

# Ruhende Konidien von *Rhizopus arrhizus* bewirken eine proinflammatorische Antwort humaner mononukleärer Phagozyten

Wurster S<sup>1</sup>, Thielen V<sup>1</sup>, Walther P<sup>2</sup>, Elias J<sup>3</sup>, Waaga-Gasser AM<sup>4</sup>, Dragan M<sup>4</sup>, Einsele H<sup>1</sup>, Löffler J<sup>1</sup>, Ullmann AJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Josef-Schneider-Str. 2, D-97080 Würzburg

<sup>2</sup> Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89069 Ulm

<sup>3</sup> Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM), Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Josef-Schneider-Straße 2 / E 1, D-97080 Würzburg

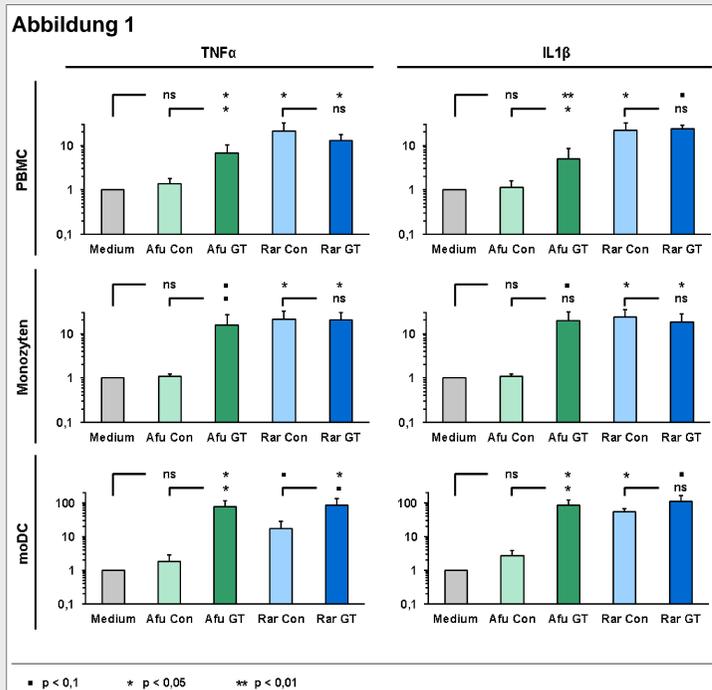
<sup>4</sup> Universitätsklinikum Würzburg, Chirurgische Klinik I, Oberdürrbacher Str. 6, D-97080 Würzburg

## Einleitung und Zielsetzung

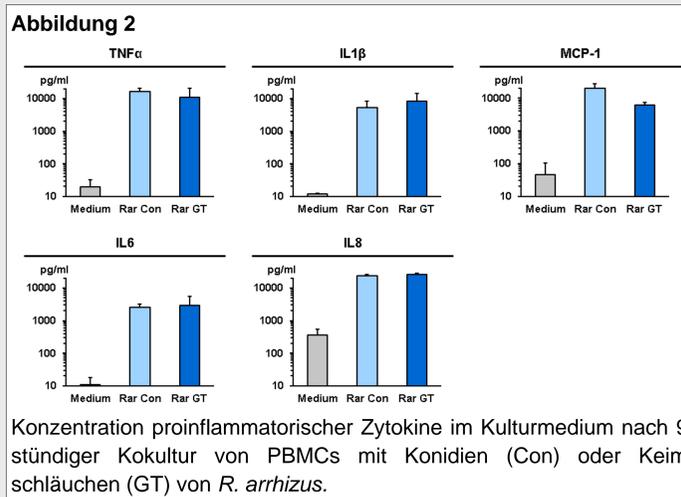
Die Fortschritte der modernen Medizin, z. B. durch die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen oder immunmodulatorische Therapieansätze bei hämatologischen und immunologischen Erkrankungen führen zu einer steigenden Anzahl von Patienten mit lang andauernder Immunsuppression und damit zu einer Prädisposition für invasive Mykosen. Neben den klassischen Erregern wie *Candida* spp. oder *Aspergillus* spp. ist eine Vielzahl weiterer Pilze für einen in ihrer Gesamtheit nicht unerheblichen Anteil der invasiven Mykosen verantwortlich. Die Ordnung *Mucorales* tritt hierbei mit steigender Inzidenz in Erscheinung [1]. Aufgrund der oft fulminanten klinischen Verläufe, der schwierigen Diagnosefindung und der limitierten therapeutischen Optionen sind Mucormykosen mit einer hohen Morbidität und Letalität assoziiert. In deutlichem Kontrast zu ihrer wachsenden klinischen Bedeutung sind die immunpathologischen Mechanismen bei Mucormykosen sowie die Zellwandstrukturen und Antigene von *Mucorales* bislang kaum charakterisiert. Zielsetzung unserer Studie war daher die vergleichende Analyse der Zytokinantwort verschiedener Leukozyten-Populationen auf unterschiedliche Morphotypen von *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus arrhizus*, dem häufigsten Erreger humaner Mucormykosen.

