Mikrobielle Interaktionen

Jäger und Gejagte – wie sich Pilze gegen räuberische Amöben wehren

IULIA FERLING, SILVIA RADOSA, FALK HILLMANN

LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG UND INFektionsBIOLOGIE –
HANS-KNÖLL-INSTITUT, JENA

What seems obvious for most free-living bacteria, also appeals for yeast and filamentous fungi: their natural reservoirs include a variety of micropredators, such as members of the Amoebozoa kingdom. Not only do they share a predatory lifestyle, but their amoeboid motility and way of ingesting living microbial food reveals several similarities to innate immune cells. Understanding how fungi have learned to cope with such environmental phagocytes will shed new light on the evolutionary driving forces of fungal diversity and virulence.

DOI: 10.1007/s12268-021-1617-1

© Die Autorinnen und Autoren 2021

■ Es gibt wohl kein terrestrisches Ökosystem ohne Pilze. Als Zersetzer organischen Materials leben sie häufig in mutualistischen oder parasitären Beziehungen zu anderen Organismen. Als Krankheitserreger treten Pilze nicht nur bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen in Erscheinung, sondern sorgen

zunehmend für klinische Herausforderungen. Gewebsinvasive oder systemische Pilzinfektionen sind zwar im Vergleich zu bakteriellen Infektionen seltener, dafür aber häufig nur schwer diagnostizier- und behandelbar. Die Erreger von Mykosen sind divers: Hefen der Gattung *Candida* leben als Kommensalen auf

Schleimhäuten warmblütiger Tiere und Menschen, während *Cryptococcus neoformans* von Bäumen, aus Böden oder Taubenkot isoliert wurde. *Pneumocystis jirovecii* ist dagegen ein obligater, intrazellulärer Parasit menschlicher Zellen, dessen Kultivierung im Labor bis heute nicht möglich ist. Unter den filamentösen Pilzen tritt *Aspergillus fumigatus* am häufigsten klinisch in Erscheinung. Gleichzeitig ist er durch die Verbreitung über Sporen ubiquitär verbreitet.

Schimmelpilze – wehrhafte Saprophyten mit Infektionspotenzial

Das Wirtsspektrum von *A. fumigatus* ist alles andere als spezifisch und umfasst neben immunsupprimierten Menschen auch Reptilien und Vögel. In der Regel gehen die gewebsinvasiven Hyphen in der Lunge auf wenige eingeatmete Sporen (Konidien) zurück, die den Angriff phagozytierender Immunzellen überlebt haben. Diese Resistenz gegenüber Makrophagen war Motivation für zahlreiche Studien zur Oberflächenstruktur der Sporen. Hier liegen die besonders immu-

▲ **Abb. 1:** Phagozytische Prozessierung von *Aspergillus fumigatus*-Konidien in der Amöbe *Dictyostelium discoideum*. Im Gegensatz zu unpigmentierten Pilzsporen (oben, weiße Kolonie), verzögern melanisierte Sporen (unten, grüne Kolonie) die intrazelluläre Prozessierung und anschließende Exozytose. Schwellung und Keimung beschädigen die Membran des Phagolysosoms, wobei DHN-Melanin die Rekrutierung der ESCRT-Reparaturmaschinerie hemmt.

nogenen Kohlenhydratpolymere der Zellwände wie β -1,3-Glucan und Chitin in der ruhenden Spore allerdings unter einem hydrophoben Mantel aus Proteinen und dem amorphen Pigment 1,8-DHN-Melanin verborgen. Letzteres verleiht den Pilzsporen ihre charakteristischen grau-grüne Farbe (Abb. 1). Wie andere Pilze verfügt *A. fumigatus* dazu über ein Arsenal von Naturstoffen, wovon einige immunsuppressive Wirkung entfalten.

Welche Rolle spielen diese Virulenzfaktoren im natürlichen Habitat? Für pathogene Bakterien, die menschliche Wirtszellen aktiv infizieren, wie z. B. *Legionella* und *Listeria*, ist bereits bekannt, dass sich ihre Virulenzfaktoren auch gegen Amöben als allgegenwärtige Mikroprädatoren richten können. Auch Hefen und filamentöse Pilze unterliegen einem Fraßdruck durch Amöben. So fand man bereits in den 1970er- und frühen 1980er-Jahren immer wieder ausgehöhlte Sporen und leere Hyphen. Die Pilze waren Opfer verschiedener hochkomplexer amöboider Einzeller geworden, zumeist aus der Gruppe der Cercozoa (*Vampyrella* sp.) oder Amoebozoa (*Gephyramoeba*, *Saccamoeba*, *Thecamoeba*) [1].

Amöben und Pilze – zwischen Modell und natürlichen Interaktionspartnern

Dass Amöben und Pilze interagieren, entdeckte Aldo Castellani schon vor fast 100 Jahren, als *Acanthamoeba* eine *Cryptococcus*-Kultur kontaminierten [2]. *Acanthamoeba castellanii* wurde später das erste Amöben-Phagozytose-Modell für Pilze. Bei der Hefe *Cryptococcus neoformans* verläuft eine Infektion fast nur bei AIDS-Patienten systemisch und lebensbedrohlich. Die Hefezellen werden in der Regel aus der Umwelt aufgenommen und können von der Lunge ausgehend bis in Gehirn gelangen, wo sie fatale Entzündungen auslösen können. Vermutlich transportieren Makrophagen sie dorthin, die von den Hefen infiziert werden. Zu bestimmten Zeitpunkten können die Hefen ihr trojanisches Pferd wieder verlassen, entweder durch Lyse der Wirtszelle oder eine plötzliche, nicht lytische Exozytose, die die Entdecker auf den Namen „Vomozytose“ (engl. vomit) brachte [3].

Interessanterweise laufen diese Prozesse nach nahezu identischem Muster auch im beliebten zellbiologischen Modell *Dictyostelium discoideum* ab. Zudem wird die Hefe nach längerer Exposition und einem sich wiederholenden Transfer von *Cryptococcus* durch die Amöben resistenter gegenüber Makrophagen [4].

▲ Abb. 2: *Protostelium aurantium* (blau) frisst Hefezellen von *Rhodotorula mucilaginosa* (grün). Die mikroskopische Aufnahme zeigt grün fluoreszierende Zellen der Hefe *R. mucilaginosa* (Färbung mit Fluorescein-Isothiocyanat) und *P. aurantium* (gefärbt mit CMCA, CellTracker™ Blue). Weiße Pfeile kennzeichnen Amöben, die bereits Hefezellen phagozytiert haben.

▲ Abb. 3: Ruphozytose („Aussaugen“) von *Protostelium aurantium* an Hyphen des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*. A, Schema der Interaktion. Die Amöbe attackiert Hyphen zunächst an der Spitze und öffnet die Zellwand, sodass eine flexible, fingerartige Struktur in die Hyphe eingeführt und anschließend das Cytoplasma resorbiert wird. Zurück bleibt die leere Zellwandhülle. B, Mikroskopische Aufnahme der Ruphozytose (blau: Chitin in der Zellwand von *A. fumigatus*; rot: F-Actin von *P. aurantium*)

Die *Acanthamoeba*- und *Dictyostelium*-Modelle lassen sich auch auf die Sporen von *A. fumigatus* anwenden und zeigen, dass die

Amöben die Sporen zwar aufnehmen können, diese dann aber innerhalb der Zelle ihre Keimung einleiten und somit die Wirtszelle

von innen lysieren [5]. Ein ähnliches Bild wurde bei Makrophagen beobachtet. Mittlerweile ist bekannt, dass DHN-Melanin oder dessen Abbauprodukte sich während des Schwellens von der Sporenoberfläche lösen. Diese würde normalerweise zu einer Erkennung des β -1,3-Glucans der Zellwand führen, und die Makrophagen würden ähnlich wie bei einer Autophagie den Verdau der Spore einleiten [6]. Durch DHN-Melanin oder dessen Fragmente wird jedoch die Verarbeitung der phagozytierten Spore in Makrophagen deutlich verzögert, u. a. werden Flöße aus Lipiden, die *lipid rafts*, in der Phospholipidmembran des Phagolysosoms nicht mehr korrekt ausgebildet, und somit können wesentliche Proteine der Wirtszelle nicht korrekt positioniert werden [7].

Auch bei der Interaktion mit Amöben spielt das DHN-Melanin eine entscheidende Rolle für den Ausgang der Interaktion. Während unpigmentierte Sporen von *D. discoideum* innerhalb von einer Stunde wieder ausgeschieden werden, verbleiben Sporen mit einer Melaninschicht bis zu zwei Stunden oder länger innerhalb der Wirtszelle. In diesem Fall verzögert das Pigment ebenfalls die Prozessierung des Amöben-Phagolysosoms. Aufgrund der längeren Verweilzeit stellten wir zudem vermehrte Schäden an der phagolysosomalen Membran fest (**Abb. 1**), wobei eindeutig erkennbar ist, dass die notwendigen Reparaturproteine als Teil der *endosomal sorting complex required for transport machinery* (ESCRT) nicht am Phagolysosom lokalisiert sind [8]. Die Schäden an der Membran führen dabei möglicherweise zum Einstrom von Cytoplasma, was wiederum die Keimung des Pilzes beschleunigen könnte.

Protostelium aurantium: fungivore Amöbe mit breitem Speiseplan

Handelt es sich bei der Abwehr von Amöben lediglich um Analogien zu Vorgängen mit Makrophagen, oder können so widerstandsfähige Pilze wie *A. fumigatus* tatsächlich Fressfeinden aus der Gruppe der Amoebozoa ausgesetzt sein? Tatsächlich gibt es sogar unter den Verwandten der Dictyosteliden pilzfressende Vertreter. Hierbei handelt es sich um viele Arten der Protosteliden, Kosmopoliten die häufig von Blattoberflächen isoliert werden können. Unsere Charakterisierung von *Protostelium aurantium* verweist auf eine strikt

fungivore Lebensweise [9]. Während *P. aurantium* in Gegenwart von Bakterien nicht wächst, konsumiert sie ein weites Spektrum von Hefen, wobei *Candida parapsilosis* oder *Rhodotorula mucilaginosa* favorisierte Nahrungsquellen sind. Überraschend ist zudem, dass sich *P. aurantium* bei der Nahrungssuche nicht nur auf die Phagozytose „einfacher“ Hefen beschränkt (**Abb. 2**). *P. aurantium* phagozytiert und tötet auch Sporen von *A. fumigatus*, allerdings nur, wenn deren melaninhaltige Hülle entweder durch Schwellung oder Mutation verloren gegangen ist [8]. Auch ganze Hyphen werden attackiert. In einem Vorgang, den wir als „Ruphozytose“ (gr. ρουφώ, schlürfen, saugen, **Abb. 3**) bezeichnen, öffnet die Amöbe die Hyphe, dringt durch Konzentration ihrer Aktinfilamente in das Innere der Hyphe ein und verlässt sie wieder, nachdem das Cytoplasma resorbiert wurde [10]. Ähnliche Vorgänge wurden auch schon bei anderen Protozoen beobachtet, die sich von filamentösen Algen ernähren.

Es spricht also vieles dafür, dass auch die Sporen und Hyphen der meisten filamentösen Pilze in ihren Habitaten solchen Mikroprädatoren seit Millionen von Jahren ausgesetzt sind und den Jägern eine Fülle von Sekundärmetaboliten entgegensetzen. Einige davon entfalten ihre Wirkung wohl auch gegen phagozytische Immunzellen, was für diese Pilze wiederum die Chance erhöht, einen Wirt zu kolonisieren. Derzeitige Forschungen sollen zeigen, ob die molekularen Faktoren, mit denen Amöben Pilze derart spezifisch erkennen und abtöten, auch diagnostische oder therapeutische Verwendung finden könnten. ■

Literatur

- [1] Old KM, Darbyshire JF (1978) Soil fungi as food for giant amoebae. *Soil Biol Biochem* 10: 93–100
- [2] Castellani A (1930) An amoeba found in culture of yeast: Preliminary note. *J Trop Med Hyg* 33: 16
- [3] Ma H, Croudace JE, Lammass DA, May RC (2006) Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16: 2156–2160
- [4] Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 71: 4862–4872
- [5] Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ et al. (2015) Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. *Environ Microbiol* 17: 2858–2869
- [6] Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I et al. (2016) *Aspergillus* cell wall melanin blocks LC3-associated phagocytosis to promote pathogenicity. *Cell Host & Microbe* 19: 79–90
- [7] Schmidt F, Thywißen A, Goldmann M et al. (2020) Flotillin-dependent membrane microdomains are

Hier steht eine Anzeige.

Springer

required for functional phagolysosomes against fungal infections. *Cell Rep* 32: 108017

[8] Ferling I, Dunn JD, Ferling A et al (2020) Conidial melanin of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* disrupts cell autonomous defenses in amoebae. *mBio* 11: 00862–00820

[9] Hillmann F, Forbes G, Novohradská S et al. (2018) Multiple roots of fruiting body formation in amoebozoans. *Genome Biol Evol* 10: 591–606

[10] Radosa S, Ferling I, Sprague JL et al. (2019) The different morphologies of yeast and filamentous fungi trigger distinct killing and feeding mechanisms in a fungivorous amoeba. *Environ Microbiol* 21: 1809–1820

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Falk Hillmann
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI)
Beutenbergstraße 11a
D-07745 Jena
falk.hillmann@leibniz-hki.de

AUTORINNEN UND AUTOREN

Iuliia Ferling

2003–2009 Studium der Ökobiotechnologie an der National Aviation University Kiev, Ukraine. 2010–2014 Studium der Agrobiotechnologie an der Universität Gießen. 2015–2019 Doktorandin in der Gruppe von Dr. F. Hillmann am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena. Seit 2021 Postdoktorandin bei Prof. Dr. S. Grinstein am Hospital for Sick Children, Toronto, Kanada.

Silvia Radosa

2005–2010 Bachelor- und Masterstudium der Biologie bzw. Mikrobiologie an der Comenius-Universität Bratislava, Slowakei. 2014–2019 Doktorandin und seit 2020 Postdoktorandin in der Gruppe von Dr. F. Hillmann am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena.

Falk Hillmann

1999–2009 Biologiestudium und Promotion in Mikrobiologie an der Universität Rostock bei Prof. Dr. H. Bahl. 2009–2011 Postdoktorand am Institut Pasteur bei Prof. Dr. A. P. Pugsley, Paris, Frankreich. 2011–2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI) bei Prof. Dr. A. Brakhage. Seit 2016 Leiter der unabhängigen Nachwuchsgruppe *Evolution Mikrobieller Interaktionen*.

Hier steht eine Anzeige.

Springer