

Die Bedeutung von Glykokonjugaten
für die Pathogenität und das Wachstum des humanpathogenen
Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*



DISSERTATION

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

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von
Andrea Kotz

November 2010

angefertigt
am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität

**Die Bedeutung von Glykokonjugaten
für die Pathogenität und das Wachstum des humanpathogenen
Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus***

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

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Andrea Kotz

Dissertation eingereicht am: 25.11.2010
Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2011

Dekan: Prof. Dr. Benedikt Grothe
Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung
Sondergutachter: PD Dr. Frank Ebel

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den

Andrea Kotz

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Publikationen:

Luther K., Rohde M., Sturm K., Kotz A., Heesemann J., Ebel F. (2008): Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. *Microbes and Infection* 10 (2008), 175-184

Wagener J., Echtenacher B., Rohde M., Kotz A., Krappmann S., Heesemann J., Ebel F. (2008): The putative α -1,2-Mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryotic Cell* 7, (2008), 1661-1673

Kotz A., Wagener J., Engel J., Routier F., Echtenacher B., Pich A., Rohde M., Hoffmann P., Heesemann J., Ebel F. (2010): The *mitA* gene of *Aspergillus fumigatus* is required for mannosylation of inositol-phosphorylceramide, but is dispensable for pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology* 47 (2010), 169-178

Kotz A., Wagener J., Engel J., Routier F., Echtenacher B., Jacobsen I., Heesemann J., Ebel F.: Approaching the secrets of N-Glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: Characterization of the AfOch1 protein.
Accepted at PLOS One

Heesemann L.*, Kotz A.*, Echtenacher B., Routier F., Hoffmann P., Ebel F.: Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. Submitted to International journal of medical microbiology

* both authors contributed equally

Tagungsbeiträge

1st Life Science PhD Symposium, 7.12.2007 in München

Poster: *Aspergillus fumigatus* versus the innate immune system

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 21.-24.09.2008 in Dresden

Poster: Studies using two monoclonal antibodies specific for galactomannan

Statusworkshop der Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-06.03. 2009 in Tübingen

Vortrag: Characterization of the SurA protein in *Aspergillus fumigatus*

61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 20.-23.09.2009 in Göttingen

Poster: The *mitA* gene - required for mannosylation of inositol-phosphorylceramide, but dispensable for growth and sporulation of *Aspergillus fumigatus*

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 1 |
| 1.1.1 | Taxonomie, Morphologie, Lebenszyklus und Ökologie | 1 |
| 1.1.2 | Medizinische Bedeutung | 4 |
| 1.1.3 | Sporenhülle und Zellwand | 7 |
| 1.1.4 | Wichtige Glycostrukturen in <i>A. fumigatus</i> | 9 |
| 1.1.4.1 | Galactomannan | 9 |
| 1.1.4.2 | Mannosylierte Sphingolipide | 11 |
| 1.1.4.3 | Proteinglycosylierung | 12 |
| 1.2 | Interaktionen von <i>A. fumigatus</i> mit dem Wirt | 15 |
| 1.2.1 | Erste Konfrontation: Alveolare Epithelzellen | 15 |
| 1.2.2 | Primäre Verteidigungslinie: Residente Makrophagen | 16 |
| 1.2.3 | Zur Bekämpfung der Infektion rekrutiert: Neutrophile Granulozyten | 17 |
| 1.2.4 | Adaptive Immunantwort | 19 |
| 1.3 | Zielsetzung dieser Arbeit | 20 |
| 2 | Material und Methoden | 22 |
| 2.1 | Material | 22 |
| 2.1.1 | Organismen, Plasmide und Oligonukleotide | 22 |
| 2.1.2 | Medien | 27 |
| 2.1.2.1 | Bakterien-Medium | 27 |
| 2.1.2.2 | <i>Aspergillus</i> -Medien | 27 |
| 2.1.2.3 | Zellkultur-Medien und -Puffer | 30 |
| 2.1.3 | Antikörper | 31 |
| 2.1.3.1 | Primäre Antikörper | 31 |
| 2.1.3.2 | Sekundäre Antikörper | 32 |
| 2.1.4 | Fluoreszenzmarkierte Moleküle | 32 |
| 2.1.5 | Inhibitoren | 32 |
| 2.1.6 | Größenstandards | 33 |
| 2.1.7 | Chemikalien und Enzyme | 33 |
| 2.1.8 | Apparaturen, Geräte und Verbrauchsmaterialien | 33 |
| 2.2 | Methoden | 35 |
| 2.2.1 | Mikrobiologische Methoden | 35 |
| 2.2.1.1 | Kultur von <i>E. coli</i> | 35 |
| 2.2.1.2 | Kultur und Ernte von <i>A. fumigatus</i> | 35 |
| 2.2.1.3 | Wachstumsversuche mit <i>A. fumigatus</i> | 36 |
| 2.2.2 | Zellbiologische Methoden | 37 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.2.1 | Kultur und Kryokonservierung von Zelllinien: A549, J774 A.1 und MH-S | 37 |
| 2.2.2.2 | Isolierung, Differenzierung und Kultur von Knochenmarks-makrophagen | 38 |
| 2.2.2.3 | Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand | 39 |
| 2.2.2.4 | Isolierung und Kultur von Peritonealzellen | 39 |
| 2.2.2.5 | Kultur von Hybridomzelllinien..... | 40 |
| 2.2.2.6 | Infektionen von Zellen mit <i>A. fumigatus</i> | 40 |
| 2.2.2.7 | Generierung von Hybridomzelllinien zur Herstellung monoklonaler Antikörper | 41 |
| 2.2.2.8 | Infektionen von Mäusen mit <i>A. fumigatus</i> | 42 |
| 2.2.3 | Molekularbiologische Methoden | 43 |
| 2.2.3.1 | Amplifizierung von DNA-Fragmenten | 43 |
| 2.2.3.2 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 43 |
| 2.2.3.3 | Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. fumigatus</i> | 44 |
| 2.2.3.4 | Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen..... | 44 |
| 2.2.3.5 | Agarosegelelektrophorese | 44 |
| 2.2.3.6 | DNA-Extraktion aus Agarosegelen | 45 |
| 2.2.3.7 | Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren | 45 |
| 2.2.3.8 | Herstellung von Deletions- und Komplementationskonstrukten..... | 46 |
| 2.2.3.9 | Austausch einzelner Nukleotide..... | 47 |
| 2.2.3.10 | Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 47 |
| 2.2.3.11 | Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 48 |
| 2.2.3.12 | Transformation von <i>A. fumigatus</i> | 48 |
| 2.2.3.13 | Sequenzanalyse und Datenbankrecherche..... | 50 |
| 2.2.4 | Biochemische Methoden..... | 50 |
| 2.2.4.1 | Herstellung von <i>A. fumigatus</i> -Proteinextrakten | 50 |
| 2.2.4.2 | Herstellung nativer <i>A. fumigatus</i> -Proteinextrakte | 51 |
| 2.2.4.3 | Fällung von Proteinen | 51 |
| 2.2.4.4 | Aufreinigung von IgM-Antikörpern | 51 |
| 2.2.4.5 | Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen | 52 |
| 2.2.4.6 | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 52 |
| 2.2.4.7 | Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 53 |
| 2.2.4.8 | N-Acetylglucosaminidase- <i>in vitro</i> -Aktivitäts-Assay | 53 |
| 2.2.4.9 | Aufreinigung und Analyse von Glycosphingolipiden..... | 54 |
| 2.2.4.10 | N-Glycan-Analyse | 54 |
| 2.2.5 | Immunologische Methoden..... | 55 |
| 2.2.5.1 | Transfer von Proteinen auf Nitrocelulose-Membran (Western Blot)..... | 55 |
| 2.2.5.2 | Detektion von Proteinen mittels Antikörper..... | 55 |
| 2.2.5.3 | Bestimmung der Immunglobulinsubklasse monoklonaler Antikörper mittels ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) | 56 |
| 2.2.5.4 | Messung von Cytokin-Konzentrationen mittels ELISA | 57 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.5.5 | Messung von Cytokin-Konzentrationen mittels Durchflusszytometrie..... | 57 |
| 2.2.5.6 | Charakterisierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie..... | 57 |
| 2.2.6 | Mikroskopie | 58 |
| 2.2.6.1 | Lichtmikroskopie | 58 |
| 2.2.6.2 | Immunfluoreszenzfärbungen | 58 |
| 2.2.6.3 | Filipin-Färbung | 59 |
| 2.2.6.4 | Nachweis von Phagosomen durch Rhodamin-markiertes Dextran..... | 59 |
| 2.2.6.5 | Konfokale Laserscanning-Mikroskopie | 59 |
| 2.2.6.6 | Elektronenmikroskopie..... | 60 |
| 3 | Ergebnisse | 61 |
| 3.1 | Reaktionen verschiedener Immunzellen auf <i>A. fumigatus</i> | 61 |
| 3.1.1 | Erster Kontakt mit dem Pathogen <i>A. fumigatus</i> : alveolare Epithelzellen | 61 |
| 3.1.1.1 | Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Strukturen zur Aufnahme von Konidien..... | 61 |
| 3.1.1.2 | Keine Ausschüttung von IL-8 durch A549-Zellen als Reaktion auf <i>A. fumigatus</i> | 64 |
| 3.1.1.3 | Keine NFκB- und HIF-Aktivierung durch <i>A. fumigatus</i> in A549-Zellen | 65 |
| 3.1.2 | Primäre Verteidigungslinie bei der Bekämpfung von <i>A. fumigatus</i> : residente Makrophagen | 68 |
| 3.1.2.1 | Die Rolle des Cytoskeletts während der Phagozytose von Konidien..... | 68 |
| 3.1.2.2 | Bildung von großen Vakuolen während der Phagozytose von Konidien..... | 70 |
| 3.1.2.3 | Ausschüttung von Cytokinen als Reaktion auf <i>A. fumigatus</i> | 71 |
| 3.1.2.4 | Beeinflussung von Phagozytose und Cytokin-Ausschüttung durch Aktin und die PI 3-Kinase | 75 |
| 3.1.3 | Zur Bekämpfung der Infektion rekrutiert: neutrophile Granulozyten..... | 77 |
| 3.2 | Bedeutung von Glycostrukturen in <i>A. fumigatus</i> | 79 |
| 3.2.1 | Das amorphe Polysaccharid Galactomannan in der Zellwand von <i>A. fumigatus</i> | 80 |
| 3.2.1.1 | Fehlen von Galactofuranose in der Δglf -Mutante von <i>A. fumigatus</i> | 80 |
| 3.2.1.2 | Spezifität der Antikörper L10 und L99 für Galactomannan..... | 82 |
| 3.2.1.3 | Detektion von Mannan auf der Oberfläche der Δglf -Mutante | 84 |
| 3.2.1.4 | Eignung der α -Galactomannan-Antikörper zur Detektion von <i>A. fumigatus</i> in klinischen Proben..... | 85 |
| 3.2.1.5 | Bedeutung von Galactomannan für die Cytokin-Produktion muriner Makrophagen | 86 |
| 3.2.1.6 | Aufreinigung des α -Galactomannan-Antikörpers L10..... | 87 |
| 3.2.1.7 | Kein Einfluss des aufgereinigten L10-Antikörpers auf das Wachstum von <i>A. fumigatus in vitro</i> | 89 |
| 3.2.1.8 | Die Aktivierung des Komplementsystems durch <i>A. fumigatus</i> -Hyphen wird durch die Bindung des L10-Antikörpers verstärkt..... | 90 |
| 3.2.1.9 | Kein protektiver Effekt des L10-Antikörpers während einer systemischen-Infektion mit <i>A. fumigatus</i> | 92 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.2 | Die Rolle von mannosylierten Sphingolipiden als Bestandteil der Pilzoberfläche: Charakterisierung des MitA-Proteins von <i>A. fumigatus</i> | 93 |
| 3.2.2.1 | MitA- das zu den <i>S. cerevisiae</i> - und <i>C. albicans</i> -Proteinen Sur1 und Mit1 homologe <i>A. fumigatus</i> -Protein | 93 |
| 3.2.2.2 | Die Topologie von MitA | 95 |
| 3.2.2.3 | Deletion des <i>mitA</i> -Gens in <i>A. fumigatus</i> | 96 |
| 3.2.2.4 | Mangel an MIPC und MIPC-abgeleiteten Glycolipiden in der Δ <i>mitA</i> -Mutante | 99 |
| 3.2.2.5 | Analyse der Zellwand der Δ <i>mitA</i> -Mutante | 102 |
| 3.2.2.6 | Wachstumsinhibition der Δ <i>mitA</i> -Mutante durch hohe Calciumkonzentrationen | 104 |
| 3.2.2.7 | Verzögerte Auskeimung der Δ <i>mitA</i> -Mutante | 106 |
| 3.2.2.8 | Kein Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort von Makrophagen und die Virulenz von <i>A. fumigatus</i> | 108 |
| 3.2.2.9 | Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort von humanen Zellen | 110 |
| 3.2.3 | Bedeutung der N-Glycosylierung in Pilzen: Charakterisierung des AfOch1-Proteins ... | 111 |
| 3.2.3.1 | Das <i>afoch1</i> -Gen AFUA_5G08580 | 112 |
| 3.2.3.2 | Herstellung und Charakterisierung einer Δ <i>afoch1</i> -Mutante | 115 |
| 3.2.3.3 | Reduzierte Sporulation der Δ <i>afoch1</i> -Mutante bei hohen Calciumkonzentrationen | 116 |
| 3.2.3.4 | Bedeutung von AfOch1 für die Synthese von N-Glycanen in <i>A. fumigatus</i> | 119 |
| 3.2.3.5 | Kein Zusammenhang zwischen der Mannosyltransferase-Aktivität und der Ca ²⁺ -abhängigen Inhibition der Sporulation der Δ <i>afoch1</i> -Mutante | 122 |
| 3.2.3.6 | Erhöhte Virulenz der Δ <i>afoch1</i> -Mutante im murinen Infektionsmodell trotz unbeeinflusster Cytokin-Antwort | 123 |
| 3.2.3.7 | Unterschiede in den N-Termini Och1-ähnlicher Proteine in Hefen und filamentösen Pilzen | 124 |
| 3.2.3.8 | Charakterisierung des AfOch4-Proteins | 126 |
| 3.2.3.9 | Lokalisation von AfOch1 | 128 |
| 3.2.3.10 | Keine funktionelle Bedeutung des N-Terminus von AfOch1 | 129 |
| 4 | Diskussion | 131 |
| 4.1 | Interaktionen von <i>A. fumigatus</i> mit Immunzellen des Wirts | 132 |
| 4.2 | Galactomannan und seine Bedeutung für die Immunantwort auf <i>A. fumigatus</i> | 139 |
| 4.3 | Mannosylierte Sphingolipide und deren Rolle für die Stressresistenz und Virulenz von <i>A. fumigatus</i> | 147 |
| 4.4 | Proteinglycosylierung und deren Rolle für die Stressresistenz und Virulenz von <i>A. fumigatus</i> | 153 |
| 4.5 | Schlussfolgerungen | 160 |
| 5 | Zusammenfassung | 162 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 164 |

| | | |
|----------|------------------------------------|------------|
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 176 |
| 8 | Anhang | 179 |

1 Einleitung

1.1 *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Taxonomie, Morphologie, Lebenszyklus und Ökologie

Die Erstbeschreibung des filamentösen Pilzes *Aspergillus fumigatus* erfolgte 1863 durch den deutschen Arzt und Botaniker Johann Baptist Georg Fresenius. *Fumigatus* leitet sich dabei vom lateinischen Wort für Rauch, *fumus*, ab und ist vermutlich in Anlehnung an die Tatsache zu sehen, dass die zahlreichen graugrünen Konidien, wenn sie von der Luft aufgewirbelt werden, einer Rauchwolke ähneln. Die Gattung *Aspergillus* wurde bereits im Jahre 1729 durch den italienischen Gärtner und Botaniker Pier Antonio Micheli geschaffen. Namensgebend war in diesem Fall die Form der Konidienträger. Micheli wurde durch ihre Gestalt an ein Aspergill, einen Weihwasserwedel, erinnert. Im heutigen Sprachgebrauch wird die Gattung auch oft, ebenfalls aufgrund des Aussehens der Konidienträger, als Gießkannenschimmel bezeichnet. Sie umfasst 250 Arten, von denen mehr als 40 als humanpathogen eingestuft werden (Geiser *et al.*, 2007). Neben einigen pflanzenpathogenen Arten sind auch mehrere Arten bekannt, die aufgrund der Produktion extrazellulärer Enzyme, organischer Säuren und biotechnologisch wichtiger Sekundärmetabolite für den Menschen von Nutzen sind (Bennett, 2010). Aufgrund der Tatsache, dass für *A. fumigatus* kein sexueller Zyklus nachgewiesen werden konnte, obwohl bekannt war, dass der Pilz alle dafür nötigen Gene besitzt (Grosse and Krappmann, 2008), wurde er lange Zeit dem Form-Taxon der Deuteromycota oder *fungi imperfecti* zugeordnet. Erst im Januar 2009 wurde die Entdeckung der sexuellen Reproduktion von *A. fumigatus* veröffentlicht, woraufhin die Art in ihre natürliche Klasse, die der Ascomycetes gestellt werden konnte, wobei die teleomorphe Form *Neosartorya fumigata* genannt wurde (O'Gorman *et al.*, 2009). *A. fumigatus* besitzt mit 29,4 Mb das kleinste bislang sequenzierte Genom aller *Aspergillus*-Spezies (Bennett, 2010). Es ist auf 8 Chromosomen verteilt und enthält 9926 potentielle Gene (Nierman *et al.*, 2005). Ruhende Konidien, 2-3 µm große mitotische Sporen, stellen die sehr effiziente Verbreitungseinheit der Pilze dar und dienen zudem als Überdauerungsstadium während widriger Lebensumstände. In den Konidien werden große Mengen Trehalose eingelagert, die als kompatibles Solut die Fähigkeit zum Überleben über längere Zeiträume sichern (Ni and Yu, 2007). Die charakteristische grüne Färbung der Konidien resultiert aus einer Pigmentierung mit Melanin. Treffen die Konidien durch Luftverbreitung auf eine feste Oberfläche, setzen sie sich dort fest und beginnen in Abhängigkeit von Kohlenstoff- und

Stickstoffquelle, aber auch Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert und anderen Verhältnissen auszukeimen. Dieser Prozess ist bis heute nicht im Detail bekannt, man weiß jedoch, dass er von zahlreichen Rezeptoren und Signalwegen kontrolliert wird. Zunächst wird von der Spore wahrgenommen, dass verschiedene essentielle Nährstoffe wie Zucker, Salze und Aminosäuren vorhanden sind, wobei sich die verschiedenen Pilze in ihren Anforderungen unterscheiden. Ist die Germination einmal ausgelöst, schwellen die Sporen an und eine Reihe metabolischer Aktivitäten wird in Gang gesetzt, wie z.B. der Umbau der Zellwand, die Proteinbiosynthese und der Abbau von Trehalose (d'Enfert and Fontaine, 1997; Schmit and Brody, 1976). Während des Anschwellens wächst die Spore isotrop, nach einigen Stunden bildet sich jedoch ein Keimschlauch und polares Wachstum in Richtung des terminalen Bereiches setzt ein. Durch Verzweigung der einzelnen Hyphen entsteht ein dichtes Geflecht, das als Myzel bezeichnet wird. Die Hyphen sind durch Septen unterteilt, jedoch ermöglichen Poren den Austausch von Cytoplasma und Nährstoffen zwischen den Kompartimenten. Bei Luftkontakt des Myzels kommt es zur Bildung der Konidienträger (Abb. 1). Dabei wächst aus der sogenannten Fußzelle senkrecht ein Stiel, auch Konidiophor genannt, heraus. Beim Fortschreiten der Konidiogenese verdickt sich das Konidiophor an der Spitze und bildet ein birnenförmiges Vesikel, aus dem die keulenförmigen grünlichen Phialiden herauswachsen. Phialiden sind, genau wie die Hyphen des Pilzes zönozytisch, besitzen also mehr als einen Zellkern. Diese werden dann in den konidienproduzierenden Tubus geschoben, wo sie nacheinander abgeschnürt werden. Im Ergebnis entspringt an jedem Tubus eine einzelne,

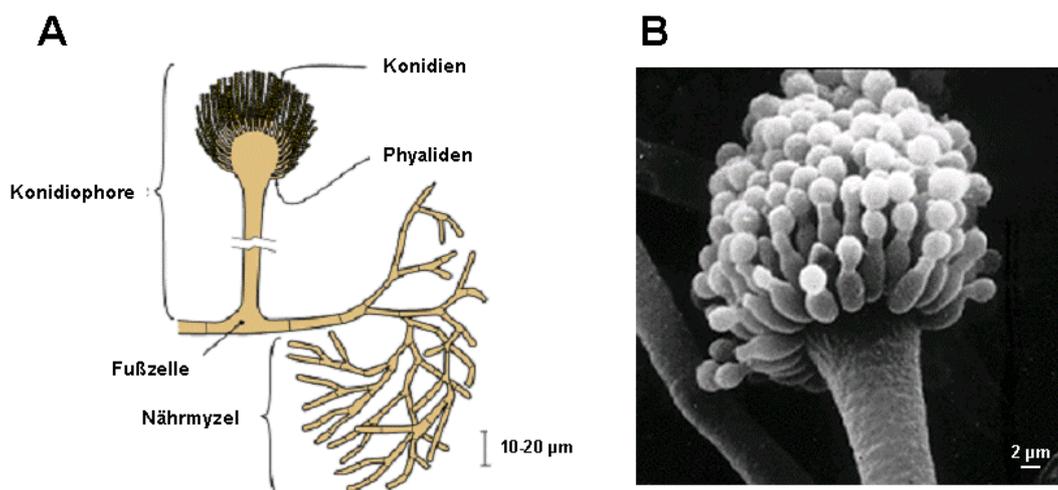


Abb. 1 Morphologie von *A. fumigatus*

Schematische Darstellung der Morphologie von *A. fumigatus* (Schwienbacher, 2005) (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors (<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/105899>) (B)

unverzweigte Kette von Konidien. Diese enthalten bei den meisten *Aspergillus*-Arten jeweils einen Zellkern, es sind jedoch auch Arten bekannt, deren Konidien bis zu zwölf Kerne aufweisen. Nach der Reifung der abgeschnürten Sporen können diese durch den Wind verbreitet werden und ein neuer Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt (Abb. 2).

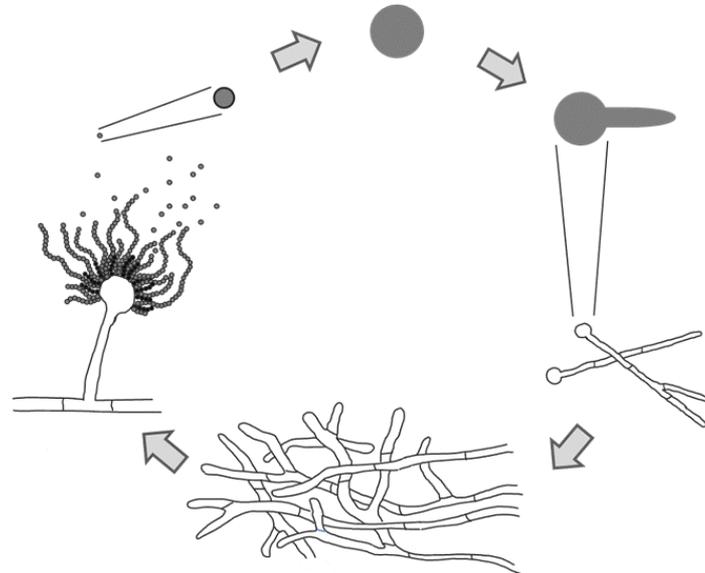


Abb. 2 Lebenszyklus von *A. fumigatus*

Treffen ruhende, durch Wind verbreitete Konidien auf eine Oberfläche mit geeigneten Bedingungen, können sie anschwellen, auskeimen und Hyphen bilden. Befindet sich das Myzel in Kontakt zur Luft, bilden sich aus sogenannten Fußzellen Konidiophoren, denen ein Vesikel mit Konidien-abschnürenden Phialiden aufsitzt.

Das natürliche Habitat von *A. fumigatus* ist der Boden, wo er sich saprophytisch und damit chemoorganotroph ernährt. Aufgrund von zahlreichen sekretierten Enzymen und Proteasen ist der Pilz in der Lage, nahezu alle in organischem Abfall enthaltenen Makromoleküle zu einfachen Verbindungen zu zersetzen. Beispiele der zahlreichen Nährstoffquellen sind Zucker, Fettsäuren, Proteine, Zellulose, Hemizellulose, Pektin und weitere Zuckerpolymere (Bennett, 2010). *A. fumigatus* zählt zu den thermotoleranten Organismen, und gutes Wachstum erfolgt über ein breites Temperaturspektrum von 30°C-45°C (Cooney und Emerson, 1964), wobei die optimale Wachstumstemperatur bei 37°C, die maximale bei 55°C liegt (Latge 1999). Auch noch bei bis zu 70°C ist der Pilz lebensfähig (Raper und Fenell, 1965). Die Fähigkeiten, eine Vielzahl organischer Verbindungen als Nährstoffe zu nutzen und sich an die verschiedensten Umweltbedingungen anzupassen, machen *A. fumigatus* zu einem ubiquitär verbreiteten Organismus.

1.1.2 Medizinische Bedeutung

Aufgrund der weiten Verbreitung von *A. fumigatus* atmet der Mensch täglich mehrere hundert Sporen ein, die zugleich das infektiöse Agens für Pilzkrankungen darstellen (Latge, 1999). Bedeutend ist in diesem Zusammenhang, dass die menschliche Lunge nicht die natürliche Nische dieses eigentlich im Boden lebenden Organismus ist. Somit gab es keine evolutionäre Anpassung des Pilzes an dieses Habitat, und bis heute konnten keine Virulenzfaktoren gefunden werden. Ob eine Konfrontation mit *A. fumigatus* zu einer Infektion führt, hängt deshalb vom vorherigen Gesundheitszustand des Menschen ab. Für einen Großteil der verursachten Krankheiten sind eine allergische Disposition, vorherige Erkrankungen der Lunge, wie z.B. Tuberkulose oder aber eine Schwächung des Immunsystems Voraussetzung. In den meisten Fällen werden *A. fumigatus*-Sporen, die bis in die unteren Atemwege vordringen, von Zellen des angeborenen Immunsystems eliminiert (Latge, 1999). Da die protektive Antwort des angeborenen Immunsystems bei immunsupprimierten Menschen geschwächt ist, stellen diese Patienten die größte Risikogruppe für *Aspergillus*-Infektionen dar. Der Status von *A. fumigatus* als relativ unbedeutender, opportunistischer Krankheitserreger änderte sich in den letzten Jahrzehnten. Mit einem Anstieg der Zahl der immunkomprimierten Patienten steigerte sich auch die klinische Relevanz von *A. fumigatus*. Neben einer angeborenen oder erworbenen Immundefizienz durch Krankheiten wie z.B. Neutropenie, Chronischer Granulomatose, Leukämie oder AIDS spielt die therapeutische Immunsuppression bei vielen Erkrankungen oder medizinischen Eingriffen eine immer größere Rolle. Beispiele hierfür wären Langzeit-Therapien mit Immunsuppressiva z.B. nach Transplantationen oder bei Autoimmunkrankheiten, hochdosierte Glucocorticoid-Behandlungen oder neue, intensive Chemotherapieverfahren, die bei unterschiedlichen Krebserkrankungen wie Tumoren, Lymphomen, Myelomen und Leukämien eingesetzt werden (Dagenais and Keller, 2009). Durch die stetige Weiterentwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten steigt auch die Zahl der immundefizienten Menschen und damit die der *A. fumigatus*-Infektionen an. Somit sind diese Infektionen im Wesentlichen eine Folge der modernen Medizin.

Zu bedenken ist, dass neben Sporen von *A. fumigatus* auch die zahlreicher anderer Pilzspezies in die menschlichen Atemwege gelangen. Dennoch werden Pilzinfektionen in erster Linie von *A. fumigatus*, zu einem kleineren Teil auch von *A. terreus*, *A. flavus* und wenigen anderen Spezies ausgelöst (Marr *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2005). Dies lässt auf bestimmte selektive Mechanismen auch in immunsupprimierten Patienten schließen, sodass eingedrungene Sporen der meisten Arten eliminiert werden, noch bevor sie die unteren Atemwege erreichen. Im Moment jedoch ist das Wissen über diese Selektion noch sehr

begrenzt (McCormick *et al.*, 2010b). Ein wichtiges Merkmal der meisten Pilzspezies ist Optimum der Wachstumstemperatur bei Raumtemperatur, weshalb sie vor allem in Insekten, Amphibien und Pflanzen wichtige Pathogene darstellen. Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass die Endothermie der Wirbeltiere einen generellen Schutz gegenüber Pilzinfektionen vermittelt (Casadevall, 2005). Diese protektive Wirkung der Körpertemperatur ist im Fall von *A. fumigatus* aufgrund dessen bereits erwähnter Thermotoleranz jedoch aufgehoben, genauer gesagt entspricht die optimale Wachstumstemperatur von 37°C genau der des menschlichen Körpers, weshalb *A. fumigatus* bei der Kolonisierung der menschlichen Lunge einen Vorteil gegenüber anderen Pilzspezies hat. Weiterhin könnte die Thermotoleranz ein Beispiel für die generelle Robustheit von *A. fumigatus* und die Fähigkeit, sich an verschiedene Stresssituationen anzupassen, darstellen. Dies, zusammen mit der ubiquitären Verbreitung des Pilzes sind vermutlich auch die Gründe dafür, dass *A. fumigatus* trotz fehlender Virulenzfaktoren in der Lage ist, beim Menschen Infektionen zu verursachen, die ihn zu dem bedeutendsten luftübertragenen Pilzpathogen machen (McCormick *et al.*, 2010b).

Die schwerste von *A. fumigatus* ausgelöste Krankheit ist die invasive Aspergillose. Diese kann sich, außer in Ausnahmefällen, nur bei Patienten mit starker Immunsuppression entwickeln. Bei gesunden Individuen werden eingedrungene Sporen, die nicht schon durch mukoziliäre Klärung entfernt wurden, von residenten Phagozyten, also Makrophagen oder Epithelzellen, oder aber von rekrutierten Neutrophilen bekämpft. Diese Reaktion des angeborenen Immunsystems ist bei immunsupprimierten Patienten geschwächt, weshalb das Pilzwachstum in manchen Fällen nicht eingedämmt wird. Der weitere Verlauf der Erkrankung hängt maßgeblich von der Art der Immunsuppression ab (Abb. 3). Während bei Neutropenie-Patienten aufgrund des Mangels an Neutrophilen das Entzündungslevel sehr gering ist, und es dadurch zur Angioinvasion und Verbreitung des Pilzes über den Blutkreislauf auf andere Organe kommt, ist die Infektion bei Patienten, die aufgrund einer Corticosteroid-Therapie immunsupprimiert sind, durch limitiertes Pilzwachstum mit starkem Neutrophilen-Influx, hohem Entzündungslevel und Gewebeschäden gekennzeichnet. Somit sterben Neutropenie-Patienten mit *A. fumigatus*-Infektionen häufig an dem unkontrollierten Wachstum des Pilzes, wohingegen bei Patienten mit Corticosteroid-Therapie eine überschießende Entzündungsreaktion mit folgenden Gewebeschäden die Todesursache ist (Dagenais and Keller, 2009). Auf die detaillierte Reaktion von Neutrophilen und anderen Immunzellen des Wirts auf *A. fumigatus* wird in Punkt 1.2 noch genauer eingegangen.

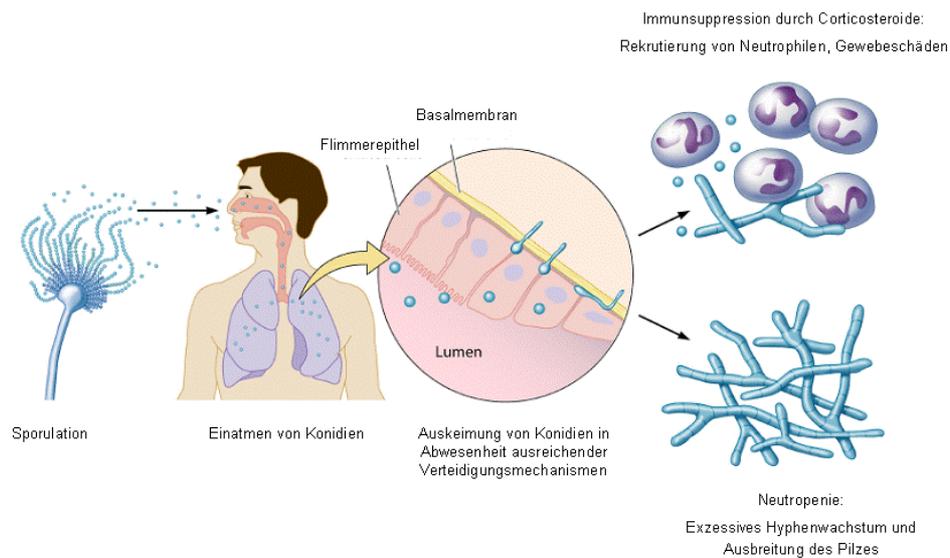


Abb. 3 Entwicklung einer invasiven Aspergillose abhängig von der Art der Immunsuppression

Luftverbreitete, eingeatmete Sporen können bei mangelnder Abwehr auskeimen und das Lungengewebe infiltrieren. Im weiteren Verlauf kommt es im Falle einer Neutropenie zu exzessivem Pilzwachstum mit Verbreitung auf andere Organe oder aber, bei Corticosteroid-induzierter Immunsuppression zu starker Rekrutierung von Neutrophilen und daraus folgenden Gewebeschäden. (modifiziert nach Dagenais and Keller, 2009)

Die Problematik bei dieser Infektion besteht in ihrer Invasivität. Dies unterscheidet sie von anderen *A. fumigatus*-Infektionen, an denen auch immunkompetente Individuen erkranken können (Abb. 4). Wiederum ist jedoch der vorherige Gesundheitszustand ausschlaggebend. So ist es z. B. möglich, dass Krankheiten wie Tuberkulose Kavitäten in der Lunge zurücklassen, in denen sich Konidien festsetzen und ein Aspergillom bilden können. Im Unterschied zur invasiven Aspergillose wird bei dieser auch als Pilzball bezeichneten Erkrankung das gesunde, die Höhle umgebende Lungengewebe nicht durch den Pilz infiltriert. Patienten, die an Asthma und cystischer Fibrose leiden, weisen eine hohe Disposition für die Ausbildung einer allergisch-bronchopulmonalen Aspergillose auf. Auch diese Krankheit ist nicht invasiv, geht jedoch genau wie die invasive Aspergillose oder das Aspergillom mit einer Kolonisierung des Wirts einher. Dies unterscheidet sie von rein allergischen Reaktionen auf die ubiquitär verteilten Sporen des Pilzes, wie es beim allergisch bronchialen Asthma der Fall ist.

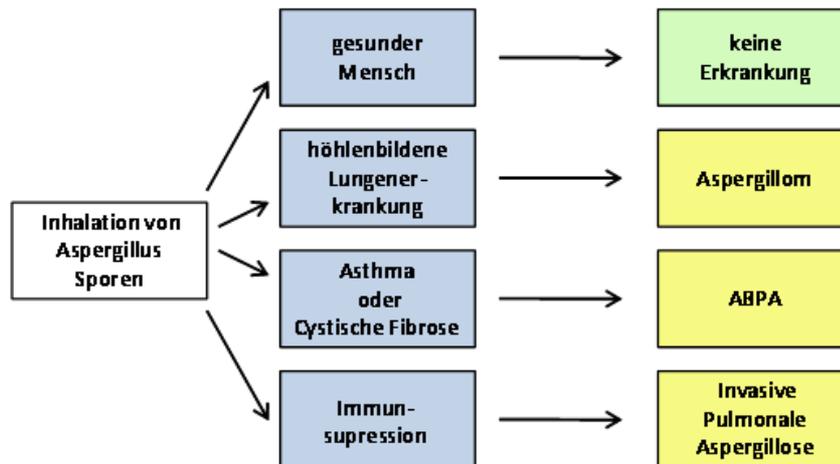


Abb. 4 Mögliche von *A. fumigatus* verursachte Erkrankungen

Eine Inhalation von *A. fumigatus*-Sporen kann, abhängig vom vorherigen Gesundheitszustand des Patienten, zu verschiedenen Erkrankungen führen (Bauer, 2010)

1.1.3 Sporenhülle und Zellwand

Mit dem Anstieg der klinischen Relevanz von *A. fumigatus*, vor allem durch die Zunahme der immunsupprimierten Patienten wuchs auch das Interesse an der Interaktion des Pilzes mit Wirtszellen. Von großer Bedeutung ist dabei die pilzliche Zellwand, da diese in ständigem Kontakt mit der Umwelt und damit auch den Immunzellen des Wirts steht (Bernard and Latge, 2001), und dadurch die Adhäsion an Oberflächen oder andere Zellen vermittelt. Zugleich stellt sie einen wichtigen Unterschied zwischen Pilzzellen und denen anderer Eukaryonten, z.B. Säugetierzellen dar und schützt durch ihre starre Struktur den Pilz vor Umwelteinflüssen, wie z.B. Änderungen des osmotischen Drucks. Sämtliche Veränderungen in der Umgebung des Pilzes werden über die Zellwand registriert und ausgehend von dort über intrazelluläre Signaltransduktionswege weitergeleitet (Levitz, 2010). Weitere Bedeutung erlangt die Zellwand durch die Tatsache, dass viele der in ihr vorhandenen Polysaccharide keine entsprechenden Strukturen in Säugetieren haben, was die Biosynthese der Zellwand-Polysaccharide zu einem wichtigen Angriffsziel neuer Antifungizide mit geringen Nebenwirkungen für den Menschen macht. Ein Beispiel hierfür stellen die Echinocandine dar, Inhibitoren der β -1,3-Glucan-Synthese, die aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums und der niedrigen Toxizität immer häufiger eingesetzt werden (Bernard and Latge, 2001;Hohl, 2008). Somit sprechen zahlreiche Gründe für eine konkrete Untersuchung der Pilzoberfläche. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass *A. fumigatus* als filamentöser Pilz seine Oberfläche während des Ablaufs seines Lebenszyklus ändert. Bei

ruhenden Sporen ist die Zellwand durch eine äußere Schicht verdeckt, die die beiden hydrophoben Proteine RodAp und RodBp enthält. Beide Proteine sind nicht im Myzel zu finden (Paris *et al.*, 2003). Vor allem RodAp, über GPI-Reste kovalent an die Konidien-Zellwand gebunden, ist für die charakteristische „rodlet“-Struktur der Konidien-Oberfläche verantwortlich, die namensgebend für das Protein war. Inzwischen ist bekannt, dass diese hydrophobe „rodlet“-Struktur auf der Oberfläche der Konidien dafür sorgt, dass diese immunologisch inert sind (Aimanianda *et al.*, 2009). Für den Pilz bedeutet dies, dass er in Form von ruhenden Konidien den Verteidigungsmechanismen des Immunsystems im Wirt entgehen kann, bis die Konditionen für die Germination geeignet sind.

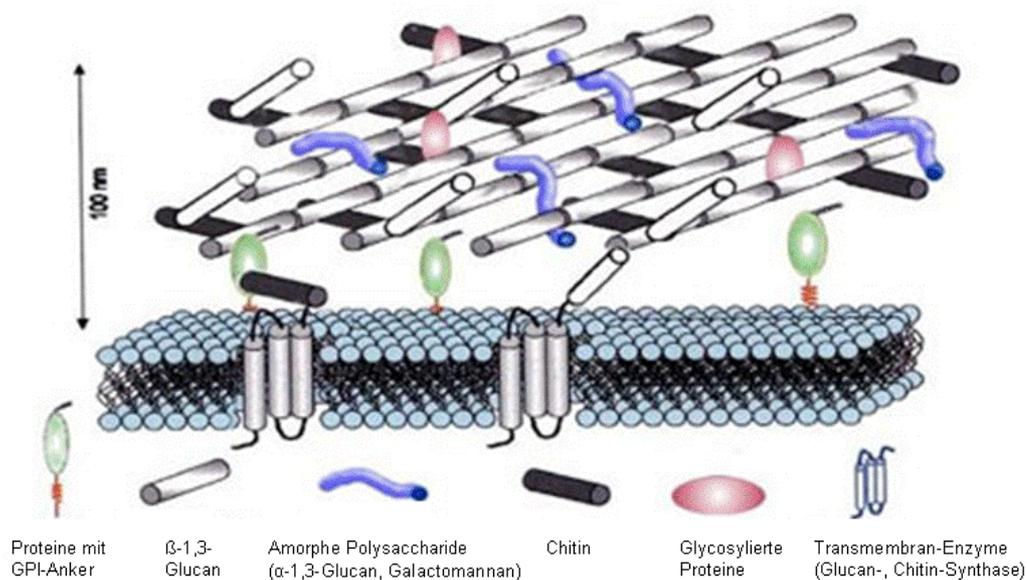


Abb. 5 Dreidimensionales Schema der Zellwand von *A. fumigatus*

Die Zellwand von *A. fumigatus* besteht im Wesentlichen aus den Hauptkomponenten β -1,3-Glucan, Chitin, α -1,3-Glucan, Galactomannan, sowie verschiedenen Proteinen.

(modifiziert nach <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2003/print/Aspergil-en.html>)

Während des Auskeimungsprozesses, der damit beginnt, dass die Konidien auf eine Größe von ca. 5 μ m anschwellen, wird diese Proteinschicht abgeworfen und eine glatte Oberfläche kommt zum Vorschein (Rohde *et al.*, 2002). Die ab diesem Zeitpunkt exponierte pilzliche Zellwand ist eine komplexe Struktur, die aus verschiedenen Polysacchariden besteht (Latge *et al.*, 2005). Das Grundgerüst der Zellwand wird durch eine starre Struktur aus β -1,3-Glucan gebildet, das über β -1,4-Bindungen an Chitin gekoppelt ist (Abb. 5). Chitin selbst besteht aus β -1,4-verknüpften N-Acetylglucosamin-Einheiten. Dieses Gerüst hat einen Anteil von 30% an der gesamten Pilzzellwand und ist eingebettet in eine amorphe Bindesubstanz aus α -1,3-Glucan und Galactomannan, welches im Folgenden noch näher

charakterisiert wird. Spezifisch für *A. fumigatus* sind lineare β -1,3,- β -1,4-Glucan-Ketten, die kovalent an das Grundgerüst gebunden sind.

Die verschiedenen Komponenten innerhalb der Zellwand stellen aufgrund ihrer ständigen Exposition gegenüber den Immunzellen des Wirts Strukturen dar, die von Rezeptoren auf diesen Zellen erkannt werden können. Da es unter allen Pathogenen verschiedene derartige Strukturen gibt, die in bestimmten Mustern organisiert sind, werden diese als Pathogen-assoziierte molekulare Muster, oder, nach ihrer englischen Bedeutung *pathogen-associated molecular patterns* kurz PAMPs genannt. Die entsprechenden Rezeptoren auf den Immunzellen werden als Muster-Erkennungs-Rezeptoren, oder nach *pattern recognition receptors* PRRs bezeichnet. β -1,3-Glucan, das den größten Anteil an der pilzlichen Zellwand hat, stellt dabei das einzige bisher bewiesene PAMP in *A. fumigatus* dar (Steele *et al.*, 2005; Luther *et al.*, 2007). Es wird durch den zur Familie der Nicht-klassischen C-Typ-Lektine gehörenden Rezeptor Dectin-1 erkannt, der auf Makrophagen, Neutrophilen sowie Dendritischen Zellen zu finden ist.

1.1.4 Wichtige Glycostrukturen in *A. fumigatus*

Die für den Aufbau der Zellwand wichtigen Polysaccharide bestehen im Wesentlichen aus Glucose, N-Acetylglucosamin, Galactose und Mannose. Vor allem Mannose spielt bei der Zusammensetzung vieler wichtiger Glycostrukturen innerhalb der Zellwand eine Rolle. Nicht nur im Galactomannan als Teil der amorphen Bindesubstanz innerhalb der Zellwand, auch durch die Mannosylierung von Sphingolipiden und Proteinen ist Mannan in vielen Glycostrukturen von *A. fumigatus* zu finden.

1.1.4.1 Galactomannan

Galactomannan ist ein Polysaccharid, dessen Hauptkette aus D-Mannose-Einheiten besteht, die α -1,2-glycosidisch verknüpft sind und eine helikale Schrauben-Struktur bilden. In unregelmäßigen Abständen treten Seitenketten aus 4 bis 5 Galactose-Molekülen auf, die in sich β -1,5-glycosidisch verknüpft und über β -1,3- oder β -1,6-glycosidische Bindungen an die Mannose gebunden sind (Latge *et al.*, 1994). In der Zellwand von *A. fumigatus* ist Galactomannan kovalent an β -1,3-Glucan gebunden (Abb. 6) Von Bedeutung ist dabei, dass die Galactose dabei als Galactofuranose vorliegt, einer sehr seltenen Ringform. Diese ist auf der Oberfläche von verschiedenen pathogenen Pro- und Eukaryonten vorhanden, wie z.B. *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, und eben Pilzen wie *Penicillium*, *Histoplasma*,

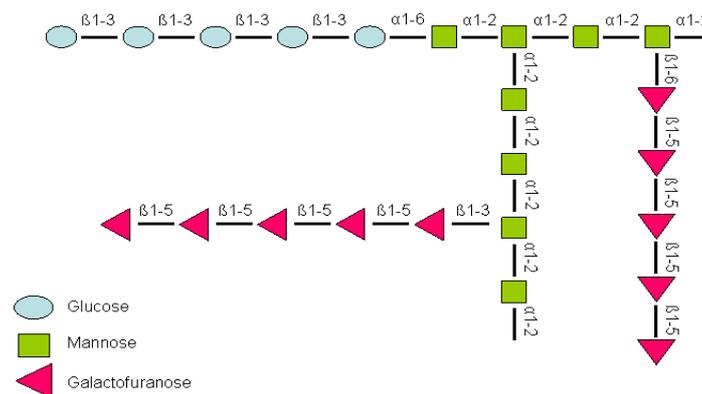


Abb. 6 Galactomannan in der Zellwand von *A. fumigatus*

In der Zellwand von *A. fumigatus* besteht Galactomannan aus einer Hauptkette aus D-Mannose, die kovalent an β -1,3-Glucan gebunden ist und Seitenketten aus 4-5 Galactoseresten enthält. Die Galactose liegt dabei als Galactofuranose vor.

Cryptococcus und *Aspergillus*. Im Menschen dagegen ist Galactofuranose nicht zu finden, Galactose liegt hier nur in der Pyranose-Form vor. Diese Tatsache ermöglicht die Diagnostik der invasiven Aspergillose und macht Galactofuranose zu einem potentiellen Zielmolekül antimikrobieller Therapien (Pedersen and Turco, 2003). Tatsächlich kann die Struktur in Serum, Urin und Bronchialsekret von Patienten mit invasiver Aspergillose nachgewiesen werden (Mennink-Kersten *et al.*, 2006), was dazu führte, dass ein kommerziell erhältlicher ELISA zur Diagnostik einer Aspergillose entwickelt werden konnte, dessen Grundlage ein Anti-Galactofuranose-Antikörper ist. Bisher ist noch nicht genau geklärt, aus welchen pilzlichen Strukturen bzw. Glycokonjugaten die in den Körperflüssigkeiten der Patienten detektierte Galactofuranose stammt, da sie nicht nur Bestandteil des Galactomannans in der Zellwand ist, sondern auch in O- und N-Glycan-Seitenketten von sekretierten Proteinen, in GPI-verankertem Lipophosphogalactomannan und in einigen Sphingolipiden zu finden ist (Latge, 2009). Für die medizinische Mykologie ist Galactomannan zudem durch seine hohe Immunreaktivität interessant, da es eine humorale Immunantwort im Wirt auslöst (Ponton *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Galactomannan ähnlich wie β -1,3-Glucan als Bestandteil der Zellwand ein wichtiges PAMP darstellt, das durch Rezeptoren auf den Immunzellen erkannt werden kann.

1.1.4.2 Mannosylierte Sphingolipide

Die Oberfläche von *A. fumigatus*-Hyphen besteht aus der Zellwand und der darunterliegenden Plasmamembran. Auch innerhalb der Membran spielen mannosylierte Strukturen eine Rolle, in Form der dort vorhandenen Sphingolipide. Diese bilden eine vielseitige Klasse von Membranlipiden, die in Eukaryonten einen beträchtlichen Anteil an der zellulären Lipidfraktion haben können (Brennan and Losel, 1978). Alle Sphingolipide enthalten ein Ceramid-Rückgrat aus einem langkettigen Aminoalkohol, der über eine Säureamid-Bindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Durch Anfügen einer Kopfgruppe aus verschiedenen Zuckerphosphatresten entstehen drei Klassen von Sphingolipiden: Inositol-Phosphorylceramide (IPCs), Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramide (MIPCs) und Mannosyl-di-Inositol-Phosphorylceramide (M(IP)₂Cs) (Abb. 7), (Dickson and Lester, 1999a; Dickson and Lester, 1999b).

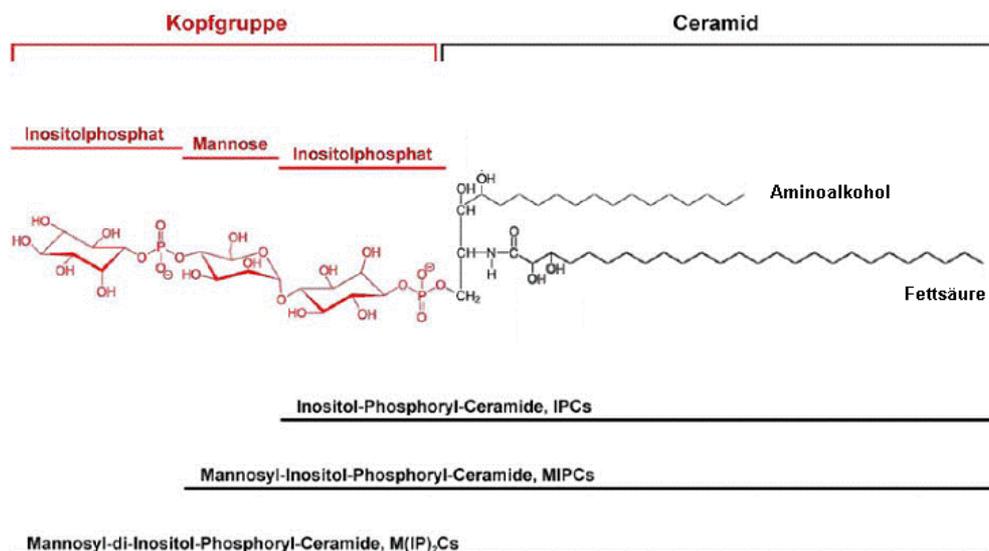


Abb. 7 Sphingolipide in Pilzen

Sphingolipide sind in Pilzen in drei Klassen zu unterteilen: IPCs, MIPCs und M(IP)₂Cs. Alle bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und einem Ceramid-Rückgrat mit einem langkettigen Alkohol und einer überlangen Fettsäure (modifiziert nach (Betz, 2005))

Neben diesen drei Klassen sind Sphingolipide auch innerhalb der Glycosyl-Phosphatidyl-Membrananker einiger Proteine zu finden. Die Synthese der Ceramide erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum, von dort aus werden sie zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie ihre endgültigen Modifikationen erfahren. Hier erfolgt auch die Mannosylierung mit Hilfe einer α -1,2-Mannosyltransferase, die in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Sur1) und *Candida albicans* (Mit1) bereits näher charakterisiert ist (Beeler *et al.*, 1997; Mille *et al.*,

2004). Das entstandene MIPC kann schließlich noch durch eine Inositolphosphotransferase in ein Molekül der dritten Klasse, $M(IP)_2C$, umgewandelt werden (Dickson and Lester, 1999a). Durch Modifikationen der Kopfgruppen können in *S. cerevisiae* bis zu 30 verschiedene Arten von Sphingolipiden entstehen.

Lange Zeit wurde Sphingolipiden nur eine Rolle als Strukturkomponente der Biomembran zugeschrieben, indem sie zur Aufrechterhaltung der Membranstabilität benötigt werden. Seit Jahren mehren sich jedoch Hinweise, wonach Sphingolipide sowie deren Synthese- und Abbau-Intermediate an wichtigen Signaltransduktions-Ketten der eukaryontischen Zelle beteiligt sind (Hannun and Bell, 1989; Dressler *et al.*, 1992). Zusammen mit Ergosterolen sind Sphingolipide in inselartigen Ansammlungen, sogenannten *lipid rafts*, organisiert, die sich frei in der Membran bewegen können. Diese werden mit der Endozytose und der Regulation des sub-corticalen Aktin-Cytoskeletts in Verbindung gebracht.

In Hefen ist bereits bekannt, dass die Mannosylierung der IPCs einen Einfluss auf die Resistenz der Organismen gegenüber Zellwandstress hat (Beeler *et al.*, 1997; Mille *et al.*, 2004), in filamentösen Pilzen jedoch ist die Bedeutung der MIPCs noch ungeklärt. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass das aus MIPC entstandene Glycolipid GSL B eine proinflammatorische Immunantwort als Reaktion auf *A. fumigatus* auslöst (Bozza *et al.*, 2009). Dies deutet auf eine Rolle der mannosylierten Sphingolipide bei der Erkennung des Pilzes hin. Verstärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass in *C. albicans* MIPC als essentielle Vorläuferform von Phospholipomannan gilt, einem wichtigen PAMP dieses Organismus, das von Immunzellen mit Hilfe des Rezeptors TLR2 erkannt wird und über den Transkriptionsfaktor NF κ B die Produktion des proinflammatorischen Cytokins TNF α auslöst (Mille *et al.*, 2004; Levitz, 2010). Eine Deletion der α -1,2-Mannosyltransferase in *C. albicans* führte zu einer Reduktion der Virulenz, was ein weiterer Hinweis für die Relevanz mannosylierter Sphingolipide im Bezug auf die Interaktion zwischen pathogenen Pilzen und Immunzellen ist.

1.1.4.3 Proteinglycosylierung

Große Bedeutung erlangt die kovalente Bindung von Zuckerresten durch die Glycosylierung von Proteinen. Diese stellt einen wichtigen co- oder posttranslationalen Prozess in Eukaryonten sowie *Eubacteria* und *Archaea* dar (bu-Qarn *et al.*, 2008), der die Faltung, die biologische Aktivität und die Stabilität der Proteine beeinflusst und zudem ausschlaggebend ist für den intrazellulären Transport, also das Proteintargeting. Die

Relevanz von Zellwandstrukturen als potentielle Ziele neuer Antimykotika und für die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts wurde bereits in Abschnitt 1.1.4 dargestellt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang ist, dass der Großteil aller Proteine in der Pilzzellwand glycosyliert ist. Diese Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, wandern dann weiter durch den Golgi-Apparat und gelangen schließlich mit Hilfe von Vesikeln zur Zellwand oder werden sekretiert. Die Glycosylierung findet während des Transports im ER bzw. im Golgi-Apparat statt. Dabei wird unterschieden zwischen O-Glycosylierung und N-Glycosylierung von Proteinen.

Die O-Glycosylierung erfolgt über den Hydroxy-Sauerstoff der Serin- und Threonin-, seltener auch Tyrosin-, Hydroxyprolin- oder Hydroxylysin-Seitenketten der Proteine. Dieser Prozess erfolgt als posttranslationale Modifikation im Golgi-Apparat (Spiro, 2002). In Pilzen beginnt die O-Glycosylierung mit der Bindung von Mannose an das Protein, das letztendlich eine Modifikation durch ein Polysaccharid aus lediglich α -1,2-verknüpften Mannoseresten erfährt (Deshpande *et al.*, 2008). Dieser als O-Mannosylierung bezeichnete Prozess wurde in *S. cerevisiae* entdeckt (Sentandreu and Northcote, 1968), und lange Zeit ging man davon aus, dass diese Modifikation nur in Pilzen stattfindet. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass diese Art der O-Glycosylierung innerhalb der Pilze und Säugetiere hochkonserviert ist und dass auch Bakterien zur O-Mannosylierung fähig sind (Lommel and Strahl, 2009). In Säugetierzellen startet die O-Glycosylierung in den meisten Fällen mit der kovalenten Bindung von N-Acetylgalactosamin an Serin- bzw. Threonin-Seitenketten des Proteins. Dies ist der Ausgangspunkt für die Bildung eines komplexen Polysaccharids, bestehend aus verschiedenen Zuckern, das kovalent an das Protein gebunden ist.

Während der N-Glycosylierung werden die Glycokonjugate an die Asparagin- oder Arginin-Seitenketten der Proteine gehängt. Dieser cotranslationale Prozess startet im Cytoplasma und wird im ER und im Golgi-Apparat fortgesetzt. Dabei wird zunächst auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran ein Vorläufer-Oligosaccharid aus Mannose- und N-Acetylglucosamin-Resten an einem Dolichol-Träger synthetisiert, welches dann über die Membran hinweg in das Lumen des ER geklappt wird, wo weitere Mannose- und Glucose-Reste angehängt werden, bevor das Zuckergerüst auf die Asparagin-Seitenkette des wachsenden Polypeptids übertragen wird. Während der nun folgenden Modifikation der Glycostruktur werden die Glucose- und auch ein Teil der Mannosereste wieder entfernt, woraufhin das Protein in den Golgi-Apparat transportiert wird, wo die Glycostruktur durch Anhängen verschiedener Zucker noch weiter verzweigt und verlängert wird (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Die im ER gebildete Kernstruktur ist in allen eukaryontischen Zellen sehr ähnlich, jedoch besteht eine sehr große Diversität unter den im Golgi-Apparat erzeugten

Modifikationen. Die N-Glycane in Hefen sind vor allem durch komplexe Strukturen aus vielen Mannoseresten charakterisiert (Munro, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Och1 Protein in *S. cerevisiae* und *C. albicans* eine α -1,6-Mannosyltransferase ist, die die Ausbildung einer neuen Seitenkette von der N-Glycan-Kernstruktur initiiert und damit für die Entstehung einer großen polymannosylierten Seitenkette verantwortlich ist (Munro, 2001; Munro, 2001; Nakayama *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 2006). Diese **outer chain** ist namensgebend für das Protein, jedoch konnten die mannosereichen Strukturen bisher nur in Hefen festgestellt werden. In den wenigen bisher durchgeführten Untersuchungen zur N-Glycosylierung in filamentösen Pilzen wurden keine vergleichbaren Glycane gefunden (Maras *et al.*, 1999).

Generell sind sehr wenige Daten vorhanden, die die Protein-Glycosylierung in filamentösen Pilzen betreffen und die durch die Untersuchung von Hefen erlangten Erkenntnisse sind nicht unbedingt direkt übertragbar (Deshpande *et al.*, 2008). Aufgrund der Apathogenität von *S. cerevisiae* ist diese Hefe als Modell-Organismus nicht geeignet, um den Einfluss der Proteinglycosylierung auf die Interaktion von Wirt und Pathogen zu charakterisieren (Mora-Montes *et al.*, 2009). Erkenntnisse aus der opportunistisch pathogenen Hefe *C. albicans* sprechen allerdings für eine Relevanz der Proteinglycosylierung, da *C. albicans*-Deletions-Mutanten in Genen, die die O- bzw. N-Glycosylierung von Proteinen betreffen, in den meisten Fällen reduzierte Wachstumsraten und attenuierte Virulenz aufwiesen. Die meisten dieser Mutanten zeigten eine veränderte Zusammensetzung der Zellwandkomponenten und erhöhte Sensibilität gegenüber Zellwandstress-Faktoren (Mora-Montes *et al.*, 2009). N-Glycane stellen in *C. albicans* ein wichtiges PAMP dar, und werden von Makrophagen und Monozyten mit Hilfe des Mannose-Rezeptors, einem C-Typ-Lektin, erkannt, was zur Ausschüttung von Cytokinen durch die Makrophagen führt (Netea *et al.*, 2006). Für die Identifizierung von N-Glycanen durch Dendritische Zellen werden 2 weitere Rezeptoren, die beiden C-Typ-Lektine DC-SIGN (**dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule -3-grabbing nonintegrin**) und Dectin-2 benötigt (Cambi *et al.*, 2008; Cambi *et al.*, 2003; McGreal *et al.*, 2006). Jedoch sind diese Daten lediglich als Hinweise auf die Relevanz der Proteinglycosylierung in *A. fumigatus* zu sehen. Für weitere Erkenntnisse bedurfte es der Herstellung von *A. fumigatus*-Deletions-Mutanten, die die Proteinglycosylierung betreffen.

1.2 Interaktionen von *A. fumigatus* mit dem Wirt

Die Verteidigungsmechanismen des Immunsystems während einer Pilzinfektion sind sehr vielfältig. Zunächst ist vor allem die unvermittelte Reaktion des angeborenen Immunsystems von Bedeutung, später spielt auch die adaptive Immunabwehr eine Rolle. Die jeweiligen Reaktionen werden dabei durch Immunzellen, deren Rezeptoren und verschiedene humorale Faktoren vermittelt. Dabei sind neben professionellen Phagozyten, wie Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Dendritischen Zellen, auch nicht-hämatopoetische Zellen wie T-Zellen, Epithel- und Endothelzellen wichtig (Romani, 2004).

1.2.1 Erste Konfrontation: Alveolare Epithelzellen

Das infektiöse Agens von *A. fumigatus* sind ruhende Konidien. Wegen ihrer geringen Größe können diese bis in die unteren Atemwege vordringen, wo sie zunächst an Epithelzellen adhären. Dabei sind tracheobronchiale Zellen der erste Zelltyp, der mit dem Pathogen in Berührung kommt (Paris *et al.*, 1997). Diese mit Cilien ausgestatteten Zellen bilden ein Flimmerepithel, das der Reinigung der Atemwege dient. Durch den kontinuierlichen Wimpernschlag werden Schleim und Schmutzstoffe aus der Lunge abtransportiert. Zudem wird die Adhäsion von *A. fumigatus*-Sporen verhindert. Ohne die Bewegung der Cilien kommt es allerdings zur Internalisation der Sporen, was zugleich die Voraussetzung für eine Infektion ist (Paris *et al.*, 1997). Dies ist ein weiterer Grund für die erhöhte Suszeptibilität bestimmter Personen für *A. fumigatus*-Infektionen. In gesunden Menschen wird ein Großteil der eingeatmeten Sporen durch die Cilien-Bewegung der Epithelzellen eliminiert (Park and Mehrad, 2009). Diese Bewegung wird allerdings inhibiert durch verschiedene während einer Chemotherapie eingesetzte Medikamente oder aber auch aufgrund großer Mengen zähflüssigen Schleims, die bei einer Erkrankung an Cystischer Fibrose auftreten (Tronchin *et al.*, 2008). Diese Stresssituationen begünstigen unter Umständen die Ausbreitung des Pilzes schon von der tracheobronchialen Epithelschicht aus.