## Ruhende Konidien von *R. arrhizus* stimulieren konzentrationsabhängig die Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in humanen mononukleären Phagozyten

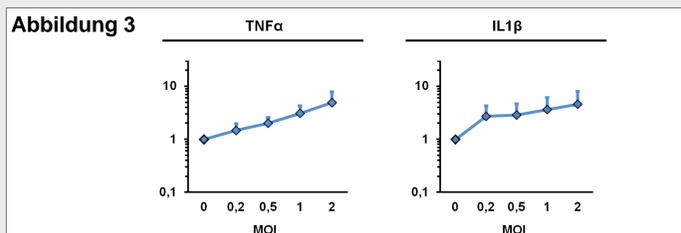
Bei 6- und 9-stündiger Kokultur von PBMCs, Monozyten und moDCs (*monocyte-derived dendritic cells*) gesunder Spender (n = 5) mit Keimschläuchen von *R. arrhizus* und *A. fumigatus* zeigte sich eine signifikante Hochregulation der mRNA-Synthese und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und MCP-1. Im deutlichen Gegensatz zu den Sporen von *A. fumigatus* (ATCC 46645) führten ruhende Konidien von *R. arrhizus* (CBS 110.17) ebenfalls zu einer starken Induktion dieser Zytokine auf mRNA- und Protein-Ebene. Unter Verwendung verschiedener Werte für die Multiplizität der Infektion (MOI) zeigte sich eine positive Korrelation der Expression proinflammatorischer Zytokine mit der MOI.



Relative mRNA-Expressionslevel (Fold Change) von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  nach 6-stündiger Kokultur von PBMCs, Monozyten und moDCs mit Konidien (Con) oder Keimschläuchen (GT) von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar).



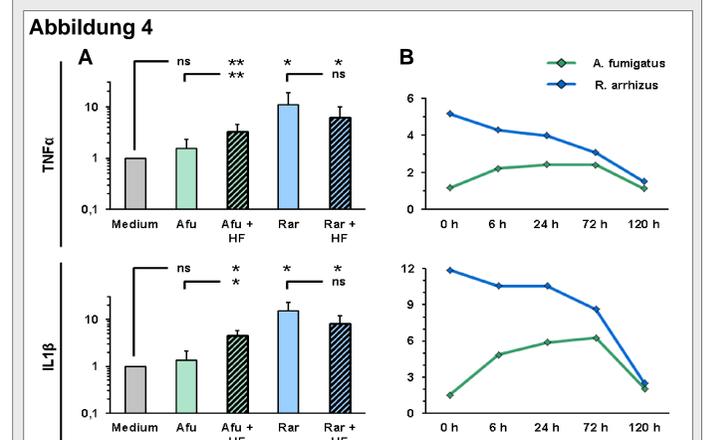
Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Kulturmedium nach 9-stündiger Kokultur von PBMCs mit Konidien (Con) oder Keimschläuchen (GT) von *R. arrhizus*.



Relative TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -mRNA-Expressionslevel nach 6-stündiger Kokultur von PBMCs mit Konidien von *R. arrhizus* (Rar) in unterschiedlicher Multiplizität der Infektion (MOI).

## Die Behandlung ruhender Konidien von *R. arrhizus* mit 48% Flusssäure führt nicht zu einer Zunahme der Immunogenität

Die inflammatorische Zytokinantwort gegenüber ruhenden Konidien von *R. arrhizus* steht im Kontrast zu bisherigen Beobachtungen bei *A. fumigatus* [2, 3] und deutet auf Unterschiede im Zellwandaufbau hin. Um das Phänomen näher zu adressieren, wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen PBMCs nach Kokultur mit Konidien von *R. arrhizus* und *A. fumigatus* vor und nach Behandlung mit 48% Flusssäure analysiert. Dieses bei *A. fumigatus* zur chemischen Depletion der *Rodlet*-Hydrophobinschicht beschriebene Verfahren [4] führte bei *R. arrhizus* zu keiner Verstärkung der IL1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ - Antwort der mit den Konidien kokultivierten PBMCs.



