Rinaldi, M.G. (1987).** Phaeohyphomycotic cyst caused by a recently described species, *Phaeoannellomyces elegans*. *J Clin Microbiol* **25**, 605-608
- Espinel Ingroff, A.; Kerkerling, T.M. & Shadomy, H.J. (1982).** Isolation of dematiaceous patho-genic fungi from a feed and seed warehouse. *J Clin Microbiol* **15**, 714-719
- Espinel Ingroff, A.; Goldson, P.R.; McGinnis, M.R. & Kerkerling, T.M. (1988).** Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* **26**, 301-307
- Espinel Ingroff, A.; McGinnis, M.R.; Pincus, D.H.; Goldson, P.R. & Kerkerling, T.M. (1989).** Evaluation of the API 20C yeast identification system for the differentiation of some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* **27**, 2565-2569
- Etzioni, A. (1999).** Integrins – the glue of life. *Lancet* **353**, 341-343
- Fader, R.C. & Mc Ginnis, M.R. (1988).** Infections caused by dematiaceous fungi: Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin North Am* **2**, 925-938

- Fallman, M.; Andersson, R. & Andersson, T. (1993).** Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol* **151**, 330-338
- Fattorossi, A.; Nisini, R.; Pizzolo, J.G. & D'Amelio, R. (1989).** New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis. *Cytometry* **10**, 320-325
- Feng, B.; Wang, X.; Hauser, M.; Kaufmann, S.; Jentsch, S.; Haase, G.; Becker, J.M. & Szaniszló, P.J. (2001).** Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect Immun* **69**, 1781-1794
- Flynn, B.J.; Bourbeau, P.P.; Cera, P.J.; Scicchitano, L.M.; Jordan, R.L. & Yap, W.T. (1999).** Phaeohyphomycosis of the epididymis caused by *Exophiala jeanselmei*. *J Urol* **162**, 492-493
- Forsyth, C.B. & Mathews, H.L. (1996).** Lymphocytes utilize CD11b/CD18 for adhesion to *Candida albicans*. *Cell Immunol* **170**, 91-100
- Forsyth, C.B. & Mathews, H.L. (2002).** Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect Immun* **70**, 517-527
- Fothergill, A.W. (1996).** Identification of dematiaceous fungi and their role in human disease. *Clin Infect Dis* **22**, 179-184
- Gabrilovich, D. & Serebrovskaya, L. (1991).** Assessment of phagocytic activity in whole blood using laser flow cytometry. *J Immunol Methods* **140**, 289-290
- Gahmberg, C.G.; Nortamo, P.; Li, R. & Valmu, L. (1992).** Leukocyte cell adhesion proteins: from molecular dissection to clinical applications. *Ann Med* **24**, 329-335
- Gbarah, A.; Gahmberg, C.G.; Ofek, I.; Jacobi, U. & Sharon, N. (1991).** Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptors for type 1-fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**, 4524-4530
- Gemsa, D.; Kalden, J.R. & Resch, K. (1997).** Immunologie. Stuttgart: Georg Thieme.
- Giaimis, J.; Lombard, Y.; Poindron, M. & Muller, C.D. (1994).** Flow cytometry distinction between adherent and phagocytized yeast particles. *Cytometry* **17**, 173-178
- Gold, W.L.; Vellend, H.; Salit, I.E.; Campbell, I.; Summerbell, R.; Rinaldi, M. & Simor, A.E. (1994).** Successful treatment of systemic and local infections due to *Exophiala species*. *Clin Infect Dis* **19**, 339-341
- Göttlich, E.; de Hoog, G.S.; Yoshida, S.; Takeo, K.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1995).** Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses* **38**, 489-494
- Greer, K.E.; Gross, G.P.; Cooper, P.H. & Harding, S.A. (1979).** Cystic Chromomycosis due to *Wangiella dermatitidis*. *Arch Dermatol* **115**, 1433-1434
- Gresham, H.D.; Graham, I.L.; Anderson, D.C. & Brown, E.J. (1991).** Leukocyte adhesion-deficient neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation. Evidence for CD11b/CD18-dependent and -independent mechanisms of phagocytosis. *J Clin Invest* **88**, 588-597
- Gugnani, H.C. & Okeke, C.N. (1989).** Physiological characteristics of environmental isolates of pathogenic dematiaceous fungi. *Mycoses* **32**, 78-83
- Günther, J.; Lobstein, S. & Uhlmann, H. (1994).** Akute Lungenexazerbation bei Mukoviszidose durch *Exophiala dermatitidis*. In 14. CF Ambulanzärztetagung, pp. 92-96. Edited by Schumacher, Titisee.

- Gupta, G.; Burden, A.D.; Shankland, G.S.; Fallowfield, M.E. & Richardson, M.D. (1997).** Tinea nigra secondary to *Exophiala werneckii* responding to itraconazole. *Br J Dermatol* **137**, 483-484
- Gustafson, K.S.; Vercellotti, G.M.; Bendel, C.M. & Hostetter, M.K. (1991).** Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* **87**, 1896-1902
- Haase, G.; Skopnik, H. & Kusenbach, G. (1990).** *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. *Lancet* **336**, 188-189
- Haase, G.; Skopnik, H.; Groten, T.; Kusenbach, G. & Posselt, H.G. (1991).** Long-term fungal cultures from sputum of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **34**, 373-376
- Haase, G.; Sonntag, L.; van de Peer, Y.; Uijthof, J.M.; Podbielski, A. & Melzer-Krick, B. (1995).** Phylogenetic analysis of ten black yeast species using nuclear small subunit rRNA gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**, 19-33
- Haase, G. (1996a).** Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens. *J Clin Microbiol* **34**, 2049-2050
- Haase, G. (1996b).** *Exophiala jeanselmei* var. *castellanii* and *Exophiala mansonii* are synonyms. *Clin Infect Dis* **23**, 852-853
- Haase, G.; Conrad, C.; Kentrup, H. & Schnitzler, N. (1997).** Establishment of an assay for detection of *Exophiala dermatitidis* antibodies using the ABI-CAP TOOL kit. Abstract P397, p. 103. In Abstracts of the 49th Annual Meeting of the German Society for Hygiene & Microbiology 1997. Einhorn Presse Verlag, Reinbeck (Germany).
- Haase, G.; Sonntag, L.; Melzer-Krick, B. & de Hoog, G.S. (1999).** Phylogenetic interference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Stud Mycol* **43**, 80-97
- Hachisuka, H.; Matsumoto, T.; Kusuhaara, M.; Nomura, H.; Nakano, S. & Sasai, Y. (1990).** Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei* after renal transplantation. *Int J Dermatol* **29**, 198-200
- Hammer, M.E.; Harding, S. & Wynn, P. (1983).** Post-traumatic fungal endophthalmitis caused by *Exophiala jeanselmei*. *Ann Ophthalmol* **15**, 853-855
- Hampton, M.B. & Winterbourn, C.C. (1999).** Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**, 15-22
- Hannant, D. (1998).** Phagocytosis and flow cytometric analyses: another step towards an urgent goal. *Vet J* **156**, 79-80
- Hardcastle, R.; Szaniszlo, V. & Szaniszlo, P.J. (1974).** Characterization of dimorphism in *Cladosporium werneckii*. *J Bacteriol* **119**, 294-302
- Harler, M.B.; Wakshull, E.; Filardo, E.J. Albina, J.E. & Reichner, J.S. (1999).** Promotion of neutrophil chemotaxis through differential regulation of beta 1 and beta 2 integrins. *J Immunol* **162**, 6792-6799
- Harvath, L. & Terle, D.A. (1994).** Assay for phagocytosis. *Methods Mol Biol* **34**, 249-259
- Hata, Y.; Naka, W. & Nishikawa, T. (1999).** A case of melanonychia caused by *Exophiala dermatitidis*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **40**, 231-234
- Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C. & Pegler, D.N. (1995).** Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Wallingford, CAB International, 8th Edition.
- Hayashi, M.; Kiryu, H.; Suenaga, Y. & Asahi, M. (1994).** A case of cutaneous infection by *Exophiala jeanselmei*. *J Dermatol* **21**, 971-973