Sporen, die die Bronchien passieren, gelangen in den Alveolarraum. Dort finden sich vor allem Typ I- und Typ II- Epithelzellen, wobei die sehr dünnen und flachen Typ I-Zellen 95% der alveolaren Oberfläche ausmachen und besonders wichtig für den Gasaustausch sind. Typ II-Zellen bedecken zwar nur 5% der Oberfläche, sind dennoch von großer Bedeutung, da sie in die Antwort des angeborenen Immunsystems involviert sind, indem sie Komplement- und Surfactant (**surface active agent**)-Proteine, sowie Cytokine ausschütten (Herzog *et al.*, 2008). Vor allem die Surfactant-Proteine A und D sind wichtig für eine

normale Lungenfunktion und Immunantwort. Sie bewirken die Agglutination von *A. fumigatus*-Konidien und deren Bindung an Neutrophile und alveolare Makrophagen, wodurch das Abtöten der Konidien durch diese Zellen begünstigt wird (Park and Mehrad, 2009). In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Konidien sehr effizient an A549-Zellen, Typ II-ähnliche Zellen einer humanen Lungenkarzinom-Epithelzelllinie, binden. Weiterhin adhären sie an die von Fibroblasten produzierten Matrix-Proteine wie Typ I- und Typ IV-Kollagen, Laminin und Fibrinogen, was darauf hindeutet, dass sich in der Oberfläche von ruhenden Sporen Rezeptoren für diese Matrix-Proteine befinden, die die Adhäsion an das Epithel vermitteln (Bromley and Donaldson, 1996). Die Sporen können ihre Endozytose durch alveolare Epithelzellen über einen Zipper-Mechanismus induzieren (Filler and Sheppard, 2006). Aufgenommene Sporen befinden sich in der Zelle innerhalb von Lysosomen. Durch die Internalisierung wird die Auskeimung der Sporen verlangsamt oder zum Teil komplett inhibiert. Keimen die Sporen dennoch aus, können sie dem Lysosom entkommen und penetrieren die Plasmamembran der Epithelzelle (Wasylnka and Moore, 2003). *A. fumigatus*-Sporen sind dadurch in der Lage die durch das Lungenepithel geschaffene Barriere zu überwinden und sich in der Lunge des Wirts auszubreiten (Abb.8).

1.2.2 Primäre Verteidigungslinie: Residente Makrophagen

Alveolare Makrophagen stellen den größten Anteil an professionellen Phagozyten im Alveolarraum dar und halten die Infektion vor allem in frühen Phasen unter Kontrolle (Romani, 2004), indem sie die eingeatmeten Konidien phagozytieren, abtöten und auf diese Begegnung mit der Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen antworten, was zur Rekrutierung weiterer Zellen führt (McCormick *et al.*, 2010b). Dadurch bilden sie die primäre Verteidigungslinie während einer *A. fumigatus*-Infektion (Abb. 8). Das Schlüsselereignis für eine unvermittelte Reaktion durch die Makrophagen ist, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, die Erkennung molekularer Strukturen, die verschiedenen Gruppen von Pathogenen gemein sind (PAMPs), durch Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten (PRRs). Wichtig dabei ist, dass ruhende Sporen keine dieser PAMPs exponieren und aufgrund der hydrophoben Proteinschicht immunologisch inert sind und von Phagozyten nicht erkannt werden (Aimanianda *et al.*, 2009). Erst nach Abwurf der Proteinhülle während der Auskeimung wird β -1,3-Glucan, das wichtigste pilzliche PAMP, exponiert und kann durch den Nicht-Klassischen-C-Typ-Lektin-Rezeptor Dectin-1 erkannt werden, was der Grund dafür ist, dass die Phagozytoserate von angeschwollenen Sporen und Keimlingen deutlich höher ist als die von ruhenden Sporen (Luther *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2005). Neben Dectin-1 wird auch die

Rolle der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 bei der Erkennung von *A. fumigatus* diskutiert (Luther *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001). Allerdings sind die Ergebnisse, die die Relevanz der beiden Rezeptoren für die Phagozytose und Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen betreffen, sehr kontrovers und abhängig von dem für die Untersuchung verwendeten Zelltyp und *A. fumigatus*-Morphotyp (Park and Mehrad, 2009). Nach der Aufnahme durch alveolare Makrophagen gelangen die Sporen in ein Phagolysosom. Der Mechanismus, durch den sie schließlich abgetötet werden, ist noch nicht im Detail bekannt, es wird jedoch vermutet, dass reaktive Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) dazu beitragen (Brakhage *et al.*, 2010), wobei ihnen hauptsächlich eine Rolle während der Signaltransduktion zur Aktivierung von Immun-Effektorzellen und weniger beim Abtöten des Pilzes zugeschrieben wird (Lessing *et al.*, 2007). Makrophagen töten die Konidien mit einer zeitlichen Verzögerung von drei bis sechs Stunden nach der Phagozytose, wobei sie den Pilz sehr effizient eliminieren. Innerhalb von 30 Stunden können 90% der Konidien abgetötet werden (Schaffner *et al.*, 1983). Neben der Phagozytose reagieren die Makrophagen auf das Zusammentreffen mit *A. fumigatus*-Sporen mit der Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen, wodurch weitere Zellen rekrutiert werden und eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Zu den ausgeschütteten Cytokinen und Chemokinen zählen TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 und MIP-2, G-CSF und GM-CSF (Meier *et al.*, 2003).

Es wird vermutet, dass *A. fumigatus* verschiedene Mechanismen besitzt, um der Phagozytose bzw. Abtötung durch Makrophagen zu entgehen. So ist β -1,3-Glucan beispielsweise vor allem auf geschwollenen Sporen und Keimlingen zu finden, nicht jedoch auf längeren Hyphen, ein Umstand, der als Tarnungsmanöver von *A. fumigatus* diskutiert wird (Hohl, 2008). Weiterhin helfen verschiedene Proteasen dem Pilz dabei, der Phagozytose zu entkommen (Romani, 2004). Darüber hinaus besitzt *A. fumigatus* vier Gene, die für Superoxid-Dismutasen (SOD) kodieren. Man geht davon aus, dass durch SOD der ROS-Stress reduziert werden kann, eine Hypothese die durch die Tatsache bekräftigt wird, dass eine Deletion von drei der vier SOD-Genen zur verstärkten Abtötung von Sporen durch alveolare Makrophagen führte (Lambou *et al.*, 2010a).

1.2.3 Zur Bekämpfung der Infektion rekrutiert: Neutrophile Granulozyten

Durch die von alveolaren Makrophagen ausgeschütteten Cytokine werden Granulozyten aus dem Blutkreislauf zum Infektionsherd rekrutiert (Meier *et al.*, 2003). Dieser Schritt ist entscheidend für die Entwicklung einer Entzündungsreaktion (Abb. 8). Wie in

Abschnitt 1.1.2 beschrieben wird, wird der Verlauf einer invasiven Aspergillose maßgeblich durch die Anwesenheit von Neutrophilen beeinflusst, was deren Bedeutung bei der Bekämpfung einer Infektion mit *A. fumigatus* unterstreicht. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Konidien vor allem von Makrophagen eliminiert werden, wohingegen die Bekämpfung von Hyphen durch Neutrophile erfolgen sollte (Schaffner *et al.*, 1982). Inzwischen konnte jedoch die Relevanz von Neutrophilen auch in der frühen Phase der Infektion gezeigt werden. Diese scheint sogar über die Bedeutung von Makrophagen für die Eliminierung von Konidien hinauszugehen (Mircescu *et al.*, 2009). Neutrophile erkennen *A. fumigatus* mit Hilfe derselben Rezeptoren wie Makrophagen – Dectin-1, TLR2 und TLR4 (Bellocchio *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2009). Zu den Verteidigungsmechanismen gehört neben Phagozytose und Abtöten von Konidien die Freisetzung von antimikrobiellen Stoffen durch Degranulation, wodurch Hyphen angegriffen und Konidien an der Auskeimung gehindert werden (Brakhage *et al.*, 2010; Romani, 2004). Neutrophile sind somit in der Lage, den Pilz sowohl intra- als auch extrazellulär anzugreifen, was vor allem von Bedeutung ist bei der Bekämpfung von längeren Keimlingen und Hyphen, die nicht internalisiert werden können (Balloy and Chignard, 2009). Während die Eliminierung der Konidien durch Makrophagen meist sehr verzögert ist, wird der Pilz durch eine Interaktion mit Neutrophilen sehr schnell beschädigt und getötet (Roilides *et al.*, 1993). Neutrophile binden und internalisieren Konidien, wodurch unmittelbar ein oxidativer *burst*, also die schnelle Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies und die Degranulation ausgelöst werden (Levitz and Farrell, 1990). Inzwischen wurde ein dritter Mechanismus beschrieben, der der Bekämpfung von *A. fumigatus* durch Neutrophile dient: NETs, *neutrophil extracellular traps*. Diese Netzwerke aus extrazellulären Fasern bestehen im Wesentlichen aus einem DNA-Grundgerüst dekoriert mit bestimmten cytoplasmatischen und Granula-Proteinen (Urban *et al.*, 2009). Bisher waren sie nur als antimikrobieller Mechanismus bei Bakterien- und *Candida*-Infektionen bekannt (Brinkmann *et al.*, 2004; Papayannopoulos and Zychlinsky, 2009), inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass sie auch in einer mit *A. fumigatus* infizierten Lunge ausgebildet werden (Bruns *et al.*, 2010). Während die Ausbreitung des Pilzes im Stadium von Sporen und kurzen Keimlingen primär durch Phagozytose inhibiert wird, hemmen NETs vor allem die Verlängerung von Hyphen durch eine Chelatbildung mit Zink-Ionen mit Hilfe des NET-assoziierten Proteins Calprotectin (McCormick *et al.*, 2010a).

1.2.4 Adaptive Immunantwort

Mit den hier beschriebenen Mechanismen werden eingeatmete Konidien tagtäglich durch die angeborene Immunantwort eliminiert. Kommt es jedoch zu einer schwerwiegenden Infektion, bedarf es kontrollierter Aktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Nur so ist eine erfolgreiche Bekämpfung des Pathogens ohne exzessiven Gewebeschaden möglich. Als vermittelnde Instanz zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem agieren Dendritische Zellen. Diese aus Monozyten differenzierten Zellen sind ebenfalls in der Lage, den Pilz mit Hilfe spezifischer Rezeptoren zu erkennen.

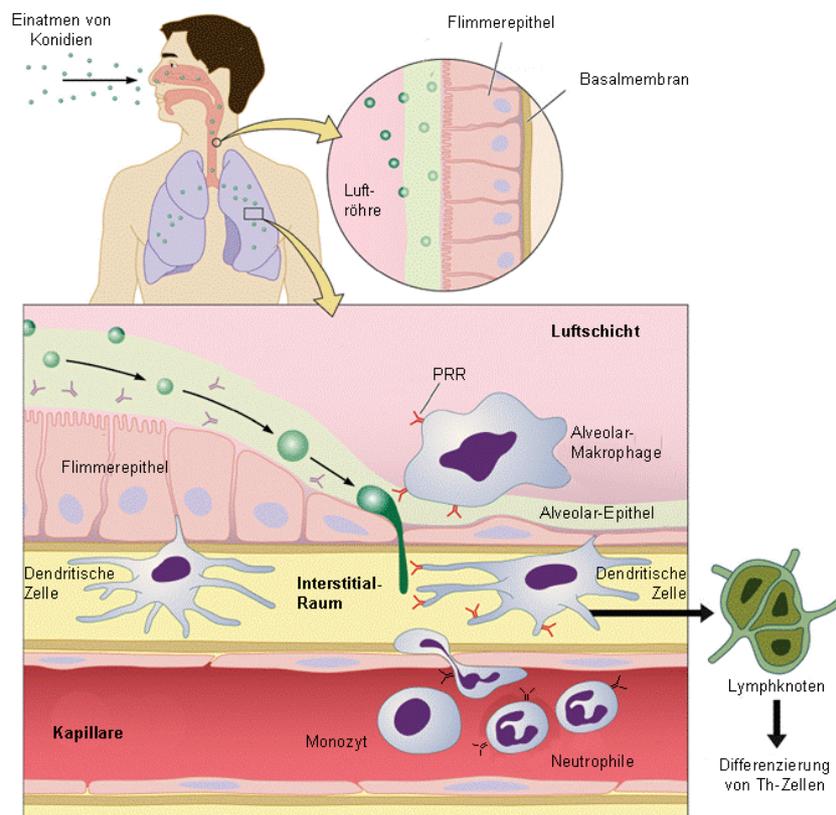


Abb. 8 Antwort des Immunsystems auf *A. fumigatus*

Werden eingeatmete Sporen nicht durch das Flimmerepithel entfernt, kann der Pilz die Alveolar-Epithelschicht passieren und sich in der Lunge des Wirts ausbreiten. Dies löst zunächst eine unmittelbare Antwort des angeborenen Immunsystems aus. Die primäre Verteidigungslinie wird durch alveolare Makrophagen gebildet, die den Pilz mit Hilfe spezieller Rezeptoren (PRR) erkennen und eingedrungene Konidien phagozytieren und abtöten. Als Reaktion auf diese Begegnung werden Cytokine ausgeschüttet, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird und Neutrophile aus dem Blutkreislauf rekrutiert werden. Dendritische Zellen erkennen und binden *A. fumigatus*, differenzieren, und wandern beladen mit den Antigenen zu den Lymphknoten. Mit der daraus resultierenden Differenzierung von Th-Zellen wird die adaptive Immunantwort ausgelöst (Park and Mehrad, 2009).

Durch die folgende Internalisierung nehmen sie Antigene auf und reifen aus. Die Antigene präsentierend wandern sie zu den T-Zell-reichen Lymphknoten. So wird die Erkennung der prozessierten Antigene durch spezifische T-Zellen und somit auch deren Aktivierung ermöglicht. Dieser Prozess stellt die Grundlage einer kontrollierten und regulierten Immunantwort dar. T-Zellen sind in der Lage, die Phagozyten der angeborenen Immunantwort entweder zu aktivieren oder zu inhibieren (McCormick *et al.*, 2010b). Während Th1-Zellen proinflammatorische Cytokine ausschütten, die sich stimulierend auf die Reaktionen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Phagozytose und Degranulation in Neutrophilen auswirken, geben Th2-Zellen antiinflammatorische Cytokine ab, die die Immunantwort herunterregulieren (Romani, 2004). Dadurch können Gewebeschäden durch eine überschießende Immunantwort vermieden werden.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

A. fumigatus ist momentan das bedeutendste Luft-übertragene Pilzpathogen. Trotz der Fortschritte im diagnostischen und pharmazeutischen Bereich konnte die hohe Mortalitätsrate der verursachten Krankheiten nicht wesentlich gesenkt werden. Immer noch stellt die frühzeitige Diagnostik einer *A. fumigatus*-Infektion ein wesentliches Problem dar, ebenso sind die zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten nicht zufriedenstellend. Von großer Bedeutung ist die Fragestellung, warum gerade *A. fumigatus*, und keine der weiteren 650 *Aspergillus*-Arten in der Lage ist, derartig schwerwiegende Infektionen auszulösen. Offensichtlich weist *A. fumigatus* einen Fitness-Vorteil gegenüber anderen Pilzen auf. Ein Schlüssel zu dieser Thematik ist die Zellwand von *A. fumigatus*. Aufgrund ihrer schützenden Funktion gegenüber negativen Umwelteinflüssen stellt sie einen wichtigen Fitnessfaktor dar. Interessant sind dabei vor allem Glycostrukturen. Da diese meist pilzspezifisch sind, stellen sie zum einen wichtige Angriffsziele für neue Antimykotika dar und sind zudem ein bedeutender Faktor für die Erkennung des Pilzes durch das angeborene Immunsystem, die erste Instanz bei der Bekämpfung einer *A. fumigatus*-Infektion. Durch Untersuchungen mit der Hefe *C. albicans* verdichten sich die Anzeichen darauf, dass Glycostrukturen in der Zellwand des Pilzes von großer Bedeutung für die Antwort des angeborenen Immunsystems sind. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Bedeutung dieser Strukturen auch in *A. fumigatus* zu klären. Durch die Herstellung von Mutanten in zentralen Genen der Protein-Glycosylierung und Glycolipidbiosynthese sollte die Relevanz dieser Glycostrukturen für die Fitness, Pathogenität und Interaktion des Pilzes mit Wirts-Immunzellen untersucht werden. Als Grundlage für die Charakterisierung von

Mutanten sollten Infektionsassays entwickelt werden, weshalb die generelle Reaktion von Epithelzellen, Makrophagen und Neutrophilen auf *A. fumigatus* im Detail betrachtet wurde. Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf Galactomannan, einem wichtigem Polysaccharid in der Zellwand des Pilzes, das inzwischen große Bedeutung bei der serologischen Diagnostik von *A. fumigatus*-Infektionen erlangte. Bisher ist die Bedeutung dieses Polysaccharids für die Erkennung von *A. fumigatus* durch Immunzellen nicht geklärt, ebenso wie die Frage, ob Galactomannan und α -Galactomannan-Antikörper Grundlage therapeutischer Ansätze darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Eine Auflistung der verwendeten Bakterien- und Pilzstämmen, Zelllinien und Mausstämmen ist in den Tabellen 1 bis 4 zu finden.

Tabelle 1: Verwendeter Bakterienstamm

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|---|---|---------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | F-, Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> -, <i>argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k -, m _k -), <i>supE44</i> , λ -, <i>thi -1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | Hanahan, 1983 |

Tabelle 2: Verwendete Pilzstämmen

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--|---|------------------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645 (NCTC2109) | Wildtyp; Patientenisolat | Hearn und Mackenzie, 1980 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> D141 | Wildtyp; Patientenisolat | Reichard et al., 1990 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645 (NCTC2109) GFP | Wildtyp; <i>gfp</i> | Meier, 2003 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> AfS35 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>akuA</i> | Krappmann et al., 2006 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ <i>glf</i> | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>glf</i> | Schmalhorst et al., 2008 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ <i>mnt1</i> | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>akuA</i> Δ <i>mnt1</i> | Wagener et al., 2008 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ <i>mnt1+mnt1</i> | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>akuA</i> Δ <i>mnt1+mnt1</i> | Wagener et al., 2008 |

| | | |
|--|--|--------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ mitA | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ mitA | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ mitA+mitA | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ mitA+mitA | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1 | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1+afoch1 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1+afoch1 | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1+afoch1-rfp | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1+afoch1-rfp | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1+afoch1* | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1+afoch1* | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1+afoch1-AID | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1+afoch1-AID | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch1+afoch4 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch1+afoch4 | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch4 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch4 | diese Arbeit |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Δ afoch4+afoch4 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ akuA Δ afoch4+afoch4 | diese Arbeit |

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

| Stamm | Stammnummer | Bezugsquelle |
|--|---------------|-----------------------------------|
| A549 Humane Lungenepithel-Zelllinie | ATCC CCL-185 | Sven Hammerschmidt, Greifswald |
| J774.A1 („J774“) Murine Makrophagen-Zelllinie | ATCC TIB-67 | DSMZ, Braunschweig |
| MH-S Murine Alveolar-Makrophagen-Zelllinie | ATCC CRL-2019 | DSMZ, Braunschweig |
| P3X63Ag8 („Ag8“) Murine Myelom-Zelllinie | ATCC TIB-9 | DSMZ, Braunschweig |

Tabelle 4: Verwendete Mausstämme

| Stamm | Alter | Bezugsquelle |
|---------|-------------|---------------------------------|
| C57BL/6 | 6-10 Wochen | Fa. Charles River, Sulzfeld |
| BALB/c | 8-10 Wochen | Fa. Charles River, Sulzfeld |
| CD-1 | 8-10 Wochen | Zucht Universität Regensburg |

Die verwendeten Plasmide, Oligonukleotide und Plasmidkonstrukte sind in den Tabellen 5 bis 7 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Eigenschaften | Bezugsquelle |
|---------------------|---|--|
| pBluescript | <i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> , <i>lacZ</i> , Amp ^R | MBI Fermentas |
| pCR2.1-TOPO | <i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/reverse- und T7-Promotor-Oligonukleotid-Bindestellen, Amp ^R , Kan ^R | Invitrogen |
| pSK 379 | <i>gpdA</i> -Promotor, <i>ptrA</i> ^R , <i>his2A</i> -Bindestelle | Sven Krappmann, Würzburg |
| pSK 346 | Hyg ^R | Sven Krappmann, Würzburg |
| pSK 379- <i>rfp</i> | <i>gpdA</i> -Promotor, <i>ptrA</i> ^R , <i>his2A</i> -Bindestelle, <i>rfp</i> | Sven Krappmann, Würzburg, modifiziert durch Johannes Wagener, München |

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz 5 → 3 | Interne Nummer |
|----------------------------|---|----------------|
| mitA-5' | ATGCGGCGCGGTGTCTTAATC | 266 |
| mitA-3' | TTAATCGCGACGGCTATAAAG | 265 |
| mitA-3'-b | GCGAAAATCAACCTGGCGTC | 289 |
| mitA-upstream-5' | TTGCGGCCGCTCGAAGACTTTGCTCCACTACTC | JW14 |
| mitA-upstream-3' | TGGCCTGAGTGGCCTGTGCAACAGTACGGCCGAAC | JW15 |
| mitA-downstream-5' | GGGCCATCTAGGCCTGACCCAAATTGTGACCGTG | JW18 |
| mitA-downstream-3' | GGGCGGCCGCATCTGAATAGGATGAACAGG | JW19 |
| mitA-5'-cast | GTCCAACCTAAAGGCTTCCC | JW13 |
| mitA-3'UTR-rev | CCATTCATCACCGAAGAAGCG | 267 |
| och1-5' | ATGCTCACCTTCAGGAAGTCG | 262 |
| och1-3' | TTAGTGGACTTGGTCTTTAGT | 263 |
| och1-3'-b | GCACCACTAAAGTCGTGTTTCAC | 288 |
| och1-1149-3' | GCAGAGCCGGATCTGTCTTCCA | 387 |
| och1-upstream-5' | GGGCGGCCGCATCTGAGTCATAAAATGTCC | JW21 |
| och1-upstream-3' | GGGCCTGAGTGGCCAAGAAGAATCACAGTAGCGC | JW22 |
| och1-downstream-5' | GGGCCATCTAGGCCGACACAGTGCTTTCCATCAAAA | JW25 |
| och1-downstream-3' | GGGCGGCCGCTTCCAACGGGACACCAGTCC | JW26 |
| och1-cast-5' | GCCACCTGATGGTTAAGAAACG | JW20 |
| och1-3'UTR-rev | GACTATCCCGACGTAGACGTG | 264 |
| och1-Change-DXD-motif-PstI | TACAGTGCCATCGATACCTACGCGCTCAAGCCTGCA GTCGACTGGTT | 391 |
| och1-Anker-fwd | AGTTTCGATTAAGATCCCCGCCGTTCTTAACACGGAA | 371 |
| och1-Anker-rev | GCGAGAGATTAAGAAAAGGAGGACGACGAATGTAAT | 370 |
| och1-Check-Anker | TAATCTCTCGCAGTTCGATTA | 375 |
| och4-5' | ATGCGGCCTTTTCGTTGCCATC | 295 |
| och4-3' | CTAACACAGCCATGGTAGGCT | 294 |
| och4-upstream-5' | GACGAACGCACTATCAGGCAA | 334 |
| och4-upstream-3' | ATCGATGGCCTGAGTGGCCCGGTGTGCGGCTCCAC AGATC | 353 |
| och4-downstream-5' | ATCGATGGCCATCTAGGCCATTCTTTGTTATTAGCG | 352 |

| | | |
|--------------------|--------------------------------|-----|
| och4-downstream-3' | ACATACTATAACCTGATCGGC | 337 |
| och4-cast-5' | CGTTGCACGATTCCACAACGG | 374 |
| och4-3'UTR-rev | TAGGCGGCTGGTTACTGTGTT | 310 |
| T7-Promotor | TAATACGACTCACTATAGGG | A1 |
| hph-3-Smal | TCCCGGGCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAG | A4 |
| trpCt-fwd | CAGAATGCACAGGTACACTTG | A5 |
| seq-gpdA(p)-fwd | ACTCCATCCTTCCCATCCCC | A6 |
| seq-his2A-rev | CAGATGCCCACTAAGCTTGG | A7 |
| seq-RFP-rev | TTCACGGAGCCCTCCATG | A8 |

Tabelle 7: Verwendete Plasmid-Konstrukte

| Bezeichnung | Insert | Vektor |
|------------------------|--|-------------|
| pBluescript-del_mitA | Kassette zur Deletion der MIPC-Synthase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_6G04680 | pBluescript |
| pBluescript-del_afoch1 | Kassette zur Deletion der α -1,6-Mannosyltransferase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_5G08580 | pBluescript |
| pCR2.1-del_afoch4 | Kassette zur Deletion α -1,6-Mannosyltransferase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_1G01380 | pCR2.1-TOPO |
| pSK379-mitA | MIPC-Synthase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_6G04680 | pSK379 |
| pSK379-afoch1 | α -1,6-Mannosyltransferase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_5G08580 | pSK379 |
| pSK379-rfp-afoch1 | α -1,6-Mannosyltransferase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_5G08580 | pSK379-rfp |
| pSK379-afoch1* | AFUA_5G08580 mit Transmembrandomäne | pSK379 |
| pSK379-afoch1-AID | AFUA_5G08580 mit mutiertem aktivem Zentrum | pSK379 |
| pSK379-afoch4 | α -1,6-Mannosyltransferase aus <i>A. fumigatus</i> : AFUA_1G01380 | pSK379 |

2.1.2 Medien

Die verwendeten Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren bei 121°C, 1 bar, 20 min sterilisiert.

2.1.2.1 Bakterien-Medium

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in LB (Luria Bertani) - Medium mit folgender Zusammensetzung:

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| Pepton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; autoklavieren |

Je nach Bedarf wurde dem Medium zur Selektion nach dem Autoklavieren Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 20 g Bactoagar (Difco) pro Liter Medium [2,0 % (w/v)] versetzt.

2.1.2.2 Aspergillus-Medien

A. fumigatus wurde in folgenden Medien angezogen:

Komplexmedien:

Potatoe-Dextrose-Agar (Difco)

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| Kartoffelstärke | 4 g |
| Glucose | 20 g |
| Agar | 15 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; autoklavieren |

Der resultierende pH-Wert beträgt 5,6±0,2.

Sabouraud-Agar (Difco):

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| Pepton | 5 g |
| Casein | 5 g |
| Glucose | 40 g |
| Agar | 15 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; autoklavieren |

Der resultierende pH-Wert beträgt 5,6±0,2.

YG (Hefe-Glucose)-Medium:

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Hefeextrakt | 5 g |
| Glucose | 20 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; pH 6,0; autoklavieren |

Minimal-Medien:Aspergillus-Minimal-Medium (AMM)

| | |
|--|------------------------------|
| MgSO ₄ • 7 H ₂ O | 2 mM (Stammlösung 400 mM) |
| Salzlösung | 50 ml |
| Spurenelementlösung | 1 ml |
| Glucose | 10 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; sterilfiltrieren |

Der resultierende pH-Wert beträgt 6,6.

Salzlösung (20x)

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| NaNO ₃ | 120,0 g |
| KCl | 10,4 g |
| KH ₂ PO ₄ | 16,3 g |
| K ₂ HPO ₄ | 20,9 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; autoklavieren |

Spurenelementlösung (nach Hunter)

Lösung I:

| | |
|--|----------|
| FeSO ₄ • 7 H ₂ O | 1,0 g |
| EDTA | 10,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 80 ml |

Es erfolgt die Zugabe von KOH-Pellets, bis eine Gelbfärbung der Lösung eintritt. Der resultierende pH beträgt in etwa 5,5.

Lösung II:

| | |
|--|----------|
| ZnSO ₄ • 7 H ₂ O | 2,2 g |
| H ₃ BO ₃ | 1,1 g |
| MnCl ₂ • 4 H ₂ O | 500 mg |
| CoCl ₂ • 6 H ₂ O | 160 mg |
| CuSO ₄ • 5H ₂ O | 160 mg |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O | 110 mg |
| H ₂ O _{dest} | ad 80 ml |

Nach Kombination der Lösungen I und II wurde der pH-Wert durch Zugabe von zunächst KOH-Pellets, später KOH-Lösung mit abnehmender Konzentration auf 6,5 eingestellt.

Durch Zugabe von H₂O_{dest} wurde das finale Volumen von 200 ml erreicht. Nach der Sterilfiltration der Lösung wurden Aliquots mit einem Volumen von 1 ml abgefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Spurenelementlösung ist zunächst hellgrün, während der Lagerung stellt sich eine Violettfärbung ein.

Für die Transformation von Protoplasten (siehe 2.2.3.12.) wurde AMM mit 1,2 M Sorbitol versetzt und bei Bedarf nach dem Autoklavieren eines der folgenden Antibiotika zugesetzt: Pyriithiamin (Stammlösung 1mg/ml, Endkonzentration 0,1 µg/ml), Hygromycin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 200 µg/ml), Phleomycin (Stammlösung 6 mg/ml, Endkonzentration 30 µg/ml). Zur Herstellung von AMM-Sorbitol-Softagar wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 7 g Bactoagar (Difco) pro Liter Medium [0,7 % (w/v)] versetzt.

SD-Minimal-Medium (modifiziert)

| | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Yeast Nitrogen Base (Invitrogen) | 1,7 g |
| NH ₄ Cl | 2,0 g |
| Glucose | 20,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml; autoklavieren |

Zur Herstellung von Agarplatten wurden alle Medien vor dem Autoklavieren mit 20 g Bactoagar (Difco) pro Liter Medium [2,0 % (w/v)] versetzt.

2.1.2.3 Zellkultur-Puffer und -Medien

Puffer:

| | | |
|------|-----------------------------------|------------|
| PBS: | KCl: | 200 mg |
| | KH ₂ PO ₄ : | 200 mg |
| | NaCl | 8000 mg |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1150 mg |
| | H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml |

Medien:

| | |
|----------|---|
| RPMI | RPMI (<i>Royal Park Memorial Institute</i>) 1640 Medium mit L-Glutamin |
| DMEM | DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) mit Natriumpyruvat und Pyridoxin |
| Opti-MEM | Opti-MEM Reduced-Serum Medium |

Alle Zellkultur-Medien wurden von Invitrogen bezogen.

Allen Medien wurde standardmäßig Glutamin (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Medien zusätzlich mit einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 100 U/ml bzw. 100 µg/ml versetzt. Zudem erfolgte eine Supplementation des Mediums mit 5-10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS; Invitrogen)

Zum Ablösen adhärenter Zellen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) oder Accutase (PAA) eingesetzt.

Zur Anzucht von Hybridom-Zellen wurde Opti-MEM bei Bedarf mit 1,5% (v/v) Hybridoma Cloning Supplement (HCS; PAA) versetzt.

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper

| Name | Eigenschaft | Verdünnung | Bezugsquelle |
|--|--|-------------------------|--|
| α -NF κ B p65 (F-6) sc-8008 | Monoklonaler Antikörper gegen NF κ B p65 (Maus IgG) | 1:50 | Santa Cruz |
| α -HIF1 α | Monoklonaler Antikörper gegen humanes HIF-1 α (Maus IgG) | 1:100 | Sven Krappmann, Würzburg |
| α -C1q-A (7H8) sc-58920 | Monoklonaler Antikörper gegen C1q (Ratte IgG) | 1:50 | Santa Cruz |
| α -Tubulin | Monoklonaler Antikörper gegen Tubulin (Maus IgG) | 1:100 | Stefan Linder, München |
| L10 | Monoklonaler Antikörper gegen Galactomannan (Maus IgM) (Hybridom-Überstand) | 1:2 | Leonie Heesemann, München |
| L99 | Monoklonaler Antikörper gegen Galactomannan (Maus IgM) (Hybridom-Überstand) | 1:2 | Leonie Heesemann, München |
| AF1 | Monoklonaler Antikörper gegen Mannan (Maus IgM) (Hybridom-Überstand) | 1:2 | Antonella Torosantucci, Rom Cassone <i>et al.</i> , 1988 |
| 2G8 | Monoklonaler Antikörper gegen β -1,3-Glucan (Maus IgG) | 1:30 | Antonella Torosantucci, Rom Torosantucci <i>et al.</i> , 2005 |
| α -F4/80 Pacific Blue | Monoklonaler Antikörper gegen Maus F4/80 für FACS (Ratte IgG, Pacific Blue-markiert) | 0,1 μ g/100 μ l | Invitrogen |
| α -GR-1-FITC | Monoklonaler Antikörper gegen Maus Gr-1 für FACS (Ratte IgG, FITC-markiert) | 10 μ l/100 μ l | Miltenyi Biotech |

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Verwendete sekundäre Antikörper

| Name | Eigenschaft | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-------------------------|--|------------|--------------|
| α -Maus IgG-Cy3 | Antikörper gegen Maus IgG (Ziege, Cy3-markiert) | 1:200 | Dianova |
| α -Maus-IgM-Cy3 | Antikörper gegen Maus IgM (Ziege, Cy3-markiert) | 1:200 | Dianova |
| α -Ratte-IgG-Cy3 | Antikörper gegen Ratte IgG (Ziege, Cy3-markiert) | 1:200 | Dianova |
| α -Maus-IgM-AP | Antikörper gegen Maus IgM (Ziege, Alkalische Phosphatase-markiert) | 1:1000 | Dianova |

2.1.4 Fluoreszenzmarkierte Moleküle

Tabelle 10: Verwendete Fluoreszenzmarkierte Moleküle

| Name | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Phalloidin-Rhodamin | 1: 100 (2 μ g/ml) | Dianova |
| Phalloidin-Cy5 | 1:100 (2 μ g/ml) | Stefan Linder, München |
| Calcofluor | 1:100 | Sigma Aldrich |
| Blankophor | 1:1000 | Reonhard Rückel, Göttingen |
| Rhodamin-markiertes Dextran | 2 mg/ml | Sigma Aldrich |
| Filipin | 25 μ g/ml | Sigma Aldrich |

2.1.5 Inhibitoren

Tabelle 11: Verwendete Inhibitoren

| Name | Endkonzentration | Bezugsquelle |
|----------------|------------------|---------------|
| Cytochalasin D | 1 μ M | Sigma Aldrich |
| Wortmannin | 1 μ M | Sigma Aldrich |

2.1.6 Größenstandards

DNA: Agarose-Gelelektrophorese: Promega *Bench Top DNA Marker*

Protein: Polyacrylamid-Gelelektrophorese: BioRad *Precision Plus Protein Standard All Blue*

2.1.7 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England), AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson (New Jersey, USA) Biomol (Hamburg), Boeringer Ingelheim Bioproducts (Heidelberg), Calbiochem (Merck, Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Difco (Becton Dickinson, New Jersey, USA), Fluka (Sigma Aldrich, Steinheim), Invitrogen (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Invitrogen, Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Soweit möglich wurden sie im Reinheitsgrad „*pro analysi*“ (p.a.) bzw. reinst bezogen.

Enzyme stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Ipswich, UK), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim), usb Affimetrix (Santa Clara, USA) und Qiagen (Hilden).

2.1.8 Apparaturen, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Apparaturen und Geräte

| | |
|----------------------|------------------------------|
| Agarose-Gelkammern | EASY-CAST |
| Blot-Apparatur | BioRad, Biometra, Owl |
| Brutschränke | Heraeus |
| Digitalkamera | Kodak |
| DNA Speed Vac | Savant |
| Durchflusszytometer | BD, FACS Canto II |
| Elektroporationsgrät | BioRAD, <i>Gene Pulser</i> |
| ELISA Reader | Tecan, <i>Sunrise Reader</i> |
| ELISA Washer | Tecan, <i>Columbus Pro</i> |
| Magnetrührer | Heidolph, MR 3001 K |

Mikroskope

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Lichtmikroskop | Zeiss, Axiovert 25 |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica DM LB |
| Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop | Leica SP-5 und Leica TCS-NT |

Mikrowelle

Privileg

pH-Messgerät

Kettler Toledo

Photometer

Amersham Bioscience Ultraspec 10

Schüttellinkubatur

B. Braun

SDS-PAGE-Kammern

Biometra

Spannungsquelle

BioRad, Power pac 1000

Sterilbank

Heraeus, *Hera Safe*

Spritzenaufsatzfilter 0,2-0,8 µm

Millex GD

Thermomixer

Eppendorf

Thermocycler

Biometra *T Gradient*

Biometra *Personal Cycler*

UV-Transilluminator

BioRad

Video-Geldokumentationssystem

BioRad

Vortex

Scientific Instruments

Wasserbad

GFL

Zellaufschlussgerät

MP *Fastprep 24*

Zentrifugen

Sigma 1-13, 1K15, 6K15

Heraeus, Megafuge 1.0R

Roth Micro Centrifuge

Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche

Medicell International

Elektroporationsküvetten

Eurogentec

ELISA Maxisorp Platten

Nunc

Filterpapier

Whatman

Halbmikroküvetten

Brand

Konzentrationsröhrchen

Sartorius Stedim, *Vivaspin 6 bzw. 20*

Kryoröhrchen

TPP

Miracloth

Calbiochem

Nitrocellulose-Membran

Whatman

| | |
|---|-----------|
| Slide-A-Lyser | Pierce |
| Sterilfiltrationssysteme (250 ml/ 500 ml) | TPP |
| Spritzenaufsatzfilter 0,2-0,8 µm | Millex GD |
| Zellkulturflaschen und -platten | TPP |
| Zellschaber | TPP |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml/ 50ml) | Falcon |

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultur von *E. coli*

E. coli wurde aerob unter Schütteln (180 U/min) bei 37°C angezogen. Als Kulturgefäße dienten bis zu einem Volumen von 5 ml Zentrifugenröhrchen der Firma Falcon (15 ml), ansonsten Erlenmeyerkolben entsprechender Größe. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 g.

Die Lagerung erfolgte für kurze Zeiträume auf LB-Agarplatten bei 4°C, für längere Zeiträume wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin [50% (v/v)] versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Kultur und Ernte von *A. fumigatus*

A. fumigatus wurde aerob unter Schütteln (180 U/min) bei 37°C angezogen. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben entsprechender Größe.

Für die Herstellung von Sporenstammlösungen wurden 100 µl einer verdünnten Sporenstammlösung (1:500) in Zellkulturflaschen, in denen sich Nähragar befand, eingebracht. Nach Zugabe von sterilen Glaskugeln wurde die Sporensuspension durch Schwenken auf der Agaroberfläche verteilt. Nach etwa 2-4 Tagen war ein dichtes Myzel mit dunkelgrün gefärbten Sporen sichtbar. Diese konnten nach Zugabe von sterilen Glaskugeln und 10 ml sterilem H₂O geerntet werden. Durch Schütteln und Schwenken konnten die Sporen von den Konidiophoren getrennt werden. Die im Wasser gelösten Sporen wurden durch sterile, mit Miracloth ausgekleidete Filter geschüttet, um Hyphenfragmente und Konidiophoren von der Sporenlösung zu trennen. Dieser Teil des Erntevorgangs wurde so

oft wiederholt, bis das weiße Myzel in der Zellkulturflasche sichtbar wurde. Zum Waschen und Konzentrieren der Sporen wurde das Filtrat durch einen Spritzenaufsatzfilter (0,8 µm) gepresst, wobei die Sporen im Filter hängen blieben und so von der Flüssigkeit getrennt wurden. Durch Zurücksaugen von sterilem H₂O durch die Spitze des Filters konnte nun die konzentrierte Sporenlösung gewonnen werden. Durch Auszählung einer 1:1000 verdünnten Stammlösung in einer Neubauer-Zählkammer wurde der Titer der Sporensuspensionen bestimmt. Die Konzentration befand sich in der Regel in einer Größenordnung von 5x10⁸ Sporen/ml. Die Lagerung der Sporen erfolgte mittelfristig bei 4°C in H₂O. Für eine langfristige Lagerung wurden 300 µl Sporensuspension und 200 µl Glycerin [50% (v/v)] vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Wachstumsversuche mit *A. fumigatus*

Bestimmung des radialen Wachstums

Zur Bestimmung des radialen Wachstums von *A. fumigatus* wurden 3 µl einer Sporensuspension (1x10⁶ Sporen/ml) mittig auf eine Agarplatte getüpfelt. Der Durchmesser der Kolonie wurde im Abstand von 24 h gemessen, bis diese den Rand der Platte erreicht hatte. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Tüpfeltests

Zur Untersuchung der Reaktion verschiedener *A. fumigatus*-Stämme auf bestimmte Reagenzien, wie z.B. Zellwandstressfaktoren, wurden Nähragarplatten mit dem jeweils zu untersuchenden Reagenz gegossen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen von frischen Sporensuspensionen der jeweiligen *A. fumigatus*-Stämme mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 10⁸/ml, 10⁷/ml, 10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml und 10³/ml. Jeweils 3 µl jeder Verdünnungsstufe wurden mit Hilfe eines unterlegten Rasters auf die Agarplatten getüpfelt. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Hemmhofests

Zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber H₂O₂ wurden 100 µl einer Sporensuspension (1x10⁶ Sporen/ml) auf YG-Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurde ein steriles, mit 30 µl H₂O₂-Lösung (30%) getränktes Filterplättchen in die Mitte der Agarplatte gelegt. Nach der Bildung eines dichten Myzels wurde der entstandene Hemmhof ausgemessen. Dabei wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Azol-Antibiotika wurde ebenso verfahren. Jedoch wurden statt des Filterplättchens kommerziell erhältliche E-test-Streifen, die Konzentrationsgradienten der Antimycotika Voriconazol, Posaconazol und Caspofungin enthielten, in die Mitte der Platte gelegt.

XTT-Test

Das Wachstum von Hyphen in Flüssigkultur wurde mit Hilfe des XTT-Tests entsprechend dem von Meshulam und Kollegen entwickelten Protokoll gemessen (Meshulam *et al.*, 1995). Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass während der Inkubation bei 37°C der gelbe, wasserlösliche Farbstoff (2,3)-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphenyl)-(2H)-Tetrazolium-5-Carboxanilid (XTT) zu blau-violetter, wasserlöslichem Formazan reduziert wird. Diese Reduktion ist hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH abhängig. Teilweise erfolgt die Reduktion auch durch Succinat in den Mitochondrien. Somit stellt die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs ein Maß für die Glykolyserate der Zellen *per se* dar und spiegelt dadurch auch die Menge an lebendem Pilzmaterial in der jeweiligen Vertiefung wieder. Für die Untersuchung wurde frische XTT-Lösung zu den bereits vorgekeimten Hyphen gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in eine ELISA-Maxisorp-Platte gefüllt und die Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Reader (*Sunrise Reader*, Tecan) gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 690 nm.

XTT-Lösung: 0,5 mg/ml XTT, 40 µg/ml Coenzym Q (2,3-Dimethoxy-5-Methyl-1,4-Benzochinon) in PBS

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultur und Kryokonservierung von Zelllinien: A549, J774 A.1 und MH-S

Die murine Makrophagen-Zelllinie J774 A.1 und die murine Lungenepithelzelllinie A549 wurden in RPMI 1640 Medium mit 5% fötalem Kälberserum angezogen, die murine Alveolarmakrophagenzelllinie M-HS in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum. Alle Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% bis zur Konfluenz kultiviert.

Um diese adhärenen Zelllinien in neue Kulturschalen umzusetzen, wurde zunächst das vorhandene Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Petrischale 3-4 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen) oder

Accutase (PAA) zugegeben, um die Zellen vom Boden der Schale zu lösen. Jene Zellen, die nach 5 Minuten noch nicht vollständig abgelöst waren, wurden mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden entfernt. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt und die Zellen anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Trypsin-Medium-Gemisches wurden die Zellen entweder in 1 ml frischem Medium resuspendiert, um neue Kulturschalen mit jeweils ca. 100-200 µl Zellsuspension anzupflanzen oder für die Kryokonservierung vorbereitet.

Für die Kryokonservierung wurden die abzentrifugierten Zellen in 1-2 ml Einfriermedium aufgenommen. Aliquots dieser Zellsuspension mit einem Volumen von 0,5 ml wurden in Kryoröhrchen (TPP) pipettiert und diese in mit Isopropanol gefüllten Einfrierdosen (Nalgene) zunächst bei -80°C gelagert, um eine langsame Temperatursenkung zu gewährleisten. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt.

Das Auftauen der Zellen sollte wegen der Toxizität von DMSO möglichst rasch erfolgen. Dennoch wurde darauf geachtet, das Einfriermedium stufenweise zu verdünnen, um eine osmotische Schädigung der Zellen zu vermeiden. Dazu wurde tropfenweise auf 37°C erwärmtes Medium zu den noch halbgefrorenen Zellen gegeben und diese anschließend für 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die weitere Kultivierung erfolgte wie bereits beschrieben.

Einfriermedium: 92% FCS + 8% Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

2.2.2.2 Isolierung, Differenzierung und Kultur von Knochenmarks- makrophagen

Murine Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6-Mäusen isoliert. Dazu wurde jeweils eine sechs bis acht Wochen alte Maus durch CO₂-Inhalation getötet. Im Anschluss wurde die Maus mit Hilfe von Kanülen auf einem mit OP-Tüchern ausgelegten Styroporbrett fixiert. Corpus und Umgebung wurden mit Ethanol (70%) desinfiziert. Das Fell wurde entlang der Hinterläufe mit einer Pinzette angehoben, aufgeschnitten und entfernt. Der Muskelmantel wurde sorgfältig von Femur und Tibia getrennt und die Knochen mit einer Schere am Ansatz des Hüft- und Kniegelenks abgetrennt. Anschließend wurden die Knochen in eine Petrischale auf Eis gelegt. In gleicher Weise wurde mit dem zweiten Hinterlauf und den beiden Vorderläufen verfahren. Das Knochenmark wurde mit Hilfe von Spritze und Kanüle mit sterilem PBS aus den Knochen gespült und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Die

Differenzierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM, das mit 10% FCS und 10% L929-konditioniertem, M-CSF-haltigem (*macrophage colony-stimulating factor*) Zellkulturüberstand (siehe 2.2.2.3) versetzt wurde. Nach einem Tag wurden nichtadhärente Zellen durch mehrfaches Pipettieren abgenommen und gezählt. Anschließend wurden sie mit frischem, angereichertem Medium verdünnt und in einer Konzentration von 5x10⁵ Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät. Fünf Tage nach der Knochenmarksentnahme wurde ein Volumen frisches Medium zugegeben, nach insgesamt acht Tagen waren die Zellen fertig ausdifferenziert.

2.2.2.3 Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand

Das für die Differenzierung der Knochenmarkszellen nötige Cytokin M-CSF wird durch die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 sekretiert (SANFORD *et al.*, 1948). Zur Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand wurden L929-Zellen in DMEM mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen einer Schale auf fünf Schalen, nach weiteren drei Tagen auf insgesamt zehn Schalen verteilt. Bei ca. 50%iger Konfluenz wurde jeden zweiten Tag der Überstand abgenommen und frisches Medium auf die Zellen gegeben, bis diese sich vom Boden ablösten. Der gesammelte Überstand wurde mit Hilfe eines Faltenfilters und einer Sterilfiltermembran (0,2 µm) filtriert und in 50 ml-Aliquots bei -20°C gelagert. Zur Ausdifferenzierung der Makrophagen wird DMEM mit 10% Überstand frisch angesetzt.

2.2.2.4 Isolierung und Kultur von Peritonealzellen

Peritonealmakrophagen, die für Infektionen mit *A. fumigatus* verwendet wurden, wurden aus unstimulierten 8-10 Wochen alten C57BL/6-Mäusen isoliert. Zur Charakterisierung des Granulozyten-Influx wurden Zellen aus dem Peritoneum infizierter Mäuse isoliert (siehe 2.2.2.7.). In beiden Fällen wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse durch CO₂-Inhalation getötet. Im Anschluss wurde die jeweilige Maus mit Hilfe von Kanülen auf einem mit OP-Tüchern ausgekleideten Styroporbrett fixiert. Das Fell über der Peritonealhaut wurde vorsichtig entfernt, ohne diese zu verletzen. Mit einer feinen Kanüle (0,45 x 10 mm) wurden 5 ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle der Maus injiziert und diese anschließend vorsichtig massiert. Die Peritonealhaut wurde mit einer Pinzette angehoben, um mit einer Präparierschere ein kleines Loch einzuschneiden, durch das mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette die im PBS gelösten Peritonealzellen abgesaugt

werden konnten. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen zur Adhärenz der Peritonealmakrophagen 1 Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% FCS inkubiert oder zur Charakterisierung der Zellzusammensetzung mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe 2.2.5.6.)

2.2.2.5 Kultur von Hybridomzelllinien

Die Kultivierung von Hybridomzelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Opti-MEM mit 10% FCS. Bei schlechtem Wachstum der Zellen wurden 1,5% *Hybridoma Cloning Supplement* zugegeben. Um diese nichtadhärenten Zellen umzusetzen wurden sie für 5 min bei 300 g abzentrifugiert und das Zellsediment in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen. Die Kryokonservierung erfolgte in Einfriermedium wie unter 2.2.2.1. beschrieben.

2.2.2.6 Infektionen von Zellen mit *A. fumigatus*

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden sterile Deckgläschen in Zellkultur-Platten mit 24 Vertiefungen gelegt, mit 1 ml Medium bedeckt und insgesamt 5×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach dem Adhärenzieren der Zellen wurden 5×10^6 *A. fumigatus*-Sporen zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Untersuchung der Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen und Epithelzellen

Zur Untersuchung der Cytokin-Ausschüttung von Makrophagen bzw. A549-Zellen wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 150 µl Medium in einer Zellkultur-Platte mit 96 Vertiefungen mit $2,5 \times 10^5$ *A. fumigatus*-Sporen (MOI, *multiplicity of infection*, 10) oder 1,25 mg/ml (w/v) Keimlingen infiziert. Alternativ wurden $2,5 \times 10^4$ Makrophagen mit bereits in der Vertiefung vorgekeimten Hyphen konfrontiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Teilweise wurden die Pilzzellen zuvor durch UV-Bestrahlung inaktiviert. In jedem Fall wurden sie zuvor mit 80 µg/ml Polymyxin B behandelt, um eventuelle Lipopolysaccharid (LPS)-Kontaminationen zu binden. Zur Kontrolle der Reaktivität der Zellen wurden in eine Vertiefung 100 ng/ml LPS, bzw., im Fall von A549-Zellen, 20 ng/ml TNFα zugegeben. Nach

15 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration der enthaltenen Cytokine bestimmt (siehe 2.2.5.3. und 2.2.5.4.)

Untersuchung der Cytokin-Ausschüttung durch humane dendritische Zellen

Die zur Untersuchung der Cytokin-Ausschüttung von humanen dendritischen Zellen durchgeführten Infektionen wurden in Kooperation mit Michael Ok und Dr. Jürgen Löffler an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 humane dendritische Zellen in 1 ml Medium einer Zellkultur-Platte mit 24 Vertiefungen mit 1×10^6 *A. fumigatus*-Keimlingen infiziert (MOI 1). Die Keimlinge wurden vor der Infektion nicht inaktiviert. Nach 6 h wurden die Überstände dieser Co-Kultur abgenommen und mittels ELISA analysiert, um die Konzentrationen der enthaltenen Cytokine zu messen.

2.2.2.7 Generierung von Hybridomzelllinien zur Herstellung monoklonaler

Antikörper

Für Untersuchungen mit dem monoklonalen α -Galactomannan-IgM-Antikörper L10 wurde ein Kontroll-IgM-Antikörper benötigt, der keine Reaktivität mit Galactomannan aufwies. Die Generierung einer Hybridomzelllinie zur Produktion des IgM-Antikörpers A9 wurde analog zu der von Leonie Heesemann durchgeführten Herstellung der L10-produzierenden Hybridomzelllinie ausgeführt (Heesemann, 2010). Dazu wurden BALB/c-Mäuse mit vorbereitetem Antigen immunisiert. Am Tag 32 nach Beginn der Immunisierung wurden die Lymphozyten isoliert und anschließend eine Zellfusion mit der murinen Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Selektivmedium (Opti-MEM + 20 mg/l Hypoxanthin (Invitrogen) + 1,5 mg/l Azaserin (Sigma)). Nicht fusionierte Lymphozyten sind in Zellkultur nicht lebensfähig und sterben bald ab. Das Wachstum nicht fusionierter Myelomzellen wird durch den Einsatz des Selektivmediums verhindert, da die eingesetzte Zelllinie aufgrund einer Mutation der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase nicht in der Lage ist, Hypoxanthin in Purinbasen umzuwandeln. Somit können nur Fusionszellen überleben. Im Anschluss wurden die erhaltenen Hybridomzellklone subkloniert, um homogene Zelllinien zu erhalten, die aus einer Einzelzelle hervorgegangen sind. Die in den Überständen der entstandenen Subklone enthaltenen Immunglobuline wurden schließlich mit Hilfe von ELISA unter Verwendung der *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (Sigma) analysiert, um die jeweilige Immunglobulin-Subklasse festzustellen. (siehe 2.2.5.3.). Eine IgM-produzierende Zelllinie,

die keine Reaktion mit *A. fumigatus*-Lysaten und -Zellen zeigte (A9), wurde schließlich für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2.2.8 Infektionen von Mäusen mit *A. fumigatus*

Intraperitoneale Infektionen

Zur Charakterisierung des Granulozyten-Influx wurden acht Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit 1×10^7 *A. fumigatus*-Sporen in 100 μ l sterilem H₂O intraperitoneal mit Hilfe einer feinen Kanüle (0,45 x 10 mm) infiziert. Die Sporen wurden zuvor mit 80 μ g/ml Polymyxin B versetzt, um eine falsch-positive Rekrutierung von Granulozyten infolge einer LPS-Kontamination zu vermeiden. Nach der jeweils erforderlichen Inkubationszeit wurden die sich im Peritoneum der Maus befindlichen Zellen durch eine Peritoneallavage isoliert (siehe 2.2.2.4.).

Systemische Infektionen

Die zur Untersuchung der Virulenz von *A. fumigatus*-Mutanten durchgeführten systemischen Infektionen von Mäusen wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Echtenacher am Institut für Immunologie der Universität Regensburg ausgeführt. Dazu wurden immunkompetente CD-1-Mäuse retroorbital mit 1×10^6 bzw. 2×10^6 ruhenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert und das Überleben der Mäuse über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet.

Zur Untersuchung der potentiell protektiven Wirkung des monoklonalen α -Galactomannan-IgM-Antikörpers L10 wurde den Mäusen vor einer retroorbitalen Infektion mit 3×10^6 angeschwollenen Sporen 200 μ g Antikörper intravenös injiziert.

Intranasale Infektionen

Zur Charakterisierung von *A. fumigatus*-Mutanten wurden neben systemischen Infektionen auch intranasale Infektionen immungeschwächter Mäuse durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Ilse Jacobsen in der Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen am HKI in Jena ausgeführt. Dazu wurden Mäuse zur Immunsuppression mit Cortison behandelt und anschließend mit 1×10^6 ruhenden *A. fumigatus*-Sporen intranasal infiziert. Das Überleben der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten (Mullis *et al.*, 1986). Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarer Deckplatte mit verschiedenen Taq- und Pfu-Polymerasen unter Verwendung der entsprechenden Puffersysteme nach den Angaben des Herstellers. Das Probenvolumen betrug normalerweise 50 µl, im Fall einer analytischen PCR 16 µl. Für die Anlagerung der Oligonukleotide wurde eine Temperatur ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids gewählt. Im Folgenden ist beispielhaft ein verwendetes Programm dargestellt:

| | | | |
|---------|-------------|--------------------------------|-------------|
| 94°C | 2-10 min | Denaturierung | |
| 94°C | 30 s | Denaturierung | } 30 Zyklen |
| 50-59°C | 30 s | Anlagerung der Oligonukleotide | |
| 72°C | 1-2 min/1kB | Polymerisierung | |
| 72°C | 10 min | Finale Polymerisierung | |
| 4°C | ∞ | Kühlung | |

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die PCR-Produkte bei 8°C oder -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden diese mit Hilfe des *Prep Ease Gel Extraction Kits* (usb) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder durch alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979) oder mit Hilfe folgender Kits nach Angaben des Herstellers isoliert: *Pure Yield Plasmid Miniprep System* bzw. *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega). Die Elution der DNA erfolgte dabei in H₂O_{dest.}

2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus *A. fumigatus*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *A. fumigatus* erfolgte unter Verwendung des *MasterPure Yeast DNA Purification Kits* nach einer Protokollvariante von Johannes Wagener (persönliche Mitteilung).

Das in flüssiger Kultur (20 ml) gewachsenes Myzel wurde mit Hilfe eines Trichters mit Filterpapier geerntet und ca. 200 mg Myzel mit 450 µl *Yeast Cell Lysis Solution* im Schüttelhomogenisator *FastPrep 24* (MP Biomedicals) unter Verwendung der entsprechenden, mit Quarzsand und einer Keramikugel befüllten Reaktionsgefäße (*Lysing Matrix C*, MP Biomedicals) für 35 sec bei 6,5 m/s geschüttelt. Nach Zugabe von 2 µl RNaseA (Qiagen) wurden die Proben für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis 225 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugegeben. Nun folgte eine Zentrifugation bei 10000 g für 10 min. Der klare Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 750 µl Isopropanol ausgefällt. Nach mehrmaligem Invertieren der Gefäße war die DNA als weißer Faden sichtbar. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 20000 g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 70% Ethanol (v/v) gelöst. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 20000 g wurde der Überstand abgenommen und Ethanol-Rückstände durch Inkubation bei 50°C mit offenem Deckel entfernt. Anschließend wurde die sedimentierte DNA in 30 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ + RNaseA (1ml H_2O + 2 µl RNaseA) gelöst.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit Hilfe des *Nano Drop* (Thermo Scientific) durch spektrophotometrische Messung bei 260 nm gegen den Leerwert bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde dabei durch Berechnung des $\text{OD}_{260/280}$ -Verhältnisses kontrolliert. Eine proteinfreie DNA-Lösung weist normalerweise ein $\text{OD}_{260/280}$ -Verhältnis von 1,8-2,0 auf.

2.2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die verwendete Standard-Agarosekonzentration (Roth) betrug 1,5% (w/v) in TAE-Puffer. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6x *Loading Dye*, Promega) versetzt, um die Proben farblich zu

markieren und durch das enthaltene Glycerin die Dichte der Lösung zu erhöhen. Die Auftrennung erfolgte für ca. 50 min bei 80-120 V (abhängig vom Abstand zwischen Anode und Kathode) mit TAE als Laufpuffer. Anschließend wurden die Nukleinsäuren in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in TAE) angefärbt. Nachdem die Gele kurz in H₂O gewaschen wurden, konnte die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und anschließend photographiert werden. Durch einen mitgeführten Größenstandard konnte die Länge der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

2.2.3.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *PrepEase Gel Extraction Kits* (usb) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA in H₂O_{dest} eluiert.

2.2.3.7 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

Sequenz-spezifische Spaltung von DNA

Die Sequenz-spezifische Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen der Firmen MBI Fermentas und Invitrogen. Dabei wurde bei der Festlegung der jeweiligen Puffer-, Konzentrations- und Temperaturbedingungen nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Die Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten erfolgte bei 37°C mit Hilfe einer T4 Polynukleotid-Ligase, die Entfernung der Phosphatgruppen an den 3'- und 5'-Enden der Fragmente bei 37°C unter Verwendung einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase (Fast AP). Beide Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) eingesetzt und durch eine Inkubation von 20 min bei 80°C inaktiviert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.2.3.8 Herstellung von Deletions- und Komplementationskonstrukten

Für die Generierung von *A. fumigatus*-Mutanten wurden Deletionskonstrukte, die ein Hygromycin-Phosphotransferase-Gen enthalten, hergestellt, wobei nach dem von Kämper entwickelten Protokoll vorgegangen wurde (Kämper, 2004). Dazu wurde die 3,5 kb große Hygromycin-Resistenz-Kassette zunächst mit Hilfe des Restriktionsenzym *SfiI* aus dem Plasmid pSK346 ausgeschnitten und über Agarosegelelektrophorese und anschließende DNA-Extraktion mit Hilfe des *Prep Ease Gel Extraction Kits* (usb) aufgereinigt. Die Amplifikation der ca. 1,1 kb großen flankierenden Bereiche des jeweils zu deletierenden Gens erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (siehe 2.1.1., Tabelle 6), wobei diese jeweils inkompatible *SfiI*-Schnittstellen enthielten. Nachdem die flankierenden Bereiche mit *SfiI* geschnitten und anschließend aufgereinigt wurden, ergab eine Ligation dieser Bereiche mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette eine Deletions-Kassette mit einer Größe von ca. 5,6 kb. Um unvollständig ligierte Fragmente zu entfernen wurde der gesamte Ligationsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und nur die 5,6 kb große Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *PrepEase Gel Extraction Kits* (usb) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigte Deletionskassette wurde im Anschluss über *NotI*-Schnittstellen, die über die Oligonukleotide während der Amplifikation der flankierenden Bereiche in die Konstrukte eingebracht wurden, in den Vektor pBluescript kloniert.

Da für die auf diese Art produzierten Deletionskassetten große Mengen der flankierenden Bereiche durch PCR-Amplifikation generiert werden mussten, wurde eine zweite Herstellungsweise der Deletionskonstrukte etabliert. Dabei wurden die flankierenden Bereiche mit einer Pfu-Polymerase und Oligonukleotiden, die jeweils eine *Clal*-Schnittstelle sowie inkompatible *SfiI*-Schnittstellen enthielten, amplifiziert. Mit Hilfe der *Clal*-Schnittstelle wurden der stromaufwärts- und stromabwärts gelegene Bereich zusammenligiert und über die von der Pfu-Polymerase geschaffenen glatten Enden in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert. Das sich ergebende Plasmid wurde mit *SfiI* verdaut, um die aus dem Plasmid pSK346 mit *SfiI* ausgeschnittene und aufgereinigte Hygromycin-Resistenz-Kassette hineinklonieren zu können.

In beiden Fällen wurde die Deletionskassette vor der Transformation mit Hilfe geeigneter Schnittstellen aus den Vektoren geschnitten, über Agarosegelelektrophorese und anschließende DNA-Extraktion aufgereinigt und in linearisierter Form für die Transformation eingesetzt.