A) Relative TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -mRNA-Expressionslevel nach 6-stündiger Kokultur von PBMCs mit Konidien von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar) mit und ohne vorherige 48-stündige Behandlung mit Flusssäure (HF). B) Relative TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -mRNA-Expression nach 6-stündiger Kokultur von PBMCs mit Konidien von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* nach unterschiedlich langer Vorbehandlung mit 48% HF.

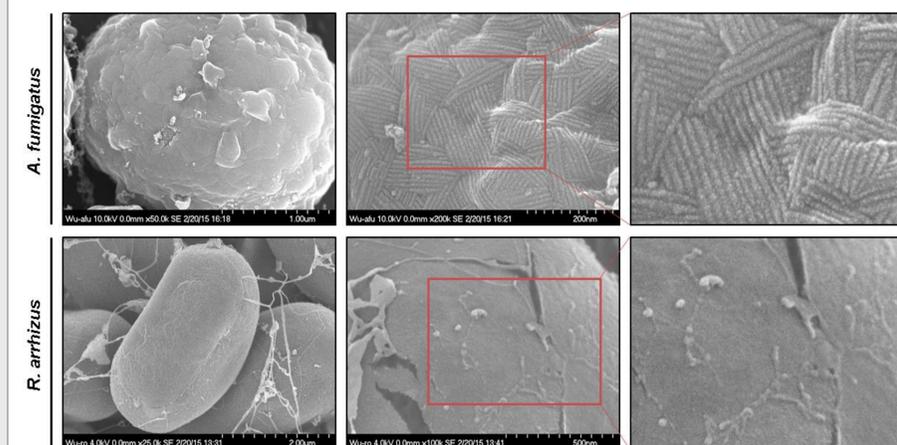
## Analyse der oberflächlichen Zellwandstrukturen ruhender Konidien mittels Cryo-SEM

Die ausgeprägte Immunogenität der ruhenden *Rhizopus*-Konidien in Verbindung mit der im Gegensatz zu *A. fumigatus* ausbleibenden Zunahme der Zytokinantwort humaner PBMCs auf die Konidien nach Flusssäure-Behandlung legt das Fehlen einer *Rodlet*-Hydrophobin-Schicht bei *Rhizopus*-Konidien nahe.

Zur Adressierung dieser Hypothese erfolgten SEM-Aufnahmen der konidialen Zelloberfläche unter Verwendung der bei *A. fumigatus* beschriebenen Gefrierpräparationstechnik [5]. Während bei den *Aspergillus*-Konidien die typische fibrilläre Hydrophobin-Struktur [4, 5], nachgewiesen werden konnte, fand sich bei den *R. arrhizus*-Konidien kein morphologisches Korrelat einer solchen.

pBLAST *in silico*-Analysen der *A. fumigatus* RodA- und RodB-Sequenz gegen die MycoCosm-Datenbank des *Joint Genome Institute* (*University of California*) unterstreichen die Annahme, dass *R. arrhizus* keine *Rodlet*-Hydrophobine besitzt (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 5



Cryo-SEM-Aufnahmen der oberflächlichen Zellwandstruktur von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

## Zusammenfassung und Ausblick

- Ruhende Konidien von *R. arrhizus* stimulieren im Gegensatz zu *A. fumigatus* eine erhebliche proinflammatorische Zytokinantwort humaner mononukleärer Phagozyten.
- Zwischen diesen Erregern bestehen Unterschiede im Aufbau der äußeren Zellwand, welche wahrscheinlich für die beobachtete Immunogenität der ruhenden Konidien verantwortlich sind.
- Gegenstand unserer aktuellen Untersuchungen ist die Frage, ob sich die beobachteten Effekte auch bei anderen Pilzen der Ordnung *Mucorales* finden und ob genusspezifische Unterschiede bestehen.
- Zudem soll untersucht werden, welche (konidialen) Antigene über welche Signalwege erkannt werden und ob sich eine spezifische Immunantwort gegen konidiale *Rhizopus*-Antigene ausbildet.

## Funding

Dieses Projekt wurde unterstützt durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung Würzburg, Projekt-Nr. Z-3/56 (SW) und BayImmuNet (AJU).