- Hazen, K.C. & Glee, P.M. (1995).** Adhesion of fungi. *Methods Enzymol* **253**, 414-424
- Hed, J.; Hallden, G.; Johansson, S.G.O. & Larsson, P. (1987).** The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* **101**, 119-125
- Heinzelmann, M.; Gardner, S.A.; Mercer-Jones, M.; Roll, A.J. & Polk, H.C. (1999).** Quantification of phagocytosis in human neutrophils by flow cytometry. *Microbiol Immunol* **43**, 505-512
- Helms, S.R. & McLeod, C.G. (2000).** Systemic *Exophiala jeanselmei* infection in a cat. *J Am Vet Med Assoc* **217**, 1858-1861
- Hemashettar, B.M.; Patil, C.S.; Nagalotimath, S.J. & Thammayya, A. (1986).** Mycetoma due to *Exophiala jeanselmei* (a case report with description of the fungus). *Indian J Pathol Microbiol* **29**, 75-78
- Hironaga, M.; Watanabe, S.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1981).** Annellated conidiogenous cells in *Exophiala dermatitidis*, agent of phaeohyphomycosis. *Mycologia* **73**, 1181-1183
- Hironaga, M.; Mochizuki, T. & Watanabe, S. (1982).** Cutaneous phaeohyphomycosis of the sole caused by *Exophiala jeanselmei* and its susceptibility to amphotericin B, 5-FC and ketoconazole. *Mycopathologia* **79**, 101-104
- Hiruma, M.; Kawada, A.; Ohata, H.; Ohnishi, Y.; Takahashi, H.; Yamazaki, M.; Ishibashi, A.; Hatsuse, K.; Kakiyama, M. & Yoshida, M. (1993).** Systemic phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*. *Mycoses* **36**, 1-7
- Hof, H. (1991).** Microbial strategies for intracellular survival. *Infection* **19**, 202-205
- Hofling-Lima, A.L.; Freitas, D.; Fischmann, O.; Yu, C.Z.; Roizenblatt, R. & Belfort, R. (1999).** *Exophiala jeanselmei* causing late endophthalmitis after cataract surgery. *Am J Ophthalmol* **128**, 512-514
- Hogg, N. & Landis, R.C. (1993).** Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* **5**, 383-390
- Hogg, N.; Stewart, M.P.; Scarth, S.L.; Newton, R.; Shaw, J.M.; Law, S.K. & Klein, N. (1999).** A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta 2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* **103**, 97-106
- Hohl, P.E.; Holley Jr., H.P.; Prevost, E.; Ajello, L. & Padhye, A.A. (1983).** Infections due to *Wangiella dermatitidis* in humans: report of the first documented case from the United States and a review of the literature. *Rev Infect Dis* **5**, 854-864
- Horré, R. & de Hoog, G. S. (1999).** Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Stud Mycol* **43**, 176-193
- Hurtado, I. & Magran, B.L. (1989).** Invasion of a soft contact lens by *Exophiala jeanselmei*. *Mycopathologia* **105**, 171-173
- Hynes, R.O. (1992).** Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25
- Iwatsu, T. & Miyaji, M. (1984).** Phaeomycotic cyst. A case with a lesion containing a wooden splinter. *Arch Dermatol* **120**, 1209-1211
- Jacobson, E.S.; Hove, E. & Emery, H.S. (1995).** Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect Immun* **63**, 4944-4945
- Jakelic, J.; Kokic, S.; Hozo, I.; Maras, J. & Fabijanic, D. (1995).** Nonspecific immunity in diabetes: hyperglycemia decreases phagocytic activity of leukocytes in diabetic patients. *Med Arh* **49**, 9-12

- Jentsch, S. (2000).** Immunologische Untersuchungen zu ascomycetalen Schwarzen Hefen. Diplomarbeit (RWTH Aachen)
- Kabel, P.J.; Illy, K.E.; Holl, R.A.; Buiting, A.G. & Winternans, R.G. (1994).** Nosocomial intravascular infection with *Exophiala dermatitidis*. Lancet **344**, 1167-1168
- Kagan, B.L.; Ganz, T. & Lehrer, R.I. (1994).** Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. Toxicology **87**, 131-149
- Kane, J. & Summerbell, R.C. (1987).** Sodium Chloride as aid in identification of *Phaeoannellomyces werneckii* and other medically important dematiaceous fungi. J Clin Microbiol **25**, 944-946
- Kano, K. (1937).** Über die Chromoblastomykose durch einen noch nicht als pathogen beschriebenen Pilz: *Hormiscium dermatitidis*. Archiv Syph Derm **176**, 282-294
- Kano, R.; Kusuda, M.; Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (2000).** First isolation of *Exophiala dermatitidis* from a dog: identification by molecular analysis. Vet Microbiol **76**, 201-205
- Karuppayil, S.M. & Szanislo, P.J. (1997).** Importance of calcium to the regulation of polymorphism in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. J Med Vet Mycol **35**, 379-388
- Kaufmann, S.H.E. (1989a).** Immunity to bacteria and fungi. Curr Opin Immunol **1**, 431-440
- Kaufmann, S.H.E. & Reddehase, M.J. (1989b).** Infection of phagocytic cells. Curr Opin Immunol **2**, 43-49
- Kawachi, Y.; Tateishi, T.; Shojima, K.; Iwata, M. & Otsuka, F. (1995).** Subcutaneous phaeomycotic cyst of the finger caused by *Exophiala jeanselmei*: association with a wooden splinter. Cutis **56**, 41-43
- Kazanas, N. (1986).** Pathogenicity of a fungus resembling *Wangiella dermatitidis* isolated from edible mushrooms. Appl Environ Microbiol **51**, 261-267
- Keller, R.; Keist, R. & Joller, P. (1995).** Macrophage response to microbial pathogens: modulation of the expression of adhesion, CD14, and MHC class II molecules by viruses, bacteria, protozoa and fungi. Scand J Immunol **42**, 337-344
- Kenney, R.T.; Kwon Chung, K.J.; Waytes, A.T.; Melnick, D.A.; Pass, H.I.; Merino, M.J. & Gallin, J.I. (1992).** Successful treatment of systemic *Exophiala dermatitidis* infection in a patient with chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis **14**, 235-242.
- Kerkmann, M.L., Piontek, K.; Mitze, H. & Haase, G. (1999).** Isolation of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* in a case of otitis externa. Clin Infect Dis **29**, 939-940
- Kerr, C.M.; Perfect, J.R.; Craven, P.C.; Jorgensen, J.H.; Drutz, D.J.; Shelburne, J.D. Gallis, A.H. & Gutman, R.A. (1983).** Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med **99**, 334-337.
- Kim, H.U.; Kang, S.H. & Matsumoto, T. (1998).** Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei* in a patient with advanced tuberculosis. Br J Dermatol **138**, 351-353
- Kimby, E.; Rincón, J.; Patarroyo, M. & Mellstedt, H. (1994).** Expression of adhesion molecules CD11/CD18 (Leu-CAMs, beta 2-integrins), CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in B-chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma **13**, 297-306
- Kinkead, S.; Jancic, V.; Stasko, T. & Boyd, A.S. (1996).** Chromoblastomycosis in a patient with a cardiac transplant. Cutis **58**, 367-370
- Kozel, T.R. (1993).** Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. Arch Med Res **24**, 211-218

- Kurita, N.; Terao, K.; Brummer, E.; Ito, E.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1991). Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils. Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. *Mycopathologia* **115**, 207-213
- Kusenbach, G.; Skopnik, H.; Haase, G.; Friedrichs, F. & Dohmen, H. (1992). *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* **151**, 344-346
- Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Lee, K.H.; Yoon, M.S. & Chun, W.H. (1997). The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis. *Immunology* **92**, 104-110
- Levenson, J.E.; Duffin, R.M.; Gardner, S.K. & Pettit, T.H. (1984). Dematiaceous fungal keratitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmic Surg* **15**, 578-582
- Levitz, S.M. (1992). Overview of host defenses in fungal infections. *Clin Infect Dis* **14**, 37-42
- Levitz, S.M.; North, E.A.; Dupont, M.P. & Harrison, T.S. (1995a). Mechanisms of inhibition of *Cryptococcus neoformans* by human lymphocytes. *Infect Immun* **63**, 3550-3554
- Levitz, S.M.; Mathews, H.L. & Murphy, J.W. (1995b). Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today* **16**, 387-391
- Li, D.; Li, R.; Wang, D. & Ma, S. (1999). In vitro activities of five antifungal agents against pathogenic *Exophiala* species. *Chin Med J* **112**, 484-488
- Liou, J.M.; Wang, J.T.; Wang, M.H.; Wang, S.S. & Hsueh, R.R. (2002). Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala* species in immunocompromised hosts. *J Formos Med Assoc*, **101**, 523-526
- Listemann, H.; Sinner, U. & Meigel, W. (1986). *Exophiala mansonii* als Erreger einer superfiziellen Phaeohyphomycose. *Mykosen* **29**, 480-485
- Listemann, H. & Freiesleben, H. (1996). *Exophiala mesophila spec. nov.* *Mycoses* **39**, 1-3
- Lopez Rodriguez, C., Nueda, A.; Grospierre, B.; Sanchez-Madrid, F.; Fischer, A.; Springer, T.A. & Corbi, A.L. (1993). Characterization of two new CD18 alleles causing severe leukocyte adhesion deficiency. *Eur J Immunol* **23**, 2792-2798
- Lye, W.C. (1993). Peritonitis due to *Wangiella dermatitidis* in a patient on CAPD. *Perit Dial Int* **13**, 319-320
- Lyman, C.A. & Walsh, T.J. (1994). Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **62**, 1489-1493
- Magana, M. & Magana-Garcia, M. (1989). Mycetoma. *Dermatol Clin* **7**, 203-217
- Majima, T.; Minegishi, N.; Nagatomi, R.; Ohashi, Y.; Tsuchiya, S.; Kobayashi, K. & Konno, T. (1990). Unusual expression of IgG Fc receptors on peripheral granulocytes from patients with leukocyte adhesion deficiency (CD11/CD18 deficiency). *J Immunol* **145**, 1694-1699
- Manian, F.A. & Brischetto, M.J. (1993). Pulmonary infection due to *Exophiala jeanselmei*: successful treatment with ketoconazole. *Clin Infect Dis* **16**, 445-446
- Margo, C.E. & Fitzgerald, C.R. (1990). Postoperative endophthalmitis caused by *Wangiella dermatitidis*. *Am J Ophthalmol* **110**, 322-323
- Marks, J.G.; King, Jr., R.D. & Davis, B.M. (1980). Treatment of tinea nigra palmaris with miconazole. *Arch Dermatol* **116**, 321-322
- Marpmann, G. (1886). *Saccharomyces niger*. Eine neue Hefeform. *Zentralblatt für allgemeine Gesundheitspflege* **5**, 422-425

- Martin, E. & Bhakdi, S. (1991).** Quantitative analysis of opsonophagocytosis and of killing of *Candida albicans* by human peripheral blood leukocytes by using flow cytometry. *J Clin Microbiol* **29**, 2013-2023
- Matos, T.; de Hoog, G.S.; de Boer, A.G.; de Crom, I. & Haase, G. (2002).** High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses* **45**, 373-377
- Matsumoto, M.; Padhey, A.A.; Ajello, L. & Standard, P.G. (1984).** Critical review of human isolates of *Wangiella dermatitidis*. *Mycologia* **76**, 232-249
- Matsumoto, T.; Padhye, A.A. & Ajello, L. (1987).** Medical significance of the so-called black yeasts. *Eur J Epidemiol* **3**, 87-95
- Matsumoto, T.; Matsuda, T. & McGinnis, M.R. (1990).** A previously undescribed synanamorph of *Wangiella dermatitidis*. *J Med Vet Mycol* **28**, 437-444
- Matsumoto, T. & Ajello, L. (1991).** Dematiaceous fungi potential pathogenic to humans and lower animals. *Handbook of Applied Mycology*, pp 117-162. New York: Marcel Dekker
- Matsumoto, T.; Matsuda, T.; Padhye, A.A.; Standard, P.G. & Ajello, L. (1992).** Fungal melan-onychia: ungual phaeohyphomycosis caused by *Wangiella dermatitidis*. *Clin Exp Dermatol* **17**, 83-86
- Matsumoto, T.; Matsuda, T.; McGinnis, M.R. & Ajello, L. (1993).** Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses* **36**, 145-155
- Matsumoto, T., Ajello, L.; Matsuda, T.; Szaniszlo, P.J. & Walsh, T.J. (1994).** Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis. *J Med Vet Mycol* **32**, 329-349
- Mayser, P.; Grunder, K.; Qadripur, S.; Kohn, F.M.; Schill, W.B. & de Hoog, G.S. (1996).** Diagnostik, Klinik und Therapie der frühen Chromoblastomycose an einem Fallbeispiel. *Hautarzt* **47**, 693-700
- McCown, H.F. & Sahn, E.E. (1997).** Subcutaneous phaeohyphomycosis and nocardiosis in a kidney transplant patient. *J Am Acad Dermatol* **36**, 863-866
- McGinnis, M.R. (1977).** *Wangiella dermatitidis*, a correction. *Mycotaxon* **5**, 367-369
- McGinnis, M.R.; Schell, W.A. & Carson, J. (1985).** Phaeoannellomyces and the *Phaeococcomycetaceae*, new dematiaceous blastomycete taxa. *Sabouraudia* **23**, 179-188
- McGough, D. (1993).** Clinical and laboratory aspects of the "Black Yeasts". *Clin Microbiol Newslet* **15**, 145-151
- Medeiros, A.I.; Bonato, V.L.; Malheiro, A.; Dias, A.R.; Silva, C.L. & Faccioli, L.H. (2002).** *Histoplasma capsulatum* inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leukocytes. *Scand J Immunol* **56**, 392-398
- Meletiadiis, J.; Meis, J.F.; de Hoog, G.S. & Verweij, P.E. (2000).** In vitro susceptibilities of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses* **43**, 309-312
- Middelhoven, W.J.; de Jong, I.M. & de Winter, M. (1990).** Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other ensiled vegetable crops. *Antonie van Leeuwenhoek* **57**, 153-158
- Miller, R.A. & Britigan, B.E. (1997).** Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**, 1-18
- Mirza, S. H.; Hannan, A.; Ahmad, A. & Ahmad, M. (1993).** Subcutaneous phaeohyphomycosis. *J Infec* **27**, 75-78
- Mittag, H. (1993).** The fine structure of *Hortaea werneckii*. *Mycoses* **36**, 343-350

- Moissenet, D.; Marsol, P. & Vu-Thien, H. (1995).** Repeated isolation of *Exophiala dermatitidis* from catheter blood cultures. *Journal de Mycologie Medicale* **5**, 179-181
- Mok, W.Y. & Luizao, R.C. (1981).** Serological analysis and pathogenic potentials of *Wangiella dermatitidis* isolated from bats. *Mycopathologia* **73**, 93-99
- Mok, W.Y. (1982).** Nature and identification of *Exophiala werneckii*. *J Clin Microbiol* **16**, 976-978
- Mok, W.Y. & Barreto da Silva, M.S. (1984).** Mycoflora of the human dermal surfaces. *Can J Microbiol* **30**, 1205-1209
- Monroe, P.W. & Floyd, W.E., Jr., (1981).** Chromohyphomycosis of the hand due to *Exophiala jeanselmei* (*Phialophora jeanselmei*, *Phialophora gougerotii*) - case report and review. *J Hand Surg* **6**, 370-373
- Morel, F.; Doussiere, J. & Vignais, P.V. (1991).** The superoxide-generating oxidase phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* **201**, 523-546
- Mosser, D.M. (1994).** Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. *Immunol Ser* **60**, 99-114
- Muotoe-Okafor, F.A. & Gugnani, H.C. (1993).** Isolation of *Lecythophora mutabilis* and *Wangiella dermatitidis* from the fruit eating bat, *Eidolon helvum*. *Mycopathologia* **122**, 95-100
- Murphy, J.W. (1990).** Immunity to fungi. *Cur Opin Immunol* **2**, 360-367
- Murphy, J.W.; Hidore, M.R. & Wong, S.C. (1993).** Direct interactions of human lymphocytes with the yeast-like organism, *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **91**, 1553-1566
- N'Doye, B.; De Bievre, C.; Gueye, P.M.; Cloatre, G.; Mbaye, P.S. & Klotz, F. (1997).** *Exophiala jeanselmei* phaeohyphomycosis in a Senegalese patient with HTLV-I infection and lymphoma. *Med Trop* **57**, 414-415
- Nachman, S.; Alpan, O.; Malowitz, R. & Spitzer, E.D. (1996).** Catheter-associated fungemia due to *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *J Clin Microbiol* **34**, 1011-1013
- Naka, W.; Harada, T.; Nishikawa, T. & Fukushima, R. (1986).** A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* **29**, 445-452
- Neumeister, B.; Zollner, T.M.; Krieger, D.; Sterry, W. & Marre, R. (1995).** Mycetoma due to *Exophiala jeanselmei* and *Mycobacterium chelonae* in a 73- year-old man with idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Mycoses* **38**, 271-276
- Nishimura, K. & Miyaji, M. (1982).** Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from a humidifier. *Mycopathologia* **77**, 173-181
- Nishimura, K. & Miyaji, M. (1983).** Studies on the phylogenesis of pathogenic 'black yeasts'. *Mycopathologia* **81**, 135-144
- Nishimura, K.; Miyaji, M.; Taguchi, H. & Tanaka, R. (1987).** Fungi in bathwater and sludge of bathroom drainpipes. First frequent isolation of *Exophiala species*. *Mycopathologia* **97**, 17-23
- Nucci, M.; Akiti, T.; Barreiros, G.; Silveira, F.; Revankar, S.G.; Wickes, B.L.; Sutton, D.A. & Patterson, T.F. (2002).** Nosocomial outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with contamination of hospital water. *Clin Infect Dis* **34**, 1475-1480
- Padhye, A.A. & Ajello, L. (1987).** A case of chromoblastomycosis with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* **30**, 134
- Patarroyo, M. (1991).** Leukocyte adhesion in host defense and tissue injury. *Clin Immunol Immunopathol* **60**, 333-348

- Patarroyo, M. (1994).** Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology* **191**, 474-477
- Peltroche-Llacsahuanga, H.; Schnitzler, N.; Schmidt, S.; Tintelnot, K.; Lütticken, R. & Haase, G. (2000a).** Phagozytosis, oxidative burst and killing of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by human neutrophils. *FEMS Microbiol Lett* **191**, 151-155
- Peltroche-Llacsahuanga, H.; Schmidt, S.; Schnitzler, N.; Lütticken, R. & Haase, G. (2000b).** Simultaneous measurement of bipolymer-mediated Mac-1 up-regulation and adherence of neutrophils: a novel flow cytometric approach for predicting initial inflammatory interaction with foreign materials. *J Immunol Methods* **258**, 13-25
- Pepe, R.R. & Vigolo, G. (1986).** First isolation of *Exophiala jeanselmei* (Lang) De Hoog from a dental granuloma. *Ann Osp Maria Vittoria Torino* **29**, 283-291
- Perticarari, S.; Presani, G. & Banfi, E. (1994).** A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J Immunol Methods* **170**, 117-124
- Petersen, M.M.; Steadman, R. & Williams, J.D. (1994).** Human neutrophils are selectively activated by independent ligation of the subunits of the CD11b/CD18 integrin. *J Leukoc Biol* **56**, 708-713
- Peterson, P.K.; Lee, D.; Suh, H.J.; Devalon, M.; Nelson, R.D. & Keane, W.F. (1986).** Intracellular survival of *Candida albicans* in peritoneal macrophages from chronic peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* **7**, 146-152
- Podbielski, A.; Schnitzler, N.; Beyhs, P. & Boyle, M.D.P. (1996).** M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Mol Microbiol* **19**, 429-441
- Polacheck, I.; Antman, A.; Barth, I.; Sagi, E. & Giloh, H. (1995).** Adherence of *Candida albicans* to epithelial cells: studies using fluorescently labelled yeasts and flow cytometry. *Microbiology* **141**, 1523-1533
- Polak, A. (1984).** Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. *Sabouraudia* **22**, 167-169
- Polak, A. & Dixon, D.M. (1989).** Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater susceptibility to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1639-1640
- Polak, A. (1990).** Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses*, **33**, 215-224
- Pospisil, L.; Skorkovska, S. & Moster, M. (1990a).** Corneal phaeohyphomycosis caused by *Wangiella dermatitidis*. *Ophthalmologica* **201**, 128-132
- Pospisil, L.; Bucek, J.; Moster, M. & Synek, S. (1990b).** Experimental phaeohyphomycosis. *Mycoses* **33**, 469-475
- Potel, J.; Rhode, G.; Seeliger, H. & Werry, H. (1984).** *Exophiala jeanselmei* (*Phialophora jeanselmei*)-demonstration in the vitreous body of the eye. *Mykosen* **27**, 380-384
- Rath, P.-M.; Müller, K.-D.; Dermounmi, H. & Ansorg, R. (1997).** A comparison of methods of phenotypic and genotypic fingerprinting of *Exophiala dermatitidis* isolated from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* **46**, 757-762
- Ravisse, P. & Rodriguez Vindas, V.J. (1981).** Mycotic cysts. A histopathologic study. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **74**, 46-54
- Reiss, N.R. & Mok, W.Y. (1979).** *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus Brazil. *Sabouraudia* **17**, 213-218
- Remon, C.; de la Calle, I.J.; Vallejo-Carrion, F.; Perez-Ramos, S. & Fernandez-Ruiz, E. (1996).** *Exophiala jeanselmei* peritonitis in a patient on CAPD. *Perit Dial Int* **16**, 536-538

- Rieu, P.; Ueda, P.; Haruta, I.; Sharma, C.P. & Arnaout, M.A. (1994).** The A-domain of beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is a receptor for the Hookworm-derived neutrophil adhesion inhibitor NIF. *J Cell Biol* **127**, 2081-2091
- Rink, T.J.; Tsien, R.Y. & Pozzan, T. (1982).** Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *J Cell Biol* **95**, 189-196
- Ronan, S.G.; Uzoaru, I.; Nadimpalli, V.; Guitart, J. & Manaligod, J.R. (1993).** Primary cutaneous phaeohyphomycosis: report of seven cases. *J Cutan Pathol* **20**, 223-228
- Roncoroni, A.J. & Smayevsky, J. (1988).** Arthritis and endocarditis from *Exophiala jeanselmei* infection. *Ann Intern Med* **108**, 773
- Roos, D. (1991).** The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr* **69**, 975-980
- Root, R.K. (1989).** Leukocyte adhesion proteins: their role in neutrophil function. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **101**, 207-224
- Ross, G.D. & Vetvicka, V. (1993).** CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* **92**, 181-184
- Rossmann, S.N.; Cernoch, P.L. & Davis, J.R. (1996).** Dematiaceous fungi are an increasing cause of human disease. *Clin Infect Dis* **22**, 73-80
- Rotstein, D.; Parodo, J.; Taneja, R. & Marshall, J.C. (2000).** Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock* **14**, 278-283
- Sabbaga, E.; Tedesco-Marchesi, L.M.; Lacaz, C.daS.; Cuce, L.C.; Salebian, A.; Heins-Vaccari, E.M.; Sotto, M.N.; Valente, N.Y.; Porto, E. & Levy-Neto, M. (1994).** Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Exophiala jeanselmei*. Report of 3 cases in patients with a kidney transplant. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **36**, 175-183
- Salih, H.; Husfeld, L. & Adam, D. (1997).** Inhibitory effect of heparin on neutrophil phagocytosis and burst production using a new whole-blood cytofluorometric method for determination. *Eur J Med Res* **2**, 507-513
- Saresella, M.; Roda, K.; Speciale, L.; Taramelli, D.; Mendozzi, E.; Guerini, F. & Ferrante, P. (1997).** A rapid evaluation of phagocytosis and killing of *Candida albicans* by CD13+ leukocytes. *J Immunol Methods* **210**, 227-234
- Sartoris, K.E.; Baillie, G.M.; Tiernan, R. & Rajagopalan, P.R. (1999).** Phaeohyphomycosis from *Exophiala jeanselmei* with concomitant *Nocardia asteroides* infection in a renal transplant recipient: a case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* **19**, 995-1001
- Sautter, R.E.; Bliss, D.M ; Morrow, D. & Lee, R.E. (1984).** Isolation of *Exophiala jeanselmei* associated with esophageal pathology: three cases, laboratory and clinical features. *Mycopathologia* **87**, 105-109
- Schaffner, A.; Davis, C.E.; Schaffner, T.; Markert, M.; Douglas, H. & Braude, A.I. (1986).** In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* **78**, 511-524
- Schmitz, G. & Rothe, G. (1994).** Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart: Schattauer.
- Schnitzler, N.; Haase, G.; Büssing, A.; Kaufhold, A.; Beyhs, P. & Podbielski, A. (1995).** Measuring resistance to phagocytosis of group A and G *streptococci*: comparison of direct bactericidal assay and flow cytometry. *Med Microbiol Immunol* **184**, 17-22
- Schnitzler, N.; Peltroche-Llagsahuanga, H.; Bestier, N.; Zündorf, J.; Lütticken, R. & Haase, G. (1999a).** Effect of Melanin and Carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on Phagocytosis, Oxidative Burst, and Killing by Human Neutrophils. *Infect Immun* **67**, 94-101

- Schnitzler, N.; Haase, G.; Podbielski, A.; Lütticken, R. & Schweitzer, K.G. (1999b).** A co-stimulatory signal through ICAM-beta2 integrin-binding potentiates neutrophil phagocytosis. *Nat Med* **5**, 231-235
- Schnur, R.A. & Newman, S.L. (1990).** The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. *J Immunol* **144**, 4765-4772
- Schwinn, A.; Strohm, S.; Helgenberger, M.; Rank, C. & Bröcker, E.-B. (1993).** Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei* treated with itraconazole. *Mycoses* **36**, 445-448
- Scott, J.W.; Luckie, J.; Pfister, W.C.; Padhye, A.A.; Standard, P.G.; Bohan, C.A. & Breazeale, R.D. (1986).** Phaeohyphomycotic cyst caused by *Wangiella dermatitidis*. *Mykosen* **29**, 243-247
- Severo, L.C.; Bassanesi, M.C. & Londero, A.T. 1994.** Tinea nigra: report of four cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil) and a review of Brazilian literature. *Mycopathologia* **126**, 157-162
- Shaoxi, W.; Ningru, G. & Zhengnan, Y. (1996).** Characterization of pathogenic fungi genomes using pulsed field gel electrophoresis. *Chin Med Sciences J* **11**, 188-190
- Shapiro, H. (1995).** Practical Flow Cytometry. New York: Alan R. Liss.
- Shaw, J.M.; Al-Shamkhani, A.; Boxer, L.A.; Buckley, C.D.; Dodds, A.W.; Klein, N.; Nolan, S.M.; Roberts, I.; Roos, D.; Scarth, S.L.; Simmons, D.L.; Tan, S.M. & Law, S.K. (2001).** Characterization of four CD18 mutants in leukocyte adhesion deficient (LAD) patients with differential capacities to support expression and function of the CD11/CD18 integrins LFA-1, Mac-1 and p150/95. *Clin Exp Immunol* **126**, 311-318
- Simpson, A.J. & Nightingale, J.M. (1995).** Intravascular line infection with *Exophiala dermatitidis*. *Lancet* **345**, 67
- Sindhuphak, W.; McDonald, E.; Head, E. & Hudson, R.D. (1985).** *Exophiala jeanselmei* infection in a postrenal transplant patient. *J Am Acad Dermatol* **13**, 877-881
- Sixbey, J.W.; Fields, B.T.; Sun, C.N.; Clark, R.A. & Nolan, C.M. (1979).** Interactions between human granulocytes and *Blastomyces dermatitidis*. *Infect Immun* **23**, 41-44
- Sixt, M.; Hallmann, R.; Wendler, O.; Scharffetter-Kochanek, K. & Sorokin, L.M. (2001).** Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negativ polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix moleküles. Relevance for leukocyte extravasation. *J Biol Chem* **276**, 1878-1887
- Spatafora, J.W.; Mitchell, T.G. & Vilgalys, R. (1995).** Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens. *J Clin Microbiol* **33** 1322-1326
- Springer, T.A. (1990).** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434
- Springer, T.A. (1994).** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314
- Standard, P.G.; Kaufman, L. & Padhye, A.A. (1988).** An immunological procedure for the rapid identification of *Phaeoannellomyces werneckii*. *Diagn Clin Immunol* **5**, 367-370
- Steadham, J.E.; Geis, P.A. & Simmank, J.L. (1986).** Use of carbohydrate and nitrate assimilations in the identification of dematiaceous fungi. *Diagn Microbiol Infect Dis* **5**, 71-75
- Stickle, J.E. (1996).** The neutrophil. Function, disorders, and testing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **26**, 1013-1021

- Sudduth, E.J.; Crumbley, A.J.d. & Farrar, W.E. (1992).** Phaeohyphomycosis due to *Exophiala species*: clinical spectrum of disease in humans. Clin Infect Dis **15**, 639-644
- Szaniszlo, P.J.; Karuppaiyil, S.M.; Mendoza, L. & Rennard, R.J. (1993).** Cell cycle regulation of polymorphism in *Wangiella dermatitidis*. Arch Med Res **24**, 251-261
- Tachavanich, K.; Pattanapanyasat, K.; Sarasombath, S.; Suwannagool, S. & Suvattee, V. (1996).** Opsonophagocytosis and intracellular killing activity of neutrophils in patients with human immunodeficiency virus infection. Asian Pac J Allergy Immunol **14**, 49-56
- Taguchi, H.; Tanaka, R.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1988).** Application of flow cytometry to differentiating *Exophiala dermatitidis*, *E. moniliae* and *E. jeanselmei* from each other. Mycopathologia **103**, 87-90
- Thammayya, A. & Sanyal, M. (1980).** *Exophiala jeanselmei* causing mycetoma pedis in India. Sabouraudia **18**, 91-95
- Tintelnot, K.; de Hoog, G.S.; Thomas, E.; Steudel, W.-I.; Huebner, K. & Seeliger, H.P.R. (1991a).** Cerebral phaeohyphomycosis caused by an *Exophiala species*. Mycoses **34**, 239-244
- Tintelnot, K.; de Hoog, G.S. & Tan, C.S. (1991b).** Little known mycoses caused by dematiaceous opportunists. Immun Infekt **19**, 111-115
- Tintelnot, K. (1997).** Therapy of infections caused by dematiaceous fungi. Mycoses **40**, 91-96
- Tran, T.L.; Auger, P.; Marchand, R.; Carrier, M. & Pelletier, C. (1997).** Perioperative variation in phagocytic activity against *Candida albicans* measured by a flow-cytometric assay in cardiovascular-surgery patients. Clin Diagn Lab Immunol **4**, 447-451
- Uijthof, J.M.J.; de Hoog, G.S.; de Cock, A.W.A.M.; Takeo, K. & Nishimura, K. (1994).** Pathogenicity of strains of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*: an evaluation based on polymerase chain reaction. Mycoses **37**, 235-242
- Uijthof, J.M.J. & de Hoog, G.S. (1995).** PCR-ribotyping of type isolates of currently accepted *Exophiala* and *Phaeococcomyces species*. Antonie van Leeuwenhoek **68**, 35-42
- Uijthof, J.M.J. (1996).** Relationships within the black yeast genus *Exophiala* based on ITS1 sequences. Mycol Res **100**, 1265-1271
- Uijthof, J.M.J.; van Belkum, A.; de Hoog, G.S. & Haase, G. (1998).** *Exophiala dermatitidis* and *Sarcinomyces phaeomuriformis*: ITS1-sequencing and nutritional physiology. J Med Vet Mycol **36**, 143-152
- Ulson, C.M. (1959).** Contribuicao para o estudo das chamadas "leveduras pretas" (Thesis). Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil.
- Untereiner, W.A.; Straus, N.A. & Malloch, D. (1995).** A molecular-morphotaxonomic approach to the systematics of the *Herpotrichiellaceae* and allied black yeasts. Mycol Res **99**, 897-913
- Vakili, N.G. (1993).** *Exophiala jeanselmei*, a pathogen of earthworm species. J Med Vet Mycol **31**, 343-346
- Valmu, L.; Autero, M.; Siljander, P.; Patarroyo, M. & Gahmberg, C.G. (1991).** Phosphorylation of the beta-subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. Eur J Immunol **21**, 2857-2862
- Vartian, C.V.; Shaes, S.M.; Padhye, A.A. & Ajello, L. (1985).** *Wangiella dermatitidis* endocarditis in an intravenous drug user. Am J Med **78**, 703-707
- Vartivarian, S.E. (1992).** Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. Clin Infect Dis **14**, 30-36

- Ventin, M.; Ramirez, C. & Garau, J. (1987). *Exophiala dermatitidis* de Hoog from a valvular aortal prothesis. Mycopathologia 99, 45-46
- Venugopal, P.V.; Venugopal, T.V.; Ramakrishna, E.S. & Ilavarasi, S. (1993). Antimycotic susceptibility testing of agents of black grain eumycetoma. J Med Vet Mycol 31, 161-164
- Vlassopoulos, D.; Kouppari, G.; Arvanitis, D.; Papaefstathiou, K.; Dounavis, A.; Velegraki, A. & Hadjiconstantinou, V. (2001). *Wangiella dermatitidis* peritonitis in a CAPD patient. Perit Dial Int 21, 69-97
- Wang, C.; Hayashi, H.; Harrison, R.; Chiu, B.; Chan, J.R.; Ostergaard, H.L.; Inman, R.D.; Jongstra, J.; Cybulsky, M.I. & Jongstra-Bilen, J. (2002). Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. J Immunol 169, 415-423
- Wang, Y.; Aisen, P. & Casadevall, A. (1995). *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. Infect Immun 63, 3131-3136
- Whittle, D.I. & Kominos, S. (1995). Use of itraconazole for treating subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei*. Clin Infect Dis 21, 1068
- Whyte, M. K. B.; Meagher, L.C.; MacDermot, J. & Haslett, C. (1993). Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. J Immunol 150, 5124-5134
- Wilson, R.M.; Galvin, A.M.; Robins, R.A. & Reeves, W.G. (1985). A flow cytometric method for the measurement of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes. J Immunol Methods 76, 247-253
- Woollons, A.; Darley, C.R.; Pandian, S.; Arnstein, P.; Blackee, J. & Paul, J. (1996). Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis* following intra-articular steroid injection. Brit J Dermatol 135, 475-477
- Xia, Y.; Borland, G.; Huang, J.; Mizukami, I.F.; Petty, H.R.; Todd, R.F. & Ross, G.D. (2002). Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. J Immunol 169, 6417-6426
- Yan, S.R.; Huang, M. & Berton, G. (1997). Signaling by adhesion in human neutrophils. J Immunol 158, 1902-1910
- Yong, K. & Khwaja, A. (1990). Leucocyte cellular adhesion molecules. Blood Rev 4, 211-225
- Young, J.M. & Ulrich, E. (1953). Sporotrichiosis produced by *Sporotrichium gougeroti*. Arch Dermatol Syphil (Chicago) 67, 44-52
- Zackheim, H.S.; Halde, C.; Goodman, R.S.; Marchasin, S. & Buncke Jr., H.I. (1985). Phaeohyphomycotic cyst of the skin caused by *Exophiala jeanselmei*. J Am Acad Dermatol 12, 207-212
- Zalar, P.; de Hoog, G.S. & Gunde-Cimerman, N. (1999). Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. Stud Mycol 43, 38-48
- Zielinska, M. & Fenrych, W. (1997). The application of a flow cytometric assay for evaluation of phagocytosis of neutrophils. Acta Biochim Pol 44, 121-125

7 Anhang

7.1 Verwendete Geräte

- Durchflusszytometer: FACScan®, Becton Dickinson, San Jose, USA
- Zentrifuge: Varifuge K, Heraeus Christ, Düsseldorf, Deutschland
- Schütteltisch: Biometra® - biometrische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
- Ultraschallbad: Transsonic 460/H, Elma®, Singen, Deutschland
- Wasserbad: Typ 1083, GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland.
- heizbares Magnetrührgerät: Heidolph MR 20002, Kelheim, Deutschland
- Vortexer: Heidolph Reax 2000, Kelheim, Deutschland
- Thermomixer: Eppendorf S436, Hamburg, Deutschland
- Photometer: Ultrospec III®, Pharmacia Biotech, München, Deutschland
- pH-Meter: PHM 82, Standard ph-Meter, Radiometer A\S, Kopenhagen, Dänemark
- Mikroskope: Leitz Dialux 22 EB, bzw. Leitz DM RB (Epifluoreszenz-/Interferenzkontrast-Mikroskop), Leica, Wetzlar, Deutschland

7.2 Verwendete Abkürzungen

AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrom
ATCC	American Type Culture Collection (USA)
BCECF	2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6) carboxyfluorescein
BCECF-AM	2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-penta-acetoxymethyl-ester
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBS	Cetralbureau voor Schimmelcultures (Niederlande)
CD	Cluster of Differentiation (Antigen-Differenzierungs-Cluster)
CD11a	α -Kette des LFA-1-Moleküls
CD11b	α -Kette des Mac-1-Moleküls
CD11c	α -Kette des gp150/95-Moleküls
CD18	β -Kette der β_2 -Integrine
CAPD	Kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse
CF	Cystic fibrosis (Zystische Fibrose)
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CR1	Komplementrezeptor 1 (CD34)
CR3	Komplementrezeptor 3 (Mac-1, CD18/11b)
CR4	Komplementrezeptor 4 (gp150/95, CD18/11c)
DBA	Direkter Bakterizidie Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. bergeri</i>	<i>Exophiala bergeri</i>
<i>E. castellanii</i>	<i>Exophiala. castellanii</i>
<i>E. dermatitidis</i>	<i>Exophiala. dermatitidis</i>
<i>E. jeanselmei</i>	<i>Exophiala. jeanselmei</i>
<i>E. mesophila</i>	<i>Exophiala. mesophila</i>
FL1	Fluoreszenz 1, 530 nm (grün)
FL1-H	Relatives Maß der Fluoreszenz-Intensität (H = hight)
FL2	Fluoreszenz 2, 578 nm (rot-orange)
FSC	Forward-Scatter-Light (Vorwärtsstreulicht)
FSC-H	Relatives Maß der (Zell-)Größe (H = hight)
G-CSF	Koloniestimulierender Faktor für Granulozyten
GHP	Gerhard Haase Pilzsammlung, Institut für Medizinische Mikrobiologie
GM-CSF	Koloniestimulierender Faktor für Granulozyten und Monozyten

gp159/90	Glykoprotein gp150/90, Komplementrezeptor 4 (CR4, CD18/11c)
<i>H. capsulatum</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
<i>H. werneckii</i>	<i>Hortaea werneckii</i>
KD	Kilo-Dalton (atomare Masseinheit)
LAD	Leukozytenadhärenz-Proteinddefekt
LFA-1	Lymphozyten-Funktion-assoziiertes Antigen 1 (CD18/11a)
LL	Lower left (unterer linker Quadrant)
LR	Lower right (unterer rechter Quadrant)
Mac-1	Makrophagen-Antigen-Komplex 1 (CR3, CD18/11b)
mAk	Monoklonale Antikörper
mel-	Melanin negative Mutante (<i>E. dermatitidis</i>)
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte (gemessen bei 600 nm)
<i>P. elegans</i>	<i>Phaeoannellomyces elegans</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
R	(Proben-)Röhrchen
PNG	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAS	Statistical Analysis System
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCA	Sabouraud-Chloramphenicol-Agar
SSC	Side-Scatter-Light (Seitwärtsstreulicht)
SSC-H	Relatives Maß der Intensität der (Zell-)Granularität (H = hight)
STAW	Standardabweichung
UL	Upper left (oberer linker Quadrant)
UR	Upper right (oberer rechter Quadrant)
upm	Umdrehungen pro Minute
YNB	Yeast Nitrogen Base

7.3 Bisherige Veröffentlichungen partieller Studienergebnisse

1. Schnitzler, N.; **Platz, A.**; Peltroche-Llacsahuanga, H.; Holland, R.; Lütticken, R. & Haase, G. (1998). Mac-1 (CD 11b/CD18) ist der granulozytäre Rezeptor für opsonierte Schwärzepilze. 50. Tagung der „Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie“ (DGHM) und 25. Jahrestagung der „Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V.“ (DGI), Berlin, 04.-09. Oktober 1998
2. Haase, G.; Peltroche-Llacsahuanga, H.; **Platz, A.**; Jentsch, S. & Schnitzler, N. (1999) Phagocytosis of black yeasts by human neutrophils. In Proceedings of the human research conference of human fungal pathogens (fungal dimorphism and disease), page 41, European Research Foundation, Granada (Spain), 04.-08. September 1999
3. Peltroche-Llacsahuanga, H.; Schnitzler, N.; Jentsch, S.; **Platz, A.**; de Hoog, G.S.; Schweitzer, K.G. & Haase, G. (2003). Analyzes of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: A tool for estimating their pathogenicity? Medical Mycology **41**, 7-14

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Lütticken, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen, für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes zur Durchführung dieser Arbeit.

Bei den beiden Betreuern, Herrn Priv.-Doz. Dipl.-Biol. Dr. med. G. Haase und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. N. Schnitzler, möchte ich mich für die intensive Betreuung während der experimentellen Untersuchungen sowie ihr geduldiges Verständnis bei der Abfassung dieser Arbeit bedanken. Ihre Beratung und die nutzbringenden Diskussionen bei allen praktischen und theoretischen Problemen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Institute für Medizinische Mikrobiologie und Medizinische Immunologie, besonders aber bei Regina Holland und Beate Melzer-Krick bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich als Blutspenderinnen unterstützt haben.

Stefanie Haaf von Below, die mir im gesamten Studium als Kommilitonin eine wertvolle Begleiterin war, danke ich für ihren fachlichen Rat bei der statistischen Auswertung.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Frau Maria und den beiden während des Studiums geborenen Töchtern Johanna und Damaris, die durch ihr Verständnis und ihre Liebe maßgeblich zur Vollendung der Arbeit beigetragen haben. Kurz nach der Geburt unseres Sohnes Cornelius konnte die vorliegende Arbeit zum Abschluß gebracht werden.

7.5 Lebenslauf

Geboren:	3. Januar 1967, Gelsenkirchen
Familienstand:	Verheiratet, drei Kinder
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Juni 1986:	Abitur, Ritzefeld-Gymnasium Stolberg
Juli 1986 - Februar 1988:	Zivildienst, Sozialwerk Nazareth e.V., Norden- Norddeich
April - Juli 1988:	Hausmeister-/Gärtnertätigkeit verbunden mit Vertiefung der englischen Sprachkenntnisse in einem Gästehaus, Oxford (England)
April 1989 - März 1992:	Krankenpflegeschule, Universitätsklinikum RWTH Aachen
Mai - Oktober 1992:	Krankenpfleger, Seniorenwohn- & Sozialzentrum, Stolberg
Oktober 1992 - September 1994:	Vorklinisches Studium, RWTH Aachen
Oktober 1994 - März 1999:	Klinisches Studium, RWTH Aachen
April 1999 - März 2000:	Praktisches Jahr, Marienhospital Aachen Tertiale: Anästhesie, Chirurgie, Innere Medizin
Mai 2000:	3. Staatsexamen
Juli 2000 - April 2001:	Arzt im Praktikum, Anästhesie, Marienhospital Aachen
Mai - Dezember 2001:	Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik, Marienhospital Aachen
Seit Januar 2002:	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Marienhospital Aachen