Für die Komplementation der Mutanten wurde das jeweilige Gen unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide und einer Pfu-Polymerase amplifiziert und mit Hilfe des

Restriktionsenzym MssI in den Vektor pSK379 kloniert, was bei richtiger Orientierung des Fragments zur Expression des Gens ausgehend vom *gpdA*-Promotor führte.

2.2.3.9 Austausch einzelner Nukleotide

Für den Austausch einzelner Nukleotide in Plasmiden wurde das *Change-IT-Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit* (Affimetrix, usb) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Mit diesem Kit können einzelne oder mehrere Nukleotide in Plasmiden ausgetauscht werden. Dazu wird ein spezielles *Change-IT-Enzyme* verwendet, wodurch die zu mutierenden Plasmide amplifiziert und anschließend sofort ligiert werden. Die Mutationen wurden mit Hilfe der Oligonukleotide eingefügt.

Des Weiteren wurden Nukleotide durch Amplifikation der Plasmide mit einer *LongAmp Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs) ausgetauscht. Diese ist in der Lage, besonders lange DNA-Fragmente mit einer sehr geringen Fehlerquote zu amplifizieren. Auch in diesem Fall wurden die Mutationen durch Verwendung entsprechender Oligonukleotide eingeführt. Da diese Polymerase Fragmente mit Poly-A-Überhängen produziert, wurde eine *blunting reaction* mittels der T4-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) angesetzt, um DNA-Fragmente mit glatten Enden zu produzieren. Diese wurden im Anschluss mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) ligiert, um wieder ein geschlossenes Plasmid zu erhalten.

2.2.3.10 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch-kompetente Bakterien wurden nach einer Modifikation der Rubidiumchlorid-Methode, einer Variante der Calciumchlorid-Methode hergestellt (Cohen *et al.*, 1972; Inoue *et al.*, 1990). Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 1,2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) bis zu einer OD_{595 nm} von 0,5-0,7 inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Kultur wurde bei 4000 g für 15 min zentrifugiert und das Sediment in 150 ml frisch hergestelltem Tfb I resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend nochmals zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Sediment in 20 ml frisch hergestelltem Tfb II resuspendiert. Die Bakterien wurden in Aliquots von 50 μ l aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tfb I: 10 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin;
pH 5,8 mit HCl; sterilfiltrieren

Tfb II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerin;
pH 6,5 mit Essigsäure; sterilfiltrieren

2.2.3.11 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte nach der von Hanahan entwickelten Methode (Hanahan, 1983). Dazu wurden die chemisch-kompetenten Zellen (siehe 2.2.3.10.) zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend maximal 20 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes zugegeben. Für die Transformation reiner Plasmid-DNA wurde maximal 1 µl eingesetzt. Nach einer Inkubation des Ansatzes auf Eis für 30 min folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt (1 min) und nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 100 µl auf selektiven LB-Agarplatten (z.B. mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl abgenommen, das Sediment darin resuspendiert und auch diese aufkonzentrierte Zellsuspension auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C.

2.2.3.12 Transformation von *A. fumigatus*

Die Transformation von *A. fumigatus*-Protoplasten erfolgte nach einem von Sven Krappmann modifizierten Protokoll (persönliche Mitteilung).

Dazu wurden 200 ml AMM mit etwa 2×10^6 Sporen beimpft und für mindestens 16 h bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert. Zur Ernte des Myzels wurde dieses durch sterile, mit Miracloth ausgekleidete Trichter geschüttet. Nach dreimaligem Waschen mit Citrat-Puffer wurde mit Hilfe eines sterilen Spatels ein lockerer Myzel-Klumpen geformt. Dabei wurde darauf geachtet, das Myzel während der Behandlung nicht zu verletzen. Im nächsten Schritt wurde das Myzel in einem sterilen Erlenmeyerkolben in frisch zubereiteter Enzymlösung durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte nun für ca. 45 min bei 30°C und langsamem Schütteln (80 U/min). Der Fortschritt der Protoplastierung wurde mikroskopisch kontrolliert, um eine Schädigung der Protoplasten durch zu lange Inkubation in der Enzymlösung zu vermeiden. Durch mehrmaliges kurzes Schwenken des Kolbens wurden die entstandenen Protoplasten von den Hyphen gelöst und konnten nun mit Hilfe eines weiteren, sterilen, mit Miracloth ausgekleideten Filters von den

Rückständen des Myzels befreit werden. Die Lösung wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) aufgefangen und auf Eis inkubiert. Durch Waschen des Filters mit kalter STC 1700-Lösung wurden die restlichen dort verbliebenen Protoplasten gewonnen und das Zentrifugenröhrchen auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Das Eluat wurde für etwa 5 min auf Eis gekühlt und im Anschluss bei 1700 g und 4°C für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 50 ml kalter STC-Lösung vorsichtig durch Schwenken des Röhrchens resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1700 g, 12 min, 4°C) wurde der Überstand wiederum abgeschüttet und das Sediment vorsichtig in der verbleibenden Flüssigkeitsmenge gelöst. Dabei sollte sich eine Protoplasten-Konzentration von etwa 1×10^9 /ml ergeben. Je 100-150 μ l dieser Lösung wurden in frische 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit maximal 30 μ l DNA-Lösung versetzt und für 23-30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die tropfenweise Zugabe von 250 μ l PEG-4000-Mix, welches durch leichtes Schwenken mit den Protoplasten vermischt wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt und anschließend noch einmal 850 μ l PEG-4000-Mix zugegeben. Während der Transformation wurden die Proben für 15-20 min in einem Zentrifugenröhrchen-Halter über Eis, also bei einer Temperatur etwas niedriger als Raumtemperatur, inkubiert. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit kaltem STC 1700 aufgefüllt, um das Polyethylenglycol wieder zu verdünnen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 1500 g und 4°C wurde der Überstand verworfen, die Protoplasten vorsichtig in der verbleibenden Flüssigkeitsmenge gelöst und im Anschluss in Aliquots von 20 μ l, 60 μ l und ca. 100 μ l aufgeteilt. Jedes dieser Aliquots wurde mit 5 ml flüssigem, nicht zu heißem AMM-Sorbitol-Weichagar (AMM, 0,7% (w/v) Agar + 1,2 M Sorbitol; siehe 2.1.2.2.) vermennt und auf selektive AMM-Sorbitol-Agarplatten (AMM, 2,0% (w/v) Agar + 1,2 M Sorbitol + Antibiotikum; siehe 2.1.2.2.) gegossen. Nach einer Inkubation von 36-48 h bei 37°C waren erste Transformanden sichtbar.

| | |
|----------------|---|
| Citrat-Puffer: | 150 mM KCl, 580 mM NaCl, 50 mM Na-Citrat; pH 5,5 mit Citrat; autoklavieren |
| Enzymlösung: | 900 mg Vinoflow in 30 ml Citratpuffer; sterilfiltrieren |
| STC 1700: | 1,2 M Sorbitol, 50 mM CaCl ₂ , 35 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 5,5; autoklavieren; Lagerung bei 4°C |
| PEG-4000-Mix: | 50 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris pH 7,5, 60% (w/v) Polyethylenglycol 4000; autoklavieren |

2.2.3.13 Sequenzanalyse und Datenbankrecherche

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von der Firma GATC (Kempten) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme DNAMAN (Lynnon Software) und Chromas (Technelysium Pty Ltd).

Datenbankrecherchen wurden unter Verwendung der Programme BlastN und BlastP in den folgenden Datenbanken betrieben: GeneBank/ EMBL/ DDBJ, the Central Aspergillus Repository (CADRE) (http://www.cadre-genomes.org.uk/Aspergillus_fumigatus/), der Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) und der Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>).

Transmembrandomänen wurden mit Hilfe des Programms *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) vorausgesagt, Signalsequenzen mit Hilfe des Programms SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Für die Vorhersage von N-Glycosylierungsstellen wurde NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) verwendet, die Vorhersage von Proteindomänen erfolgte durch Verwendung der InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).

Sequenzhomologien wurden mit Hilfe von EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>) analysiert, Phylogenetische Stammbäume wurden mit CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) nach der *Neighbour-Joining*-Methode erstellt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von *A. fumigatus*-Proteinextrakten

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *A. fumigatus*-Myzel wurde das in Flüssigkultur (20 ml) gewachsene Myzel mit Hilfe eines Trichters mit Filterpapier geerntet und etwa 2-3 Spatelspitzen Myzel in mit Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) befüllte Reaktionsgefäße (*Lysing Matrix A*, MP Biomedicals) gegeben. Anschließend wurde dasselbe Volumen 2x-SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) zugegeben und die Proben für 20 s bei 4,5 m/s im Schüttelhomogenisator *Fast Prep 24* (MP Biomedicals) geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 95°C wurden die Proben erneut geschüttelt und im Anschluss für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 5 min wurde der nun klare Überstand abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

2x-SDS-Probenpuffer: 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,125M Tris/HCl pH 6,8, 0,004% (w/v) Bromphenolblau

2.2.4.2 Herstellung nativer *A. fumigatus*-Proteinextrakte

Zur Herstellung nativer Proteinextrakte aus *A. fumigatus*-Myzel wurde das in Flüssigkultur (20 ml) gewachsene Myzel mit Hilfe eines Trichters mit Filterpapier geerntet, 2-3-mal mit H₂O gewaschen, zwischen zwei Lagen Whatman-Papier getrocknet und anschließend bei -20°C eingefroren. Das gefrorene Myzel wurde in vorgekühlten Mörsern in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Etwa 2-3 Spatelspitzen des Pulvers wurden mit 500 μ l Lysepuffer in mit Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) befüllte Reaktionsgefäße (*Lysing Matrix A*, MP Biomedicals) gegeben. Anschließend wurden die Proben für 25 s bei 5 m/s im Schüttelhomogenisator *Fast Prep 24* (MP Biomedicals) geschüttelt. Nach einer zweiminütigen Pause wurden sie erneut geschüttelt und nach Zugabe von 100 μ l Lysepuffer für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 9500 g und 4°C für 15 min wurde der Überstand abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt

Lysepuffer: 10 mM Tris, pH8, 1% (w/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)

2.2.4.3 Fällung von Proteinen

Die Fällung von sekretierten Proteinen aus dem Überstand von *A. fumigatus*-Flüssigkulturen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 100%iger Trichloressigsäure (TCA). Nach einer Inkubation bei 4°C für 16 h konnten die ausgefällten Proteine durch 30-minütige Zentrifugation bei 13000 g und 4°C gesammelt werden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Sediment getrocknet und in 300 μ l 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8) resuspendiert.

2.2.4.4 Aufreinigung von IgM-Antikörpern

Vor der Aufreinigung der im Zellkultur-Überstand von Hybridomzellen enthaltenen IgM-Antikörper wurde der Überstand durch Cross-Flow-Filtration mit Hilfe des *Labscale TFF Systems* (Millipore) von einem Ausgangsvolumen von ca. 2,5 l auf ein Volumen von ca. 25 ml eingengt und der Antikörper dabei aufkonzentriert. Die weitere Konzentration erfolgte

durch Zentrifugation unter Verwendung der Konzentrations-Röhrchen *Vivaspin 20*, und später *Vivaspin 6* (Sartorius Stedim) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung des IgM-Antikörpers wurde mit Hilfe des *IgM-Purification Kits* (Pierce, Thermo Scientific) analog zur Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei statt des angegebenen Aszites der aufkonzentrierte Hybridom-Überstand eingesetzt wurde. Die Aufreinigung beruht bei diesem Prinzip auf der Bindung des Antikörpers an eine Säule mit immobilisiertem Mannan-Bindeprotein. Nach der Elution wurde der Antikörper gegen PBS dialysiert, um das im Elutionspuffer enthaltene Natrium-Azid zu entfernen.

2.2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Protein-Lösungen wurde mit Hilfe des *Nano Drop* (Thermo Scientific) durch spektrophotometrische Messung bei 280 nm gegen den Leerwert bestimmt.

2.2.4.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei werden Proteine aufgrund der Zugabe von SDS unabhängig von der Eigenladung nach ihrer Größe aufgetrennt. Die dabei verwendeten Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei das Trenngel je nach Bedarf eine Acrylamid-Konzentration von 10%, 12% oder 15% aufwies. Proteinlösungen, die noch keinen Ladepuffer enthielten (siehe 2.2.4.1.), wurden 1:1 mit 2x-SDS-Ladepuffer gemischt, für 10 min bei 95°C inkubiert und für 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend auf das Gel aufgetragen und in speziellen, mit SDS-Laufpuffer befüllten Gelkammern aufgetrennt. Zum Einlaufen der Proteine in das Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 120 V angelegt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte schließlich bei 160 V. Durch Mitführen eines Molekulargewichtsstandards konnte die Größe der untersuchten Proteine abgeschätzt werden.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Western Blot, siehe 2.2.5.1.) oder durch Inkubation der Gele in *Coomassie-Brilliant-Blue*-Färbelösung für 16 h angefärbt. Während der Inkubation in der Entfärbelösung wurde überschüssiges *Coomassie Brilliant Blue* entfernt, sodass die Proteine sichtbar wurden.

| | |
|----------------------|--|
| 2x-SDS-Probenpuffer: | 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,125M Tris/HCl pH 6,8, 0,004% (w/v) Bromphenolblau |
| SDS-Laufpuffer: | 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris |
| Coomassie-Lösung: | 0,2% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250 (Serva), 10% (v/v) Essig- säure, 45% (v/v) Methanol |
| Entfärbelösung: | 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol |

2.2.4.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrer Eigenladung und der molekularen Masse aufgetrennt. Dazu wurden kommerziell erhältliche Tris-Acetat-Polyacrylamid-Gele (*NuPAGE Novex 3-8% Tris-Acetate Gels*, Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit nativem Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen in Tris-Glycin-Laufpuffer bei 150 V für ca. 1 h.

| | |
|-------------------------|--|
| Nativer Ladepuffer: | 62 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 15% (v/v) Glycerin |
| Tris-Glycin-Laufpuffer: | 192 mM Glycin, 25mM Tris |

2.2.4.8 N-Acetylglucosaminidase-*in vitro*-Aktivitäts-Assay

A. fumigatus wurde in AMM, das als Kohlenstoffquelle N-Acetylglucosamin statt Glucose enthielt, angezogen, um die Expression der N-Acetylglucosaminidase zu induzieren. Nach einer Proteinextraktion unter nativen Bedingungen (siehe 2.2.4.2.) wurde ein Teil der Proben einer Endoglycosidase-H-Behandlung unterzogen. Dazu wurden 50 μ l Proteinlösung mit 25 mU Endoglycosidase H (Roche Applied Science) in 50 mM Na-Acetat (pH 5,2) für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Proben durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 2.2.4.8.). Das Gel wurde für 10 min bei Raumtemperatur in Citrat-KOH-Puffer gewaschen und anschließend für 30 min bei 37°C in der Substratlösung inkubiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von *Fast Blue* zur Substrat-Lösung in einer Endkonzentration von 0,7 mM und einer Inkubation bei 60°C.

| | |
|--------------------|------------------------------|
| Citrat-KOH-Puffer: | 0,1 M Citrat; pH 4,0 mit KOH |
|--------------------|------------------------------|

Substratlösung: 0,18 mM Naphthyl-N-Acetylglucosamin (Glycosynth Ltd., Warrington, England) in 0,1 M Citrat-KOH-Puffer

2.2.4.9 Aufreinigung und Analyse von Glycosphingolipiden

Die Extraktion von Glycosphingolipiden aus der Membran von *A. fumigatus* und deren Analyse wurden in Kooperation mit Jakob Engel und Dr. Françoise Routier am Institut für Zelluläre Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Die Glycosyl-Inositol-Phosphorylceramide (GIPCs) wurden aus 500 mg Myzel extrahiert. Dazu wurde das Myzel in Gegenwart von flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung in 6 ml einer 1:1-Mischung aus Chloroform (CHCl_3) und Methanol (MeOH). Durch Zugabe von 3 ml CHCl_3 wurde ein Verhältnis CHCl_3 :MeOH von 2:1 erreicht, woraufhin die GIPCs durch 15-minütige Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur extrahiert wurden. Zur Verringerung der Dichte wurden 3 ml MeOH zugesetzt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2000 g um unlösliches Material zu entfernen. Der Überstand wurde mit Chloroform und Wasser versetzt, um ein Zwei-Phasen-System mit einem Verhältnis CHCl_3 /MeOH/ H_2O von 8:4:3 zu erhalten. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 2000 g wurde die obere, die GIPCs enthaltende Phase abgenommen und auf eine C_{18} SepPak-Chromatographie-Säule (Waters, Eschborn), die zuvor mit 5 ml eines CHCl_3 /MeOH/ H_2O -Gemisches mit dem Verhältnis 3:48:47 äquilibriert wurde, aufgetragen. Für eine Desaminierung mittels salpetriger Säure wurden die GIPCs zuvor 3 h bei 37°C mit 250 mM NaNO_3 und 150 mM Na-Acetat in einem CHCl_3 /MeOH/ H_2O -Gemisch mit dem Verhältnis 3:48:47 inkubiert. Nach dem Auftragen auf die Säule wurden die Glycolipide mit 5 ml MeOH eluiert, unter flüssigem Stickstoff getrocknet und in 200 μl MeOH resuspendiert. Die Analyse erfolgte durch *High-Performance Thin-Layer Chromatography* (HPTLC) und anschließende Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MEST-1 entsprechend der von Toledo und Kollegen beschriebenen Methode (Toledo *et al.*, 2007).

2.2.4.10 N-Glycan-Analyse

Die Präparation und Analyse der N-Glycane wurde in Kooperation mit Jakob Engel und Dr. Françoise Routier am Institut für Zelluläre Chemie der Universität Hannover entsprechend der von Laroy und Kollegen entwickelten Methode durchgeführt (Laroy *et al.*, 2006). Dazu wurden die verschiedenen *A. fumigatus*-Stämme für 3 Tage bei 37°C in Flüssigkultur angezogen. Jeweils 1 ml des Kultur-Überstandes wurde auf *Immobilon P*

Multiwell Platten (Millipore), die eine PVDF-Membran enthalten, übertragen. Nach der Freisetzung der N-Glycane mittels einer Peptid-N-Glycosidase (PNGase F, New England Biolabs) in 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,4 und deren Markierung mit 8-Amino-1,3,6-Pyren-Trisulfonsäure wurden sie unter Verwendung eines *Kapillar-Elektrophorese-DNA-Sequencers* (ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Forster City, USA) mit einer Injektionszeit von 30 bis 90 s aufgetrennt. Durch die Verwendung von Referenz-Glycanen (Dextra Laboratories, Reading, UK) konnten die entstandenen *peaks* den jeweiligen Glycostrukturen zugeordnet werden.

2.2.5 Immunologische Methoden

2.2.5.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)

Nach der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophese (siehe 2.2.4.7.) konnten diese mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Dazu wurden die Proteine entsprechend der *Semidry-Electroblotting*-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran (Porenweite 0,45 μm ; Protran) übertragen. Der Western Blot wurde von der Anodenseite her folgendermaßen aufgebaut: Auf drei Lagen Whatman-Papier wurde die Nitrocellulose-Membran gelegt, auf die das Polyacrylamid-Gel gebettet wurde. Darauf folgten noch einmal drei Lagen Whatman-Papier. Beim Aufbau des Western Blots wurde darauf geachtet, dass alle Bestandteile zuvor sorgfältig in Blotpuffer getränkt wurden und die einzelnen Schichten luftblasenfrei übereinander gelegt wurden. Der Proteintransfer wurde bei 2,5 mA/cm^2 Membran und maximaler Spannung für 90 min durchgeführt.

Blotpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037% (v/v) SDS, 30% (v/v) Methanol

2.2.5.2 Detektion von Proteinen mittels Antikörper

Vor der Detektion der Proteine durch Antikörper wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in TBS-T mit 5 % Milchpulver (*Blotting Grade*; Roth) abgesättigt. Nach kurzem Schwenken in TBS-T wurde die Membran für mindestens 1 h, zum Teil aber über Nacht, in einem spezifischen, entsprechend in TBS-T verdünnten, Primärantikörper inkubiert. Kommerziell erhältliche Antikörper wurden entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt, Kulturüberstände von Antikörper-

produzierenden Hybridomzelllinien wurden 1:1 mit TBS-T gemischt. Eine Inkubation über Nacht wurde bei 4°C durchgeführt, bei kürzeren Zeiträumen erfolgte dieser Schritt bei Raumtemperatur. Durch dreimaliges Waschen in TBS-T für 10 min wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt wurde ein in TBS-T verdünnter, Alkalische-Phosphatase-gekoppelter Sekundärantikörper zugegeben und die Membran wiederum für mindestens 1 h darin geschwenkt. Nach nochmals drei Waschschritten in TBS-T für 10 min wurde die Membran kurz in Glycinpuffer äquilibriert. Anschließend erfolgte die Entwicklung in Glycinpuffer mit 1 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), solange, bis eine Blaufärbung der Banden zu detektieren war.

TBS-T: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20

Glycinpuffer: 0,1 M Glycin pH 10, 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂

2.2.5.3 Bestimmung der Immunglobulinsubklasse monoklonaler Antikörper mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Die Immunglobulinsubklasse der von Hybridomzelllinien produzierten monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe der *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (Sigma) bestimmt. Die darin enthaltenen Kontroll-Antikörper-Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM) wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in Carbonatpuffer verdünnt, jeweils 100 µl davon in die Vertiefungen einer ELISA-Maxisorp-Platte gefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden stets Doppelbestimmungen angesetzt und Negativkontrollen ohne Antikörper-Isotypen mitgeführt. Überschüssiger Antikörper wurde nach der Inkubation durch dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit TBS-T im ELISA-Washer (*Columbus Pro*, Tecan) entfernt. Die Absättigung der Bindungsstellen erfolgte durch eine Inkubation mit 300 µl TBS-T mit 1% BSA für 2 h bei Raumtemperatur. Erneut erfolgten drei Waschschritte mit TBS-T. Anschließend wurden jeweils 200 µl des 1:4 mit TBS-T verdünnten Hybridom-Zellkultur-Überstandes in die Vertiefungen gefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Zur Detektion wurden 100 µl eines 1:1000 in TBS-T verdünnten, Alkalische Phosphatase-gekoppelten α-Maus-IgG/IgM-Antikörpers eingesetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µl einer Phosphatase-Substrat-Lösung zugegeben. Dazu wurde eine Tablette Phosphatase-Substrat (Sigma) in 5 ml ELISA-Entwicklungspuffer gelöst. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte im ELISA-Reader (*Sunrise Reader*, Tecan,) bei 405 nm, die Referenzwellenlänge betrug 620 nm.

| | |
|---------------------|--|
| TBS-T: | 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20 |
| Carbonatpuffer: | 0,1 M NaHCO ₃ ; pH 9,6 |
| Entwicklungspuffer: | 0,97% (v/v) Diethanolamin, 0,1 mM MgCl ₂ ; pH 9,8 |

2.2.5.4 Messung von Cytokin-Konzentrationen mittels ELISA

Die Konzentrationen von IL-10 und TNF α im Zellkulturüberstand von mit *A. fumigatus* infizierten Makrophagen wurde mittels ELISA unter Verwendung der *Kits Mouse IL10 Duo Set* und *Mouse TNF Duo Set* (R&D Systems) bestimmt. Für die Messung von IL-8 im Überstand von infizierten A549-Zellen wurde das *Human IL8 Duo Set* (R&D Systems) verwendet. Die Durchführung des ELISAs entsprach jeweils den Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader bei 450 nm. Die Referenzwellenlänge betrug 540 nm.

2.2.5.5 Messung von Cytokin-Konzentrationen mittels Durchflusszytometrie

Für die Messung der IL-10-, IL-6- und TNF α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand von infizierten Makrophagen wurde neben dem ELISA die cba-(*Cytometric Bead Array*)-Technologie (Becton Dickinson) zum Einsatz gebracht. Bei dieser Untersuchung werden die Konzentrationen der Cytokine durch die Analyse spezifischer *beads* im Durchflusszytometer bestimmt. Dazu wurden die folgenden Kits entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt: *Mouse IL-10 Flex Set*, *Mouse IL-6 Flex Set* und *Mouse TNF Flex Set* (Becton Dickinson). Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer (FACS Canto II, Becton Dickinson). Für die Auswertung wurde die zugehörige Software *FCAP Array* (Soft Flow Inc.) verwendet.

2.2.5.6 Charakterisierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von Zellen z.B. nach einer Peritoneallavage (siehe 2.2.2.4.) wurden diese zunächst durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden ca. 1×10^7 Zellen in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern entsprechend der Angaben der Hersteller gefärbt. Für die Markierung von Granulozyten wurde ein FITC-gekoppelter α -Maus-Gr-1-Antikörper (Miltenyi Biotec) eingesetzt, für die Markierung von Makrophagen ein *Pacific-Blue*-gekoppelter α -Maus-F4/80-Antikörper. Die

Analyse erfolgte im Durchflusszytometer (FACS Canto II, Becton Dickinson) unter Verwendung der Software FACSDiva (Becton Dickinson), die auch für die Datenauswertung benutzt wurde.

FACS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10,0 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, 2 mM EDTA, 0,5% (w/v) BSA, pH 7,2

2.2.6 Mikroskopie

2.2.6.1 Lichtmikroskopie

Die mikroskopische Analyse lebender Makrophagen, Epithel- und *A. fumigatus*-Zellen erfolgte mit Hilfe des inversen Hellfeld- und Phasenkontrast-Mikroskops Zeiss Axiovert 25. Unter Verwendung des entsprechenden Adapters konnten Aufnahmen der Zellen mit einer Digitalkamera (Kodak) gemacht werden.

2.2.6.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Für Immunfluoreszenzfärbungen von *A. fumigatus*-Hyphen und Säugetierzellen wurden diese auf sterilen Deckplättchen in einer Zellkultur-Schale mit 24 Vertiefungen angezogen und anschließend für 5 min mit 3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS oder entsprechend der Hersteller-Angaben der im Anschluss zu verwendenden Antikörper fixiert. Nachdem die Proben mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte bei Zellkulturen in der Regel ein Permeabilisierungsschritt. Dazu wurden die Zellen für 10 s in 0,2% Triton X100 in PBS (v/v) inkubiert. Da auf *A. fumigatus*-Hyphen nur Oberflächen-Strukturen detektiert wurden, war für diese Proben kein Permeabilisierungsschritt notwendig. Nach nochmaligem Waschen der Proben wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 3% Ziegen Serum in PBS bei 37°C für 1 h abgesättigt. Nachdem die Proben erneut in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Bindung des primären Antikörpers bei 37°C für 1 h. Kommerziell erhältliche Antikörper wurden dazu entsprechend der Angaben des Herstellers verdünnt, die Zellkultur-Überstände Antikörper-produzierender Hybridomzellen wurden 1:1 mit PBS gemischt. Nach der Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch PBS ab gespült, im Anschluss wurde ein entsprechender fluoreszenzmarkierter in PBS verdünnter Sekundärantikörper zugegeben und die Proben für 1 h bei 37°C inkubiert. Nachdem der nicht-gebundene Antikörper mit PBS ab gespült worden war, wurden die Deckgläschen

umgedreht in Einbettmedium auf einem Objektträger platziert und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (siehe 2.2.6.5).

2.2.6.3 Filipin-Färbung

Für die Färbung von *A. fumigatus* mit dem Sterol-bindenden Agens Filipin wurden zunächst auf sterilen Deckgläschen Hyphen in YG-Medium angezogen, das Medium abgenommen und die Hyphen für fünf Minuten in vorgewärmtem Medium mit 25 µg/ml Filipin inkubiert. Nachdem das Filipin mit frischem, vorgewärmtem Medium ausgewaschen worden war, wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit Einbettmedium gelegt, mit Nagellack umschlossen und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert (siehe 2.2.6.5).

2.2.6.4 Nachweis von Phagosomen durch Rhodamin-markiertes Dextran

Zum Nachweis von Phagosomen, die aufgrund der Makropinozytose-ähnlichen Aufnahme von Sporen gebildet wurden, wurden J774-Makrophagen auf Deckgläschen in Gegenwart von 2 mg/ml Rhodamin-markiertem Dextran für 15 min mit Sporen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes infiziert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für 5 min mit 3,7% Formaldehyd in PBS (v/v) fixiert. Nachdem die Proben mit PBS gewaschen worden waren erfolgte ein Permeabilisierungsschritt für 10 s in 0,2% Triton X100 in PBS (v/v). Anschließend wurde das Aktin-Cytoskell durch 30-minütige Inkubation in 2 µg/ml Cy5-markiertem Phalloidin angefärbt. Nach erneutem Waschen der Proben mit PBS wurden diese in Einbettmedium auf einem Objektträger platziert, mit Nagellack umschlossen und mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops ausgewertet (siehe 2.2.6.5).

2.2.6.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Mit Hilfe der Konfokalen Laserscanning-Mikroskope Leica TCS NT und Leica SP-5 wurden Hellfeld- und Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Zellen sowie *A. fumigatus* durchgeführt. Zur Anregung der Fluorophore wurden Laser der Wellenlänge 488 nm und 561 nm verwendet. Es wurden Aufnahmen mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv (63x/1,4 Oil) gemacht. Der Abstand zwischen den einzelnen

Schnittebenen betrug in der Regel ca. 500 nm. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software-Pakete LAS AF (Leica) und Adobe Photoshop.

2.2.6.6 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die jeweiligen Proben in Fixierpuffer fixiert und anschließend eingebettet. Die Aufnahmen und die darauf folgende Messung der Zellwanddicke wurden von Dr. Manfred Rohde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig gemacht.

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

Cacodylatpuffer: 0,1 M Cacodylat 0,09 M Saccharose, 0,01 M CaCl₂, 0,01 M MgCl₂; pH 7,4

3 Ergebnisse

3.1 Reaktionen verschiedener Immunzellen auf *A. fumigatus*

Den Ausgangspunkt einer systemischen *A. fumigatus*-Infektion stellt zumeist der Alveolarraum dar, wobei sich der Verlauf einer solchen Infektion maßgeblich in der frühen Phase entscheidet, wenn Sporen auskeimen und letztendlich Hyphen bilden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Reaktionen von Epithelzellen, Makrophagen und Granulozyten auf *A. fumigatus* untersucht.

3.1.1 Erster Kontakt mit dem Pathogen *A. fumigatus*: alveolare Epithelzellen

Die Zusammensetzung der Zellen im Alveolarraum wird durch Epithelzellen vom Typ I und Typ II dominiert (Herzog *et al.*, 2008), weshalb die Wirkung von *A. fumigatus* auf das alveolare Epithel anhand von A549-Zellen untersucht wurde. Diese Typ II-ähnliche humane Lungenkarzinom-Epithelzelllinie stellt ein Standard-Modell dar, um die Interaktionen von *A. fumigatus* mit dem alveolären Epithel zu analysieren.

3.1.1.1 Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Strukturen zur Aufnahme von Konidien

Es ist bekannt, dass Konidien von *A. fumigatus* an A549-Zellen binden (Bromley and Donaldson, 1996). Diese Interaktion und die phagozytische Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen durch A549-Zellen wurden nach Anfärben des Pilzes mit Blankophor durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie beobachtet. Der optische Aufheller Blankophor geht durch Interkalation eine starke Bindung mit β -glycosidisch verknüpften Polysacchariden ein, die in Form von Chitin und Glucanen Bestandteil der Pilzzellwand sind (Ruchel *et al.*, 2004). Abb. 9 zeigt den zeitlichen Verlauf einer Infektion von A549-Zellen mit *A. fumigatus*-Sporen. Es wird deutlich, dass die Zellen bereits nach 2 Stunden zahlreiche Sporen gebunden und internalisiert hatten, wobei diese Anzahl mit Verlängerung der Infektionsdauer noch ansteigt. Acht Stunden nach dem Start der Infektion beginnen die Sporen auszukeimen. In Abb. 9 ist für diesen Zeitpunkt eine sich teilende Zelle mit phagozytierten, auskeimenden Sporen abgebildet.

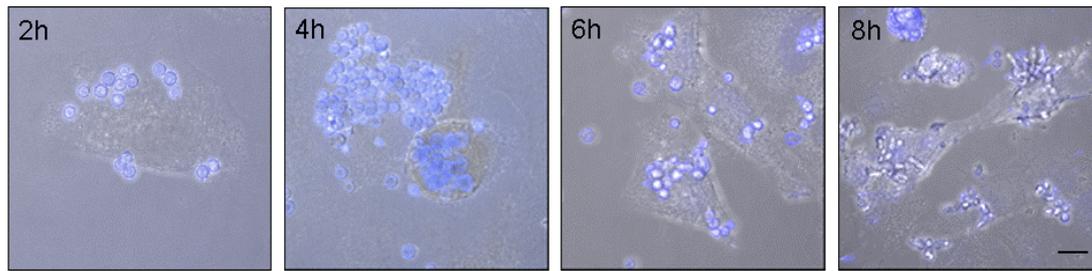


Abb. 9 Zeitlicher Verlauf einer Infektion von A549-Zellen mit Sporen von *A. fumigatus*

Fluoreszenz- und Hellfeld-Aufnahmen einer Infektion von A549-Zellen mit Sporen von *A. fumigatus* nach Anfärben des Pilzes mit Blankophor zu den angegebenen Zeitpunkten. Für den Zeitpunkt $t = 8$ h wurde eine sich teilende Zelle mit phagozytierten, auskeimenden Sporen abgebildet. Es werden jeweils Projektionen aus allen Schnittebenen dargestellt. Der angezeigte Größenmarker entspricht $10 \mu\text{m}$ und ist für alle Bilder anzuwenden.

Näheren Aufschluss über die Bindung der Sporen an Epithelzellen gaben elektronenmikroskopische Aufnahmen, die in Kooperation mit Dr. Manfred Rohde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig gemacht wurden. Dazu wurden A549-Zellen mit *A. fumigatus*-Sporen infiziert und nach achtstündiger Inkubation mit Cacodylatpuffer fixiert.

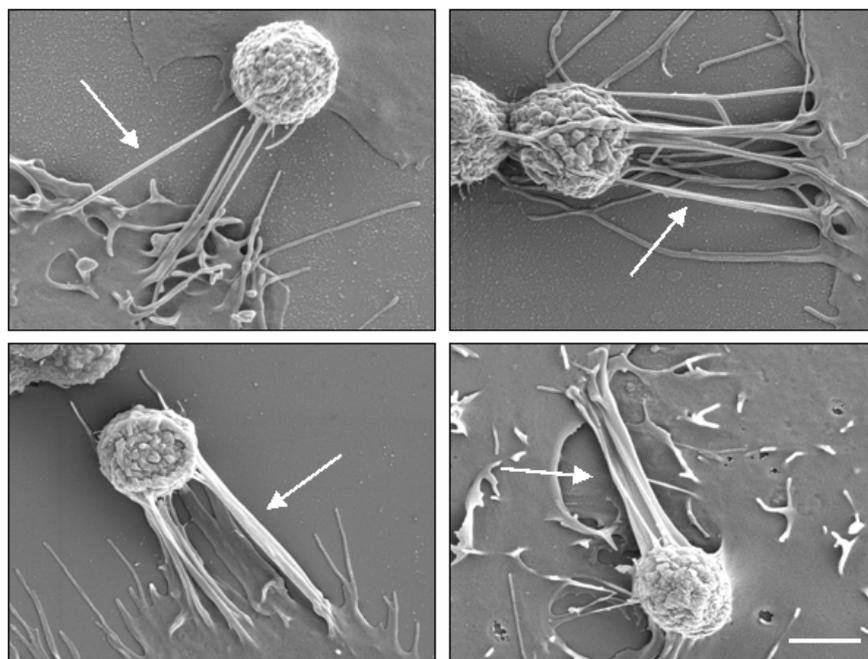


Abb. 10 Filopodien-ähnliche Strukturen während der Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahmen von Filopodien-ähnlichen Strukturen, die charakteristisch sind für die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch A549-Zellen. Die Aufnahmen zeigen Zellen nach einer achtstündigen Infektion mit Sporen von *A. fumigatus*. Filopodien-ähnliche Strukturen sind durch einen Pfeil markiert. Der angezeigte Größenmarker gilt für alle Bilder und entspricht $2 \mu\text{m}$.

Die im Anschluss angefertigten Aufnahmen zeigen deutlich die Ausbildung Filopodien-ähnlicher Strukturen, die der Bindung und Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen durch A549-Zellen dienen (Abb. 10).

Die Zusammensetzung dieser Strukturen wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz näher analysiert. Dazu wurden die Zellen, wiederum nach achtstündiger Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen, fixiert und das Aktin-Cytoskelett mit Hilfe von Rhodamin-markiertem Phalloidin, das an F-Aktin bindet, rot angefärbt. Abb. 11 zeigt in Fluoreszenz- sowie Hellfeldaufnahmen die Ausbildung der Filopodien-ähnlichen Strukturen in Richtung des Keimschlauchs einer auskeimenden Spore. Diese stellen offensichtlich einen stärkeren Stimulus für die Zellen dar als ruhende Sporen. Weiterhin spiegelt die deutliche rote Fluoreszenz einen hohen Anteil an F-Aktin in der Aufnahme-Struktur wieder.

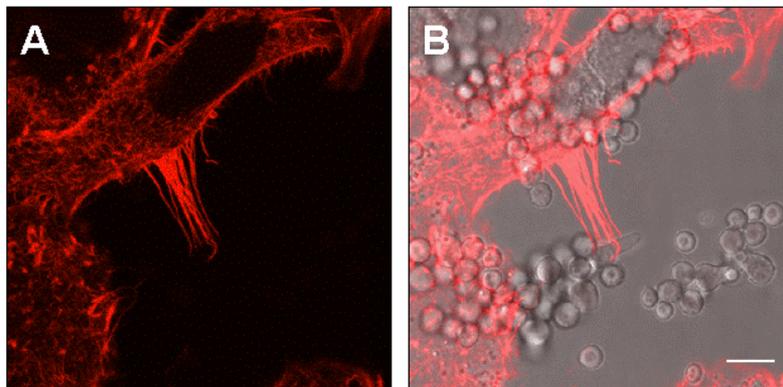


Abb. 11 Detektion von F-Aktin in den Filopodien-ähnlichen Strukturen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A) der Filopodien-ähnlichen Strukturen, die charakteristisch sind für die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch A549-Zellen. Die Aufnahmen zeigen Zellen nach achtstündiger Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen. Das Aktin-Cytoskelett wurde nach Fixierung der Zellen mit Hilfe von Rhodamin-markiertem Phalloidin rot gefärbt. Zur besseren Sichtbarkeit der Sporen wurden zudem aus Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen überlagerte Bilder angefertigt (B). Die Abbildungen zeigen eine Projektion aus allen Schnittebenen. Der abgebildete Größenmarker entspricht 10 μm .

Im Folgenden wurde zudem die Bedeutung der Mikrotubuli für die Ausbildung dieser Strukturen durch Immunfluoreszenz analysiert. Dazu wurde neben Rhodamin-markiertem Phalloidin ein α -Tubulin-Antikörper mit entsprechendem Cy5-markierten Sekundärantikörper eingesetzt. Wie Abb. 12 zeigt, ist Aktin diejenige Cytoskelett-Komponente, die für die Ausbildung der Filopodien-ähnlichen Struktur verantwortlich ist. Während das durch rote Fluoreszenz dargestellte Aktin sich besonders rund um die Spore ansammelt und im hinteren Teil der Zelle kaum zu finden ist, scheint das in blau dargestellte Tubulin einen unwesentlichen Anteil an der Ausbildung der Filopodien-ähnlichen Struktur zu haben. Das

Mikrotubuli-Skelett ist stattdessen im hinteren Teil der Zelle sehr stark ausgeprägt und scheint sich allgemein durch die Interaktion mit der Spore nicht zu verändern. Somit bilden A549-Zellen stark ausgeprägte Aktin-reiche Filopodien-ähnliche Strukturen, die der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen dienen.

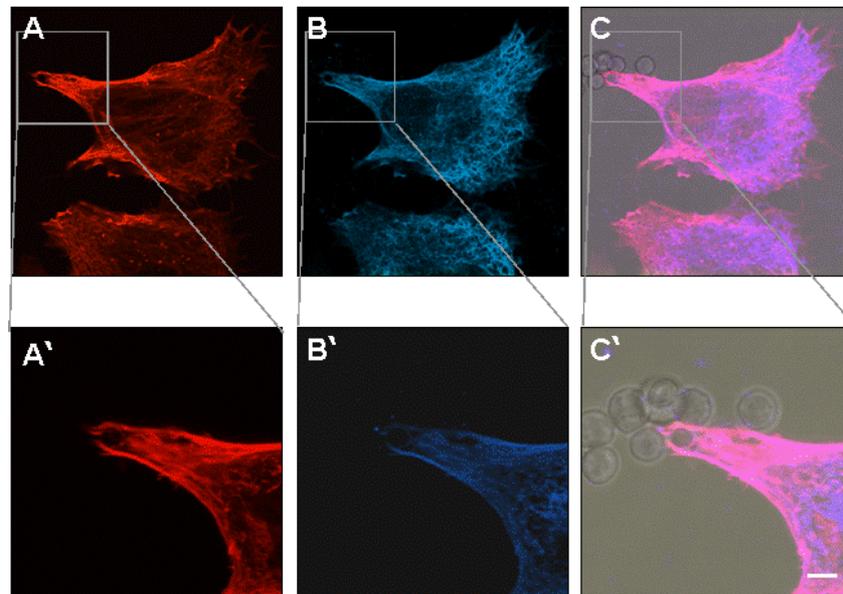


Abb. 12 Primärer Nachweis von F-Aktin in den Aufnahmestrukturen, keine Bedeutung von Tubulin

Aufnahmen von A549-Zellen nach achtstündiger Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen, nachdem das Aktin-Cytoskelett mit Rhodamin-markiertem Phalloidin (A und A') bzw. die Mikrotubuli mit einem α -Tubulin-Antikörper und entsprechenden Cy5-markierten Sekundär-Antikörper (B und B') sichtbar gemacht wurden. Die Bilder zeigen eine Projektion aller Schnittebenen. Zur besseren Darstellung der Interaktion wurden die Abbildungen beider Cytoskelettkomponenten mit Hellfeld-Aufnahmen überlagert (C und C'). Der in C' dargestellte Größenmarker ist für alle Bilder gültig und entspricht 2 μ m.

3.1.1.2 Keine Ausschüttung von IL-8 durch A549-Zellen als Reaktion auf *A.*

fumigatus

IL-8 ist ein Chemokin der CXC-Familie, das von Epithelzellen, aber auch Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten produziert wird. IL-8 stellt einen Entzündungsmediator dar, der für die chemotaktische Rekrutierung weiterer Zellen, vor allem neutrophiler Granulozyten, aber auch Makrophagen, Keratinozyten und Mastozyten verantwortlich ist. Deshalb wurde die IL-8-Produktion als Reaktion von A549-Zellen auf verschiedene Formen von *A. fumigatus* bestimmt.

Die Zellen wurden für 15 Stunden mit ruhenden Sporen, geschwollenen Sporen, Keimlingen, Hyphenfragmenten und Hyphen infiziert. Durch eine Bestimmung der IL-8-Konzentration im Kulturüberstand der Zellen mit Hilfe des *IL-8-ELISA-Duo-Sets* von R&D wurde deutlich, dass die A549-Zellen auf keine der verwendeten *A. fumigatus*-Formen mit einer deutlichen IL-8-Produktion reagierten (Abb. 13). Jedoch beweist eine sehr hohe IL-8 Konzentration im Überstand der Zellen, die mit TNF α (20 ng/ml) stimuliert wurden, das bekanntlich eine starke IL-8-Produktion in Epithelzellen hervorruft (Standiford *et al.*, 1990), dass A549-Zellen generell zur Produktion von IL-8 fähig sind.

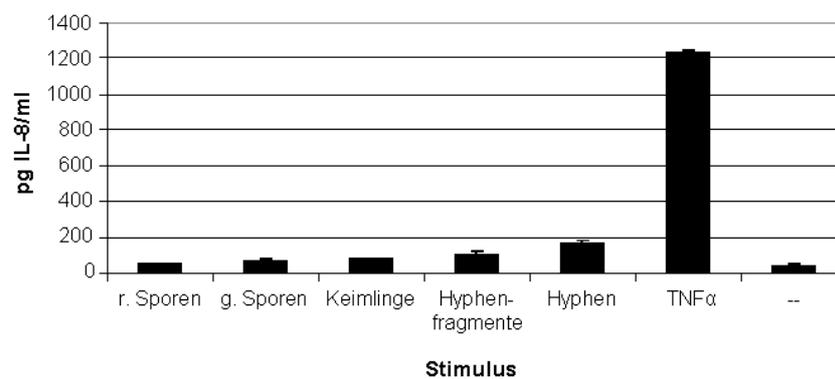


Abb. 13 Keine IL-8-Produktion durch A549-Zellen als Reaktion auf *A. fumigatus*

Zur Bestimmung der Cytokinantwort wurden Zellen der Zelllinie A549 mit ruhenden Sporen, geschwollenen Sporen, Keimlingen, Hyphenfragmenten und Hyphen infiziert und nach 15 Stunden die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand mit Hilfe des *IL-8-ELISA-Duo-Sets* von R&D bestimmt. Als Positivkontrolle diente TNF α (20ng/ml). Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

r. Sporen: ruhende Sporen; g. Sporen: geschwollene Sporen

3.1.1.3 Keine NF κ B- und HIF-Aktivierung durch *A. fumigatus* in A549-Zellen

HIF1, ein Transkriptionsfaktor der HIF-Familie, Hypoxia-inducible Factors, reagiert primär auf Änderungen der Sauerstoff-Konzentration in der Umgebung der jeweiligen Zelle, speziell auf eine Reduzierung des Sauerstoffgehalts oder Hypoxie (Wang *et al.*, 1995). Jedoch gab es in den letzten Jahren zahlreiche Fakten, die auf eine wichtige regulatorische Rolle von HIF1 während einer Entzündungsreaktion hinwiesen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass HIFs zu den inflammatorischen Funktionen verschiedener Zelltypen wie Epithelzellen, Makrophagen, Neutrophilen, und dendritischen Zellen beitragen (Imtiyaz and Simon, 2010). Jung und Kollegen konnten zeigen, dass HIF1 in A549 durch das proinflammatorische Cytokin IL-1 β über einen Signaltransduktionsweg, der den

Transkriptionsfaktor NFκB enthält, aktiviert wird und dadurch eine mögliche Bedeutung für die Auslösung einer Entzündungsreaktion erlangt (Jung *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde durch Immunfluoreszenz untersucht, ob eine Infektion von A549-Zellen mit *A. fumigatus*-Sporen zwar keine Ausschüttung von IL-8, aber dennoch eine HIF1-Aktivierung hervorruft. Dazu wurde die Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Fixierung der Zellen gestoppt und mit Hilfe eines α-HIF1-Antikörpers sowie eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörpers die Verteilung von HIF in der Zelle sichtbar gemacht. Eine Aktivierung von HIF wäre dabei als Translokation in den Zellkern sichtbar, dies konnte jedoch zu keinem der analysierten Zeitpunkte ($t = 1 \text{ h}, 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 6 \text{ h}, 8 \text{ h}, 15 \text{ h}$ und 24 h) beobachtet werden (Abb. 14 und Daten nicht gezeigt). Eine Stimulierung der Zellen mit IL-1β (500 pg/ml) ergab ein positives Signal, was beweist, dass eine Translokation von HIF1 in den verwendeten Zellen generell möglich ist.

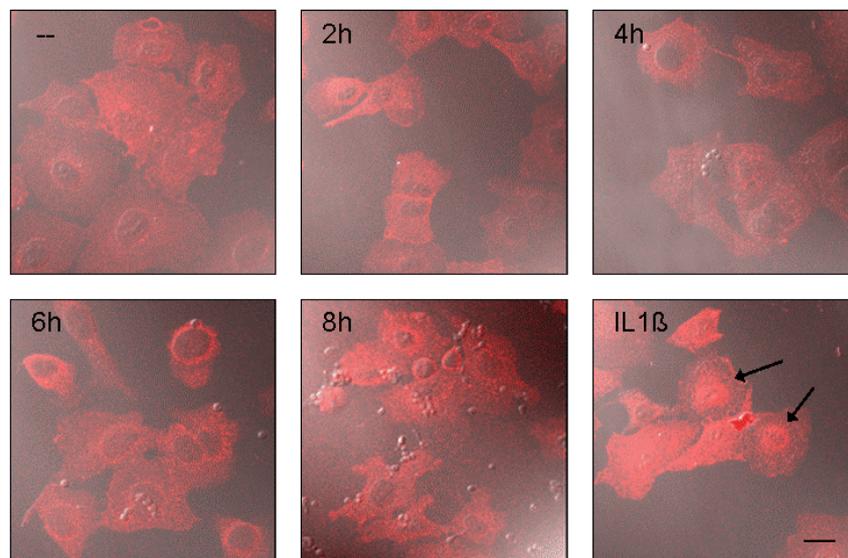


Abb. 14 Keine HIF-1 -Aktivierung in A549-Zellen durch *A. fumigatus*

Eine Infektion von A549-Zellen mit *A. fumigatus* wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Fixierung der Zellen gestoppt und anschließend die Lokalisation von HIF1 in der Zelle mittels eines α-HIF1-Antikörpers sowie eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen (--), als Postivkontrolle mit IL-1β (500 pg/ml) stimulierte Zellen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Es ist eine Projektion aller Schnittebenen abgebildet. Der angegebene Größenmarker entspricht 10 μm und gilt für alle Aufnahmen.

Da der Signaltransduktionsweg, der zur IL-1β-abhängigen Aktivierung von HIF-1 in A549-Zellen führt, den Transkriptionsfaktor NFκB enthält (Jung *et al.*, 2003), sollte untersucht werden, ob NFκB trotz mangelnder Translokation von HIF1 aktiviert wird, da es im Signaltransduktionsweg weiter oben agiert. NFκB ist insgesamt von großer Bedeutung für

die Regulation der Immunantwort. In den meisten Zelltypen liegt NFκB, solange die jeweilige Zelle nicht stimuliert ist, inaktiv im Cytoplasma vor. Erst wenn das gebundene inhibitorische Protein IκB ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird, kommt es zur Aktivierung von NFκB und dadurch zur Translokation in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert. Eine Aktivierung von NFκB gilt als kritisch für die Entstehung von Entzündungen, da es für die Regulation von vielen Cytokinen und Adhäsionsmolekülen verantwortlich ist. Deshalb wurde durch Immunfluoreszenz untersucht, ob eine Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen zur NFκB-Aktivierung in A549-Zellen führt. Dieses Experiment wurde analog zur Untersuchung der HIF-Aktivierung durchgeführt. Die Verteilung von NFκB innerhalb der Zelle wurde mittels eines Antikörpers, der gegen die p65-Untereinheit von NFκB gerichtet ist, sowie eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (t = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 15 h und 24 h) konnte eine Translokation von NFκB in den Zellkern beobachtet werden (Abb. 15 und Daten nicht gezeigt). Jedoch führte eine Stimulierung der Zellen mit IL-1β (500 pg/ml), wie schon im Fall von HIF-1, zu einem positiven Signal, womit gezeigt wurde, dass die verwendeten Zellen prinzipiell zur Translokation von NFκB fähig sind.

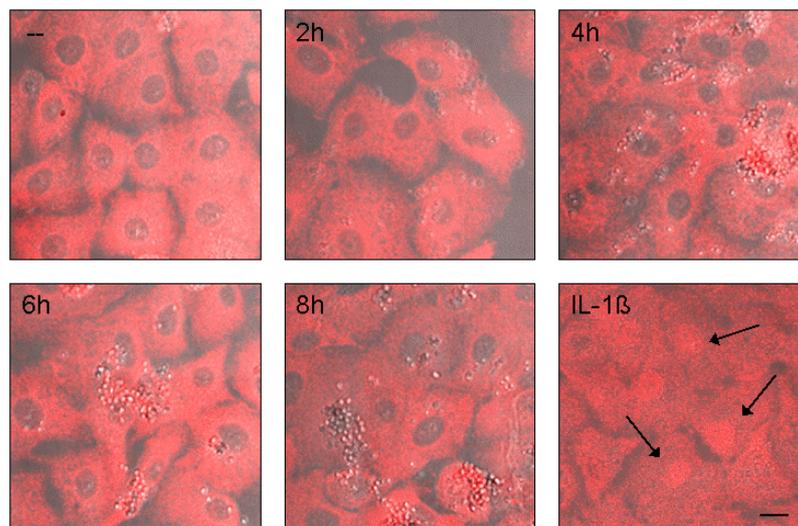


Abb. 15 Keine NFκB -Aktivierung in A549-Zellen durch *A. fumigatus*

Eine Infektion von A549-Zellen mit *A. fumigatus* wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Fixierung der Zellen gestoppt und anschließend die Verteilung von NFκB in der Zelle mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen die p65-Untereinheit von NFκB gerichtet ist, sowie eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen (--), als Postivkontrolle mit IL-1β (500 pg/ml) stimulierte Zellen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Es ist eine Projektion aller Schnittebenen abgebildet. Der angegebene Größenmarker entspricht 10 μm und ist für alle Aufnahmen gültig.

3.1.2 Primäre Verteidigungslinie bei der Bekämpfung von *A. fumigatus*: residente Makrophagen

Residente alveoläre Makrophagen nehmen eingeatmete Konidien auf, töten sie ab und reagieren auf diese Begegnung mit der Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen. Um aus diesem Grund die Interaktion von Makrophagen und *A. fumigatus* näher zu beleuchten, wurden murine Knochenmarks- und Peritonealmakrophagen, sowie MH-S-Zellen, die zu einer murinen Alveolarmakrophagen-Zelllinie gehören, mit verschiedenen Formen des Pathogens konfrontiert.

3.1.2.1 Die Rolle des Cytoskeletts während der Phagozytose von Konidien

Es ist bekannt, dass Aktin eine Rolle bei der Phagozytose von Konidien durch Makrophagen spielt (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Um die dynamischen Veränderungen des Cytoskeletts während einer Infektion von Makrophagen mit *A. fumigatus* über einen Zeitraum von zwölf Stunden zu dokumentieren wurden primäre murine Makrophagen, in diesem Fall Knochenmarksmakrophagen, mit lebenden Sporen eines GFP-exprimierenden Stammes infiziert. Die Infektion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Fixierung der Zellen gestoppt und mit Hilfe von Rhodamin-markiertem Phalloidin das Aktin-Cytoskelett rot angefärbt.

Wie die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 16 zeigen, konnten schon nach kurzer Zeit Ansammlungen von Aktin rund um die aufgenommenen Sporen beobachtet werden. Dies verstärkte sich mit Verlängerung der Inkubationszeit (Daten nicht gezeigt). Besonders sieben Stunden nach Beginn der Infektion, einem Zeitraum, den die meisten Sporen benötigen, um Keimschläuche zu bilden, waren deutliche Aktinansammlungen an auskeimenden Sporen bemerkbar. Ebenso konnten diese zu einem späteren Zeitpunkt ($t = 12$ h) entlang von längeren Keimschläuchen beobachtet werden (Abb. 16). Eine Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts ist somit nicht nur zur Aufnahme der Sporen wichtig, sondern ist bezeichnend für die gesamte Interaktion der Makrophagen während einer *A. fumigatus*-Infektion. Besonders Veränderungen in der Morphologie des Pilzes führten zu einer Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts.

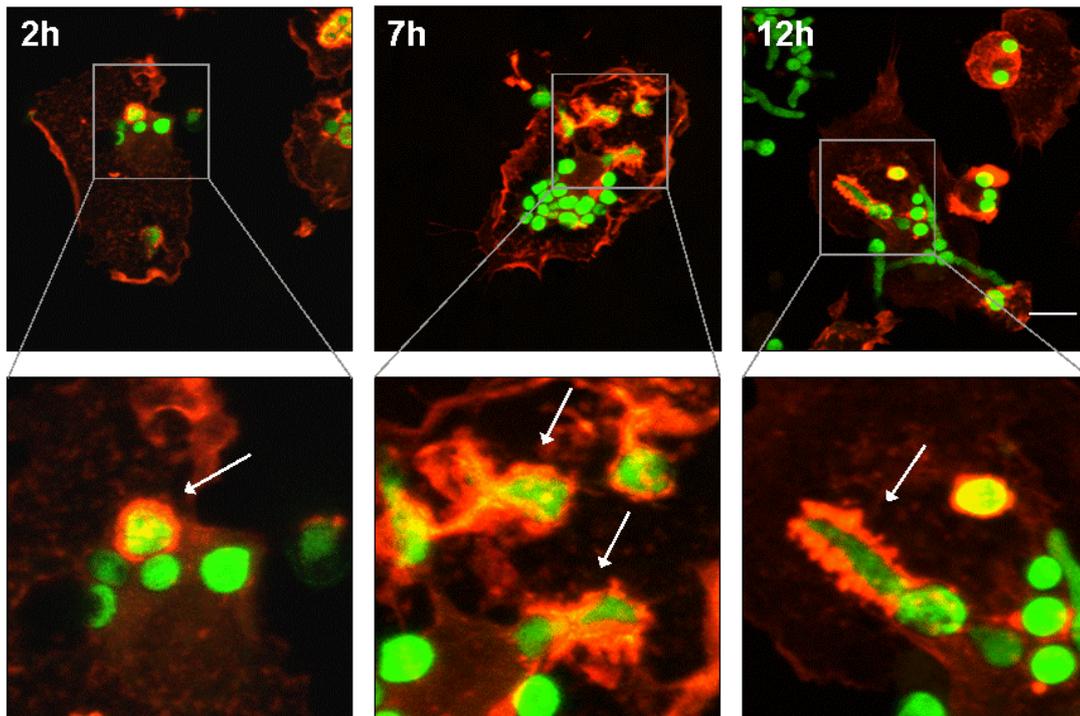


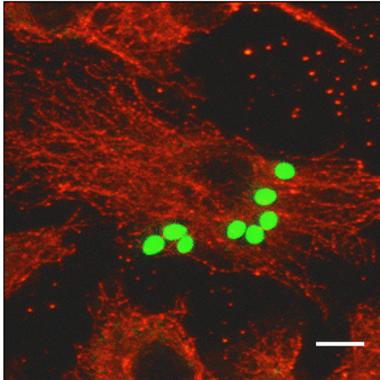
Abb. 16 Detektion von F-Aktin-reichen Strukturen um Sporen und Hyphen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes in murinen Knochenmarksmakrophagen

Murine Knochenmarkszellen aus C57BL/6-Mäusen wurden mit Hilfe des Cytokins M-CSF zu Makrophagen differenziert. Diese wurden im Anschluss mit Sporen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes infiziert, und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Das Aktin-Cytoskelett wurde durch Rhodamin-markiertes Phalloidin rot gefärbt. Aktinansammlungen um phagozytierte *A. fumigatus*-Sporen und wachsende Hyphen wurden mit einem Pfeil markiert. Die Auswertung erfolgte am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, wobei Projektionen aller Schnittebenen abgebildet sind. Der angegebene Größenmarker entspricht 10 μm und ist für die Aufnahmen gültig der oberen Reihe gültig.

Grün: *A. fumigatus* Rot: Aktin-Cytoskelett der Makrophagen

Durch Anfärben der Mikrotubuli einer mit GFP-Sporen infizierten Zelle mittels eines α -Tubulin-Antikörpers und eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundär-Antikörpers konnten keine auffälligen Ansammlungen von Mikrotubuli um intrazelluläre Sporen beobachtet werden (Abb. 17), was zeigt, dass bei Makrophagen Mikrotubuli keine Rolle während der Interaktion mit *A. fumigatus* spielen, wie es auch schon für Epithelzellen der Fall war.

Abb. 17 Keine Umstrukturierung der Mikrotubuli während der Phagozytose von *A. fumigatus*



Murine Knochenmarkszellen aus C57BL/6-Mäusen wurden mit Hilfe des Cytokins M-CSF zu Makrophagen differenziert. Diese wurden im Anschluss mit Sporen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes infiziert, fixiert und mittels eines α -Tubulin-Antikörpers und eines entsprechenden Cy3-markierten Sekundär-Antikörpers die Verteilung der Mikrotubuli in der Zelle sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, wobei eine Projektion aller Schnittebenen abgebildet ist. Der angegebene Größenmarker entspricht 10 μ m.

Grün: *A. fumigatus* Rot: Mikrotubuli der Makrophagen

3.1.2.2 Bildung von großen Vakuolen während der Phagozytose von Konidien

Während die Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen in Epithelzellen durch einen sogenannten Reißverschluss- oder „zipper“-Mechanismus gekennzeichnet ist, bei dem durch eine ständige Vergrößerung der Interaktionen von Oberflächen-exponierten Rezeptoren und Liganden der jeweilige Partikel schließlich internalisiert wird (Filler and Sheppard, 2006), konnte gezeigt werden, dass bei der Phagozytose durch Makrophagen faltenförmige Ausstülpungen der Membran gebildet werden, die charakteristisch sind für den sogenannten Auslöser- oder „trigger“-Mechanismus der Phagozytose (Luther *et al.*, 2008). Bei diesem Prozess, der gekennzeichnet ist durch starke Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts, ist kein enger Kontakt zwischen dem Pathogen und der Wirtszelle nötig. Die gebildeten Ausstülpungen umschließen das zu phagozytierende Partikel und nehmen es unter Bildung einer großen Vakuole auf. Derartige Vakuolen können mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten *tracers* nachgewiesen werden (Mansfield *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden Zellen der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 mit Konidien eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes in Gegenwart von Rhodamin-markiertem Dextran infiziert. Während der Phagozytose der Konidien wurde das markierte Dextran mit in die gebildeten Vakuolen eingeschlossen, weshalb diese schon nach 15-minütiger Inkubation deutlich im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar waren. Die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts wurde mit Hilfe von Cy5-markiertem Phalloidin sichtbar gemacht. Durch die Aufnahmen wurde deutlich, dass die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen der Makropinozytose ähnelt.

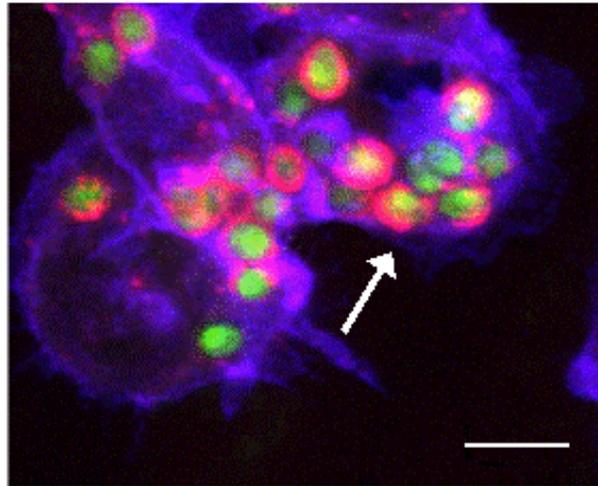


Abb. 18 Bildung großer Vakuolen während der Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen

J774-Makrophagen wurden in der Anwesenheit von Rhodamin-markiertem Dextran mit Sporen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes infiziert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, fixiert und das Aktin-Cytoskelett mit Cy5-markiertem Phalloidin angefärbt. Die Bildung der Vakuolen wurde im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. Die Abbildung zeigt eine Projektion aller Schnittebenen. Der Größenmarker entspricht 10 μm . Große Vakuolen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Grün: GFP-Sporen, Rot: Rhodamin-Dextran, Blau: Aktin-Cytoskelett

3.1.2.3 Ausschüttung von Cytokinen als Reaktion auf *A. fumigatus*

Um die Reaktion von Peritonealmakrophagen auf *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Formen des Pathogens konfrontiert und die Konzentration einiger repräsentativer Cytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. Bei der Herstellung der Stimuli wurde besonders darauf geachtet, Verunreinigungen mit Lipopolysaccharid (LPS) zu vermeiden. Zur Eliminierung eventuell vorhandener Kontaminationen eignet sich Polymyxin B (PMB), da diese Substanz bakterielle Endotoxine inaktiviert (Cooperstock, 1974). Das Ausmaß der Inaktivierung wurde überprüft, indem gereinigtes LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml für 30 Minuten mit 80 $\mu\text{g/ml}$ Polymyxin vorinkubiert wurde, um anschließend Makrophagen für 15 Stunden mit diesem Gemisch zu stimulieren. Eine Messung der Konzentrationen von TNF α und IL-6 als Vertreter der proinflammatorischen Cytokine, sowie die Konzentration des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 mit Hilfe des *Cytometric Bead Arrays* (cba) im Durchflusszytometer ergab eine starke IL-6- (Abb. 19 B), eine mäßige TNF α - (Abb. 19 A) und eine schwache IL-10- (Abb. 19 C) Ausschüttung als Reaktion auf LPS. Die Konzentration aller Cytokine konnte durch eine

Präinkubation mit Polymyxin B um bis zu 70% reduziert werden, was die Fähigkeit von Polymyxin B, LPS zu neutralisieren, unter Beweis stellt. In den verwendeten 250 µl Zellkulturüberstand befanden sich aufgrund der eingesetzten LPS-Konzentration 25 ng LPS. Es ist davon auszugehen, dass bis zu 17,5 ng LPS durch Polymyxin B neutralisiert wurden, was ausreichend ist, um mögliche Endotoxin-Kontaminationen in den verschiedenen *A. fumigatus*-Präparationen zu eliminieren.

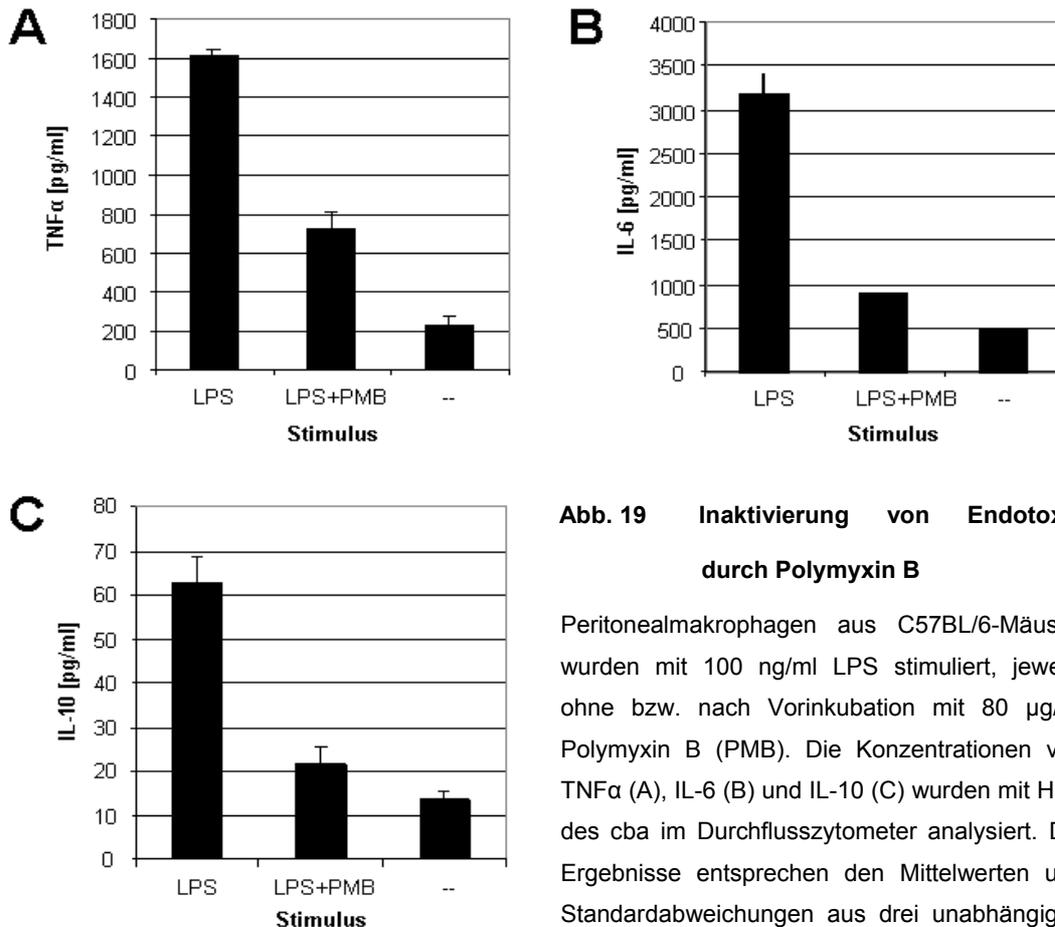


Abb. 19 Inaktivierung von Endotoxin durch Polymyxin B

Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen wurden mit 100 ng/ml LPS stimuliert, jeweils ohne bzw. nach Vorinkubation mit 80 µg/ml Polymyxin B (PMB). Die Konzentrationen von TNFα (A), IL-6 (B) und IL-10 (C) wurden mit Hilfe des cba im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Für die Infektion von Peritonealmakrophagen mit *A. fumigatus* wurden verschiedene Morphotypen des Pathogens eingesetzt, wobei die einzelnen Stimuli vorher abgetötet wurden, um spezifische Reaktionen auf die jeweiligen Morphotypen messen zu können. Die Zellen wurden mit ruhenden Sporen, angeschwollenen Sporen (MOI jeweils 10), Keimlingen (1,25 mg/ml) und Hyphen konfrontiert, nachdem die Stimuli für 30 Minuten mit Polymyxin B inkubiert wurden. Nach 15 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentrationen von TNFα, IL-6 und IL-10 bestimmt. Die Zellen reagierten mit einer starken

Cytokinausschüttung auf die *Aspergillus*-Stimuli, mit Ausnahme der Hyphen. Da in den Überständen der Zellen ohne Stimulus kaum Cytokine detektiert werden konnten, ist jeweils von einer spezifischen Stimulation durch *A. fumigatus* auszugehen (Abb. 20). Zu bemerken ist, dass angeschwollene Sporen trotz gleicher MOI eine viel stärkere Immunreaktion auslösten als ruhende.

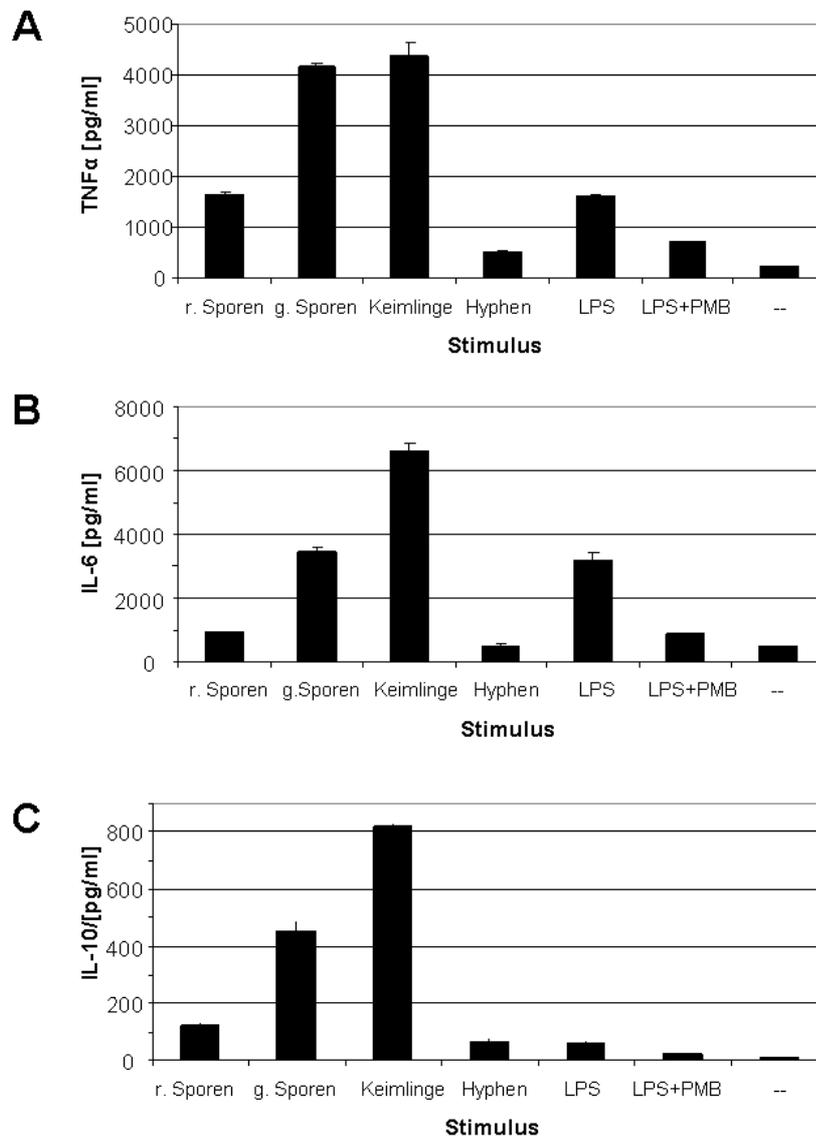


Abb. 20 Cytokinausschüttung durch Peritonealmakrophagen als Antwort auf verschiedene Formen von *A. fumigatus*

Peritonealmakrophagen wurden aus C57BL/6-Mäusen präpariert und mit ruhenden und geschwollenen Sporen, Keimlingen und Hyphen konfrontiert und für 15 Stunden inkubiert. Die Messung der Konzentrationen von TNF α (A), IL-6 (B) und IL-10 (C) erfolgte im Durchflusszytometer unter Verwendung des cba. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

r. Sporen: ruhende Sporen; g. Sporen: geschwollene Sporen; LPS: Lipopolysaccharid; PMB: Polymyxin B

Die jeweils höchste Cytokinkonzentration – sowohl pro- (Abb. 20 A und B), als auch antiinflammatorisch (Abb. 20 C) – konnte in den Parallelen detektiert werden, in denen die Zellen mit Keimlingen infiziert wurden. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die Reaktionen auf die verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* nicht direkt zu vergleichen sind, da keine Gewähr gegeben werden kann, dass die Infektionsdosis für Keimlinge und Hyphen dieselbe ist wie für Sporen, weil in diesem Fall das Pilzmaterial nicht über eine absolute Zahl quantifiziert werden kann.

Während einer *A. fumigatus*-Infektion der Lunge stellen ruhende Sporen das infektiöse Agens dar. Inhalierete Sporen können auskeimen und letztlich Hyphen bilden. Diese Situation wurde simuliert, indem murine Peritonealmakrophagen sowie MH-S-Zellen mit lebenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert wurden und der zeitliche Verlauf der Infektion anhand der TNF α -Produktion dokumentiert wurde. MH-S-Zellen, eine murine Alveolarmakrophagen-Zelllinie, wurden verwendet, um generell die Cytokin-Produktion von primären Zellen mit jener von Zellen einer Zelllinie vergleichen zu können.

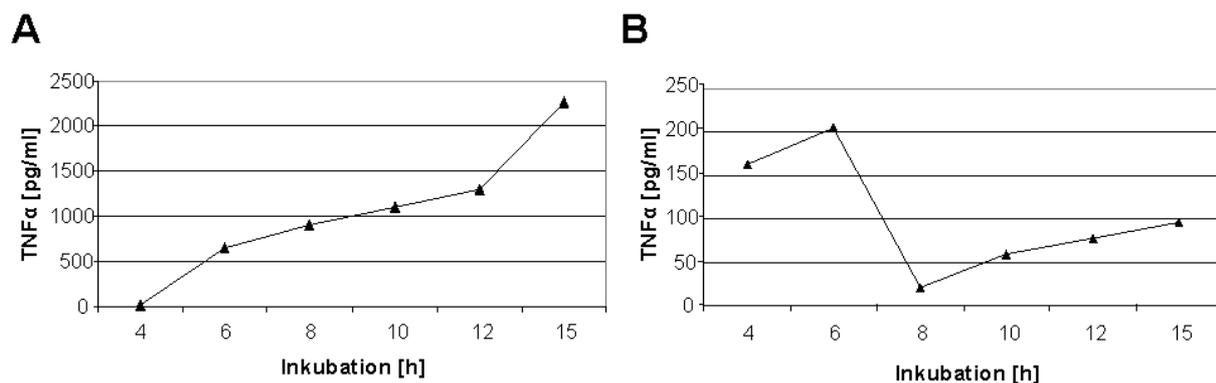


Abb. 21 Entwicklung der TNF α -Konzentration im Kulturüberstand von Peritonealmakrophagen (A) und MH-S-Zellen (B) nach einer Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen

Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen bzw. MH-S-Zellen wurden mit lebenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Die Kulturüberstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und mit Hilfe des cba die TNF α -Konzentration im Durchflusszytometer bestimmt.

Nach einer Inkubation bei 37°C wurden die Kulturüberstände zu den Zeitpunkten t = 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h und 15 h abgenommen und die Konzentration von TNF α bestimmt. Wie in Abb. 21 A zu sehen ist, setzte die Cytokin-Produktion der Peritonealmakrophagen im Zeitraum zwischen vier und sechs Stunden nach Infektionsbeginn ein. Dies entspricht auch der Zeitspanne, die Sporen benötigen, um ihre Proteinhülle abzuwerfen und anzuschwellen. Der daraufhin folgende konstante Anstieg der Cytokinkonzentration lässt auf eine stetige TNF α -Produktion schließen. Aufgrund der hohen Konzentration ist davon auszugehen, dass

A. fumigatus einen starken Stimulus für die Peritonealmakrophagen darstellt. Die Reaktion der MH-S-Zellen dagegen fiel sehr schwach aus (Abb. 21 B). Aufgrund der sehr variablen, aber insgesamt niedrigen TNF α -Konzentrationen ist es nicht möglich einen Schluss im Bezug auf die Kinetik der Immunantwort zu ziehen. Generell ist davon auszugehen, dass es in MH-S-Zellen keine eindeutige Immunreaktion auf *A. fumigatus* gibt.

3.1.2.4 Beeinflussung von Phagozytose und Cytokin-Ausschüttung durch

Aktin und die PI 3-Kinase

Näheren Aufschluss über den Phagozytoseprozesses sollten Infektionen von Peritonealmakrophagen mit *A. fumigatus* in Gegenwart verschiedener, für die Phagozytose relevanter Inhibitoren geben. Dazu wurden die Makrophagen 30 Minuten vor der Infektion mit Wortmannin inkubiert, das spezifisch und irreversibel an die ATP-Bindungsstelle der Phosphatidylinositol-3-Kinase bindet, die eine wichtige Rolle bei der Phagozytose über Fc-Rezeptoren und der Makropinocytose spielt (Ui *et al.*, 1995). Wortmannin verhindert hier den Verschluss von Phagosomen zu intrazellulären Organellen (Araki *et al.*, 1996) und wirkt insgesamt inhibierend auf die Phagozytose (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Wie in 3.1.2.2 gezeigt, weist die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen Ähnlichkeiten zur Makropinozytose auf. Weiterhin wurde Cytochalasin D eingesetzt, das in der Lage ist, Aktinfilamente zu binden und deren Elongation zu blockieren (Cooper, 1987). Die Daten aus Abschnitt 3.1.2.1. zeigen, dass Aktin maßgeblich am Phagozytoseprozess von Konidien durch Makrophagen beteiligt ist. Kathrin Luther konnte in ihrer Doktorarbeit durch Quantifizierung der internalisierten Sporen die inhibierende Wirkung beider Agenzien auf die Phagozytose nachweisen (Luther *et al.*, 2008). Die in Abb. 22 zusammengefassten mikroskopischen Untersuchungen veranschaulichen die Wirkung der Inhibitoren noch einmal. Dazu wurden die Zellen nach einer 30 minütigen Präinkubation mit den beiden Inhibitoren für 15 Stunden mit lebenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert und die Interaktion im Hellfeld-Mikroskop ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass in der Parallele mit nicht-vorbehandelten Peritonealmakrophagen ein Großteil der Sporen phagozytiert wurde (Abb. 22 C). Weiterhin war zu erkennen, dass die Peritonealmakrophagen die Entwicklung des Pilzes weitestgehend unterdrückten, da die Sporen trotz einer Inkubation von 15 Stunden kaum ausgekeimt waren. Auch die mit Wortmannin (Abb. 22 A), bzw. Cytochalasin D (Abb. 22 B) behandelten Zellen waren in der Lage, einen Teil der Sporen aufzunehmen. Dennoch konnten in diesen beiden Parallelen deutlich mehr extrazelluläre Sporen, die ungehindert auskeimen konnten, gefunden werden. Diese Aufnahmen unterstreichen somit sehr

nachdrücklich die Bedeutung der PI 3-Kinase bzw. des Aktin-Cytoskeletts für die Phagozytose durch Makrophagen.

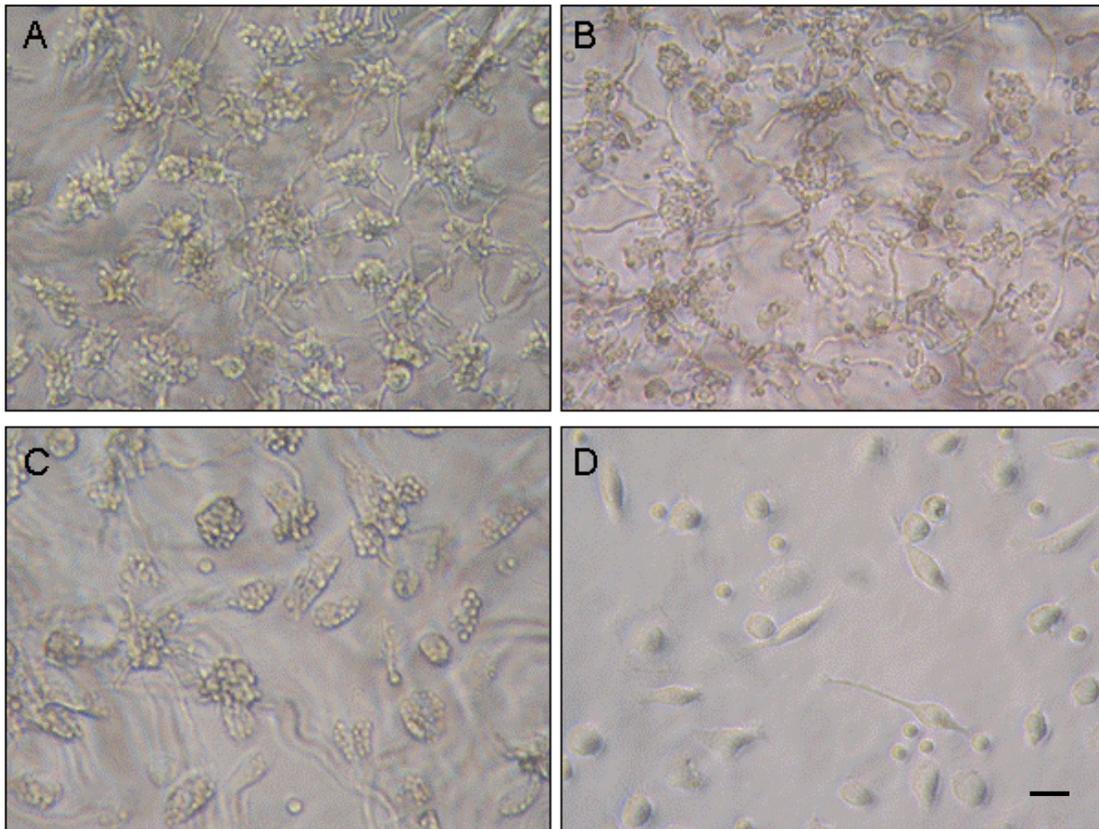


Abb. 22 Phagozytose und Wachstum von *A. fumigatus* unter Einfluss von Inhibitoren

Peritonealmakrophagen wurden aus C57BL/6-Mäusen präpariert, jeweils mit Wortmannin (A) bzw. Cytochalasin D (B) 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit lebenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Nach 15-stündiger Inkubation wurden Aufnahmen der Zellen im Durchlichtmikroskop gemacht. Als Kontrollen wurden infizierte Zellen ohne Inhibitor (C) und unbehandelte Zellen (D) mitgeführt. Der angegebene Größenmarker ist für alle Abbildungen gültig und entspricht 10 μm .

Bei der Bestimmung der TNF α -Konzentration mittels cba im Durchflusszytometer konnte dieser Effekt bestätigt werden. Die reduzierte Phagozytoserate der mit Inhibitoren vorbehandelten Zellen resultierte in einer Abnahme der TNF α -Konzentration um ca. 35% (Abb. 23 A).

Sehr viel drastischer fiel jedoch der Effekt der Inhibitoren auf die IL-10-Produktion aus. Die an sich schon geringe Cytokin-Konzentration wurde durch Inhibition der PI 3-Kinase komplett unterdrückt, durch Inhibition der Aktin-Polymerisation jedoch um mehr als 400% gesteigert. Die aus der Blockade der Aktin-Elongation resultierende Unfähigkeit der Zellen, *A. fumigatus*-Sporen zu phagozytieren, führte somit zu einem extremen Anstieg der

antiinflammatorischen Antwort. Eine Konfrontation der Makrophagen mit den Inhibitoren ohne zusätzliche Infektion mit *A. fumigatus*-Sporen löste keine Immunreaktion aus (Daten nicht gezeigt).

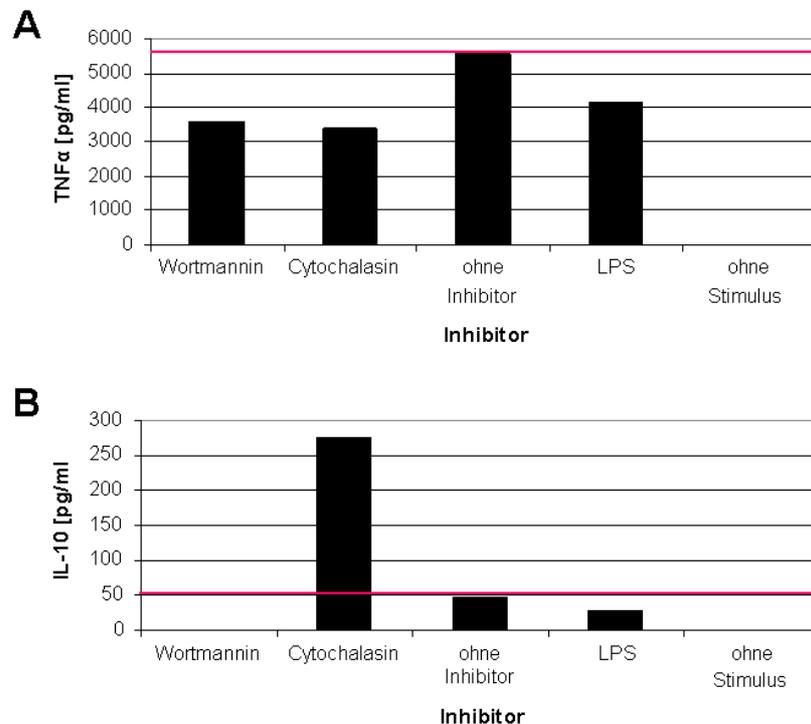


Abb. 23 Auswirkung von Wortmannin und Cytochalasin D auf die Cytokinausschüttung durch Peritonealmakrophagen als Reaktion auf *A. fumigatus*-Sporen

Peritonealmakrophagen wurden aus C57BL/6-Mäusen präpariert, mit Wortmannin bzw. Cytochalasin D 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit lebenden *A. fumigatus*-Sporen infiziert. Nach 15-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Überstände abgenommen und im Durchflusszytometer mit Hilfe des cba-Kits die Konzentrationen von TNFα und IL-10 bestimmt.

3.1.3 Zur Bekämpfung der Infektion rekrutiert: neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten patrouillieren innerhalb des Blutkreislaufs und werden durch von Makrophagen und Epithelzellen ausgeschüttete Chemokine und Cytokine zum Entzündungsherd gerufen. Sie sind von zentraler Bedeutung bei der Reaktion des angeborenen Immunsystems.

Um das Ausmaß der Rekrutierung von Granulozyten näher zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse für einen Zeitraum von 15 Stunden intraperitoneal mit 1×10^7 *A. fumigatus*-Sporen infiziert, um eine *Aspergillus*-Infektion zu simulieren. Die Sporen wurden vorher mit Polymyxin B inkubiert, um eine Reaktion auf LPS-Kontaminationen auszuschließen. Als

Kontrolle wurde sterile PBS-Lösung injiziert. Die im Peritoneum befindlichen Zellen wurden durch Peritoneallavage gewonnen und mit F4/80-Pacific Blue, einem Makrophagen-Marker, bzw. Gr-1-FITC, einem Granulozyten-Marker angefärbt. Eine Analyse der Zellpopulation im Durchflusszytometer ergab einen Anteil von 43,4% für residente Makrophagen im Peritoneum der Mäuse, denen zur Kontrolle PBS injiziert wurde (Abb. 24 A). Granulozyten hatten in diesem Fall nur einen Anteil von 2,2%. Dies entspricht der Zusammensetzung der Zellen im Peritoneum unstimulierter Mäuse. Die Untersuchung der Population im Peritoneum der mit *A. fumigatus*-Sporen infizierten Mäuse ergab ein komplett anderes Bild: Während hier der Anteil an Makrophagen nur noch 9,6% betrug, stieg der der Granulozyten auf 44,7% an (Abb. 24 A), was einen starken Influx von Granulozyten aufgrund der Infektion mit *A. fumigatus* beweist.

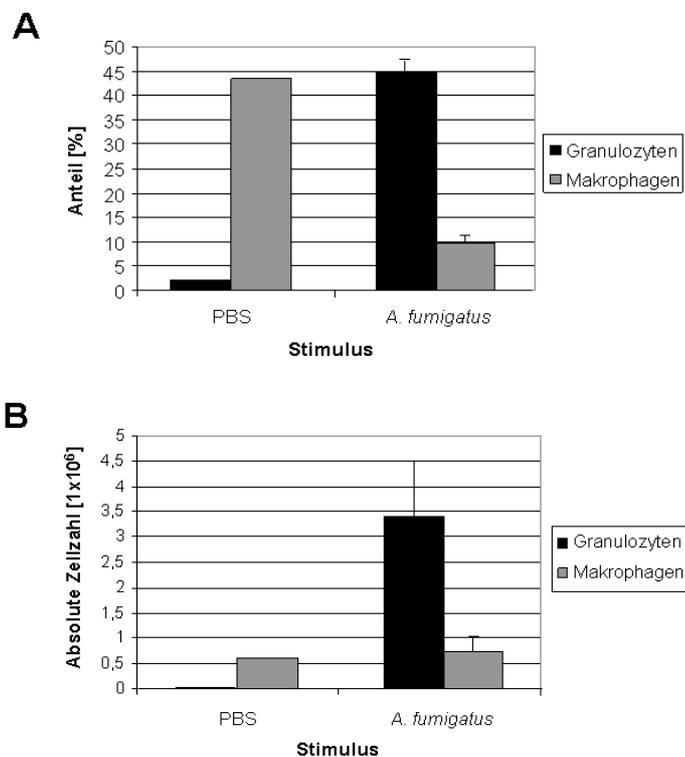


Abb. 24 Influx von Granulozyten durch eine intraperitoneale Infektion mit *A. fumigatus*

Prozentualer Anteil (A) bzw. absolute Zahl (B) an Granulozyten bzw. Makrophagen an der Zellpopulation des Peritoneums von C57Bl/6-Mäusen, mit sterilem PBS oder 1×10^7 *A. fumigatus*-Sporen für 15 Stunden intraperitoneal infiziert wurden. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer nach Anfärben der Zellen mit F4/80-Pacific Blue bzw. Gr-1-FITC. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Diese Zahlen erwecken zunächst den Eindruck, als hätte die Rekrutierung von Granulozyten zu einem Efflux von Makrophagen aus dem Peritonuem geführt. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass der Einstrom von Granulozyten zu einem starken Anstieg der Gesamtzellzahl führt. Wie Abb. 25 B zeigt, bleibt die absolute Zahl an Makrophagen gleich, ihr Anteil nimmt nur aufgrund der großen Menge eingewanderter Granulozyten im Peritoneum der infizierten Maus ab.

Bei der näheren Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Granulozyten-Einstroms während einer intraperitonealen Infektion wurde deutlich, dass bereits drei Stunden nach Infektionsbeginn ein signifikanter Anstieg der Granulozytenzahl zu verzeichnen ist (Abb. 25). Durch weitere Beobachtung der Infektion bis zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden zeigte sich, dass weiterhin stetig Granulozyten ins Peritonuem einwanderten

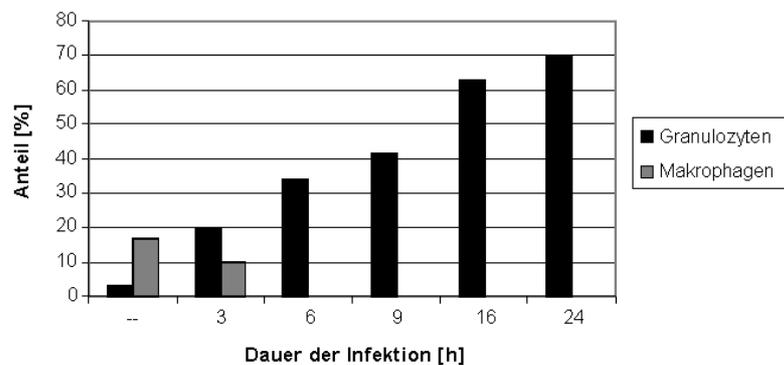


Abb. 25 Konstanter Einstrom von Granulozyten während einer Infektion mit *A. fumigatus*

Prozentualer Anteil an Granulozyten bzw. Makrophagen an der Zellpopulation des Peritoneums von C57BL/6-Mäusen, die mit 1×10^7 *A. fumigatus*-Sporen intraperitoneal für die angegebenen Zeiträume infiziert wurden. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer nach Anfärben der Zellen mit F4/80-Pacific Blue bzw. Gr-1-FITC.

3.2 Bedeutung von Glycostrukturen in *A. fumigatus*

Ein Schlüsselereignis für die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf *A. fumigatus* ist die Fähigkeit der Immunzellen zur Erkennung des Pathogens mit Hilfe von Muster-Erkennungs-Rezeptoren. Die Entdeckung von Dectin-1 als Rezeptor von β -1,3-Glucan gab erste Hinweise auf den Stellenwert von Glycostrukturen für die Erkennung von *A. fumigatus* durch Immunzellen (Steele *et al.*, 2005; Luther *et al.*, 2007). Auf der Suche nach weiteren, für Muster-Erkennungs-Rezeptoren relevanten Strukturen verdichten sich die Anzeichen darauf, dass Glycostrukturen in der Zellwand des Pilzes von großer Bedeutung für die Antwort des angeborenen Immunsystems sind (Jouault *et al.*, 2003; Netea *et al.*,

2006). Daher wurde mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten von *A. fumigatus* die Bedeutung von Galactomannan als amorphem Polysaccharid in der pilzlichen Zellwand, sowie die Auswirkung der Mannosylierung von Sphingolipiden und Proteinen auf die Reaktion der Immunzellen und die Stressresistenz des Pilzes untersucht.

3.2.1 Das amorphe Polysaccharid Galactomannan in der Zellwand von *A. fumigatus*

Das Polysaccharid Galactomannan stellt neben β -1,3-Glucan und Chitin einen der Hauptbestandteile der pilzlichen Zellwand dar. Es ist zudem bedeutend für die serologische Diagnostik einer invasiven Aspergillose, die bis heute im Wesentlichen auf einem Galactomannan-Nachweis, der als Sandwich-ELISA aus α -Galactomannan-Antikörpern aufgebaut ist, beruht (Stylen *et al.*, 1995). Der Grund dafür ist die Konformation der im Galactomannan von *A. fumigatus* vorhandenen Galactose als Galactofuranose, da diese in Säugetierzellen nicht existiert.

3.2.1.1 Fehlen von Galactofuranose in der Δ *glf*-Mutante von *A. fumigatus*

Die Synthese von Galactofuranose geht von einer aktivierten Vorläuferform aus, dem Uridin-diphospho-Galactofuranose (UDP-Gal_f). Von diesem Molekül können schließlich die Galactofuranosereste mit Hilfe spezifischer Galactofuranosyltransferasen auf unterschiedlichste Akzeptoren übertragen werden. UDP-Gal_f wird durch das Enzym UDP-Galactopyranose- Mutase (UGM) aus Uridin-diphospho-Galactopyranose (UDP-Gal_p) hergestellt (Abb.26).

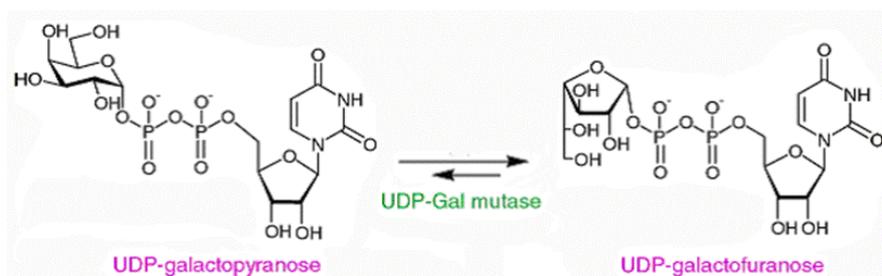


Abb. 26 Umwandlung von UDP-Galactopyranose in UDP-Galactofuranose mit Hilfe der UDP-Galactopyranose-Mutase

Das Enzym UDP-Galactopyranose-Mutase wandelt spezifisch die beiden aktivierten Formen UDP-Galactopyranose und UDP-Galactofuranose ineinander um.

Da eine spontane Interkonversion nicht möglich ist, ist dieses Enzym essentiell für die Herstellung von UDP-Gal_f und damit auch für die Übertragung von Galactofuranose auf Akzeptormoleküle, wie z. B. auf das Mannan-Grundgerüst im Galactomannan. Der Arbeitsgruppe von Prof. Françoise Routier gelang es, eine *A. fumigatus*-Mutante herzustellen, in der *glf*, das Gen der UGM, deletiert ist (Schmalhorst *et al.*, 2008). Diese Mutante, in der somit die Galctofuranose-Reste des Galactomannans fehlen, wurde für weitere Untersuchungen zum Thema Galactomannan zur Verfügung gestellt.

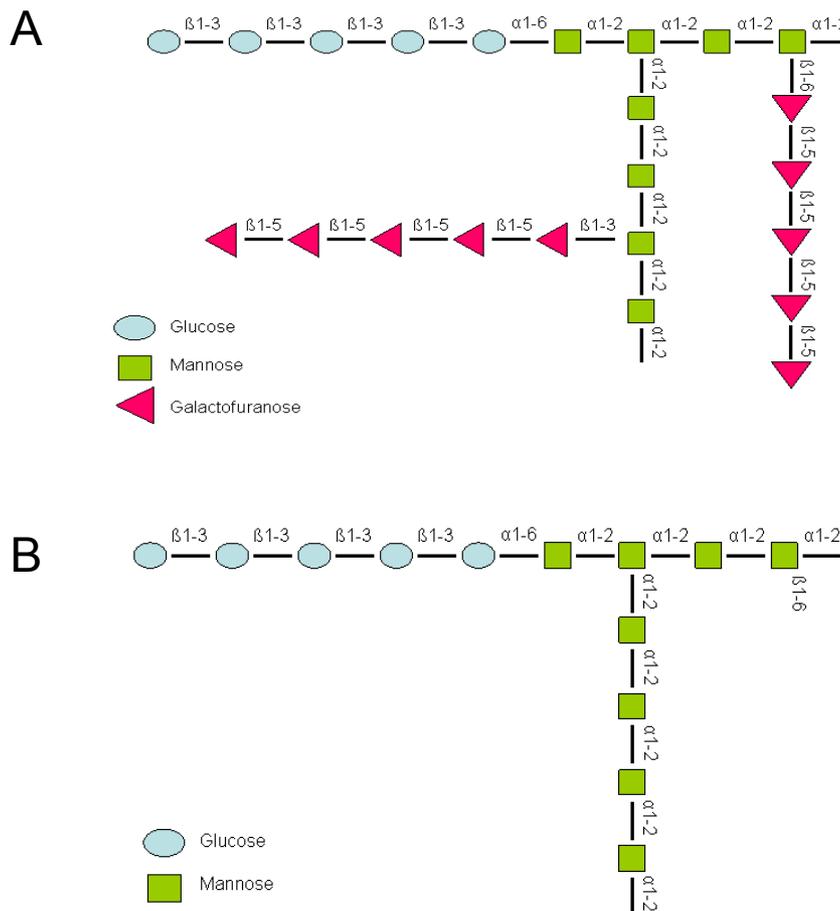


Abb. 27 Galactomannan in der Zellwand des Wildtyps (A) und der Δglf -Mutante (B) von *A. fumigatus*

In der Zellwand von *A. fumigatus* besteht Galactomannan aus einer Hauptkette aus D-Mannose, die kovalent an β -1,3-Glucan gebunden ist und Seitenketten aus 4-5 Galactoseresten enthält, wobei die Galactose als Galactofuranose vorliegt (A). Bei der Δglf -Mutante sind diese Galactose-Seitenketten nicht vorhanden (B).

3.2.1.2 Spezifität der Antikörper L10 und L99 für Galactomannan

In der Doktorarbeit von Leonie Heesemann wurden 2 monoklonale Antikörper - L10 und L99 - generiert, die beide in der Lage sind, Oberflächenstrukturen von *A. fumigatus* zu detektieren (Heesemann, 2010). Die Antikörper erkennen Hyphen und Keimlinge, etwas schwächer auch angeschwollene Sporen. Ruhende Sporen konnten nicht detektiert werden. Bezüglich der Bindung an Hyphen konnte festgestellt werden, dass die Antikörper verstärkt an die Hyphenspitze binden, und ältere Teile des Myzels schlechter erkennen. Beide Antikörper gehören zur IgM-Untergruppe. Immunglobuline dieser Gruppe erkennen vorwiegend Kohlenhydratepitope, also Zuckerstrukturen. Die Proteaseresistenz der detektierten Epitope lässt zudem darauf schließen, dass es sich nicht um Proteinstrukturen handelt. Weiterhin deutet eine Sensitivität gegenüber Perjodatbehandlungen auf Kohlenhydratepitope hin, da Perjodat nur Diolen angreift. Durch eine milde Säurebehandlung, die bekanntlich Galactofuranosereste ablöst, konnten die detektierten Epitope entfernt werden. Alle diese Hinweise zusammen ließen vermuten, dass es sich bei den von den Antikörpern erkannten Epitopen um Galactofuranosereste handelt.

Um eine Erkennung von Galactomannan durch L10 und L99 nachzuweisen, wurden Sporen des Wildtyps WT D141 und der Δglf -Mutante auf sterilen Deckgläschen zum Auskeimen gebracht und die gebildeten Hyphen anschließend mit einer 1:2-Verdünnung der Zellkulturüberstände der L10- bzw. L99-produzierenden Hybridome für 60 Min inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-markierter α -Maus-IgM-Antikörper verwendet. Die Analyse der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ergab, dass nur die Wildtyp-Hyphen Fluoreszenz auf der Oberfläche (Abb. 28 A und C) zeigten, während die Antikörper bei der Δglf -Mutante offensichtlich nicht an die Zellwand binden konnten. Hier wurde jeweils nur eine Hintergrundfluoreszenz detektiert (Abb. 28 B und D). Aufgrund der Deletion des *glf*-Gens, das für die UDP-Galactopyranose-Mutase kodiert und damit für die Umwandlung von UDP-Galactopyranose in UDP-Galactofuranose verantwortlich ist, sind bei dieser Mutante keine Galactofuranose-Seitenketten an das Mannan-Grundgerüst gebunden. Somit beweist das Fehlen einer Fluoreszenz bei dieser Mutante die Spezifität der Antikörper L10 und L99 für Galactofuranose.

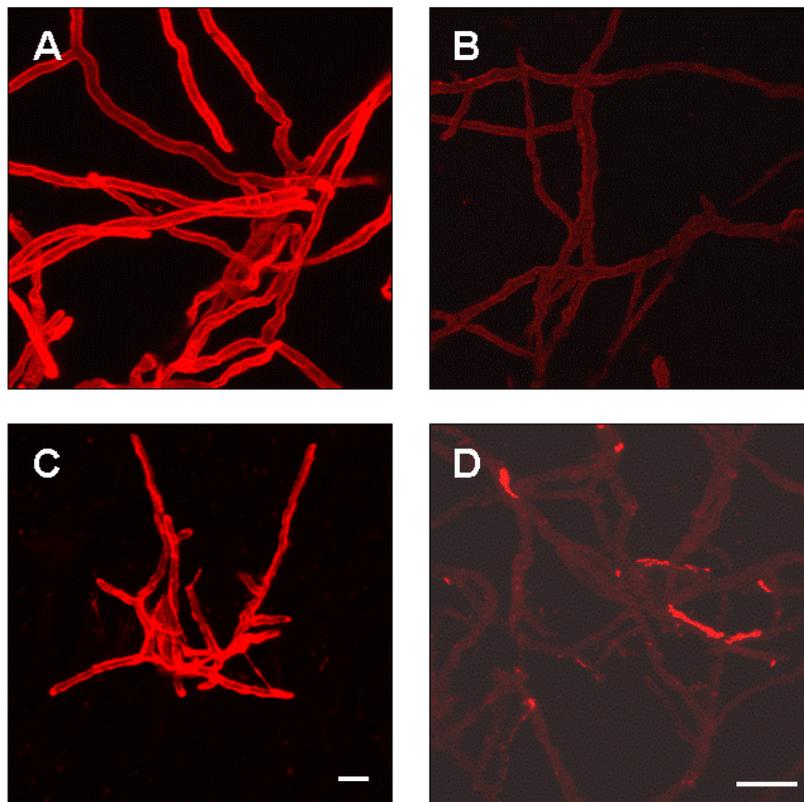


Abb. 28 Spezifität der Antikörper L10 (A) und L99 (C) für Galactofuranose

Hyphen des *A. fumigatus*-Wildtyps WT D141 (A, C) und der Δglf -Mutante (B, D) wurden mit einer 1:2-Verdünnung des Zellkulturüberstandes der L10- (A, B), bzw. L99- (C, D) produzierenden Hybridome und einem entsprechenden Cy3-markierten Sekundär-Antikörper für jeweils 60 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die Abbildungen stellen jeweils eine Projektion aller Schnittebenen dar. Die Größenmarker entsprechen jeweils 5 μm , wobei der in D dargestellte Marker auch für die Abbildungen A und B gültig ist.

Für L99 konnte beobachtet werden, dass das sich ergebende Färbungsmuster weniger gleichmäßig ist als beim L10-Antikörper und je nach Medium, in dem die Hyphen angezogen wurden, z.T. etwas schwächer und fleckig ausfällt. So zeigten Hyphen, die in DMEM wuchsen, eine sehr gleichmäßige Fluoreszenz (Abb. 29 A), während Hyphen, die in YG wuchsen, nur stellenweise leuchteten (Abb. 29 B), was zeigt, dass das von L99 erkannte Epitop hier nicht gleichmäßig auf der Hyphenoberfläche zu finden ist. Bei L10 konnte eine Abhängigkeit des Färbungsmusters vom jeweiligen Inkubationsmedium nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf eine Erkennung unterschiedlicher Epitope innerhalb des Galactofuranose-Moleküls durch die beiden Antikörper schließen.

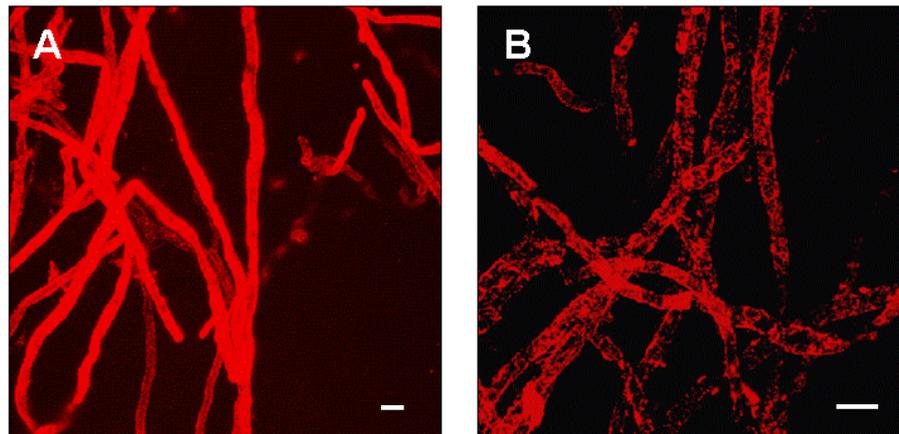


Abb. 29 Abhängigkeit des Färbemusters des L99-Antikörpers vom Inkubationsmedium

Hyphen des *A. fumigatus*-Wildtyps WT D141 wurden in DMEM (A) bzw. YG (B) angezogen und mit einer 1:2-Verdünnung des Zellkulturüberstandes der L99-produzierenden Hybridome und einem entsprechenden Cy3-markierten Sekundär-Antikörper für jeweils 60 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Die Abbildungen stellen jeweils eine Projektion aller Schnittebenen dar. Die Größenmarker entsprechen jeweils 2 μm .

3.2.1.3 Detektion von Mannan auf der Oberfläche der $\Delta g/f$ -Mutante

Die hier gezeigten Daten weisen sehr anschaulich eine Spezifität der beiden Antikörper für Galactofuranose nach. Wie in Abschnitt 1.1.4.1 erklärt wurde, enthalten neben Galactomannan in der Zellwand mehrere pilzliche Strukturen dieses Glykokonjugat. Zum endgültigen Nachweis der Spezifität beider Antikörper für Galactomannan wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Wie Abbildung 27 zeigt, sollte das im Wildtyp durch Galactofuranose maskierte Mannan-Grundgerüst in der Mutante exponiert sein. Um zu überprüfen, ob bei der $\Delta g/f$ -Mutante tatsächlich Mannan nachzuweisen ist, wurden Hyphen von beiden Stämmen angezogen und mit AF1, einem α -Mannan-Antikörper, der die Zellwand von *Candida albicans* erkennt, sowie anschließend mit einem entsprechenden Cy3-markierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Auswertung im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zeigte eine Lokalisation von Mannan auf der Oberfläche der $\Delta g/f$ -Mutante.

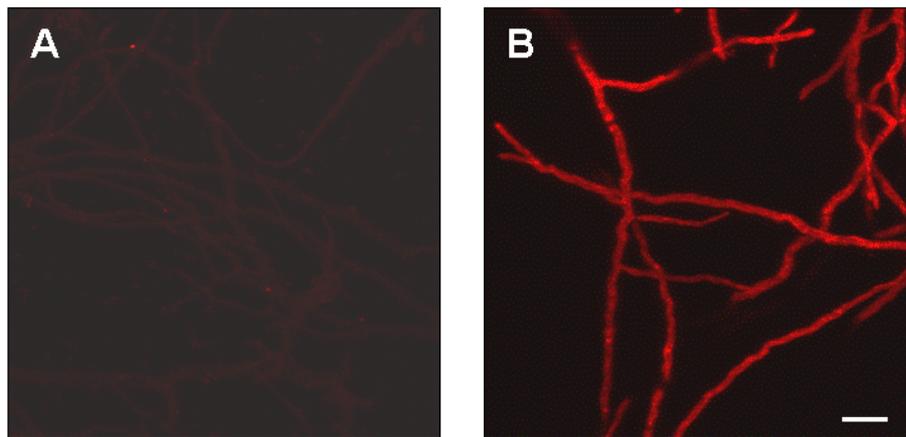


Abb. 30 Exposition von Mannan auf der Oberfläche von Hyphen der Δglf -Mutante

Hyphen des Wildtyps WT D141 (A) und der Δglf -Mutante (B) wurden mit AF1, einem Antikörper, der Mannan in der Pilzzellwand erkennt, und einem entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Die Abbildungen stellen jeweils eine Projektion aller Schnittebenen dar. Der Größenmarker entspricht 5 μm und ist für beide Bilder gültig.

3.2.1.4 Eignung der α -Galactomannan-Antikörper zur Detektion von *A.*

fumigatus in klinischen Proben

Während der Doktorarbeit von Leonie Heesemann wurden die beiden α -Galactomannan-Antikörper auf eine mögliche Kreuzreaktion mit anderen Pilzen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Antikörper nicht mit *S. cerevisiae* oder *C. albicans* reagierten, jedoch Strukturen auf allen getesteten *Aspergillus*-Spezies erkannten. Für diese Untersuchung wurden *A. terreus*, *A. niger*, *A. giganteus* und *A. nidulans* verwendet (Heesemann, 2010). Somit wurde gezeigt, dass die Antikörper spezifisch Galactomannan auf *Aspergillus*-Spezies erkennen.

Ein direkter Nachweis einer Aspergillose kann durch Mikroskopie von histologischen Proben erfolgen. Abb. 31 zeigt sehr deutlich, dass der Antikörper L10 geeignet ist, um *Aspergillus*-Hyphen in entparaffinierten Proben zu detektieren, die von Patienten mit invasiver Aspergillose stammen. Die Abbildung zeigt Lungengewebe, das von *Aspergillus*-Hyphen infiltriert wird. Diese wurden mit Hilfe des L10-Antikörpers und einem entsprechenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

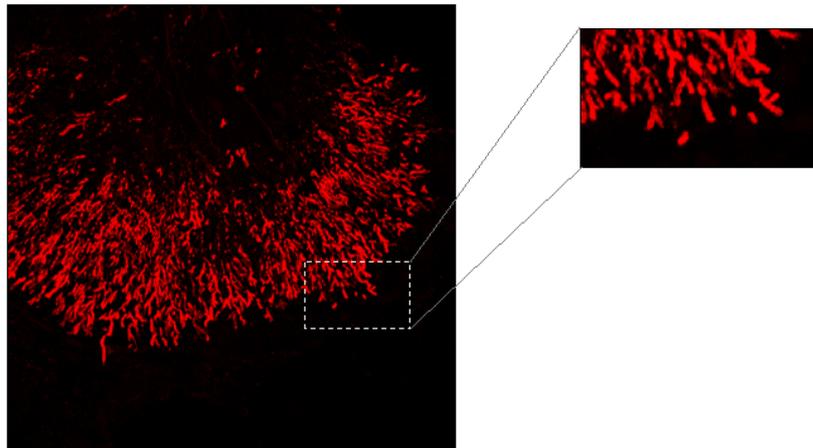


Abb. 31 Eignung des L10-Antikörpers zur Detektion von *Aspergillus*-Hyphen in histologischen Proben

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer Lungengewebeprobe eines Patienten mit invasiver Aspergillose. Die Pilzhypen wurden mit Hilfe des L10-Antikörpers und dem entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

3.2.1.5 Bedeutung von Galactofuranose und Mannan für die Cytokin-Produktion muriner Makrophagen

Wie Abschnitt 3.1.2.3 zeigt, hat eine Konfrontation von Makrophagen mit *A. fumigatus* die Ausschüttung von Cytokinen zur Folge. Zur quantitativen Analyse der Relevanz von Galactomannan in diesem Zusammenhang wurden murine Peritonealmakrophagen mit Sporen des Wildtyps, der Δglf -Mutante und der komplementierten Mutante infiziert (MOI 10) und nach 15-stündiger Coinkubation die Konzentration verschiedener Cytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. Dabei konnte weder für TNF α (Abb. 32), noch für IL-6 bzw. IL-10 (Daten nicht gezeigt) ein Unterschied in der Reaktion auf die Δglf -Mutante im Vergleich zu den Kontrollstämmen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Galactofuranose als auch das in der Mutante exponierte Mannan-Grundgerüst als PAMPs in *A. fumigatus* ausgeschlossen werden können.

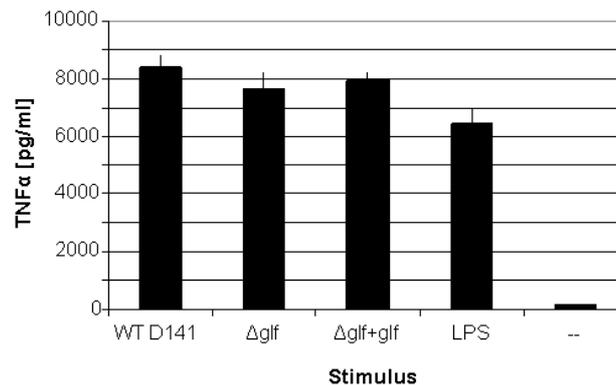


Abb. 32 Kein Einfluss von Galactofuranose bzw. Mannan auf die Cytokinantwort muriner Peritonealmakrophagen

Zur Bestimmung der Cytokinantwort wurden Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit Konidien der jeweiligen Stämme infiziert und nach 15 Stunden die Konzentration von TNF α im Zellkulturüberstand mit Hilfe von cba im FACS bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen entsprechen den Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.1.6 Aufreinigung des α -Galactomannan-Antikörpers L10

Aufgrund von Hinweisen, dass ein Antikörper gegen die Zellwand-Komponente β -1,3-Glucan das Wachstum von *A. fumigatus in vitro* inhibiert (Torosantucci *et al.*, 2005), sollte analysiert werden, ob auch der α -Galactomannan-Antikörper L10 Einfluss auf das Pilzwachstum hat. Dazu wurde der Antikörper zunächst aufkonzentriert und gereinigt. Aus diesem Grund wurde Kulturüberstand der L10-produzierenden Hybridome gesammelt und mit Hilfe von *Cross-Flow-Filtration* und *Vivaspin* Konzentrationsröhrchen aufkonzentriert. Zur Aufreinigung des Antikörpers wurde das *IgM-Purification-Kit* von Thermo Scientific angewendet, da eine Aufreinigung über Fc-Rezeptoren aufgrund des pentameren Aufbaus eines Immunglobulins M, wie es bei L10 der Fall ist, nicht möglich ist. Die Aufreinigung beruht bei dieser Methode auf der Bindung des Antikörpers an eine Agarose-Säule mit Hilfe von immobilisiertem Mannan-Binde-Protein. Die während der Elution des gereinigten Antikörpers in mehreren Fraktionen aufgefangenen Proteine wurden über ein 12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Hilfe eines Alkalische-Phosphatasegekoppelten α -IgM-Antikörpers und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) detektiert. Durch die Anfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* konnten Proteine mit einer Größe von 25 kD und 75 kD, und in schwächerem Ausmaß auch Proteine mit einer Größe von 50 kD

sichtbar gemacht werden (Abb. 33). Proteine mit einer Größe von 50 kD bzw. 75 kD konnten auch nach deren Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran mit Hilfe eines α -IgM-Antikörpers detektiert werden (Abb. 34). Ein IgM-Antikörper ist aus 5 Immunglobulin-Molekülen zusammengesetzt, wobei jedes dieser Moleküle aus 2 schweren und 2 leichten Ketten besteht.

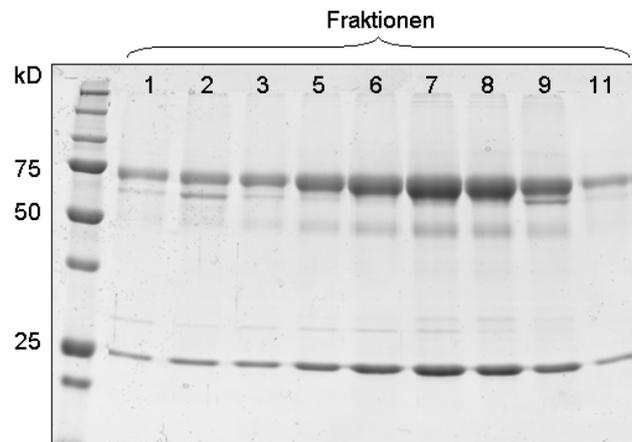


Abb. 33 Aufreinigung des L10-Antikörpers – SDS-PAGE

Nach der Elution wurden die verschiedenen Fraktionen des gereinigten L10-Antikörpers über SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt.

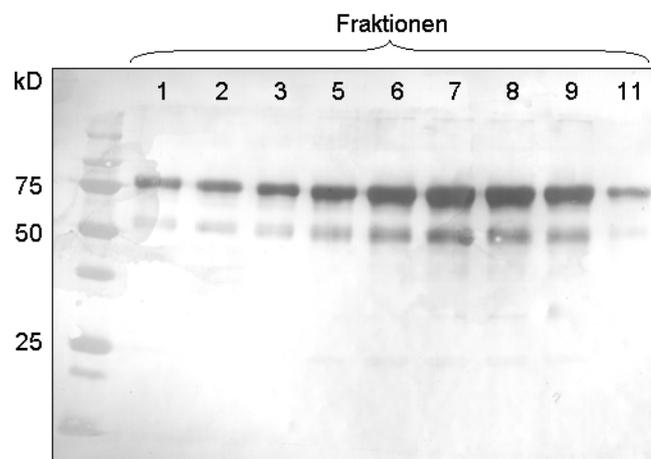


Abb. 34 Spezifität der Aufreinigung des L10-Antikörpers – Western Blot

Nach der Auftrennung der Fraktionen des gereinigten L10-Antikörpers wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Hilfe eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten α -IgM-Antikörpers und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) detektiert.

Die molekulare Masse einer leichten Kette beträgt 25 kD, die einer schweren Kette 50 kD. Somit konnten im SDS-Polyacrylamidgel die leichte Kette (25 kD), ein Dimer aus schwerer und leichter Kette (75 kD), und zu einem geringen Anteil die schwere Kette (50 kD) des L10-Antikörpers nachgewiesen werden. Die 25 kD-Bande ist auf der Nitrocellulose-Membran nicht zu sehen, da ein Antikörper verwendet wurde, der nur die schwere Kette eines IgMs erkennt. Da keine weiteren Banden durch die *Coomassie Brilliant Blue*-Färbung sichtbar gemacht wurden, ist davon auszugehen, dass während der Aufreinigung alle Fremdproteine, insbesondere das in großer Menge im Medium vorhandene Albumin entfernt wurden.

3.2.1.7 Kein Einfluss des aufgereinigten L10-Antikörpers auf das Wachstum von *A. fumigatus* *in vitro*

Um zu untersuchen, ob der gereinigte L10 Antikörper das Wachstum von *A. fumigatus* inhibiert, wurden 1×10^4 Sporen des Wildtyps ATTC 46645 in 100 μ l YG-Medium angezogen bzw. in YG-Medium, das mit 100 μ g/ml L10-Antikörper versetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden bei 37° C wurde mit Hilfe eines XTT-Tests die mitochondriale Aktivität des Pilzmaterials in der jeweiligen Parallele bestimmt und die Ergebnisse zueinander in Relation gesetzt. Dabei wurde das Wachstum in YG-Medium ohne Zusätze auf 100 % gesetzt.

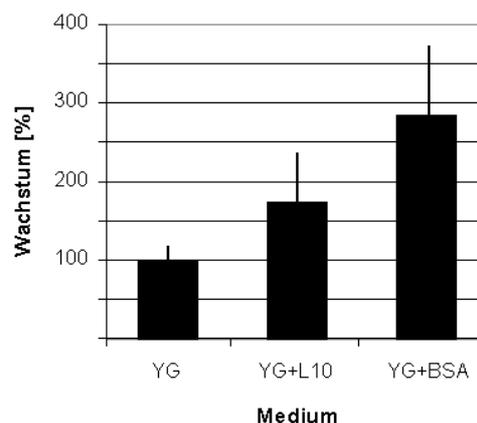


Abb. 35 Keine Wachstumsinhibition durch den α -Galactomannan-Antikörper L10

A. fumigatus-Sporen wurden in YG-Medium ohne Zusatz, mit 100 μ g/ml L10-Antikörper oder mit 100 ng/ml BSA bei 37°C für 15 Stunden inkubiert. Anschließend wurde durch einen XTT-Test die Menge an vorhandenem, lebendem Pilzmaterial bestimmt und die Ergebnisse zueinander relativiert, wobei das Wachstum in YG-Medium ohne Zusätze auf 100 % gesetzt wurde. Die abgebildeten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu publizierten Daten, die eine Wachstumsinhibition durch Zugabe eines α - β -1,3-Glucan-Antikörpers beschreiben (Torosantucci *et al.*, 2006), konnte durch den α -Galactomannan-Antikörper das Pilzwachstum nicht blockiert werden. Im Gegenteil, wie in Abb. 35 zu erkennen ist, konnte sogar eine Wachstumssteigerung gemessen werden. Das stärkste Pilzwachstum war jedoch in YG-Medium mit 100 ng/ml BSA zu verzeichnen. Durch diese Kontrolle sollte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Medium zu einem Unterschied im Wachstum des Pilzes führt. Somit ist davon auszugehen, dass der α -Galactomannan-Antikörper selbst keinen Einfluss auf das Pilzwachstum hatte, dass durch die Zugabe des Antikörpers aber die Proteinkonzentration erhöht wurde, was sich wachstumsfördernd auf den Pilz auswirkte.

3.2.1.8 Die Aktivierung des Komplementsystems durch *A. fumigatus*-Hyphen wird durch die Bindung des L10-Antikörpers verstärkt

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 löslichen Blutplasma- und Zellmembranproteinen. Zunächst wurde ihm nur die Aufgabe eines komplementierenden Teils der Antikörperantwort zugeschrieben, inzwischen ist jedoch bekannt, dass es auch bei Reaktionen des angeborenen Immunsystems eine Rolle spielt. Dabei ist die Aufgabe der Plasmaproteine, Pathogene zu binden und zu zerstören, während die Membranproteine als Komplementrezeptoren und -regulatoren wichtig sind (Bohana-Kashtan *et al.*, 2004). Letztendlich kommt es durch Komplementaktivierung zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und zur Opsonierung und zum Abtöten von Pathogenen. Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Wege aktiviert werden. Dabei unterscheidet man den oft über Antikörper vermittelten klassischen Weg, den über Mannose-bindendes Lektin aktivierten Lektin-Weg und den spontanen und Antikörper-unabhängigen alternativen Weg (Bohana-Kashtan *et al.*, 2004). Am klassischen, Antikörper vermittelten Weg sind neun Glycoproteine (C1-C9) beteiligt. Das erste Protein, der Komplementfaktor C1 besteht aus dem sechsköpfigen Kollektiv C1q, zwei Molekülen C1s und einem Molekül C1r. C1q besitzt Bindungsdomänen für Antigen-gebundene Antikörper und durch die Bindung eines IgM- oder IgG-Antikörpers erfolgt eine Aktivierung der gebundenen Serin-Proteasen C1s und C1r. Nach dieser Aktivierung katalysiert C1s die Startreaktionen des klassischen Weges. Das Produkt dieses Weges, wie auch der beiden anderen Komplementwege ist eine Serin-Protease, die als C3-Konvertase bezeichnet wird und eine Spaltungskaskade auslöst, wodurch es zur Rekrutierung von Leukozyten, zur verstärkten Phagozytose und letztendlich

zur Lyse der Zielzelle kommt. Es ist bekannt, dass *A. fumigatus* zur Aktivierung und Bindung von C3 führt (Kozel *et al.*, 1989).

Da C1q mehrere Bindungsdomänen für IgM-, sowie IgG-Antikörper besitzt, sollte untersucht werden, ob eine Opsonierung von *A. fumigatus*-Hyphen mit dem IgM-Antikörper L10 zu einer verstärkten Bindung dieses Kollektins an die Pilzoberfläche führt. Dazu wurden Hyphen zunächst mit dem Antikörper inkubiert, um eine Bindung zu ermöglichen, bevor murines Serum, das alle Komplementproteine enthält, zugegeben wurde. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und mit eiskaltem Methanol fixiert. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers wurde durch Inkubation mit Ziegen Serum verhindert. Die Komplementaktivierung wurde mit einem α -C1q-Antikörper und einem entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörper untersucht. Wie ein Vergleich der Fluoreszenz-intensitäten in Abb. 36 zeigt, lösen *A. fumigatus*-Hyphen eine Komplementaktivierung aus, die durch vorherige Opsonierung der Hyphen mit dem α -Galactomannan-Antikörper (Abb. 36 A) noch deutlicher ausgeprägt ist als ohne Vorbehandlung (Abb. 36 B).

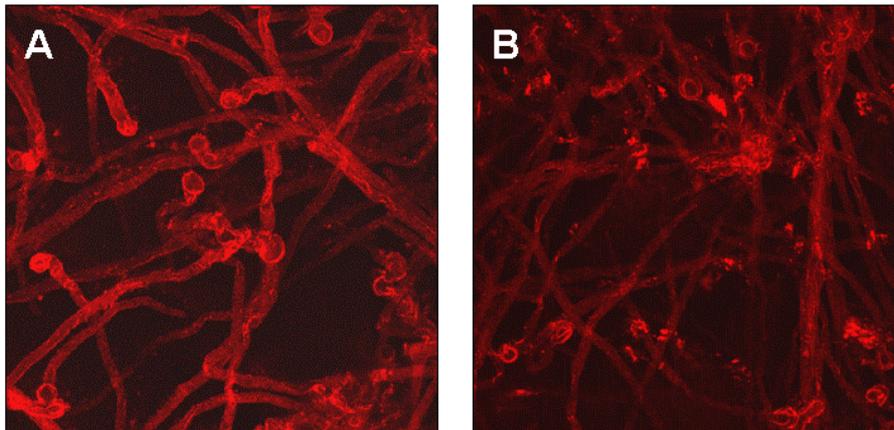


Abb. 36 Verstärkung der durch *A. fumigatus* ausgelösten Komplementaktivierung durch vorherige Opsonierung mit dem IgM-Antikörper L10

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Komplementaktivierung durch *A. fumigatus*, mit (A) und ohne (B) vorherige Opsonierung der Hyphen mit dem IgM-Antikörper L10. Eine Bindung des Kollektins C1q, ermöglicht durch Inkubation der Hyphen mit Mausserum, wurde durch einen α -C1q-Antikörper und einen entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

3.2.1.9 Kein protektiver Effekt des L10-Antikörpers während einer systemischen-Infektion mit *A. fumigatus*

Um zu untersuchen, ob die verstärkte Komplementaktivierung durch den L10-Antikörper auch einen Effekt während einer systemischen Infektion mit *A. fumigatus* hat, wurden BALB/c-Mäuse mit 3×10^6 angeschwollenen *A. fumigatus*-Sporen infiziert, nach vorheriger Injektion von 200 μg L10-Antikörper bzw. 200 μg A9-Antikörper. A9 wurde als Kontroll-Antikörper eingesetzt. Dieser gehört ebenfalls zur IgM-Untergruppe, erkennt allerdings kein Galactomannan.

Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, stand die Absterberate der Mäuse in keinem Zusammenhang mit dem jeweils verwendeten Antikörper, in beiden Parallelen starben die Mäuse gleich schnell. Somit ist kein protektiver Effekt des L10-Antikörpers während einer *in vivo*-Infektion zu verzeichnen.

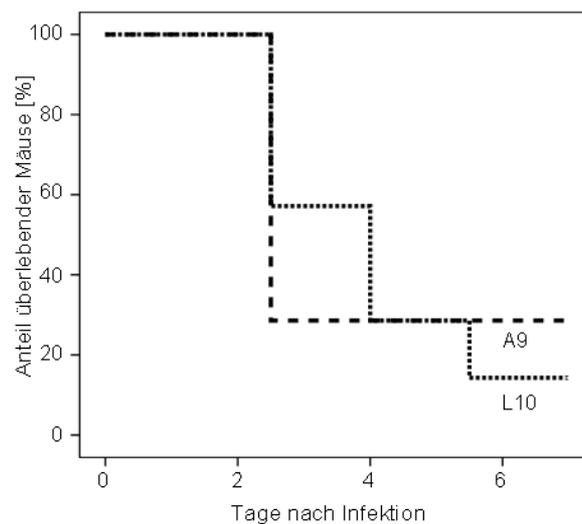


Abb. 37 Kein protektiver Effekt des L10-Antikörpers

Verlauf einer systemischen Infektion von BALB/c-Mäusen mit 3×10^6 angeschwollenen *A. fumigatus*-Sporen, nach vorheriger Injektion von 200 μg des L10-Antikörpers bzw. 200 μg des Kontroll-Antikörpers A9.

3.2.2 Die Rolle von mannosylierten Sphingolipiden als Bestandteil der Pilzoberfläche: Charakterisierung des MitA-Proteins von *A. fumigatus*

Neben der Bedeutung der amorphen Glycostruktur Galactomannan wurde die Rolle von glycosylierten Sphingolipiden auf der Oberfläche von *A. fumigatus* untersucht. Dazu wurde eine *A. fumigatus*-Mutante hergestellt, in der das Gen *mitA* deletiert ist. In *S. cerevisiae* und *C. albicans* vermitteln die homologen Proteine Sur1 bzw. Mit1 die Mannosylierung des Sphingolipids Inositol-Phosphorylceramid, also die Bildung von Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid (MIPC) (Beeler *et al.*, 1997; Mille *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* scheint Sur1 eine Rolle bei der Toleranz gegenüber hohen Calciumkonzentrationen bei erhöhter Inkubationstemperatur zu spielen (Beeler *et al.*, 1997). In *C. albicans* führt das Fehlen von Mit1 zu einem Mangel an komplexen, aus MIPC entstandenen Sphingolipiden und Phospholipomannan, einem wichtigen PAMP dieses Pathogens. Dies wiederum ist ein Grund für die Attenuierung der *C. albicans*- Δ *mit1*-Mutante (Mille *et al.*, 2004). Im folgenden Abschnitt erfolgt die Charakterisierung der *A. fumigatus*- Δ *mitA*-Mutante, zudem wird die Rolle der glycosylierten Sphingolipide für die Virulenz und Stressresistenz von *A. fumigatus* beschrieben. Unter Berücksichtigung der in Hefen gültigen Nomenklatur werden dabei aktive Gene in *S. cerevisiae* und *C. albicans* kursiv und in Großbuchstaben geschrieben.

3.2.2.1 MitA- das zu den *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Proteinen Sur1 und Mit1 homologe *A. fumigatus*-Protein

Mit Hilfe der Sequenz des *S. cerevisiae*-Proteins Sur1 und des Alignment-Programms BLASTP wurde im Genom des *A. fumigatus*-Stammes 293 nach homologen Sequenzen gesucht. Nur eines der offenen Leseraster (AFUA_6G04680) zeigte große Homologien zu Sur1 (49% Identität, 67% Ähnlichkeit) bzw. dem *C. albicans*-Protein Mit1 (54% Identität, 71% Ähnlichkeit). Ein Sequenzvergleich der drei Proteine ist in Abbildung 38 dargestellt. Bisher ist Afu6g04680 in der Aspergillus-Datenbank CADRE als SurA annotiert, was in Einklang mit der *S. cerevisiae*-Nomenklatur steht. Hier steht Sur für die Abkürzung von „**s**uppressor of the phenotypes of **r**vs 161 and 167 mutants“ (Desfarges *et al.*, 1993). Rvs 161 und 167 stellen Amphiphysin-ähnliche Proteine dar, die eine Rolle bei der Regulation des Aktin-Cytoskeletts spielen (Lombardi *et al.*, 2001). Zwar konnten homologe Proteine zu Rvs 161 und 167 gefunden werden (Afu_5g05950 und Afu_3g14230), dennoch wurden bisher weder die

Phänotypen der entsprechenden Deletionsmutanten noch ein potentiell unterdrückender Effekt dieser Phänotypen durch das Sur1-homologe Protein in *A. fumigatus* (Afu_6g04680) beschrieben. Deshalb wurde für das Protein Afu_6g04680 in Einklang mit der *C. albicans*-Nomenklatur die neue Bezeichnung GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase A, kurz MitA, vorgeschlagen.

| | | |
|------|--|-----|
| SUR1 | MRKELKYLICFNILLLSITYYTFDLLTLCIDDTVKDAILEEDLN-PDAPP---KPQLIP | 56 |
| MIT1 | MRKELKCIIVSHVGLIVYLLYLSEBLLSLLNDDIFSDALLDVEIN-PNPSTSLNKPATIP | 59 |
| MitA | MRRGVLIELVNLIIISFLVRSVETLLSLLVEDASDAIRHAEPLSPNSSLIEQRPQIIP | 60 |
| | ***: : :: : : : : : * **:* : * ** : . : : * : . : * : ** | |
| | H1 | |
| SUR1 | KIIHQTYKTEDIPEHWKEGRQKCLDLHP-DYKYILWTDEMAYEFIKEEYPWFIDTFENYK | 115 |
| MIT1 | KIIHQTYKTIDIPEIWKPGQQACINLHQDDYQYFLWTDSESAREFINKEFNWFIDTWDNYK | 119 |
| MitA | KIIHQTYKNETIPEVWREAAQSKCDLHP-DYEYILWTDNEKSREFIKNEYPWFLDTFDQYK | 119 |
| | *****. *** * : : * * : ** **:*:*****: * : ***: : * : **:*:**** | |
| SUR1 | YPIERADAIKYFILSHYGVYIDLDDGCEKRLDLLAFPAPL RKT SPLGVSNDVMGCVPR | 175 |
| MIT1 | YPIQRADAIKYFALYYYGGIYIDLDDGCKRKLDP LLLTVPAFVRKTAPTGISNDVMGCVPR | 179 |
| MitA | YPIQRADTIKYFVLAHFGGTYIDLDDGCNRRLDLLSYPAMVRRVPTGISNDAMGCVPR | 179 |
| | ***:***:*** * : : ** * : ** * : * : ** * : * : ** * : ** * : ** * : * | |
| SUR1 | HPFFLKALKSLKHVDKYWEIPYMTDMGSGPLFLSVIWKQYKRWRIIPKNGTVRI LQPAYY | 235 |
| MIT1 | HPFFLKVIQDLEKYQFNLVLPYITDMGSGPLFLSIMWKQYKRWGVPEAGKVRI LLPQNY | 239 |
| MitA | HPFFFLRVIELLKSVD RSWLLPYITVMYSTGPLFLSVIWKQYKRWGVPEAGKVRI LMQDEY | 239 |
| | *****: : : * : * : : * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : * | |
| | H2 | |
| SUR1 | KMHSYSFFSITKGSWHLDDAKLMLAL ENHILSCVVTGFIKGFELLYGEFTFYCWLCSEK | 295 |
| MIT1 | RGT TSSYFAIVRCSSWHMIGDANFIKSLCDHLVLAVIGGELLGLLILEVEYLFSYSWVSSQ | 299 |
| MitA | NKYSWSFFTTHVGNSSWHGKDA RLIFMIGQHMELTVLGFILASVVGECLEWVWYGRMILL | 299 |
| | : : ** * : * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : ** * : * | |
| | H3 | |
| SUR1 | FSNLT----- | 300 |
| MIT1 | CRRLTSKLLSFTVRI LMGVLRFFHLDKLLSKCD FWS RSTKYE EML LPKDSNDLKNINNN | 359 |
| MitA | S----- | 300 |
| | H4 | |
| SUR1 | -----KWKLN--AIKVRFVTILNSLGLRLKLSKS----- | 328 |
| MIT1 | TSNNNTNGCDSNNNDKSDYNNNDNINNINNNHT GKT RLS SIFNILCGKTRVKRRNRKDSN | 419 |
| MitA | -----KYRYRYSKLPGLGRLSSPTRR----- | 321 |
| | : * : . : * * : . : * | |
| SUR1 | -----TSDTASATLLARQQRLEK | 347 |
| MIT1 | LPIEIDVLSKLLDDTVIDASTTETPTNPVSPTPSPISPTINSRTSNNELLIPTNNNNNN | 479 |
| MitA | -----SRGVMP TLLR----- | 331 |
| | * ** | |
| SUR1 | DSNTN-----IVLLKSSPKSDVYDLKRD--SSKYSLGNNSS---- | 382 |
| MIT1 | NNNTNDNTNNVNNINNNRT TCDDQS TLL PYS TRLSSSSSSSSSPSSSTSSLPSHETIMKL | 539 |
| MitA | -----RVSFKEDEESAHTVETS FELYSRFD----- | 356 |
| | * * : . : * . . | |
| SUR1 | ----- | |
| MIT1 | NNDIV 544 | |
| MitA | ----- | |

Abb. 38 Sequenzvergleich der Protein-Sequenzen von *S. cerevisiae* Sur1 (YPL057C), *C. albicans* Mit1 (orf19.4077) und *A. fumigatus* MitA (Afu_6g04680)

Die Proteinsequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Eine allen Och1-verwandten Enzymen gemeinsame Mannosyltransferase-Domäne ist durch eine dicke Linie über den Sequenzen angedeutet. Ein Kasten weist auf das für Proteine der Glycosyltransferase-Familie charakteristische DXD-Motiv hin. Eine helikale Signalsequenz (H1) und putative Transmembrandomänen (H2-H4) sind durch dünne Linien unterhalb des Sequenzvergleichs angedeutet.

Abb. 38 zeigt einen Sequenzvergleich der Proteine Sur1, Mit1 und MitA. Darin wird die allen Och1-Verwandten Enzymen gemeinsame Mannosyltransferase-Domäne durch eine dicke Linie über den Sequenzen dargestellt, dünne Linien unterhalb des Sequenzvergleichs hingegen deuten die helikale Signalsequenz (H1) und putative Transmembrandomänen (H2-H4) an. Das für Proteine der Glycosyltransferase-Familie charakteristische DXD-Motiv wird durch einen Kasten angedeutet.

3.2.2.2 Die Topologie von MitA

Mit Hilfe des Programms TMHMM wurden die Proteinsequenzen von Sur1, Mit1 und MitA und die darin vorkommenden Helices analysiert. Für MitA wurden zwei Transmembrandomänen vorausgesagt (H1 und H3 in Abbildung 38), wobei die erste Helix laut des Programms SignalP mit einer Wahrscheinlichkeit von 98,5 % als N-terminale Signalsequenz fungiert und nach Aminosäure Nr. 25 abgeschnitten wird. Hierbei erfolgte die Berechnung mit Hilfe des Hidden Markov Modells (HMM). Die Lokalisation und die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Helices, in MitA als Transmembran-Domänen zu fungieren, sind in Abb. 39 veranschaulicht. Wie hier erkennbar ist, ist es aufgrund der Vorhersage eher unwahrscheinlich, dass die Helix H2 eine Transmembran-Domäne darstellt.

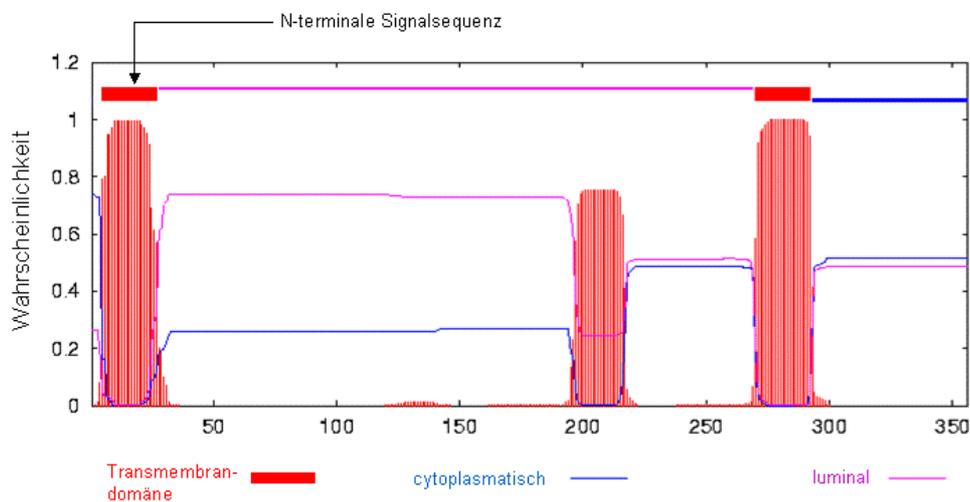


Abb. 39 Vorhersage der Topologie des MitA-Proteins

Mit Hilfe des Programms TMHMM wurden innerhalb von MitA 3 helikale Domänen gefunden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, dass Helix H3 eine Transmembrandomäne darstellt, sehr hoch, während dies für Helix H2 nicht zutrifft. Helix H1 ist laut des Programms SignalP eine N-terminale Signalsequenz, die vor Insertion des Proteins abgeschnitten wird.

Somit sind nur die Helices H1 und H3 in allen drei Organismen konserviert, während H2 nur in den Proteinen Mit1 und Sur1 eine Transmembran-Domäne darstellt und H4 sogar spezifisch für Mit1 ist (Daten nicht gezeigt für Sur1 und Mit1; vergleiche außerdem Abbildungen 38 und 39).

Es ist anzunehmen, dass sich die N-terminale Mannosyltransferase-Domäne aller drei Proteine im Lumen des Golgi-Apparats oder des Endoplasmatischen Retikulums befindet. Die genaue Konformation der Proteine ist jedoch unbekannt, so wurden verschiedene Modelle für die Topologie von Sur1 vorgeschlagen (Uemura *et al.*, 2007b; Lisman *et al.*, 2004). Anlehnend an diese Modelle wird für MitA die in Abb. 40 dargestellte Typ II-Topologie angenommen, bei der H1 als N-terminale Signalsequenz abgeschnitten wird, H2 in die Membran inseriert, diese jedoch nicht durchquert und H3 eine typische Transmembrandomäne darstellt. Dadurch ergeben sich eine große luminal Domäne, die die N-terminale Mannosyltransferase-Domäne enthält, und ein kurzer cytoplasmatischer C-Terminus. Dies ist eine Konformation, die für viele Golgi-assoziierte Glycosyltransferasen vorausgesagt wird.

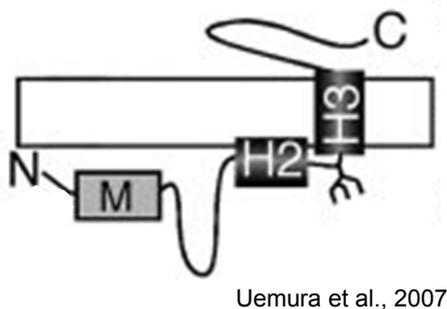


Abb. 40: Modell der Konformation von MitA

Analog zu einem Modell der Konformation für Sur1 wird für MitA eine TypII-Topologie mit einer großen luminalen Domäne, die die N-terminale Mannosyltransferase-Domäne enthält, und einem kurzen cytoplasmatischen C-Terminus angenommen. H3 ist dabei die einzige Transmembrandomäne, da H2 die Membran nicht durchspannt und H1 als N-terminale Signalsequenz abgeschnitten wird.

3.2.2.3 Deletion des *mitA*-Gens in *A. fumigatus*

Für die Generierung der $\Delta mitA$ -Mutante wurde ein Deletionskonstrukt hergestellt. Dazu wurden die jeweils 1.1 kb großen Abschnitte der stromauf- bzw. stromabwärts des *mitA*-Gens gelegenen Bereiche an eine Hygromycin-Resistenz-Kassette fusioniert. Dieses lineare Deletionskonstrukt wurde benutzt, um Protoplasten des *A. fumigatus*-Stammes AfS35 zu transformieren. Während dieses Prozesses wird in den Protoplasten das *mitA*-Gen aufgrund von homologer Rekombination durch die Hygromycin-Resistenz-Kassette ausgetauscht. Generell stellt die hohe Frequenz an nicht-homologen Rekombinations-Ereignissen bei der Transformation von *A. fumigatus* ein großes Problem dar, da dadurch

gezielte Integrationen erschwert werden. Für die durchzuführende Transformation standen verschiedene *A. fumigatus*-Stämme zur Verfügung. WT D141 ist ein klinisches Isolat und stellt einen Wildtyp-Stamm dar. AfS35 ist ein Derivat dieses Stammes mit einer Deletion des Gens *akuA*, das essentiell für die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) ist. Somit sind in AfS35 mehr gezielte Integrationen möglich, da in diesem Stamm die Frequenz homologer Rekombinationen besonders hoch ist (Krappmann et al., 2006). Phänotypisch unterscheiden sich AfS35 und WT D141 nicht. Auch die Virulenz beider Stämme ist vergleichbar, sowohl in einem systemischen Infektionsmodell als auch in einem intranasalen Infektionsmodell mit immungeschwächten Mäusen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde AfS35 als parentaler Stamm für die Generierung der Mutante ausgewählt. Nach der Transformation ergaben sich zahlreiche Hygromycin-resistente Klone, die mit Hilfe von PCR auf die korrekte Integration der Kasette bzw. die Deletion des Gens untersucht wurden (Abb. 41).

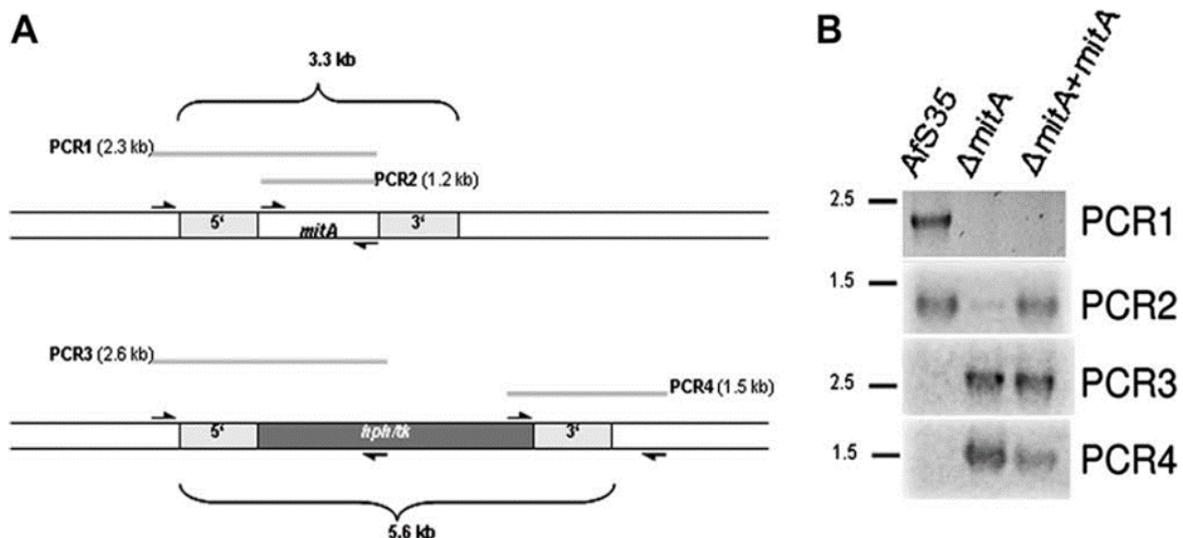


Abb. 41 Konstruktion der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante ($\Delta mitA+mitA$)

Schematische Darstellung der Struktur des genomischen *A. fumigatus mitA*-Locus (A oben) und des *mitA::hph/tk* Locus (A unten). Die 1,1 kb großen flankierenden Bereiche, die Positionen der für die Verifikation benutzten Oligonukleotide und die sich ergebenden PCR-Produkte (PCR1-4, siehe B) sind angezeigt. Zur Verifikation der Stämme wurden für die PCR-Amplifikation der in A markierten Regionen gleiche Mengen genomischer DNA der Stämme AfS35, $\Delta mitA$ und $\Delta mitA+mitA$ als Matrize eingesetzt. Größenmarker sind links neben den sich ergebenden Amplifikaten angegeben.

hph = Hygromycin-Phosphotransferase-Gen; tk = Thymidin Kinase Gen

Einer der positiven Klone wurde für alle weiteren Studien als $\Delta mitA$ -Mutante benutzt und komplementiert. Dazu wurde eine Transformation der $\Delta mitA$ -Mutante durchgeführt, wobei das Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *gpdA*-Promotors und mit Hilfe einer Pyriithiamin-Resistenz wieder in die Mutante eingebracht wurde. Dabei erfolgte eine gezielte Integration des Plasmids am *his2A*- Locus (Krappmann, 2006). Verschiedene Pyriithiamin-resistente Klone wurden ebenfalls durch PCR analysiert und einer der positiven Klone als komplementierte $\Delta mitA$ -Mutante für die weiteren Studien verwendet.

Unter Standard-Bedingungen führte die Deletion von *mitA* zu keinem Phänotyp. Die $\Delta mitA$ -Mutante zeigte keine Auffälligkeiten im radialen Wachstum auf verschiedenen Medien wie YG, AMM oder SD. Dazu wurden Sporen aller drei Stämme in die Mitte einer Agar-Platte aufgebracht und die Platten bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden zu den Zeitpunkten $t = 24$ h, 48 h, 72 h und 96 h photographisch festgehalten, zudem wurde der Radialdurchmesser bestimmt. Bis zum letzten Zeitpunkt konnte sowohl im Bezug auf den Radialdurchmesser als auch auf die Fähigkeit zur Sporulation kein Unterschied zwischen den drei Stämmen detektiert werden (Abb. 42).

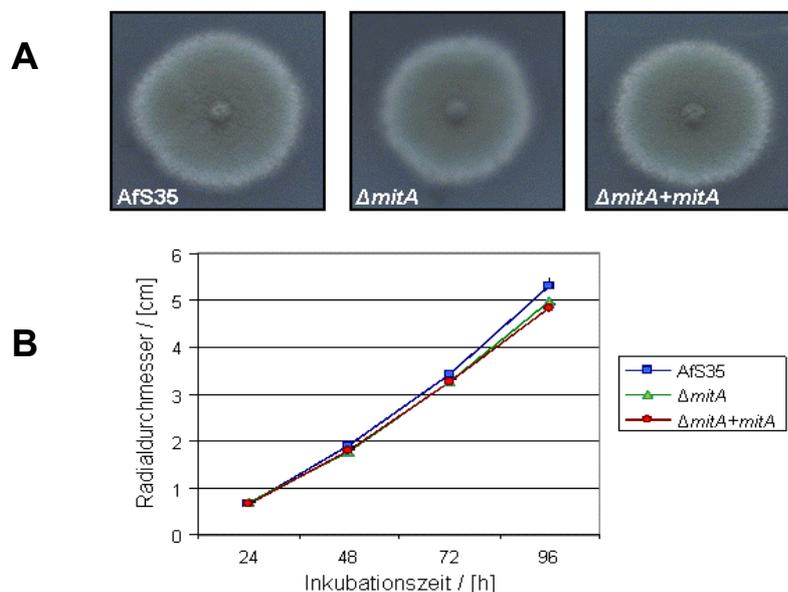


Abb. 42 Wachstum und Sporulation der $\Delta mitA$ -Mutante

Sporen des Wildtyp-Stammes Afs35, der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante wurden in die Mitte einer YG-Agarplatte aufgebracht und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 24$ h, 48 h, 72 h und 96 h wurde der Radialdurchmesser bestimmt (B) und photographisch die Fähigkeit der einzelnen Stämme zur Sporulation dokumentiert (A; $t = 48$ h).

Weiterhin wurde keine Temperatursensitivität festgestellt, da das Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante in einem Tüpfeltest sowohl bei 37°C als auch bei 48°C mit dem des Wildtyps bzw. der komplementierten Mutante vergleichbar war (Abb. 43).

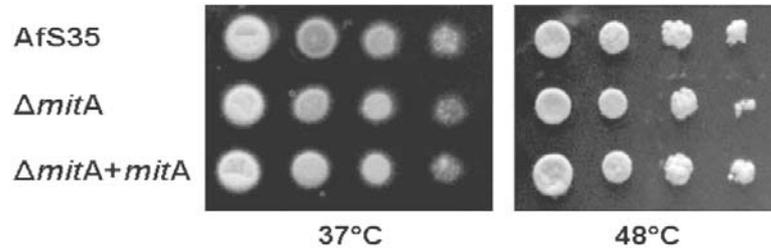


Abb. 43 Keine Temperatursensitivität der $\Delta mitA$ -Mutante

Das Wachstum aller drei Stämme wurde in einem Tüpfeltest auf SD-Medium bei 37°C und 48°C analysiert

3.2.2.4 Mangel an MIPC und MIPC-abgeleiteten Glycolipiden in der $\Delta mitA$ -Mutante

In *S. cerevisiae* und *C. albicans* vermitteln die beiden MitA-homologen Proteine die Synthese von Mannosyl-Inositolphosphorylceramid (MIPC) und den daraus hervorgehenden Glycolipiden (Beeler *et al.*, 1997; Mille *et al.*, 2004). Aufgrund der großen Homologie zwischen Sur1, Mit1 und MitA bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine ähnliche Funktion von MitA. Aus diesem Grund wurden die gereinigten Glycolipide der $\Delta mitA$ -Mutante und des Wildtyp-Stammes (AfS35) mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Jakob Engel und Prof. Françoise Routier am Institut für zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Wie in Abb. 44 A sichtbar ist, wurden die Spektren der negativen Ionen im Fall von AfS35 von vier Spitzenwerten, bei m/z 1249, 1265, 1277 und 1293 dominiert. Laut der bisher publizierten Daten (Toledo *et al.*, 2007; Simenel *et al.*, 2008) entsprechen diese Werte dem Glycolipid Man(α 1-3)Man(α 1-2)IPC, wobei die verschiedenen Größen durch unterschiedliche Ceramidreste zu begründen sind. Aufgrund der molekularen Massen der einzelnen Komponenten ist davon auszugehen, dass die Ceramidreste aus einer gesättigten Trihydroxy-Base mit 18 (t18:0, auch bekannt als Phytosphingosin) oder 20 Kohlenstoffatomen (t20:0) in Verbindung mit einer Hydroxy- oder Dihydroxy-Lignocerinsäure (Hydroxy C24:0 oder Dihydroxy C24:0) bestehen. Diese Sphingoide und hydroxylierten Lignocerinsäuren sind als die Hauptkomponenten der glycosylierten Inositol-Phosphorylceramide (GIPC) in *A. fumigatus* bekannt (Toledo *et al.*, 2007). Die etwas niedrigeren Spitzenwerte bei m/z 1411, 1427, 1440 und 1455 sind durch GIPCs mit drei

Hexoseresten zu erklären und können den Glycolipiden Man(α 1-2)Man(α 1-3)Man(α 1-2)IPC und/oder Man(α 1-3)[Gal(β 1-6)]Man(α 1-2)IPC zugeordnet werden (Toledo *et al.*, 2007). Auch in diesem Fall führte eine Heterogenität der Ceramidreste zu vier verschiedenen Peaks. Die Massenspektren der GIPCs der $\Delta mitA$ -Mutante unterscheiden sich deutlich von denen des Wildtyps. Wie aufgrund der Homologien zu Sur1 und Mit1 erwartet wurde, können in der $\Delta mitA$ -Mutante keine Mannosereste auf IPC übertragen werden, was zu einer Ansammlung von IPCs führt, die durch Spitzenwerte bei m/z 925, 941, 954 und 969 sichtbar wurden. Im Gegenzug fehlten die Werte bei m/z 1249, 1265, 1277 und 1293, die beim Wildtyp durch das mannosylierte Glycolipid Man(α 1-3)Man(α 1-2)IPC verursacht wurden. Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich bei den IPCs der Mutante höchstwahrscheinlich um Moleküle, die aus einem t18:0 oder t20:0 Sphingoid und entweder einer hydroxylierten oder dihydroxylierten Lignocerinsäure aufgebaut sind.

Auffällig ist, dass auch die Massenspektren der $\Delta mitA$ -Mutante etwas niedrigere Peaks bei m/z 1411, 1426, 1439 und 1456 aufweisen. Diese sind vermutlich auf Man(α 1-3)Man(α 1-6)GlcNac(α 1-2)IPC zurückzuführen, ein Glycolipid, dessen Biosynthese unabhängig von der Aktivität der MIPC-Transferase ist. Um dies nachzuweisen, vor allem da sich die Massen der GIPC in der Mutante nur geringfügig von denen im Wildtyp unterscheiden, wurden die GIPCs durch salpetrige Säure desaminiert und erneut analysiert. Diese Desaminierung spaltet spezifisch acetylierte Glycosamine ab, was im Fall von zwitterionischen Glycosphingolipiden zur Freisetzung von IPCs führen würde. Im Gegensatz dazu bleiben aber GIPCs, die auf einer Man(α 1-3)Man(α 1-2)IPC-Kernstruktur basieren, intakt. Wie Abb. 44 B zeigt, spaltete die Desaminierung wirklich die Glycolipide der $\Delta mitA$ -Mutante, während sie auf die GIPCs aus dem Wildtyp-Stamm keinerlei Einfluss hatte. Diese Daten zeigen einen Mangel an mannosylierten GIPCs in der $\Delta mitA$ -Mutante, was die Rolle von MitA als GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid Transferase beweist.

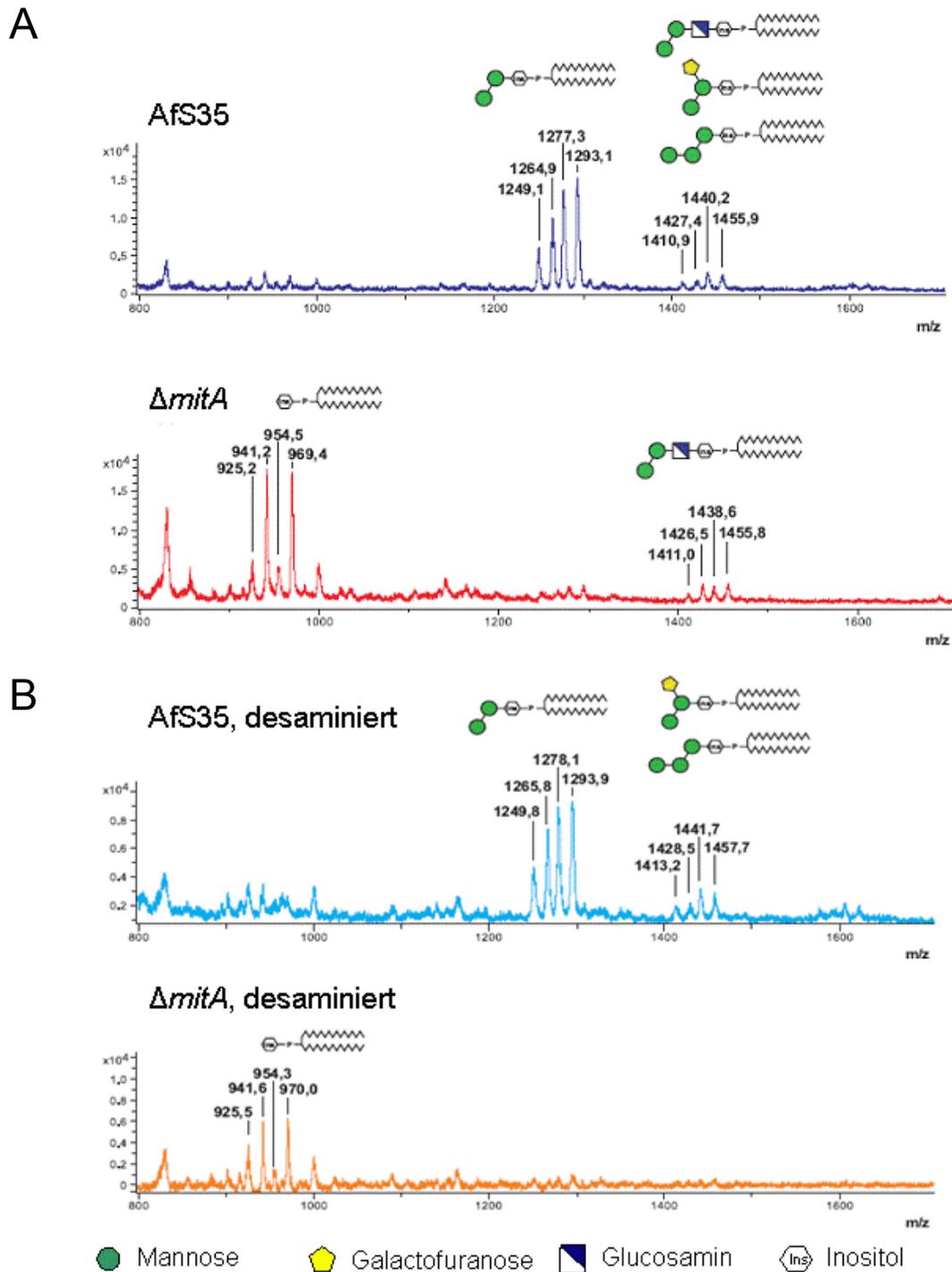


Abb. 44 Mangel an mannosylierten GIPCs in der $\Delta mitA$ -Mutante

Die gereinigten Glycolipide des Wildtyp-Stammes Afs35 und der $\Delta mitA$ -Mutante wurden vor (A) und nach (B) Desaminierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Die den gemessenen Signalen entsprechenden Glycolipide sind schematisch dargestellt. Jeder Glycan-Rest ist an vier verschiedene Inositolphosphorylceramide gebunden. Die Desaminierung spaltet spezifisch GIPCs mit einem Glucosamin-Rest, deren Biosynthese unabhängig von der Aktivität einer MIPC-Transferase ist.

3.2.2.5 Analyse der Zellwand der $\Delta mitA$ -Mutante

Eine nähere Analyse der Zellwand der $\Delta mitA$ -Mutante erfolgte mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie. Dazu wurden vom Wildtyp AfS35, der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante Hyphen angezogen und mit Cacodylatpuffer fixiert. Die mikroskopische Analyse wurde in Kooperation mit Dr. Manfred Rohde am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Dabei konnte für die Mutante ein leichter Anstieg der Zellwanddicke im Vergleich zu den Kontrollstämmen gemessen werden, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 45).

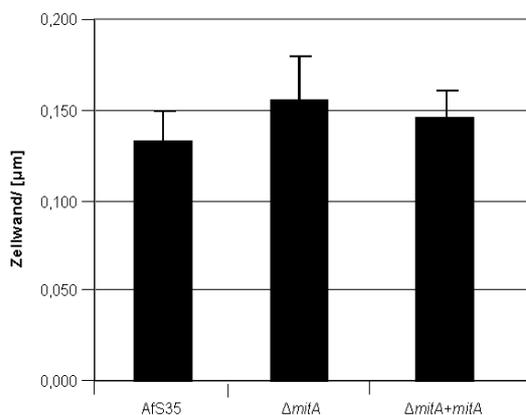


Abb. 45: Durchmesser der Zellwand der $\Delta mitA$ -Mutante im Vergleich zur Zellwand des Wildtyps und der komplementierten Mutante

Von allen drei Stämmen wurden Hyphen angezogen, mit Cacodylatpuffer fixiert und im Transmissions-Elektronenmikroskop die Dicke der Pilzzellwand bestimmt.

Für weitere Untersuchungen wurden von der Mutante sowie den Kontrollstämmen Hyphen angezogen, fixiert und mit Hilfe eines α - β 1,3-Glucan- bzw. α -Galactomannan-Antikörpers sowie entsprechenden Cy3-markierten Sekundärantikörpern die jeweiligen Strukturen sichtbar gemacht. Zudem wurde Calcofluor Weiß benutzt, um spezifisch das Chitin in der Zellwand anzufärben. Die Verteilung der verschiedenen Zellwandkomponenten wurde im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert, wobei sich bei keiner Struktur Unterschiede im Färbemuster der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, bzw. der komplementierten Mutante ergaben (Daten nicht gezeigt).

Glycosphingolipide und Sterole reichern sich innerhalb der Zellmembran in Mikrodomänen, sogenannten „lipid rafts“ an. Aus diesem Grund wurde Filipin, ein Sterol-bindendes Agens, eingesetzt, um die Verteilung der lipid rafts zu analysieren. Das sich ergebende Färbemuster zeigte bei allen Stämmen eine Anreicherung an der Hyphenspitze, ohne dass Unterschiede zwischen der Mutante und den Kontrollstämmen zu beobachten waren (Abb. 46). Dieses Färbemuster ist sehr ähnlich zu dem, das für *A. nidulans* beschrieben wurde (Pearson *et al.*, 2004)

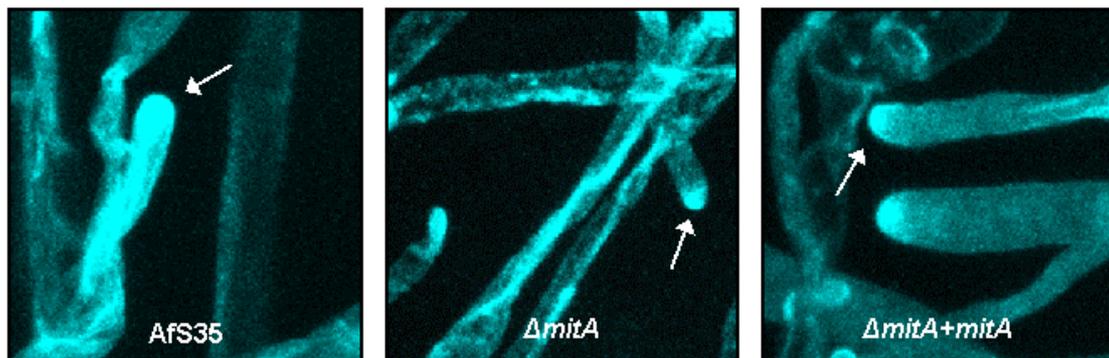


Abb. 46 Bindung von Filipin

Hyphen des Wildtyps, der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante wurden 5 Minuten mit Filipin inkubiert, das an die Sterole in der Zellmembran bindet. Nachdem das Agens wieder ausgewaschen wurde, wurde die Verteilung der *lipid rafts* im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

Die Reaktion auf Zellwandstress wurde durch Tüpfeltests auf Agarplatten mit verschiedenen bekannten Zellwandstress-Faktoren wie Congo Rot (60 $\mu\text{g/ml}$), Calcofluor Weiß (200 $\mu\text{g/ml}$), Coffein (1-5 mM), Natriumdesoxycholat (0,1%) oder SDS (1%) untersucht. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen der Mutante und den Kontrollstämmen, weder bei einer Inkubation bei 37°C, noch bei 48°C (Abb. 47 und Daten nicht gezeigt).

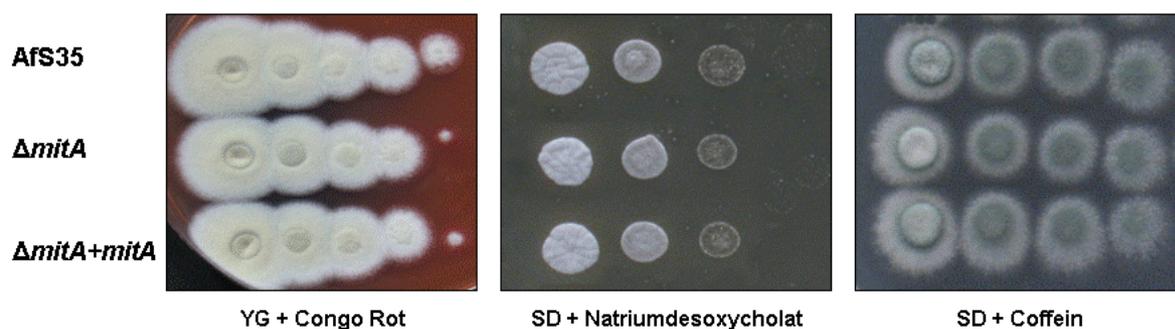


Abb. 47 Kein Effekt von Zellwandstressfaktoren auf das Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante

In einem Tüpfeltest wurden Aliquots verschiedener Verdünnungsstufen der Sporensuspensionen des Wildtyps, der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante auf Agarplatten aufgebracht, die mit verschiedenen Zellwandstressfaktoren wie, hier exemplarisch gezeigt, Congo Rot (60 $\mu\text{g/ml}$), Natriumdesoxycholat (0,1%) und Coffein (1mM) versetzt wurden. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C wurden die Platten ausgewertet.

Die Sensitivität gegenüber H_2O_2 und verschiedenen Antimycotika wurde mit Hilfe eines mit 30% H_2O_2 getränkten Filterplättchens bzw. mit kommerziell erhältlichen E-test-Streifen, die Konzentrationsgradienten der Antimycotika Voriconazol, Posaconazol und Caspofungin enthielten, untersucht. Unter standardisierten Bedingungen konnte so die minimale Hemmkonzentration (MHK) untersucht werden. Dabei wurde kein Unterschied in der Größe der Hemmhöfe der Mutante im Vergleich zu den Kontrollstämmen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Somit scheint die Deletion des *mitA*-Gens in *A. fumigatus* keinen Einfluss auf die Dicke, die Architektur und die Stabilität von Zellwand und -membran zu haben.

3.2.2.6 Wachstumsinhibition der $\Delta mitA$ -Mutante durch hohe Calciumkonzentrationen

In *S. cerevisiae* löst die Deletion von *SUR1* eine hohe Sensitivität gegenüber einer extrazellulären Calcium-Konzentration von 10 mM aus (Beeler *et al.*, 1997), während für die *C. albicans* $\Delta mit1$ -Mutante nur eine mäßige Wachstumsinhibition bei extrazellulären Calcium-Konzentrationen von 25-50 mM gezeigt werden konnte (Mille *et al.*, 2004). Das Wachstum der *A. fumigatus* $\Delta mitA$ -Mutante wurde bei diesen Konzentrationen nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte reduziertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollstämmen bei einer Calcium-Konzentration von 350 mM beobachtet werden (Abb. 48 B), ein Phänotyp der durch osmotische Stabilisation durch Zugabe von 1,2 M Sorbitol leicht abgeschwächt werden konnte (Abb 48 C). Andere zweiwertige Ionen, wie z.B. Magnesium lösten bei vergleichbaren Konzentrationen keinen derartigen Phänotyp aus (Abb. 48 F).

Für die *S. cerevisiae* $\Delta sur1$ -Mutante konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Kupfer zum Medium die Wachstuminhibition durch Calcium verhindern kann (Beeler *et al.*, 1997), ein Effekt, der in ähnlichem Ausmaß auch bei der *A. fumigatus* $\Delta mitA$ -Mutante beobachtet werden konnte (Abb. 48 D). Da zusätzliches Kupfer im Medium den Calcium-abhängigen Phänotyp abschwächte, sollte überprüft werden, ob eine Reduktion der normalerweise vorhandenen Kupferkonzentration zu einer Verstärkung der Wachstuminhibition führt. Um dies zu untersuchen wurde das Wachstum in Anwesenheit von Calcium zusammen mit dem Kupferchelator Bathocuproin-Disulfonsäure (BCS) beobachtet. Wie Abb. 48 E zeigt, konnte das Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante zusätzlich reduziert werden. Besonders das Radialwachstum rund um das Zentrum der Kolonie wurde komplett unterdrückt.

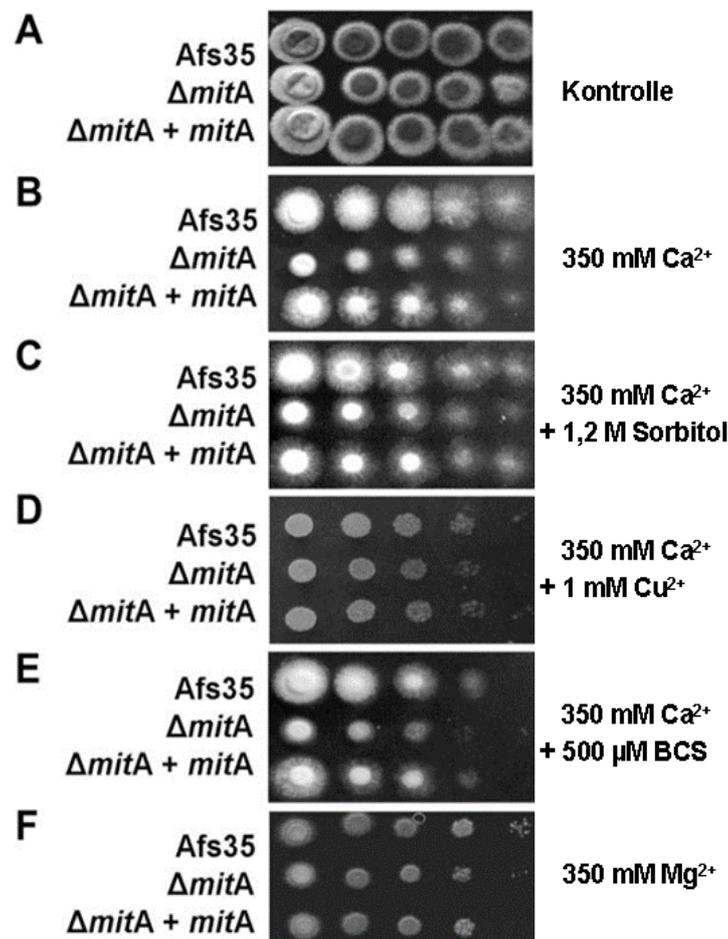


Abb. 48 Sensitivität der $\Delta mitA$ -Mutante gegenüber hohen Calciumkonzentrationen

Aliquots von Verdünnungsreihen der Sporensuspensionen der $\Delta mitA$ -Mutante, des Wildtyp- und komplementierten Stammes wurden in einem Tüpfeltest auf Agarplatten mit den angegebenen Supplementen aufgebracht.

Um den Einfluss von Calcineurin, einem wichtigen Regulator intrazellulärer Calciumsignale in Eukaryonten, zu testen, wurde FK506 eingesetzt. FK506 blockiert die Expression Calcineurin-regulierter Gene. Der Inhibitor zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Calcium-abhängige Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante (Daten nicht gezeigt), was gegen einen Einfluss von Calcineurin spricht. Die Relevanz des Chaperons Hsp90 wurde mit Hilfe von Geldanamycin untersucht. Geldanamycin inhibiert Hsp90, ein Hitzeschockprotein, das zudem bei der Reaktion auf verschiedene Arten von Zellwandstress wichtig ist, indem es an die aminoternale Domäne bindet und damit als kompetitiver Inhibitor von ATP wirkt, das entscheidend für die Funktion von Hsp90 ist. Die Wirkung von 10 μM Geldanamycin wurde in einem Tüpfeltest auf Agarplatten ohne bzw. mit 350 mM Calcium untersucht, wobei sich

zeigte, dass Hs90 keine Rolle für das Wachstum bei hohen Calciumkonzentrationen spielt (Daten nicht gezeigt).

Zur näheren Analyse des Calcium-abhängigen Wachstums wurden ruhende Sporen der $\Delta mitA$ -Mutante und der Referenzstämmen auf sterile Dialysemembranen aufgebracht, die auf Agarplatten ohne bzw. mit 350 mM Calcium gelegt wurden. Dabei konnten die nötigen Nährstoffe sowie das auf einer Platte vorhandene Calcium durch die Membran zu den Sporen diffundieren, was zu deren Auskeimung führte, sodass sich auf den Platten ohne Calcium nach zwei Tagen Kolonien bildeten. Diese wurden zusammen mit der Membran auf die mit Calcium versetzte Platte transferiert und für weitere zwei Tage inkubiert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass das Wachstum der Mutante nur leicht eingeschränkt war und sie, wie die beiden Kontrollstämmen, normale Koloniemorphologie und Sporulation aufwies. Im Gegensatz dazu ergab sich bei den Sporen, die schon zu Beginn auf die mit Calcium versetzten Platten aufgebracht wurden, ein deutlich reduziertes Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante, deren Kolonien einen geringeren Durchmesser und herabgesetzte Hyphendichte aufwiesen (Abb. 49). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Sensitivität der $\Delta mitA$ -Mutante gegenüber hohen Calcium-Konzentrationen während der Auskeimung der Sporen besonders ausgeprägt ist.

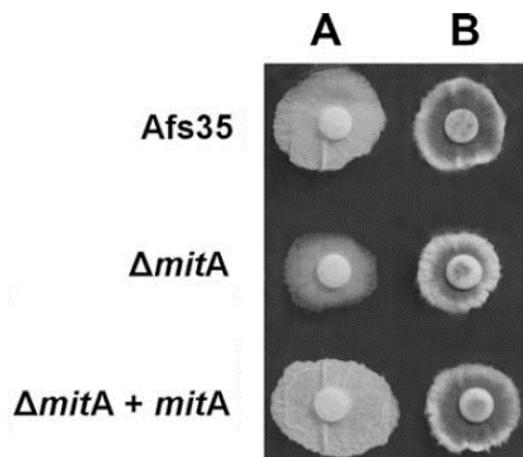


Abb. 49: Inhibition der $\Delta mitA$ -Mutante durch Ca^{2+} während der Auskeimung

Sterile Filterplättchen wurden auf Dialysemembranen aufgebracht und auf SD-Agar-Platten mit und ohne 350 mM Ca^{2+} gelegt. Die Filterplättchen wurden anschließend mit Sporensuspensionen des Wildtyps, der $\Delta mitA$ -Mutante und der komplementierten Mutante in gleichen Konzentrationen getränkt. In Reihe A sind Kolonien zu sehen, die für vier Tage in der Anwesenheit von Ca^{2+} inkubiert wurden, in Reihe B Kolonien, die nach zweitägiger Inkubation ohne Ca^{2+} auf Platten mit Ca^{2+} transferiert und für weitere zwei Tage inkubiert wurden.

3.2.2.7 Verzögerte Auskeimung der $\Delta mitA$ -Mutante

Wie Abb. 42 A zeigt, ist das Wachstum der $\Delta mitA$ -Mutante und ihrer Kontrollstämmen unter Standard-Bedingungen nicht zu unterscheiden. Dennoch wiesen zahlreiche mikroskopische Untersuchungen auf eine verzögerte Auskeimung der $\Delta mitA$ -Mutante hin.

Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Anteile der runden Konidien (Stadium I), kurzen Keimlingen (Keimschlauch bis zu 5 μ M, Stadium II) und längeren Keimlingen (Stadium III) bestimmt. Wie die Daten in Abb. 50 A zeigen, konnte zum Zeitpunkt $t = 8$ h eine verzögerte Auskeimung der $\Delta mitA$ -Mutante festgestellt werden. Allerdings nivellierte sich der Unterschied bei längerer Inkubation und war zum Zeitpunkt $t = 16$ h nicht mehr sichtbar.

Eine Verzögerung in der Auskeimung wirkt sich unter Umständen auch auf die Interaktion des Schimmelpilzes mit Immunzellen aus. Besonders in der frühen Phase der Infektion, bei der Phagozytose von inhalierten Sporen durch residente Makrophagen, könnte eine derartige Verzögerung eine Rolle spielen. Um diese Situation zu simulieren, wurden Zellen der Makrophagen-Zelllinie J774 mit ruhenden Konidien der drei verschiedenen Stämme infiziert. Nach neunstündiger Inkubation konnten bei den mit AfS35 bzw. mit dem komplementierten Stamm infizierten Zellen sternförmige Cluster auskeimender Konidien innerhalb der Makrophagen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren bei den mit der Mutante infizierten Zellen hauptsächlich unausgekeimte Konidien zu sehen (Abb. 50 B).

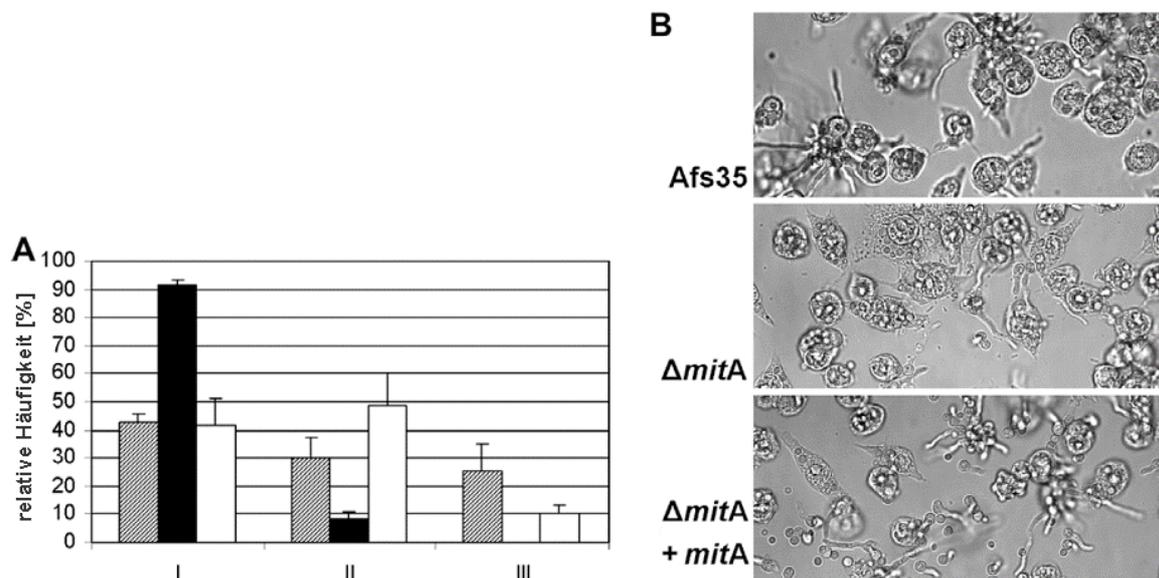


Abb. 50 Verzögerte Auskeimung der $\Delta mitA$ -Mutante

Nach achtstündiger Inkubation bei 37°C wurde für den Wildtyp (graue Balken), die $\Delta mitA$ -Mutante (schwarze Balken) und die komplementierte Mutante (weiße Balken) der Anteil runder Konidien (Stadium I), kurzer Keimlinge (Keimschlauch ≤ 5 μ m; Stadium II) und langer Keimlinge (Stadium III) bestimmt. Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (A). J774-Zellen wurden mit ruhenden Konidien der angegebenen Stämme infiziert. Nach neunstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert und im Durchlichtmikroskop analysiert. Die Abbildungen stellen repräsentative Aufnahmen der Infektionen dar (B).

3.2.2.8 Kein Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort von Makrophagen und die Virulenz von *A. fumigatus*

Wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, löst eine Konfrontation von Makrophagen mit *A. fumigatus* einen starken Influx von Granulozyten aus. Eine verzögerte Auskeimung, wie sie in Abb. 50 für die $\Delta mitA$ -Mutante dargestellt ist, ändert unter Umständen die Kinetik, mit der bestimmte PAMPs, wie z.B. β -1,3-Glucan, exponiert werden, und könnte dadurch Auswirkungen auf die Rekrutierung von Granulozyten haben. Diese Hypothese wurde getestet, indem ruhende, in Wasser suspendierte Konidien der $\Delta mitA$ -Mutante und ihrer Referenzstämme in das Peritoneum von Mäusen injiziert wurden. Die durch Peritoneallavage isolierten Zellen wurden nach der Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen den Granulozytenmarker GR-1 bzw. den Makrophagenmarker F4/80 im Durchflusszytometer analysiert.

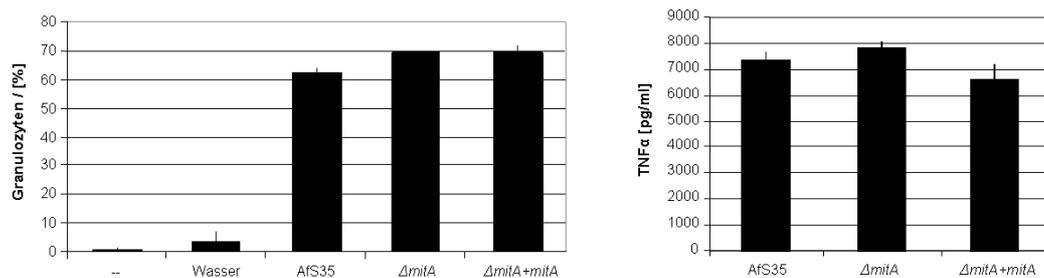


Abb. 51 Kein Einfluss von MitA auf die Rekrutierung von Granulozyten in Mäusen und die Cytokin-Antwort von murinen Makrophagen

Jeweils 1×10^7 ruhende Konidien der angegebenen Stämme wurden in 100 μ l Wasser in das Peritoneum von C57BL/6-Mäusen injiziert. Als Kontrolle diente eine Injektion von 100 μ l Wasser bzw. unstimulierte Mäuse. 15 Stunden nach der Injektion wurden die Zellen durch Peritoneallavage isoliert und nach Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die jeweiligen Zellmarker – im hier gezeigten Fall GR-1 – im FACS analysiert (A). Zur Bestimmung der Cytokinantwort wurden Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit Konidien der jeweiligen Stämme infiziert und nach 15 Stunden die Konzentration von TNF α im Zellkulturüberstand mit Hilfe von cba im FACS bestimmt (B). Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Zusammensetzung der Zellen im Peritoneum unstimulierter Mäuse wird durch Makrophagen dominiert (Daten nicht gezeigt). Granulozyten sind, wie in Abb. 51 A zu sehen, ohne vorherige Stimulation der Mäuse (--) nahezu nicht vorhanden. Jedoch führte die Injektion der Konidien innerhalb von 15 Stunden zu einem drastischen Influx von

Granulozyten, während die zur Kontrolle durchgeführte Injektion von Wasser keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellen hatte. Im Peritoneum infizierter Mäuse wurden die Granulozyten mit einem Anteil von 60-70% zum vorherrschenden Zelltyp, wobei keine Unterschiede zwischen Mäusen, die mit Konidien der $\Delta mitA$ -Mutante bzw. Konidien der Kontrollstämme infiziert wurden, detektierbar waren (Abb. 51A).

Zur Analyse der Cytokinantwort durch Primärzellen wurden Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit Konidien der drei Stämme infiziert und nach 15-stündiger Coinkubation die Konzentration verschiedener Cytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. Dabei konnte weder für TNF α (Abb. 51 B), noch für IL-6 bzw. IL-10 (Daten nicht gezeigt) ein Unterschied in der Reaktion auf die $\Delta mitA$ -Mutante im Vergleich zu den Kontrollstämmen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIPC und aus MIPC hervorgehende Glycolipide als PAMPs in *A. fumigatus* ausgeschlossen werden können.

Zudem wurde die Virulenz der $\Delta mitA$ -Mutante in einem systemischen Mausinfektionsmodell untersucht. Die Infektionen wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Echtenacher am Institut für Immunologie der Universität Regensburg durchgeführt. Das eingesetzte Modell ist dem, das zur Demonstration der Attenuierung der *C. albicans* $\Delta mit1$ -Mutante verwendet wurde, sehr ähnlich. In beiden Fällen wurde eine systemische Infektion in immunkompetenten Mäusen ausgelöst.

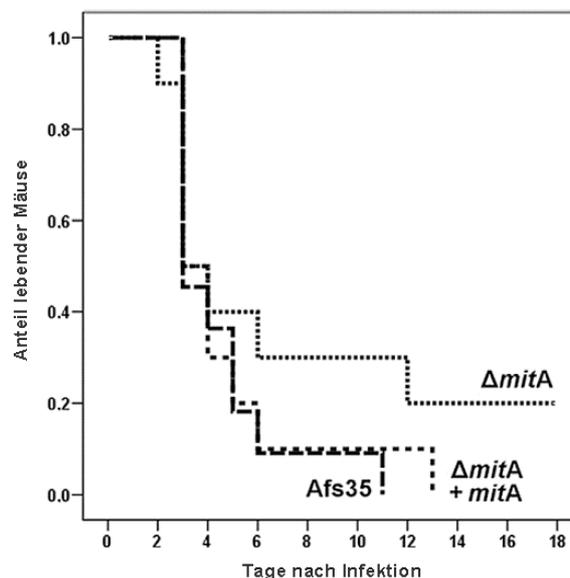


Abb. 52 Keine Relevanz mannosylierter Sphingolipide für die Virulenz von *A. fumigatus*

Verlauf einer systemischen Infektion von CD-1-Mäuse mit 1×10^6 Konidien der $\Delta mitA$ -Mutane (n=10), des Wildtyps Afs35 (n=10) und der komplementierten Mutane (n=10).

Während dieses Versuches zeigte sich, dass die Virulenz der *ΔmitA*-Mutante mit der der Kontrollstämme vergleichbar ist. Die leichte Attenuierung der Mutante zeigte keine Signifikanz (p-Wert: 0,232). Zusammengenommen sprechen diese Daten gegen eine Rolle von mannosylierten Sphingolipiden im Bezug auf die Virulenz von *A. fumigatus* im murinen System.

3.2.2.9 Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort von humanen Zellen

Die bisher gezeigten Daten sprechen gegen einen Einfluss von MitA auf die Antwort des angeborenen Immunsystems. Sowohl die Cytokinausschüttung durch Makrophagen als auch die Rekrutierung von Granulozyten sowie die Virulenz von *A. fumigatus* blieben durch eine Deletion des *mitA*-Gens unbeeinflusst. Alle genannten Versuche wurden im Maus-Hintergrund durchgeführt. Da immunologische Studien durch die Spezies, den verwendeten Zelltyp und den *A. fumigatus*-Morphotyp häufig maßgeblich beeinflusst werden (Park and Mehrad, 2009), wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort humaner Zellen untersucht. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Michael Ok und Dr. Jürgen Löffler am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Dazu wurden humane Monozyten mit Hilfe der Cytokine GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen differenziert. Diese wurden für sechs bzw. zwölf Stunden mit Keimlingen der *ΔmitA*-Mutante und der komplementierten Mutante infiziert (MOI=1). Die Konzentration von TNF α im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des *Human TNF α ELISA-CytoSets* von Invitrogen, die Konzentration von IL-10 basierend auf dem *IL-10-Duo Set-ELISA* von R&D gemessen. Der Unterschied in der TNF α -Konzentration war sowohl nach sechs, als auch nach zwölf Stunden signifikant. Im Gegensatz dazu konnte für die IL10-Ausschüttung nach sechs Stunden nur ein sehr schwacher, nach zwölf Stunden jedoch ein hoch signifikanter Unterschied detektiert werden. Somit konnte ein deutlicher Einfluss von mannosylierten Sphingolipiden auf die Cytokin-Ausschüttung durch humane dendritische Zellen gemessen werden.

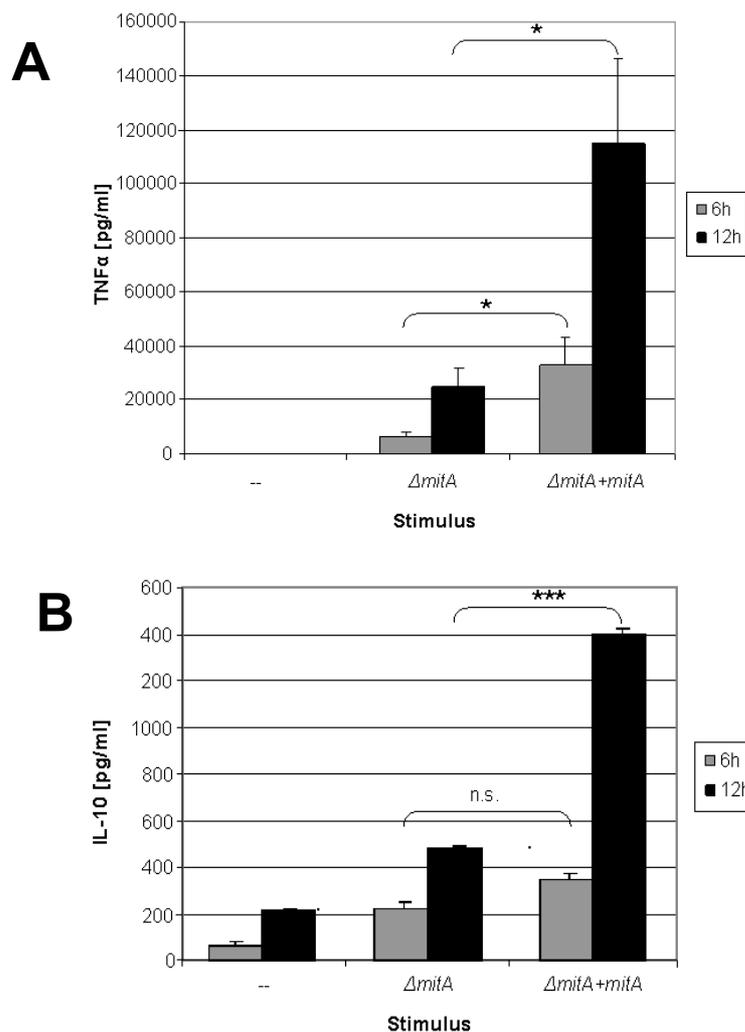


Abb. 53 Einfluss von MitA auf die Cytokin-Antwort von humanen dendritischen Zellen

Humane dendritische Zellen wurden mit Keimlingen der angegebenen Stämme infiziert und nach sechs bzw. zwölf Stunden die Konzentrationen von TNF α und IL10 im Zellkulturüberstand mit Hilfe von ELISA bestimmt.

3.2.3 Bedeutung der N-Glycosylierung in Pilzen: Charakterisierung des AfOch1-Proteins

Die Untersuchung verschiedener Glycostrukturen in *A. fumigatus* führte nach Galactomannan und mannosylierten Sphingolipiden zu glycosylierten Proteinen. Proteinglycosylierung kann als O-Glycosylierung über den Hydroxy-Sauerstoff in Serin-, Threonin-, Tyrosin-, Hydroxyprolin- oder Hydroxylysin-Seitenketten der Proteine erfolgen, ein Prozess, der im Golgi-Apparat stattfindet. Von Johannes Wagener wurde eine *A. fumigatus*- $\Delta mit1$ -Mutante, in der das Gen einer für die O-Glycosylierung wichtigen α -1,2-

Mannosyltransferase deletiert wurde, hergestellt. Während der Untersuchung dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass O-glycosylierte Proteine keinen Unterschied in der Cytokin-Antwort von murinen Makrophagen auslösen, also für diese Zellen kein PAMP darstellen (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte eine Attenuierung der Mutante in einem systemischen Mausinfektionsmodell und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Antifungiziden festgestellt werden, was die Proteinglycosylierung zu einem Angriffspunkt für antifungale Therapien macht (Wagener *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zur O-Glycosylierung startet die N-Glycosylierung, die an den Stickstoffatomen in den Asparagin- oder Arginin-Seitenketten der Proteine stattfindet, im endoplasmatischen Retikulum und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Bisher wurde dieser Prozess vor allem in Hefen untersucht, wobei gezeigt wurde, dass in *S. cerevisiae* und *C. albicans* die Ausbildung einer neuen Seitenkette ausgehend von der N-Glycan-Kernstruktur und damit die Entstehung einer großen polymannosylierten Seitenkette durch das Och1-Protein, eine α -1,6-Mannosyltransferase initiiert wird (Munro, 2001;Munro, 2001;Nakayama *et al.*, 1992;Bates *et al.*, 2006). Diese *outer chain* ist namensgebend für das Protein. Ein homologes Protein konnte auch in *A. fumigatus* gefunden und in dieser Arbeit charakterisiert werden. Untersuchungen in *C. albicans* zeigten, dass die Δ *Caoch1*-Mutante eine reduzierte Cytokin-Antwort in Mausmakrophagen auslöste und eine attenuierte Virulenz im Infektionsmodell zeigte (Bates *et al.*, 2006). *A. fumigatus* besitzt vier Och-Proteine, AfOch1-AfOch4. Im folgenden Abschnitt werden eine *A. fumigatus* Δ *afoch1*-Mutante und Δ *afoch4*-Mutante charakterisiert und die Rolle N-glycosylierter Proteine für die Virulenz und Stressresistenz von *A. fumigatus* untersucht. Dabei werden die entsprechenden Proteine ScOch1 (*S. cerevisiae*), CaOch1 (*C. albicans*) und AfOch1 (*A. fumigatus*) genannt. Durch diese Nomenklatur, bei der die Proteinamen die jeweiligen Organismen implizieren, werden Verwechslungen aufgrund der identischen Benennung der Proteine aus den unterschiedlichen Pilzspezies vermieden. Dabei wird auch für die entsprechenden Hefe-Gene die für die meisten Organismen gängige Schreibweise in Kleinbuchstaben verwendet, die der eigentlichen Hefe-Nomenklatur widerspricht, in der Gene normalerweise in Großbuchstaben geschrieben werden.

3.2.3.1 Das *afoch1*-Gen AFUA_5G08580

Eine mit Hilfe des Alignment-Programms BLASTP und der Sequenz des *S. cerevisiae*-Proteins ScOch1 durchgeführte Suche nach homologen Proteinen im Genom des *A. fumigatus*-Stammes 293 lieferte die größte Homologie für AFUA_5G08580. Die in der

Aspergillus-Datenbank CADRE hinterlegte Sequenz sagt für dieses offene Leseraster ein Intron voraus. Eine Amplifikation dieses Gens mit den Oligonukleotiden och1-5' und och 1-3' lieferte sowohl mit chromosomaler DNA aus *A. fumigatus* als auch mit cDNA als Matrize ein Amplifikat, was die Transkription des Gens in Hyphen belegt (Abb. 54). Der Größenunterschied der beiden Amplifikate beweist das Vorhandensein des vorausgesagten Introns.

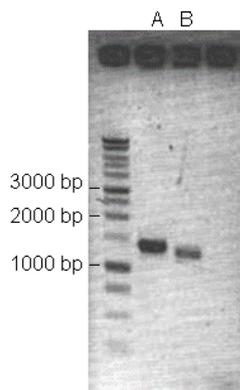


Abb. 54: Existenz eines Introns im Gen *afoch1*

Die Amplifikation von *afoch1* mit den Oligonukleotiden och1-5' und och1-3' mit chromosomaler DNA (A) bzw. cDNA (B) aus *A. fumigatus* als Matrize lieferte zwei Produkte unterschiedlicher Größe.

Eine Sequenzierung des aus der cDNA hervorgegangenen PCR-Produkts ergab eine Sequenz, die sich von dem für AFUA_5G08580 in der *Aspergillus*-Datenbank CADRE vorhergesagten offenen Leseraster unterschied. Durch eine offensichtlich falsche Annotation der Intronsequenz verschob sich das Leseraster, wodurch für das zweite Exon eine falsche und zugleich zu lange Sequenz vorausgesagt wurde. Die richtige Sequenz der gesamten mRNA wurde inzwischen in der EMBL Datenbank unter der Nummer FR667640 hinterlegt. Die Tatsache, dass das Gen mit einem Oligonukleotid amplifiziert werden konnte, das 173 bp stromabwärts des eigentlichen STOP-Codons bindet, lässt auf die Existenz eines längeren untranslatierten Bereiches am 3'-Ende des Gens schließen. Eine ähnliche Sequenz wird auch für das homologe Gen in *A. nidulans*, AN4716.4-T vorausgesagt.

Unter Verwendung der korrigierten Proteinsequenz wurde ein Sequenzvergleich mit den beiden homologen Proteinen in *S. cerevisiae* und *C. albicans* durchgeführt. Dabei ergaben sich für AfOch1 33,7% Identität (43,4% Ähnlichkeit), bzw. 37,3% Identität (56,3% Ähnlichkeit) zu den Proteinen in *S. cerevisiae* bzw. *C. albicans*. Die beiden Hefeproteine untereinander weisen ähnliche Werte auf (37,3% Identität, 51,3% Ähnlichkeit). In dem in Abb. 55 gezeigten Sequenzvergleich sind 2 Regionen mit hoher Homologie auffällig.

| | | |
|--------|---|-----|
| ScOch1 | MSRKLSHLIATRKSKTIVVTVLLIYS---LTFHLSNKRLLSQFYPSKDDFKQTLLEPTS | 57 |
| CaOch1 | MLQLREPQMVHKKHLKLAVLGIVVIFTTYFIISLSSPTSTHKTEYNSPKLQLAKELELNS | 60 |
| AfOch1 | MLTFRKSLIAAVVLITFVLLRSAS-----SPSAEPAVLNTEHTTAHDTSQAADEHLTD | 54 |
| | * . :. * : . : : . : . : | |
| ScOch1 | HSQDINLKKQITVNKKKNQLHNLRDQLSFAFPYDSQAPIQQRVWQTKVKGADDKNFP | 117 |
| CaOch1 | NWKELGLNFQPNKKYSLPDESTLRQQLSYQFPYDESKPFPKNIWQTKVGVIDEKSF | 120 |
| AfOch1 | QKHDIQQP-----LKPPTAPLRERLRYQFPYDLENRFPAYIWQTKWYTPASMWFS | 109 |
| | : : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| ScOch1 | RTYQKTWSGSYSPDYQYSLISDDSIIPFLENLYAPVPIVIQAFKLMPGNLIKADFLRYLL | 177 |
| CaOch1 | LKYQQTWE-DKNPDYKHVVVPDKQCDLLIEQLYSQVPDVAKAYRIMPKSILKADFFRYLI | 179 |
| AfOch1 | RPAEASWT-ELHPGFVHEVIPDDTQRHLVKYLYGSVPEVFEAYDSMPLPVLKADFFRYLI | 168 |
| | : : * . * : : : : * . : : : * . * * * : : * * : * * * * * * : | |
| ScOch1 | LFARGGIYSMDPMLLKQPIDSWPSQNKSWLNNIIDLNKPIPYKNSKPSLLSSDEISHQPG | 237 |
| CaOch1 | LFARGGVYTDIDFVGLKPVDEWIS-----NSEMILEK---KN-----RSG | 216 |
| AfOch1 | LLARGGIYSIDIFYALKPAVDWLP-----GELDLAT-----VG | 201 |
| | * : * * * * * : * : * * * * * . : : * . | |
| ScOch1 | LVIGIEADPDRDDWSEYARRIQFCQWTIQAKPGHPILRELILNITATTLASVQNPQV | 297 |
| CaOch1 | LVVIGIEADPDRPDWADWYARRIQFCQWTIQSKRGHPMLRELIAKITDITLT----- | 267 |
| AfOch1 | FVIGIEADPDRPDWHDWYSRRIQFCQWTIQAKPGHPILRDIVAYITEEALR----- | 252 |
| | : * : * * * * * * * * : * : * * * * * * * * : * * * * * : : * * : * | |
| ScOch1 | SEMIDPRFEEDYNVNYRHKRRHDETYKHSELKNNKNVDGSDIMNWTGPGIFSDIIFEYMN | 357 |
| CaOch1 | -----RHKK---GQLKKVLGKN---EGGDIMNWTGPGIFTDTVFEYMN | 304 |
| AfOch1 | -----MKKK---GILKEGKMDK-----TIVEFTGPAAWTDAVFRYFN | 286 |
| | : * : * . * . : : * : : * * . : : * : * : * * | |
| ScOch1 | NVLRYSNDILLINPNLNKNDDEEGSESATTPAKDVNDTLKSKSTRFYKKISESLQSSNSM | 417 |
| CaOch1 | NILQS-----PEVFNKK-----KWATII | 323 |
| AfOch1 | N-----PEYFSIEP-----GSTHNV | 301 |
| | * . : . : : : : | |
| ScOch1 | PWEFFSFLKEPVIIVDDVMVLPITSFSPDVGMGAQSSDDKMAFVKHMFSGSWKEDADKNA | 477 |
| CaOch1 | DWKLFTGMEQPIAIDVVLVLPITSFSPDVNQMGAKDSDHDPMAKHMFGSGSWKDDGMP | 383 |
| AfOch1 | TYEDFTNQGYKVGDVVLPITSFSPGVGMAGDLDDPMAFVKHDFSGSWKTDPAL-- | 359 |
| | : : * : : : * : * | |
| ScOch1 | GHK | 480 |
| CaOch1 | EQ- | 385 |
| AfOch1 | --- | |

Abb. 55 Sequenzvergleich der Protein-Sequenzen von *S. cerevisiae* ScOch1 (YGL038C), *C. albicans* CaOch1 (orf19.7391) und *A. fumigatus* AfOch1 (AFUA_5G08580)

Die korrigierte Proteinsequenz von AfOch1 wurde mit denen von ScOch1 und CaOch1 verglichen. Die Proteinsequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die Zucker-bindende Region der Glycosyltransferase, die Pfam-Domäne PF04488, ist in rot dargestellt. Das für Proteine der Glycosyltransferase-Familie charakteristische DXD-Motiv ist durch einen Kasten gekennzeichnet.

Die erste befindet sich im Bereich der in rot dargestellten Zucker-bindenden Region der putativen Glycosyltransferase (Pfam Domäne PF04488) und enthält das für Proteine der Glycosyltransferase-Familie charakteristische DXD-Motiv, welches durch einen Kasten gekennzeichnet ist. Die zweite homologe Region ist innerhalb des C-terminalen Bereichs zu finden.

3.2.3.2 Herstellung und Charakterisierung einer $\Delta afoch1$ -Mutante

Das für die Generierung der $\Delta afoch1$ -Mutante verwendete Deletionskonstrukt enthielt die jeweils 1 kb großen Abschnitte der stromauf- bzw. stromabwärts des *afoch1*-Gens gelegenen Bereiche sowie eine Hygromycin-Resistenz-Kassette (Abb. 56 A). Dieses lineare Deletionskonstrukt wurde benutzt, um Protoplasten des in 3.2.2.3 beschriebenen *A. fumigatus*-Stammes AfS35 zu transformieren. Die Herstellung und Komplementation der Mutante erfolgte analog zu der ebenfalls in 3.2.2.3 beschriebenen Herstellung der $\Delta mitA$ -Mutante. Dazu wurden Hygromycin-resistente Klone mit Hilfe von PCR auf die korrekte Integration der Kassette bzw. die Deletion des Gens untersucht.

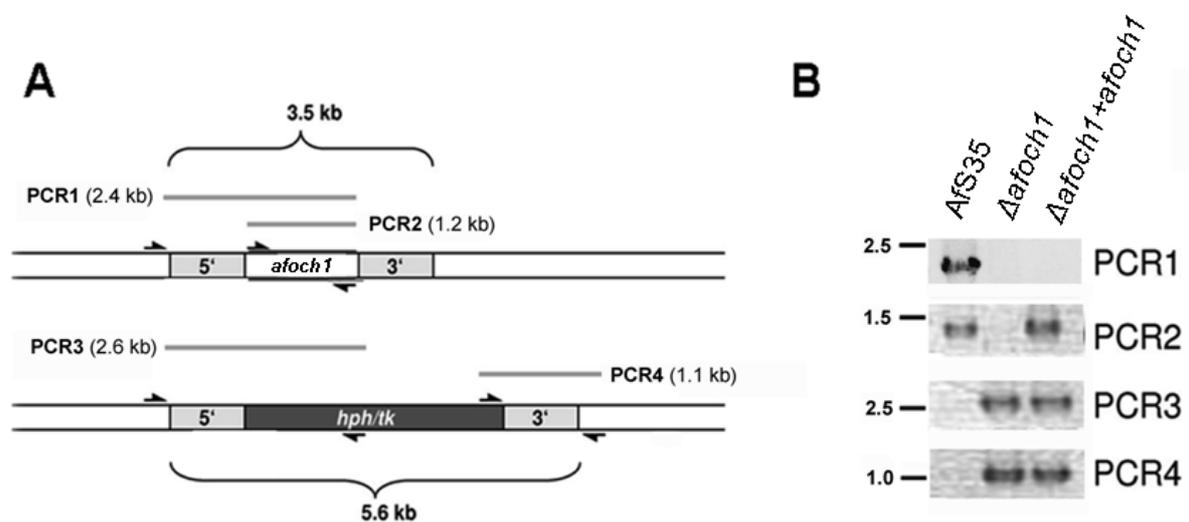


Abb. 56 Konstruktion der $\Delta afoch1$ -Mutante und der komplementierten Muante ($\Delta afoch1 + afoch1$).

Schematische Darstellung der Struktur des genomischen *A. fumigatus afoch1*-Gens (A oben) und des mitA::hph/tk Locus (A unten) mit den 1,0 kb großen flankierenden Bereichen, den Positionen der für die Verifikation benutzten Oligonukleotide und den sich ergebenden PCR-Produkten (PCR1-4, siehe B). Zur Überprüfung der Stämme wurden für die Amplifikation der in A markierten Regionen gleiche Mengen genomischer DNA der Stämme AfS35, $\Delta afoch1$ und $\Delta afoch1 + afoch1$ als Matrize eingesetzt. Größenmarker sind links neben den sich ergebenden Amplifikaten dargestellt.

hph = Hygromycin-Phosphotransferase-Gen; tk = Thymidin Kinase Gen

Einer dieser Klone wurde daraufhin komplementiert, wobei sich das *afoch1*-Gen unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors in einem Vektor (psk379) mit Pyrithiamin-Resistenz befand. Der Nachweis der korrekten Komplementation erfolgte wiederum durch PCR (Abb.

56 B). Jeweils einer der durch PCR verifizierten Klone wurde als *Δafoch1*-Mutante bzw. komplementierte Mutante (*Δafoch1+afoch1*) weiterverwendet.

In ersten Untersuchungen zur Charakterisierung der Mutante zeigte diese in Wachstum und Sporulation auf AMM, YG und Sabouraud-Medium bei 37°C keinen Unterschied zu den Kontrollstämmen - dem Ursprungsstamm AfS35 und der komplementierte Mutante (Abb. 57 A-A'' und Daten nicht gezeigt). Von der *Δscoch1*-Mutante ist bekannt, dass diese eine Temperatur-Sensitivität aufweist (Nagasu *et al.*, 1992), die entsprechende *C. albicans*-Mutante ist außerdem empfindlich gegenüber verschiedenen Zellwandstress-Faktoren (Bates *et al.*, 2006), weshalb das Wachstum der *Δafoch1*-Mutante unter diesen und weiteren Stress-Bedingungen untersucht wurde. Dabei konnte kein auffälliger Wachstums-Phänotyp detektiert werden, weder bei Temperaturen bis zu 48°C, noch auf Agar-Platten mit Calcofluor Weiß (200 µg/ml), Congo Rot (100 µg/ml), SDS (0,05%) oder Natriumdesoxycholat (0,05-0,1%). Ebenso zeigte die *Δafoch1*-Mutante keine Besonderheiten in einem Platten-Diffusionstests mit einem mit 30% H₂O₂ getränkten Filterplättchen oder mit kommerziell erhältlichen E-Test-Streifen, die Konzentrationsgradienten der Antimycotika Voriconazol, Posaconazol oder Caspofungin enthielten (Daten nicht gezeigt).

3.2.3.3 Reduzierte Sporulation der *Δafoch1*-Mutante bei hohen Calciumkonzentrationen

Die in 3.2.2 charakterisierte *ΔmitA*-Mutante wies reduziertes Wachstum in der Gegenwart von hohen Calciumkonzentrationen auf. Da dieses Protein, ebenso wie es für ScOch1 und CaOch1 schon gezeigt wurde (Nakayama *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 2006), eine Mannosyltransferase-Aktivität aufweist, wurde auch die Reaktion der *Δafoch1*-Mutante auf hohe Calcium-Konzentrationen untersucht. Dazu wurde das Radialwachstum auf YG-Agarplatten, die mit 350 mM Calcium supplementiert worden waren, charakterisiert. Es konnte ein geringfügiger Unterschied in der Koloniegröße der Mutante im Vergleich zu den Kontrollstämmen festgestellt werden (Abb. 57 B-B''), jedoch zeigten die Kolonien der Mutante einen auffälligen weißen Randbereich aus dichtem Myzel ohne detektierbare Sporenbildung. In einem entsprechenden Experiment auf Platten mit 350 mM MgCl₂ wies die Mutante keinen Sporulations-Phänotyp auf (Daten nicht gezeigt), was als Hinweis darauf zu sehen ist, dass der Effekt nicht unspezifisch durch zweiwertige Ionen oder aber durch Chlorid-Ionen im CaCl₂ hervorgerufen wird.

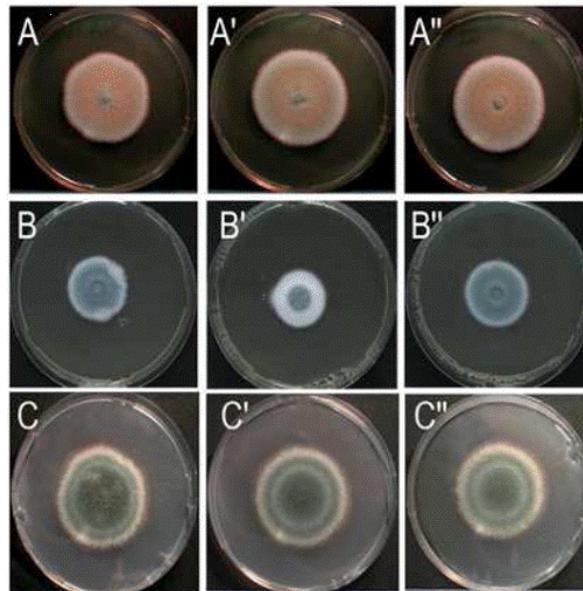


Abb. 57 Reduzierte Sporulation der *Δafoch1*-Mutante bei hohen Calciumkonzentrationen

Kolonien des Ursprungstammes AfS35 (A, B, C), der *Δafoch1*-Mutante (A', B', C') und der komplementierten Mutante (A'', B'', C'') wurden bei 37°C für 48 Stunden auf YG-Medium (A-A''), YG-Medium versetzt mit 350 mM CaCl₂ (B-B'') und AMM-Medium versetzt mit 500 mM CaCl₂ angezogen.

Weitere Wachstumstests auf verschiedenen mit Calcium versetzten Medien ergaben, dass Calcium *per se* nicht ausreichend ist, um den Sporulation-Phänotyp hervorzurufen. So zeigte die Mutante auf AMM- und PD (Potatoe-Dextrose)- Agar keinerlei Auffälligkeiten im Hinblick auf die Sporulation, auch nicht, wenn die verwendeten Calciumkonzentrationen auf bis zu 500 mM erhöht wurden. (Abb. 57 C'' und Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig wurde auf Sabouraud-Agarplatten festgestellt, dass bei diesem Medium bereits 100 mM Calcium ausreichen, um die Sporulation der Mutante nahezu komplett zu unterdrücken (Abb. 58 A-A'' und 58 B-B''). Bei detaillierter Betrachtung der Kolonien der *Δafoch1*-Mutante wurde deutlich, dass während des Wachstums auf Sabouraud-Medium mit 100 mM Calcium kaum Konidien und Konidiophoren gebildet werden und die Kolonien nur aus dichtem weißem Myzel bestehen (Abb. 59).

Besonders deutlich wurde der Unterschied zwischen der Mutante und ihren Kontrollstämmen bei längeren Inkubationszeiten von bis zu 240 Stunden, wenn die Kolonien der Kontrollstämme die gesamte Agarplatte mit sporulierendem Myzel bedeckten, während bei der Mutante auch nach diesem langen Zeitraum kaum Sporulation zu verzeichnen war (Abb. 58 F-F'').

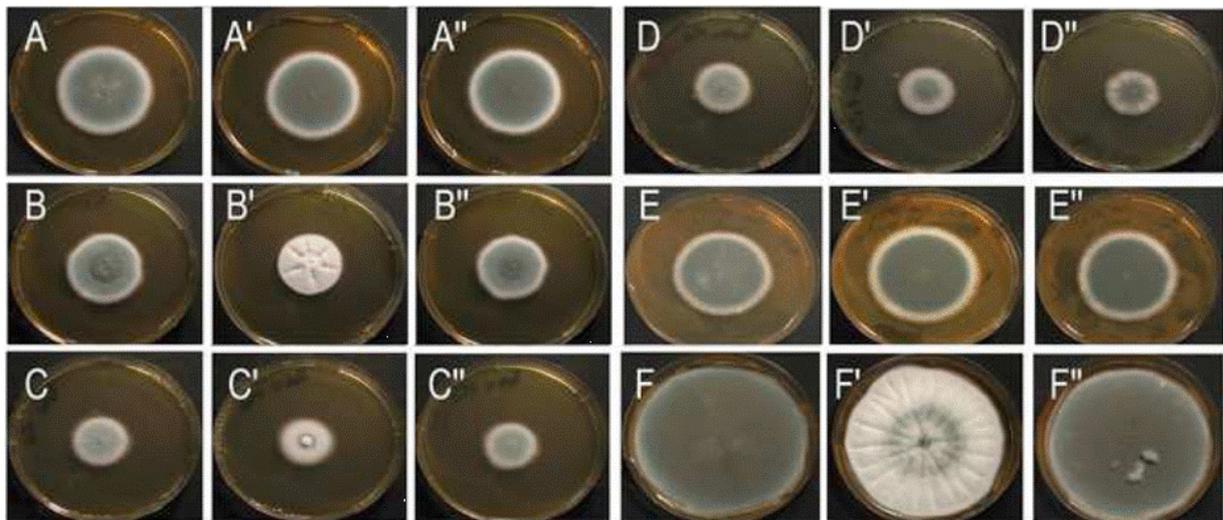


Abb. 58 Reduzierte Sporulation der *Δafoch1*-Mutante auf Sabouraud-Medium versetzt mit Calcium

Kolonien des Ursprungsstammes AfS35 (A-F), der *Δafoch1*-Mutante (A'-F') und der komplementierten Mutante (A''-F'') wurden bei 37°C für 48 Stunden (A-E) bzw. 240 Stunden (E) auf folgenden Medien angezogen:

A: Sabouraud-Medium; B und F: Sabouraud-Medium mit 100 mM CaCl₂; C: Casein (10 g/l) + 4% Glucose + 100 mM CaCl₂; D: Pepton (10 g/l) + 4% Glucose + 100 mM CaCl₂; E: Sabouraud-Medium mit 100 mM CaCl₂, pH 7,0

Sabouraud-Medium besteht aus 4% Glucose, Casein und Pepton (jeweils 5 g/l). Um den Einfluss der komplexen Komponenten, die in AMM nicht vorhanden sind, beurteilen zu können, wurden Agarplatten mit 4% Glucose, 100 mM Calcium und entweder 10 g/l Casein oder Pepton hergestellt. Somit wurde jeweils einer der komplexen Bestandteile durch den anderen ersetzt. Eine verminderte Sporulation der *Δafoch1*-Mutante konnte nur auf den Platten mit Casein festgestellt werden, während das Wachstum auf Pepton zu normaler Sporulation aller drei Stämme führte (Abb. 58 C-C'' und 58 D-D''). Charakteristisch für Sabouraud-Medium ist der saure pH-Wert des Mediums von 5,6. Eine Neutralisierung des pH-Werts auf 7,0 resultierte in unbeeinträchtigter Sporulation der Mutante trotz Zugabe von 100 mM Calcium (Abb. 58 E-E''). Wachstumstests auf AMM-Agar mit Calcium führten weder bei einem pH-Wert von 5,0, 6,0 noch 7,0 zu reduzierter Sporulation (Daten nicht gezeigt), was zeigt, dass der niedrige pH-Wert des Sabouraud-Mediums zwar nötig, aber nicht ausreichend ist, um den beschriebenen Sporulations-Phänotyp hervorzurufen.

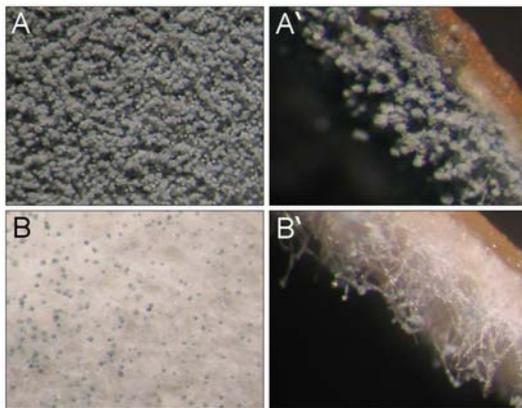


Abb. 59: Keine Ausbildung von Konidien bzw. Konidiophoren bei der $\Delta afoch1$ -Mutante bei hohen Calciumkonzentrationen

Nahaufnahmen von Kulturen des Ursprungsstammes AfS35 und der $\Delta afoch1$ -Mutante, jeweils angezogen auf Sabouraud-Medium versetzt mit 100 mM $CaCl_2$. Die Bilder A und B zeigen eine Aufsicht, A' und B' eine Seitenansicht der Kolonien.

3.2.3.4 Bedeutung von AfOch1 für die Synthese von N-Glycanen in *A.*

fumigatus

Die Och1-Proteine von *S. cerevisiae* und *C. albicans* knüpfen über eine α -1,6-glycosidische Bindung einen Mannoserest an das $Man_8GlcNAc_2$ -Grundgerüst der N-Glycane, was den ersten Schritt zur Bildung einer Poly-Mannose-Seitenkette darstellt. Für die $\Delta caoch1$ -Mutante wurde eine reduzierte N-Glycosylierung des Proteins N-Acetyl-Glucosaminidase beschrieben (Bates *et al.*, 2006). Dieses Protein besitzt sieben potentielle Glycosylierungsstellen und wird bekanntlich stark glycosyliert (Cannon *et al.*, 1994; Molloy *et al.*, 1994). Durch eine Suche nach Sequenz-homologen Proteinen mittels des Programms BLASTP konnte eine putative orthologe *A. fumigatus* N-Acetyl-Glucosaminidase identifiziert werden (AFUA_8G05020). Die Expression dieses Enzyms wurde durch Wachstum des Pilzes in AMM mit N-Acetylglucosamin als einziger Kohlenstoff-Quelle stimuliert. Anschließend wurden die Proteine des Wildtyp-Stamms AfS35, der $\Delta afoch1$ -Mutante und der komplementierten Mutante isoliert, ohne sie zu denaturieren und durch Gelelektrophorese mittels eines nativen SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine im nativen Gel wurde dabei als Maßstab für den N-Glycosylierungs-Status verwendet. Durch einen *in vitro*-Aktivitäts-Assay mit einem Naphthyl-Derivat von N-Acetylglucosamin und dem Tetrazolium-Salz *Fast Blue* wurden die Proteinbanden der N-Acetylglucosaminidase der einzelnen Stämme sichtbar gemacht. Dabei ergab sich kein Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität der N-Acetyl-Glucosaminidase der $\Delta afoch1$ -Mutante im Vergleich zu den Kontrollstämmen (Abb. 60 a-c). Durch eine Behandlung mit Endoglycosidase H wurde das Molekulargewicht der Proteine verringert, was die Anwesenheit von N-Glycanen in allen drei Stämmen nachweist (Abb. 60

d-f), denn Endoglycosidase H spaltet N-Glycane an Asparagin-Resten ab, indem es die Bindung zwischen den beiden an Asparagin gebundenen N-Acetylglucosamin-Resten durchtrennt. Somit konnte in diesem Experiment kein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit des *afoch1*-Gens und dem Glycosylierungsstatus der N-Acetylglucosaminidase gefunden werden.

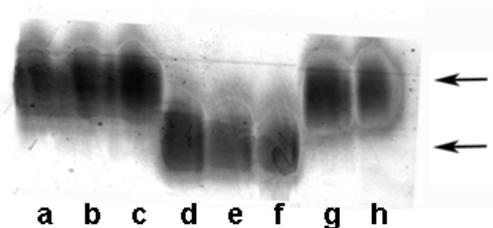


Abb. 60 Kein Unterschied im Glycosylierungsstatus der N-Acetylglucosaminidase von AfS35 und *Δafoch1*

Durch einen *in vitro*-Aktivitäts-Assay wurden die Proteinbanden der N-Acetylglucosaminidase von AfS35 (a, d, g), der *Δafoch1*-Mutante (b, e, h) und der komplementierten Mutante (c, f) nach Auftrennung durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Die Existenz von N-Glycanen wurde durch 16-stündige Inkubation bei 37°C mit Endoglycosidase H überprüft (d-f), der eventuelle Einfluss von Proteasen während dieser Behandlung durch 16-stündige Inkubation bei 37°C ohne Zusätze (g,h).

Weitere Untersuchungen der N-Glycane der *Δafoch1*-Mutante und ihrer beiden Kontrollstämme wurden in Kooperation mit Jakob Engel und Prof. Françoise Routier am Institut für zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Dazu wurden die N-Glycane sekretierter Proteine vom Wildtyp, der *Δafoch1*-Mutante und der komplementierten Mutante durch Behandlung mit Glycosidase F freigesetzt. Diese Glycosidase spaltet die Bindung zwischen Asparagin und dem darauffolgenden N-Acetylglucosamin. Die so freigesetzten N-Glycane wurden anschließend nach Fluoreszenz-Markierung durch Kapillar-Elektrophorese analysiert. Wie bisherige Untersuchungen (Schmalhorst *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2009) und Abbildung 61 zeigen, besitzen die von *A. fumigatus* sekretierten Proteine hauptsächlich N-Glycane, die aus einem Man₅₋₉GlcNAc₂-Grundgerüst und in den meisten Fällen einem angehängten Galactofuranose-Rest bestehen (Abb. 61 A und B). Bei Wachstum auf Sabouraud-Medium weisen die Proteine des Wildtypstamms AfS35 zusätzlich zu diesen N-Glycanen weitere Zucker-Strukturen auf, die in Abbildung 61 A jeweils durch einen Stern markiert sind. Erfolgte die Kultivierung von AfS35 nicht in Sabouraud-Medium, sondern in AMM, sind diese N-Glycan-Strukturen in den

untersuchten sekretierten Proteinen nicht zu finden. Ebenso konnten sie nicht in der *Δafoch1*-Mutante detektiert werden, weder nach einer Kultivierung in AMM noch nach Anzucht in Sabouraud-Medium. Besonders deutlich waren diese speziellen Zucker-Strukturen in der komplementierten Mutante zu detektieren, interessanterweise unabhängig vom Kulturmedium. In diesem Stamm erfolgt die Expression von *afoch1* durch den starken, konstitutiven *gpdA*-Promotor.

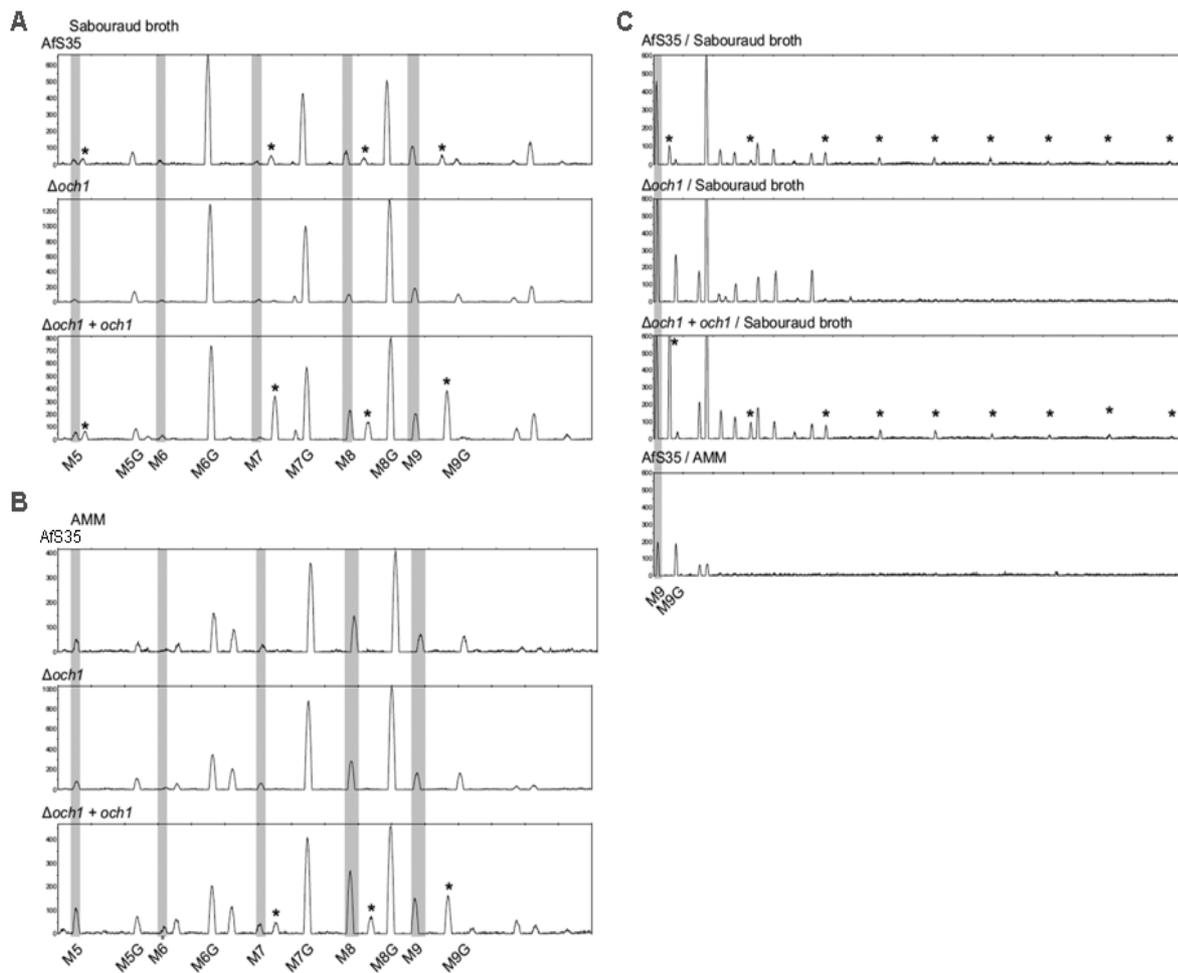


Abb. 61 Bedeutung von AfOch1 bei der Biosynthese von N-Glycanen

Der Ursprungsstamm AfS35, die *Δafoch1*-Mutante und die komplementierte Mutante wurden entweder in Sabouraud-Medium (A, C) oder in AMM (B, C) angezogen. Nach enzymatischer Freisetzung der N-Glycane aus sekretierten Glycoproteinen wurden diese Fluoreszenz-markiert und durch Kapillarelektrophorese analysiert. Die x-Achse wurde mit Fragmentgrößen des *GeneScan-500 ROX Standards* kalibriert (A-C), wobei die grauen Balken die Mobilität der als Standard benutzten $Man_{5-9}GlcNAc_2$ -Kernstrukturen anzeigen (A und B). Große N-Glycan-Strukturen wurden durch längere Injektionszeiten und mit $Man_9GlcNAc_2$ als Standard detektiert (C). Von der Expression von *afoch1* abhängige N-Glycane sind durch einen Stern markiert.

M5G-M9G: Glycane mit $Man_{5-9}GlcNAc_2$ -Kernstruktur substituiert mit einem Galactofuranose-Rest

Darüberhinaus waren N-Glycane mit höheren molekularen Massen bei Proteinen des Wildtyps und der komplementierten Mutante, nicht jedoch bei Proteinen der *Δafoch1*-Mutante oder wenn die Kultivierung der Pilze in AMM erfolgte. Somit sind auch diese, in Abb. 61 C wiederum durch einen Stern markierten Strukturen abhängig von der Expression von *afoch1*. Diese Daten sprechen dafür, dass die Synthese von polymannosylierten N-Glycanen in *A. fumigatus* durchaus stattfindet und als Antwort auf spezifische Umweltbedingungen zu sehen ist, wobei AfOch1 eine essentielle Rolle bei der Biosynthese dieser Glycokonjugate spielt.

3.2.3.5 Kein Zusammenhang zwischen der Mannosyltransferase-Aktivität und der Ca^{2+} -abhängigen Inhibition der Sporulation der *Δafoch1*-Mutante

Um den Zusammenhang zwischen der Mannosyltransferase-Aktivität von AfOch1 und der fehlenden Sporulation der *Δafoch1*-Mutante auf Sabouraud-Medium mit Calcium zu untersuchen, wurde durch Mutagenese des Komplementationsplasmids das für die Mannosyltransferase-Aktivität ausschlaggebende DID-Motiv von AfOch1 mutiert. Dabei wurde der erste Asparaginsäure-Rest durch einen Alanin-Rest ausgetauscht, sodass ein AID-Motiv entstand. Eine derartige Mutation ist laut publizierten Daten ausreichend, um die Aktivität der Mannosyltransferase zu inhibieren (Wiggins and Munro, 1998). Nach der Transformation der *Δafoch1*-Mutante mit dem mutierten Plasmid wurde die Sporulationsfähigkeit des so erzeugten Stammes auf Sabouraud-Agar mit Calcium untersucht. Wie Abb. 62 C zeigt, war das AfOch1-AID Protein in der Lage, den Sporulations-Phänotyp der Mutante zu komplementieren. Eine Überprüfung der Mutante durch PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung ergab jedoch eine definitive Mutation des DID-Motivs zu AID.

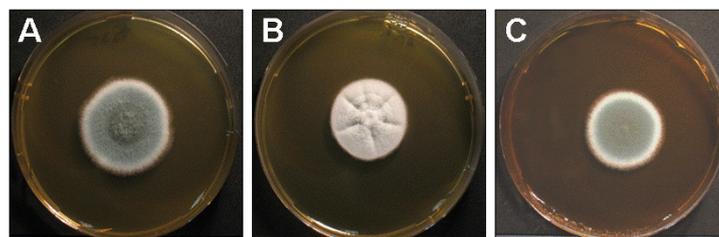


Abb. 62 Komplementation der *Δafoch1*-Mutante mit einem *afoch**-Gen mit mutiertem DXD-Motiv

Kolonien des Ursprungsstammes AfS35 (A), der *Δafoch1*-Mutante (B) und des *Δafoch1+afoch1**-Stammes (C) wurden bei 37°C für 48 Stunden auf Sabouraud-Agar versetzt mit 100 mM CaCl_2 angezogen.

Unter der Voraussetzung, dass die von Wiggins und Munro für *C. albicans* publizierten, die Enzym-Aktivität betreffenden Daten auch für *A. fumigatus* zutreffend sind, scheint kein Zusammenhang zwischen der Mannosyltransferase-Aktivität von AfOch1 und dem Sporulations-Phänotyp der Mutante in Anwesenheit von Calcium zu bestehen.

3.2.3.6 Erhöhte Virulenz der *Δafoch1*-Mutante im murinen Infektionsmodell trotz unbeeinflusster Cytokin-Antwort

Für die *Δoch1*-Mutante von *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Cytokin-Ausschüttung in murinen Makrophagen hervorruft (Netea et al. 2006). Eine Infektion von murinen Peritonealmakrophagen mit Sporen der *Δafoch1*-Mutante und den beiden Kontrollstämmen ergab keinerlei Unterschiede im Bezug auf die Ausschüttung von TNF α , IL-6 oder IL-10 (Abb. 63 und Daten nicht gezeigt).

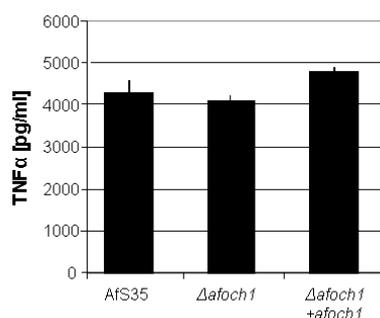


Abb. 63: Kein Einfluss von AfOch1 auf die Cytokin-Antwort von murinen Makrophagen

Zur Bestimmung der Cytokinantwort wurden Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit Konidien der *Δafoch1*-Mutante und der Kontrollstämmen infiziert und nach 15 Stunden die Konzentration von TNF α im Zellkulturüberstand mit Hilfe von cba im Durchflusszytometer bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die *Δafoch1*-Mutante genau wie die entsprechende *C. albicans*-Mutante in ihrer Virulenz attenuiert ist, wurden Mäuse in einem systemischen Infektionsmodell mit immunkompetenten Mäusen und in einem intranasalen Infektionsmodell mit immunsupprimierten Mäusen infiziert. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Echtenacher am Institut für Immunologie der Universität Regensburg und Dr. Ilse Jacobsen in der Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen am HKI in Jena durchgeführt. Dabei ergab sich jedoch keine attenuierte, sondern Hinweise auf eine erhöhte Virulenz der *Δafoch1*-Mutante. Im systemischen Infektionsmodell war dieser Effekt signifikant ($p=0,002$; Abb. 64 A), die mit den Sporen der *Δafoch1*-Mutante infizierten Mäuse starben deutlich schneller als die Tiere, denen die Kontrollstämmen injiziert wurden. Im intranasalen Infektionsmodell konnte ebenfalls eine Erhöhung der Virulenz beobachtet werden (Abb. 64 B). In diesem Fall starben die mit den Sporen der *Δafoch1*-Mutante infizierten Mäuse zwar

nicht schneller, insgesamt war der Anteil überlebender Tiere in dieser Parallele aber am geringsten.

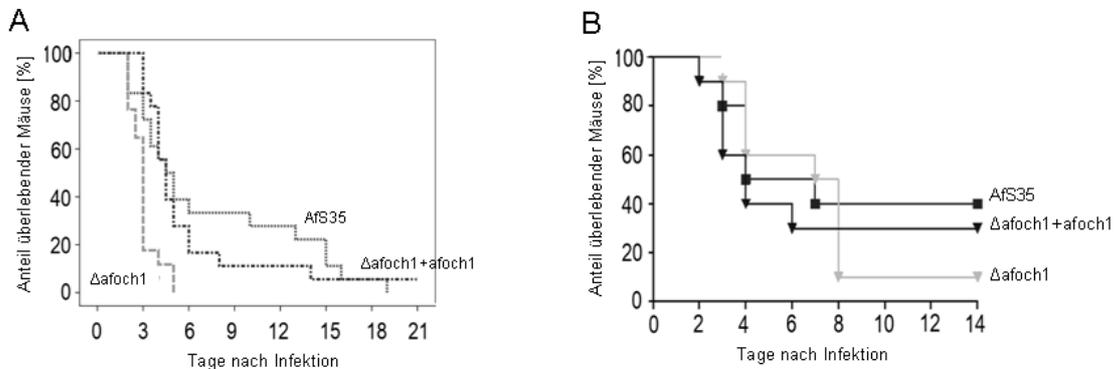


Abb. 64 Erhöhte Virulenz der Δ afoch1-Mutante im murinen Infektionsmodell

Verlauf einer systemischen Infektion von immunkompetenten Mäusen mit jeweils 2×10^6 Konidien von AfS35 (n=18), der Δ afoch1-Mutante (n=17) und der komplementierten Mutante (n=18) (A) und einer intranasalen Infektion von Cortison-behandelten Mäusen mit jeweils 1×10^6 Konidien von AfS35 (n=10), der Δ afoch1-Mutante (n=10) und der komplementierten (n=10) Mutante (B).

3.2.3.7 Unterschiede in den N-Termini Och1-ähnlicher Proteine in Hefen und filamentösen Pilzen

Hefen und filamentöse Pilze besitzen normalerweise mehrere Proteine der Och1-Familie. Die homologen Hoc1-Proteine (homologous to **O**ch1) bilden eine zweite, phylogenetisch abgegrenzte Gruppe innerhalb der putativen Mannosyltransferasen. ScHoc1 ist wie ScOch1 im Golgi lokalisiert, kann aber eine Δ scoch1-Mutante nicht komplementieren (Neimann et al., 1997). Ein weiteres Mitglied der Och-Familie, PaOcr1 (**O**ch-related protein) aus *Pichia angusta* (früher: *Hansenula polymorpha*) spielt sowohl bei der N-Glycosylierung, als auch bei der O-Glycosylierung eine Rolle (Kim et al., 2006). Abb. 65 zeigt einen mit Hilfe der Neighbour-Joining-Methode (Saitou and Nei, 1987) erstellten Stammbaum der Proteine Och1, Hoc1 und Ocr1 aus *S. cerevisiae*, *P. angusta*, *C. albicans* und *A. fumigatus*. Wie erwartet, ergaben sich offensichtliche Verwandtschaften der verschiedenen Och1- und Hoc1-Proteine, jedoch fiel außer AfOch1 keines der Och-Proteine von *A. fumigatus* in diese Untergruppe (Abb. 65). Tatsächlich scheint das Protein AfOch3 näher mit der GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Mannosyltransferase MitA (siehe 3.2.2) verwandt zu sein als mit den verschiedenen α -1,6-Mannosyltransferasen.

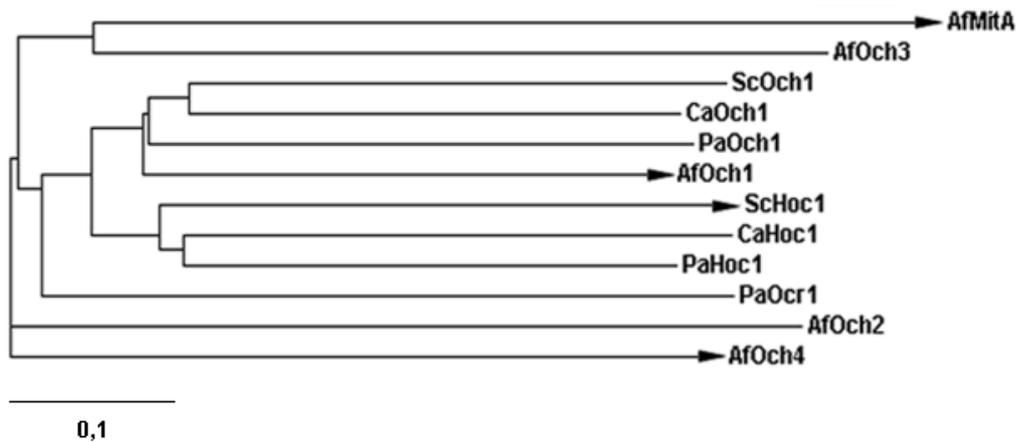


Abb. 65 Verwandtschaft ausgewählter Proteine der Och1-Familie in *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *P. angusta*

Phylogramm ausgewählter Proteine der Och1-Familie, erstellt mittels der *Neighbour-Joining*-Methode. Pfeile deuten die vorhergesagte Existenz einer N-terminalen Signalsequenz an, stumpfe Enden einen Transmembran-Anker.

Bei näherer Betrachtung der Polypeptid-Sequenz von AfOch1 ergab sich ein bemerkenswerter Unterschied zu den orthologen Hefe-Proteinen. Das Programm *SignalP* sagt für alle Och1-Proteine in Hefen einen N-terminalen Transmembran-Anker voraus, wohingegen AfOch1 ein abzuspaltendes Signalpeptid besitzen soll. Diese Untersuchung wurde mit weiteren homologen Proteinen in verwandten Spezies durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 65 dargestellt. Die Existenz eines N-terminalen Transmembran-Ankers wurde von *SignalP* für die Och-Proteine von *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans*, *Pichia angusta* und *Pichia pastoris* vorausgesagt. N-terminale Signalsequenzen hingegen, in Abb. 65 und Abb. 66 durch einen Pfeil markiert, wurden für die Och-Proteine von *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Histoplasma capsulatum*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* und *Ashbya gossypii* prognostiziert. Auffallend ist dabei, dass N-terminale Transmembrananker ausschließlich in Hefen, Signalsequenzen dagegen in filamentösen Pilzen zu finden sind. Eine Besonderheit stellt dabei *Ashbya gossypii* dar. Phylogenetisch ist diese Spezies zu den Saccharomycetaceae zu rechnen - eine Verwandtschaft, die auch in dem in Abb. 66 dargestellten Stammbaum offensichtlich ist. Dennoch wächst *Ashbya gossypii* nur in einer filamentösen Form und das Och-Protein dieses Pilzes enthält eine N-terminale Signalsequenz, was die oben dargestellte Hypothese unterstützt.

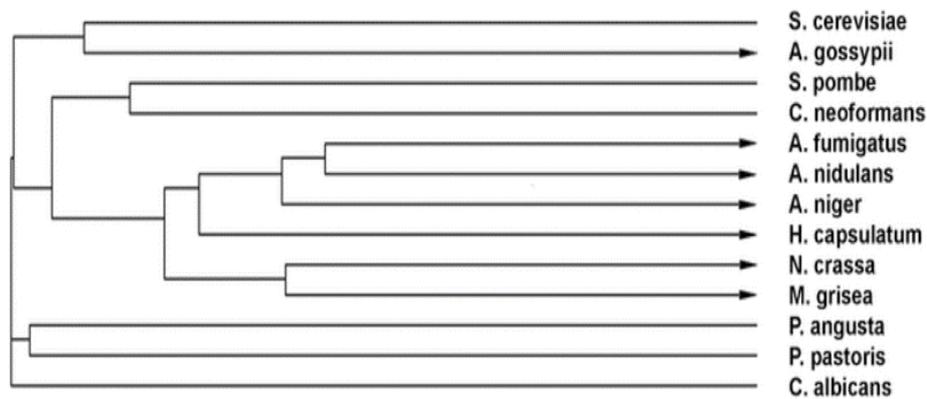


Abb. 66 Verwandtschaft der Och1-Proteine verschiedener ausgewählter Spezies

Cladogramm der Och1-Proteine verschiedener ausgewählter Spezies, erstellt mittels der *Neighbour-Joining*-Methode. Pfeile deuten die vorhergesagte Existenz einer N-terminalen Signalsequenz an, stumpfe Enden einen Transmembran-Anker.

3.2.3.8 Charakterisierung des AfOch4-Proteins

Wie in Abb. 65 deutlich wird, wurde für die Proteine der Och-Familie in *A. fumigatus* nur im Fall von AfOch1 und AfOch4 (Afu_1g01380) eine Signalsequenz vorausgesagt. Aus diesem Grund sollte auch die putative Mannosyltransferase AfOch4 genauer untersucht werden. Analog zur Herstellung der $\Delta afoch1$ -Mutante wurden Protoplasten von AfS35 mit einem Deletionskonstrukt, bestehend aus einer Hygromycin-Resistenz-Kassette und den jeweils 1 kb großen flankierenden Bereichen von *afoch4*, transformiert. Einer der Hygromycin-resistenten Klone wurde für weitere Versuche verwendet und mit Hilfe eines Vektors, der das *afoch4*-Gen unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors enthält, komplementiert. Das verwendete Deletionskonstrukt und die zur Verifizierung der Stämme durchgeführten PCR-Reaktionen sind in Abb. 67 dargestellt.

In unterschiedlichen Wachstumstests zeigte die Mutante normales Wachstum und uneingeschränkte Sporulation. Eine Reaktion auf Stressfaktoren wie erhöhte Inkubationstemperatur oder Zellwandstress, ausgelöst durch Congo Rot, Calcofluor Weiß, SDS oder Natriumdesoxycholat konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

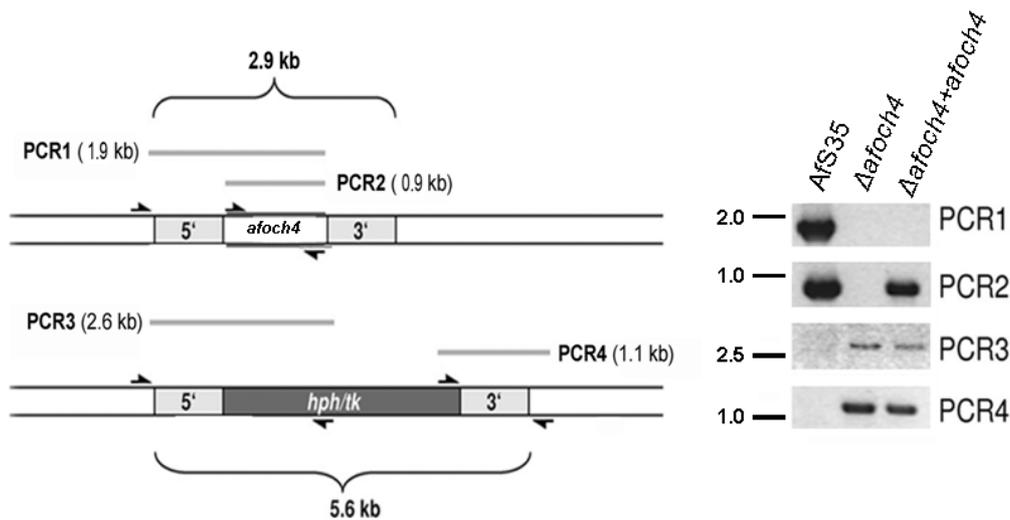


Abb. 67 Konstruktion der $\Delta afoch4$ -Mutante und der komplementierten Mutante ($\Delta afoch4+afoch4$)

Schematische Darstellung der Struktur des genomischen *A. fumigatus afoch4*-Gens (A oben) und des mitA::hph/tk-Locus (A unten) mit den 1,0 kb großen flankierenden Bereichen, den Positionen der für die Verifikation benutzten Oligonukleotide und den sich ergebenden PCR-Produkten (PCR1-4, siehe B). Zur Verifikation der Stämme wurden für die Amplifikation der in A markierten Regionen gleiche Mengen genomische DNA der Stämme AfS35, $\Delta afoch4$ und $\Delta afoch4+afoch4$ als Matrize eingesetzt. Die Größenmarker sind links neben den sich ergebenden Amplifikaten dargestellt.

hph = Hygromycin-Phosphotransferase-Gen; tk = Thymidin Kinase Gen

Auch der für die $\Delta afoch1$ -Mutante gezeigte Sporulations-Phänotyp bei Wachstum auf Sabouraud mit 100 mM Calcium konnte bei der $\Delta afoch4$ -Mutante nicht nachgewiesen werden (Abb. 68 A-A'').

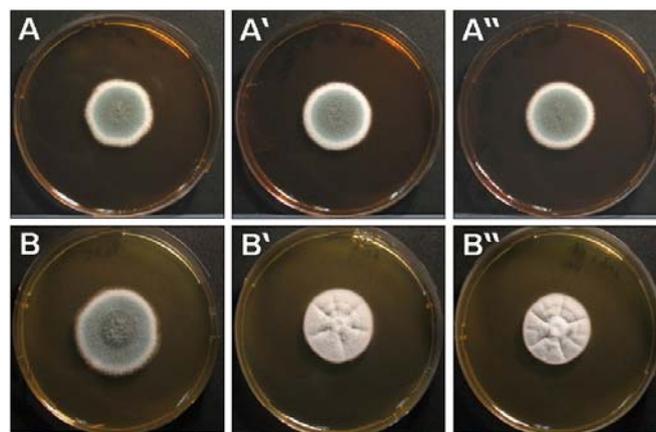


Abb. 68 Unterschiedliche biologische Funktionen für AfOch1 und AfOch4

Kolonien des Ursprungsstammes AfS35 (A und B), der $\Delta afoch4$ -Mutante (A'), der $\Delta afoch1$ -Mutante (B'), der komplementierten $\Delta afoch4$ -Mutante (A'') und des Stammes $\Delta afoch1+afoch4$ (B''), nach 48-stündigem Wachstum bei 37°C auf Sabouraud-Agar mit 100 mM CaCl_2 .

Eine Transformation der $\Delta afoch1$ -Mutante mit dem Komplementationsvektor, der das *afoch4*-Gen unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors enthält, führte nicht zu einer Wiederherstellung der Sporulationsfähigkeit auf mit 100 mM Calcium versetztem Sabouraud-Agar. Diese Tatsache legt unterschiedliche biologische Funktionen für AfOch1 und AfOch4 nahe.

3.2.3.9 Lokalisation von AfOch1

Für das ScOch1-Protein in *S. cerevisiae* wurde eine Lokalisation im Golgi-Apparat nachgewiesen (Harris and Waters, 1996). Da das AfOch1-Protein aber im Gegensatz zu ScOch1 keinen N-terminalen Membrananker zur Verankerung in der Golgimembran besitzt, war die Lokalisation des Proteins unklar. Nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids gelangt das Protein in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, von wo aus es sekretiert werden könnte. Um die Lokalisation von AfOch1 zu klären, wurde das *afoch1*-Gen an das 5'-Ende des *rfp*-Gens fusioniert, welches für das rot-fluoreszierende Protein kodiert. Das RFP-Fusionsprotein war in der Lage, die $\Delta afoch1$ -Mutante im Hinblick auf den Sporulationsdefekt zu komplementieren (Abb. 69).

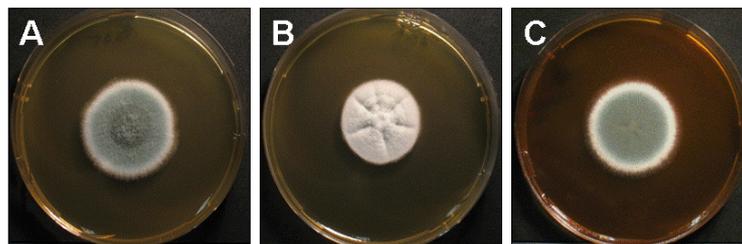


Abb. 69 Komplementation der $\Delta afoch1$ -Mutante durch ein *afoch1-rfp*-Fusionskonstrukt

Kolonien des Ursprungsstammes AfS35 (A), der $\Delta afoch1$ -Mutante (B) und des $\Delta afoch1+afoch1-rfp$ -Stammes (C) wurden bei 37°C für 48 Stunden auf Sabouraud-Agar versetzt mit 100 mM CaCl_2 angezogen.

Die Lokalisation von AfOch1 wurde anschließend durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dabei war eine deutliche rote Fluoreszenz in intrazellulären Kompartimenten zu detektieren (Abb. 70 B). Eine Behandlung der Hyphen mit Brefeldin A für 4 Stunden führte dazu, dass diese Strukturen verschwanden und sich kleine, unregelmäßige Kompartimente bildeten (Abb. 70 D). Da Brefeldin A den Golgi-Apparat zerstört (Cole et al., 2000), beweist dies eine Lokalisation von AfOch1 innerhalb des Golgi-Apparats trotz Fehlen eines N-terminalen Membran-Ankers.

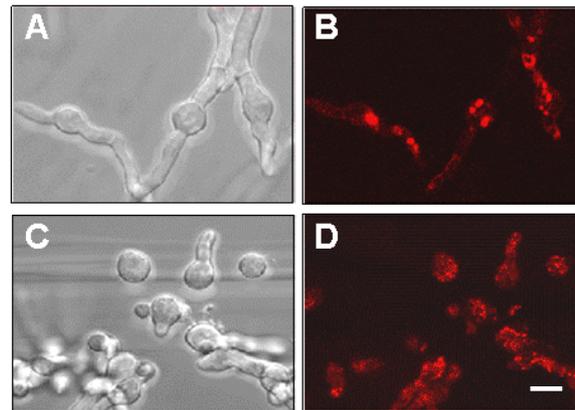


Abb. 70 Lokalisation des AfOch1-RFP-Fusionsproteins in distinkten vesikulären Strukturen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hyphen, die ein AfOch1-RFP-Fusionsprotein exprimieren (B und D) mit den entsprechenden Hellfeldaufnahmen (A und C). Die in C und D gezeigten Kulturen wurden für 4 Stunden mit Brefeldin A behandelt, die Aufnahmen in A und B zeigen unbehandelte Kulturen. Die Abbildungen stellen Projektionen aller Schnittebenen dar. Der Größenmarker entspricht 5 µm und ist für alle Bilder gültig.

3.2.3.10 Keine funktionelle Bedeutung des N-Terminus von AfOch1

Um festzustellen, ob das Signalpeptid von AfOch1 wichtig für die Funktion des Proteins ist, wurden neun, die vorhergesagte Schnittstelle umgebende, Aminosäuren durch Mutagenese des Komplementationsplasmids ausgetauscht (Abb. 71 A).



Abb. 71 Komplementation der $\Delta afoch1$ -Mutante mit einem $afoch1^*$ -Gen ohne Signalsequenz

Sequenzvergleich von 40 N-terminalen Aminosäuren von AfOch1 und AfOch1* (A). Aminosäuren, die in AfOch1* mutiert wurden, sind fett gedruckt, Aminosäuren, die die vorhergesagte Schnittstelle der abzuspaltenden Signalsequenz darstellen, sind fett und kursiv gedruckt. Kolonien des Ursprungsstammes AfS35 (B), der $\Delta afoch1$ -Mutante (C) und des $\Delta afoch1+afoch1^*$ -Stammes (D) wurden bei 37°C für 48 Stunden auf Sabouraud-Agar versetzt mit 100 mM CaCl₂ angezogen.

Das sich ergebende AfOch1*-Protein enthält mit einer Wahrscheinlichkeit von 88,3% einen N-terminalen Transmembran-Anker. Durch eine Transformation von Protoplasten der *Δafoch1*-Mutante mit dem *afoch1**-Gen konnte der Sporulationsdefekt auf Calcium-Platten aufgehoben werden (Abb. 71 B-D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die N-terminale Signalsequenz nicht essentiell für die Funktion von AfOch1 ist.

4 Diskussion

Aspergillus fumigatus ist ein filamentöser, opportunistisch humanpathogener Pilz und die Ursache schwerwiegender Infektionen mit zum Teil sehr hohen Mortalitätsraten. Systemische Infektionen wie die invasive Aspergillose treten bei immunkompetenten Personen nur sehr vereinzelt auf, stellen aber eine große Bedrohung für immungeschwächte Patienten dar. Neben einer angeborenen oder erworbenen Immundefizienz durch Krankheiten erlangt die therapeutische Immunsuppression bei vielen Erkrankungen oder medizinischen Eingriffen eine immer größere Bedeutung. Mit einem Anstieg der Zahl der immungeschwächten Patienten wächst auch die klinische Relevanz von *A. fumigatus*.

Der Verlauf einer *A. fumigatus*-Infektion entscheidet sich maßgeblich in der frühen Phase, in der inhalede Sporen auskeimen und letztlich Hyphen bilden. In diesem Zeitrahmen erweist sich, ob die angeborene Immunabwehr, die im Wesentlichen aus Phagozyten besteht, in der Lage ist, die Infektion allein zu beenden. Eine erste Barriere stellen alveolare Epithelzellen dar. Danach spielen neben residenten Makrophagen, die eindringende Sporen phagozytieren und abtöten können, auch dynamische Veränderungen der an der Immunantwort beteiligten Zellen eine Rolle. Hier ist vor allem die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsherd zu nennen. Gewährleistet wird eine schnelle Reaktion des angeborenen Immunsystems durch die Erkennung von spezifischen Strukturen auf der Oberfläche eines pathogenen Organismus. Diese werden als „*pathogen-associated molecular patterns*“ oder auch kurz PAMPs bezeichnet. Neben β -1,3-Glucan als erstem bestätigtem *Aspergillus*-PAMP (Steele *et al.*, 2005; Luther *et al.*, 2007) mehrten sich in letzter Zeit die Hinweise darauf, dass weitere Glycostrukturen in der Zellwand von zentraler Bedeutung für die Antwort des angeborenen Immunsystems auf pathogene Pilze sind (Jouault *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2006). Zudem ist die Zellwand des Pilzes ein essentieller Faktor für dessen Stressresistenz und generelle Toleranz gegenüber negativen Umwelteinflüssen. Einen wichtigen Schritt auf der Suche nach weiteren PAMPs stellt deshalb die Herstellung von *A. fumigatus*-Mutanten mit Deletionen in zentralen Genen der Glykokonjugat-Biosynthese und die Untersuchung der Auswirkungen dieser Mutationen auf die Interaktionen mit dem angeborenen Immunsystem des Wirts und das Wachstum des Pilzes dar. Für die Charakterisierung solcher Mutanten werden Infektionsassays mit Immunzellen benötigt. Im ersten Teil der Arbeit wurden daher zunächst die Interaktionen von Zellen der angeborenen Immunität mit *A. fumigatus*-Wildtyp-Stämmen untersucht.

4.1 Interaktionen von *A. fumigatus* mit Immunzellen des Wirts

Die zur Charakterisierung der Interaktionen des alveolären Epithels mit *A. fumigatus* verwendeten A549-Zellen sind eine Typ II-ähnliche humane Lungenkarzinom-Epithelzelllinie und stellen ein Standard-Modell dar, um die Reaktion des Alveolarepithels auf *A. fumigatus* zu untersuchen. Es zeigte sich, dass A549-Zellen ruhende Sporen binden und internalisieren, obwohl sie nicht zu den professionellen Phagozyten des angeborenen Immunsystems gehören. Dennoch konnten bereits nach 2 Stunden zahlreiche Sporen in engem Kontakt mit den Epithelzellen gefunden werden. Eine effiziente Bindung von *A. fumigatus*-Sporen an A549-Zellen wurde schon früher beobachtet. Dabei wurde bemerkt, dass eine vorherige Inkubation der Sporen mit Fibrinogen und Laminin deren Anlagerung an A549-Zellen verhindert. Offensichtlich spielen bei der Bindung von Konidien verschiedene Matrix-Proteine wie Fibrinogen, Laminin und Typ I und Typ IV Kollagen eine Rolle (Bromley and Donaldson, 1996). Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Annahme, dass sich Rezeptoren für Matrix-Proteine in der Oberflächenschicht der Konidien befinden, die eine primäre Adhäsion an das Alveolar-Epithel vermitteln (McCormick *et al.*, 2010b). Eine nähere Betrachtung der Bindung von *A. fumigatus*-Sporen durch A549-Zellen im Transmissions-Elektronenmikroskop zeigte, dass die Zellen in der Lage sind, auch weiter entfernte Sporen durch die Ausbildung Filopodien-ähnlicher Strukturen aufzunehmen. Diese auffälligen, bis zu 10 µm langen Strukturen scheinen sehr zielgenau in Richtung der Sporen ausgebildet zu werden. Für Epithelzellen wurden derartige Interaktionen bisher noch nicht gezeigt. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz konnte Aktin als die wesentliche Komponente beim Aufbau dieser Strukturen identifiziert werden, wohingegen Tubulin keine Bedeutung in diesem Zusammenhang zugeschrieben werden kann. Bevorzugt erfolgte die Bildung der Filopodien in Richtung von angeschwollenen Sporen und Keimschläuchen. Offenbar stellen diese Morphotypen einen besonders starken Stimulus für die Epithelzellen dar. Durch eine Untersuchung der Interaktion über einen längeren Zeitraum konnte gezeigt werden, dass Konidien durch Epithelzellen nicht nur gebunden, sondern auch internalisiert werden, eine Beobachtung, die bereits andere Arbeitsgruppen machten (Wasylnka and Moore, 2003). Die Aufnahme der Konidien durch Epithelzellen erfolgt mit Hilfe des sogenannten Reißverschluss- oder *zipper*-Mechanismus (Filler and Sheppard, 2006). Ausschlaggebend für diesen Aufnahme-Mechanismus ist eine enge Bindung zwischen spezifischen Liganden auf der Oberfläche des Pathogens und Rezeptoren der Wirtszelle. Offensichtlich werden die spezifischen Liganden vor allem nach der Auskeimung auf der Oberfläche exponiert. Welche Strukturen es genau sind, die diesen Stimulus auslösen, bleibt noch näher zu untersuchen.

Wasylnka und Kollegen fanden heraus, dass Konidien nach der Aufnahme durch A549-Zellen in saure Kompartimente mit lysosomalen Markern gelangen, wobei nur 3% der Konidien innerhalb der Zellen überlebten (Wasylnka and Moore, 2003). Dies würde bedeuten, dass A549-Zellen in der Lage sind, ruhende Konidien in phagosomalen Kompartimenten abzutöten. Diese Beobachtung konnte während der hier vorgestellten Untersuchungen nicht gemacht werden. Im Gegenteil, der Großteil der Konidien keimte innerhalb von acht Stunden aus und durchbohrte die Epithelzellen von innen. Die Auskeimung von Konidien innerhalb der Zelle und weniger deren Internalisierung wird als Auslöser einer proinflammatorischen Antwort auf *A. fumigatus* durch Epithelzellen diskutiert (Bellanger *et al.*, 2009). Möglicherweise ist die Diskrepanz zu den von Wasylnka und Kollegen gewonnenen Daten durch den von ihnen verwendeten Versuchsaufbau zu erklären. Die Zahl der überlebenden Konidien wurde dabei durch Lyse der A549-Zellen und Ausplattieren der aufgenommenen Sporen bestimmt. Da *A. fumigatus*-Sporen nach dem Auskeimen und vor allem nach der Aufnahme durch Phagozyten sehr stark dazu tendieren zu aggregieren, wird durch eine Auszählung der gebildeten Kolonien die Zahl der überlebenden Konidien vermutlich sehr stark unterschätzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nicht den Schluss zu, dass A549-Zellen in der Lage sind, *A. fumigatus*-Konidien abzutöten.

Weiterhin konnte keine Immunantwort der A549-Zellen auf den Pilz beobachtet werden. Weder eine Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins IL-8, noch eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und HIF-1 konnte detektiert werden. In ähnlichen Studien wurde gezeigt, dass die Ausschüttung von IL-8 durch A549-Zellen als Reaktion auf Konidien sehr gering, auf Myzelfragmente jedoch stärker ausgeprägt ist (Zhang *et al.*, 2005). Untersuchungen, in denen mittels Real-Time-PCR die mRNA-Expression des für IL-8 kodierenden Gens ermittelt wurde, zeigten außerdem einen Anstieg der Expression bereits acht Stunden nach Infektionsbeginn, woraus geschlossen wurde, dass die Auskeimung der Sporen als Stimulus für die Ausschüttung von IL-8 dient (Bellanger *et al.*, 2009). Die hier gezeigten Infektionen wurden mit lebenden Konidien durchgeführt, die während der Infektion auskeimten und Hyphen bildeten. Dennoch konnte kaum IL-8 im Zellkultur-Überstand detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liefert der verwendete *A. fumigatus*-Stamm. Während Daten in dieser Arbeit durch Infektionen mit dem *A. fumigatus*-Stamm ATCC 46645 gewonnen wurden, verwendeten Zhang und Kollegen ein klinisches Isolat, Bellanger und Kollegen einen Instituts-eigenen Stamm des *Institut Pasteur*. Möglicherweise lösten diese Stämme eine stärkere Immunreaktion aus. Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass A549-Zellen eine sehr geringe Reaktivität auf *A.*

fumigatus zeigten. Im Gegensatz zu diesen Zellen reagieren z.B. primäre Makrophagen auf eine *A. fumigatus*-Infektion mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Allison McCormick, persönliche Mitteilung). Aufgründessen wären Untersuchungen mit primären Epithelzellen hilfreich, um festzustellen, ob Epithelzellen an sich eine geringe Immunreaktion auf *A. fumigatus* zeigen, oder ob diese Daten spezifisch für die verwendete Zelllinie sind.

Die anfangs beschriebene Relevanz von Aktin für die Interaktion von Epithelzellen mit *A. fumigatus* wurde auch während verschiedener Untersuchungen mit Makrophagen deutlich. Eine Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts ist sowohl während der Internalisierung von Sporen als auch ausgelöst durch deren intrazelluläre Auskeimung zu beobachten. Die Phagozytose von Sporen wurde sehr detailliert von Kathrin Luther in deren Doktorarbeit untersucht (Luther, 2007). Dabei konnte sie durch Immunfluoreszenz-Färbungen eine Aktin-abhängige Aufnahme von *A. fumigatus*-Sporen durch Makrophagen zeigen. Dies wurde bestätigt durch den Einsatz von Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation. Durch Quantifizierung phagozytierter Sporen konnte sie zeigen, dass der Einsatz von Cytochalasin D, die Phagozytose-Rate um bis zu 70% herabsetzt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegten, dass der Aufnahme-Mechanismus dem der Makropinozytose gleicht. Währenddessen kommt es durch starke Umstrukturierungen des Aktin-Cytoskeletts zu Ansammlungen von Aktin um die Konidien und zu großen Ausstülpungen der Plasmamembran (Luther, 2007). Untersuchungen, die an diese Arbeit anschlossen, kamen zu demselben Schluss. Wie schon von Kathrin Luther gezeigt, konnte durch die Verwendung von Rhodamin-markiertem Dextran die Aufnahme von Konidien in einer Vakuole zusammen mit größeren Flüssigkeitsmengen veranschaulicht werden (Luther *et al.*, 2008).

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts wurde vor allem der Phagozytose-Prozess untersucht, und man ging davon aus, dass die beschriebenen Aktinansammlungen nur ein vorübergehendes und sehr kurzlebiges Ereignis sind (Aderem and Underhill, 1999). Durch Immunfluoreszenz-Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Reorganisation des Cytoskeletts auch durch die Auskeimung des Pilzes innerhalb der Zellen ausgelöst wird. Vermutlich ist der mechanische Druck, den die wachsende Hyphe auf die Plasmamembran ausübt, der Grund dafür, dass die Zelle daraufhin versucht, durch Verstärkung des Aktin-Cytoskeletts ein schützendes Gerüst aufzubauen, um von innen dem Druck auf die Plasmamembran entgegen zu wirken. Die Tatsache, dass bei der intrazellulären Hyphenbildung von *C. albicans* innerhalb von Phagozyten ähnliche Beobachtungen gemacht wurden, lassen darauf schließen, dass dieser Mechanismus nicht

spezifisch für *A. fumigatus* ist, sondern generell durch den mechanischen Druck, den die Hyphenbildung verursacht, ausgelöst wird (Oliver Kurzai, persönliche Mitteilung).

Neben der zellulären Reaktion von Makrophagen auf *A. fumigatus* wurde der immunologische Aspekt dieser Konfrontation durch Analyse der Cytokin-Ausschüttung näher beleuchtet. Derartige Versuche allein mit Primärzellen durchzuführen hängt mit einem enormen zeitlichen Aufwand und einem hohen Verbrauch an Versuchstieren zusammen. Um dies zu umgehen, wurde zunächst versucht, Makrophagen einer Zelllinie zu verwenden. Dieser Versuch scheiterte jedoch, da die eingesetzten M-HS-Zellen, eine murine Alveolar-Makrophagen-Zelllinie, keine eindeutige Immunreaktion auf *A. fumigatus* zeigten. Die geringe und sehr variable Cytokin-Ausschüttung der M-HS-Zellen in Folge einer *A. fumigatus*-Infektion ließ keine eindeutigen Schlüsse auf deren Immunantwort zu. Möglicherweise ist die Fähigkeit von Zellen einer Zelllinie mit der Ausschüttung von Cytokinen auf die Konfrontation mit *A. fumigatus* zu reagieren deutlich herabgesetzt. Dies würde auch die geringe Reaktivität der A549-Zellen erklären. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen wieder auf Primärzellen zurückgegriffen. Die erste Wahl fiel dabei auf Knochenmarkszellen, da diese in großer Zahl aus Mäusen zu isolieren sind. Die gewonnenen Zellen können im Anschluss durch eine achttägige Inkubation mit dem Cytokin M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) zu Makrophagen differenziert werden. Jedoch erwiesen sich diese Zellen als extrem variabel im Bezug auf ihre Cytokin-Ausschüttung, und auch in diesem Fall konnte zum Teil eine sehr geringe Reaktivität beobachtet werden, was insgesamt zu einer großen Streuung der Daten führte (Daten nicht gezeigt). Rosas und Kollegen konnten zeigen, dass mit M-CSF differenzierte Zellen aufgrund einer niedrigen Dectin-1-Expression nicht in der Lage sind, durch Cytokin-Ausschüttung auf eine Stimulation mit β -1,3-Glucan zu antworten (Rosas *et al.*, 2008). Da die Erkennung von β -1,3-Glucan eine wesentliche Voraussetzung für die Interaktion zwischen Makrophagen und *A. fumigatus* ist (Luther *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2005), wurde aus diesem Grund für den Großteil der durchgeführten Versuche auf Peritonealzellen zurückgegriffen. Die dort residenten ruhenden Monozyten-ähnlichen Zellen sind bereits ausdifferenziert und können nach einer eintägigen Inkubation als adhärente Makrophagen für Infektionsassays eingesetzt werden. Der Nachteil dieser Methode beruht auf einer sehr geringen Zellausbeute, jedoch zeigten diese im Bezug auf ihre Cytokin-Produktion die verlässlichsten Werte.

Bei der generellen Betrachtung der Kinetik einer *in vitro*-Infektion von Peritonealmakrophagen mit ruhenden *A. fumigatus*-Sporen konnte gezeigt werden, dass diese durch eine Ausschüttung von Cytokinen sehr stark auf den Pilz reagieren. Allerdings setzt die Reaktion erst in einem Zeitraum von vier bis sechs Stunden nach Infektionsbeginn ein. Dies

ist in etwa der Zeitpunkt kurz nachdem die Sporen ihre Hydrophobin-Hülle abgeworfen haben, die sie zu immunologisch inerten Partikeln macht (Aimanianda *et al.*, 2009). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Beobachtung, dass Makrophagen während einer Infektion mit abgetöteten Sporen bei gleicher MOI (*multiplicity of infection*) viel stärker auf angeschwollene als auf ruhende Sporen reagieren. Dies kann als Anpassung des Wirtes an die konstante Präsenz von *A. fumigatus*-Sporen gesehen werden. Da pro Tag mehrere hundert Sporen eingeatmet werden, würde eine generelle Ausschüttung von Cytokinen als Antwort auf ruhende Sporen ständig eine Entzündungsreaktion im Körper auslösen, was unter Umständen mit erheblichen Gewebeschäden einhergehen kann. Dadurch, dass Cytokine nur als Reaktion auf auskeimende, also metabolisch aktive Sporen ausgeschüttet werden, ist das Immunsystem des Wirtes in der Lage, zwischen der täglichen Standard-Belastung und einer tatsächlichen Infektion zu unterscheiden. Die hier beobachtete verzögerte Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen veranschaulicht diese Hypothese. Nach dem Einsetzen der Cytokin-Produktion war ein stetiger Anstieg zu verzeichnen, was für eine Immunreaktion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 15 Stunden hinweg spricht. Es ist bekannt, dass Makrophagen im Gegensatz zu Granulozyten Konidien mit einer zeitlichen Verzögerung abtöten. Dieser Prozess setzt nach ca. drei bis sechs Stunden ein und erst nach 30 Stunden sind 90% der Konidien durch Makrophagen eliminiert (Schaffner *et al.*, 1983).

Nach der generellen Betrachtung der immunologischen Reaktion auf *A. fumigatus* wurde die Wirkung von Phagozytose-Inhibitoren auf die Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen untersucht. Dazu wurden Cytochalasin D und Wortmannin eingesetzt. Wie von Kathrin Luther gezeigt wurde, wird die Phagozytose von *A. fumigatus*-Sporen sehr effizient durch den Aktin-Inhibitor Cytochalasin D und den PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin blockiert (Luther *et al.*, 2008). Cytochalasin D verhindert die Polymerisation von Aktin und dadurch die Ausbildung der für die Makropinozytose wichtigen Ausstülpungen (Cooper, 1987). Wortmannin hingegen blockiert nicht die Bildung der Phagozytose-Struktur, sondern verhindert den Verschluss des Phagosoms nach der Aufnahme des jeweiligen Partikels, wodurch ebenfalls der korrekte Ablauf der Makropinozytose gestört wird (Araki *et al.*, 1996). Dadurch inhibieren beide Reagenzien letztendlich die Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien durch Makrophagen, was in dieser Arbeit durch Hellfeld-Mikroskopie-Aufnahmen veranschaulicht werden konnte. Während unbehandelte Zellen sehr viele Sporen phagozytiert hatten, befanden sich in den Parallelen, bei denen die Inhibitoren eingesetzt wurden, die meisten Sporen außerhalb der Zellen und konnten ungehindert auskeimen. Die Messung der ausgeschütteten Cytokine während einer Infektion von Peritoneal-

makrophagen, die mit den Inhibitoren behandelt wurden, ergab vor allem eine interessante Reaktion auf Cytochalasin D. Während eine Behandlung mit Wortmannin wie erwartet aufgrund der Makropinozytose-Inhibition zu einer kompletten Reduktion der Ausschüttung von TNF α und IL-10 führte, löste Cytochalasin D eine Abnahme der TNF α -Konzentration, und gleichzeitig eine exorbitante Steigerung der IL-10-Konzentration aus. Ein Kontrollansatz mit Makrophagen, die mit Inhibitoren inkubiert wurden, ohne mit Sporen infiziert zu werden, zeigte, dass die Inhibitoren *per se* keinen Einfluss auf die Immunantwort hatten. Ein Anstieg der Konzentration der ausgeschütteten Cytokine durch Behandlung von Makrophagen mit Cytochalasin D konnte bereits in ähnlichen Versuchen gezeigt werden und kann durch das Phänomen der „frustrierten Phagozytose“ begründet werden (Brown *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2008). Die Zellen scheitern bei dem Versuch, die Konidien aufzunehmen, da Cytochalasin D die Polymerisation des Aktin-Cytoskeletts blockiert. Auf diesen Reiz reagieren sie durch eine verstärkte Ausschüttung von Cytokinen. Allerdings konnte bisher generell ein Anstieg der Konzentrationen von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Cytokinen gemessen werden. Während der hier dargestellten Versuche kam es jedoch zu einer stark reproduzierbaren Abnahme der TNF α - und einer gleichzeitigen Zunahme der IL-10-Produktion. Während einer Infektion könnte eine derartige Reaktion des Immunsystems durchaus sinnvoll sein. Falls mehrere Sporen in der Lage wären auszukeimen und Hyphen zu bilden, würden die Makrophagen bei dem Versuch, die Infektion zu bekämpfen aufgrund der Größe der Hyphen ebenfalls eine Art frustrierte Phagozytose erfahren. Eine ständige Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen in Folge dessen würde unter Umständen zu einer überschießenden Immunreaktion mit starker Granulozyten-Rekrutierung und daraus folgenden Gewebeschäden führen. Durch die Produktion des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 wäre es möglich, eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern.

Die Reaktion von neutrophilen Granulozyten wurde durch eine 15-stündige intraperitoneale *A. fumigatus*-Infektion von C57BL/6-Mäusen mit anschließender Peritoneallavage und Charakterisierung der gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht, wobei ein starker Granulozyten-Influx gemessen werden konnte. Diese Rekrutierung der Granulozyten zum Entzündungsherd ist als deren Antwort auf die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine durch residente Makrophagen zu betrachten. Derartige dynamische Veränderungen der Zellpopulationen während einer Infektion sind ausschlaggebend für deren weiteren Verlauf. Es konnte gezeigt werden, dass Granulozyten nicht nur, wie bisher angenommen, zur Bekämpfung von Hyphen rekrutiert werden, sie unterstützen residente Makrophagen auch bei der Phagozytose von Konidien. Unter Umständen sind sie in diesem Zusammenhang sogar von größerer Bedeutung als

Makrophagen (Mircescu *et al.*, 2009). Zudem werden Konidien durch Granulozyten viel schneller abgetötet als durch Makrophagen, was vor allem auf deren Fähigkeit, einen oxidativen *burst*, also die schnelle Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies auszulösen, beruht (Roilides *et al.*, 1993; Levitz and Farrell, 1990). Dennoch sind Granulozyten vor allem bei der Bekämpfung von Hyphen von großer Bedeutung. Dies erfolgt zum einen durch Beschädigung der Hyphen aufgrund der Freisetzung antimikrobieller Stoffe durch Degranulation, zum anderen durch die Bildung von *neutrophil extracellular traps*, oder NETs, die durch eine Chelatbildung mit Zink-Ionen mit Hilfe des NET-assoziierten Proteins Calprotectin das Wachstum der Hyphen verhindern (Romani, 2004; McCormick *et al.*, 2010a). Durch diese verschiedenen Mechanismen sind Granulozyten äußerst bedeutend für die Reaktion des angeborenen Immunsystems.

Während einer näheren Betrachtung der Kinetik der Granulozyten-Rekrutierung konnte bereits ab drei Stunden und bis zu 24 Stunden nach Infektionsbeginn ein Einstrom detektiert werden. Bei einer Analyse der Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen wurde allerdings, wie bereits beschrieben, erst ab vier bis sechs Stunden nach Infektionsbeginn eine Reaktion der Zellen gemessen. Die von Makrophagen ausgeschütteten proinflammatorischen Cytokine gelten als der wesentliche Stimulus für eine Rekrutierung von Granulozyten zum Entzündungsherd. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Cytokin-Ausschüttung von Makrophagen mit Hilfe einer *in vitro*-, der Granulozyten-Influx hingegen durch eine *in vivo*-Infektion gemessen wurde. Die Reaktionen des gesamten angeborenen Immunsystems während einer *in vivo*-Infektion sind sehr komplex, und können deshalb nicht direkt mit *in vitro*-produzierten Daten gleichgesetzt werden. Vermutlich setzen die verschiedenen Mechanismen während einer *in vivo*-Infektion viel schneller ein. Eine zur Kontrolle durchgeführte Injektion von PBS führte nicht zur Rekrutierung von Granulozyten. Zudem kann aufgrund einer vorherigen Behandlung der Sporen mit Polymyxin B eine Reaktion auf LPS-Kontaminationen ausgeschlossen werden. Somit ist der Influx als eine spezifische Reaktion auf *A. fumigatus* zu sehen. Ausgehend von den hier gezeigten Daten lösen offensichtlich auch ruhende Sporen eine Rekrutierung von Granulozyten aus, was nicht im Einklang mit der Hypothese ist, dass diese aufgrund der Hydrophobin-Hülle immunologisch inert sind (Aimanianda *et al.*, 2009). Der Stimulus und der genaue Mechanismus der Antwort von Granulozyten auf *A. fumigatus* muss noch genauer untersucht werden. Wichtig ist dabei auch, wann und wie die Rekrutierung der Zellen wieder beendet wird. Ein konstanter Einstrom von Granulozyten, wie er hier über 24 Stunden hinweg gemessen wurde, könnte eine zu starke Entzündungsreaktion mit Gewebeschäden aufgrund von reaktiven Sauerstoff-Spezies verursachen.

4.2 Galactomannan und seine Bedeutung für die Immunantwort auf *A.*

fumigatus

Ein wesentliches Problem bei der Bekämpfung von *A. fumigatus*-Infektionen stellt deren erfolgreiche Diagnostik dar. Während in immunkompetenten Patienten Krankheiten wie Aspergilloma oder alveolares bronchopulmonares Asthma leicht durch einen Anstieg des Antikörper-Titers gegen verschiedene *Aspergillus*-Antigene diagnostiziert werden können, geht man davon aus, dass bei immungeschwächten, an invasiver Aspergillose erkrankten Menschen die humorale Immunantwort aufgrund der Immunsuppression reduziert ist und somit keinen zuverlässigen Parameter darstellt. Momentan basieren die Methoden für die serologische Diagnostik von Invasiver Aspergillose auf zirkulierenden Zellwand-Polysacchariden (Latge, 1999). Die größte Bedeutung in diesem Zusammenhang erlangt Galactomannan, das zusammen mit β -1,3-Glucan und Chitin eine der wichtigsten Zellwandkomponenten darstellt und als Antigen in Serum, Urin und Bronchoalveolarer Lavage von Patienten zu detektieren ist (Bernard and Latge, 2001). Bereits 1978 wurden zirkulierende Antigene von *A. fumigatus* entdeckt, und ein Jahr danach konnte ein spezifisches Antigen als das Polysaccharid Galactomannan identifiziert werden (Reiss and Lehmann, 1979; Lehmann and Reiss, 1978). Etwas später konnte gezeigt werden, dass das immunodominante Epitop von Galactomannan durch den in Tieren und Pflanzen nicht vorhandenen Zucker Galactofuranose gebildet wird (Bennett *et al.*, 1985). Dadurch wird das pilzliche Galactomannan nicht nur in diagnostischer, sondern auch in therapeutischer Sicht interessant, da neue Therapieansätze mit Galactomannan als Zielmolekül denkbar sind. In *A. fumigatus* sind die Galactofuranose-Seitenketten an einem Mannan-Grundgerüst verankert (Latge, 1999). β -1,3-Glucan kann ebenfalls als zirkulierendes Antigen im Serum nachgewiesen werden, allerdings in geringen Konzentrationen, da es im Gegensatz zu Galactomannan nicht von den Hyphen freigesetzt wird. Zudem ist dieses Polysaccharid nicht immunogen. Deshalb basiert die serologische Diagnostik einer invasiven Aspergillose bis heute im Wesentlichen auf einem Galactomannan-Nachweis, der als Sandwich-ELISA aus α -Galactomannan-Antikörpern aufgebaut ist (Stynen *et al.*, 1995). Wichtig ist dabei auch, dass Galactomannan nur in der Zellwand von filamentösen Pilzen wie *Aspergillus* und *Penicillium* zu finden ist, nicht jedoch bei den ebenfalls zum Teil pathogenen Hefen, wie z.B. *Candida* (Beauvais and Latge, 2001).

Auf der Suche nach Antikörpern zur Detektion von *A. fumigatus*-Hyphen fand Leonie Heesemann in ihrer Doktorarbeit zwei positiv reagierende Antikörper, L10 und L99, die beide zur IgM-Untergruppe gehören (Heesemann, 2010). Immunglobuline dieser Gruppe sind die

ersten, die nach einer Immunisierung auftreten. Während der humoralen Immunantwort ist durch einen Klassenswitch eine Umwandlung in ein Immunglobulin der Subklasse IgG möglich. In weiteren Schritten kann ein Wechsel in IgA und IgE erfolgen. Voraussetzung dafür ist jedoch die Ausschüttung von Cytokinen wie IL-4 und IL-5 durch T-Zellen. Deshalb ist ein Klassenswitch nur bei Präsenz der passenden T-Zell-Epitope möglich. Bei diesen Epitopen handelt es sich grundsätzlich um Peptide, was der Grund dafür ist, dass Antikörper der IgM-Subklasse, die keinen T-Zell-vermittelten Klassenswitch erfahren haben, sehr häufig Glycostrukturen erkennen, da diesen die eben erwähnten T-Zell-Epitope fehlen. Gegen die Tatsache, dass es sich bei den von L10 und L99 detektierten Epitopen um Proteinstrukturen handeln könnte, sprach zudem deren Proteaseresistenz. Weiterhin deutete eine Sensitivität gegenüber Perjodatbehandlungen auf Kohlenhydratepitope hin. Die Möglichkeit, die von den Antikörpern erkannten Epitope durch eine milde Säurebehandlung abzulösen, war ausschlaggebend für die Vermutung, dass es sich um Galactofuranosereste handeln könnte. Die milde Säure greift spezifisch derartige Reste an (Heesemann, 2010). Ein letztendlicher Beweis der Galactofuranose-Spezifität beider Antikörper konnte in dieser Arbeit durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung einer Δglf -Mutante erbracht werden. In dieser Mutante ist das Gen der UDP-Galactopyranose-Mutase deletiert. Aufgrund der zentralen Bedeutung dieses Gens für die Biosynthese von Galactofuranose ist in der Δglf -Mutante der Galactofuranose-Metabolismus komplett unterbunden (Schmalhorst *et al.*, 2008). Die beiden Antikörper L10 und L99 reagierten jeweils nur positiv mit Hyphen des Wildtyps, wohingegen sie Hyphen der Mutante nicht erkennen konnten. In den meisten Fällen war eine besonders starke Bindung an die Hyphenspitze zu verzeichnen. Dabei wurde außerdem festgestellt, dass die beiden Antikörper offensichtlich an unterschiedliche Epitope innerhalb der Galactofuranose binden. Während L10 unabhängig vom Wachstumsmedium immer eine gleichmäßige Bindung aufwies, die eine sehr intensive Fluoreszenz hervorrief, war das Färbemuster von L99 abhängig vom Wachstumsmedium teilweise unregelmäßig und die hervorgerufene Fluoreszenz zum Teil viel schwächer als bei L10. Unter Umständen wurde durch eine Kultivierung des Pilzes in DMEM das von L99 erkannte Epitop sehr stark und gleichmäßig auf der Oberfläche der Hyphen exponiert, wohingegen die Anzucht in YG-Medium nur zu einer sporadischen Exposition des Epitops führte. Aufgrund der negativen Reaktion mit Hyphen der Δglf -Mutante ist aber davon auszugehen, dass beide Epitope Galactofuranose-Reste als essentiellen Anteil enthalten. Eine Bindung zweier Antikörper an verschiedene Epitope innerhalb derselben Struktur könnte für den Aufbau eines Sandwich-ELISAs von Vorteil sein, da sich die beiden Antikörper nicht gegenseitig durch eine Konkurrenz um dasselbe Epitop blockieren können.

Galactofuranose an sich ist in zahlreichen Strukturen von *A. fumigatus* zu finden. Neben Galactomannan in der Zellwand enthalten auch O- und N-Glycan-Seitenketten sekretierter Proteine, sowie GPI-verankertes Lipophosphogalactomannan und verschiedene Sphingolipide Galactofuranose (Latge, 2009). Für weitere Untersuchungen der Oberfläche der Δglf -Mutante wurde der Antikörper AF-1 eingesetzt, der an ein Zellwand-Mannan bindet, wobei die genaue Struktur des Epitops unbekannt ist (Cassone *et al.*, 1988). Immunfluoreszenzfärbungen mit diesem Antikörper ergaben eine positive Reaktion mit Hyphen der Δglf -Mutante und gleichzeitig eine negative Reaktion mit Hyphen des Wildtyps. Dies ist als Indiz dafür zu sehen, dass der AF-1-Antikörper das β -1,2-verknüpfte Mannan-Grundgerüst in der Zellwand von *A. fumigatus* erkennt und dass dieses in der Mutante exponiert wird, während es im Wildtyp durch Galactofuranose maskiert ist. Inzwischen ist bekannt, dass der Mangel an Galactofuranoseresten in der Zellwand und die daraus folgende Exposition von Mannan eine Veränderung der Oberflächenstruktur auslöst. Wildtyp-Hyphen zeigen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine glatte Oberfläche aus amorphem Material, während die Hyphenoberfläche der Mutante durch ein gleichmäßig organisiertes Material gekennzeichnet ist. Diese extrazelluläre Matrix resultiert in einer verstärkten Bindung des Pilzes an verschiedene Oberflächen sowie Epithelzellen (Lamarre *et al.*, 2009). Dadurch erlangt Galactofuranose eine Bedeutung während der Interaktion mit Immunzellen, indem es das Mannan-Grundgerüst verdeckt und somit die Adhäsion an Epithelzellen reduziert. Zudem ist bekannt, dass Mannane in der Zellwand von *C. albicans* durch den Mannose-Rezeptor von Immunzellen erkannt werden, was letztendlich zur Ausschüttung des Granulozyten-rekrutierenden Cytokins IL-17 durch Makrophagen führt (van, V *et al.*, 2009; Netea *et al.*, 2006). Eine Erkennung von *A. fumigatus*-Mannan durch Mannose-Rezeptoren wurde bisher noch nicht beschrieben.

Die Bindung der α -Galactomannan-Antikörper an Wildtyp-Hyphen weist eine Exposition des Epitops auf der Hyphenoberfläche nach. Dabei ist jedoch zu bemerken, dass sich die Organisation der Zellwand im Zuge der Auskeimung und während des Hyphenwachstums verändert. Eine Untersuchung mit humanen dendritischen Zellen geht von einer Interaktion des C-Typ-Lectins DC-SIGN mit Galactomannan auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Konidien aus, was letztendlich deren Bindung und Internalisierung vermitteln soll (Serrano-Gomez *et al.*, 2004). Die tatsächliche Exposition von Galactomannan auf Sporen von *A. fumigatus* war allerdings noch nicht geklärt. Bereits vorhandene monoklonale α -Galactomannan-Antikörper zeigten eine Bindung an Keimlinge, jedoch konnten keine eindeutigen Aussagen im Bezug auf die Interaktion mit Konidien gemacht werden (Stynen *et al.*, 1995). Für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde gezeigt,

dass sie besonders gut an Keimlinge und Hyphen, und dabei vor allem an die Hyphenspitze binden. Sporen werden von den Antikörpern nicht erkannt. Dies steht im Gegensatz zu den von Stynen und Kollegen hergestellten Antikörpern, die teilweise eine Bindung an Konidien aufwiesen (Stynen *et al.*, 1995). Generell ist eine Exposition von Galactomannan auf der Oberfläche von ruhenden Konidien aufgrund der schützenden Hydrophobin-Hülle, die ruhende Sporen umgibt, eher unwahrscheinlich (Aimanianda *et al.*, 2009). Die Bindung der Antikörper an Konidien wäre zudem im Widerspruch zu Daten aus real-time-RT-PCR-Untersuchungen, die zeigten, dass die Expression der UDP-Galactopyranose-Mutase erst nach vierstündigem Wachstum der Pilze einsetzt und ihren Maximalwert nach acht Stunden erreicht (Lamarre *et al.*, 2009). Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden haben die Sporen ihre Hydrophobinhülle bereits verloren und sind angeschwollen, nach acht Stunden sind erste Keimlinge zu finden. Offensichtlich wird Galactomannan vor allem während der Neubildung der Zellwand gebildet und auf der Oberfläche exponiert, was zugleich der Grund für die häufig sehr starke Bindung der Antikörper an die Hyphenspitze ist, da neues Zellwandmaterial nur an dieser Stelle eingebaut wird. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass ein Rückgang der Expression der UDP-Galactopyranose-Mutase während des Wachstums der Hyphen (Lamarre *et al.*, 2009) offensichtlich keinen Einfluss auf die Exposition von Galactomannan auf der Oberfläche hatte, da Hyphen generell ein positives Signal der α -Galactomannan-Antikörper auslösten. Scheinbar wird Galactomannan, sobald es einmal gebildet wurde, für längere Zeit auf den Hyphen exponiert und erfährt keinen hohen Umsatz auf der Hyphenoberfläche. Diese Tatsache ist von Relevanz für die Eignung der Antikörper für diagnostische Zwecke, sowie für die Bedeutung von Galactomannan bei der Interaktion mit Immunzellen, da in beiden Fällen dessen Exposition auf der Oberfläche der Hyphen vorausgesetzt wird.

Der diagnostische Einsatz von L10 wird prinzipiell ermöglicht durch die Tatsache, dass die Zellwand von Hefen, unter denen ebenfalls pathogene Spezies zu finden sind, kein Galactomannan enthält (Beauvais and Latge, 2001). Weiterhin zeigen die beiden Antikörper L10 und L99 keine Kreuzreaktion mit Hefen wie z.B. *S. cerevisiae* und *C. albicans* (Heesemann, 2010). Somit stellen die beiden Antikörper eine Möglichkeit zur spezifischen Detektion von filamentösen Pilzen dar, unter denen *A. fumigatus* der bedeutendste Krankheitserreger ist. Durch den Einsatz von histologischen Schnitten aus der Lunge von Patienten mit invasiver Aspergillose konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es möglich ist, mit Hilfe des L10-Antikörpers *Aspergillus*-Myzel innerhalb von Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar zu machen. Somit stellen die Antikörper eine Möglichkeit zur histologischen Diagnose von *Aspergillus*-Infektionen nach Biopsien dar.

Durch eine Konfrontation von Peritonealmakrophagen mit Sporen der Δglf -Mutante und deren Kontrollstämmen und einen anschließenden Vergleich der produzierten Cytokine konnte gezeigt werden, dass der Mangel an Galactofuranose auf der Oberfläche der Hyphen zu keinem Unterschied in der Immunantwort der Makrophagen führt. Galactomannan wird also scheinbar nicht von diesen Zellen erkannt und stellt somit nach den bisherigen Ergebnissen trotz seiner Immunogenität kein PAMP in *A. fumigatus* dar (Schmalhorst *et al.*, 2008). Dasselbe scheint für das Mannan-Grundgerüst zuzutreffen. Da dessen Exposition auf den Hyphen der Mutante keinen Einfluss auf die Cytokin-Antwort der Makrophagen hatte, geben die in diesen *in vitro*-Versuchen gewonnenen Daten einen Hinweis darauf, dass Mannan in *A. fumigatus* im Gegensatz zu *C. albicans* nicht durch Rezeptoren von Immunzellen erkannt wird (Netea *et al.*, 2006). Generell ist die Reaktion des Immunsystems auf Galactomannan momentan sehr umstritten. Während für *Aspergillus*-Hyphen bisher keine Reaktion von Makrophagen auf den Mangel an Galactomannan verzeichnet werden konnte, waren Duncan und Kollegen in der Lage, ein Galactomannan aus der Speisemorchel *Morchella esculenta* zu isolieren, durch das in THP-Makrophagen eine Aktivierung des für die Immunantwort essentiellen Transkriptionsfaktors NF κ B ausgelöst wird. Die Möglichkeit einer therapeutischen Verwendung dieses Polysaccharids ist nicht ausgeschlossen (Duncan *et al.*, 2002). Weiterhin führte die unabhängige Generierung und Untersuchung einer *A. fumigatus*-Mutante mit einer Deletion des Gens der UDP-Galactopyranose-Mutase durch zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen zu kontroversen Ergebnissen im Bezug auf die Bedeutung von Galactomannan für die Virulenz von *A. fumigatus* (Schmalhorst *et al.*, 2008; Lamarre *et al.*, 2009). Beide Gruppen konnten eine Reduktion des Wachstums für die Δglf -Mutante zeigen, wobei dieses Defizit nur in einem Fall in einer Attenuierung der Virulenz resultierte (Schmalhorst *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung dafür stellt der unterschiedliche genetische Hintergrund der Parentalstämmen der Mutanten dar. Generell kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Daten gegen eine Bedeutung von Galactofuranose sowie des Mannan-Grundgerüsts für die Reaktionen des angeborenen Immunsystems sprechen. Es konnte keine Relevanz als PAMP von *A. fumigatus* nachgewiesen werden, und der geringe Effekt der Deletion der UDP-Galactopyranose auf Wachstum und Pathogenität des Pilzes (Schmalhorst *et al.*, 2008; Lamarre *et al.*, 2009) führt zu dem Schluss, dass Galactomannan vermutlich keine Zielstruktur für therapeutische Ansätze darstellt.

Bezüglich therapeutischer Ansätze bei Pilzinfektionen spielten Vakzine zur Stimulation der humoralen Immunität lange Zeit eine untergeordnete Rolle. Besonders für *A. fumigatus*-Infektionen war die Beteiligung der humoralen Immunität an der Abwehr des

Wirtes ungeklärt (Casadevall *et al.*, 2002). Neuere Ergebnisse belegen allerdings, dass Antikörper gegen Zellwand-Komponenten von *A. fumigatus* und *C. albicans* eine protektive Wirkung während Pilzinfektionen aufweisen können (Torosantucci *et al.*, 2005; Moragues *et al.*, 2003; Casadevall and Pirofski, 2007). Um die Möglichkeit eines generellen Einsatzes von protektiven Antikörpern bei Pilzinfektionen näher zu beleuchten, waren weitere Versuche mit Antikörpern gegen Bestandteile der pilzlichen Zellwand erforderlich. Da Galactomannan neben β -1,3-Glucan und Chitin eine der wichtigsten Komponenten der *Aspergillus*-Zellwand darstellt (Bernard and Latge, 2001), boten sich der L10- bzw. L99-Antikörper für derartige Versuche an. Für den Großteil der gezeigten Immunfluoreszenz-Färbungen mit den Antikörpern L10 und L99 wurde verdünnter Zellkultur-Überstand der Antikörperproduzierenden Hybridome verwendet. Dieser enthält jedoch neben dem von den Zellen abgegebenen Antikörper zahlreiche Fremdproteine, vor allem Albumin aus dem Zellkultur-Medium. Während der Immunfluoreszenz wirkten sich diese Proteine nicht störend aus, doch für weitere Untersuchungen, wie die oben beschriebene potentiell protektive Wirkung des Antikörpers während einer Infektion, wurde dieser in einer gereinigten Form, ohne kontaminierende Stoffe, benötigt. Während der deshalb erforderlichen Aufreinigung des Antikörpers bestand die Schwierigkeit im Wesentlichen im pentameren Aufbau eines Immunglobulins der Gruppe M. In diesem Fall befinden sich alle Fc-Rezeptoren in der Mitte des Moleküls. Aufgrund dessen sind diese nicht zugänglich, was eine einfache Aufreinigung über einen Fc-Rezeptor, wie es z.B. bei Immunglobulinen der Untergruppe G der Fall ist, unmöglich macht. Die Methode des hier verwendeten IgM-Purification-Kits beruhte auf der Bindung des Antikörpers an eine Agarose-Säule mit Hilfe von immobilisiertem Mannan-Binde-Protein. Durch SDS-PAGE und Western Blots konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung sehr effektiv verlief. Es konnten praktisch keine störenden Fremdproteine mehr detektiert werden. Für alle weiteren Untersuchungen wurde der gereinigte α -Galactomannan-Antikörper L10 verwendet.

Durch Untersuchungen mit dem Antikörper 2G8, der an β -1,3-Glucan innerhalb der pilzlichen Zellwand bindet, konnten Torosantucci und Kollegen einen inhibierenden Effekt auf das *in vitro*-Wachstum von *A. fumigatus* und *C. albicans* und eine protektive Wirkung des Antikörpers während einer Pilzinfektion nachweisen (Torosantucci *et al.*, 2005). In der Immunfluoreszenz zeigte dieser Antikörper eine in ihrem Muster mit der des L10-Antikörpers vergleichbare Bindung an *A. fumigatus*-Hyphen. Es konnte eine besonders starke Reaktion mit der Hyphenspitze, sowie mit den Septen, also neugebildetem Pilzmaterial, nachgewiesen werden (Torosantucci *et al.*, 2005). In Anlehnung an das von Torosantucci und Kollegen durchgeführte Experiment wurde deshalb ein potentiell inhibitorischer Effekt des L10-

Antikörpers untersucht. Die Wirkung des α -Galactomannan-Antikörpers unterschied sich jedoch deutlich von der des α - β -1,3-Glucan-Antikörpers. Denn die durch einen XTT-Test bestimmte Pilzmenge war bei Zugabe von L10 zum Wachstumsmedium größer als bei einer Inkubation ohne den Antikörper. Der wachstumsfördernde Effekt des Antikörpers konnte letztendlich durch einen Kontrollansatz mit derselben Menge Albumin als Proteinquelle auf eine Steigerung der Protein- und damit der Nährstoff-Konzentration im Medium zurückgeführt werden. Generell ist eine wachstumshemmende Wirkung eines Antikörpers durch Bindung an Hyphen ohne die Gegenwart zellulärer Faktoren der Immunabwehr des Wirtes mechanistisch schwer vorstellbar, besonders da bekannt ist, dass *A. fumigatus* sehr viele Proteasen sezerniert, die in der Lage sind, Proteine, wie z.B. die zugegebenen Antikörper, abzubauen, wie es der Fall ist für den L10-Antikörper. Bisher ist der Mechanismus der Inhibition noch nicht entschlüsselt, ebenso wie der Grund für die Protektion durch den Antikörper während einer Pilzinfektion. Ob die beobachtete Inhibition des *in vitro*-Wachstums des Pilzes durch den 2G8-Antikörper der Grund für dessen protektive Wirkung während einer Infektion ist, wurde bisher noch nicht geklärt.

Allerdings konnte für Antikörper, die Mannan-Strukturen auf der Oberfläche von *C. albicans* erkennen und protektiv während einer *C. albicans*-Infektion wirken, gezeigt werden, dass dieser Effekt in direktem Zusammenhang mit der Fixierung von Komponenten des Komplementsystems steht (Han *et al.*, 2001). Die Aktivierung des Komplementsystems resultiert in der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen sowie der Opsonierung und dem Abtöten von Pathogenen (Bohana-Kashtan *et al.*, 2004). Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Wege aktiviert werden. Dabei unterscheidet man den oft über Antikörper vermittelten klassischen Weg, den über Mannose-bindendes Lektin aktivierten Lektin-Weg und den spontanen und Antikörper-unabhängigen alternativen Weg (Bohana-Kashtan *et al.*, 2004). Das Produkt aller drei Wege ist eine Serin-Protease, die als C3-Konvertase bezeichnet wird und eine Spaltungskaskade auslöst, wodurch es zur Rekrutierung von Leukozyten, zur verstärkten Phagozytose und durch die Aktivierung terminaler Komplement-Komponenten zur Lyse verschiedenster Pathogene kommt. Es ist bekannt, dass *A. fumigatus* zur Aktivierung und Bindung von C3 führt (Kozel *et al.*, 1989), allerdings kann der terminale Komplementkomplex, der normalerweise für die Lyse der Zielzelle verantwortlich ist, Pilze nicht schädigen. Somit sind die Folgen der Komplementaktivierung bei Pilzen auf die verstärkte Rekrutierung von Phagozyten beschränkt. Am klassischen, Antikörper-vermittelten Weg sind neun Glykoproteine (C1-C9) beteiligt. Das erste Protein, der Komplementfaktor C1 ist ein Komplex aus dem sechsköpfigen Kollektin C1q und jeweils zwei Molekülen C1s und C1r. C1q besitzt Bindungsdomänen für Antigen-gebundene Antikörper

und durch die Bindung eines IgM- oder IgG-Antikörpers an den Komplex erfährt C1q eine Konformationsänderung, wodurch die Serin-Proteasen C1s und C1r aktiviert werden. Durch diesen Mechanismus werden die Startreaktionen des klassischen Weges ausgelöst. Aufgrund der IgM- und IgG-Bindungsstellen von C1q wurde untersucht, ob eine vorherige Oponierung von *A. fumigatus*-Hyphen mit dem IgM-Antikörper L10 eine verstärkte Komplementaktivierung auslöst. Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper, der gegen ein Epitop von C1q gerichtet ist, konnte diese Hypothese belegt werden, da ein positives Signal des Antikörpers mit *A. fumigatus*-Hyphen durch deren vorherige Inkubation mit L10 verstärkt wurde.

Somit konnte für den L10-Antikörper zwar keine inhibierende Wirkung auf das *in vitro*-Wachstum festgestellt werden, doch die verstärkte Komplement-Aktivierung und eine daraus vermutlich folgende Rekrutierung von Phagozyten könnten zu einem protektiven Effekt des Antikörpers während einer Infektion von Mäusen führen. Eine protektive Wirkung konnte von Torosantucci und Kollegen für den α - β -1,3-Glucan-Antikörper 2G8 während systemischer Pilzinfektionen gezeigt werden (Torosantucci *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde in einem systemischen Mausinfektionsmodell untersucht, ob eine vorherige Injektion des L10-Antikörpers dazu führt, dass die entsprechenden Mäuse vor einer Pilzinfektion geschützt sind. Dazu wurden angeschwollene Sporen verwendet, da diese, wie bereits erklärt, deutlich mehr Galactomannan auf ihrer Oberfläche exponieren als ruhende Sporen. Die Tatsache, dass kein protektiver Effekt des L10-Antikörpers verzeichnet werden konnte, lässt darauf schließen, dass die Verstärkung der Komplementaktivierung nicht ausreicht, um eine protektive Wirkung aufzubauen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu bedenken, dass der α - β -1,3-Glucan-Antikörper bereits in *in vitro*-Versuchen eine Inhibition des Pilzwachstums auslöste, wozu der α -Galactomannan-Antikörper nicht in der Lage ist.

Torosantucci und Kollegen konnten in weiteren Versuchen zeigen, dass auch die Bindung eines Antikörpers an β -1,3-Glucan nicht generell zur Inhibition des Pilzwachstums führt. Bei dem zunächst verwendeten, blockierend wirkenden 2G8-Antikörper handelte es sich um einen IgG2b-Antikörper. Ein weiterer α - β -1,3-Glucan-Antikörper hatte im Gegensatz zu diesem keine Folgen für das Wachstum des Pilzes. Wie der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte L10-Antikörper gehörte dieser zur IgM-Subklasse. Weiterhin zeigte sich, dass der IgM-Antikörper nicht nur zur Bindung von β -1,3-Glucan, sondern auch von β -1,4- und β -1,6-glycosidisch verknüpften Glucoseresten fähig ist (Torosantucci *et al.*, 2009). Unter Umständen hängt die blockierende Wirkung eines Immunglobulins für das Wachstum von *A. fumigatus*-Hyphen von verschiedenen Faktoren wie der jeweiligen Subklasse oder der exakten Struktur des erkannten Epitops ab. Der genaue Mechanismus der Wachstums-

Inhibition durch Antikörper-Bindung ist allerdings nicht annähernd geklärt und generell schwer vorstellbar, zumal diese *in vitro* ohne Beteiligung weiterer zellulärer und humoraler Faktoren beobachtet wurde. Weiterhin ist unbekannt, ob die protektive Wirkung des 2G8-Antikörpers während einer Pilzinfektion nur durch die Inhibition des Pilzwachstums ausgelöst wird, oder ob dieser Antikörper ebenfalls zur Fixierung von Komplement-Proteinen fähig ist. Für verschiedene protektiv wirkende Antikörper, die Mannan-Strukturen auf der Oberfläche von *C. albicans* erkennen, konnte gezeigt werden, dass alle zur Fixierung von Komplement-Proteinen fähig sind, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Nur die Antikörper, die eine Komplement-Aktivierung besonders effizient auslösten, wirkten sich während einer Infektion protektiv aus (Han *et al.*, 2001). Somit scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fähigkeit eines Antikörpers zur Komplement-Opsonierung und dem Aufbau einer schützenden Wirkung während einer Infektion zu geben. Möglicherweise ist die Verstärkung der Komplement-Aktivierung durch den L10-Antikörper zu schwach, um einen derartigen Effekt auszulösen.

4.3 Mannosylierte Sphingolipide und deren Rolle für die Stressresistenz und Virulenz von *A. fumigatus*

Sphingolipide bilden eine vielseitige Klasse von Membranlipiden, die einen beträchtlichen Teil der Lipidfraktion von Eukaryonten ausmachen können (Brennan and Losel, 1978). Sie sind essentiell für das Überleben von Pilzen, was durch deren Sensibilität gegenüber dem Sphingolipid-Synthase-Inhibitor Aureobasidin A bewiesen wird (Sugimoto *et al.*, 2004). Zudem stellen sie in Pilzen die Vorläufer-Form von Glycosphingolipiden dar, die in Säugern direkt aus Ceramid synthetisiert werden (Lisman *et al.*, 2004). Glycosphingolipide regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Adhäsion und sind an der Bildung von *lipid rafts* beteiligt. Diese Membranlipid-Mikrodomänen dienen als Plattform für eine effektive Signaltransduktion (Hakomori, 2004; Simons and Toomre, 2000). Aufgrund der verschiedenen Zuckerphosphatreste unterscheidet man drei Klassen von Sphingolipiden: Inositol-Phosphorylceramide (IPCs), Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramide (MIPCs) und Mannosyl-di-Inositol-Phosphorylceramide (M(IP)₂Cs) (Dickson and Lester, 1999b). Die Übertragung des ersten Mannose-Restes auf IPC wird dabei durch GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferasen katalysiert. Bisher sind nur 2 Enzyme dieser Familie charakterisiert: Die α -1,2-Mannosyltransferasen Mit1 in *C. albicans* und Sur1 in *S. cerevisiae* (Beeler *et al.*, 1997; Mille *et al.*, 2004). MIPC und daraus hervorgehende Glycosphingolipide scheinen in *C. albicans* wichtig für die Virulenz zu sein und spielen in *S.*

cerevisiae eine Rolle bei der Adaptation an Änderungen der Umweltbedingungen wie z.B. Calcium-Levels, oxidativen Stress und Einwirkung von Antimykotika. In *A. fumigatus* konnte ein Ortholog zu *MIT1* und *SUR1* gefunden werden, AFUA_6G04680. (Die Schreibweise der Gene *MIT1* und *SUR1* entspricht der gängigen Hefe-Nomenklatur, in der aktive Gene kursiv und in Großbuchstaben geschrieben werden). Dieses Gen wurde mit Hilfe einer Hygromycin-Kassette durch homologe Rekombination deletiert und die entstehende Mutante charakterisiert. Durch eine Analyse der Glycosphingolipide konnte gezeigt werden, dass die Mutante nicht fähig ist, MIPC aus IPC zu synthetisieren, was beweist, dass es sich tatsächlich um eine GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase handelt. Im Gegensatz zu der hier untersuchten Mutante ist die Fähigkeit der $\Delta sur1$ -Mutante aus *S. cerevisiae* zur Synthese von MIPC nicht komplett reduziert. Der Grund dafür ist, dass in der Hefe Sur1 oder, wie es alternativ auch genannt wird, Csg1 („*calcium-sensitive growth*“) nicht das einzige für diese Mannosylierung verantwortliche Enzym ist. Es konnte ein SUR1-homologes Gen gefunden werden: *CSH1* („*CSG1/SUR1-homolog*“) (Uemura *et al.*, 2003). Dieses Gen kodiert für eine zweite, unabhängige α -1,2-Mannosyltransferase, wobei die beiden Enzyme teilweise redundante Aktivitäten besitzen (Lisman *et al.*, 2004). In der Hefe wird die Mannosylierung von IPC nur in der $\Delta sur1\Delta csh1$ -Doppelmutante komplett unterdrückt (Uemura *et al.*, 2003). Die beiden Enzyme bilden jeweils unabhängig voneinander ein Heterodimer mit Csg2, wobei man davon ausgeht, dass Sur1 und Csh1 dabei die katalytische Untereinheit darstellen, während das Calcium-bindende Protein Csg2 eine regulatorische Funktion hat, indem es Einfluss auf Produktion, Stabilität und Transport der katalytischen Untereinheit nimmt (Uemura *et al.*, 2007a). In *A. fumigatus* konnten keine Homologen zu Csh1 und Csg2 gefunden werden, hier erfolgt also vermutlich keine Komplexbildung und die Mannosylierung von IPC wird nur durch das von AFUA_6G04680 kodierte Protein bewerkstelligt. Aufgrund seiner Funktion als GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase wurde das Protein von uns umbenannt. Mit der vorläufigen Benennung SurA, die im Zuge der Genomannotation erfolgte, wurde Bezug auf die *S. cerevisiae*-Nomenklatur genommen. In diesem Fall steht Sur als Abkürzung von „*suppressor of the phenotypes of rvs 161 and 167 mutants*“ (Desfarges *et al.*, 1993). Zwar konnten homologe Proteine zu Rvs 161 und 167 gefunden werden (Afu_5g05950 und Afu_3g14230), jedoch wurden bisher weder die Phänotypen der entsprechenden Deletionsmutanten noch ein unterdrückender Effekt derselben durch Afu_6g04680 beschrieben. Aus diesem Grund wurde Afu_6g04680 in Einklang mit der *C. albicans*-Nomenklatur GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase A, kurz MitA, genannt (Kotz *et al.*, 2010).

Sur1 und Mit1 sind Transmembran-Proteine, die in der Golgi-Membran lokalisiert sind. Beide enthalten mehrere Helices, die als potentielle Transmembran-Domänen das Protein in der Membran verankern können. Die drei helikalen Domänen von MitA wurden mit Hilfe der Programme TMHMM und SignalP analysiert. Basierend auf den daraus gewonnenen Daten wurde ein Modell für die Konformation von MitA vorgeschlagen, das dem von Uemura und Kollegen entwickelten Modell für die Konformation von Sur1 sehr ähnlich ist (Uemura *et al.*, 2007a). Dabei wird angenommen, dass Helix 1 als N-terminale Signalsequenz abgeschnitten wird, Helix 2 in die Membran inseriert, diese aber nicht durchspannt und Helix 3 als typische Transmembrandomäne das Protein in der Golgi-Membran verankert. Dadurch entstehen ein großer luminaler Bereich mit der N-terminalen Mannosyltransferase-Domäne und ein kurzer cytoplasmatischer C-Terminus. Die entsprechende Konformation für das *S. cerevisiae*-Protein wurde aufgrund der Analyse potentieller N-Glycosylierungsstellen vorausgesagt. Da die Glycosylierung von Aminosäureresten luminal stattfindet, konnte aufgrund der gegebenen Verteilung von glycosylierten Positionen nur die von Uemura und Kollegen beschriebene Konformation von Sur1 möglich sein (Uemura *et al.*, 2007a). Eine von einer anderen Arbeitsgruppe beschriebene Konformation des Enzyms mit zwei Membrandurchspannenden Helices und sowohl N- als auch C-Terminus im Lumen des Golgi-Apparates gilt als unwahrscheinlich (Lisman *et al.*, 2004), da bei dieser Untersuchung nicht alle Glycosylierungsstellen erkannt wurden und deshalb vermutlich eine fehlerhafte Annahme gemacht wurde.

Während der Phänotypisierung der $\Delta mitA$ -Mutante zeigte diese normales Wachstum auf Agar-Platten mit Minimal- und Komplex-Medien, sowohl bei 37°C, als auch bei 48°C. Es konnte also keine Temperatursensitivität festgestellt werden, was in Übereinstimmung mit den beiden entsprechenden Hefe-Mutanten ist. Auch die Reaktion gegenüber Zellwand-Stress-Faktoren wie Congo Rot und Calcofluor Weiß wurde nicht durch die Deletion von *mitA* beeinflusst. Im Gegensatz zur $\Delta sur1$ -Mutante in *S. cerevisiae* konnte keine Empfindlichkeit gegenüber Coffein festgestellt werden, im Gegensatz zur entsprechenden *C. albicans*-Mutante keine SDS-Sensitivität. Diese Resistenz der $\Delta mitA$ -Mutante gegenüber Zellwand-Stress-Faktoren ist im Einklang mit der Tatsache, dass die Deletion von *mitA* in *A. fumigatus* keinen Einfluss auf die Dicke der Zellwand hatte.

Jedoch wurde, in Übereinstimmung mit den beiden Hefe-Mutanten, ein inhibitorischer Effekt von erhöhten Calcium-Konzentrationen im Wachstumsmedium beobachtet. Für die *S. cerevisiae* und *C. albicans*-Mutanten wirken extrazelluläre Calcium-Konzentrationen von 10-25 mM wachstumshemmend. Bei der *A. fumigatus*-Mutante konnte bei diesen Konzentrationen allerdings kein Einfluss auf das Wachstum beobachtet werden. Jedoch war

bei einer Calcium-Konzentration von 350 mM ein inhibitorischer Effekt bemerkbar. Die *A. fumigatus*-Stämme sind offensichtlich sehr viel resistenter gegenüber extrazellulären Calcium-Konzentrationen als die entsprechenden Hefe-Mutanten. Interessanterweise beschränkt sich der inhibitorische Effekt von Calcium vor allem auf die Auskeimung. Ist die Hyphenbildung bereits erfolgt, wird die Mutante deutlich weniger in ihrem Wachstum gehemmt. Dies lässt vermuten, dass MitA vor allem während der Auskeimung benötigt wird, um der blockierenden Wirkung von hohen extrazellulären Calcium-Konzentrationen entgegen zu wirken. Der genaue Mechanismus der Inhibition ist jedoch nicht geklärt. Im Gegensatz zur $\Delta sur1$ -Mutante konnte die Inhibition des Wachstums durch Calcium bei der $\Delta mitA$ -Mutante nicht durch osmotische Stabilisation wieder aufgehoben werden (Beeler *et al.*, 1997). Da die Möglichkeit zur osmotischen Stabilisation einen Hinweis auf einen Zellwandeffekt darstellt, steht dies im Einklang mit der Tatsache, dass die $\Delta mitA$ -Mutante, im Gegensatz zur $\Delta sur1$ -Mutante, wie oben beschrieben, keine Defekte in der Zellwand-Integrität aufweist. Auch scheint die hohe Konzentration an extrazellulärem Calcium keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration zu haben. Durch diese können Signaltransduktionswege beeinflusst werden, wobei die Phosphatase Calcineurin, die durch die Bindung von Calcium und Calmodulin strukturell verändert und dadurch aktiviert wird, eine wichtige Rolle spielt. In *A. fumigatus* beeinflusst Calcineurin Wachstum, Morphologie und Pathogenität (Steinbach *et al.*, 2006). Die Relevanz der intrazellulären Calcium-Konzentration und der dadurch beeinflussten Signaltransduktion wurde durch den Einsatz des Calcineurin-Inhibitors FK506 untersucht. Da keine Unterschiede zwischen der $\Delta mitA$ -Mutante und den Kontrollstämmen in der Reaktion auf den Inhibitor beobachtet werden konnten, ist eine Rolle der durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration geregelten Signaltransduktion auszuschließen.

Für *S. cerevisiae* wird vermutet, dass durch die fehlende GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase-Aktivität der MIPC-Vorläufer IPC akkumuliert, insbesondere die IPC-C-Form (Beeler *et al.*, 1997). IPC ist aufgebaut aus Phytosphingosin und einer C-26-Fettsäure, die hydroxyliert sein kann. Man unterscheidet je nach Hydroxylierungsstatus fünf Formen von IPCs (A, B, B*, C, D) (Dickson and Lester, 1999b). Die Akkumulierung des einfach hydroxylierten IPC-C, und nicht der Mangel an MIPC, wird als Grund für die Calcium-Sensitivität der Mutante angesehen (Beeler *et al.*, 1997). IPC-C kann in *S. cerevisiae* durch Hydroxylierung in IPC-D umgewandelt werden, wofür die intrazelluläre Kupfer-Pumpe Ccc2 benötigt wird. Dabei ist unklar, ob die Pumpe die Hydroxylierung selbst katalysiert. Jedoch ist bekannt, dass eine Überexpression dieser Kupfer-Pumpe oder eine Erhöhung der Kupfer-Konzentration im Wachstums-Medium zu einer Kompensation des Wachstumsdefekts in der

Anwesenheit von Calcium führt, da dadurch mit Hilfe von Ccc2 das IPC-C-Level wieder gesenkt wird (Beeler *et al.*, 1997). In *A. fumigatus* ist ein Ccc2-Homolog konserviert (AFUA_4G12620) und eine Zugabe von Kupfer zu Calcium-reichem Medium verringerte den Unterschied im Wachstum zwischen der $\Delta mitA$ -Mutante und den Kontrollstämmen, während er durch die Verwendung des Kupfer-Chelators Bathocuproin-Disulfonsäure (BCS) verstärkt wurde. Deshalb ist davon auszugehen, dass auch in *A. fumigatus* die Calcium-Sensibilität durch eine Akkumulation von IPC-C in den Membranen hervorgerufen wird. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die Bindung der Calcium-Ionen an die Phosphat-Gruppen von IPC-C und eine daraus resultierende Veränderung der Lipid-Mikrodomänen dar (Uemura *et al.*, 2007a). Diese sind Ausgangspunkt für verschiedene Signaltransduktionswege, die auch Aktin-Polymerisation und zelluläres Wachstum regulieren. Möglicherweise führt eine Umgestaltung der Lipid-Mikrodomänen zu veränderten Signalen.

Dabei ist allerdings einzuwenden, dass in der Plasmamembran vor allem MIPC und $M(IP)_2C$ zu finden sind, während IPCs primär in der Golgi-Membran lokalisiert sind (Hechtberger *et al.*, 1994). Zudem konnte während der Charakterisierung der $\Delta mitA$ -Mutante durch eine Färbung mit Filipin, das an *lipid rafts* bindet, zumindest ohne die Anwesenheit von Calcium kein direkter Einfluss der Akkumulierung von IPC-C auf die Verteilung der Lipid-Mikrodomänen in der Plasmamembran detektiert werden.

Weiterhin deuteten Versuche mit verschiedenen Azolen wie Voriconazol und Posaconazol darauf hin, dass eine Deletion von *mitA* die Beschaffenheit der Plasmamembran nicht wesentlich änderte, da die Mutante keine erhöhte Sensibilität gegenüber diesen die Ergosterol-Biosynthese hemmenden Antimykotika aufwies.

Die Feststellung, dass der inhibierende Effekt von Calcium vor allem während der Auskeimung zum Tragen kommt, war die Veranlassung zu einer generellen Betrachtung der Germination der $\Delta mitA$ -Mutante. Eine detaillierte Betrachtung während der Kultur in Flüssigmedium unter Standard-Bedingungen zeigte, dass die Auskeimung der Mutante im Gegensatz zu den Kontrollstämmen verlangsamt war. Eine ähnliche Auskeimungsverzögerung kann durch den Einsatz von Inhibitoren der UDP-Glc:Ceramid-Glycosyltransferase und die daraus resultierende Blockade der Glycosylceramid-Biosynthese erzielt werden (Levery *et al.*, 2002). Dies lässt auf eine Rolle von MIPC und daraus hervorgehenden Glycosphingolipiden während der Auskeimung unter Normal-Bedingungen schließen. Wie Glycosphingolipide die Auskeimungs-Fähigkeit von Sporen beeinflussen, ist bisher ungeklärt.

Eine verlangsamte Auskeimung der Mutante konnte auch in Infektions-Experimenten mit J774-Makrophagen festgestellt werden. Obwohl der Effekt auf ein Zeitfenster zwischen

sieben und zwölf Stunden nach Infektionsbeginn begrenzt war, bestand die Möglichkeit, dass dies eventuell Auswirkungen auf die frühe Immunantwort während einer Infektion haben könnte. Deshalb wurde zunächst die inflammatorische Antwort analysiert, die durch eine Infektion des Peritoneums von Mäusen mit Sporen der $\Delta mitA$ -Mutante und den Kontrollstämmen ausgelöst wird. Es konnte ein massiver Influx von Granulozyten bei allen infizierten Mäusen detektiert werden, unabhängig von dem jeweils verwendeten *A. fumigatus*-Stamm. Die Fähigkeit zur Produktion von Chemokinen zur Rekrutierung von Granulozyten scheint also in der $\Delta mitA$ -Mutante nicht eingeschränkt zu sein. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen aus *in vitro*-Infektionen von murinen Peritonealmakrophagen mit den drei Stämmen. Dabei konnten keine Unterschiede in der Immunantwort im Bezug auf die Produktion von TNF α , IL-6 und IL-10 gemessen werden. Allerdings zeigten humane dendritische Zellen einen signifikanten Unterschied in der TNF α - und einen hoch signifikanten Unterschied in der IL-10-Produktion als Reaktion auf die $\Delta mitA$ -Mutante bzw. die komplementierte Mutante als Kontrollstamm, wobei die Cytokin-Antwort auf die Mutante jeweils stark reduziert war. Die Charakterisierung der *C. albicans* $\Delta mit1$ -Mutante führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. In *C. albicans* scheint das aus MIPC entstehende Glycolipid Phospholipomannan ein wichtiges PAMP zu sein, das durch den Muster-Erkennungs-Rezeptor TLR2 erkannt wird (Jouault *et al.*, 2003; Mille *et al.*, 2004). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Rolle von MIPC und daraus hervorgehenden Glycosphingolipiden als PAMPs in *A. fumigatus* noch nicht endgültig geklärt ist. Die gewonnenen Daten unterstreichen zudem, wie sehr immunologische *in vitro*-Daten durch den verwendeten Zelltyp beeinflusst werden (Park and Mehrad, 2009). Ob die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der Cytokinantwort auf *A. fumigatus* durch MIPCs darin liegt, dass zunächst Makrophagen, im zweiten Experiment aber dendritische Zellen verwendet wurden, oder ob dies durch den murinen bzw. humanen Ursprung der Zellen zu erklären ist, muss noch näher untersucht werden. Die Deletion von *MIT1* in *C. albicans* führt außerdem zu einer Attenuierung der Virulenz, eine Beobachtung, die für die $\Delta mitA$ -Mutante nicht gemacht werden konnte. Während einer systemischen Infektion von immunkompetenten Mäusen konnte kein Unterschied in der Virulenz zwischen der Mutante und den Kontrollstämmen gemessen werden. Dieses Infektionsmodell entspricht dem, das für die Charakterisierung der *C. albicans* $\Delta mit1$ -Mutante eingesetzt wurde (Netea *et al.*, 2006). Die mangelnde Attenuierung der $\Delta mitA$ -Mutante im systemischen Infektionsmodell ist in Übereinstimmung mit vorläufigen Daten, die durch eine intranasale Infektion von Cortison-behandelten Mäusen gewonnen wurden (Ilse Jacobsen, persönliche Mitteilung).

Bozza und Kollegen diskutierten in einer kürzlich erschienen Publikation die Bedeutung einer Glycosphingolipid-Fraktion aus *A. fumigatus*, in der β -Galf-(1,2)- α -Man-(1,3)- α -Man-(1,2)-Ins-(1,0)-P-Cer angereichert ist, als starken Stimulus für die Immunantwort von T_H17-Zellen (Bozza *et al.*, 2009). Durch die Deletion von *mitA* wird die Synthese von MIPC unterbunden, das ein essentieller Vorläufer von β -Galf-(1,2)- α -Man-(1,3)- α -Man-(1,2)-Ins-(1,0)-P-Cer ist. Somit kann durch die Δ *mitA*-Mutante die Relevanz dieses und verwandter Glycosphingolipide, die aus MIPC entstehen, näher bestimmt werden. Die hier gezeigten Daten lassen größtenteils darauf schließen, dass diese Glycosphingolipide in ihrer natürlichen Einbettung von geringer Bedeutung für die murine Immunantwort während einer *A. fumigatus*-Infektion sind. Die Cytokin-Ausschüttung von murinen Peritoneal-Makrophagen, die Rekrutierung von Granulozyten ins Peritoneum infizierter Mäuse sowie die Virulenz während einer systemischen und intranasalen *A. fumigatus*-Infektion im Mausmodell wurden nicht durch den Mangel an mannosylierten Sphingolipiden beeinflusst. Allerdings zeigt die reduzierte Cytokin-Ausschüttung durch humane dendritische Zellen als Antwort auf die Δ *mitA*-Mutante, dass die Bedeutung von MIPCs und daraus hervorgehenden Glycosphingolipiden noch nicht endgültig geklärt ist, und dass diese Glycostrukturen möglicherweise doch eine Rolle bei der Erkennung des Pilzes spielen, abhängig von dem für die Untersuchungen verwendeten Zelltyp und der Spezies, aus der die Zellen isoliert wurden.

4.4 Proteinglycosylierung und deren Rolle für die Stressresistenz und

Virulenz von *A. fumigatus*

Neben der Bildung von verschiedenen Glykokonjugaten wie die eben beschriebenen MIPCs sind Mannosyltransferasen essentiell für die Proteinglycosylierung in filamentösen Pilzen und Hefen, sowohl durch Anhängen von O- als auch N-verknüpften Mannanstrukturen. Im Gegensatz zu Säugerzellen, in denen die Modifikation von Proteinen durch komplexe Glycane aus verschiedenen Zuckern wie Galactose, N-Acetylglucosamin, Mannose, Fucose und N-Acetylneuraminsäure erfolgt, werden Proteine in Pilzen mannosyliert (Deshpande *et al.*, 2008; Lommel and Strahl, 2009; Munro, 2001). Dieser wesentliche Unterschied wird vom humanen Immunsystem genutzt, um pilzliche Pathogene zu erkennen und kann zugleich als Angriffspunkt antifungaler Therapien dienen (Netea *et al.*, 2006). Dennoch ist die Proteinglycosylierung, vor allem in filamentösen Pilzen, bisher noch nicht gut untersucht und generell liegen wenige Daten über die Mannansynthese in filamentösen Pilzen vor.

Die bisher am besten untersuchten Enzyme sind α -1,2-Mannosyltransferasen, die in die O-Mannosylierung von Proteinen involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass einige der für die Initiation der Mannan-Seitenkette verantwortlichen Protein-O-Mannosyltransferasen (Pmts) essentiell für das Überleben von *Aspergillus* sind (Goto *et al.*, 2009; Mouyna *et al.*, 2010). Mnt1 ist eine α -1,2-Mannosyltransferase, die für die Elongation der Mannankette während der O-Mannosylierung verantwortlich ist. Eine Deletion des kodierenden Gens resultiert in einer dünneren Zellwand und einer erhöhten Sensitivität gegenüber den Zellwand-Stressfaktoren Calcofluor Weiß und Congo Rot sowie verschiedenen Azol-Antimykotika. Weiterhin führt die dünnere Zellwand zu einer Temperatur-Sensitivität, sodass die $\Delta mnt1$ -Mutante ohne osmotische Stabilisation bei einer Temperatur von 48°C nicht wachstumsfähig ist, da die Hyphen an der Spitze und den Septen aufplatzen. Die Protein-O-Glycosylierung hat somit eine wesentliche Bedeutung für die Stabilität der Zellwand. Weiterhin weist die $\Delta mnt1$ -Mutante eine attenuierte Virulenz im Mausmodell auf. In dieser Arbeit wurde die Relevanz von Mnt1 für die Immunantwort durch Analyse der Cytokin-Ausschüttung durch Makrophagen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese nicht durch die Deletion von *mnt1* beeinflusst wird. Somit scheinen O-Glycane in *A. fumigatus* zwar kein PAMP darzustellen, jedoch resultiert die verringerte Robustheit der Zellwand in einer Reduktion der Virulenz (Wagener *et al.*, 2008).

Die N-Glycosylierung betreffend wurden zahlreiche Untersuchungen in Hefen gemacht, jedoch ist die Datenlage in filamentösen Pilzen sehr begrenzt. Die Gene, die in die N-Glycan-Synthese involviert sind, sind in Hefen bereits identifiziert und gut charakterisiert und sie scheinen in filamentösen Pilzen konserviert zu sein (Deshpande *et al.*, 2008). Es ist bekannt, dass die Synthese der stark verzweigten äußeren Mannan-Seitenketten (*outer chains*) in Hefen durch das Protein Och1 initiiert wird (Abb. 72) (Munro, 2001). In filamentösen Pilzen fehlten bisher allerdings Hinweise, die auf eine Existenz der *outer chains* hindeuteten (Maras *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung des orthologen *A. fumigatus*-Proteins stellt die erste detaillierte Untersuchung einer α -1,6-Mannosyltransferase in filamentösen Pilzen dar und gibt zudem wichtige Aufschlüsse über die Bedeutung von N-Glycanen für die Stressresistenz und Virulenz von *A. fumigatus*. Von den vier zur Och-Familie gehörenden Proteinen in *A. fumigatus* wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem AfOch1 und teilweise AfOch4 charakterisiert.

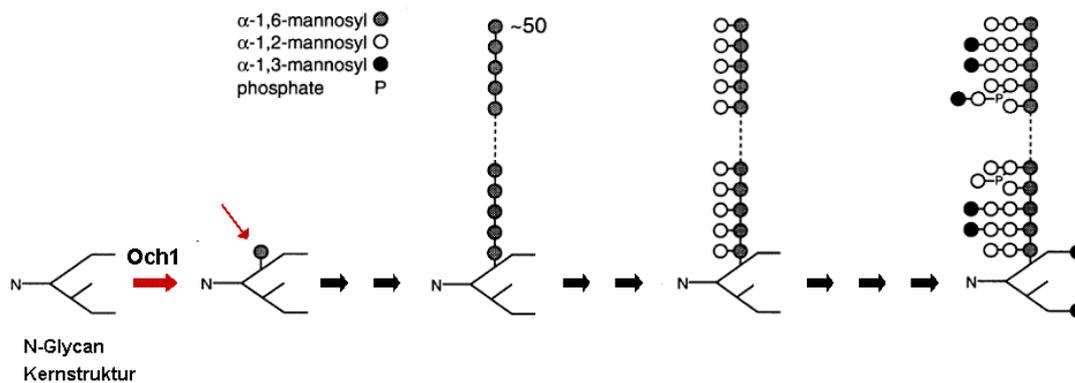


Abb. 72 Initiation der Synthese der *outer chains* durch Och1 in *S. cerevisiae*

Das Protein Och 1 vermittelt in *S. cerevisiae* die Bindung eines Mannose-Restes an die Kernstruktur des N-Glycans über eine α -1,6-glycosidische Bindung. Dadurch wird die Ausbildung der stark verzweigten polymannosylierten Seitenketten der N-Glycane von *S. cerevisiae*-Proteinen initiiert (modifiziert nach Munro, 2001)

Die Deletion von *afoch1* zog keine augenscheinlichen Konsequenzen für das Wachstum des Pilzes unter Standard- oder verschiedenen Stressbedingungen, wie z.B. Zellwand-, oxidativer, osmotischer oder Hitzestress, nach sich. Untersuchungen, die zeitgleich von einer weiteren Arbeitsgruppe gemacht wurden, lieferten ebenfalls keinen Phänotyp für diese Mutante, obwohl durch RT-PCR-Analyse die Transkription des Gens während des Hyphenwachstums und auch in ruhenden Sporen nachgewiesen wurde (Lambou *et al.*, 2010b). Auch in der hier vorliegenden Studie konnte die Transkription von *afoch1* durch PCR-Amplifikation von cDNA belegt werden. Die Sequenzierung des PCR-Produkts enthüllte einen Fehler in der Annotierung von *afoch1* in der Genomsequenz.

Auf der Suche nach einem Phänotyp der Δ *afoch1*-Mutante wurden unterschiedlichste Wachstumsbedingungen getestet. Schließlich gelang es, eine Bedeutung des entsprechenden Proteins für die Sporulation bei hohen extrazellulären Calcium-Konzentrationen nachzuweisen. Der entsprechende Phänotyp äußerte sich während des Wachstums auf Calcium-haltigen Agarplatten meist als breiter, weißer Randbereich der Kolonien. Da die Anfärbung der Kolonien durch die Bildung von Konidien erfolgt, deutete dies auf eine deutlich verzögerte Sporulation hin. Unter bestimmten Umständen erstreckte sich dieser Sporulationsdefekt über die ganze Kolonie. Eine detaillierte mikroskopische Betrachtung zeigte eine starke Reduktion der Anzahl der Konidiophoren in diesem Bereich. Interessanterweise hingen die Ausprägung des Phänotyps und die dazu nötige Calciumkonzentration vom Wachstumsmedium ab. So wurde die Ausbildung von

Konidiophoren in Sabouraud-Medium bereits bei einer Konzentration von 100 mM Calcium komplett unterdrückt, während bei der Kultivierung auf YG-Agarplatten immer ein zentraler Bereich mit normaler Sporulation detektierbar war und zur Auslösung des Phänotyps eine Calcium-Konzentration von 350 mM nötig war. Auf AMM-Agar hingegen konnte der Sporulationsdefekt nicht beobachtet werden, was eine Relevanz der komplexen Komponenten in Sabouraud- und YG-Medium vermuten lässt. Sabouraud-Medium besteht aus Glucose, Pepton und Casein und weist einen pH-Wert von 5,6 auf. Es konnte eine Abhängigkeit des Sporulationsdefekts von der erhöhten Calcium-Konzentration, einer bislang noch unbekannt Komponente von Casein und dem niedrigem pH-Wert in Sabouraud-Medium nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass jede Komponente *per se* den Phänotyp nicht verursachen kann und Calcium nicht durch Magnesium ersetzt werden konnte, wodurch ein unspezifischer Einfluss eines beliebigen zweiwertigen Ions ausgeschlossen werden kann. Der Versuch, die $\Delta afoch1$ -Mutante mit AfOch4, einer homologen α -1,6-Mannosyltransferase zu komplementieren, scheiterte. Zudem zeigte die $\Delta afoch4$ -Mutante keine Sensitivität gegenüber Calcium. Dies lässt auf teilweise unterschiedliche Funktionen der beiden Proteine schließen. In der Hefe *Kluyveromyces lactis* wurde ein Zusammenhang zwischen Och1 und Calcium-/Calmodulin-vermittelter Signaltransduktion gefunden (Zanni *et al.*, 2009). Dabei konnte eine Bedeutung von Och1 für eine korrekte Mitochondrien-Morphologie und -Funktion festgestellt werden. Zudem scheint Och1 wichtig zu sein für die Reaktion von *K. lactis* auf oxidativen Stress, der durch H₂O₂ verursacht wird. Dies stellt einen Unterschied zwischen *K. lactis* und *A. fumigatus* dar, da in letzterem die Deletion von *afoch1* keine Folge für die Sensitivität gegenüber H₂O₂ hat. Weiterhin ist davon auszugehen, dass der Einfluss von AfOch1 auf die Mitochondrien-Morphologie und -Funktion nicht gravierend sein kann, da sich in *A. fumigatus* als aerobem Organismus eine fehlerhafte Mitochondrien-Funktion in reduziertem Wachstum widerspiegeln müsste, was im Gegensatz zur $\Delta och1$ -Mutante von *K. lactis* nicht der Fall ist. Somit sind zwar einige Unterschiede zwischen *K. lactis* und *A. fumigatus* bezüglich der Auswirkungen der Deletion von *och1* festzuhalten, dennoch scheint es in beiden Organismen einen Zusammenhang zwischen Och1 und der Calcium-Homöostase zu geben.

Obwohl in filamentösen Pilzen alle Gene für die N-Glycosylierung konserviert sind, konnte bisher kein überzeugender experimenteller Beweis für die Existenz von komplexen, polymannoslierten N-Glycanen erbracht werden. Die wenigen publizierten N-Glycan-Strukturen lassen zumindest nicht auf das Vorhandensein von komplexen äußeren Ketten schließen (Takayanagi *et al.*, 1994; Wallis *et al.*, 2001; Morelle *et al.*, 2005). Während der Charakterisierung von AfOch1 konnte erstmalig gezeigt werden, dass in *A. fumigatus* unter

bestimmten Umständen polymannosylierte N-Glycane gebildet werden. Dies ist der Fall für den Wildtyp-Stamm, nicht aber für die $\Delta afoch1$ -Mutante, was beweist, dass AfOch1 essentiell für die Bildung dieser Strukturen ist. Im Wildtyp waren *outer chains* nur nach der Kultivierung in Sabouraud-Medium, nicht jedoch in AMM detektierbar, in der komplementierten Mutante dagegen, in der *afoch1* durch den konstitutiven und sehr starken *gpdA*-Promotor kontrolliert wird, waren unabhängig vom jeweiligen Kulturmedium N-Glycane mit komplexen äußeren Seitenketten vorhanden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bildung polymannosylierter N-Glycane von der Anwesenheit von *afoch1* abhängt und dass zudem die Expression von *afoch1* von seinem natürlichen Promotor aus sehr stark durch das jeweilige Wachstumsmedium beeinflusst wird.

Die Relevanz der Enzymaktivität für die Sporulation in Gegenwart von Calcium wurde durch eine Mutation des für die Mannosyltransferase-Aktivität essentiellen DXD-Motivs und eine anschließende Komplementation der $\Delta afoch1$ -Mutante untersucht. Dazu wurde durch Mutation die erste Asparaginsäure dieses Motivs gegen Alanin ausgetauscht. Für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass eine derartige Mutation die Faltung von Mannosyltransferasen nicht beeinflusst und somit keine Degradation des Proteins auslöst (Wiggins and Munro, 1998). Es ist jedoch möglich, dass die Faltung eines kleinen Bereiches rund um das katalytische Zentrum beeinflusst und dadurch die für die Mannosyltransferase-Aktivität nötige Bindung von Mangan-Ionen verhindert wird, wodurch das Enzym nicht mehr funktionsfähig ist (Wiggins and Munro, 1998). Durch den Einsatz des mutierten AfOch1-Proteins konnte keine Relevanz der Mannosyltransferase-Aktivität für die Sporulation in Gegenwart von Calcium nachgewiesen werden. Dennoch ist zu bemerken, dass der beschriebene Sporulations-Defekt nur bei hohen Calcium-Konzentrationen in Sabouraud- und YG-Medium, nicht aber in AMM auszulösen ist, also unter den Bedingungen, unter denen auch komplexe polymannosylierte N-Glycane detektierbar sind. AfOch1, aber nicht seine Mannosyltransferase-Aktivität scheint für die Sporulation in Gegenwart hoher Calcium-Konzentrationen wichtig zu sein. Offensichtlich wirkt sich Calcium in bestimmten, komplexen Medien inhibierend auf die Sporulation von *A. fumigatus* aus. Die Fähigkeit zu normaler Sporulation bei hohen Calcium-Konzentrationen ist dann nur in Anwesenheit von *afoch1* gegeben. Eventuell bildet AfOch1 einen Komplex mit anderen Proteinen und ist in dieser Konstellation wichtig für die Sporenbildung in Komplexmedien bei hohen Calciumkonzentrationen. Jedoch besteht die Relevanz von AfOch1 dabei nicht in seiner Funktion als Mannosyltransferase, sondern möglicherweise darin, die richtige Ausbildung des Komplexes zu gewährleisten.

In *C. albicans* führt eine Deletion von *och1* zu attenuierter Virulenz und einer reduzierten Cytokin-Antwort durch murine Makrophagen (Netea *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung der Cytokin-Antwort während einer *in vitro*-Infektion von Peritonealmakrophagen mit Sporen der $\Delta afoch1$ -Mutante und ihren Kontrollstämmen konnte jedoch kein Unterschied zwischen den jeweiligen Stämmen festgestellt werden. Im Gegensatz zu CaOch1 ist AfOch1 somit nicht verantwortlich für die Synthese von Strukturen, die für die Erkennung des Pilzes durch Immunzellen von Bedeutung sind. Dieser Unterschied ist vermutlich begründet im verschiedenartigen Aufbau der Zellwände von Hefen und filamentösen Pilzen. Die Hefeoberfläche ist gekennzeichnet durch eine dicke Schicht von mannosylierten Proteinen. Das Fehlen dieser Schicht in der $\Delta caoch1$ -Mutante ist der Grund für die reduzierte Cytokin-Antwort (Netea *et al.*, 2006). Offensichtlich wird die Mannoprotein-Schicht von *C. albicans* durch Immunzellen erkannt. In *A. fumigatus* ist diese Schicht generell nicht vorhanden, mannosylierte Proteine sind hier nur vereinzelt innerhalb der Zellwand zu finden (Latge *et al.*, 2005), weshalb eine Deletion von *afoch1* in diesem Fall keine derartig ausgeprägten Folgen hat. Bei einer Analyse der Virulenz der $\Delta afoch1$ -Mutante konnte keine Attenuierung festgestellt werden. Überraschenderweise führte eine Infektion mit Sporen der Mutante in einem systemischen Infektionsmodell sogar zu einem rascheren Absterben der Mäuse. Diese Daten werden gestützt durch Ergebnisse aus einem intranasalen Infektionsmodell mit immungeschwächten Mäusen. Der Grund für eine erhöhte Virulenz der Mutante und ob die beobachtete leichte Steigerung der Virulenz tatsächlich von Bedeutung ist, bleibt noch zu klären. Zumindest legen die Daten nahe, dass *afoch1* während einer Infektion exprimiert wird, wovon nicht automatisch auszugehen war, da die Expression dieses Gens offensichtlich stark von den Wachstumsbedingungen abhängt.

Für das AfOch1-Protein wird eine Signalsequenz zur Sekretion des Proteins, die vermutlich während des Transports über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums abgeschnitten wird, vorhergesagt. Dies war unerwartet, da ScOch1 durch eine N-terminale Transmembrandomäne im Golgi verankert ist. Dies war der Anlass für eine nähere Analyse der Sequenzen weiterer Proteine dieser Familie. Bemerkenswerterweise besitzen die Och1-Proteine der filamentösen Pilze *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *N. crassa* und *M. grisea* eine Signalsequenz, während die entsprechenden Proteine der Hefen *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. angusta*, *P. pastoris* und *C. albicans* N-terminale Ankersequenzen aufweisen. Eine Besonderheit stellt die Hefe *Ashbia gossypii* dar, die in Hyphenfilamenten wächst, phylogenetisch jedoch eng mit *S. cerevisiae* verwandt ist und deshalb auch als „filamentöse Hefe“ bezeichnet wird (Wendland and Walther, 2005). Auch die Och1-Proteine dieser beiden Hefen zeigen große Homologien, allerdings weist AgOch1 eine Signalsequenz, ScOch1

hingegen eine N-terminale Ankersequenz auf. Hier deutete sich eine Assoziation einer Signalsequenz im Och1 mit einem filamentösen Wachstum an. Nun gibt es neben Pilzen, die obligat als Hyphe oder Hefen wachsen, auch solche, die zwischen beiden Formen variieren können, wie z.B. die beiden Hefen *C. albicans* und *H. capsulatum*. Dabei findet man *C. albicans* unter Standard-Bedingungen in der Hefeform vor, während einer Infektion ist allerdings Wachstum in Form von Hyphen zu beobachten. *H. capsulatum* wächst in der Umwelt in filamentösen Hyphen und geht bei 37°C in eine pathogene Hefeform über. Entsprechend weist das Och1-Protein von *C. albicans* einen Transmembrananker auf, jenes von *H. capsulatum* dagegen eine Signalsequenz. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz mit dem Wachstum in Hyphenfilamenten unter Standard-Bedingungen zusammenhängt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu bemerken, dass die komplexen N-Glycane mit polymannosylierten äußeren Seitenketten aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* bisher nur aus Hefeformen isoliert wurden. Ob diese Strukturen auch in der pathogenen Hyphenform von *C. albicans* zu beobachten sind, ist bisher noch nicht geklärt.

Nachdem die N-terminale Signalsequenz abgeschnitten ist, wird AfOch1 in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums freigesetzt und kann dann theoretisch zur Sekretion an die Oberfläche der Zelle wandern. Allerdings ist AfOch1, wie oben beschrieben, eine funktionelle α -1,6-Mannosyltransferase, die unter bestimmten Umständen die Ausbildung von polymannosylierten Seitenketten initiiert. Enzyme, die für die N-Glycan-Synthese benötigt werden befinden sich normalerweise an ihrem Wirkungsort, dem Golgi-Apparat. Eine Sekretion des Proteins würde also dessen Funktion widersprechen. Um als Mannosyltransferase während der N-Glycan-Synthese zu agieren sollte es in der Golgi-Membran verankert sein oder mit luminalen Proteinen interagieren (Helenius and Aebi, 2001). Mit Hilfe eines RFP-AfOch1-Fusionsproteins konnte eine Lokalisation des Proteins in intrazellulären Kompartimenten nachgewiesen werden, bei denen es sich aufgrund ihrer Brefeldin A-Sensitivität höchstwahrscheinlich um Abschnitte des *Aspergillus*-Golgi-Apparates handelt. Die korrekte Lokalisation und Funktion des Fusionsproteins wurde durch dessen Fähigkeit, den Sporulationsdefekt der Mutante zu komplementieren unter Beweis gestellt. Der Verbleib von AfOch1 im Golgi-Apparat wird vermutlich durch die Interaktion mit weiteren Proteinen bewerkstelligt. Auch in *S. cerevisiae* sind Transportmechanismen für ScOch1 beschrieben. Dieses Membran-verankerte Protein wandert zu distalen Kompartimenten im Golgi-Apparat und wird schließlich durch retrograden Transport wieder zur Ausgangsposition, dem *cis*-Golgi, zurückgebracht (Harris and Waters, 1996). Vergleichbare Mechanismen sind denkbar, um die Lokalisation von AfOch1 im Golgi-Apparat trotz der

Signalsequenz zu sichern. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass ein mutiertes AfOch1*-Protein, das laut Vorhersage statt der Signalsequenz einen N-terminalen Membran-Anker besitzt, ebenfalls in der Lage ist, den Sporulationsdefekt zu komplementieren. Offensichtlich ändert sich die Lokalisation des Proteins durch den Membran-Anker nicht wesentlich. Unter Umständen sind die Mechanismen, durch die verursacht wird, dass Golgi-Proteine in diesem Organell verbleiben, teilweise redundant. Dies ist ebenfalls zutreffend für die α -1,3-Mannosyltransferase ScMnn1, die auch noch nach einem Austausch der Transmembrandomäne gegen eine Signalsequenz im Golgi-Apparat zu finden ist (Graham and Krasnov, 1995). Bei einem Sequenzvergleich fiel eine stark konservierte Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich von AfOch1 auf. Ob diese für die Interaktion mit weiteren Golgi-Proteinen verantwortlich ist und somit letztendlich die Lokalisation gewährleistet, bleibt noch zu klären.

4.5 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden *A. fumigatus*-Mutanten in zentralen Genen der Glykokonjugat-Biosynthese hergestellt und charakterisiert. Dabei wurden die Bedeutung von Mannosyl-Inositolphosphoryl-Ceramid und daraus hervorgehenden Glycolipiden sowie die von polymannosylierten N-Glycanen für das Wachstum und die Pathogenität des humanpathogenen Schimmelpilzes *A. fumigatus* untersucht. Es zeigte sich, dass beide Mutanten im Gegensatz zu ihren Hefe-Pendants einen moderaten Phänotyp aufweisen, der jedoch jeweils durch eine interessante Reaktion auf erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentrationen gekennzeichnet ist. Biochemische Untersuchungen erbrachten den Beweis für die Funktionen der Proteine als Mannosyltransferasen und deren Bedeutung während der Mannosylierung von Sphingolipiden bzw. N-glycosylierten Proteinen. Immunologische Tests ergaben, dass die entsprechenden Glykokonjugate keine Bedeutung für die Erkennung und die Virulenz des Pilzes im murinen System haben, allerdings erbrachten neuere Untersuchungen mit humanen Zellen Hinweise auf eine Relevanz mannosylierter Sphingolipide für die Interaktionen des Pilzes mit dem angeborenen Immunsystem. Dies zeigt, dass die Herstellung von Mutanten in Genen, die die Synthese von Zellwand-Glykokonjugaten betreffen, einen interessanten Pfad darstellt, der dringend weiterverfolgt werden sollte. Durch die Komplexität der pilzlichen Zellwand birgt dieses Feld sicherlich noch weitere interessante Erkenntnisse bezüglich der Erkennung von *A. fumigatus* durch Zellen des angeborenen Immunsystems sowie der Virulenz dieses Schimmelpilzes. Derartige Untersuchungen stattdessen mit gereinigten Zellwand-Komponenten durchzuführen stellt

zudem keine geeignete Option dar, da die dafür nötigen Aufreinigungen sehr aufwendig und selten ohne Kontaminationen mit beispielsweise pilzlichen, oder auch bakteriellen Substanzen durchzuführen sind, die bereits in geringen Konzentrationen zu starken Effekten führen können.

5 Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein humanpathogener Pilz, der als Verursacher der invasiven Aspergillose, einer lebensbedrohlichen Krankheit bei immunsupprimierten Patienten, als das derzeit bedeutendste Luft-übertragene Pilz-Pathogen gilt. Das infektiöse Agens einer *A. fumigatus*-Infektion stellen die Sporen des Pilzes dar, die aufgrund ihrer geringen Größe bis in die Alveolen vordringen können, wo sie in erster Linie von Zellen der angeborenen Immunität bekämpft werden. Die Mechanismen dieser Interaktionen sind bis heute weitestgehend unbekannt. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass Glycostrukturen eine wichtige Rolle bei der Erkennung des Pilzes spielen, was als Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu sehen ist. Für die Charakterisierung der hergestellten *A. fumigatus*-Mutanten in zentralen Genen der Glykokonjugat-Biosynthese war die Entwicklung von Infektionsassays mit Zellen des angeborenen Immunsystems nötig, sodass zunächst die generelle Antwort von Epithelzellen, Makrophagen und Granulozyten auf *A. fumigatus* beleuchtet wurde.

Epithelzellen bilden Aktin-reiche Filopodien aus, wodurch sie zur Bindung und anschließenden Internalisierung von *A. fumigatus*-Sporen fähig sind. Jedoch sind die Zellen nicht in der Lage, die Konidien abzutöten. Ebenso zeigte die hier verwendete Zelllinie A549 keine Immunreaktion auf *A. fumigatus*. Es konnte weder eine Ausschüttung des proinflammatorischen Cytokins IL-8 noch eine Aktivierung des Transkriptions-Faktoren NF κ B und HIF-1 nachgewiesen werden. Ob die geringe Reaktivität spezifisch für diese Zelllinie ist, oder auch für primäre Epithelzellen zutrifft, stellt einen möglichen Gegenstand zukünftiger Untersuchungen dar.

Für die Interaktion von *A. fumigatus* mit Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der mechanische Druck, den intrazellulär auskeimende Sporen und in Zellen eindringende Hyphen auf die Plasmamembran ausüben, zu starken submembranösen Aktin-Umlagerungen führen. Das Anschwellen und Auskeimen von Sporen innerhalb von Makrophagen stellt zudem den Stimulus für die Ausschüttung von Cytokinen dar, wodurch im Körper eine Entzündungsreaktion vermittelt wird. Die Konzentration der als Reaktion auf eine *A. fumigatus*-Infektion ausgeschütteten Cytokine sowie das Ausmaß des Granulozyten-Influx, der in der vorliegenden Arbeit in einem intraperitonealen Infektionsmodell untersucht wurde, stellen einen Maßstab für die Erkennung des jeweiligen *A. fumigatus*-Stammes durch Immunzellen dar.

Die Bedeutung von Glycostrukturen in der Zellwand wurde zunächst anhand von Galactomannan untersucht, welches mit Hilfe von zwei monoklonalen α -Galactomannan-

Antikörpern auf Keimlingen und Hyphen nachgewiesen werden konnte, wohingegen es auf Konidien offensichtlich nicht zu detektieren ist. Es zeigte sich, dass Galactofuranose verstärkt in neugebildetem Zellwand-Material enthalten ist und auf der Oberfläche von Hyphen das Mannan-Grundgerüst, welches in der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* durch Rezeptoren der angeborenen Immunität erkannt wird, verdeckt. Im Unterschied zu *C. albicans* scheint allerdings in *A. fumigatus* Mannan ebenso wie die daran gebundene Galactofuranose keine Rolle bei der Erkennung des Pilzes durch Immunzellen zu spielen. Ob Galactomannan als mögliche Zielstruktur therapeutischer Ansätze in Frage kommt, bleibt noch zu prüfen. Ein protektiver Einsatz eines α -Galactomannan-Antikörpers ist nicht möglich, da dieser, obwohl er eine verstärkte Komplementaktivierung auslöst, keine protektive Wirkung während einer *A. fumigatus*-Infektion von Mäusen zeigt.

Bei der Untersuchung von Mannosyl-Inositolphosphoryl-Ceramid (MIPC) und daraus hervorgehenden Glycolipiden konnte gezeigt werden, dass diese in *A. fumigatus* im Gegensatz zu Hefen die Empfindlichkeit gegenüber Zellwandstress-Faktoren nicht beeinflussen, jedoch von Bedeutung sind für die Auskeimung des Pilzes in Gegenwart von hohen Calcium-Konzentrationen. Die entsprechende *A. fumigatus*-Mutante zeigt zudem auch eine verzögerte Auskeimung während der Infektion von Makrophagen, was allerdings keinen Einfluss auf die Antwort von Immunzellen und die Virulenz des Pilzes im murinen Modell hat. Eine Reduktion der Cytokin-Ausschüttung durch humane dendritische Zellen als Antwort auf diese Mutante deutet jedoch eine Relevanz von MIPC und daraus hervorgehenden Glycolipiden für die Erkennung von *A. fumigatus* durch das angeborene Immunsystem an und ist als Grundlage weiterer Studien zu sehen.

Auch das für die Synthese von polymannosylierten N-Glycanen wichtige Enzym AfOch1 hat keinen Einfluss auf die Resistenz des Pilzes gegenüber Zellwandstress, sondern ist von Bedeutung für die Sporulation in Komplexmedien mit hohen Calcium-Konzentrationen. Die Charakterisierung der entsprechenden Mutante lieferte erstmalig den Beweis der Existenz von polymannosylierten N-Glycanen in *A. fumigatus* und zeigte, dass die Expression von *afoch1* von Umweltbedingungen wie dem Wachstumsmedium reguliert wird. Im Gegensatz zu den entsprechenden Hefeproteinen weist AfOch1 eine N-terminale Signalsequenz statt eines Transmembranankers auf, und es scheint eine generelle Korrelation zwischen filamentösem Wachstum des jeweiligen Organismus und der Existenz einer Signalsequenz in Proteinen der Och1-Familie zu bestehen. Die Lokalisation von AfOch1 im Golgi trotz der Signalsequenz deutet auf zusätzliche Sortierungsmechanismen und Interaktionen mit weiteren Proteinen hin. Zusammengenommen bilden diese Erkenntnisse eine wichtige Grundlage für die Erforschung der N-Glycosylierung in *A. fumigatus*.

6 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Aderem,A., Underhill,D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.
2. Aimanianda,V., Bayry,J., Bozza,S., Knemeyer,O., Perruccio,K., Elluru,S.R., Clavaud,C., Paris,S., Brakhage,A.A., Kaveri,S.V., Romani,L., Latge,J.P., 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117-1121.
3. Araki,N., Johnson,M.T., Swanson,J.A., 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol.* 135, 1249-1260.
4. Balloy,V., Chignard,M., 2009. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes. Infect.* 11, 919-927.
5. Bates,S., Hughes,H.B., Munro,C.A., Thomas,W.P., MacCallum,D.M., Bertram,G., Atri,A., Ferguson,M.A., Brown,A.J., Odds,F.C., Gow,N.A., 2006. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol. Chem.* 281, 90-98.
6. Bauer,B. Untersuchung der Adaptation des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* an Stress: Die funktionelle Charakterisierung eines CipC-homologen Proteins. 2010.
Ref Type: Thesis/Dissertation
7. Beauvais,A., Latge,J.P., 2001. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist. Updat.* 4, 38-49.
8. Beeler,T.J., Fu,D., Rivera,J., Monaghan,E., Gable,K., Dunn,T.M., 1997. SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca²⁺ concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol. Gen. Genet.* 255, 570-579.
9. Bellanger,A.P., Millon,L., Khoufache,K., Rivollet,D., Bieche,I., Laurendeau,I., Vidaud,M., Botterel,F., Bretagne,S., 2009. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol.* 58, 174-179.
10. Bellocchio,S., Montagnoli,C., Bozza,S., Gaziano,R., Rossi,G., Mambula,S.S., Vecchi,A., Mantovani,A., Levitz,S.M., Romani,L., 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol.* 172, 3059-3069.
11. Bennett,J.E., Bhattacharjee,A.K., Gludemans,C.P., 1985. Galactofuranosyl groups are immunodominant in *Aspergillus fumigatus* galactomannan. *Mol. Immunol.* 22, 251-254.
12. Bennett,J.W., 2010 An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Masayuki Machida and Katsuya Gomi (Ed.), *Aspergillus-Molecular Biology and Genomics.*, pp. 1-17.
13. Bernard,M., Latge,J.P., 2001. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol.* 39 Suppl 1, 9-17.

14. Betz,C. Untersuchungen zur Wirkungsweise der ISC-1-kodierten Phosphosphingolipid-Phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. 2005.
Ref Type: Thesis/Dissertation
15. Birnboim,H.C., Doly,J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
16. Bohana-Kashtan,O., Ziporen,L., Donin,N., Kraus,S., Fishelson,Z., 2004. Cell signals transduced by complement. *Mol. Immunol.* 41, 583-597.
17. Bozza,S., Clavaud,C., Giovannini,G., Fontaine,T., Beauvais,A., Sarfati,J., D'Angelo,C., Perruccio,K., Bonifazi,P., Zagarella,S., Moretti,S., Bistoni,F., Latge,J.P., Romani,L., 2009. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J Immunol.* 183, 2407-2414.
18. Brakhage,A.A., Bruns,S., Thywissen,A., Zipfel,P.F., Behnsen,J., 2010. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 409-415.
19. Brennan,P.J., Losel,D.M., 1978. Physiology of fungal lipids: selected topics. *Adv. Microb. Physiol.* 17, 47-179.
20. Brinkmann,V., Reichard,U., Goosmann,C., Fauler,B., Uhlemann,Y., Weiss,D.S., Weinrauch,Y., Zychlinsky,A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
21. Bromley,I.M., Donaldson,K., 1996. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax* 51, 1203-1209.
22. Brown,G.D., Herre,J., Williams,D.L., Willment,J.A., Marshall,A.S., Gordon,S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp. Med.* 197, 1119-1124.
23. Bruns,S., Kniemeyer,O., Hasenberg,M., Amanianda,V., Nietzsche,S., Thywissen,A., Jeron,A., Latge,J.P., Brakhage,A.A., Gunzer,M., 2010. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 6, e1000873.
24. bu-Qarn,M., Eichler,J., Sharon,N., 2008. Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 544-550.
25. Cambi,A., Gijzen,K., de Vries,J.M., Torensma,R., Joosten,B., Adema,G.J., Netea,M.G., Kullberg,B.J., Romani,L., Figdor,C.G., 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J Immunol.* 33, 532-538.
26. Cambi,A., Netea,M.G., Mora-Montes,H.M., Gow,N.A., Hato,S.V., Lowman,D.W., Kullberg,B.J., Torensma,R., Williams,D.L., Figdor,C.G., 2008. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol. Chem.* 283, 20590-20599.
27. Cannon,R.D., Niimi,K., Jenkinson,H.F., Shepherd,M.G., 1994. Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *J Bacteriol.* 176, 2640-2647.
28. Casadevall,A., 2005. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal. Genet. Biol.* 42, 98-106.
29. Casadevall,A., Feldmesser,M., Pirofski,L.A., 2002. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 386-391.

30. Casadevall,A., Pirofski,L.A., 2007. Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma. *Infect. Immun.* 75, 5074-5078.
31. Cassone,A., Torosantucci,A., Boccanera,M., Pellegrini,G., Palma,C., Malavasi,F., 1988. Production and characterisation of a monoclonal antibody to a cell-surface, glucomannoprotein constituent of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 27, 233-238.
32. Cohen,S.N., Chang,A.C., Hsu,L., 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 2110-2114.
33. Cooper,J.A., 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 105, 1473-1478.
34. Cooperstock,M.S., 1974. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 422-425.
35. d'Enfert,C., Fontaine,T., 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* 24, 203-216.
36. Dagenais,T.R., Keller,N.P., 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 447-465.
37. Deshpande,N., Wilkins,M.R., Packer,N., Nevalainen,H., 2008. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* 18, 626-637.
38. Dickson,R.C., Lester,R.L., 1999a. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 305-321.
39. Dickson,R.C., Lester,R.L., 1999b. Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 347-357.
40. Dressler,K.A., Mathias,S., Kolesnick,R.N., 1992. Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 255, 1715-1718.
41. Duncan,C.J., Pugh,N., Pasco,D.S., Ross,S.A., 2002. Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *J Agric. Food Chem.* 50, 5683-5685.
42. Engel,J., Schmalhorst,P.S., Dork-Bousset,T., Ferrieres,V., Routier,F.H., 2009. A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol. Chem.* 284, 33859-33868.
43. Filler,S.G., Sheppard,D.C., 2006. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS. Pathog.* 2, e129.
44. Geiser,D.M., Klich,M.A., Frisvad,J.C., Peterson,S.W., Varga,J., Samson,R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 59, 1-10.
45. Goto,M., Harada,Y., Oka,T., Matsumoto,S., Takegawa,K., Furukawa,K., 2009. Protein O-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 8, 1465-1474.
46. Graham,T.R., Krasnov,V.A., 1995. Sorting of yeast alpha 1,3 mannosyltransferase is mediated by a lumenal domain interaction, and a transmembrane domain signal that can confer clathrin-dependent Golgi localization to a secreted protein. *Mol. Biol. Cell* 6, 809-824.

47. Grosse,V., Krappmann,S., 2008. The asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* expresses functional determinants of *Aspergillus nidulans* sexual development. *Eukaryot. Cell* 7, 1724-1732.
48. Hakomori,S., 2004. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An. Acad. Bras. Cienc.* 76, 553-572.
49. Han,Y., Kozel,T.R., Zhang,M.X., MacGill,R.S., Carroll,M.C., Cutler,J.E., 2001. Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol.* 167, 1550-1557.
50. Hanahan,D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol.* 166, 557-580.
51. Hannun,Y.A., Bell,R.M., 1989. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 243, 500-507.
52. Harris,S.L., Waters,M.G., 1996. Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J Cell Biol.* 132, 985-998.
53. Hearn,V.M., Mackenzie,D.W., 1980. Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen* 23, 549-562.
54. Hechtberger,P., Zinser,E., Saf,R., Hummel,K., Paltauf,F., Daum,G., 1994. Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J Biochem.* 225, 641-649.
55. Heesemann,L. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Moleküle des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*. 2010.
Ref Type: Thesis/Dissertation
56. Helenius,A., Aebi,M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.
57. Herzog,E.L., Brody,A.R., Colby,T.V., Mason,R., Williams,M.C., 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc. Am Thorac. Soc.* 5, 778-782.
58. Hohl,T.M., 2008. Stage-specific innate immune recognition of *Aspergillus fumigatus* and modulation by echinocandin drugs. *Med Mycol.* 1-7.
59. Ibrahim-Granet,O., Philippe,B., Boleti,H., Boisvieux-Ulrich,E., Grenet,D., Stern,M., Latge,J.P., 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 71, 891-903.
60. Imtiyaz,H.Z., Simon,M.C., 2010. Hypoxia-Inducible Factors as Essential Regulators of Inflammation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
61. Inoue,H., Nojima,H., Okayama,H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
62. Jouault,T., Iбата-Ombetta,S., Takeuchi,O., Trinel,P.A., Sacchetti,P., Lefebvre,P., Akira,S., Poulain,D., 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect. Dis* 188, 165-172.
63. Jung,Y.J., Isaacs,J.S., Lee,S., Trepel,J., Neckers,L., 2003. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17, 2115-2117.

64. Kämper,J., 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* 271, 103-110.
65. Kim,M.W., Kim,E.J., Kim,J.Y., Park,J.S., Oh,D.B., Shimma,Y., Chiba,Y., Jigami,Y., Rhee,S.K., Kang,H.A., 2006. Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol. Chem.* 281, 6261-6272.
66. Kornfeld,R., Kornfeld,S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
67. Kotz,A., Wagener,J., Engel,J., Routier,F., Echtenacher,B., Pich,A., Rohde,M., Hoffmann,P., Heesemann,J., Ebel,F., 2010. The *mitA* gene of *Aspergillus fumigatus* is required for mannosylation of inositol-phosphorylceramide, but is dispensable for pathogenicity. *Fungal. Genet. Biol.* 47, 169-178.
68. Kozel,T.R., Wilson,M.A., Farrell,T.P., Levitz,S.M., 1989. Activation of C3 and binding to *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae. *Infect. Immun.* 57, 3412-3417.
69. Krappmann,S., 2006. Tools to study molecular mechanisms of *Aspergillus* pathogenicity. *Trends Microbiol* 14, 356-364.
70. Laemmli,U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
71. Lamarre,C., Beau,R., Balloy,V., Fontaine,T., Wong Sak,H.J., Guadagnini,S., Berkova,N., Chignard,M., Beauvais,A., Latge,J.P., 2009. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol.* 11, 1612-1623.
72. Lambou,K., Lamarre,C., Beau,R., Dufour,N., Latge,J.P., 2010a. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol* 75, 910-923.
73. Lambou,K., Perkhofer,S., Fontaine,T., Latge,J.P., 2010b. Comparative functional analysis of the OCH1 mannosyltransferase families in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 625-636.
74. Laroy,W., Contreras,R., Callewaert,N., 2006. Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat. Protoc.* 1, 397-405.
75. Latge,J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310-350.
76. Latge,J.P., 2009. Galactofuranose containing molecules in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 47 Suppl 1, S104-S109.
77. Latge,J.P., Kobayashi,H., Debeaupuis,J.P., Diaquin,M., Sarfati,J., Wieruszeski,J.M., Parra,E., Bouchara,J.P., Fournet,B., 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62, 5424-5433.
78. Latge,J.P., Mouyna,I., Tekaiia,F., Beauvais,A., Debeaupuis,J.P., Nierman,W., 2005. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 43 Suppl 1, S15-S22.
79. Lehmann,P.F., Reiss,E., 1978. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. *Infect. Immun.* 20, 570-572.
80. Lessing,F., Kniemeyer,O., Wozniok,I., Loeffler,J., Kurzai,O., Haertl,A., Brakhage,A.A., 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for

- defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* 6, 2290-2302.
81. Lavery, S.B., Momany, M., Lindsey, R., Toledo, M.S., Shayman, J.A., Fuller, M., Brooks, K., Doong, R.L., Straus, A.H., Takahashi, H.K., 2002. Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. *FEBS Lett.* 525, 59-64.
 82. Levitz, S.M., 2010. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS. Pathog.* 6, e1000758.
 83. Levitz, S.M., Farrell, T.P., 1990. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *J Leukoc. Biol.* 47, 170-175.
 84. Lisman, Q., Pomorski, T., Vogelzangs, C., Urli-Stam, D., de Cocq van, D.W., Holthuis, J.C., 2004. Protein sorting in the late Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* does not require mannosylated sphingolipids. *J Biol. Chem.* 279, 1020-1029.
 85. Lommel, M., Strahl, S., 2009. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 19, 816-828.
 86. Luther, K. Interaktionen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* mit Wirtszellen. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 87. Luther, K., Rohde, M., Sturm, K., Kotz, A., Heesemann, J., Ebel, F., 2008. Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. *Microbes. Infect.* 10, 175-184.
 88. Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A.A., Heesemann, J., Ebel, F., 2007. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 9, 368-381.
 89. Mansfield, P.J., Shayman, J.A., Boxer, L.A., 2000. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95, 2407-2412.
 90. Maras, M., van, D., I, Contreras, R., van den Hondel, C.A., 1999. Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconj. J* 16, 99-107.
 91. Marr, K.A., Carter, R.A., Crippa, F., Wald, A., Corey, L., 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis* 34, 909-917.
 92. McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2010a. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes. Infect.*
 93. McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F., 2010b. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an Opportunistic Human Pathogen. *Cell Microbiol.*
 94. McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., