

**Die Rolle von NK-Zellen in der Immunantwort
gegen *Candida albicans***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Jessica Voigt
geboren am 23.05.1984 in Meerane

2013

Gutachter:

1. Prof. Dr. Oliver Kurzai, Zentrum für Innovationskompetenz Septomics, Jena
2. Prof. Dr. Peter F. Zipfel, Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut, Jena
3. Prof. Dr. Thomas Lehrnbecher, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

Tag der öffentlichen Disputation: 18.11.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Summary.....	1
1 Einleitung	5
1.1 Humanpathogene Pilze.....	5
1.2 Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	6
1.3 Immunantwort gegen <i>C. albicans</i>	7
1.4 Die Erkennung von <i>C. albicans</i> durch das angeborene Immunsystem.....	8
1.5 Neutrophile Granulozyten	9
1.6 Natürliche Killerzellen	11
1.7 Die Rolle von NK-Zellen in systemischen Pilzinfektionen	15
1.8 NK-Zellen und <i>C. albicans</i>	16
1.9 Hypothesen und Ziele dieser Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Zellkultur.....	18
2.1.1 Isolierung von humanen NK-Zellen.....	18
2.1.1.1 Kultivierung von humanen NK-Zellen	18
2.1.2 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten.....	19
2.2 Anzucht von <i>C. albicans</i>	19
2.3 Konfrontationsexperimente.....	20
2.3.1 Konfrontation von NK-Zellen und <i>C. albicans</i>	21
2.3.1.1 Blockierungsexperimente.....	21
2.3.1.1.1 FasL/TRAIL.....	21
2.3.1.1.2 Blockierung der Aktin- und Mikrotubuli-Polymerisation	21

2.3.1.2	Toxizitätskomponenten	22
2.3.2	Konfrontation im Transwell	22
2.3.3	Konfrontation von NK-Zellen und Neutrophilen und <i>C. albicans</i>	22
2.4	Durchflusszytometrie	23
2.5	XTT-Assay	24
2.6	ELISA-/ Bioplex-Messung.....	25
2.7	Mikroskopie.....	25
2.7.1	Vermessung der Filamente	25
2.7.2	Videoaufnahmen	26
2.7.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	26
2.8	Microarray-basierte Analyse von NK-Zellen.....	27
2.8.1	RNA-Isolation	27
2.8.2	RNA-Amplifikation, cRNA-Transkription und Array.....	28
2.8.3	Bioinformatik	28
2.9	<i>In vivo</i> Experimente.....	28
2.9.1	Murines NK1.1-Depletionsmodell.....	28
2.9.1.1	NK.1.1-Depletion	30
2.9.1.2	Infektion	30
2.9.1.3	Klinisches Monitoring.....	30
2.9.1.4	Probenaufbereitung	31
2.9.2	SCID- und NSG-Mausmodell	32
2.9.2.1	Probenaufbereitung	32

2.10	Software.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Generierung humaner NK-Zellen in Kurzzeitkultur	34
3.2	Humane NK-Zellen zeigen Phagozytose in der Interaktion mit <i>C. albicans</i> ...	36
3.3	<i>C. albicans</i> aktiviert NK-Zellen	39
3.4	Die Aktivierung von NK-Zellen durch <i>C. albicans</i> ist abhängig von direktem Kontakt.....	44
3.5	Perforin vermittelt eine Wachstumsinhibierung bei <i>C. albicans</i>	47
3.6	Eine effiziente Aktivierung von humanen NK-Zellen wird hauptsächlich durch Filamente von <i>C. albicans</i> vermittelt, nicht durch die Hefeform.....	52
3.7	Die transkriptionelle Dynamik der Aktivierung von NK-Zellen nach Kontakt mit verschiedenen Morphotypen von <i>C. albicans</i>	54
3.8	Signalweg-basierte Untersuchungen des NK-Zell-Transkriptoms nach Pilzkontakt unterstreichen die Wichtigkeit von Zytokinen.....	56
3.9	Die Dynamik selektierter NK-Zell-Gene in der Gruppe Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion	58
3.10	Das wechselseitige Zusammenspiel von humanen Neutrophilen und humanen NK-Zellen in der Immunabwehr von <i>C. albicans</i>	59
3.11	NK-Zellen beeinflussen den Krankheitsverlauf einer invasiven Candidose in Mäusen	65
4	Diskussion.....	70
4.1	Die Interaktion von Zytokin-aktivierten NK-Zellen und <i>C. albicans</i> führt zur Phagozytose des Pilzes	70
4.2	Das Aktivierungsmuster von NK-Zellen nach Konfrontation mit <i>C. albicans</i>	72
4.3	<i>C. albicans</i> Filamente sind essentiell für eine effiziente Aktivierung von NK-Zellen.....	73
4.4	Perforin führt zur Inhibierung der metabolischen Aktivität von <i>C. albicans</i> ...	74

4.5	Zytokine spielen eine dominierende Rolle in der Interaktion von NK-Zellen mit <i>C. albicans</i>	75
4.6	NK-Zellen in der Allianz mit neutrophilen Granulozyten	76
4.7	NK-Zellen verstärken die pro-inflammatorische Zytokinantwort <i>in vivo</i> und verkürzen das Überleben von <i>C. albicans</i> infizierten Mäusen.....	79
5	Literaturverzeichnis	82
6	Abkürzungsverzeichnis	96
7	Anhang	i
7.1	Danksagung	i
7.2	Eigenständigkeitserklärung	ii
7.3	Lebenslauf	iii

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen eine wichtige Population zytotoxischer Immunzellen dar. Sie kombinieren eine gut charakterisierte anti-tumorale Reaktivität mit antimikrobiellen Eigenschaften und sind damit als potenzielles immuntherapeutisches Werkzeug in den Fokus des Interesses gerückt. Obwohl Evidenzen für einen Einfluss von NK-Zellen in der Immunabwehr gegen die humanpathogenen Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Cryptococcus neoformans* vorliegen, ist ihre Funktionen in der Abwehr von Pilzinfektionen weitgehend unerforscht. Der polymorphe Hefepilz *C. albicans* ist der häufigste Erreger systemischer Pilzinfektionen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von NK-Zellen mit *C. albicans* und die Bedeutung von NK-Zellen in der systemischen Infektion durch *C. albicans* analysiert.

Mittels Live-cell imaging konnte erstmals eine Phagozytose durch NK-Zellen beschrieben werden. Diese aktinabhängige Aufnahme von *C. albicans* resultierte in einer Aktivierung der NK-Zelle, mit einer verstärkten Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Degranulierungsmarkers CD107a. Parallel zeigte sich eine verminderte Expression verschiedener Immunerkennungsrezeptoren. Nach Kontakt mit *C. albicans* sezernierten humane NK-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und GM-CSF sowie MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Neben diesen Mediatoren wurden auch lytische Substanzen wie Perforin und Granzym B detektiert. Der direkte Kontakt von NK-Zellen und Pilz führte darüber hinaus zu einer Inhibierung der metabolischen Aktivität von *C. albicans*, die durch Perforin vermittelt wurde.

Im nächsten Schritt der Arbeit wurde die Interaktion von NK-Zellen mit neutrophilen Granulozyten analysiert. Diese Zellen sind bei *Candida*-Infektionen von essentieller Bedeutung und spielen eine zentrale Rolle im Immunnetzwerk. Es konnte gezeigt werden, dass die zuvor beobachtete Aktivierung von NK-Zellen durch Neutrophile inhibiert wurde. Infolge einer verringerten Aufnahme des Pilzes durch NK-Zellen wurde keine Degranulierung induziert. Weiterhin konnte ein spezifischer inhibitorischer Effekt auf die TNF- α Sekretion beobachtet werden, während die Freisetzung anderer Zytokine in der Präsenz von Neutrophilen nicht beeinflusst wurde. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wurde in der Gegenwart von NK-Zellen verstärkt. Neben einer erhöhten Phagozytose zeigte sich eine Hochregulierung des Aktivierungsmarkers CD66b.

Die Bedeutung von NK-Zellen in invasiven *C. albicans* Infektionen wurde anschließend *in vivo* in murinen Infektionsmodellen untersucht. Dazu wurden NK-Zellen in einem Mausmodell durch den Einsatz des NK1.1-Depletionsantikörpers depletiert und NK-Zell depletierte Tiere parallel zu einer immunkompetenten Gruppe mit einer lethalen Pilzdosis infiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die NK-Zell-depletierten Mäuse ein verzögertes Krankheitsbild und ein signifikant verlängertes Überleben aufwiesen. Im Blut der immunkompetenten Mäuse wurden weiterhin signifikant erhöhte Mengen der Zytokine IL-17a, GM-CSF sowie der Chemokine RANTES und MIP-1 gemessen, was einen relevanten Beitrag der NK-Zellen zur hyper-inflammatorischen Immunantwort zeigt. Im immunsupprimierten Mausmodell (T-Zell defiziente Mäuse) führte dagegen die Depletion von NK-Zellen zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf, so dass diesen Zellen hier eine protektive Funktion nach *C. albicans* Infektion zukam.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung der angeborenen Immunantwort bei systemischen *C. albicans* Infektionen. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in Gegenwart von *C. albicans* aktiviert werden und pro-inflammatorische Zytokine freisetzen, die in der Lage sind, andere Immunzellen zu rekrutieren und aktivieren. Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion der NK-Zellen mit neutrophilen Granulozyten. Diese modulieren die pro-inflammatorische Antwort der NK-Zellen und zeigen in Gegenwart der NK-Zellen eine erhöhte Aktivierung. Die Beteiligung von NK-Zellen an Immunreaktionen *in vivo* konnte in murinen Infektionsmodellen bestätigt werden.

Summary

Natural killer (NK) cells represent an important population of cytotoxic innate immune cells, which combine a well known anti-tumor activity with anti-microbial properties and are therefore of interest as a potential immunotherapeutic tool. Although there are hints towards the impact of NK cells in the immune response against the human pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus neoformans*, their function in the defence against fungal infections is largely unknown. The polymorphic yeast *Candida albicans* is the most frequently isolated invasive fungal pathogen. Here, the interaction of human NK cells with *C. albicans* and their role of in systemic *Candida*-infections are analyzed.

With live-cell imaging, for the first time, NK cells were observed as having phagocytic activity. The actin dependend engulfment of *C. albicans* resulted in an activation of the NK cell, accompanied by an increased surface exposure of the activation marker CD69 and of the degranulation marker CD107a. In parallel, a decrease in important immune detection receptors was observed. Following contact with *C. albicans*, human NK cells increased secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IFN- γ and GM-CSF, and chemokines like MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES after *Candida* contact. In addition, perforin and granzyme B were detected. Internalization of the fungus led to inhibition of the metabolic activity of *C. albicans*, which was shown to be mediated by perforin.

As neutrophils are known as principal effector cells in *C. albicans* infections, the role of NK cells in alliance with neutrophils was analyzed. In the presence of neutrophils, the previously observed activation of NK cells was completely abolished. Due to the lack of uptake of the fungus by NK cells, the degranulation of the cells was strongly reduced. Furthermore, a specific inhibitory effect on the secretion of TNF- α was observed, while the release of other cytokines was not affected in the presence of neutrophils. The presence of NK cells enhanced the activation of neutrophils, indicated by CD66b up-regulation and increased up-take of the fungus.

To further explore the role of NK cells in invasive *C. albicans* infections, a NK cell depleted murine infection model using anti-NK1.1 depletion antibody was employed. Following infection with a lethal fungal dose, the NK depleted group was compared to an immune competent control group. The NK depleted model showed a prolonged survival and accordingly, delayed symptoms. In the blood of the immune competent mice, significantly enhanced concentration of the cytokines IL-17a, GM-CSF as well as the chemokines

RANTES and MIP-1 were detected, indicating a relevant impact of NK cells on the hyper-inflammatory immune response. In an immunosuppressed mouse model (T cell deficient mice) the depletion of NK cells resulted in an accelerated course of disease, indicating a protective role of NK cells in this setting.

This study contributes to the knowledge of the innate immune response in systemic *C. albicans* infections. It was shown, that NK cells are activated and release pro-inflammatory cytokines in response to *C. albicans*. The NK cell-neutrophil interaction is especially meaningful, as neutrophils modulate the pro-inflammatory response of NK cells and show an increased activity in the presence of NK cells. The participation of NK cells in the immune response *in vivo* was confirmed in murine infection models.

1 Einleitung

1.1 Humanpathogene Pilze

Pilze sind eukaryontische Organismen und bilden neben Pflanzen und Tieren ein eigenständiges Reich [1]. Die fehlende Befähigung zur Photosynthese sowie die Fähigkeit einiger Arten zur Bildung von Chitin grenzen Pilze von Pflanzenzellen ab. Von tierischen Zellen unterscheiden sich Pilze unter anderem durch die Ausbildung einer Zellwand. Nur ein Bruchteil der wahrscheinlich über 1 Million Arten von Pilzen sind als Krankheitserreger beim Menschen in Erscheinung getreten [2]. Humanpathogene Pilze finden sich in den Phyla Ascomycota (z.B. *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Pneumocystis jirovecii*), Basidiomycota (z.B. *Cryptococcus spp.*) und Glomeromycota (in den Subphyla Mucoromycotina und Entomophtoromycotina). *Candida spp.* gehören zu den wichtigsten opportunistischen humanpathogenen Pilzen. *C. albicans* zählt dabei zu den am häufigsten isolierten Mikroorganismen auf Intensivstationen, wobei hier dem Pilz oftmals nur die Rolle eines Begleitpathogens („innocent bystander“) oder Kolonisationskeims zukommt. In über 75% der Bevölkerung gehört *C. albicans* zur normalen Flora und besiedelt hier als Kommensale die Haut und den Verdauungstrakt [3]. Das Spektrum von Krankheiten, die *C. albicans* auslösen kann, reicht von oberflächlichen Mykosen bis hin zu systemischen Candidosen. Zu den mukokutanen Candidosen gehören die Kolonisierung des Oropharynx und der Vagina. Eine vulvovaginale Candidose wird durch den Einsatz von Antibiotika und Veränderungen des Hormonspiegels begünstigt [4]. In oberflächlichen *C. albicans*-Infektionen dringt der Erreger nicht bis in den Blutstrom ein, sondern infiziert die Haut, Hautanhangsgebilde und Schleimhäute. Bei einer invasiven Candidose ist der kolonisierende Erreger in der Lage, zum Beispiel vom Gastrointestinaltrakt in den Blutstrom zu disseminieren und von dort in die Organe einzuwandern. *C. albicans* gehört zu den häufigsten isolierten Erregern von hämatogen disseminierenden Infektionen [5]. Systemische *C. albicans*-Infektionen gehen mit einer hohen Mortalitätsrate einher. Pfaller und Diekema beschreiben 0.3 Tote auf 100.000 Menschen im Jahr 2003 [6]. Das entspricht einer Zahl von 1.5 Millionen Toten pro Jahr weltweit [7].

1.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Als Kommensale besitzt *C. albicans* die Fähigkeit, in spezifischen Nischen und anatomischen Bereichen des menschlichen Körpers zu überleben. Sowohl im Rahmen der kommensalen Besiedlung, als auch bei invasiven Infektionen ist die Fähigkeit von *C. albicans* zur Adhärenz an Wirtszellen von entscheidender Bedeutung. Die Fähigkeit des Pilzes zur Adhäsion an humane Zellen wird maßgeblich durch Oberflächenproteine vermittelt. Zur Familie der Als- (agglutinin-like sequence) Oberflächenproteine gehören 8 Vertreter, von denen besonders Als3 eine wichtige Rolle in der Interaktion von *C. albicans* mit humanen Epithelzellen spielt [8, 9]. Als3 vermittelt die Bindung an E-Cadherin auf Epithelzellen bzw. N-Cadherin auf Endothelzellen und induziert damit die Aufnahme des Pilzes und dessen Invasion [10]. Als3 befähigt *C. albicans* weiterhin zur Aufnahme von Ferritin- gebundenem Eisen [11]. Mechanismen wie dieser sichern das Überleben des Pathogens im Blut und tragen entscheidend zur Virulenz des Pilzes bei. Eine Als3-Mutante zeigt eine stark reduzierte Fähigkeit, in Epithelzellen einzuwandern und ist nicht mehr in der Lage, diese zu zerstören [11]. Daneben sorgt vor allem das Hyphen-assoziierte GPI- (Glycophosphatidylinositol) verknüpfte Protein HWP-1 für eine kovalente Bindung von *C. albicans* mit den Wirtszellen [12]. Dieses Protein vermittelt eine Verankerung des Pilzes mit Transglutaminasen der Wirtszellen und führt damit zu einer stabilen Verbindung [12, 13]. Zur Etablierung einer systemischen Infektion ist nach Adhäsion der Hefeform an intestinale oder orale Epithelzellen die Invasion des Pilzes in Wirtsgewebe entscheidend. Für die Invasivität von *C. albicans* ist die Fähigkeit zur Ausbildung von filamentösen Wachstumsformen entscheidend [14-16]. Während die Hefeform von *C. albicans* auf mukosalen Oberflächen toleriert wird, stellt der Invasionsprozess durch Filamente eine Schlüsselrolle in der Disseminierung des pathogenen Pilzes dar [17, 18]. Die Deletion der wichtigen Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1, welche die Expression hyphenassoziierter Gene und damit die Ausbildung von Filamenten regulieren, führt zu einer apathogenen Mutante [15, 19]. Mäuse, die mit der entsprechenden Doppelmutante infiziert wurden, überlebten bis zu einer Infektionsdosis von 1×10^6 , während die Infektion mit dem Wildtyp Stamm SC5314 spätestens an Tag 8 bei einer Infektionsdosis von 1×10^4 Hefezellen zu Lethalität führte [15]. Deletion des Hyphenrepressors Tup1 führt zu einer konstitutiven Filamentierung in *C. albicans* [20]. Auch für diese Mutante konnte gezeigt werden, dass die Virulenz abgeschwächt ist. Damit trägt die Fähigkeit zum Wechsel zwischen der filamentösen Form und der Hefeform entscheidend zur Pathogenität von *C. albicans* und zur Fähigkeit der Invasion von Wirtszellen bei [21].

Im Verlauf einer invasiven Infektion können auch sezernierte Enzyme zur Virulenz von *C. albicans* beitragen. Zu den wichtigsten sezernierten Enzymen zählen Proteasen, Phospholipasen und Lipasen. Diese Hydrolasen scheinen die Penetration von Wirtszellen, aber auch die extrazelluläre Nahrungsaufnahme des Pilzes zu unterstützen [22, 23]. Die am besten untersuchte Familie ist die der sekretierten Aspartylproteasen (Sap's), wobei Sap1-8 vom Pathogen freigesetzt werden, während Sap9 und 10 an der Pilzoberfläche gebunden bleiben [22, 24]. Neben Schutz vor dem Komplementsystem scheinen diese Proteasen auch die Zerstörung von Wirtsgewebe zu forcieren [25, 26]. *In vitro* Untersuchungen unter dem Einfluss der Aspartatprotease Pepstatin A führten zu geringeren Läsionen des humanen Epithels in einem oralen *C. albicans* Infektionsmodell und konnten damit die Relevanz der Sekretion von Sap's bestätigen [26].

Rekombinante Sap's, wie Sap1, 2, 3 und 6 haben weiterhin die Fähigkeit die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α in Monozyten zu induzieren [27]. Dieser Effekt wird über die Aktivierung des Akt- und NF κ B-Signalweges in den Immunzellen vermittelt [27]. Eine veränderte Zytokin-Antwort nach Konfrontation mit Sap-defizienten Mutanten von *C. albicans* konnte auch auf humanen vaginalen Epithelzellen beobachtet werden. Während die Wildtypform des Pilzes zur Freisetzung von hohen Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-8, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α führt, ist die Zytokinantwort auf Sap1- und Sap2-defiziente Pilzstämme deutlich reduziert [28].

1.3 Immunantwort gegen *C. albicans*

Einen wichtigen klinischen Anhaltspunkt für die Diagnose invasiver Pilzinfektionen können prädisponierende Faktoren bei den Patienten geben. Für die meisten Pilzpathogene konnten klar definierte Risikofaktoren beschrieben werden. Invasive *Aspergillus*-Infektionen sind zum Beispiel häufig mit einem Granulozytendefekt assoziiert [29-31]. Neben Neutropenie wurden weitere prädisponierende Faktoren wie Diabetes mellitus, die Verabreichung von Steroiden über einen längeren Zeitraum oder aber fortschreitende Lebererkrankungen definiert [32]. Schwere T-Zell-Defekte, die beispielsweise in der späten Phase einer HIV-Infektion auftreten, stellen den wichtigsten Risikofaktor für Infektionen durch *C. neoformans* und *P. jirovecii* dar [33]. Für invasive Candidose wurden solche prädisponierenden Störungen des Immunsystems bisher nicht eindeutig definiert.

Die Abwesenheit klar definierter Risikofaktoren für systemische *C. albicans*-Infektionen spricht für ein komplexes Zusammenspiel und teilweise redundante Mechanismen verschiedener Effektoren des Immunsystems.

Für die Erkennung von *C. albicans* kommen sowohl Komponenten der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr in Frage. In oberflächlichen Mykosen konnten schweren T-Zelldefekten prädisponierende Eigenschaften zugeschrieben werden [34]. Damit begünstigen immunsuppressive Umstände, wie eine HIV-Infektion, eine krankhafte Besiedlung mukoser Oberflächen durch *C. albicans* [35]. Andere Faktoren, die zum Beispiel den Zugang des Pilzes zum Blutstrom erleichtern, wie Operationen, Katheter oder Verletzungen der Darmmukosa, begünstigen die Etablierung einer systemischen Candidose [36, 37]. Ein hohes Risiko tragen demnach hauptsächlich Patienten nach medizinischen und operativen Eingriffen [38]. Nach Invasion des Pilzes durch die Ausbildung von Filamenten geht die Zerstörung des epithelialen Gewebes mit einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems einher [17, 18]. Neutrophile Granulozyten wurden in vielen Studien als Hauptmediatoren der Immunabwehr gegen *C. albicans* identifiziert, wobei die Mehrheit der Patienten mit einer invasiven Candidose nicht an mangelnden Neutrophilen-Zellzahlen leidet [38-42].

1.4 Die Erkennung von *C. albicans* durch das angeborene Immunsystem

Die Detektion von *C. albicans* durch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten erfolgt über Mustererkennungsrezeptoren, insbesondere aus den Familien der Toll-like-Rezeptoren (TLR), Mannose-Rezeptoren und C-Typ-Lektin-Rezeptoren [43, 44]. Die Erkennung von Glucanen gehört zu den Schlüsselmechanismen in der Aktivierung des Immunsystems durch *C. albicans* [45]. Diese Polysaccharide sind eine zentrale Komponente der Zellwand und lassen sich in α - und β -Glucane unterteilen. Während Glucane mit α -glycosidischer Bindung, wie Dextran, Glycogen und Stärke, medizinisch weniger relevant sind, spielen Glucane mit β -glycosidischer Bindung, wie Chitin und Zymosan, eine wichtige Rolle in der Erkennung von Pathogenen und Immunaktivierung [46, 47]. Die intraperitoneale Injektion von Zymosan in Mäusen führt zu einer starken Immunaktivierung, resultierend in einer Organdysfunktion sowie Organzerstörung [46]. Sowohl der TLR-2 als auch der C-Typ-Lektin-Rezeptor Dectin-1 detektieren Glucane und werden hauptsächlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert [43, 48, 49]. Die

Erkennung des Pilzes durch Dectin-1 ist Morphologie-abhängig, wobei ausschließlich die Hefeform zur effizienten Aktivierung von Makrophagen in der Lage ist [50]. Weiterhin vermittelt die Erkennung durch diesen Rezeptor Phagozytose und die Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate *in vitro*, sowie die Sekretion von Zytokinen, wie TNF und IL-6 [51, 52]. *In vivo* Daten beschreiben eine kontroverse Funktion von Dectin-1. Zum einen wurde eine höhere Anfälligkeit von Dectin-1-Knockout Mäusen für *Candida*-Infektionen beobachtet [52]. Dieser Effekt war weiterhin mit reduzierter Zytokinproduktion und geringerer Phagozytoserate durch Neutrophile assoziiert [52]. Auf der anderen Seite konnte ein vergleichbares Knockout-Modell die Unabhängigkeit der Erkennung von *C. albicans* von diesem Rezeptor zeigen [53]. Dieser Effekt konnte mittlerweile auf Stamm-spezifische Unterschiede in der *in vivo*-Adaption zurückgeführt werden, die mit Unterschieden in der Zellwandzusammensetzung einhergeht [54].

Neben Dectin-1 spielt auch TLR-2 eine wichtige Rolle in der Detektion des Pilzes. Studien zufolge kann dem TLR-2 eine protektive Rolle in murinen *Candida*-Infektionsexperimenten zugesprochen werden, wobei TLR-2-Knockout-Mäuse eine entsprechend geringere Pilzlast und eine verringerte Mortalität zeigen und eine Immunantwort verhindert wird [55, 56]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Makrophagen dieser TLR-Knockout-Mäuse eine verstärkte Phagozytose-Aktivität gegenüber *C. albicans* aufweisen [57].

Die Erkennung der pathogenen Hefe durch Toll-like-Rezeptoren oder aber Dectin-1 führt im folgenden zur Freisetzung spezifischer Zytokine, wie TNF- α , IFN- γ und IL-12. Diese Mediatoren forcieren eine protektive Th (T-Helfer) 1-Immunantwort [58].

1.5 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten entsprechen mit 50-70% der größten Population Phagozyten der angeborenen Immunabwehr [59]. Diese polymorphkernigen Blutzellen entstehen im Knochenmark, wo sie unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu Myeloblasten und schließlich zu Granulozyten heranreifen [59]. Dieser Reifungsprozess beinhaltet die Synthetisierung von Effektorproteinen, wie das Enzym Myeloperoxidase, die Protease Lactoferrin und Enzymen wie Gelatinasen, die in verschiedenen Granula gespeichert werden [60]. Trotz ihrer kurzen Lebensspanne von 6-8 h verfügen diese schnellen Immunzellen über ein effizientes Repertoire an Effektormolekülen und spielen aus diesem

Grund eine wichtige Rolle in der Beseitigung von pathogenen Mikroorganismen [61]. Neben der Freisetzung der Granula besitzen Neutrophile unter anderem die Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate sowie zur Ausbildung von NET (neutrophil extracellular traps), um damit Pathogene zu eliminieren [62, 63]. Diese dekondensierten DNA-Stränge sind reich an intrazellulären Proteinen und werden nach Aktivierung durch Degradation der Immunzellen freigesetzt [64]. Neutrophile können durch verschiedenste Stimuli, wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und andere Pathogen-assoziierte Strukturen, klassische Zytokine wie TNF- α , aber auch Komplementfaktoren oder Pathogen-gebundene Antikörper, aktiviert werden [65-67]. Entsprechend verfügen diese Immunzellen über ein breites Angebot an Mustererkennungsrezeptoren, wie Komplementrezeptoren, Fc-Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren und können damit Pathogen-assoziierte Strukturen, wie Zymosan, Glucan, Flagellin oder CpG-DNA erkennen [68-70]. Studien mit humanem Vollblut belegen, dass neutrophile Granulozyten in der Immunantwort gegen *C. albicans* eine übergeordnete Rolle spielen, da ausschließlich in Gegenwart von Neutrophilen ein Wachstumsarrest des Pilzes beobachtet werden konnte, während *C. albicans* in der Gegenwart anderer Blutzellen in der Lage war, Filamente auszubilden [71]. Dabei wurde ausschließlich durch neutrophile Granulozyten eine Stressantwort bei *C. albicans* induziert [71]. Weiterhin sind diese Immunzellen in der Lage den humanpathogenen Pilz zu phagozytieren und zu eliminieren [72, 73]. Die Erkennung des Pilzes wird vermutlich durch das Zellwandprotein β -Glucan vermittelt, wobei dieser Prozess hauptsächlich durch den Komplementrezeptor 3 oder Dectin-1 auf Neutrophilen vermittelt wird [48, 74]. Die Depletion von neutrophilen Granulozyten in Mäusen führt weiterhin zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber systemischer und vaginaler *C. albicans*-Infektionen [75]. Die Grundlage für eine effiziente Immunantwort *in vivo* besteht in der Kommunikation von Immunzellen. Als schnelle Zellen der frühen Immunabwehr partizipieren Neutrophile in der Induktion einer inflammatorischen Antwort durch Aktivierung und Rekrutierung anderer Immunzellen, z. B. durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 β , IL-8 und TNF [76, 77]. Neben der Kommunikation mit anderen Immunzellen beschreiben aktuelle Arbeiten eine Interaktion von Neutrophilen mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Infektion von Mäusen mit *Legionella pneumophila* zum Beispiel führt zu einer Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen, wobei dieser Effekt maßgeblich von der Produktion von IL-18 durch neutrophile Granulozyten abhängt [78]. Dabei kommt es zu einer Kolo-kalisation von NK-Zellen und Neutrophilen sowie dendritischen Zellen in den entzündlichen Bereichen [78]. Aktuelle Studien belegen weiterhin eine Kontakt-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen durch neutrophile Granulozyten [79].

Hierbei vermittelt die Interaktion der Rezeptoren CD18 und ICAM-3 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-3) eine Hochregulation der IFN- γ Produktion in NK-Zellen [79].

1.6 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zu den zytotoxischen Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems. Mit einem Anteil von 5-10% der Lymphozyten stellen sie eine wichtige Population zirkulierender Leukozyten dar. Sie entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark und zeichnen sich durch die Oberflächenexpression von CD16, einem Fc γ -Rezeptor sowie CD56, einem Adhäsions-Molekül, aus [80]. NK-Zellen lassen sich in zwei Unterpopulationen einteilen, den sogenannten CD56^{bright} (starke Oberflächenexpression von CD56) und CD56^{dim} (schwache Oberflächenexpression von CD56) Zellen [81]. Nur 10% der im Blutstrom zirkulierenden NK-Zellen entsprechen der ersteren Population. Die restlichen 90% werden auch als Effektorzellen bezeichnet. Sie kennzeichnet neben der geringeren CD56-Präsentation eine hohe CD16-Expression sowie eine hohe Perforinproduktion [81].

Der Aktivierungsstatus von NK-Zellen wird durch die Kombination von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren bestimmt (Abb. 1). Diese Rezeptoren sind entsprechend mit einer intrazellulären Aktivierungs- (ITAM) oder Inhibierungsdomäne (ITIM) ausgestattet [82, 83]. Über diese Rezeptoren können körpereigene Strukturen, wie HLA-Moleküle gebunden werden, und damit über ein inhibierendes Signal eine Toleranz vermittelt werden [84]. Ein Fehlen körpereigener Strukturen und weitere Veränderungen der Oberflächenexpression körpereigener Zellen, zum Beispiel nach Virusbefall, kann dann zu einem Überwiegen von Aktivierungssignalen in NK-Zellen führen und damit die Effektormaschinerie von NK-Zellen in Gang setzen [85].

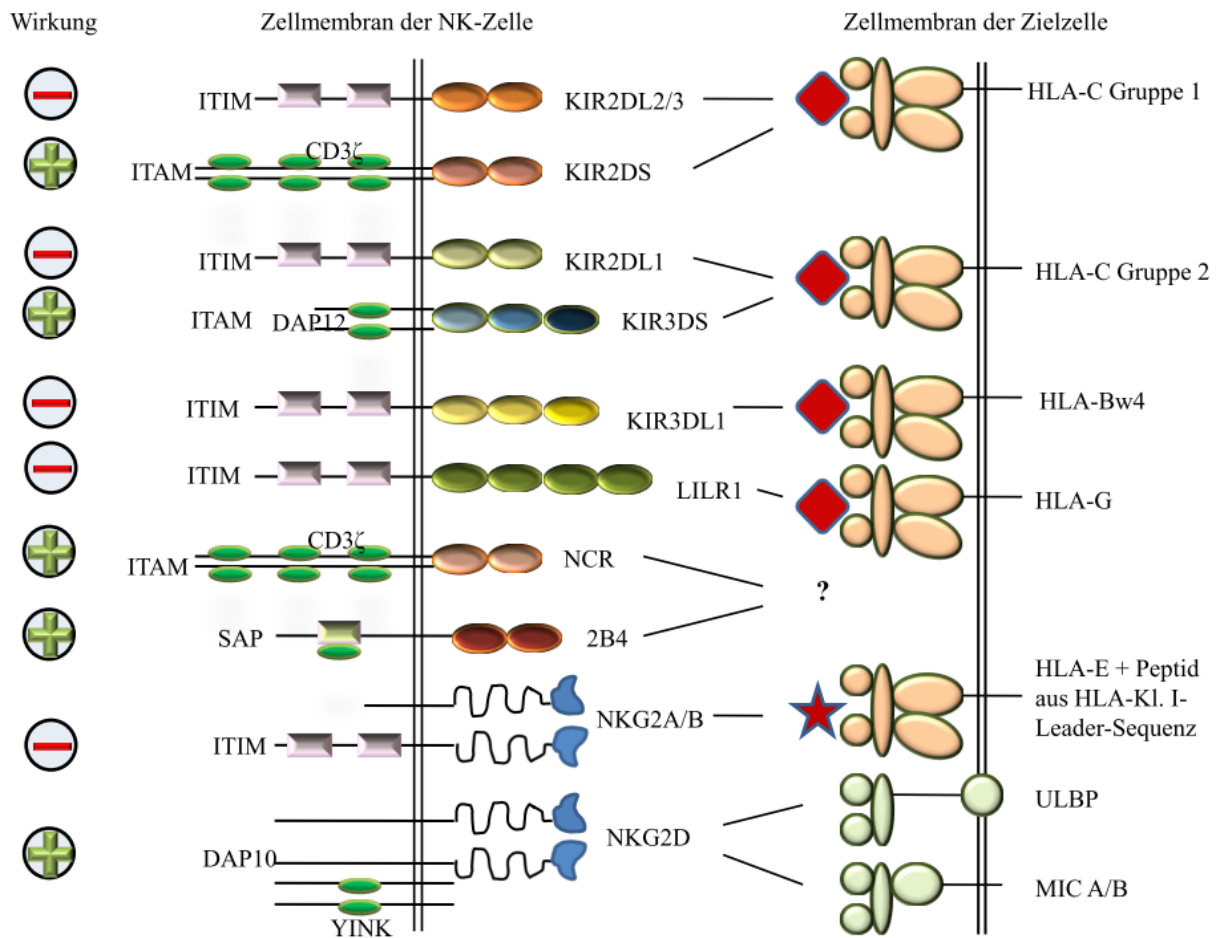


Abbildung 1: Antigenrezeptoren auf NK-Zellen und ihre Liganden.

NK-Zellen präsentieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren. Durch eine Bindung an ihren Liganden kann über „Immunorezeptor tyrosinbasierte Aktivierungs- (ITAM) oder Inhibierungsmotive (ITIM)“ die NK-Zelle stimuliert werden. Dabei kann die Zelle zum einen im Gleichgewicht gehalten werden oder beim Überwiegen von Ligation an ITAM-Rezeptoren die Zelle aktiviert werden. Sogenannte KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors) und C-Typ Lektin Rezeptoren detektieren HLA-Klasse I Moleküle auf Zielzellen und wirken inhibierend, während NCR (natural cytotoxicity receptors) wie NKp30 und NKp46, aber auch NKG2D und CD16-Rezeptoren die Immunzelle aktivieren. Modifiziert nach Moretta et. al [86].

Die Aktivierung von NK-Zellen führt über die zentrale Aktivierung der Kinase ERK zur Freisetzung zytolytischer Substanzen, wie Perforin, Granzym oder Granulysin aus den Granula sowie inflammatorischer Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine [87]. Zum einen kann die Freisetzung der zytotoxischen Granula durch Antikörperbindung an den Fc γ -Rezeptor CD16 vermittelt werden [88]. Zum anderen können Zielzellen NK-Zellen auch direkt über Rezeptorinteraktionen aktivieren und zu einer direkten natürlichen Zytotoxizität (vermittelt durch Perforin, Granzym oder Granulysin) und indirekten natürlichen Zytotoxizität (vermittelt durch Zytokine) führen [89]. Zum wichtigsten Effektormechanismus gehört die direkte Induktion der Apoptose in einer Zielzelle über die Freisetzung von Granzymen und Perforin oder über den Rezeptor-vermittelten FasL und TRAIL- Signalweg (Abb. 2) [89].

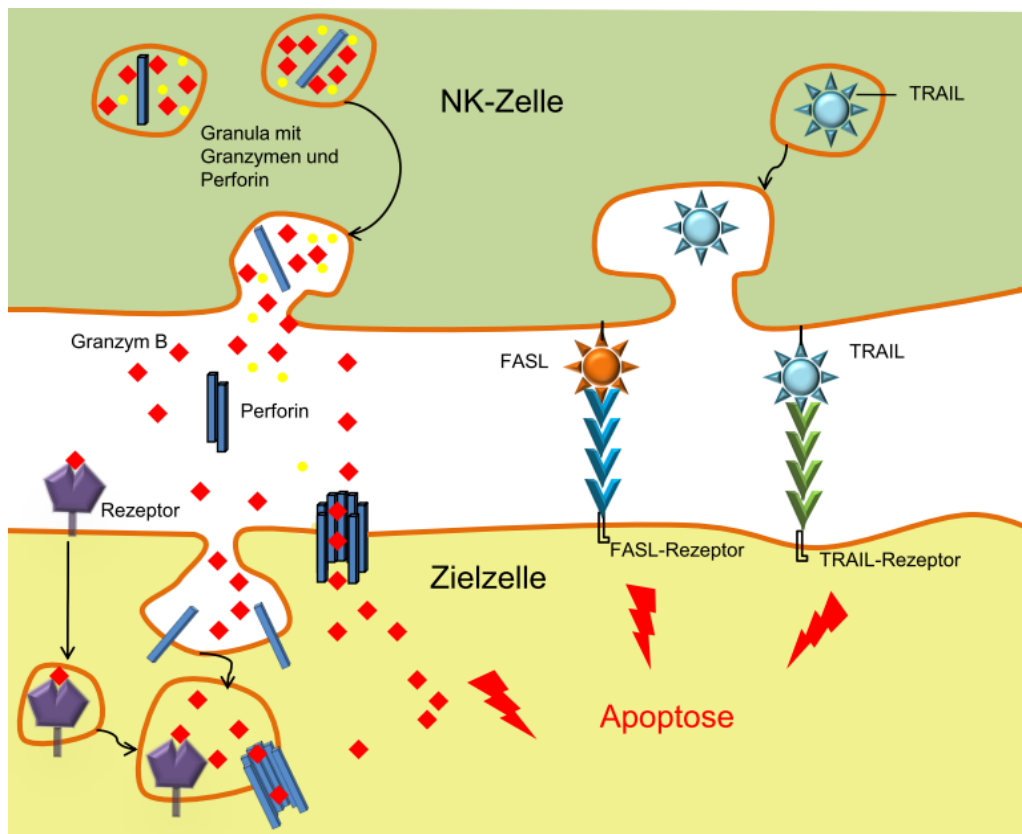


Abbildung 2: Direkte Effektormechanismen von NK-Zellen.

Über direkte Aktivierung des Todesrezeptorsignalweges über die Bindung von FASL und TRAIL an deren Rezeptoren auf der Zielzelle kommt es zur Freisetzung von Granzymen und Perforin aus den Granula von NK-Zellen. Diese sind wiederum in der Lage, durch Porenbildung Apoptose in der Zielzelle zu induzieren. Modifiziert nach Skript „Grundlagen der Immunologie“, Prof. Rieber, 2008.

Bekannt sind NK-Zellen vor allem für ihre antiviralen und antitumoralen Fähigkeiten [80]. Sie sind in der Lage maligne oder virusveränderte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Virus-infizierte Zielzellen geben Interferone in das umliegende Gewebe ab, wodurch die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen induziert wird [90]. Eine Reaktivität gegenüber tumorveränderten Zellen wurde zum ersten Mal im Jahr 1972 beschrieben [91]. Inzwischen beweisen Studien einen Zusammenhang zwischen geringen NK-Zellzahlen und einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen [92]. Tumorzellen verändern das Oberflächenrepertoire, zum Beispiel indem HLA-I Moleküle herunterreguliert oder aber NCR (natural cytotoxicity receptors) wie NKp30 heraufreguliert werden, die zu einem Überwiegen von Aktivierungssignalen für NK-Zellen führen [86, 93]. Daneben können maligne entartete Zellen durch tumor-spezifische Antikörper von NK-Zellen eliminiert werden [94]. Die Fähigkeit von NK-Zellen eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zu induzieren wird sich vor allem in der Tumorthherapie zu nutze gemacht und diese Immunzellen sind damit als therapeutisches Werkzeug besonders in den Fokus der Forschung gerückt [94, 95].

Als Hauptproduzenten des pro-inflammatorischen Zytokins $\text{INF-}\gamma$ in den frühen Phasen einer Infektion stellen NK-Zellen einen wichtigen Regulator der Immunantwort auch im Rahmen systemischer Entzündungen dar [81]. Die frühen Phasen einer Sepsis sind durch eine verstärkte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren charakterisiert, während es in der späten Phase zu einer Immunparalyse kommen kann [96]. NK-Zellen können in der frühen Phase einer Infektion durch die Freisetzung von Zytokinen, wie GM-CSF, $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$, andere Immunzellen, wie Neutrophile, Makrophagen und dendritische Zellen, aktivieren und rekrutieren [97]. Damit wird eine pro-inflammatorische Antwort forciert und amplifiziert, sodass NK-Zellen ein Überschießen der Immunreaktion begünstigen können [98]. Insbesondere die verstärkte Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{INF-}\gamma$ kann dabei zur Schädigung des Gewebes führen [99]. Obwohl NK-Zellen hauptsächlich während frühen und schnellen Immunreaktionen partizipieren, spielen sie auch eine Rolle in der Regulation adaptiver Immunantworten, indem sie B- und T- Zellantworten forcieren oder aber effiziente Immunantworten durch den Austausch mit dendritischen Zellen generieren [85, 100]. Durch die Sekretion von $\text{INF-}\gamma$ polarisieren NK-Zellen dendritische Zellen zur Ausbildung einer Th1-Immunantwort [101]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass durch die Depletion von NK-Zellen vor der Induktion eines septischen Schocks mit bakteriellem LPS die Mortalitätsrate in Mäusen reduziert werden kann [102]. Dabei wurden signifikant verringerte Konzentrationen der Zytokine $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ gemessen. Im Gegensatz dazu wurde eine verbesserte

Überlebensrate für Patienten mit erhöhten NK-Zellzahlen mit schwerer Sepsis, ausgelöst durch gram-negative Bakterien, beschrieben [103].

1.7 Die Rolle von NK-Zellen in systemischen Pilzinfektionen

Die oben erwähnten Funktionen von NK-Zellen in systemischen Entzündungen könnten auch in systemischen Pilzinfektionen eine wichtige Rolle spielen. Tatsächlich belegen Studien, neben der bereits etablierten Bedeutung von NK-Zellen in Virus- und Tumorerkrankungen, dass diese angeborenen Immunzellen auch Pilze erkennen und durch diese aktiviert werden können. Interaktionen von NK-Zellen mit dem human-pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* resultieren in einer Aktivierung von NK-Zellen und führen zur Freisetzung von Zytokinen [104-106]. Dieser Effekt konnte ausschließlich für Filamente von *A. fumigatus* beschrieben werden, wobei eine direkte Inhibierung des Pilzwachstums durch das Zytokin IFN- γ vermittelt wird [105]. Die Chemokin-vermittelte Rekrutierung von NK-Zellen zum Ort der Infektion wurde als wichtiger Schritt in der frühen Phase einer invasiven Aspergillose beschrieben [106]. Hier führte die Depletion von NK-Zellen *in vivo* zu einer gesteigerten Mortalität und Pilzlast [106]. Weiterhin führt die Anwesenheit von NK-Zellen in Neutrophilen-depletierten Mäusen zu einem verbesserten Überleben während einer systemischen *Aspergillus*-Infektion [106]. In anderen Studien konnte dem Haupteffektormolekül Perforin die größte Rolle in der Abwehr von *A. fumigatus* und *C. neoformans* zugeschrieben werden [104, 107]. NK-Zellen sind demnach in der Lage, durch *C. neoformans* aktiviert zu werden, was in einer Erhöhung des mRNA-Transkripts für Perforin resultiert [108]. Darüber hinaus sind die humanen Immunzellen in der Lage, direkte Konjugate mit den Pilzzellen auszubilden [109]. Sowohl murine als auch humane NK-Zellen vermitteln nach Konfrontation mit dem Pilz eine Perforin-abhängige Zytotoxizität gegen *C. neoformans* [107, 109-111]. Weiterhin wurde ein erhöhter Pilzbefall, vor allem in den Lungen, in NK-Zell depletierten Mäusen nach intravenöser Infektion mit *C. neoformans* beschrieben [112].

1.8 NK-Zellen und *C. albicans*

Zur Rolle von NK-Zellen in systemischen *C. albicans*-Infektionen existieren nur wenige und zudem oft widersprüchliche Daten. In einigen Studien wurde eine direkte Interaktion von NK-Zellen und *C. albicans* beschrieben. Diese Interaktion resultierte jedoch nicht oder nur kaum in einer direkten fungiziden Aktivität [113-116]. Trotz direkter Bindung von humanen NK-Zellen an den Pilz wurde das Wachstum des Pathogens nicht inhibiert [114]. Ausschließlich murine NK-Zellen vermitteln nach einem Priming mit IL-2 eine Wachstumsinhibierung von *C. albicans* durch die Freisetzung von IFN- γ *in vitro* [117]. Dieser Effekt wurde allerdings nur für Hefezellen des Pilzes beobachtet, während das Wachstum von Hyphen nicht inhibiert werden konnte [117]. Neben direkten zytotoxischen Effekten könnten NK-Zellen auch indirekt zur Induktion einer protektiven Immunantwort gegen *C. albicans* beitragen. Hierbei spielen insbesondere Zytokine und Chemokine, die durch NK-Zellen freigesetzt werden, eine entscheidende Rolle. Das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ verstärkt die Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten [118, 119]. Wenn Makrophagen durch IFN- γ stimuliert werden, zeigen sie eine gesteigerte Phagozytose gegenüber *C. albicans* [120]. TNF- α potenziert die Aktivität von Neutrophilen gegenüber *C. albicans* [119, 121, 122]. Die verstärkte antifungale Aktivität TNF- α -aktivierter neutrophiler Granulozyten konnte auf die erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate und Freisetzung von Enzymen zurückgeführt werden [121]. Auch *in vivo* konnte eine Beteiligung von NK-Zellen in der Immunantwort in systemischen *C. albicans*-Infektionen gezeigt werden. Mäuse mit kombinierter T- und NK-Zell-Defizienz zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für diesen polymorphen Pilz, während T-Zell-Defizienz allein die Manifestation der systemischen Infektion nicht beeinflussen konnte [123]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass NK-Zell-Depletion die phagozytische Aktivität von Milz-Makrophagen gegen *C. albicans* unterdrücken [124, 125]. Weiterhin führte die Injektion inaktivierter *C. albicans* Hefezellen in Mäusen zur Generierung einer zytolytischen Effektorzellpopulation mit NK-Zell-Charakter [126]. Nichts desto trotz lassen sich bisher protektive Effekte von Natürlichen Killerzellen *in vivo* hauptsächlich auf indirekte Effekte, vermittelt durch die Sekretion von IFN- γ , zurückführen [127]. Obwohl Toll-like Rezeptor- (TLR-) Expression, Rezeptoren die eine wichtige Rolle in der Erkennung von *C. albicans* durch Immunzellen spielen, auch auf NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, konnte eine Detektion des Pilzes durch diese Rezeptorfamilie noch nicht gezeigt werden [128].

1.9 Hypothesen und Ziele dieser Arbeit

Natürliche Killerzellen stellen eine wichtige Komponente des Immunsystems dar. Ihre Rolle wurde weitgehend im Hinblick auf maligne Erkrankungen, virale aber auch bakterielle Infektionen beschrieben. Die Funktion von NK-Zellen in systemischen *C. albicans*-Infektionen wurde bislang nur unzulänglich untersucht. Folgende Ziele waren aus diesem Grund Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

1. Die Analyse und Charakterisierung der Interaktion von humanen NK-Zellen und *C. albicans*.
2. Die Charakterisierung des Aktivierungsmusters von NK-Zellen nach Konfrontation mit dem polymorphen Pilz.
3. Die Rolle der Interaktion von NK-Zellen und *C. albicans* im immunologischen Netzwerk anderer wichtiger Immunzellen.
4. Die Untersuchung des Einflusses von NK-Zellen während einer systemischen *C. albicans* Infektion *in vivo*.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Der Einsatz primärer, humaner Zellen wurde entsprechend der Grundsätze gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Protokolle wurden durch das Ethik-Komitee des Universitätsklinikum Jena genehmigt (Bewilligungsnummer: 2734-12/09). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Blutspendern abgegeben.

Alle humanen Zellen wurden steril und ohne Zusatz von Antibiotika bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.1 Isolierung von humanen NK-Zellen

Periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut (PBMC) wurden mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (Biochrom AG) aus Buffy Coats freiwilliger und gesunder Spender isoliert. Dafür wurde das Blut zunächst 1:4 in PBS + 2 mM EDTA verdünnt. Die Auftrennung erfolgte in der Zentrifuge bei 800 g für 20 min. Die so gewonnenen PBMC wurden, gefolgt von drei Waschschritten in PBS + 2 mM EDTA, mit einem Bead-Cocktail (Miltenyi Biotech) versetzt, der eine Negativ-Selektion von CD56⁺ und CD3⁻ NK-Zellen ermöglicht. Die Isolierung erfolgte über magnetische Säulen mit Hilfe des autoMACS® (Miltenyi Biotech). Nach der Aufreinigung konnte mittels Durchflusszytometrie eine Reinheit von $\geq 95\%$ nachgewiesen werden. Die NK-Zellen wurden als CD56⁺, CD16⁺, CD3⁻ und CD14⁻ identifiziert.

2.1.1.1 Kultivierung von humanen NK-Zellen

Direkt nach der Aufreinigung wurden die NK-Zellen in SCG-Medium (CellGenix) + 10% humanes Serum (PAA) + 100 U / ml IL-2 (Immunotools) aufgenommen und mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen / ml in 24-Well-Platten eingesät. Primäre NK-Zellen wurden ein bis zwei Tage nach der Isolierung direkt für Experimente eingesetzt. Dafür wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in frischem SCG-Medium + 10% humanes Serum aufgenommen. Zur

Gewinnung von Zytokin-aktivierten NK-Zellen wurde das Expansionsprotokoll folgendermaßen fortgesetzt: Am Tag drei der Kultivierung wurden 500 µl des verbrauchten Mediums vorsichtig abgezogen und durch 500 µl neues SCG-Medium + 10% humanes Serum (PAA) versetzt mit 100 U/ml IL-2 (Immunotools), 50 ng/ml IL-15 (Immunotools), 1000 U/ml IFN- α (Immunotools) und 2000 U/ml IFN- β (Immunotools) ersetzt. Ab Tag 6 der Kultivierung konnten die Zellen für Experimente eingesetzt werden.

2.1.2 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten

Aus gesundem Spendervollblut wurden neutrophile Granulozyten durch Gradientenzentrifugation für 45 min bei 500 g mit Hilfe von Polymorphprep (PROGEN Biotechnik) von den restlichen Zellen abgetrennt [129]. Nach weiteren Waschschritten mit 0.5 x PBS und einem Lyseschritt mit ACK-Lysepuffer (Invitrogen) wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie die Reinheit der Zellen im Forward-/ Side-Scatter bestimmt. Zellen mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ wurden dann in SCG-Medium + 10% humanes Serum aufgenommen und für die Experimente eingesetzt.

2.2 Anzucht von *C. albicans*

Die in Tabelle 1 aufgelisteten Pilze wurden für *in vitro* Experimente eingesetzt. Alle Pilze wurden auf die gleiche Weise für Experimente vorbereitet. Zur Langzeitkultivierung wurde der Pilz auf YPD-Agarplatten (1% Hefeextrakt, 2% Bakto-Pepton, 2% D-Glukose, 2% Agar) ausgestrichen und bei 4 °C gelagert. Für den Einsatz in Experimenten wurde das Pilzwachstum induziert. Hierfür wurde *C. albicans* über Nacht in Standardflüssigmedium YPD bei 30 °C angezogen und 1.5 h vor dem Experiment 1:10 in frischem YPD-Medium verdünnt und bei 30 °C geschüttelt.

Vor dem Einsatz im Experiment wurde der Pilz gewaschen und in SCG-Medium + 10% humanes Serum aufgenommen.

Tabelle 1: Verwendete *C. albicans*-Stämme für *in vitro* Experimente.

Stamm	Beschreibung	Genotyp	Herkunft
SC5314	Wildtyp [130]	<i>C. albicans</i> Wildtyp	B. Hube, HKI Jena
<i>efg1Δ/cph1Δ</i>	Nicht-filamentöse Mutante [15]	<i>cph1::hisG /cph1::hisG</i> , <i>efg1::hisG /efg1::hisG</i> - <i>URA3-hisG</i>	B. Hube, HKI Jena
<i>C. albicans</i> - GFP	SC5314 + pADH1-GFP (GFP-Protein unter Kontrolle des ADH- Promotors, Codon-optimiert) [131]	<i>ADH1/adh1::pADH1</i> - <i>GFP-SAT1-ADH1t</i>	P. Staib, HKI Jena
BK04591 BK04055 BK05333 BK662 BK1942 BK03332 BK7024 BK09470 BK07167 BK07859 BK3370	klinische Isolate aus positiven Blutkulturen		Institut für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg

2.3 Konfrontationsexperimente

Alle Konfrontationsexperimente wurden in SCG-Medium und 10% humanes Serum für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ durchgeführt. Die Vitalität des Pilzes wurde nach Konfrontation mit Hilfe des XTT-Assay (Vergleich 2.5) festgestellt, oder aber die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (Vergleich 2.4) und der zellfreie Überstand zur Detektion von löslichen Komponenten mit ELISA oder Bioplex (Vergleich 2.6) bei -80 °C gelagert.

2.3.1 Konfrontation von NK-Zellen und *C. albicans*

Konfrontationsexperimente wurden bei einer Infektionsrate von 0.5 *C. albicans* Zellen pro Immunzelle durchgeführt. Bei einer Konfrontation wurden $1,6 \times 10^5$ NK-Zellen entsprechend mit $0,8 \times 10^5$ *C. albicans* im Eppendorf Reaktionsgefäß koinkubiert.

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurde zellfreier Überstand des Reaktionsansatzes bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Ausgangskonzentration NK-Zellen: 2×10^6 / ml

Ausgangskonzentration *C. albicans*: 1×10^6 / ml

Tabelle 2: Volumenkonzentrationen der eingesetzten Komponenten.

Ansätze	NK-Zellen	<i>C. albicans</i>	SCG-Medium
NK-Zellen	80 μl	-	160 μl
<i>C. albicans</i>	-	80 μl	160 μl
NK-Zellen + <i>C. albicans</i>	80 μl	80 μl	80 μl

2.3.1.1 Blockierungsexperimente

2.3.1.1.1 FasL/TRAIL

Zur Blockierung des Todesrezeptorweges wurden in Koinkubationen von NK-Zellen und *C. albicans* Blockierungsantikörper gegen TRAIL (10 ng / ml, Anti-human TRAIL/TNFS10 MAb, Klon 100419, R&D Systems) und FasL (1,6 ng / ml, Anti-human Fas Ligand/TNFSF6 MAb, Klon 154922, R&D Systems) hinzugefügt.

2.3.1.1.2 Blockierung der Aktin- und Mikrotubuli-Polymerisation

Um die Aktinpolymerisierung zu blockieren, wurden die NK-Zellen bereits 30 min vor Koinkubation mit 1 μM Cytochalasin D (Sigma) gelöst in DMSO versetzt. Zur Inhibierung

der Mikrotubuli-Funktion wurden die Zellen mit 1 μM Colchicin (Sigma) in DMSO für 30 min vorbehandelt. Der Inhibitor blieb während der kompletten Konfrontation von 4 h anwesend und eine Lösemittelkontrolle mit entsprechender DMSO-Konzentration wurde mitgeführt. Als Aktivierungskontrolle wurden NKp46- und CD2- spezifische Beads (Miltenyi) eingesetzt.

2.3.1.2 Toxizitätskomponenten

Aus der NK-Zelllinie YT aufgereinigtes Perforin und Granzym B (Enzo Life Science) oder rekombinantes TNF- α oder IFN- γ (Miltenyi) wurden dem Pilz entweder allein oder in Kombination hinzugefügt. Nach vierstündiger Inkubation erfolgte die Feststellung der Vitalität des Pilzes mit Hilfe des XTT-Assay festgestellt werden. Die Verdünnungspuffer wurden als Kontrolle mitgeführt.

2.3.2 Konfrontation im Transwell

Um die Notwendigkeit von direktem Kontakt zu ermitteln, wurden Konfrontationen von NK-Zellen und *C. albicans* im Transwell durchgeführt. Pilzzellen wurden entweder zusammen mit NK-Zellen in einer 24-Well-Platte oder separiert durch ein Insert (Corning) mit einem Durchmesser von 6.5 mm und einer Porengröße von 0.4 μm kultiviert.

2.3.3 Konfrontation von NK-Zellen und Neutrophilen und *C. albicans*

Konfrontationsexperimente in der Anwesenheit von Neutrophilen wurden in einem Verhältnis von 2/2/1 NK-Zellen/Neutrophile Granulozyten/*C. albicans* eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Immunzellen allein in Konfrontation mit *C. albicans*, wie bereits weiter oben für NK-Zellen beschrieben, eingesetzt.

Ausgangskonzentration NK-Zellen: $2 \times 10^6 / \text{ml}$

Ausgangskonzentration Neutrophile: $2 \times 10^6 / \text{ml}$

Ausgangskonzentration *C. albicans*: $1 \times 10^6 / \text{ml}$

Tabelle 3: Volumenkonzentrationen der eingesetzten Komponenten.

Ansätze	NK-Zellen	Neutrophile	<i>C. albicans</i>	SCG-Medium
NK-Zellen	80 µl	-	-	160 µl
Neutrophile	-	80 µl	-	160 µl
<i>C. albicans</i>	-	-	80 µl	160 µl
NK-Zellen + Neutrophile + <i>C. albicans</i>	80 µl	80 µl	80 µl	-

2.4 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und mit CellWash (BD) gewaschen. Die Antikörperfärbung wurde bei 4 °C für 30 min durchgeführt und nach einem weiteren Waschschrift mit CellWash erfolgte die Analyse der Zellen am BD FACSCanto II®.

In Tabelle 4 sind alle Antikörper gelistet, die in dieser Arbeit für *in vitro* Experimente verwendet wurden.

Um zwischen extra- und intrazellulärem *C. albicans* zu unterscheiden, wurde der Pilz mit einem spezifischen anti-*Candida*-Antikörper (Hase-IgG1, Acris Antibodies, 1 µl je Ansatz) gefärbt.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse in *in vitro* Experimenten.

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Menge
antiCD3	Klon SK7, Maus-IgG1; BD	12,5 µg/ml, 1 µl je Ansatz
antiCD14	Klon M5E2, Maus-IgG2a, BD	1 µl je Ansatz
antiCD16	Klon 3G8, Maus-IgG1, BD	1 µl je Ansatz
antiCD56	Klon B159, Maus-IgG1, BD	1 µl je Ansatz
antiCD66b	Klon G10F5, Maus-IgM, BD	3 µl je Ansatz
antiCD107a	Klon H4A3, Maus-IgG1, Biozol	1 µl je Ansatz
antiCD282	Klon 11G7, Maus-IgG2a, eBioscience	100 µg/ml, 1 µl je Ansatz
antiCD314	Klon 1D11, Maus IgG1, AbD Serotec	0.1 mg/ml, 1 µl je Ansatz
antiCD335	Klon 9E2, Maus-IgG1, Biolegend	1 µl je Ansatz
antiDectin-1	Klon GE2, Maus-IgG1, AbD Serotec	0.1 mg/ml, 1µl je Ansatz
Isotypkontrollen	Maus-IgG1, Maus-IgG2a, Maus-IgGM, BD	1 µl je Ansatz

2.5 XTT-Assay

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von *C. albicans* wurden die Reaktionsansätze mit 800 µl eiskaltem destilliertem Wasser, versetzt mit 200 µl 0.2% Triton X100, gewaschen und bei 14.000 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 800 µl eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und erneut bei 14.000 g für 5 min bei 4 °C

abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µl einer XTT-Lösung (Sigma) von 0.5 mg / ml XTT in PBS versetzt. Diese wurde zuvor für 30 min bei 55 °C erhitzt und mit 50 µg / ml Coenzyme Q (Sigma) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C konnte die Absorption des zellfreien Überstandes bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden (Referenz bei 650 nm). Dafür wurden 100 µl zellfreier Überstand mit 100 µl PBS versetzt und in eine optische Flachbodenplatte (VWR) gegeben. Die metabolische Aktivität des Pilzes wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{metabolische Aktivität in \%} = (1-X/Y) \times 100$$

X steht für die Absorption der verschiedenen Kulturkonditionen und Y für die Absorption der Negativkontrolle (Pilz allein).

2.6 ELISA-/ Bioplex-Messung

Zur Bestimmung der Konzentration von Granzym B und Perforin wurden ELISAs entsprechend der Beschreibung des Herstellers (Abcam) durchgeführt. Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Beaddetektions-System (Bioplex) von Bio-Rad durchgeführt. Bei der Durchführung wurde sich an das vom Hersteller beigelegte Protokoll gehalten. Zur Bestimmung der Konzentrationen von GM-CSF, IFN- γ und TNF- α wurden die zellfreien Koinkubationsüberstände unverdünnt eingesetzt. Für die Messung von RANTES sowie MIP-1 α und MIP-1 β wurden die Überstände 1:100 in SCG-Medium verdünnt.

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Vermessung der Filamente

Die Filamentierung von *C. albicans* wurde für 1.5 h bei 37 °C in SCG-Medium + 10% humanes Serum induziert. Danach wurde eine Spatelspitze FITC-Pulver (Sigma)

hinzugegeben und die Färbung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Medium wurden die Pilzzellen dann für weitere 2 h mit NK-Zellen versetzt und zum Schluss auf einen Objektträger gebracht, anschließend in Mowiol Dabco (Sigma) eingebettet. Es wurden 140 Pilze je Kondition vermessen und die Filamentierung mit und ohne Einfluss von NK-Zellen bestimmt. Während alle Pilze hierbei einen FITC-gefärbten Keimschlauchansatz vergleichbarer Länge aufwiesen, so zeigte die ungefärbte Fortsetzung des Keimschlauches, ob NK-Zellen einen Einfluss auf die Hyphenverlängerung haben.

2.7.2 Videoaufnahmen

Für Lebendzellanalysen wurden die Immunzellen mit *C. albicans* im Verhältnis 1:1 in einer optischen Schale (MoBiTech) inkubiert und über einen Zeitraum von 2 h aufgenommen (1 Bild / 2 min). Videoaufnahmen von NK-Zellen, *C. albicans* und neutrophilen Granulozyten fanden im Verhältnis 1:1:1 statt. Um neutrophile Granulozyten von NK-Zellen unterscheiden zu können, wurden diese Zellen mit 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein (BCECF-AM, Stocklösung 1 mg/ml, Invitrogen) vor der Konfrontation gefärbt. Dazu wurde die Stocklösung 1:250 in PBS verdünnt 500 µl des Farbstoffes mit 500 µl Zellen für 15 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen in Medium gewaschen. Aufnahmen wurden in 10 Sekunden-Abständen mit dem Zeiss LSM 780 Konfokalmikroskop gemacht.

2.7.3 Fluoreszenzmikroskopie

NK-Zellen wurden auf Gelatine (0.2%) beschichteten Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät und mit *C. albicans* bei einer Infektionsrate von 1 für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ konfrontiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 300 g an zentrifugiert. Die Deckgläschen mit den anhaftenden Zellen wurden anschließend in 250 µl 4% Histofix fixiert und nach einem darauf folgenden Waschschrift in PBS für 30 min bei 4 °C mit primärem Antikörper gegen CD107a (Klon H4A3, BD, 1 mg/ml, 1:100) allein oder in Kombination mit Phalloidin-AF568 (Invitrogen, 1:50) gefärbt. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (Ziege-anti-Maus-AF649, 1:250) und Calcofluor-White (Sigma, 350 µg/ml, 1:25). Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die

Deckgläschen in Mowiol-Dabco eingebettet und im Zeiss AxioObserver beziehungsweise Zeiss LSM 780 Konfokalmikroskop analysiert.

Für differentielle Färbungen wurden die Zellen wieder fixiert (Histofix, 4%) und extrazelluläre *C. albicans* Zellen mit Calcoflour-White (Sigma, 350 µg/ml, 1:25) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Danach wurde der Farbstoff dreimal mit PBS gewaschen. Nach einem fünfminütigen Permeabilisierungsschritt in 0.5% Triton X100 wurden sowohl die extra- als auch die intrazellulären *C. albicans* Zellen mit einem spezifischen Antikörper (Hase-anti-*Candida*, Acris Antibodies, 1:250) markiert. Die Immunzellen wurden mit antiCD56 (Klon My31, BD, 1:166) als NK-Zellen identifiziert und Phalloidin-AF488 (Invitrogen, 1:50) diente der Aktin-Färbung. Es folgten drei Waschschrte mit PBS und die Färbung mit sekundären Antikörpern (Ziege-anti-Maus-AF649, Ziege-anti-Hase-AF568, 1:250) für 1 h bei 4 °C. Nach weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Deckgläschen in Mowiol-Dabco eingebettet und im Zeiss AxioObserver beziehungsweise Zeiss LSM 780 Konfokalmikroskop analysiert.

2.8 Microarray-basierte Analyse von NK-Zellen

Für die Array-Analyse wurden mindesten 1×10^6 NK-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Pilz für 1 h, 3 h und 6 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für jeden Zeitpunkt wurde eine uninfizierte Kontrolle mitgeführt. Für die Analysen wurden Zellen von 3 unabhängigen Spendern eingesetzt und die Isolation und Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß 2.1.1. beziehungsweise 2.1.1.1.

2.8.1 RNA-Isolation

Den Koinkubationsansätzen wurde RNAProtect Zellreagent (Quiagen) im Verhältnis 1 (Probe) : 5 (RNAProtect) hinzugefügt und die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Behandlung gelagert.

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNAeasy Mini Kit (Quiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.2 RNA-Amplifikation, cRNA-Transkription und Array

RNA-Amplifikation und cRNA-Transkription wurden mit dem Illumina TotalPrep RNA Amplifikationskit (Ambion) entsprechend der Beschreibung des Herstellers durchgeführt. Weiterhin wurde sich des HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kits von Illumina bedient.

2.8.3 Bioinformatik

Nach Qualitätskontrolle wurden die Arrays mit Hilfe der Statistiksoftware R Version 2.14.1. (<http://www.r-project.org>) vorprozessiert. Die Daten wurden mit Hilfe Quantil-Normalisierung und Logarithmierung bearbeitet. Proben wurden nur dann verwendet, wenn sie mindestens auf drei Chips präsent waren und entsprechend ein Signal zeigten. Anschließend wurde ein lineares Modell an die Daten angepasst, so dass ein normalisierter Intensitätswert pro Transkript und Chip aus den Analysen resultierte. Transkripte wurden dann als signifikant differentiell reguliert betrachtet, wenn sie zwischen zwei verschiedenen Bedingungen einen absoluten Fold Change von mehr als 2 und einen FDR (false discovery rate) angepassten t-Test p-Wert von weniger als 0.05 entsprachen. Differentiell regulierte Transkripte wurden mittels DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) anhand von KEGG-Kategorien funktionellen Gruppen zugeordnet.

2.9 *In vivo* Experimente

2.9.1 Murines NK1.1-Depletionsmodell

Alle Tiere, die für diese Studie eingesetzt worden sind, wurden in Gruppen von 5 in unabhängig voneinander versorgten Käfigen untergebracht und wurden streng nach den Prinzipien des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere versorgt (<http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>). Alle Tierexperimente und Protokolle wurden in Zustimmung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Protokolle wurden durch die verantwortliche Behörde (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz) und dessen Ethikkomitee (Zulassungsnummer: 03-005/11) abgesegnet. Die Tiere wurden weiterhin mindestens zweimal täglich durch einen

Tiermediziner überwacht und bewertet (Isolierung von der Gruppe, fortschreitender Gewichtsverlust, Lethargie und Fieber). Für die Versuche wurden weibliche C57Bl/6NCrI Mäuse (6-8 Wochen, 18-20 Gramm; Charles River) eingesetzt.

Vorversuche Infektionsdosis

In zwei Vorversuchen zu je 5 Mäusen wurde die optimale Infektionsdosis ermittelt. Während eine intravenöse Injektion von 1×10^4 Hefezellen / Gramm Körpergewicht nicht zu einer raschen Inflammationsreaktion verbunden mit Fieber führte, wie es vergleichbar in einer Sepsis zu finden ist, so konnte nach einer Infektion durch 2.5×10^4 Hefezellen / Gramm Körpergewicht ein rascher Krankheitsverlauf mit schnell ansteigendem Fieber beobachtet werden. Letztere Infektionsdosis wurde für die Hauptversuche übernommen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die zweimalige intraperitoneale Injektion von 250 μ l PBS vor der Infektion mit *C. albicans* den Krankheitsverlauf der Mäuse nicht beeinflusst.

Vorversuche NK1.1-Depletion

In einem Vorversuch von 5 Mäusen, die nicht infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Applikation von 200 ng anti-NK1.1-Antikörper in 250 μ l PBS an Tag -4 und Tag -1 zu einer Reduktion von $\geq 95\%$ der NK-Zellen führte (Abb. 3).

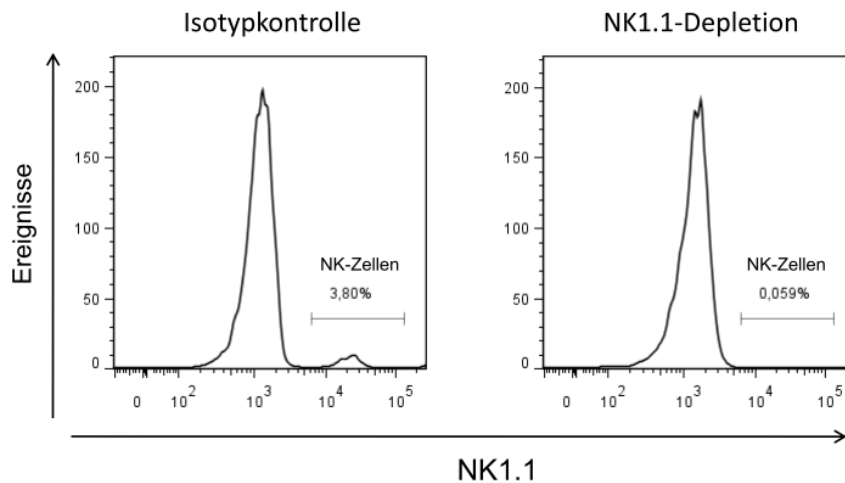


Abbildung 3: Depletion der murinen NK-Zellen mit Hilfe einer zweimaligen intraperitonealen Applikation von 200 ng NK1.1-Depletionsantikörper. Die Blutzellen wurden auf CD45-Positivität gated und dann auf die Expression des Markers NK1.1 untersucht.

2.9.1.1 NK.1.1-Depletion

Für die NK-Zell-Depletion wurden 200 ng anti-NK1.1-Antikörper ([132]; Klon PK163, Miltenyi) in 250 µl sterilem PBS an Tag -4 und Tag -1 intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt den entsprechenden Isotypkontroll-Antikörper (IgG2a, Miltenyi). Die erfolgreiche Depletion konnte in Blutproben am Tag 0 kurz vor der Injektion bestätigt werden. Hierfür wurden 75 µl Blut retrobulbär entnommen und gegen CD45, NK1.1 und CD3 gefärbt. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse und der Verwendung von TrueCount-Tubes (BD) konnten die Zellzahlen bestimmt werden.

2.9.1.2 Infektion

Für die Infektion wurde *C. albicans* SC5314 für 12 h bei 30 °C in YPD Medium angezogen. Geerntete Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen und dann auf eine finale Konzentration von 2.5×10^6 /ml eingestellt. Die Infektionsdosis wurde durch das Plattieren serieller Verdünnungen auf YPD bestätigt. Die Infektion der Mäuse erfolgte an Tag 0 über die laterale Schwanzvene mit 2.5×10^4 Hefezellen /g Körpergewicht infiziert.

2.9.1.3 Klinisches Monitoring

Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde zweimal täglich überprüft und dokumentiert sowie die Körperoberflächentemperatur und das Körpergewicht täglich gemessen. Ein klinischer Wert konnte durch die Summe von drei individuellen Parametern gebildet werden: Fell (normal: 0; zerzaust: 1), Körpergewichtsverlust ($\leq 10\%$: 0; 10%-24.9%: 1; $\geq 25\%$: 2) und Verhalten (normal: 0; reduzierte spontane Aktivität: 1; reduzierte Antwort auf externe Stimuli: 2; Lethargie und Isolierung aus der Gruppe: 3). Entsprechend wurden gesunde Tiere mit 0 bewertet und der höchstmöglich erreichbare Wert lag bei 6. Mäuse, die schwere Anzeichen von Krankheit und Lethargie zeigten (Werte 5 bis 6), wurden durch die Verabreichung von 200 µl Ketaminhydrochlorid (50 mg/ml) anästhesiert.

2.9.1.4 Probenaufbereitung

Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen und Milz, Nieren und Leber wurden entnommen. Auffällige pathologische Veränderungen wurden während der Nekropsie notiert. Zur Analyse der Immunantwort in den Organen, wurden diese zunächst gewogen und aus den Geweben im nächsten Schritt mittels 30 µm Filter (Miltenyi) Einzelzellsuspensionen hergestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 400 g konnten zellfreie Überstände für die Quantifikation der sekretierten Zytokine gewonnen und bei -80 °C gelagert werden. Dafür wurde der 23-Maus-Zytokinplex entsprechend der Empfehlungen des Herstellers Bio-Rad verwendet und die Proben unverdünnt gemessen. Der Immunzellstatus wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen ermittelt. Dafür wurden die Organhomogenate sowie das Blut mit Zellfix (BD) fixiert und mit den Antikörpern in Tabelle 5 gefärbt.

Tabelle 5: Antikörper, die für die Analyse der murinen Zellen eingesetzt wurden.

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Mengen
antiCD45	Klon 30F11.1, Ratte-IgG2b, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiLy-6G	Klon 1A8, Ratte-IgG2a, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD11b	Klon M1/70.15.11.5, Ratte-IgG2b, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD11c	Klon N418, Hamster-IgG1, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD8a	Klon53-6.7, Ratte-IgG2a, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiNK1.1	Klon PK136, Maus-IgG2a, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD19	Klon 6D5, Ratte-IgG2a, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiMHC Class II	Klon M5/114, Ratte-IgG2b, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD4	Klon GK1.5, Ratte-IgG2b, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiCD3	Klon 145-2C11, Hamster IgG1, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
antiDectin 2	Klon KVa7-6E7, Ratte-IgG3a, Miltenyi	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat
Isotypkontrollen	Ratte-IgG2a, Ratte-Ig2b, Hamster-IgG1, Maus-IgG2a, Ratte-IgG3a, BD	10 µl je 75 µl Blut oder Gewebehomogenisat

Die Zellen wurden dann auf CD45-Positivität gegated und tiefer analysiert. Mit Hilfe von TrueCcount Tubes (BD) konnten weiterhin Zellzahlen bestimmt werden. Durch Ausplattierung der Homogenisate konnte weiterhin der Pilzbefall in den Organen bestimmt werden.

2.9.2 SCID- und NSG-Mausmodell

Für die Versuche wurden weibliche NOD (WT)-Mäuse (6-8 Wochen, 18-20 Gramm; Charles River) eingesetzt. Die Experimente wurden durch das Ethik-Komitee für Tierexperimente der Radboud Universität, Nijmegen genehmigt. SCID-Mäuse weisen einen schweren, kombinierten Immundefekt auf. Entsprechend besitzen diese Mäuse eine eingeschränkte Fähigkeit, T- und B-Zellen zu produzieren sowie Defekte im Komplementsystem [133]. NSG-Mäuse weisen zusätzlich zu den T- und B-Zelldefekten einen NK-Zelldefekt auf. Für die Infektion wurde *C. albicans* ATCC MYA-3573 (UC 820) über Nacht bei 37 °C in Sabouroud Medium angezogen. Geerntete Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und dann in PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden dann an über die laterale Schwanzvene mit 1×10^4 Hefezellen/ Maus in einem Volumen von 100 µl PBS infiziert. Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde täglich überprüft und dokumentiert. Tiere, die sich von der Gruppe isoliert haben und starke Lethargie zeigten wurden anästhesiert.

Die Versuche in diesen Maus-Modellen wurden durch den Kooperationspartner in Nijmegen durchgeführt.

2.9.2.1 Probenaufbereitung

Um den Pilzbefall im Gewebe bestimmen zu können, wurden die Nieren der euthanisierten Tiere entnommen, gewogen und homogenisiert. Die Kolonie-bildenden Einheiten des Pilzes wurden durch Ausplattieren in seriellen Verdünnungsschritten auf Agarplatten bestimmt. Die Koloniezahlen wurden nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C bestimmt.

2.10 Software

Durchflusszytometrische Daten wurden entweder mit dem Programm BD FACSDiva™ Software Version 6.1.3 oder FlowJo Version 7.6.4 bearbeitet.

Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mit der GraphPad Prism 5 Software, Version 5.03.

Für die Mikroskopieaufnahmen und die Bildverarbeitung standen ZEN 2009 Light Edition sowie AxioVision Rel. 4.8 zur Verfügung.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung humaner NK-Zellen in Kurzzeitkultur

Um die Interaktion von humanen NK-Zellen mit dem pathogenen Hefepilz *C. albicans* näher beschreiben zu können, wurden die Immunzellen aus peripherem Blut freiwilliger Spender aufgereinigt. Die Identität der Zellen wurde durchflusszytometrisch auf CD56- und CD16-Positivität bestimmt (Abb. 4). Es konnte durch CD3- und CD14-Färbung ausgeschlossen werden, dass eine Verunreinigung durch T-Zellen oder Makrophagen vorliegt.

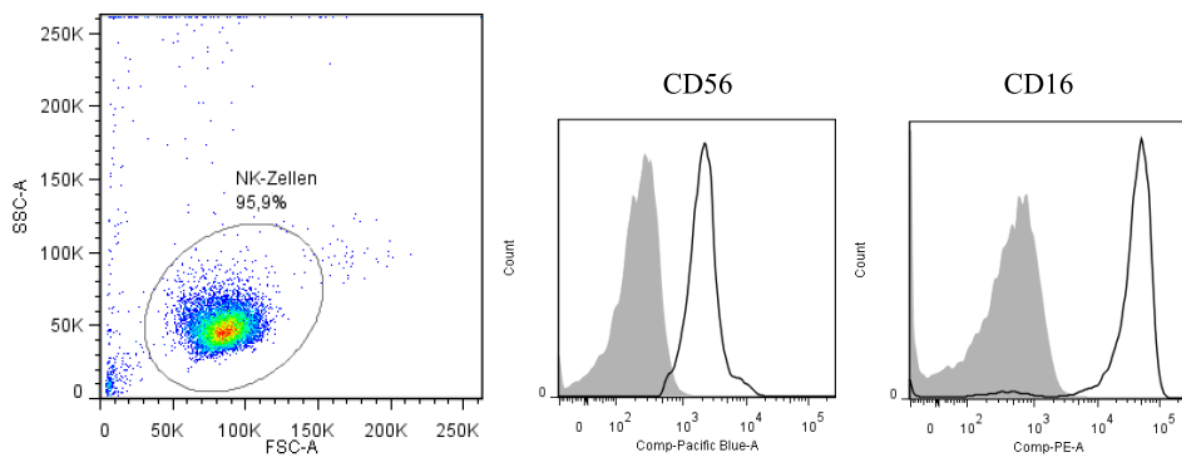


Abbildung 4: Reinheitsfärbung der NK-Zellen.

Frisch isolierte NK-Zellen wurden im Zytometer durch die Färbung gegen CD56 und CD16 auf ihre Reinheit überprüft. Links sind die Zellen im Forward-/Side-Scatter dargestellt. Die beiden rechten Histogramme zeigen eine Färbung der im Forward-/Side-Scatter gateden Zellen gegen CD56 und CD16 (schwarze Linie). Die grau-unterlegte Kurve zeigt die Isotypkontrolle.

Zellen mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ wurden in Kultur genommen und mit einem Zytokin-Cocktail bestehend aus IL-2, IL-15, IFN- α und IFN- β für sechs bis sieben Tage aktiviert. Diese Vorbehandlung resultierte in einer größeren und granulärerem NK-Zellpopulation wie sie bereits in der Literatur beschrieben worden ist (Abb. 5) [134].

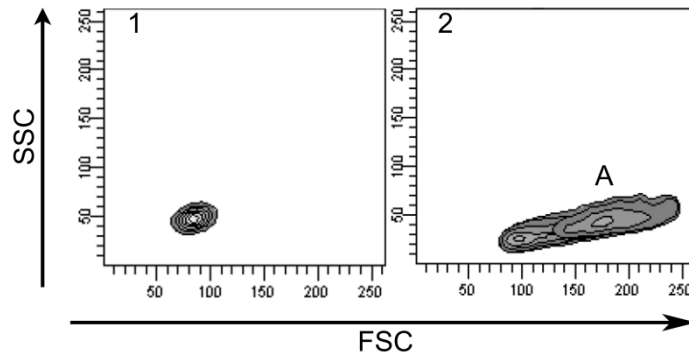


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von NK-Zellen.

Nach Isolierung von NK-Zellen zeigt sich im Forward-/Side-Scatter im Durchflusszytometer eine stark abgegrenzte Zellpopulation (links). Wurden diese Zellen nach dem beschriebenen Expansionsprotokoll für 6 Tage in einem Zytokingemisch bestehend aus IL-2, IL-15, IFN- α und IFN- β in Kultur genommen, entsteht eine zweite, größere und granuläre Population (rechts, Population A).

Um die Vitalität der NK-Zellen während der Kurzzeitkultur zu gewährleisten, haben sich Protokolle, die den Gebrauch von SCG-Medium, humanem Serum und IL-2 empfehlen, etabliert [135, 136]. Durch die Zugabe weiterer Zytokine kann das zytotoxische Potential von NK-Zellen gesteigert werden. Es wurde eine gesteigerte lytische Aktivität von NK-Zellen gegenüber autologen Krebszellen oder K562-Zielzellen durch die Expansion in Anwesenheit von IL-15 beschrieben [136, 137]. In der Literatur wurde weiterhin vor allem für die Interferone α und β ein Zytotoxizität-steigerndes Potential auf NK-Zellen beschrieben [138]. Die so behandelten NK-Zellen zeigten entsprechend eine gesteigerte Aktivität und wiesen eine gesteigerte Freisetzung von Perforin und Granzym B sowie Zytokinen auf, zeigten aber ansonsten die gleichen Aktivierungsmuster oder Effektormechanismen wie frisch isolierte NK-Zellen. Vorexperimente konnten bestätigen, dass sowohl frisch isolierte NK-Zellen als auch Zytokin-aktivierte NK-Zellen nach Kontakt mit *C. albicans* qualitativ ähnliche Reaktionsmuster zeigen.

3.2 Humane NK-Zellen zeigen Phagozytose in der Interaktion mit *C. albicans*

Die aktivierten NK-Zellen wurden dann für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ mit *C. albicans* in einem Verhältnis von 1:1 Immunzelle je Pilzzelle koinkubiert. Der Pilz beginnt unter diesen Bedingungen unmittelbar zu filamentieren und an den Boden der Kulturschale zu haften. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass NK-Zellen zu einer aktiven Bewegung befähigt sind. Eine Konfrontation von NK-Zelle und Pilz fand nach gerichteter Bewegung der Immunzellen statt. Kontinuierliche Aufnahmen einer solchen Koinkubation konnten zeigen, dass NK-Zellen aktiv eine Interaktion mit dem Pilz *C. albicans* eingingen (Abb. 6).

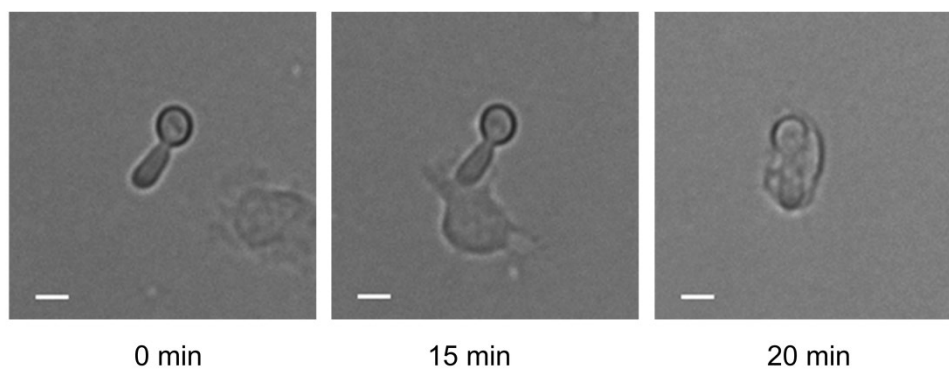


Abbildung 6: Konfrontation von NK-Zellen und *C. albicans*.

Lebendzellanalyse der Konfrontation von Zytokin-aktivierten NK-Zellen und *C. albicans*
Maßstabsbalken: 5 µm

Dabei bewegte sich die Immunzelle durch die Ausbildung von Pseudopodien auf die, an der Zellkulturschale haftende, Pilzzelle zu und nahm diese in einem phagozytose-ähnlichen Prozess auf. Dieser Vorgang konnte bereits innerhalb der ersten 20 min der Koinkubation, aber auch zu späteren Zeitpunkten und nach verlängertem Hyphenwachstum, beobachtet werden. Die Filamentierung von *C. albicans* wurde weder in Anwesenheit der Immunzellen noch nach Aufnahme durch diese beeinträchtigt. Nach Internalisierung durch die NK-Zelle konnte *C. albicans* die Zellmembran durch Hyphenverlängerung penetrieren. Während Pilzzellen, die nicht mit NK-Zellen interagierten, fest am Untergrund haften blieben, konnte für Pilze, die phagozytiert wurden, ein Ablösen von dem Reaktionsgefäß beobachtet werden. Da Phagozytose für NK-Zellen bisher nicht beschrieben worden ist, sollte ein differentielles Färben von extrazellulärem und intrazellulärem Pilz Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dieser Interaktion um eine echte Internalisierung handelte. Die extrazellulären Pilzzellen

waren zugänglich für den spezifischen Farbstoff Calcofluor-White, während extra- und intrazelluläre *Candida*-Zellen erst nach einem Permeabilisierungsschritt mit einem spezifischen anti-*Candida*-Antikörper gefärbt werden konnten (Abb. 7). Die Immunzellen wurden mit Hilfe einer CD56-Färbung als NK-Zellen identifiziert. Eine zusätzliche Färbung des Aktin-Zytoskeletts belegte eindeutig die Einbettung des Pilzes innerhalb des Aktin-Netzwerkes der CD56-positiven Zellen.

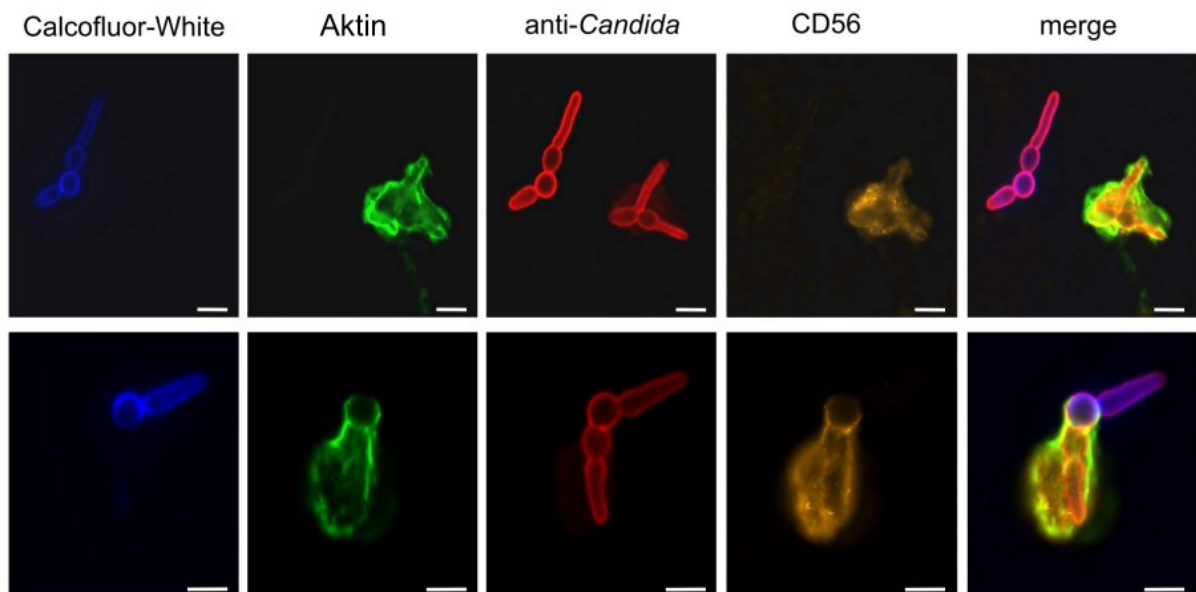


Abbildung 7: Differentielle Färbung von *C. albicans*.

Um die Internalisierung von *C. albicans* durch humane NK-Zellen zu bestätigen wurden differentielle Färbungen von extra- und intrazellulären Pilzzellen durchgeführt. Extrazelluläre *C. albicans* wurden im ersten Schritt mit Calcofluor-White (blau) gefärbt. Darauf folgte ein Permeabilisierungsschritt und sowohl intra- als auch extrazelluläre *C. albicans* konnten mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gefärbt werden (rot). Die Immunzellen konnten durch den Marker CD56 als NK-Zellen identifiziert werden (orange). Die Aufnahme des Pilzes ins Innere der humanen Immunzellen wurde weiterhin durch eine Aktin-Färbung des Zytoskeletts der Immunzellen gezeigt (grün). Maßstabsbalken: 5 μm

Die dreidimensionale Darstellung einer NK-Zelle nach Phagozytose von *C. albicans* konnte zusätzlich veranschaulichen, dass die CD56-gefärbte Zelle den Pilz komplett umschließt (Abb. 8).

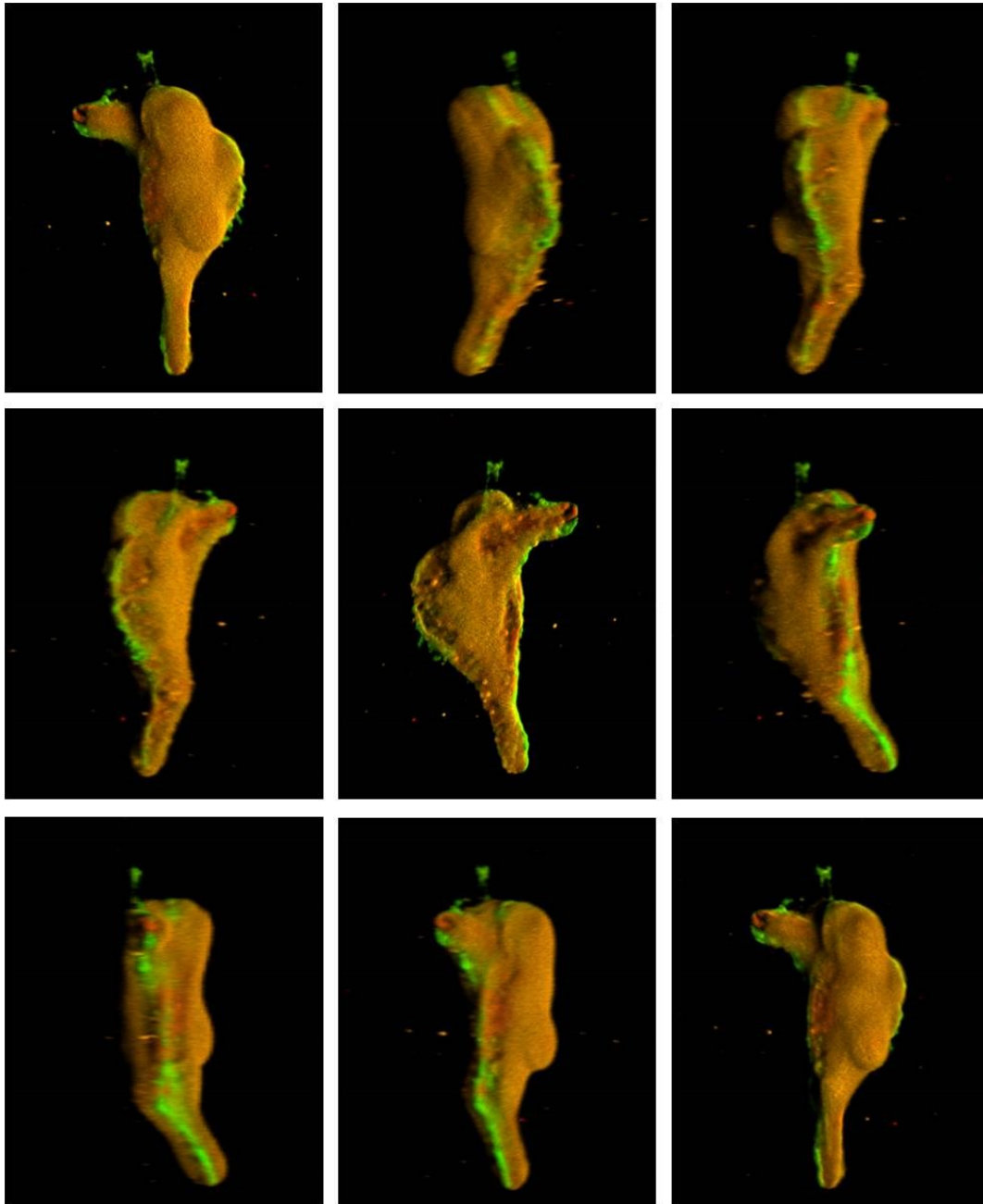


Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung einer NK-Zelle.

Die Aufnahme von Z-Stacks hat eine dreidimensionale Darstellung einer NK-Zelle ermöglicht, die *C. albicans* internalisiert hat. Die Rotation um die y-Achse veranschaulicht die komplette Umschließung der Pilzzellen (rot) durch die CD56-positive (orange) NK-Zelle, Aktinfärbung: Phalloidin (grün).

Um die Assoziationsrate der NK-Zellen mit dem Pilz zu verifizieren, wurde ein GFP- (grünfluoreszierendes Protein) exprimierender *C. albicans* Stamm eingesetzt und extrazellulärer Pilz wieder mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. Mit Hilfe von Durchflusszytometrie konnte so im Zeitverlauf die Assoziations- und Phagozytoserate bestimmt werden (Abb. 9). Ein Maximum von 26% +/- 8 der NK-Zellen assoziierten mit den Hefezellen innerhalb der ersten 2 h. 8% +/- 0.5 dieser NK-Zellen waren nicht nur assoziiert, sondern hatten den Pilz komplett internalisiert.

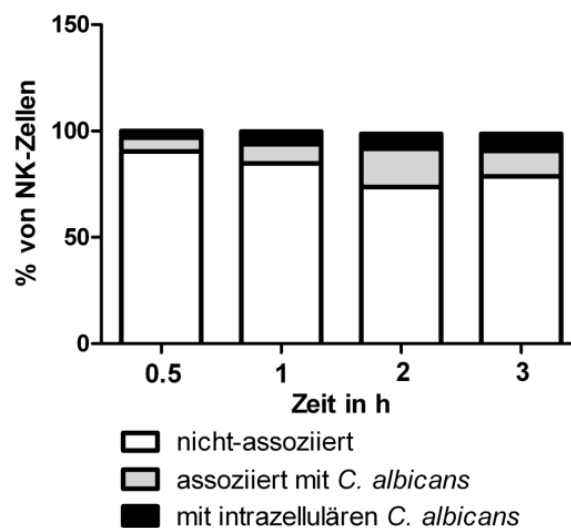


Abbildung 9: Assoziationsrate von NK-Zellen mit *C. albicans*.

Nach Analyse im Durchflusszytometer konnte bestimmt werden, wie groß der Anteil von NK-Zellen ist, der *C. albicans* phagozytiert hat beziehungsweise nur mit dem Pilz assoziiert ist. Dafür wurde ein GFP-exprimierender *Candida*-Stamm sowie ein spezifischer anti-*Candida*-Antikörper eingesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten.

3.3 *C. albicans* aktiviert NK-Zellen

Ausgehend von der mikroskopischen Analyse und der dort beobachteten phagozytoseähnlichen Interaktion von humanen NK-Zellen mit dem Pilz *C. albicans* sollte nun überprüft werden, ob die Konfrontation der Immunzellen mit dem Pathogen zur Aktivierung der NK-Zellen führt.

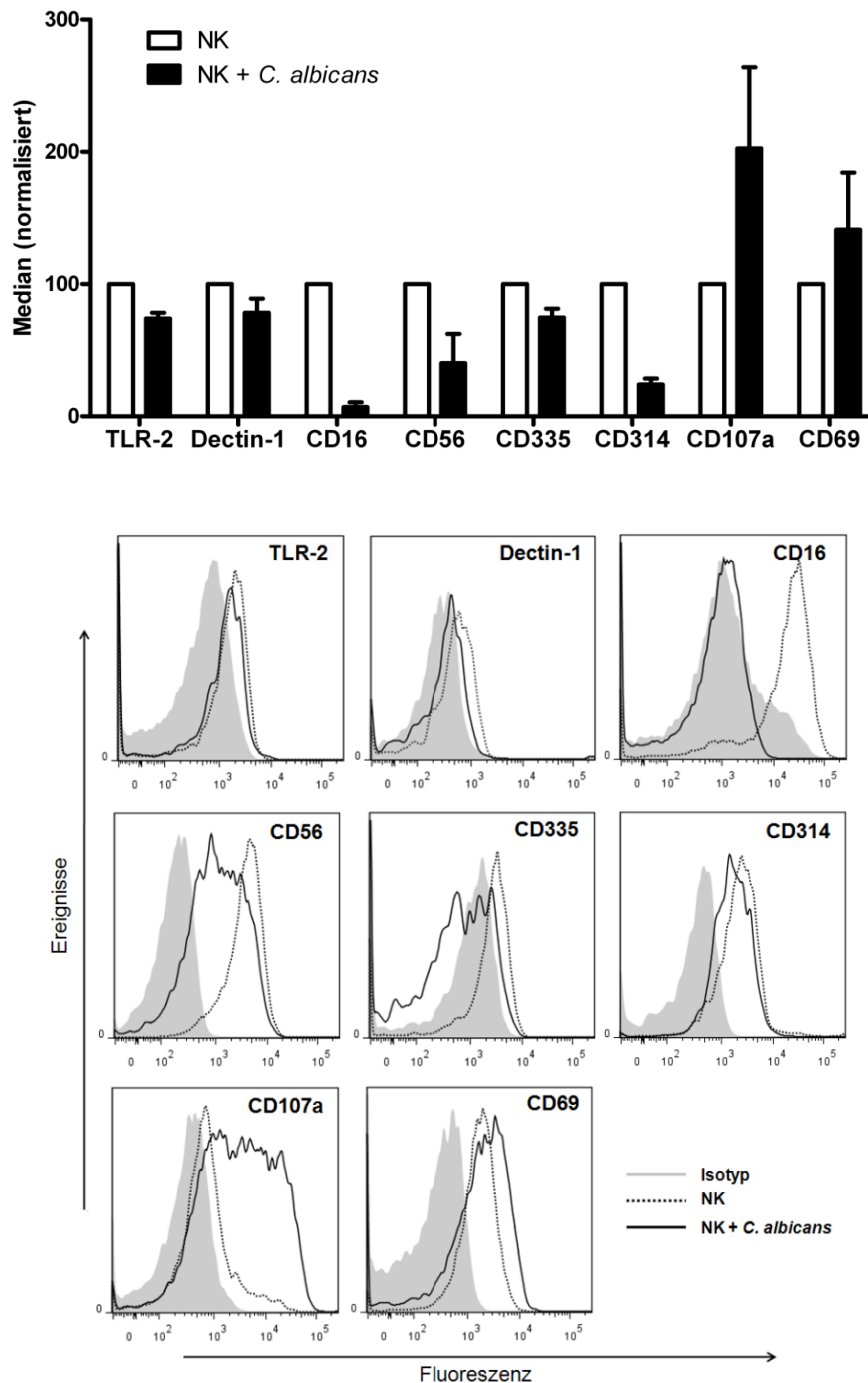


Abbildung 10: Rezeptorregulation auf NK-Zellen.

Oben: Nach Koinkubation von NK-Zellen mit *C. albicans* wurden die Immunzellen gewaschen und für 30 min mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurde mit den korrespondierenden Isotypkontrollen gefärbt. Nach Analyse im Durchflusszytometer wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten ermittelt und auf die uninfizierte Kontrolle normalisiert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Unten: Darstellung eines repräsentativen Experiments im Histogramm.

Eine Analyse der Oberflächenrezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass der Aktivierungsmarker CD69 nach 3 h um 41% +/- 34 heraufreguliert worden ist (Abb. 10). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr deutlich herunterreguliert wurden. Dazu gehören z.B. der TLR-2 und der Fc γ -Rezeptor III CD16, die um 26% +/- 4 beziehungsweise um 93% +/- 4 herunterreguliert wurden. Die Oberflächenexpression des C-Typ-Lektins Dectin-1 wurde nach *Candida*-Kontakt um 22% +/- 11 verringert. Auch die Oberflächenpräsentation der ITAM- (Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv) tragenden Rezeptoren CD314 und CD335 und des zellulären Adhäsins CD56 gingen nach Konfrontation mit dem humanpathogenen Pilz um 26-76 % zurück. Im Gegensatz dazu wurde ein starker Anstieg der CD107a-Expression von 102% +/- 61 nach 4 h *Candida*-Kontakt detektiert. Der Degranulierungsmarker CD107a wies auf eine aktive Freisetzung des Inhalts zytotoxischer Granula hin. Eine Immunofluoreszenzfärbung konnte die Relokalisierung von CD107a aus den Granula an die Oberfläche der NK-Zellen nach *Candida*-Kontakt bestätigen (Abb. 11).

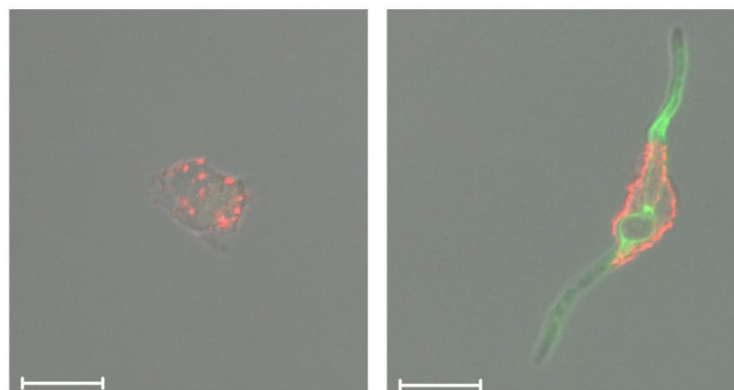


Abbildung 11: CD107a-Färbung auf NK-Zellen.

NK-Zellen wurden nach Konfrontation mit *C. albicans* fixiert und permeabilisiert. Der Pilz wurde durch Calcofluor-White-Färbung (grün) sichtbar gemacht, während eine Färbung gegen CD107a (rot) Granula visualisiert. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Um die Freisetzung zytolytischer Substanzen nachzuweisen, wurden sekretorische NK-Zellprodukte im Überstand der Koinkubationen nachgewiesen. Das porenbildende Protein Perforin sowie die spezifische Serinprotease Granzym B werden nach Konfrontation mit dem Pilz in signifikant erhöhten Mengen freigesetzt (Abb. 12).

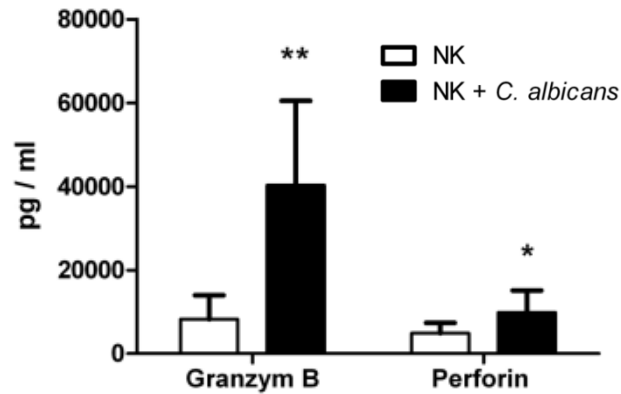


Abbildung 12: Freisetzung von Granzym B und Perforin.

Nach vierstündiger Koinkubation von *C. albicans* und NK-Zellen (MOI 0.5) wurde der zellfreie Überstand im ELISA auf freigesetztes Granzym B und Perforin untersucht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von mindestens acht unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **.

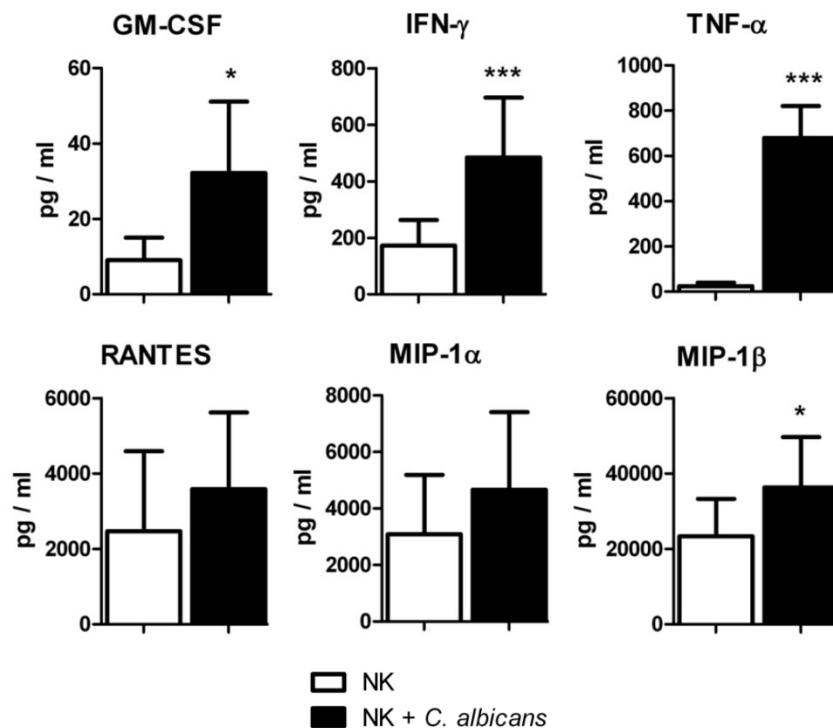


Abbildung 13: Zytokinfreisetzung.

Nach vierstündiger Koinkubation von *C. albicans* und NK-Zellen (MOI 0.5) wurde der zellfreie Überstand mit Hilfe des Bioplex-Systems auf Zytokine untersucht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von mindestens sieben unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *; $p < 0.001$ ***.

Neben diesen Substanzen sind NK-Zellen auch für die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen bekannt, die bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle spielen können. Die Zytokine GM-CSF, IFN- γ und TNF- α wurden nach Kontakt mit dem Pilz in signifikant erhöhten Konzentrationen freigesetzt (Abb. 13). Eine Steigerung der Sekretion konnte auch für die Chemokine RANTES und MIP-1 beobachtet werden.

Um einen Stamm-spezifischen Effekt ausschließen zu können, wurden zehn weitere klinische Blutstrom-Isolate von *C. albicans* getestet. Alle Stämme zeigten ein vergleichbares Aktivierungsmuster, resultierend in einer Herunterregulation von CD16 und CD56, einer Hochregulation von CD107a, sowie Zytokinfreisetzung, wie der Laborstamm SC5314 (Abb. 14).

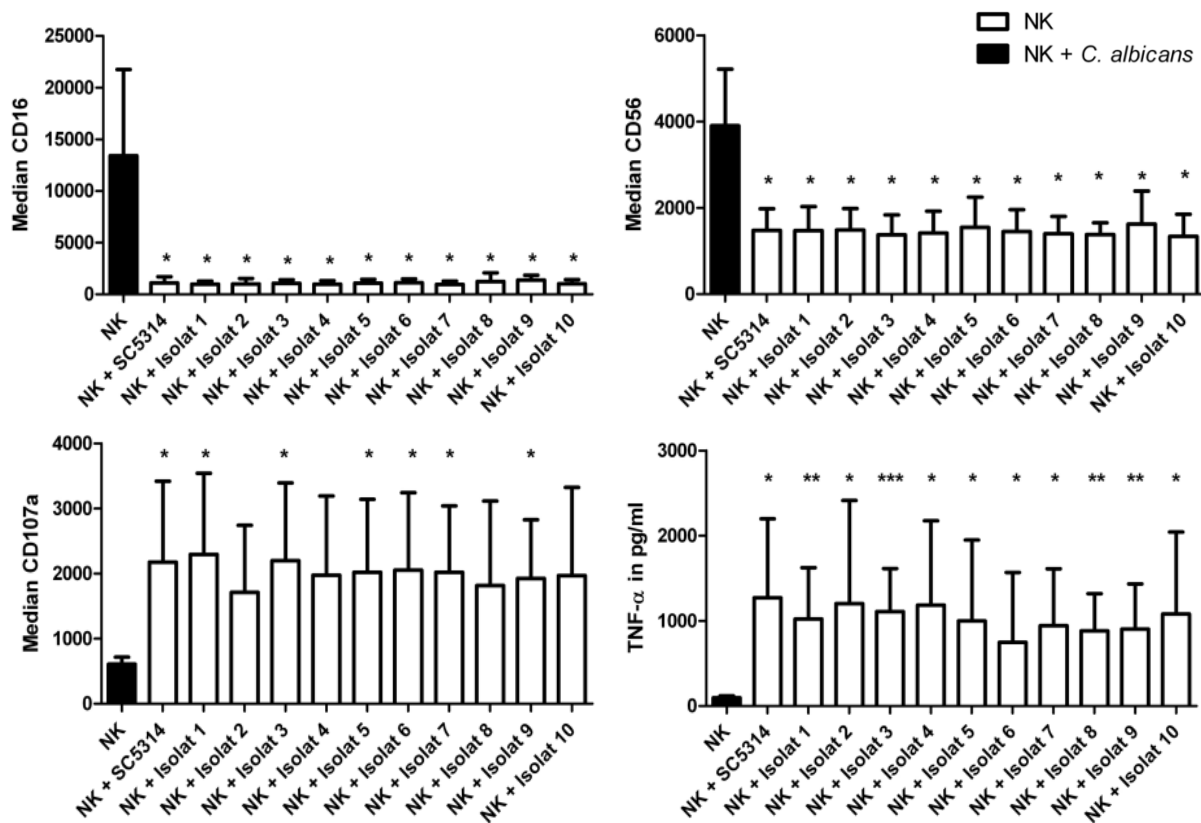


Abbildung 14: Untersuchung klinischer *C. albicans* Isolate.

Neben dem Laborstamm SC5314 wurden zehn klinische *C. albicans* Isolate aus Blutkulturen untersucht. Nach 4 h Kontakt der NK-Zellen mit den Isolaten bei einem MOI von 0.5 wurden die Immunzellen durchflusszytometrisch untersucht und TNF- α im Überstand detektiert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***.

3.4 Die Aktivierung von NK-Zellen durch *C. albicans* ist abhängig von direktem Kontakt

Direkter Kontakt und Adhäsion wurden als essentielle Bestandteile der NK-Zell-Aktivierung beschrieben [139]. Auch in der Konfrontation mit *A. fumigatus* werden NK-Zellen nur nach direktem Kontakt aktiviert, während die Separation durch permeable Membraneinsätze zu einer signifikant verringerten Freisetzung von Zytokinen führt [105]. Um zu untersuchen, inwiefern eine direkte Zell-Zell-Interaktion auch für die Aktivierung der NK-Zellen durch den polymorphen Pilz *C. albicans* entscheidend ist, wurden permeable Membraneinsätze (0.4 µm Porengröße) verwendet. Während in diesem System physikalischer Kontakt der beiden Zelltypen verhindert wird, können lösliche Mediatoren ungehindert diffundieren. Nach vier Stunden Koinkubation mit gleichzeitiger Trennung durch die Membran konnte keine Aktivierung der NK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15).

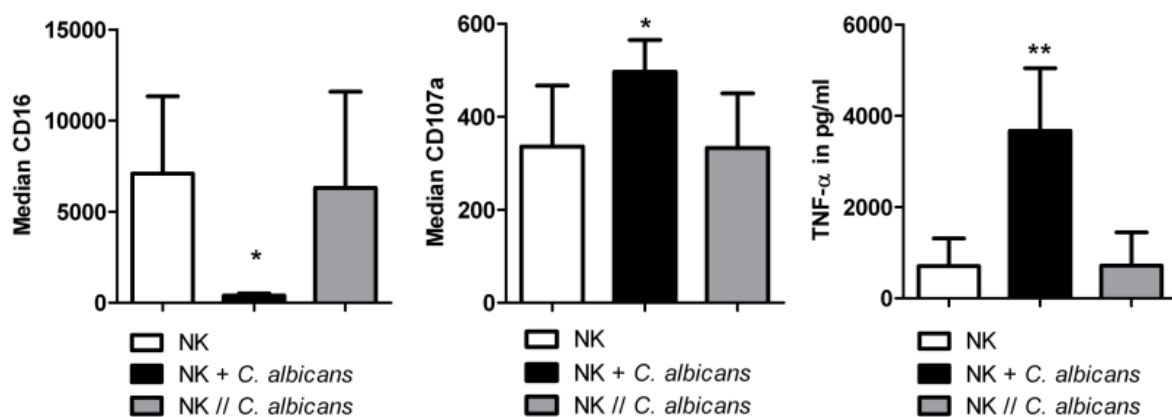


Abbildung 15: Aktivierung von NK-Zellen im Transwellssystem.

Um die Notwendigkeit von direktem Kontakt zu ermitteln, wurden Konfrontationen von NK-Zellen und *C. albicans* im Transwell durchgeführt. Pilzzellen wurden entweder zusammen mit NK-Zellen in einer 24-Well-Platte oder separiert durch einen Membraneinsatz (Corning) mit einem Durchmesser von 6.5 mm und einer Porengröße von 0.4 µm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die Konzentration des Zytokins TNF-α im Überstand ermittelt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **.

Nachdem direkter Kontakt zu einer reduzierten Oberflächenexpression von CD16 und einer verstärkten Oberflächenexpression des Degranulierungsmarkers CD107a sowie der Freisetzung des Zytokins TNF- α führte, resultierte die Separation durch eine durchlässige Membran zu einer Rezeptorexpression und Zytokinsekretion vergleichbar zur uninfizierten Kontrolle. Damit konnte gezeigt werden, dass direkter Kontakt von *C. albicans* und NK-Zellen notwendig ist, um letztere effizient zu aktivieren.

Es wurde bereits gezeigt, dass zur Herstellung eines direkten Kontaktes mit dem Pilz die Ausbildung von Pseudopodien und die Beweglichkeit der Immunzellen essentiell zu sein scheinen. Die Ausbildung von Pseudopodien hängt maßgeblich von der Polymerisierung des Strukturproteins Aktin ab. Um die Bedeutung der Restrukturierung des Zytoskeletts näher charakterisieren zu können, wurde Cytochalasin D eingesetzt, ein Inhibitor der Aktin-Polymerisierung.

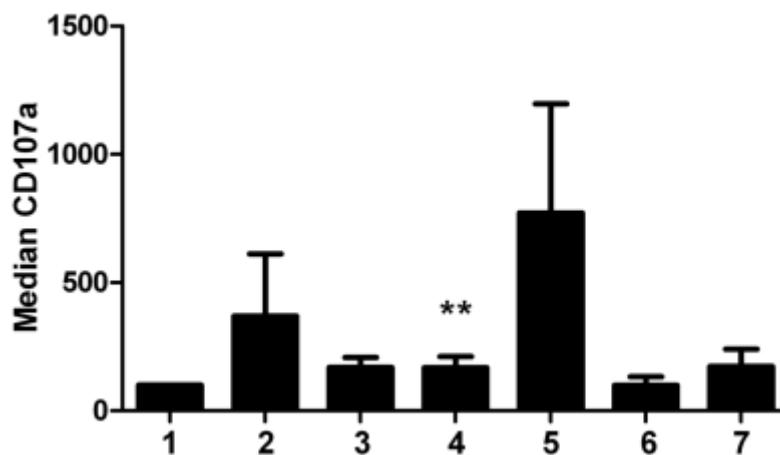


Abbildung 16: CD107a-Präsentation auf NK-Zellen nach Cytochalasin D-Behandlung.

1: NK-Zellen 2: NK-Zellen + *C. albicans* 3: NK-Zellen + Cytochalasin D 4: NK-Zellen + Cytochalasin D + *C. albicans* 5: NK-Zellen + Cytochalasin D + Beads 6: NK-Zellen + Colchicin 7: NK-Zellen + Colchicin + Beads

Im Durchflusszytometer wurde die Oberflächenpräsentation von CD107a auf NK-Zellen allein, nach Konfrontation mit *C. albicans* sowie nach dem Einfluss von Cytochalasin D, Colchicin und Aktivierungsbeads (gerichtet gegen NKp46 und CD2) allein oder in Kombination ermittelt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten des Medians (normalisiert) \pm Standardabweichung von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.01$ **.

Obwohl Cytochalasin D selbst bereits zu einer leicht erhöhten basalen Präsentation CD107a auf der Oberfläche der NK-Zellen führt, konnte gezeigt werden, dass eine beeinträchtigte Reorganisationsfähigkeit des Aktin - Zytoskeletts nach Kontakt mit dem Pilz in signifikant tieferen CD107a-Niveaus resultiert als in unbehandelten NK-Zellen (Abb. 16). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Fähigkeit, Granula auszuschütten, durch die Behandlung nicht beeinträchtigt worden ist, da NKp46-spezifische Aktivierungsbeads zur CD107a Hochregulation führen konnten.

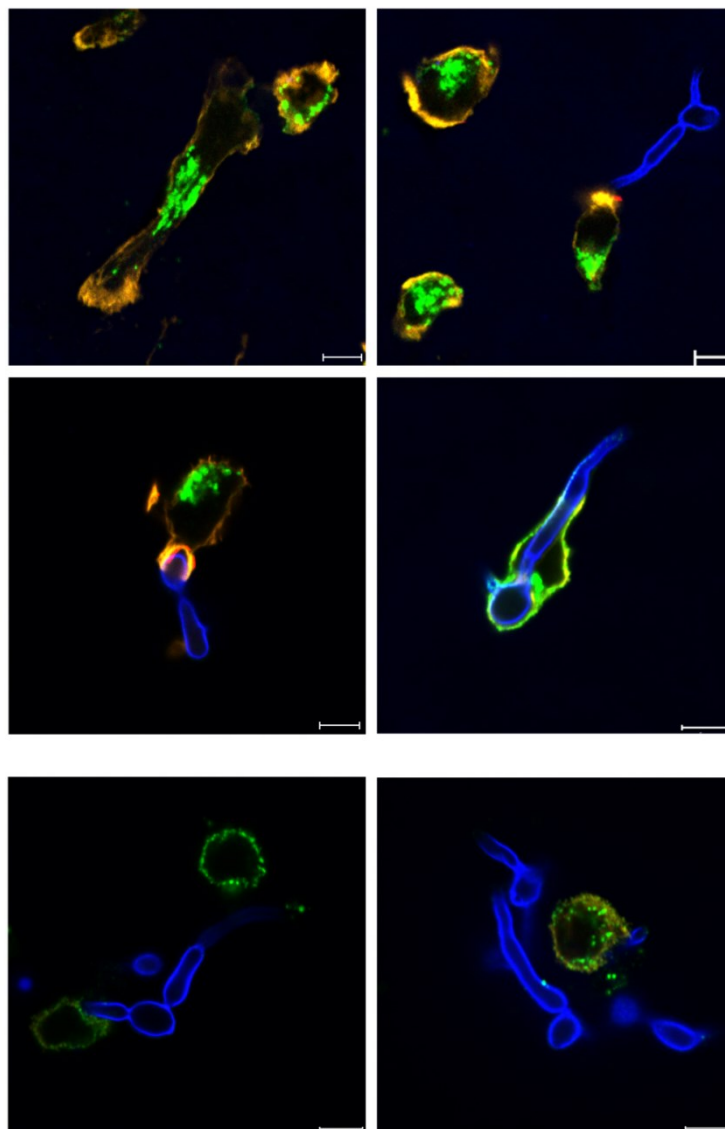


Abbildung 17: Aktin-/ CD107a-Färbung in NK-Zellen nach *Candida*-Kontakt.

Die oberen vier Bilder zeigen Momentaufnahmen der Kontaktaufnahme von NK-Zellen mit *C. albicans*. Die unteren zwei Aufnahmen zeigen eine Koinkubation in Anwesenheit des Inhibitors Cytochalasin D. Aktinfärbung: Phalloidin (rot), CD107a-Färbung (grün); Pilzfärbung: Calcofluor-White (blau); Maßstabsbalken: 5µm.

Wie erwartet konnten nach der Behandlung von NK-Zellen mit Cytochalasin D keine Phagozytose mehr beobachtet werden (Abb. 17).

Dass dieser Mechanismus wiederum Mikrotubulus-abhängig ist, konnte eine Kontrollbehandlung mit Colchicin bestätigen. Der Inhibitor für Mikrotubuli-Polymerisation führte dazu, dass NK-Zellen auch nach Behandlung mit Aktivierungsbeads CD107a nicht mehr hochregulieren konnten (Abb. 16).

3.5 Perforin vermittelt eine Wachstumsinhibierung bei *C. albicans*

Humane NK-Zellen können direkte zytotoxische Effekte gegen Zielzellen vermitteln, indem zytolytische Substanzen oder zytotoxisch wirksame Zytokine freigesetzt werden [89]. Die fungizide Wirkung von NK-Zellen auf Pilze konnte bereits für den pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* gezeigt werden [104, 105]. Es wurden dabei zwei verschiedene Mechanismen beschrieben. Zum einen wird eine fungizide Aktivität durch das Zytokin IFN- γ vermittelt. Eine andere Studie beschreibt einen zytotoxischen Effekt auf den Pilz durch die Freisetzung des porenbildenden Proteins Perforin.

Zunächst wurde der Einfluss von NK-Zellen auf die Filamentierung von *C. albicans* ermittelt, indem die Hyphenverlängerung nach Koinkubation quantifiziert wurde (Abb. 18). Nach einer kurzen Hypheninduktion wurden die Filamente angefärbt und danach für zwei Stunden mit den Zellen koinkubiert. Die Verlängerung des ungefärbten Hyphenabschnitts entspricht dem Wachstum nach Konfrontation mit NK-Zellen. Sowohl für die Kontrolle als auch nach Koinkubation mit NK-Zellen wurde eine vergleichbare Verlängerung der Filamente von 46-48 μm gemessen.

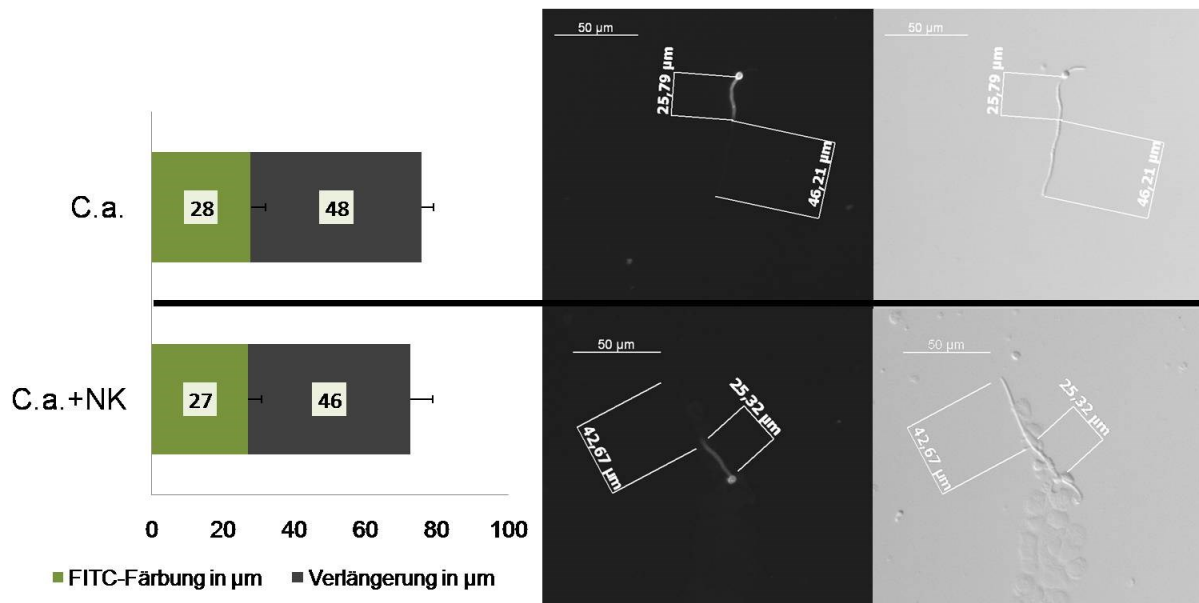


Abbildung 18: Die Filamentierung von *C. albicans*.

Vor Konfrontation mit NK-Zellen wurden kurze Keimschläuche von *C. albicans* mit FITC-Farbstoff gefärbt. Danach wurden die so behandelten Pilzzellen für 2 h mit NK-Zellen inkubiert und die Hyphenverlängerung quantifiziert. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils ca. 50 Pilze ausgemessen.

Nach einer Konfrontation von *C. albicans* und humanen NK-Zellen zeigten Plattierungsassays eine Wachstumsinhibierung des Pilzes von 20% +/- 9 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19, links). Da das Ausplattieren aufgrund der Filamentierung von *C. albicans* während des Experiments an experimentelle Limitierungen gebunden ist, wurde zusätzlich eine Kultur-unabhängige Messung der metabolischen Aktivität mit Hilfe des XTT-Assay durchgeführt. Hier konnte nach einer vierstündigen Koinkubation mit NK-Zellen eine Reduktion der metabolischen Aktivität des Pilzes von 32% +/- 10 verzeichnet werden (Abb. 19, rechts).

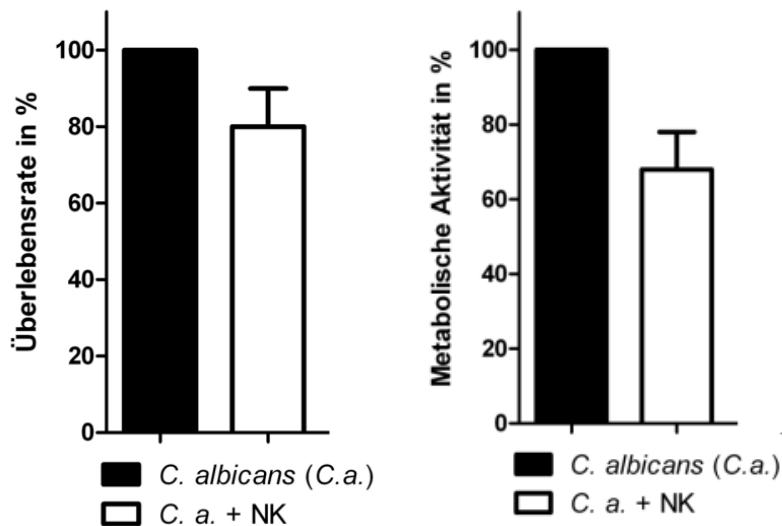


Abbildung 19: Zytotoxische Effekte von NK-Zellen gegenüber *C. albicans*.

Links: Die Überlebensrate des Pilzes wurde bestimmt, indem Verdünnungen des Reaktionsansatzes (4 h, MOI 0.5) sowie die Kontrolle auf Agarplatten ausplattiert wurden. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten.

Rechts: Anhand der Reduzierung des Farbstoffes Formazan konnte die metabolische Aktivität von *C. albicans* im XTT-Assay quantifiziert werden. Dargestellt ist die metabolische Aktivität von *C. albicans* allein und nach Konfrontation mit NK-Zellen für 4 h im Verhältnis 2:1 (Immunzellen:Pilz). Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten.

Zur Analyse des Effektormechanismus wurden die NK-Zellen mit Blockierungsantikörpern behandelt (Abb. 20). Diese Antikörper waren gegen die Todesrezeptorliganden FasL und TRAIL auf den Immunzellen gerichtet, um Rezeptor-induzierte Apoptose ausschließen zu können. Zum Beispiel für Hepatitis-C-infizierte humane Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Mechanismus essentiell für die Induktion von Apoptose durch NK-Zellen ist [140]. Die Inhibierung beider Oberflächenproteine führte zu keinerlei Veränderung im zytotoxischen Potential der NK-Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle, die nicht mit Antikörpern behandelt worden ist. Um einen direkten Effekt der Antikörper auf den Pilz auszuschließen, wurde auch die Pilzkontrolle mit den Antikörpern behandelt.

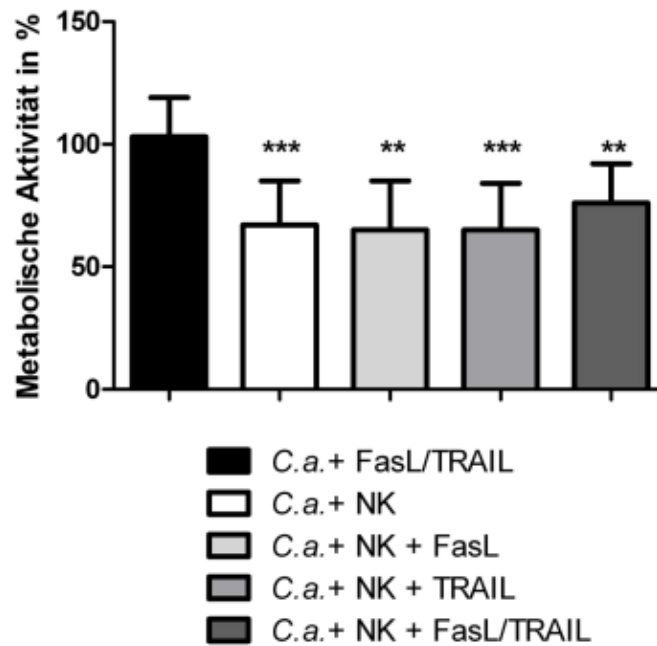


Abbildung 20: Blockierung des Todesrezeptorsignalweges.

Durch den Einsatz von Blockierungsantikörpern gerichtet gegen FasL und TRAIL konnte eine Aktivierung der Todesrezeptorkaskade verhindert werden. Mit Hilfe des XTT-Assay wurde die metabolische Aktivität von *C. albicans* (*C.a.*) nach Konfrontation mit NK-Zellen in Anwesenheit der Blockierungsantikörper bestimmt werden. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von acht unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***.

Der wachstumsinhibierende Effekt auf den Pilz ist damit unabhängig vom FasL- und TRAIL-Signalweg. Um zu testen, ob lösliche Mediatoren diesen Effekt vermitteln, wurde sogenannter konditionierter, zellfreier Überstand einer 4 h Koinkubation von NK-Zellen und *C. albicans* eingesetzt (Abb. 21). Hier konnte gezeigt werden, dass die metabolische Aktivität des Pilzes nach Kontakt mit dem Überstand 20% \pm 10 abgenommen hat. Dieser Effekt konnte deutlich verstärkt werden, indem höhere Konzentration des konditionierten Überstandes eingesetzt wurden.

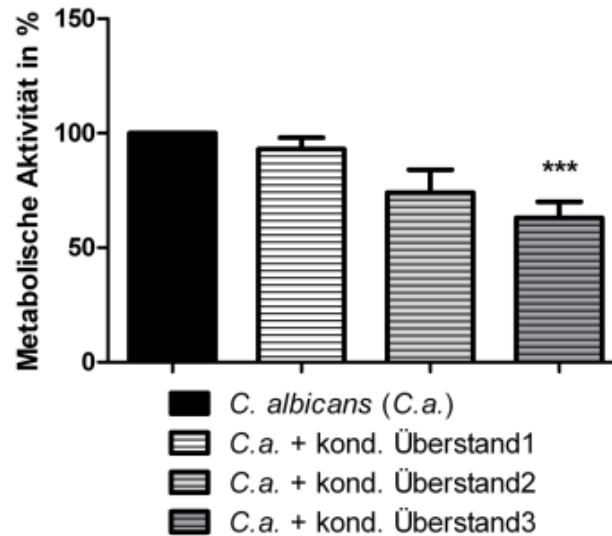


Abbildung 21: Einfluss löslicher NK-Zell-Mediatoren auf *C. albicans*.

Durch eine vierstündige Koinkubation von *C. albicans* und NK-Zellen wurde konditionierter Überstand gewonnen, der lösliche NK-Zell-Mediatoren enthält. Im XTT-Assay konnte der Einfluss dieser löslichen Faktoren auf die metabolische Aktivität des Pilzes in konzentrationsabhängiger Weise dargestellt werden (konditionierter Überstand 1 = einfache Konzentration, konditionierter Überstand 2 = doppelte Konzentration, konditionierter Überstand 3 = dreifache Konzentration). Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.001$ ***.

Um diesen löslichen Mediator identifizieren zu können, wurde der Pilz neben rekombinanten Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α auch aufgereinigtem Perforin und Granzym B sowie beiden letzteren Proteinen in Kombination ausgesetzt (Abb. 22). Während kein Einfluss von rekombinanten Zytokinen (nicht dargestellt) und Granzym B auf den Pilz beobachtet werden konnte, führte Perforin zu einer starken Wachstumsinhibierung. Eine konzentrationsabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität von bis zu 35% \pm 17 bei 500 ng/ml Perforin konnte detektiert werden. Da Perforin das Eindringen von Granzym B in die Zielzelle erleichtert, wurden beide Mediatoren in Kombination eingesetzt [141]. Der Effekt von Perforin konnte in Kombination mit Granzym B nicht signifikant verstärkt werden, sodass Perforin allein für die durch NK-Zellen vermittelten Effekte verantwortlich zu sein scheint.

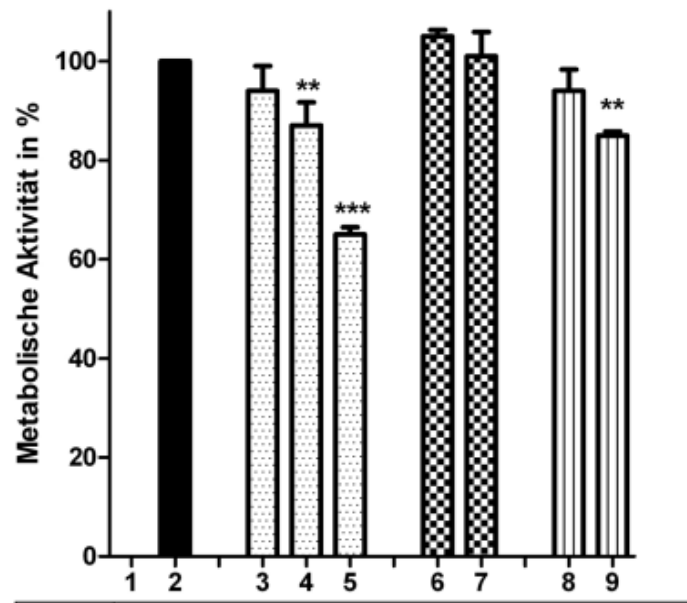


Abbildung 22: Einfluss von Perforin und Granzym B auf *C. albicans*.

1: Medium-Kontrolle 2: *C. albicans* (*C.a.*) 3: *C.a.* + Perforin 100 ng/ml 4: *C.a.* + Perforin 200 ng/ml 5: *C.a.* + Perforin 500 ng/ml 6: *C.a.* + Granzym B 10 ng/ml 7: *C.a.* + Granzym B 100 ng/ml 8: *C.a.* + Perforin 100 ng/ml + Granzym B 10 ng/ml 9: *C.a.* + Perforin 200 ng/ml + Granzym B 100 ng/ml. Nach Inkubation von *C. albicans* mit aufgereinigtem Perforin oder Granzym B oder der Kombination aus beiden konnte mit Hilfe des XTT-Assay die metabolische Aktivität des Pilzes bestimmt werden. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***.

3.6 Eine effiziente Aktivierung von humanen NK-Zellen wird hauptsächlich durch Filamente von *C. albicans* vermittelt, nicht durch die Hefeform

Filamentierung wurde als wichtiger Modulator und Pathogenitätsfaktor in der Interaktion von *C. albicans* und Immunzellen beschrieben [129, 142]. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Hyphenbildung auf die Interaktion der polymorphen Hefe *C. albicans* mit humanen NK-Zellen untersucht werden. Hierfür wurde die *C. albicans* Doppelmutante *efg1Δ/cph1Δ* eingesetzt, welche unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen ausschließlich in der Hefeform vorliegt [15]. Während der Konfrontationsexperimente mit Zytokin-aktivierten NK-Zellen war *C. albicans efg1Δ/cph1Δ* nicht in der Lage zu filamentieren. Nach einer

vierstündigen Koinkubation von NK-Zellen und *C. albicans* *efg1Δ/cph1Δ* war eine reduzierte Aktivierung der Immunzellen zu verzeichnen (Abb. 23).

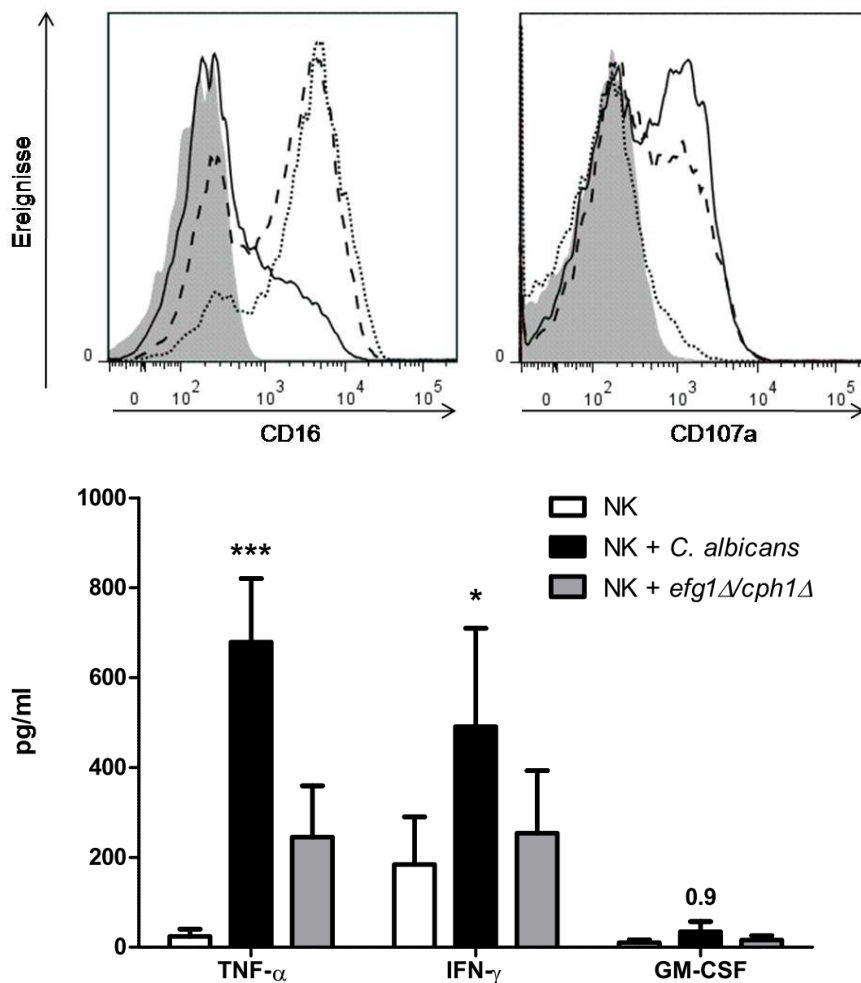


Abbildung 23: Rezeptorregulation auf NK-Zellen sowie Freisetzung von Zytokinen nach Kontakt mit *C. albicans* Wildtypform oder nicht-filamentöser Mutante *efg1Δ/cph1Δ*.

Oben: In den Histogrammen zeigt die gepunktete Linie die basale Expression des dargestellten Markers auf NK-Zellen, während die grau unterlegte Kurve die Isotypkontrolle zeigt. Die durchgezogene Linie zeigt die Rezeptorregulation nach Kontakt mit der *C. albicans* Wildtypform. Die gestrichelte Linie zeigt die Regulation des dargestellten Markers nach Kontakt mit *efg1Δ/cph1Δ*. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiexperiment.

Unten: Während die Wildtypform zu einer starken Sekretion von TNF- α , IFN- γ und GM-CSF bei NK-Zellen führt, wird nach Kontakt mit der nicht filamentösen Mutante *efg1Δ/cph1Δ* deutlich weniger Zytokin freigesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ ***.

Es konnte eine deutlich verringerte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und GM-CSF gemessen werden (Abb. 23, unten). Die für die Wildtypform beschriebene starke Herunterregulation von CD16 und Hochregulation von CD107a nach Kontakt mit Filamenten fand nach Konfrontation mit der Hefeform nur in abgeschwächter Form statt (Abb. 23, oben).

3.7 Die transkriptionelle Dynamik der Aktivierung von NK-Zellen nach Kontakt mit verschiedenen Morphotypen von *C. albicans*

Um die Interaktion von humanen NK-Zellen und *C. albicans* besser verstehen zu können, wurden Array-basierte Analysen des Transkriptoms der Immunzellen nach 1 h, 3 h und 6 h Interaktion durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurde eine unterschiedliche Aktivierung der Immunzellen in Abhängigkeit der Morphologie von *C. albicans* beobachtet. Obwohl das Aktivierungsmuster vergleichbar war, konnten deutlich stärkere Effekte nach Konfrontation mit Filamenten beobachtet werden. Für die Array-basierte Analyse wurden humane NK-Zellen von drei gesunden, freiwilligen Spendern zum einen mit der Wildtypform von *C. albicans* und zum anderen mit der nicht-filamentösen Mutante *efg1 Δ /cph1 Δ* konfrontiert. Nach einstündiger Koinkubation konnten keine veränderten Gentranskriptionsraten im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle festgestellt werden.

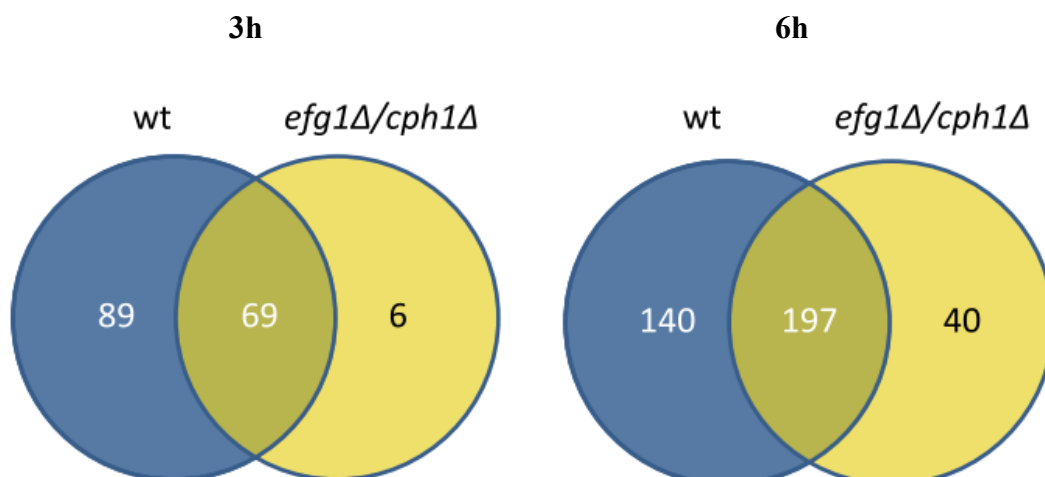


Abbildung 24: Venn-Diagramme differentiell regulierter Gene bei NK-Zellen.

Die Diagramme zeigen Gene, die bei allen drei unabhängigen Spendern mindestens einen Foldchange von größer 2 aufwiesen, wobei $p < 0.05$ betragen musste.

Nach 3 Stunden wurden jedoch bereits 164 Gene in den NK-Zellen aller drei Spender differentiell reguliert (Abb. 24). Davon wurden 89 Gene spezifisch für Filamente, 6 Gene spezifisch für die Hefeform und 69 Gene gemeinsam differentiell reguliert. Die Anzahl differentiell regulierter Gene stieg mit der Zeit an, sodass zum 6-Stunden-Zeitpunkt bereits 352 Gene differentiell reguliert wurden. Wieder konnte eine signifikant schwächere Antwort auf die nicht-filamentöse Mutante beobachtet werden, wobei ein Großteil der Gene für beide Morphologien differentiell reguliert wurde.

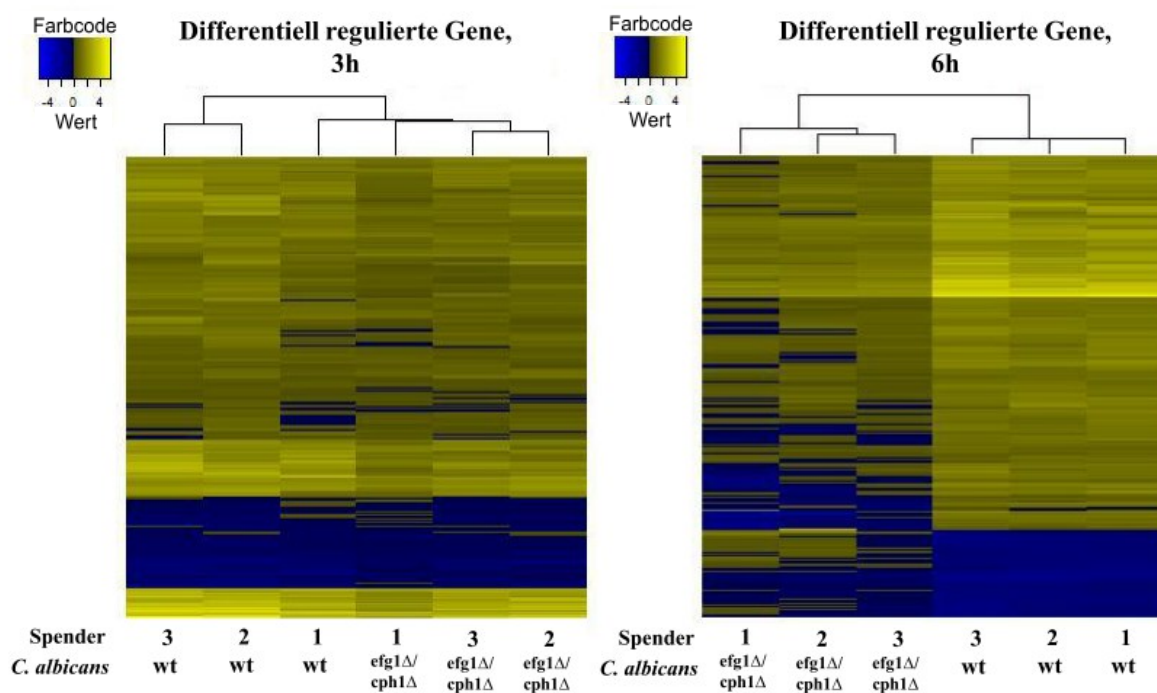


Abbildung 25: Heatmaps differentiell regulierter Gene bei NK-Zellen.

Die Heatmap-Darstellung der differentiell regulierten Gene gibt Aufschluss über das spezifische Regulationsmuster in NK-Zellen nach Kontakt mit *C. albicans*. Die Daten wurden von drei unabhängigen Spendern erhoben. Dargestellt werden Gene, die für alle drei Spender folgende Kriterien erfüllen: Foldchange > 2, $p < 0.05$.

Heatmaps der drei Spender zeigten nach 3 Stunden keine spezifischen Muster, egal ob die NK-Zellen mit der filamentösen oder der nicht-filamentösen Form des Pilzes konfrontiert worden sind (Abb. 25). Nach 6 h jedoch zeigten sich spezifische Aktivierungsmuster. Es ist eine auffallende Gruppierung der Wildtyp-konfrontierten NK-Zellen erkennbar. Dabei zeigt ein Cluster von Genen mit einem Anteil von 20% eine starke Herunterregulation der Transkripte, während die restlichen 80% der Gene gar nicht oder aber hochreguliert wird. Nach Konfrontation mit *C. albicans efg1Δ/cph1Δ* wird ein Teil der bei der Wildtypform herunterregulierten Gene hochreguliert und umgedreht.

3.8 Signalweg-basierte Untersuchungen des NK-Zell-Transkriptoms nach Pilzkontakt unterstreichen die Wichtigkeit von Zytokinen

Nach KEGG- (Kyoto Enzyklopedia of Genes and Genomes) unterstützter Analyse der Array-Daten konnten Gengruppen verifiziert werden, die in wichtige Signalwege eingebunden sind (Tabelle 6). In der Immunantwort auf die Wildtyp-Form des Pilzes konnten Gene, die spezifisch für den MAPK-Signalweg sind, detektiert werden. Gene, die in den NK-Zellen hauptsächlich nach Kontakt mit der nicht-filamentierenden Mutante differentiell reguliert wurden, konnten der Glykolyse/Glukoneogenese zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu konnten für beide Morphotypen differentiell regulierte Gene in 11 definierten KEGG-Signalwegen klassifiziert werden, wovon der überwiegende Teil der Gene für alle drei Spender hochreguliert worden ist. Die größte Gruppe, bestehend aus 14 Genen, stellte dabei die Klasse der Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen dar, womit die Rolle von humanen NK-Zellen als Immunmodulatoren unterstrichen werden konnte. Eine Vielzahl weiterer Gene konnte dem Energiemetabolismus und verschiedenen Signal-Kaskade-Wegen, wie MAPK und Jak-STAT, zugeschrieben werden. Die Hochregulation der typischen NK-Zell-Gene wie CSF2, TNF, IFNG, FASLG und NFATC1 bestätigen die spezifische Aktivierung der Immunzellen. Veröffentlichungen belegen weiterhin, dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges und die Freisetzung von Zytokinen durch die Induktion aktivierender Oberflächenrezeptoren vermittelt wird [143, 144].

Tabelle 6: KEGG-Analyse der differentiell regulierten Gene.

Gruppe	Anzahl	p-Wert	Gene
hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	14	6,64E-07	CSF2, IL3, TNF, IL8, IL21R, FASLG, TNFSF14, KIT , CCL14, CCL3L1, IFNG, VEGFA, XCL1, LTA
hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	6	2,47E-04	GPI, PGAM4, ALDOC, HK2, ENO2, HK1
hsa00051:Fructose and mannose metabolism	5	2,85E-04	PFKFB4, PFKFB3, ALDOC, HK2, HK1
hsa04940:Type I diabetes mellitus	4	0,007415997	TNF, IFNG, FASLG, LTA
hsa04640:Hematopoietic cell lineage	5	0,009058309	CSF2, IL3, TNF, ITGA5, KIT
hsa04010:MAPK signaling pathway	8	0,013137762	FOS, DUSP2, TNF, GADD45G, FASLG, GADD45A, MYC, CDC25B
hsa04630:Jak-STAT signaling pathway	6	0,015972585	CSF2, IL3, SPRY1, IFNG, IL21R, MYC
hsa04660:T cell receptor signaling pathway	5	0,019596581	CSF2, FOS, TNF, IFNG, NFATC1
hsa05200:Pathways in cancer	8	0,036040869	FOS, PTGS2, IL8, VEGFA, SLC2A1, FASLG, KIT , MYC
hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	5	0,038271845	CSF2, TNF, IFNG, FASLG, NFATC1
hsa05330:Allograft rejection	3	0,046553207	TNF, IFNG, FASLG

Nach KEGG-Einteilung der differentiell regulierten Gene konnte die transkriptionelle Antwort von NK-Zellen auf *C. albicans* bestimmten Gruppen zugeordnet werden. rot: herunterreguliert; grün: hochreguliert. Die Daten wurden von drei unabhängigen NK-Zell-Spendern erhoben. Dargestellt sind Gene, die für alle drei Spender folgende Kriterien erfüllen: Foldchange > 2, p < 0.05.

3.9 Die Dynamik selektierter NK-Zell-Gene in der Gruppe Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion

Da bereits im Zellüberstand von Koinfektionsexperimenten von humanen NK-Zellen und *C. albicans* wichtige Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden konnten, wurde die Regulation der entsprechenden Gene auch auf transkriptioneller Ebene überprüft. Es konnte eine starke Hochregulation der den Zytokinen GM-CSF (CSF2), TNF- α , IFN- γ sowie der den Chemokinen MIP-1 α and MIP-1 β entsprechenden Gene bestätigt werden (Abb. 26). Zusätzlich konnte noch eine starke Hochregulation von Lymphotoctin, IL-8 und Adrenomedulin beobachtet werden. IL-8 und Lymphotoctin konnten auch im Überstand nachgewiesen werden, wobei Adrenomedulin auch nach 6 h Koinkubation von NK-Zellen und *C. albicans* nicht im Überstand messbar war. Für alle differentiell regulierten Zytokine und Chemokine konnte eine schwächere oder aber verzögerte Antwort nach Kontakt mit der nicht-filamentierenden *C. albicans* Mutante beobachtet werden.

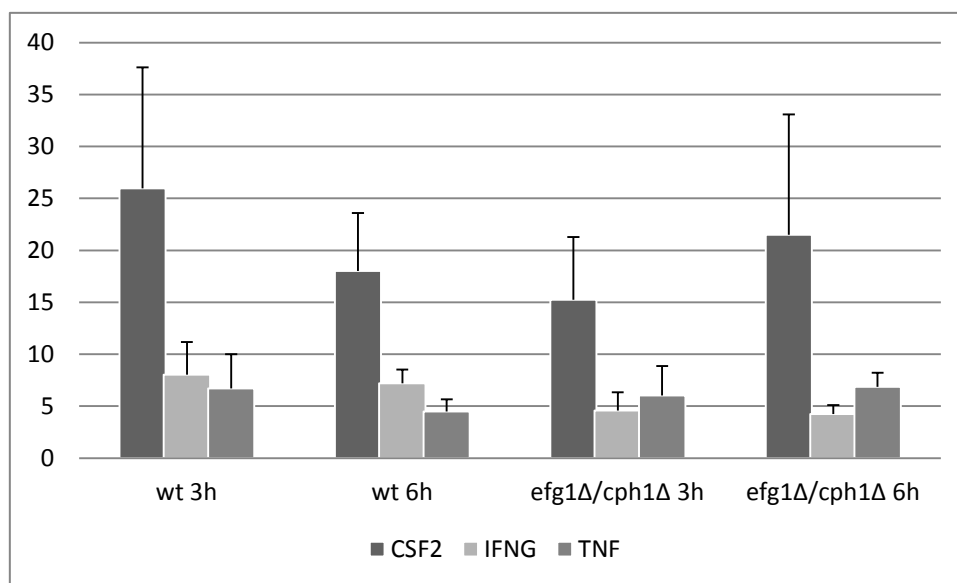


Abbildung 26: Transkriptionelle Regulation ausgewählter NK-Zell-Gene als Antwort auf verschiedene *C. albicans* Morphotypen.

Dargestellt sind die Gene der wichtigen pro-inflammatorischen Zytokine GM-CSF (CSF2), IFN- γ (IFNG) und TNF- α (TNF). Die Daten wurden von drei unabhängigen NK-Zell-Spendern erhoben. Dargestellt werden Gene, die für alle drei Spender folgende Kriterien erfüllen: Foldchange > 2, $p < 0.05$.

Auch der Aktivierungsmarker CD69 wird bereits 3 h nach Kontakt mit *C. albicans* Hyphen stark hochreguliert, während die nicht-filamentöse Mutante eine deutlich schwächere Antwort hervorgerufen hat (Abb. 27).

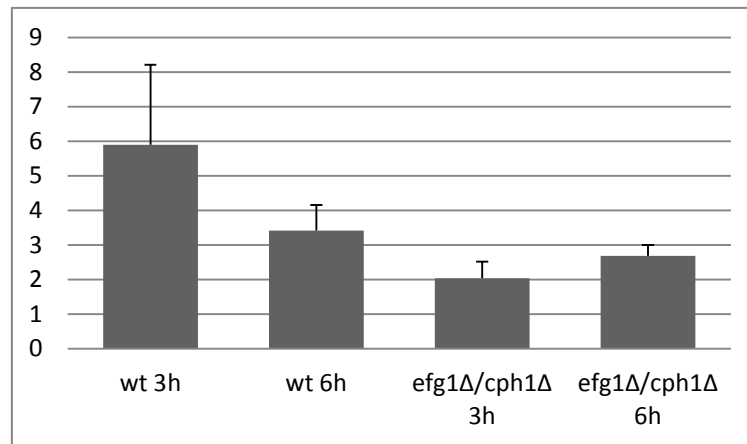


Abbildung 27: Transkriptionelle Regulation des Aktivierungsmarkers CD69.

Der Aktivierungsmarker CD69 wurde auch auf transkriptionelle Ebene hochreguliert. Die Daten wurden von drei unabhängigen NK-Zell-Spendern erhoben. Die Regulation des CD69-Gens erfüllte in allen drei Spendern folgende Kriterien: Foldchange > 2, $p < 0.05$.

3.10 Das wechselseitige Zusammenspiel von humanen Neutrophilen und humanen NK-Zellen in der Immunabwehr von *C. albicans*

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle in der Immunantwort gegen *C. albicans*. Die Gruppe um Costatini konnte bereits wechselseitige Modulationen zwischen humanen NK-Zellen und Neutrophilen beobachten [145]. Sie konnten zeigen, dass eine Interaktion von humanen Neutrophilen mit den zytotoxischen Immunzellen zu einer Modulation der Aktivierungsmarker und zu einem verbesserten Überleben der Granulozyten führt [146]. Diese Effekte konnten zum einen auf direkte Zell-Zell-Interaktionen und zum anderen auf durch NK-Zellen sekretiertes GM-CSF zurückgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Koinkubationsexperimente von NK-Zellen und *C. albicans* für vier Stunden in der Gegenwart von Neutrophilen durchgeführt, um danach die Freisetzung von Zytokinen zu messen.

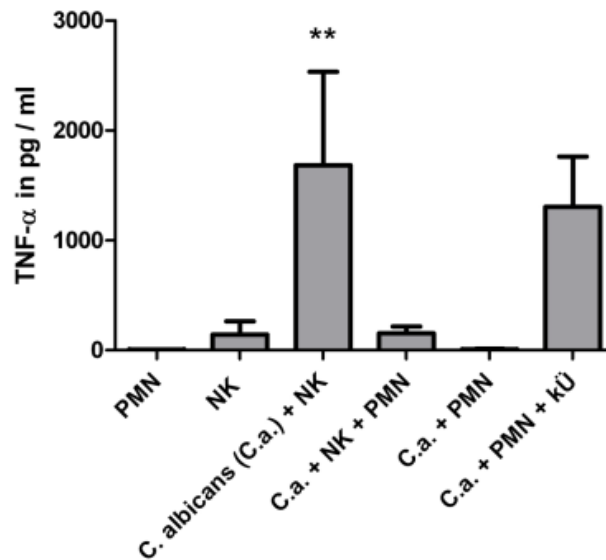


Abbildung 28: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Abhängigkeit von Neutrophilen (PMN).

Die Sekretion von TNF- α durch NK-Zellen wurde nach Koinkubation mit *C. albicans* allein sowie in Anwesenheit von Neutrophilen mittels Bioplex ermittelt. Weiterhin wurde die Konzentration von TNF- α in einer Koinkubation von *C. albicans* und Neutrophilen in Anwesenheit von konditioniertem Überstand (zellfreier Überstand einer vierstündigen Inkubation von *C. albicans* und NK-Zellen; kÜ) bestimmt. Zur Kontrolle wurde die basale Sekretion von NK-Zellen und Neutrophilen ermittelt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *.

Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung der NK-Zell-spezifischen Zytokine GM-CSF und IFN- γ nicht signifikant verändert worden ist (nicht dargestellt), wohingegen die Sekretion von TNF- α in der Gegenwart von Neutrophilen komplett zurückgegangen ist (Abb. 28).

Durch Gresnigt und Kollegen konnte ein ähnlicher modulatorischer Effekt von neutrophilen Granulozyten auf periphere mononukleäre Blutzellen beschrieben werden. Dieser Effekt wurde in der erwähnten Arbeit durch eine von Neutrophilen freigesetzte Protease vermittelt [147].

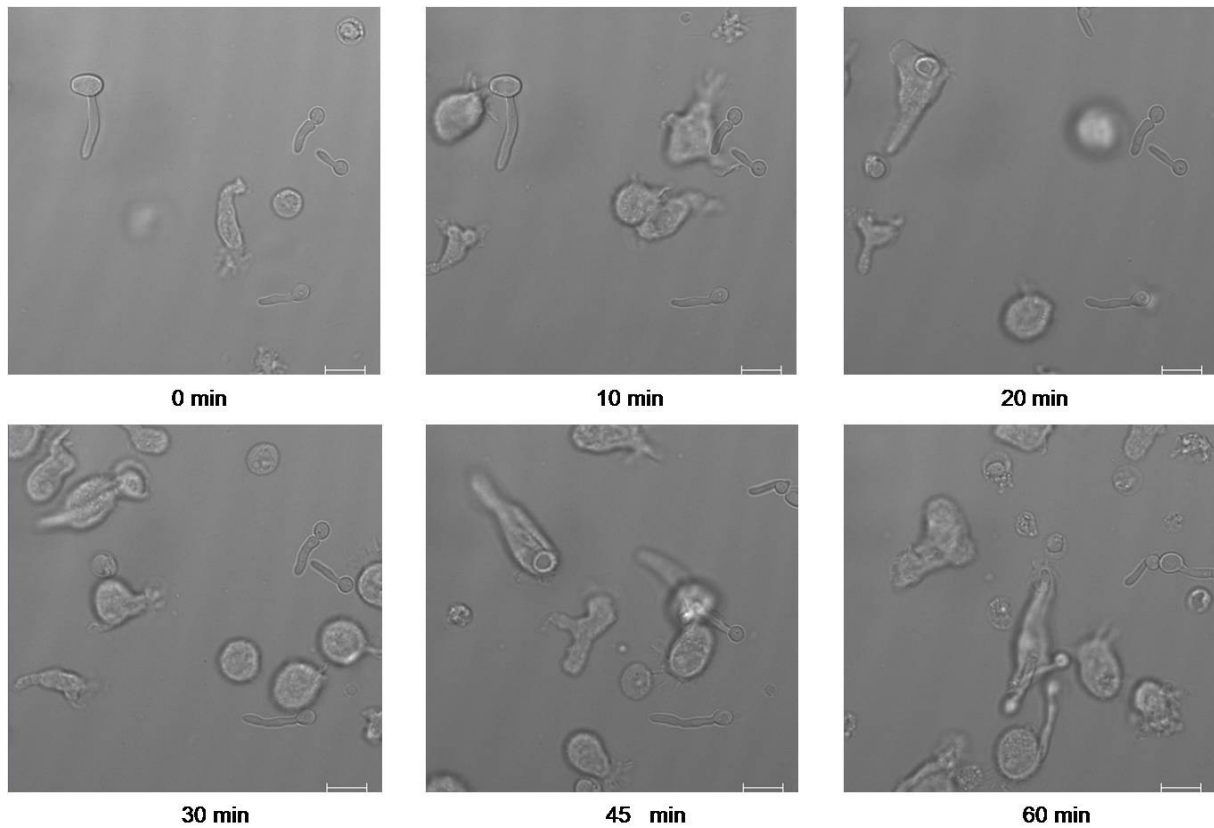


Abbildung 29: Lebendzellanalyse einer Konfrontation von NK-Zellen und *C. albicans*.

Dargestellt sind Bildausschnitte einer Videoanalyse der Interaktion. NK-Zellen zeigten innerhalb von 30 min Koinkubation eine Phagozytose des Pilzes. Dabei löst sich der Pilz von der Oberfläche des Reaktionsgefäßes, wird aber in seiner Filamentierung nicht beeinflusst. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die freigesetzte TNF- α Konzentration in einer Koinkubation von *C. albicans*, Neutrophilen und konditioniertem Überstand (resultierend aus einer 4-Stunden-Koinkubation von NK-Zellen und dem Pilz) nicht zurück ging, sodass ein Protease-abhängiger Mechanismus ausgeschlossen werden konnte. In Anlehnung an die Kinetik der Erkennung von *C. albicans* durch Neutrophile und NK-Zellen konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass eine rasche Phagozytose des Pilzes durch die Granulozyten eine physische Interaktion von NK-Zellen und dem Pilz verhindert. In der Tat konnten Lebendzellanalysen zeigen, dass eine Koinkubation von beiden Immunzelltypen und *C. albicans* zu einer raschen Aufnahme des Pilzes durch Granulozyten führte, wodurch physische Interaktion von Pathogen und NK-Zellen verhindert wurde,

während die Koinkubation von NK-Zellen und *C. albicans* in Abwesenheit von Neutrophilen, wie bereits gezeigt, zu einer Aufnahme des Pilzes führten (Abb. 29 und Abb. 30).

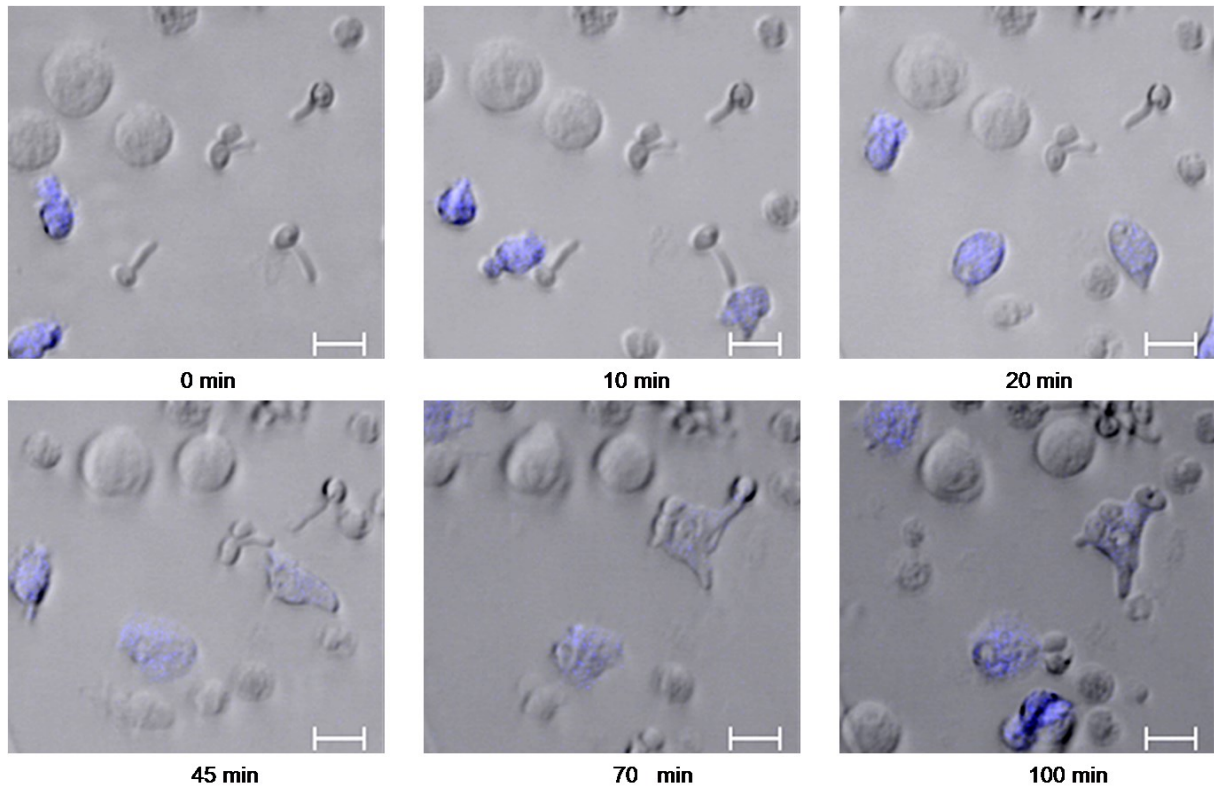


Abbildung 30: Konfrontation von NK-Zellen und *C. albicans* in der Gegenwart von Neutrophilen.

Dargestellt sind Bildausschnitte einer Videoanalyse der Interaktion. Lebendzellaufnahmen einer Konfrontation von NK-Zellen und *C. albicans* in der Gegenwart von BCECF-gefärbten Neutrophilen (blau) zeigten eine rasche Phagozytose des Pilzes durch Neutrophile, während NK-Zellen eine stark verminderte anti-*Candida*-Reaktivität zeigten. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Weitere Analysen zeigten, dass die rasche *Candida*-Aufnahme durch Neutrophile die Degranulierung von NK-Zellen und damit die erhöhte Präsentation von CD107a auf deren Oberfläche verhinderte (Abb. 31). Parallel dazu konnte auf Neutrophilen eine vermehrte Präsentation des typischen Aktivierungsmarkers CD66b gemessen werden, sowohl in der Gegenwart von Pilz, als auch vermittelt durch freigesetzte lösliche Mediatoren der NK-Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten in Interaktion mit *C. albicans* in der Gegenwart von NK-Zellen verstärkt aktiviert werden.

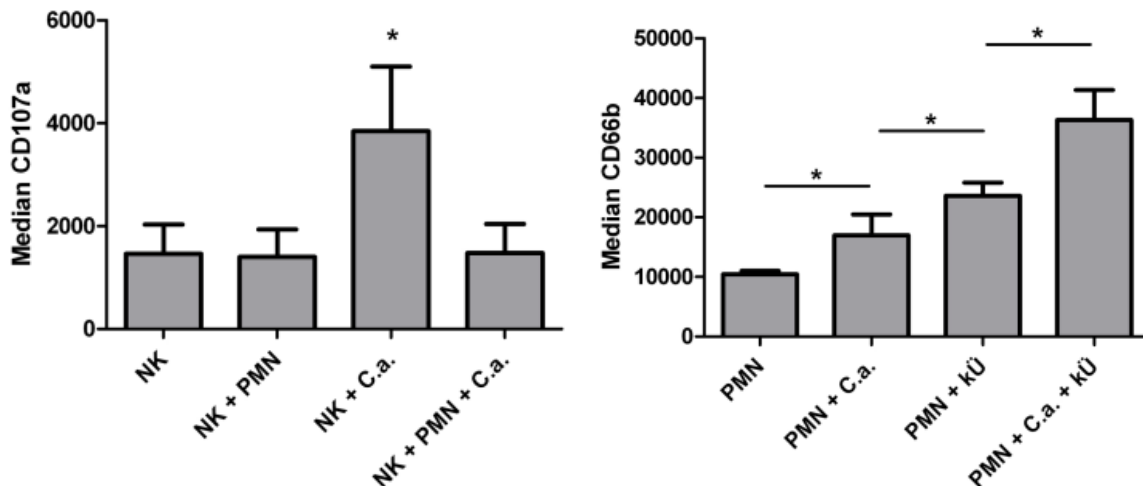


Abbildung 31: Bestimmung der CD107a-Präsentation auf NK-Zellen und CD66b-Präsentation auf Neutrophilen.

Links: NK-Zellen regulieren CD107a als Antwort auf den Pilz *C. albicans* (*C.a.*) hoch. Sind Neutrophile (PMN) in der Koinkubation anwesend, so wird die Oberflächenpräsentation von CD107a nicht mehr erhöht. Rechts: Der Aktivierungsmarker CD66b wird auf Neutrophilen (PMN) als Antwort auf den Pilz verstärkt an der Oberfläche präsentiert. Dieser Effekt kann durch den Einsatz von konditioniertem Medium von NK-Zellen (kÜ) signifikant verstärkt werden. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *.

Um die verminderte Assoziation von NK-Zellen und die verstärkte Aktivierung von Neutrophilen in diesen Koinkubationen quantifizieren zu können, wurde ein GFP-exprimierender *C. albicans* Stamm eingesetzt. Nun konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Phagozytose und nach einer Färbung mit einem spezifischen anti-*Candida* Antikörper bloße Assoziation verifiziert werden (Abb. 32). 26% \pm 8 der NK-Zellen assoziierten innerhalb der ersten 2 Stunden mit dem Pathogen. Davon hatten ungefähr 8 \pm 0.5% den Pilz komplett internalisiert. Diese starke Interaktion von Pilz und NK-Zellen konnte in Anwesenheit von Neutrophilen komplett unterbunden werden. Auf der anderen Seite zeigten Neutrophile eine starke Assoziationsrate von 37% \pm 2 und Phagozytoserate von 28% \pm 1.5 von *C. albicans* innerhalb von 3 h. Diese Raten konnten wiederum in der Gegenwart von NK-Zellen auf 52% \pm 2 Assoziationsrate und 41% \pm 7 Phagozytoserate erhöht werden.

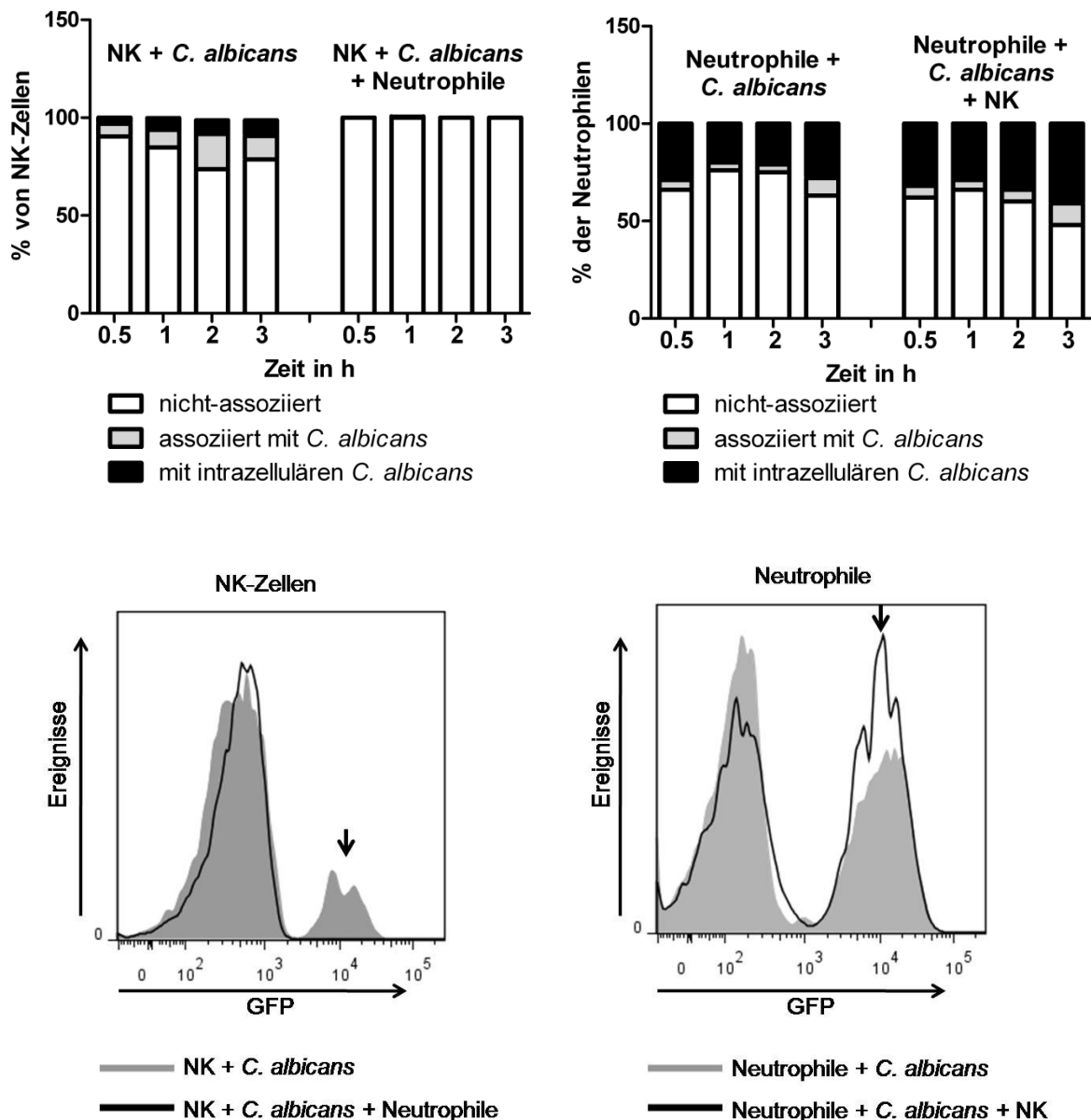


Abbildung 32: Phagozytoserate von NK-Zellen und Neutrophilen.

Oben links: Im Durchflusszytometer wurde die Assoziationsrate und Phagozytoserate von NK-Zellen mit *C. albicans* mit und ohne Einfluss von Neutrophilen unter zu Hilfenahme eines GFP-exprimierenden Stammes bestimmt.

Oben rechts: Im Durchflusszytometer wurde die Assoziationsrate und Phagozytoserate von Neutrophilen mit *C. albicans* mit und ohne Einfluss von NK-Zellen bestimmt.

Unten: Im Histogramm wurden NK-Zellen (links) und Neutrophile (rechts) auf den GFP-positiven Anteil zum 3 h Zeitpunkt aufgetragen. Die mit dem Pfeil markierte Population entspricht den Zellen, die mit dem Pilz assoziiert waren. Die Daten entsprechen einem Beispiel auf drei unabhängigen Experimenten mit identischem Ergebnis.

3.11 NK-Zellen beeinflussen den Krankheitsverlauf einer invasiven Candidose in Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine potentiell ambivalente Rolle von humanen NK-Zellen in der Immunantwort gegen *C. albicans*-Infektionen. Während sie durch die Rekrutierung anderer Immunzellen und direkte antifungale Effekte zur protektiven Immunität beitragen könnten, könnte die starke Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine in Kombination mit ineffektiver Beseitigung des Pathogens das Gegenteil bewirken oder sogar den Wirtsorganismus schädigen. Um den Einfluss von NK-Zellen auf die Immunantwort nach *C. albicans*-Infektionen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein murines *Candida*-Infektionsmodell genutzt. Zur Depletion wurde der Antikörper NK1.1 verwendet [132]. Der Verlauf einer systemischen Candidose in einer NK-Zell-depletierten Gruppe wurde dann mit einer immunokompetenten Kontrollgruppe verglichen. Zunächst konnten Blutproben eine erfolgreiche Depletion nach Behandlung mit dem NK1.1-Depletionsantikörper beziehungsweise physiologische NK-Zellzahlen in der Isotypkontrollgruppe bestätigen. Beide Gruppen wurden anschließend durch intravenöse Injektion mit einer lethalen Dosis von 2.5×10^4 *C. albicans* pro Gramm Körpergewicht infiziert. Während die Kontrollgruppe innerhalb der folgenden 7 Tage hohe Sterblichkeit zeigte, konnte bei den NK-Zell-depletierten Mäusen ein signifikant verlängertes Überleben beobachtet werden (Abb. 33).

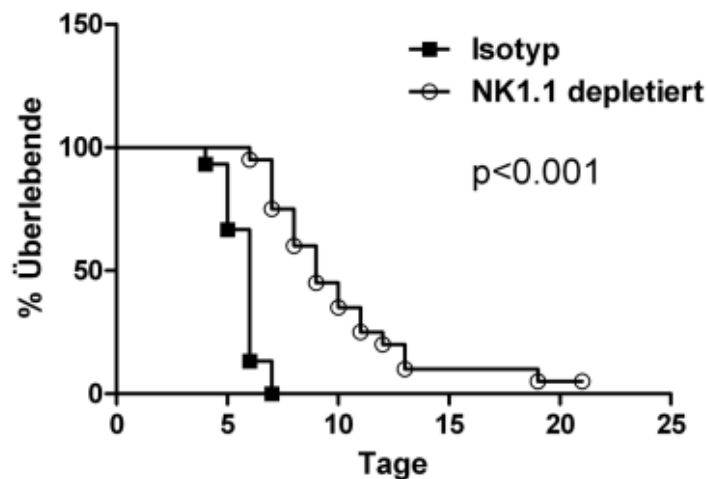


Abbildung 33: Überlebenskurve von NK1.1-depletierten und Isotyp-behandelten Mäusen nach *C. albicans*-Infektion.

Eine Gruppe von mindestens 15 Mäusen wurde mit dem Depletionsantikörper NK1.1 behandelt, während eine Kontrollgruppe mit der korrespondierenden Antikörperkontrolle behandelt wurde. Nach intravenöser Infektion beider Gruppen mit *C. albicans* wurden die Überlebensdaten mit Hilfe der Kaplan und Meier-Methode aufgetragen.

Die Anfälligkeit der Kontrollgruppe für den Erreger konnte auch anhand weiterer klinischer Merkmale zu früheren Zeitpunkten gezeigt werden: Fünf Tage nach Infektion hatte die Kontrollgruppe bereits mehr als 20% Körpergewicht verloren, während die NK-Zell-depletierte Gruppe eine Reduktion von circa 16% Körpergewicht aufwies (Abb. 34).

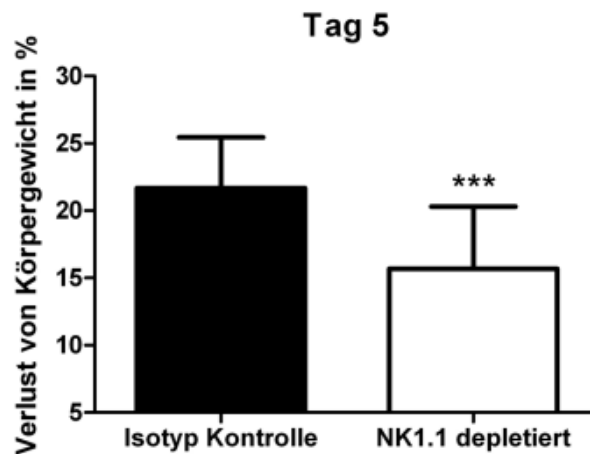


Abbildung 34: Gewichtsverlust nach *C. albicans* Infektion.

Das Körpergewicht NK1.1-behandelter und Isotyp-behandelter Mäuse wurde ab dem Tag der Infektion jeden Tag mindestens zweimal bestimmt. Dargestellt ist der Verlust des Körpergewichts beider Gruppen an Tag 5, wobei das Körpergewicht am Tag der Infektion (Tag 0) auf 100% gesetzt wurde. Jede Gruppe bestand aus mindestens 15 Tieren und die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.001$ ***.

Des Weiteren konnten unspezifische Begleiterscheinungen, wie ungepflegtes Fell, Fieber, sowie Lethargie, in der Kontrollgruppe bereits zu früheren Zeitpunkten, als in den NK-Zell-depletierten Mäusen beobachtet werden. Mit Hilfe eines Bewertungs-Systems konnte so dem Zustand einer Maus eine Zahl zugeordnet werden (Abb. 35). Je höher der Wert, umso schlechter wurde der Zustand des Tieres anhand der gesetzten Kriterien bewertet.

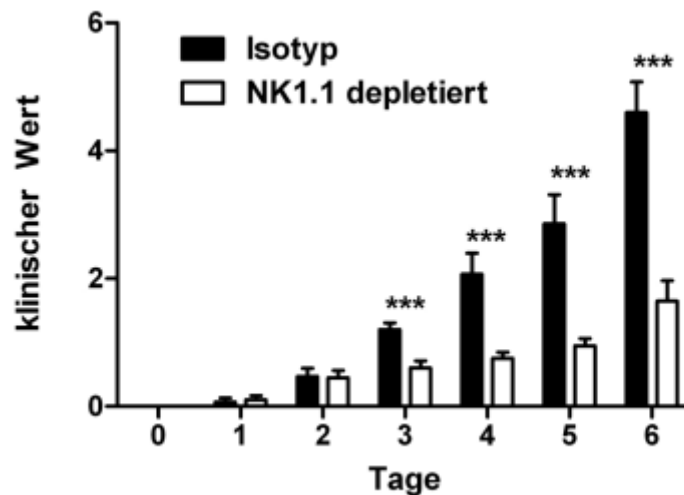


Abbildung 35: Klinischer Score von NK1.1-depletierten und Isotyp-behandelten Mäusen nach *C. albicans*-Infektion.

Ein klinischer Wert konnte durch die Summe von drei individuellen Parametern für beide Gruppen gebildet werden: Fell (normal: 0; zerzaust: 1), Körpergewichtsverlust ($\leq 10\%$: 0; $10\% - 24.9\%$: 1; $\geq 25\%$: 2) und Verhalten (normal: 0; reduzierte spontane Aktivität: 1; reduzierte Antwort auf externe Stimuli: 2; Lethargie und Isolierung aus der Gruppe: 3). Entsprechend wurden gesunde Tiere mit 0 bewertet und der höchstmöglich erreichbare Wert lag bei 6. Jede Gruppe bestand aus mindestens 15 Tieren. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.001$ ***.

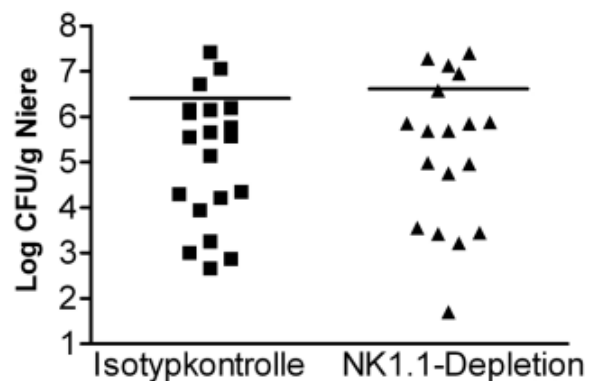


Abbildung 36: Pilzbefall in den Nieren.

Nachdem die Tiere euthanisiert wurden, konnten die Organe aseptisch entnommen, gewogen und homogenisiert werden. Nach dem Ausplattieren von seriellen Verdünnungen konnte der Pilzbefall in den Nieren beider Gruppen bestimmt werden.

Am Ende des Experiments wurden Einzelzellsuspensionen von Blut, Milz und Niere mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und ausplattiert, um die Pilzlast zu bestimmen. In den NK1.1-Depletionsantikörper behandelten Mäusen konnten auch am Ende des Experiments weder im Blut noch in den Organen NK-Zellen detektiert werden. Weiterhin zeigten beide Gruppen einen vergleichbaren Pilzbefall der untersuchten Organe (Abb. 36). Auch die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen wiesen, abgesehen von den NK-Zellzahlen, keine Unterschiede auf. Interessanterweise konnten signifikant niedrigere Konzentrationen wichtiger pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine im Blut der NK-depletierten Mäuse festgestellt werden (Abb. 37).

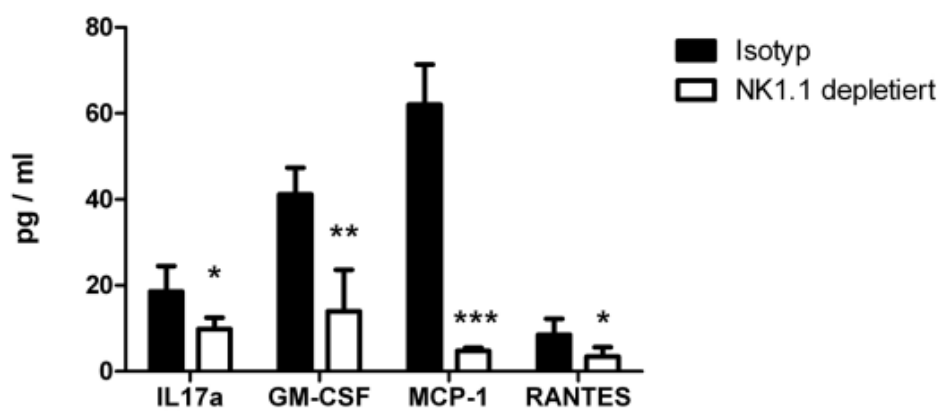


Abbildung 37: Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Blut von NK1.1-depletierten und Isotyp-behandelten Mäusen nach *C. albicans*-Infektion.

Am Tag des Todes wurde durch Herzpunktion das Blut der Tiere gewonnen. Nach Zentrifugation konnten die Zytokinkonzentrationen im zellfreien Plasma mit Hilfe von Bioplex bestimmt werden. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von 5 Mäusen je Gruppe. Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

Dies könnte ein wichtiger Hinweis auf die Rolle von NK-Zellen als frühe Produzenten entzündungsfördernder Zytokine und Chemokine darstellen.

In Zusammenarbeit mit der AG von Mihai Netea und Jessica Quintin wurde weiterhin der Einfluss von NK-Zellen in einem immunsupprimierten Wirt untersucht. Hierfür wurden zum einen T- und B-Zell-defiziente Mäuse (SCID) und zum anderen T-, B- und NK-Zell-defiziente Mäuse (NSG) mit *C. albicans* infiziert. Zur Kontrolle wurden Wildtyp-Mäuse (WT) eingesetzt. Die Anfälligkeit für die Infektion nahm in SCID-Mäusen im Vergleich zu

WT-Mäusen erheblich zu, was in einem signifikant verkürzten Überleben im Vergleich zu WT-Mäusen resultierte (Abb. 38). Die erhöhte Mortalitätsrate wurde durch das zusätzliche Fehlen von NK-Zellen sogar noch erhöht. Weiterhin konnte in NSG-Mäusen eine stark erhöhte Pilzlast in der Niere im Vergleich zu SCID- oder WT-Mäusen beobachtet werden. Während NK-Zellen im immunkompetenten Wirtstier eine scheinbar redundante Rolle spielen, so übernehmen sie eine wichtige Funktion in der Abwehr von *C. albicans* im immunsupprimierten Organismus.

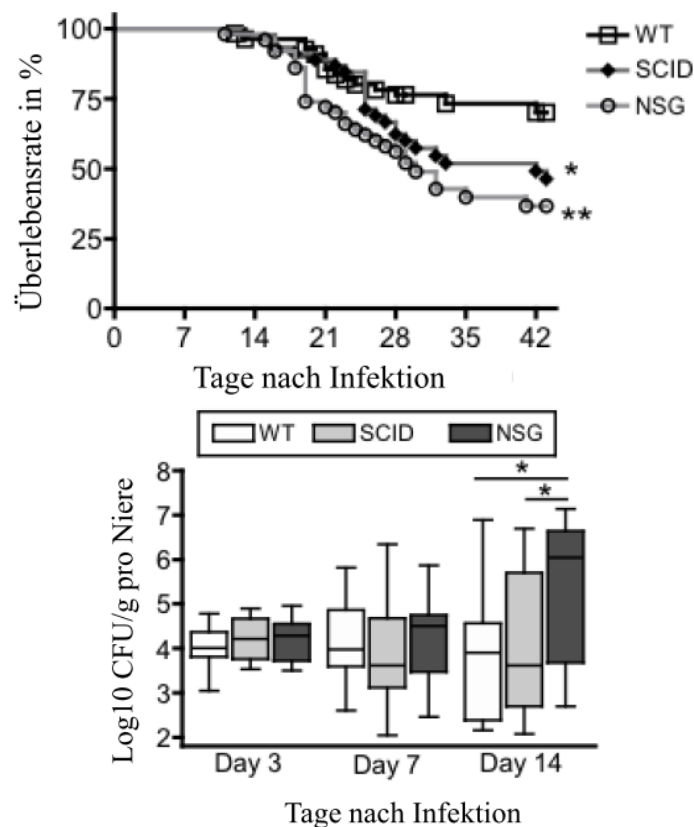


Abbildung 38: Infektion von T- und B-Zell-defizienten Mäusen (SCID) und T-, B- und NK-Zell defizienten Mäusen (NSG) mit *C. albicans*.

Oben: Nach intravenöser Infektion mit *C. albicans* wurden die Überlebensdaten von Wildtyp-Mäusen (WT) sowie SCID- und NSG-Mäusen aufgetragen.

Unten: Die Pilzlast in der Niere nach Infektion von Wildtyp-Mäusen (WT) sowie SCID und NSG-Mäusen an Tag 3, 7 und 14 nach intravenöser Infektion mit *C. albicans*.

Jede Gruppe bestand aus mindestens 15 Tieren und die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung. Signifikanz im Vergleich zur WT-Gruppe: $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

4 Diskussion

NK-Zellen repräsentieren mit 5-10% der Lymphozyten eine wichtige Population zytotoxischer Immunzellen des angeborenen Immunsystems. Zu ihren zentralen Aufgaben gehört die Initiierung einer zytotoxischen Antwort gegen tumoröse oder Virus-infizierte Zellen [148-150]. Daneben können NK-Zellen eine entscheidende Rolle in der Bekämpfung weiterer Infektionen spielen [151]. In den letzten Jahren gaben zahlreiche Studien Aufschluss über die Funktion von NK-Zellen in bakteriellen Infektionen (Staphylokokken und Laktobazillen) und Infektionen mit Trypanosomen [152, 153]. Im Gegensatz dazu ist die Rolle von NK-Zellen bei Pilzinfektionen nur unzulänglich erforscht. Bisher wurde gezeigt, dass die Immunzellen des angeborenen Immunsystems direkte zytotoxische Effekte gegen Pilzerreger, wie die Hefe *C. neoformans* und den Schimmelpilz *A. fumigatus*, vermitteln können [104, 105, 107, 108, 154]. In Bezug auf die Interaktion von humanen NK-Zellen mit der pathogenen Hefe *C. albicans* existieren bisher nur sehr wenige Daten. Da Pilzinfektionen hauptsächlich in Patienten mit Immunschwäche oder aber nach Stammzelltransplantationen auftreten, könnte eine antifungale Aktivität von NK-Zellen jedoch von besonderer klinischer Relevanz sein [155]. Adoptiver NK-Zell-Transfer wird bereits zur Behandlung von Brustkarzinomen oder von hämatologischen Erkrankungen eingesetzt [95, 156]. NK-Zellen werden im Gegensatz zu T-Zellen meist vom Empfänger toleriert und verhindern zum Teil eine Graft-versus-Host-Reaktion, welche durch die Verabreichung von T-Zellen für gewöhnlich forciert wird [157]. Während neutrophile Granulozyten als Hauptmediatoren in Pilzinfektionen identifiziert wurden, konnte abgesehen von einzelnen Publikationen, die einen klinischen Nutzen suggerierten, gezeigt werden, dass Granulozyten-Transfers keine geeignete Methode zur Behandlung darstellen [158, 159]. Entsprechend steigt das Interesse an alternativen Therapien oder optimierten Strategien zur Immunaktivierung. In diesem Kontext stellen NK-Zellen ein wichtiges Werkzeug in der Immuntherapie dar.

4.1 Die Interaktion von Zytokin-aktivierten NK-Zellen und *C. albicans* führt zur Phagozytose des Pilzes

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle humaner NK-Zellen in *C. albicans*-Infektionen untersucht. Dafür wurden NK-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Freiwilliger isoliert und *in vitro* aktiviert und kultiviert. Vergleichsweise ähnlich werden in gegenwärtigen

klinischen Ansätzen IL-2 aktivierte NK-Zellen zu therapeutischen Zwecken eingesetzt und darauf aufbauend neue Expansionsprotokolle für die zytotoxischen Immunzellen entwickelt [160-162]. Im Gegensatz zu frisch isolierten NK-Zellen, zeigen diese Zellen eine niedrigere Aktivierungsschwelle und gesteigertes zytotoxisches Potential und eignen sich somit sehr gut für den Einsatz als therapeutisches Werkzeug bei Erkrankungen [137]. Darüber hinaus konnte in eigenen Experimenten gezeigt werden, dass primäre NK-Zellen qualitativ ähnliche Reaktionsmuster nach Kontakt mit *C. albicans* aufweisen. In systemischen Pilzinfektionen ist von einer Aktivierung der NK-Zellen vergleichbar zur Voraktivierung *in vitro* auszugehen, da Mediatoren wie Interferone von anderen Immunzellen nach Konfrontation mit *C. neoformans* oder *C. albicans* freigesetzt werden [163, 164]. Aus diesem Grund ist die Arbeit mit voraktivierten NK-Zellen von klinischer Relevanz.

Mittels Live-cell imaging konnte gezeigt werden, dass aktivierte NK-Zellen stark mit dem Pilz *C. albicans* in Interaktion treten. Bereits in früheren Studien wurde ein direkter Kontakt und Bindung zwischen NK-Zellen und *C. albicans* beschrieben [114]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bindung der NK-Zellen an filamentöse Formen von *C. albicans* zu einer kompletten Internalisierung von *C. albicans* während der ersten 30 Minuten führen kann. Die vollständige Internalisierung wurde durch eine differentielle Färbung nachgewiesen. Damit wurde zum ersten Mal Phagozytose für NK-Zellen, die aus humanem Vollblut isoliert wurden, beschrieben. In einer Studie, die die Interaktion zwischen einer NK-Zelllinie und dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* beschreibt, wird von einer Phagozytose des Pathogens durch die Zellen gesprochen, wobei diese Interaktion in der Apoptose der NK-Zelllinie resultierte [165]. Im Gegensatz zu dieser Zelllinie wurden in dieser Arbeit stimulierte, humane NK-Zellen eingesetzt. Phagozytose von *C. albicans* konnte außerdem für frisch isolierte, primäre NK-Zellen beobachtet werden. Voraussetzung für das Umfließen des Pilzes mit anschließender Internalisierung war die Ausbildung von Pseudopodien. Eine Blockierung der Aktin-Polymerisierung durch Cytochalasin D verhinderte die Phagozytose des Pilzes. Dabei konnten die Cytochalasin D behandelten NK-Zellen weiterhin über klassische Aktivierungsrezeptoren wie NKp46 aktiviert werden. Damit wurde gezeigt, dass die Aktivierung von NK-Zellen nach Kontakt mit *C. albicans* vergleichbar ist mit der Aktivierung von NK-Zellen nach Ausbildung einer immunologischen Synapse mit einer Zielzelle. Während das Ausschleusen von lytischen Granula aus der Zelle von der Mikrotubuli-Polymerisierung abhängig ist, ist die einleitende Ausbildung einer NK-Zell-Synapse Aktin-vermittelt [166, 167].

Neben der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Bedeutung von humanen NK-Zellen als Phagozyten spiegeln diese Daten eine potentielle Bedeutung von NK-Zellen in *C. albicans*-Infektionen wider, indem die Immunzellen aktiv mit dem Pilz in Interaktion treten.

4.2 Das Aktivierungsmuster von NK-Zellen nach Konfrontation mit *C. albicans*

Durchflusszytometrische Messungen haben gezeigt, dass die direkte Interaktion von *C. albicans* mit den unprofessionellen Phagozyten zu einer starken Aktivierung der NK-Zellen führte. Das Aktivierungsmuster wurde unter anderem durch die verstärkte Oberflächenpräsentation des Degranulierungsmarkers CD107a sowie CD69 und die Herunterregulation z.B. des Fc γ -Rezeptors CD16 charakterisiert. Dabei stieg die Expression von CD107a auf der Oberfläche der NK-Zelle um 102% an, wobei CD16 um 93% herunterreguliert wurde. CD107a (LAMP-1), ist ein lysosomal assoziiertes Membranprotein, dass die innere Membran der intrazellulären Granula auskleidet [168]. Nach Aktivierung können NK-Zellen die in den Granula enthaltenen zytotoxischen Substanzen freisetzen, wobei die Verschmelzung der Granula an der Zellmembran zu einer Präsentation von CD107a an der Zelloberfläche der Zellen führt. Entsprechend wurde CD107a als sensibler Aktivierungsmarker für NK-Zellen definiert [169]. Weiterhin wurde für den Fc γ -Rezeptor CD16 eine Aktivierungs-induzierte Herunterregulation beschrieben [170]. Ebenfalls zu den Aktivierungsmarkern gehört das C-Typ-Lektin CD69. Dieser Rezeptor wird sowohl auf der Oberfläche von NK-Zellen, als auch auf anderen Lymphozyten wie T-Zellen präsentiert [171, 172]. Für NK-Zellen wurde die Hochregulation dieses Rezeptors nach Kontakt mit IL-2 und IFN- α beschrieben [173, 174]. Nach Kontakt mit *C. albicans* konnte eine Steigerung der Oberflächenpräsentation von CD69 auf NK-Zellen um 41% beobachtet werden. Damit zeigen die Immunzellen ein für humane NK-Zellen typisches, Pathogen-unspezifisches Aktivierungsmuster.

Die Inhibierung der Aktinreorganisation mit Cytochalasin D verhinderte eine Aktivierung von NK-Zellen durch *C. albicans*. Darüber hinaus ist direkter Kontakt zwischen *C. albicans* und NK-Zellen für die Aktivierung der Immunzellen notwendig. Nach Unterbrechung des physischen Kontaktes zwischen Pilz und Immunzelle konnte z.B. keine verstärkte Oberflächenpräsentation von CD107a beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Einklang zu einer Studie, die die Interaktion von humanen NK-Zellen und *A. fumigatus*

beschreibt [105]. Während direkter Kontakt mit dem Pilz die Immunzellen aktivierte und eine Wachstumsinhibierung von *A. fumigatus* vermittelt wurde, konnte dieser Effekt ohne physischen Kontakt nicht mehr beobachtet werden [105].

4.3 *C. albicans* Filamente sind essentiell für eine effiziente Aktivierung von NK-Zellen

Der Wechsel von der Hefeform zur filamentösen Form, wie Keimschläuche, Pseudohyphen oder Hyphen ist mit Invasivität von *C. albicans* assoziiert [175]. Obwohl sowohl die Hefe- als auch die Hyphenform im Verlauf einer Gewebeinvasion durch *C. albicans* gefunden werden können, konnten Studien belegen, dass die Verlängerung der Filamente zur Zerstörung von Gewebe beitragen kann [176, 177]. Um den Einfluss von Filamenten auf die Aktivierung von NK-Zellen zu analysieren, wurde die *efg1Δ/cph1Δ* Mutante eingesetzt [178]. Diese Mutante ist unter den meisten experimentellen Bedingungen nicht in der Lage, filamentöse Formen auszubilden und weist eine, gegenüber dem Wildtyp, deutlich reduzierte Virulenz auf [178]. Mit Hilfe dieser nicht-filamentierenden Mutante konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Hyphen für eine effiziente Aktivierung von NK-Zellen essentiell ist. Obwohl ein qualitativ vergleichbares Aktivierungsmuster, dass in einer verstärkten Expression von CD107a und Freisetzung von TNF- α , GM-CSF und IFN- γ , resultierte, war das Aktivierungspotential der nicht-filamentösen Mutante deutlich schwächer. Auch Array-basierte Untersuchungen von NK-Zellen nach *Candida*-Kontakt konnten eine abgeschwächte oder verspätete Antwort auf die Hefeform des Pilzes bestätigen. Die Ausbildung von Filamenten wurde bereits in der Literatur als essentiell in der effizienten Aktivierung von Immunzellen beschrieben. So kann eine starke Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ausschließlich nach Kontakt mit Keimschläuchen von *C. albicans* stattfinden [129]. Auch für dendritische Zellen wurde demonstriert, dass die Konidien des Pilzes eine deutlich geringere Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α induzieren [142]. Während jedoch die Hyphenform von *C. albicans* die Ausbildung einer Th1-Antwort durch dendritische Zellen inhibiert, so führt die Inkubation mit der Hefeform zur Freisetzung von IL-12 durch die Antigen-präsentierenden Zellen, und damit zur Ausbildung von T-Zellen des Helfertyps 1 [179]. Weitere Studien haben gezeigt, dass NK-Zellen ausschließlich das Wachstum von Keimschläuchen von *A. fumigatus* inhibieren können und entsprechend allein diese Morphologieform zu einer starken Freisetzung von Perforin und Zytokinen führen konnte

[104, 105]. In der Interaktion mit *C. albicans* binden humane NK-Zellen bevorzugt an Keimschläuche im Vergleich zur Hefeform [114].

4.4 Perforin führt zur Inhibierung der metabolischen Aktivität von *C. albicans*

Die Freisetzung der zytolytischen Substanzen Perforin und Granzym B stellt einen wichtigen Effektormechanismus von NK-Zellen dar und sprechen für eine Aktivierung der Zellen [89]. Das porenbildende Protein Perforin gehört zu dem bedeutendsten, direkten Effektormolekül von NK-Zellen. Die Zellen sind dadurch in der Lage, Zielzellen direkt zu eliminieren. Besonders in der Kontrolle von Krebserkrankungen scheint dieses Protein eine Rolle zu spielen [180, 181]. Die Sekretion des porenbildenden Proteins konnte auch mit der Abwehr von Pilzinfektionen in Zusammenhang gebracht werden. Nach Interaktion mit dem Pathogen *C. neoformans* konnte Perforin, freigesetzt durch humane IL-2 aktivierte NK-Zellen, zu einer direkten Wachstumsinhibierung führen [107, 108]. Auch für den Schimmelpilz *A. fumigatus* konnte ein direkter Effekt von Perforin, vermittelt durch IL-2 aktivierte NK-Zellen beschrieben werden. Eine sechsstündige Koinkubation von humanen NK-Zellen mit der Hyphenform reduziert dabei die metabolische Aktivität des Pilzes um bis zu 30% [104]. In einer früheren Studie, die direkten Kontakt und Bindung zwischen NK-Zellen und *C. albicans* beschreibt, wurde keine Wachstumsinhibierung des Pilzes beobachtet [114]. Im Gegensatz dazu belegen anderen Arbeiten eine Wachstumsinhibierung von *C. albicans* durch murine, IL-2 aktivierte NK-Zellen [117, 182, 183]. Die vorliegenden Daten zeigen deutlich, dass die Inhibierung der metabolischen Aktivität von *C. albicans* um bis zu 32% durch Perforin vermittelt wird. Im Gegensatz dazu konnten eine Rezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose und direkte Effekte von Zytokinen ausgeschlossen werden. Das Eindringen von Granzym B in die Zielzelle wird durch die von Perforin generierten Poren erleichtert [141]. Die Perforin vermittelte antifungale Aktivität konnte in Kombination mit Granzym B jedoch nicht potenziert werden, wie es in einer Studie für die Induktion von Apoptose durch bakterielle Toxine auf Jurkat-Zellen beschrieben wurde [184]. Der Prozess der Porenbildung in infizierten humanen Zellen ist bereits gut dokumentiert [185]. Das 67 Kilodalton große Multidomainprotein vermittelt über eine C-terminale C2-Domäne eine Kalzium-abhängige Bindung an die Membran und ist so in der Lage eine Pore zu bilden und damit das Eindringen von Granzym B in der Zielzelle zu vermitteln, wodurch Apoptose ausgelöst wird [185, 186].

Welche Vorgänge in der Perforin-vermittelten direkten antimikrobiellen Aktivität durch NK-Zellen von Bedeutung sind, konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Durch Vermessung der Hyphenlängen konnte keine NK-Zell vermittelte Inhibierung der Filamentierung des Pilzes beobachtet werden. Lebendzellanalysen zeigten zusätzlich, dass *C. albicans* in der Lage ist, durch fortschreitende Hyphenprolongation die Zellmembran der zytokinaktivierten NK-Zellen zu penetrieren. Dieser Vorgang konnte bereits in der Interaktion von *C. albicans* mit dendritischen Zellen beschrieben werden [142]. Hier führte die Koinkubation von lebenden Blastozoonidien zur Phagozytose und nach fortschreitender Filamentierung zur Penetration der dendritischen Zellen innerhalb von 2 h.

4.5 Zytokine spielen eine dominierende Rolle in der Interaktion von NK-Zellen mit *C. albicans*

In vivo, aber auch *in vitro* Studien haben einen protektiven Effekt einer Th1- Immunantwort in systemischen *C. albicans*-Infektionen herausgehoben [187, 188]. Die charakteristischen pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α scheinen hier eine besondere Rolle zu spielen. In dieser Arbeit wurden nach Konfrontation von NK-Zellen mit *C. albicans* hohe Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ sowie GM-CSF im Überstand detektiert. Auch auf transkriptioneller Ebene zeigte sich eine deutliche Hochregulation von IFN- γ , GM-CSF und TNF- α . Diese Zytokine sind zum Beispiel mit einer verstärkten antifungalen Aktivität von Phagozyten sowie einer geringeren Pilzlast in invasiven *A. fumigatus*-Infektionen assoziiert [189-191]. Für IFN- γ wurde weiterhin ein direkter Effekt in der Inhibierung von *A. fumigatus* beschrieben [105]. Eine verstärkte Freisetzung von IFN- γ konnte aber auch in Infektionen mit *C. albicans* nachgewiesen werden [192, 193]. Dieses Zytokin hat im Rahmen einer *Candida*-Infektion eine zytoprotektive Wirkung für endotheliale Zellen [194]. Darüber hinaus aktiviert IFN- γ die Phagozytose und im Weiteren die Beseitigung von *C. albicans* durch Makrophagen [120]. Ebenso hat der Granulozyten- und Makrophagen- stimulierenden Faktor GM-CSF eine protektive Funktion in *Candida*-Infektionen, indem das Zytokin neutrophile Granulozyten effizient aktiviert [195]. TNF- α verstärkt die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate und erhöht damit die antifungale Aktivität von neutrophilen Granulozyten [121, 122].

Neben Zytokinen konnten weiterhin hohe Konzentrationen wichtiger Chemokine wie MIP-1 und RANTES im Überstand von Koinkubationsexperimenten detektiert werden. Die

Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen generiert ein pro-inflammatorisches Milieu, das zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen wie NK-Zellen, Neutrophile und dendritische Zellen zum Entzündungsherd und zur Aktivierung dieser Zellen beiträgt [196].

4.6 NK-Zellen in der Allianz mit neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind von zentraler Bedeutung für die Immunantwort während invasiver *C. albicans*-Infektionen. Obwohl Neutrophile mit einer Lebensspanne von 8-24 h zu den kurzlebigen Zellen des Immunsystems zählen, kann ihr Überleben durch den Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IFN γ und GM-CSF, aber auch durch Faktoren bakteriellen Ursprungs, wie LPS und CpG DNA, signifikant verlängert werden [197]. Es ist bekannt, dass NK-Zellen durch frühe Zytokinproduktion eine Kommunikation mit anderen Immunzellen vermitteln. Damit agieren NK-Zellen als wichtiger Schalter in einer Immunantwort. Das Überleben von neutrophilen Granulozyten wird durch NK-Zell vermittelte Sekretion von IFN- γ , TNF- α und GM-CSF maßgeblich verlängert [146]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Aktivierungsmarker wie CD64 und CD11b auf den Neutrophilen hochreguliert werden [146]. Dies geschah sowohl als Antwort auf lösliche Faktoren, freigesetzt durch NK-Zellen, als auch nach direktem Zell-Zell-Kontakt [146]. Im Zusammenspiel mit Makrophagen konnte eine reziproke Regulierung beobachtet werden. NK-Zellen können zum einen durch Interaktion mit Makrophagen aktiviert werden und zum anderen können stark aktivierte Makrophagen durch NK-Zellen eliminiert werden [198, 199]. Auch die Kommunikation mit dendritischen Zellen ist beschrieben worden. Es wurde eine Helferaktivität von NK-Zellen, zur Ausbildung Th1-fördernder dendritischer Zellen beobachtet [200].

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Interaktion von NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten untersucht. In Koinkubationsexperimenten beider Immunzelltypen mit *C. albicans* konnte beobachtet werden, dass neutrophile Granulozyten die Degranulierung von NK-Zellen und deren Sekretion von TNF- α blockieren. Dabei handelte es sich um einen spezifischen Effekt, da die Sekretion anderer Zytokine, wie IFN- γ , dabei nicht beeinflusst wurde. Die Studie von Gresnigt et al. beschreibt die reduzierte Sekretion von TNF- α und IL-1 β durch periphere mononukleäre Blutzellen nach Konfrontation mit Neutrophilen [147]. Die Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 blieb dabei unverändert. Dieser Effekt konnte auf eine von Neutrophilen freigesetzte Protease zurückgeführt werden, welche zur aktiven Degradierung der Zytokine führte. Für die vorliegenden Daten kann ein solcher Effekt

ausgeschlossen werden, da die Zugabe von konditioniertem Medium, das bereits durch NK-Zellen sekretiertes TNF- α enthielt, nicht zum Abbau dieses Zytokins durch *C. albicans* aktivierte Neutrophile führte. Lebendzell-Analysen sprechen für eine beschleunigte Aufnahme des Pilzes durch Neutrophile, wobei eine effiziente Aktivierung der NK-Zellen verhindert wird. Neben der inhibierenden Wirkung von Neutrophilen auf NK-Zellen konnte eine Aktivierung der Granulozyten beobachtet werden. Durchflusszytometrische Analysen zeigten zum einen eine verstärkte Oberflächenpräsentation des Aktivierungsmarkers CD66b auf Neutrophilen. Weiterhin wurde im Zusammenspiel mit NK-Zellen eine verstärkte Assoziation von Neutrophilen und *C. albicans* sowie eine um 13% gesteigerte Phagozyoserate beobachtet. Bhatnagar et al. konnte zeigen, dass Zytokin-aktivierte NK-Zellen die Funktion von Neutrophilen durch die Freisetzung von Zytokinen aktivieren und vor Apoptose schützen können [201]. Andere Publikationen beschreiben zusätzlich einen Einfluss von aktivierten NK-Zellen auf den oxidativen Burst und das Überleben von Neutrophilen [145, 146]. Die gesteigerte Aktivität der neutrophilen Granulozyten führte in dieser Arbeit neben der Modulation der pro-inflammatorischen Antwort von NK-Zellen weiterhin zu einer veränderten Assoziationsrate von NK-Zellen und *C. albicans*. Während 26% der NK-Zellen mit *C. albicans* innerhalb von 2 h in Interaktion treten, konnten im Netzwerk mit neutrophilen Granulozyten keinerlei Interaktionen von NK-Zellen mit dem Pilz mehr detektiert werden.

Diese Arbeit unterstreicht das immunmodulatorische Potenzial von NK-Zellen und gibt erste Hinweise auf die wechselseitige Interaktion mit neutrophilen Granulozyten, sodass ihr Einfluss im Immunnetzwerk während *C. albicans* Infektion näher untersucht werden sollte (Abb. 39).

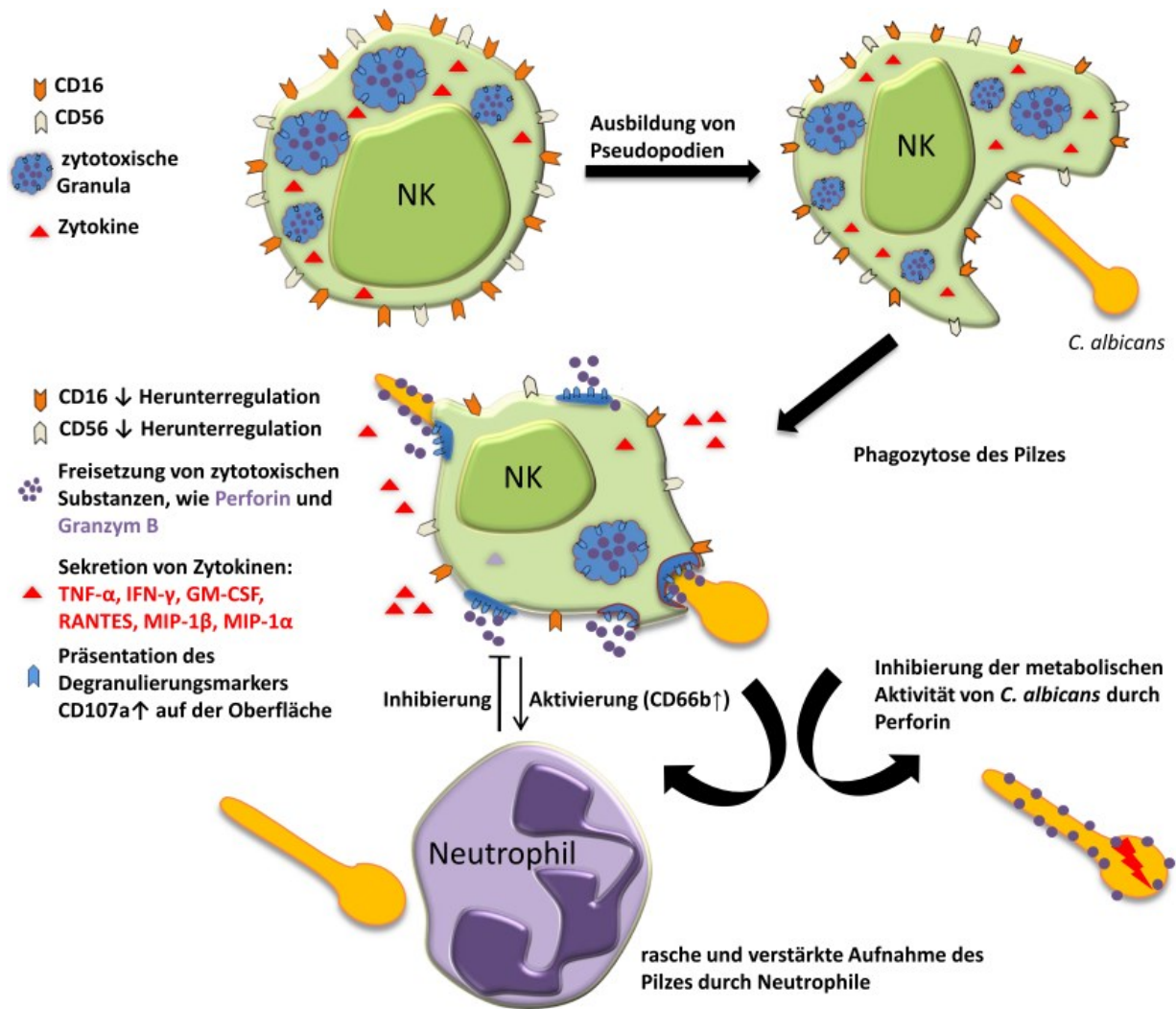


Abbildung 39: Dynamik der Interaktion von NK-Zellen, *C. albicans* und Neutrophilen.

NK-Zellen zeigen eine starke Oberflächenpräsentation von CD16 und CD56. Nach Konfrontation mit dem Pilz bilden diese Immunzellen Aktin-vermittelte Pseudopodien aus und sind so in der Lage den Pilz zu phagozytieren. Nach direkter Interaktion mit *C. albicans* werden die Rezeptoren CD16 und CD56 herunterreguliert und Zytokine freigesetzt. Die Freisetzung von Perforin und Granzym B aus den Granula geht mit der Oberflächenpräsentation von CD107a einher. Das freigesetzte Perforin führt zur Inhibition der metabolischen Aktivität des Pilzes. Während die Freisetzung von Granula von direktem Kontakt mit *C. albicans* abhängt, wirkt Perforin unabhängig von einer physischen Interaktion von NK-Zellen und Pilz. Bei einer Konfrontation von NK-Zellen und Neutrophilen gegen *C. albicans* kommt es zu einer Inhibition der NK-Zellen und damit zu einer verminderten Sekretion von TNF- α sowie Inhibition der Degranulierung. Durch die rasche Aufnahme von Pilzen durch Neutrophile wird eine Interaktion von NK-Zellen und *C. albicans* inhibiert. Lösliche Mediatoren verstärken die anti-*Candida*-Aktivität von Neutrophilen in Gegenwart von NK-Zellen.

Die Funktion von NK-Zellen im Verlauf einer *C. albicans* Infektion konnte durch die bisherigen Daten nicht eindeutig geklärt werden. Während zum einen die direkte Phagozytose zu einer metabolischen Inhibierung von *C. albicans* führt, kann dennoch nicht von einer effizienten Abtötung gesprochen werden. Die durch NK-Zellen freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine aktivieren neutrophile Granulozyten und könnten zur Rekrutierung weiterer Immunzellen führen und damit zur Beseitigung des Pathogens beitragen. Auf der anderen Seite könnte die Freisetzung der detektierten Mediatoren wie TNF- α , IFN- γ und GM-CSF, eine pro-inflammatorische Immunantwort forcieren und die Chemokine RANTES und MIP-1 die starke Diapedese von Leukozyten induzieren und zu einer überschießenden Immunantwort durch unkontrollierte Amplifikation führen und damit, ohne das Wachstum des Erregers zu inhibieren, negativ zum Ausgang einer Infektion beitragen. In direkter Interaktion mit den Neutrophilen kommt es jedoch zur ineffizienten Aktivierung der NK-Zellen, sodass ihre Bedeutung im Immunnetzwerk an dieser Stelle nicht ausreichend beantwortet werden kann.

4.7 NK-Zellen verstärken die pro-inflammatorische Zytokinantwort *in vivo* und verkürzen das Überleben von *C. albicans* infizierten Mäusen

Um den Einfluss von NK-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein murines Infektionsmodell genutzt [132]. Die Depletion von murinen NK-Zellen kann zum einen durch die Applikation eines depletierenden Antikörpers, oder aber z.B. durch die Verabreichung des Diphtherietoxins an transgene Mäuse, die einen Rezeptor für das Diphtherietoxin in NK-Zellen tragen, erreicht werden [132, 202, 203]. Da die intraperitoneale Applikation eines Antikörpers bevorzugt wurde, stellten sowohl der anti-Asialo GM1 Antikörper, als auch der NK1.1-Antikörper geeignete Depletionsantikörper dar. Während das Glykolipid Asialo GM1 ubiquitär in einer großen Anzahl an Mausstämmen auf NK-Zellen exprimiert wird, wird NK1.1 in den meisten Mausstämmen nicht auf der Oberfläche von NK-Zellen präsentiert [204, 205]. In einer vergleichenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass der anti-Asialo GM1 Antikörper, im Gegensatz zu dem NK1.1-Depletionsantikörper auch die Population der Basophilen stark reduziert [206]. In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend der NK1.1-Antikörper zur Behandlung eines NK1.1-exprimierenden Mausstamms C57BL/6 verwendet. Der Antikörper wurde den Mäusen vor einer intravenösen Injektion einer tödlichen *C. albicans*-Dosis appliziert, während einer Kontrollgruppe die korrespondierende

Isotypkontrolle verabreicht wurde. Diese Behandlung führte dazu, dass bis zum Ende des Experiments keine NK-Zellen nachweisbar waren. Die Depletion von NK-Zellen führte zu einem deutlich verlängerten Überleben der *C. albicans* infizierten Mäuse. Entsprechend traten klinische Symptome, wie Gewichtsverlust und Apathie in den behandelten Tieren, im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollgruppe, signifikant später auf. Im Blut der NK-depletierten Versuchstiere wurden signifikant verringerte Konzentrationen der Zytokine IL-17a, GM-CSF sowie der Chemokine MIP-1 und RANTES gemessen. Dafür ist die für die Pilzsepsis relevante hyper-inflammative Reaktion reduziert. Da keine Veränderung der Keimlast beobachtet werden konnte scheint es plausibel, dass die Reduktion der Inflammation zum Überleben der Mäuse beiträgt. *In vitro* Daten zeigten bereits eine potentielle pro-inflammatorische Wirkung von NK-Zellen durch die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und GM-CSF. Eine pathophysiologische Relevanz von NK-Zellen *in vivo* wurde bisher ausschließlich im Hinblick auf bakterielle Sepsis diskutiert [98, 207]. Es konnte gezeigt werden, dass hohe NK-Zellzahlen mit einer hohen Sterblichkeit während eines septischen Schocks assoziiert sind [98]. Weiterhin wurde eine durch IL-2 und IL-12 vermittelte NK-Zell-Aktivierung als Auslöser für einen systemischen Schock assoziiert mit erhöhter Mortalität beschrieben [208]. Für systemische Infektionen ausgelöst durch Pilze ist dies der erste Hinweis auf einen möglichen hyper-inflammatorischen Einfluss dieser Immunzellen und unterstreicht das vermeintlich wirtsgefährdende Potential von NK-Zellen durch Verstärkung der pro-inflammatorischen Antwort. Im Mausmodell werden NK-Zellen, im Gegensatz zu den *in vitro* Analysen, nach Kontakt mit *C. albicans* auch im Netzwerk mit anderen Immunzellen aktiviert und setzen daraufhin spezifische Zytokine und Chemokine frei. Dieser Effekt beschleunigt signifikant den Krankheitsverlauf.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Mihai Netea wurde die Bedeutung von NK-Zellen auch im immunsupprimierten Organismus untersucht. Während NK-Zellen in immunkompetenten Mäusen nach einer *C. albicans* Infektion wirtschädigend wirken, zeigen diese Immunzellen in Kombination mit einer T- und B-Zelldepletion eine gegensätzliche Wirkung. In einem solchen Rahmen tragen NK-Zellen zur Beseitigung des Pathogens bei und haben damit eine protektive Funktion [209]. Diese Studie unterstreicht die ambivalente Rolle von NK-Zellen in *C. albicans*-Infektionen. Studien mit „beige“-Mäusen, die einen NK- und Phagozyten-Defekt aufweisen, haben weiterhin gezeigt, dass auch hier die Anfälligkeit gegenüber einer systemischen Candidose im Vergleich zu Wildtyp-Tieren steigt [210]. Darüber hinaus führt ein zusätzlicher T-Zelldefekt in diesen Mäusen („beige nude“-Mäuse) zu verstärkter Prädisposition gegenüber einer endogenen *C. albicans* Infektion [211, 212].

In vitro Daten der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die pro-inflammatorische Antwort gegen *C. albicans* von NK-Zellen im Netzwerk mit Neutrophilen entscheidend beeinflusst werden kann. Eine Untersuchung der Rolle von NK-Zellen nach Infektion im neutropenischen Mausmodell könnte deshalb Aufschluss über deren Interaktion mit neutrophilen Granulozyten *in vivo* geben. Entsprechend der *in vitro* Daten wäre im neutropenischem Mausmodell mit einer weitaus stärkeren Aktivierung der NK-Zellen zu rechnen. Da die direkte Interaktion von NK-Zellen und *C. albicans* in der Gegenwart von Neutrophilen *in vitro* inhibiert wird, könnten NK-Zellen *in vivo* in der Abwesenheit der Granulozyten zu einer Beseitigung des Pilzes beitragen.

Abhängig vom Immunstatus zeigen NK-Zellen damit eine nicht-redundante Rolle in systemischen *C. albicans*-Infektionen, wobei sie im immunkompetenten Organsimus zur Schädigung beitragen, indem eine pro-inflammatorische Immunantwort forciert wird, während ihnen bisher im immunsupprimierten Rahmen eine protektive Bedeutung zugeschrieben werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Margulis L. Biodiversity: molecular biological domains, symbiosis and kingdom origins. *Biosystems* 1992;27:39-51
2. Guarro J, GeneJ and Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:454-500
3. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;125:47-70
4. MacNeill C, Carey JC. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Curr Womens Health Rep* 2001;1:31-5
5. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP and Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133-63
7. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG and White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*;4:165rv13
8. Phan QT, Myers CL, Fu Y, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 2007;5:e64
9. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One* 2012;7:e33362
10. Filler SG, Swerdloff JN, Hobbs C and Luckett PM. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995;63:976-83
11. Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, et al. the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000217
12. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL and Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999;283:1535-8
13. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR and Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 2006;5:1604-10
14. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:737-48
15. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A and Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997;90:939-49
16. Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 2000;146 (Pt 8):1763-74

17. Grubb SE, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL and Thornhill MH. *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infect Immun* 2008;76:4370-7
18. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, et al. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* 2010;8:225-35
19. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:529-53
20. Braun BR, Johnson AD. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* 1997;277:105-9
21. Murad AM, Leng P, Straffon M, et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* 2001;20:4742-52
22. Naglik JR, Challacombe SJ and Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:400-28, table of contents
23. Wachtler B, Citiulo F, Jablonowski N, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* 2012;7:e36952
24. Albrecht A, Felk A, Pichova I, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 2006;281:688-94
25. Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF and Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* 2009;47:465-75
26. Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W and Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 1999;34:169-80
27. Pietrella D, Rachini A, Pandey N, et al. The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* 2010;78:4754-62
28. Schaller M, Korting HC, Borelli C, Hamm G and Hube B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an *in vitro* model of vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2005;73:2758-65
29. Rinaldi MG. Invasive aspergillosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:1061-77
30. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ and Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984;100:345-51
31. Muhlemann K, Wenger C, Zenhausem R and Tauber MG. Risk factors for invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic malignancies. *Leukemia* 2005;19:545-50

32. Trof RJ, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp YJ, Girbes AR and Groeneveld AB. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. *Intensive Care Med* 2007;33:1694-703
33. Ramos-e-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM and Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol* 2012;30:616-27
34. Saunus JM, Kazoullis A and Farah CS. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. *Front Biosci* 2008;13:5345-58
35. Powderly WG, Gallant JE, Ghannoum MA, Mayer KH, Navarro EE and Perfect JR. Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggested guidelines for therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1619-23
36. Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis* 2001;7:342-7
37. Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N and Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* 2008;4:e35
38. Charles PE, Doise JM, Quenot JP, et al. Candidemia in critically ill patients: difference of outcome between medical and surgical patients. *Intensive Care Med* 2003;29:2162-9
39. Vonk AG, Netea MG, van der Meer JW and Kullberg BJ. Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:891-903
40. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida infections* in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009;37:1612-8
41. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:155-69
42. Arendrup MC, Bergmann OJ, Larsson L, Nielsen HV, Jarlov JO and Christensson B. Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:855-62
43. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ and Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:67-78
44. Levitz SM. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect* 2004;6:1351-5
45. Netea MG, Gow NA, Munro CA, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006;116:1642-50
46. Volman TJ, Hendriks T and Goris RJ. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* 2005;23:291-7
47. Bueter CL, Specht CA and Levitz SM. Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003080

48. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD and DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* 2007;37:467-78
49. Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:392-9
50. Gantner BN, Simmons RM and Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 2005;24:1277-86
51. Suram S, Brown GD, Ghosh M, et al. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem* 2006;281:5506-14
52. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007;8:31-8
53. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 2007;8:39-46
54. Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, et al. Differential Adaptation of *Candida albicans* *In Vivo* Modulates Immune Recognition by Dectin-1. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003315
55. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol* 2004;172:3059-69
56. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:3712-8
57. Blasi E, Mucci A, Neglia R, et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:69-79
58. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004;4:1-23
59. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD and Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-89
60. Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H and Kjeldsen L. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* 1995;85:812-7
61. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657-70
62. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5
63. Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Fukuda Y and Sugawara K. Production of chemokines and reactive oxygen species by human neutrophils stimulated by *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2002;7:170-4

64. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:577-82
65. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM and Johnston RB, Jr. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 1984;160:1656-71
66. Shalaby MR, Palladino MA, Jr., Hirabayashi SE, et al. Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol* 1987;41:196-204
67. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an *ex vivo* rat lung model. *Blood* 2006;107:1217-9
68. Sabroe I, Dower SK and Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S421-6
69. Beutler B, Hoebe K, Du X and Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74:479-85
70. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002;20:825-52
71. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 2005;56:397-415
72. Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H and Braude AI. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* 1986;78:511-24
73. Vonk AG, Wieland CW, Netea MG and Kullberg BJ. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. *J Microbiol Methods* 2002;49:55-62
74. Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P and Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* 2007;2:55-67
75. Fulurija A, Ashman RB and Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology* 1996;142 (Pt 12):3487-96
76. Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M and Kunkel SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:273-9
77. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F and Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000;177:195-203
78. Sporri R, Joller N, Hilbi H and Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol* 2008;181:7121-30

79. Costantini C, Calzetti F, Perbellini O, et al. Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood* 2011;117:1677-86
80. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-9
81. Chiche L, Forel JM, Thomas G, et al. The role of natural killer cells in sepsis. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:986491
82. Tomasello E, Blery M, Vely F and Vivier E. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* 2000;12:139-47
83. Biassoni R. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol* 2009;Chapter 14:Unit 14 10
84. Biassoni R, Ugolotti E and De Maria A. NK cell receptors and their interactions with MHC. *Curr Pharm Des* 2009;15:3301-10
85. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-9
86. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC and Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006;18:151-8
87. Vivier E, Nunes JA and Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004;306:1517-9
88. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE and Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5640-4
89. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42:501-10
90. Santoli D, Trinchieri G and Koprowski H. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J Immunol* 1978;121:532-8
91. Rosenberg EB, Herberman RB, Levine PH, Halterman RH, McCoy JL and Wunderlich JR. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int J Cancer* 1972;9:648-58
92. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K and Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356:1795-9
93. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190:1505-16

94. Seidel UJ, Schlegel P and Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013;4:76
95. Roberti MP, Mordoh J and Levy EM. Biological role of NK cells and immunotherapeutic approaches in breast cancer. *Front Immunol* 2012;3:375
96. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125:680-7
97. Lunemann A, Lunemann JD and Munz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009;15:352-8
98. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care* 2011;15:R243
99. Rittirsch D, Flierl MA and Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008;8:776-87
100. Zucchini N, Crozat K, Baranek T, Robbins SH, Altfeld M and Dalod M. Natural killer cells in immunodefense against infective agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6:867-85
101. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5:1260-5
102. Heremans H, Dillen C, van Damme J and Billiau A. Essential role for natural killer cells in the lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like reaction in mice. *Eur J Immunol* 1994;24:1155-60
103. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsaganos T, Spyridaki E, et al. Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit Care* 2006;10:R166
104. Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, et al. Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J Infect Dis* 2011;203:430-5
105. Bouzani M, Ok M, McCormick A, et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *J Immunol* 2011;187:1369-76
106. Morrison BE, Park SJ, Mooney JM and Mehrad B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest* 2003;112:1862-70
107. Ma LL, Wang CL, Neely GG, Epelman S, Krensky AM and Mody CH. NK cells use perforin rather than granulysin for anticryptococcal activity. *J Immunol* 2004;173:3357-65
108. Marr KJ, Jones GJ, Zheng C, et al. *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun* 2009;77:2436-46

109. Levitz SM, Dupont MP and Smail EH. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994;62:194-202
110. Hidore MR, Nabavi N, Sonleitner F and Murphy JW. Murine natural killer cells are fungicidal to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991;59:1747-54
111. Murphy JW, McDaniel DO. *In vitro* reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1982;128:1577-83
112. Lipscomb MF, Alvarellos T, Toews GB, et al. Role of natural killer cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* infections in mice. *Am J Pathol* 1987;128:354-61
113. Beno DW, Stover AG and Mathews HL. Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes. *J Immunol* 1995;154:5273-81
114. Arancia G, Molinari A, Crateri P, et al. Noninhibitory binding of human interleukin-2-activated natural killer cells to the germ tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995;63:280-8
115. Arancia G, Stringaro A, Crateri P, et al. Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*. *Cell Immunol* 1998;186:28-38
116. Zunino SJ, Hudig D. Interactions between human natural killer (NK) lymphocytes and yeast cells: human NK cells do not kill *Candida albicans*, although *C. albicans* blocks NK lysis of K562 cells. *Infect Immun* 1988;56:564-9
117. Mathews HL, Witek-Janusek L. Antifungal activity of interleukin-2-activated natural killer (NK1.1+) lymphocytes against *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 1998;47:1007-14
118. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T and Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89
119. Djeu JY, Blanchard DK, Halkias D and Friedman H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;137:2980-4
120. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM and Johnston RB, Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* 1993;91:2596-601
121. Ferrante A. Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infect Immun* 1989;57:2115-22
122. Djeu JY, Blanchard DK, Richards AL and Friedman H. Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 1988;141:4047-52

123. Balish E, Warner T, Pierson CJ, Bock DM and Wagner RD. Oropharyngeal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. *Med Mycol* 2001;39:261-8
124. Algarra I, Ortega E, Serrano MJ, Alvarez de Cienfuegos G and Gaforio JJ. Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;33:159-63
125. Gaforio JJ, Ortega E, Algarra I, Serrano MJ and Alvarez de Cienfuegos G. NK cells mediate increase of phagocytic activity but not of proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha, and IL-12) production elicited in splenic macrophages by tilorone treatment of mice during acute systemic candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1282-94
126. Marconi P, Scaringi L, Tissi L, et al. Induction of natural killer cell activity by inactivated *Candida albicans* in mice. *Infect Immun* 1985;50:297-303
127. Scaringi L, Rosati E, Cornacchione P, et al. Local and systemic immune response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Nat Immun* 1995;14:234-49
128. Lauzon NM, Mian F and Ashkar AA. Toll-like receptors, natural killer cells and innate immunity. *Adv Exp Med Biol* 2007;598:1-11
129. Wozniok I, Hornbach A, Schmitt C, et al. Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol* 2008;10:807-20
130. Gillum AM, Tsay EY and Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 1984;198:179-82
131. Reuss O, Vik A, Kolter R and Morschhauser J. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 2004;341:119-27
132. Koo GC, Dumont FJ, Tutt M, Hackett J, Jr. and Kumar V. The NK-1.1(-) mouse: a model to study differentiation of murine NK cells. *J Immunol* 1986;137:3742-7
133. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-82
134. Naora H, Gougeon ML. Enhanced survival and potent expansion of the natural killer cell population of HIV-infected individuals by exogenous interleukin-15. *Immunol Lett* 1999;68:359-67
135. Cho D, Campana D. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J Lab Med* 2009;29:89-96
136. Xiong D, Yang ZG, Li QH, Wu ZC and Lu JT. [Method for expansion in vitro of CD3-CD56+CD16+NK cells highly purified from human peripheral blood]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010;18:1310-5

137. Torelli GF, Guarini A, Maggio R, Alfieri C, Vitale A and Foa R. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica* 2005;90:785-92
138. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-38
139. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG and Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 2005;202:1001-12
140. Glassner A, Eisenhardt M, Kramer B, et al. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest* 2012;92:967-77
141. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-47
142. Kurzai O, Schmitt C, Brocker E, Frosch M and Kolb-Maurer A. Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 2005;295:121-7
143. Watzl C, Long EO. Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol* 2010;Chapter 11:Unit 11 9B
144. MacFarlane AWt, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:23-57
145. Costantini C, Cassatella MA. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J Leukoc Biol* 2011;89:221-33
146. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Pizzolo G and Cassatella MA. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. *Int Immunol* 2010;22:827-38
147. Gresnigt MS, Joosten LA, Verschueren I, et al. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J Immunol* 2012;189:4806-15
148. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376
149. Carrega P, Pezzino G, Queirolo P, et al. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PLoS One* 2009;4:e8132
150. Gill S, Olson JA and Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft- versus-tumor, and graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:765-76
151. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 2007;7:279-91

152. Haller D, Serrant P, Granato D, Schiffrin EJ and Blum S. Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:649-57
153. Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B and Jacobs T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun* 2004;72:6817-25
154. Jones GJ, Wiseman JC, Marr KJ, Wei S, Djeu JY and Mody CH. In contrast to anti-tumor activity, YT cell and primary NK cell cytotoxicity for *Cryptococcus neoformans* bypasses LFA-1. *Int Immunol* 2009;21:423-32
155. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010;50:1091-100
156. Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Hiddemann W and Subklewe M. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* 2013;5:63-78
157. Passweg JR, Koehl U, Uharek L, Meyer-Monard S and Tichelli A. Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:811-24
158. Strauss RG. Role of granulocyte/neutrophil transfusions for haematology/oncology patients in the modern era. *Br J Haematol* 2012;158:299-306
159. Bhatia S, McCullough J, Perry EH, Clay M, Ramsay NK and Neglia JP. Granulocyte transfusions: efficacy in treating fungal infections in neutropenic patients following bone marrow transplantation. *Transfusion* 1994;34:226-32
160. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltzis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105:3051-7
161. Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and *in vivo* influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother* 2010;33:200-10
162. Suck G, Koh MB. Emerging natural killer cell immunotherapies: large-scale *ex vivo* production of highly potent anticancer effectors. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2010;3:135-42
163. Biondo C, Midiri A, Gambuzza M, et al. IFN-alpha/beta signaling is required for polarization of cytokine responses toward a protective type 1 pattern during experimental cryptococcosis. *J Immunol* 2008;181:566-73
164. Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, et al. Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida spp.* requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling. *J Immunol* 2011;186:3104-12
165. Chung JW, Piao ZH, Yoon SR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* eliminates natural killer cells via phagocytosis-induced apoptosis. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000561

166. Banerjee PP, Pandey R, Zheng R, Suhoski MM, Monaco-Shawver L and Orange JS. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J Exp Med* 2007;204:2305-20
167. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS and Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14151-6
168. Winchester BG. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 2001;5 Suppl A:11-9
169. Alter G, Malenfant JM and Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294:15-22
170. Grzywacz B, Kataria N and Verneris MR. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia* 2007;21:356-9; author reply 359
171. Borrego F, Pena J and Solana R. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 1993;23:1039-43
172. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO and Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 1988;168:1621-37
173. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med* 1988;167:1572-85
174. Gerosa F, Scardoni M, Tommasi M, et al. Interferon alpha induces expression of the CD69 activation antigen in human resting NK cells, while interferon gamma and tumor necrosis factor alpha are ineffective. *Int J Cancer* 1991;48:473-5
175. Kumamoto CA, Vinces MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 2005;7:1546-54
176. Farrell SM, Hawkins DF and Ryder TA. Scanning electron microscope study of *Candida albicans* invasion of cultured human cervical epithelial cells. *Sabouraudia* 1983;21:251-4
177. Zink S, Nass T, Rosen P and Ernst JF. Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. *Infect Immun* 1996;64:5085-91
178. Lewis RE, Lo HJ, Raad, II and Kontoyiannis DP. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1153-5
179. d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 2000;191:1661-74
180. van den Broek MF, Kagi D, Zinkernagel RM and Hengartner H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control *in vivo*. *Eur J Immunol* 1995;25:3514-6

181. Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 1999;162:6658-62
182. Beno DW, Mathews HL. Growth inhibition of *Candida albicans* by interleukin-2-induced lymph node cells. *Cell Immunol* 1990;128:89-100
183. Beno DW, Mathews HL. Growth inhibition of *Candida albicans* by interleukin-2-activated splenocytes. *Infect Immun* 1992;60:853-63
184. Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA and Trapani JA. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol* 1999;19:8604-15
185. Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 2010;468:447-51
186. Voskoboinik I, Smyth MJ and Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:940-52
187. Puccetti P, Romani L and Bistoni F. A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol* 1995;3:237-40
188. Romani L, Mocci S, Bietta C, Lanfaloni L, Puccetti P and Bistoni F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect Immun* 1991;59:4647-54
189. Park SJ, Hughes MA, Burdick M, Strieter RM and Mehrad B. Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* 2009;182:4306-12
190. Nagai H, Guo J, Choi H and Kurup V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 1995;172:1554-60
191. Cenci E, Perito S, Enssle KH, et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1997;65:564-70
192. Levitz SM, North EA. gamma Interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun* 1996;64:1595-9
193. Gozalbo D, Gil ML. IFN-gamma in *Candida albicans* infections. *Front Biosci* 2009;14:1970-8
194. Fratti RA, Ghannoum MA, Edwards JE, Jr. and Filler SG. Gamma interferon protects endothelial cells from damage by *Candida albicans* by inhibiting endothelial cell phagocytosis. *Infect Immun* 1996;64:4714-8
195. Blanchard DK, Michelini-Norris MB and Djeu JY. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by large granular lymphocytes stimulated with *Candida albicans*: role in activation of human neutrophil function. *Blood* 1991;77:2259-65

196. Maghazachi AA, al-Aoukaty A and Schall TJ. C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* 1994;153:4969-77
197. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008;83:288-95
198. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, et al. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21659-64
199. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007;109:3776-85
200. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003;171:2366-73
201. Bhatnagar N, Hong HS, Krishnaswamy JK, et al. Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity. *Blood* 2010;116:1308-16
202. Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K and Tokunaga T. *In vivo* effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* 1981;291:334-5
203. Walzer T, Blery M, Chaix J, et al. Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3384-9
204. Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K and Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 1980;10:175-80
205. Carlyle JR, Mesci A, Ljutic B, et al. Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol* 2006;176:7511-24
206. Nishikado H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y and Karasuyama H. NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils *in vivo*. *J Immunol* 2011;186:5766-71
207. de Pablo R, Monserrat J, Torrijos C, Martin M, Prieto A and Alvarez-Mon M. The predictive role of early activation of natural killer cells in septic shock. *Crit Care* 2012;16:413
208. Carson WE, Yu H, Dierksheide J, et al. A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. *J Immunol* 1999;162:4943-51
209. Quintin J, Voigt J, van der Voort R, et al. The role of Natural Killer cells for host defence against primary and secondary infection with *Candida albicans*. *J Infect Dis* 2013;eingereicht
210. Baghian A, Lee KW. Systemic candidosis in beige mice. *J Med Vet Mycol* 1989;27:51-5
211. Cantorna MT, Balish E. Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect Immun* 1990;58:1093-100
212. Cantorna MT, Balish E. Acquired immunity to systemic candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis* 1991;164:936-43

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
Als	„agglutinin-like sequence“
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein
CD	“cluster of differentiation”
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	“coding” Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribinukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”
ERK	“extracellular regulated kinase”
FDR	“false discovery rate”
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	“Forward-Scatter“
g	Erdbeschleunigung
GFP	“green fluorescent protein”
GM-CSF	“granulocyte macrophage-colonystimulating factor”
h	Stunde(n)
HIV	„human immunodeficiency virus“
HLA	“human leukocyte antigen”
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak-STAT	“Januskinase-signal transducers and activators of transcriptome”
KEGG	Kyoto Enzyklopedia of Genes and Genomes
kÜ	konditionierter berstand
LAMP-1	“lysosomal-associated membrane protein 1”
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	“laser-scanning-microscope”
MHC	“major histocompatibility complex”
min	Minute(n)
MIP	“macrophage inflammatory protein”
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	“moiety of infection”
NCR	“natural cytotoxicity receptors”

NET	“neutrophil extracellular traps”
NFATC1	“nuclear factor of activated T cells 1”
NF κ B	“nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells”
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	“non obese diabetic”
NSG	“NOD/SCID/IL2R γ ”
PBMC	“peripheral blood mononuclear cells”
PBS	“phosphate buffered saline”
PMN	“polymorphonuclear neutrophil”
RANTES	“Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted”
RNA	Ribonukleinsäure
Sap	“secreted aspartic proteinase”
SCG-Medium	“stem cell growth”-Medium
SCID	“severe combined immunodeficiency”
SSC	“Side-Scatter”
Th1	T-Helfer 1
TLR	Toll-like Rezeptor”
TNF	“ tumor necrosis factor”
TRAIL	„tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand”
U	“Units”
WT	Wildtyp
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YPD	“yeast peptone dextrose”
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
γ	gamma

7 Anhang

7.1 Danksagung

An erster Stelle gilt ein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Oliver Kurzai für die Bereitstellung des Themas und dem damit entgegengebrachten Vertrauen. Eine intensive Betreuung sowie fachliche Diskussionen, verbunden mit ermutigendem Optimismus, haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ich danke ihm weiterhin dafür, dass er es mir ermöglicht hat, meine Forschungsarbeit auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren und dadurch meinen Horizont zu erweitern. Eine exzellentere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Einfach nur schön gestaltete sich die Forschung in der Arbeitsgruppe Fungal Septomics. Dafür bedanke ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern. Neben heiterer Ausgelassenheit und einer freundlichen Atmosphäre war der Laboralltag durch die Bereitschaft zur Hilfestellung und andauernde fachliche und moralische Unterstützung geprägt. Die letzten drei Jahre gehören damit zu einer wertvollen Phase in meinem Leben, die ich nicht missen möchte. Besonderer Dank gilt hier auch dem „Promotionsvorbereitungsteam“ mit Seána Duggan und Ines Leonhardt sowie Dr. Kerstin Hünninger. Dabei möchte ich nicht vergessen, die administrative Komponente Silke Pfohl und die technische Assistenz durch Cindy Büchner zu erwähnen.

Ich möchte weiterhin Dr. Ilse Jacobsen, Prof. Bernhard Hube, Prof. Jürgen Löffler, Dr. Maria Bouzani, Prof. Mihai Netea und Dr. Jessica Quintin für die Möglichkeit danken, in Zusammenarbeit wertvolle Kooperationsprojekte durchführen zu können.

Ein großer Dank geht an dieser Stelle auch an meine Familie, die mich bereits seit dem Studium in jeglicher Hinsicht unterstützt und auffängt.

Zu guter Letzt danke ich allen Blutspendern, ohne jene diese Forschungsarbeit undenkbar gewesen wäre.

7.2 Eigenständigkeitserklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 4. Dezember 2012 ist mir bekannt.

Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in dieser Arbeit angegeben.

Alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, habe ich benannt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen.

Diese Arbeit wurde bisher weder an einer anderen Hochschule als Dissertation noch als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Jena, 27. Mai 2013

Jessica Voigt

7.3 Lebenslauf

Jessica Voigt

geboren am 23.05.1984 in 08393 Meerane

Schulbildung

1994 – 2002 Pestalozzi-Gymnasium Meerane (Sachsen)
- Naturwissenschaftliches Profil -
Abschluss: Abitur

Studium

2002 - 2004 Medieninformatik an der TU-Dresden
2004 - 2009 Biologie an der TU-Dresden
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Immunologie, Mikrobiologie
Abschluss: Diplom 1.0

Wissenschaftliche Praktika

Sommer 2005 Praktikum im Medizinisch-Diagnostischen Labor
Dr. Uhlemann
Feb. 2006 – Dez. 2007 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-
Institut für Zellbiologie und Genetik in Dresden
Sommer 2007 Praktikum am Center für Immunology in
Irvine, California (10 Wochen)

Promotion

seit Dez. 2009 Promotion am Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK)
Septomics, Jena
(Prof. Dr. Oliver Kurzai)
Thema: Die Rolle von NK-Zellen in der Immunantwort
gegen *Candida albicans*

Wissenschaftliche Beiträge**Vorträge**

Voigt J, Kurzai O (2011) Human Natural Killer Cells mediate cytotoxic effects against *Candida albicans*, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V., 25.–28. September 2011, Essen, Deutschland

Voigt J, Kurzai O (2013) NK cells act as phagocytes against *Candida albicans* and mount an inflammatory response in mice, 6. Internationaler Kongress “Sepsis and Multiorgan Dysfunction”, 4.-6. September 2013, Weimar, Deutschland

Voigt J, Kurzai O (2013) Natural Killer Cells modulate the immune response in *Candida*-infections, 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)/ Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (dgi) 22.09.2013 - 25.09.2013, Rostock, Deutschland

Posterpräsentationen

Voigt J, Kurzai O (2011) The role of Natural Killer Cells in the immune response against *Candida albicans*, Gordon Research Conferences, Immunology of Fungal Infections, 16.-21.01.2010 Galveston, Texas, USA

Voigt J, Kurzai O (2011) Die Rolle von Natürlichen Killerzellen in der Immunabwehr von *Candida albicans*, 45. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 01. – 03. September 2011, Kiel, Deutschland

Voigt J, Kurzai O (2011) Human Natural Killer Cells show direct cytotoxic effects against *Candida albicans* filaments, 5. Internationaler Kongress „Sepsis und Multiorgandysfunktion“ der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V., 07. –10. September 2011, Weimar, Deutschland

Voigt J, Bouzani M, Löffler J, Kurzai O (2012) The Role of Natural Killer cells in antifungal immunity, Keystone Symposium; Fungal Pathogens: From basic biology to drug discovery, 15. - 20. Januar 2012, Santa Fe, New Mexico

Voigt J, Bouzani M, Löffler J, Kurzai O (2012) *Candida albicans* filaments activate human Natural Killer cells, 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2012 (ISHAM 2012), 11.-15. Juni 2012, Berlin, Deutschland

Publikationen

Voigt J, Hünninger K, Bouzani M, Jacobsen ID, Barz D, Hube B, Löffler J, Kurzai O (2013) Phagocytosis of *Candida albicans* by human NK Cells results in a proinflammatory response, The Journal of Infectious Diseases

Quintin J, **Voigt J**, van der Voort R, Jacobsen ID, Verschueren I, Hube B, van der Meer J, Joosten L, Kurzai O, Netea MG (2013) The role of Natural Killer cells for host defense against primary and secondary infection with *Candida albicans*, European Journal of Immunology, in Revision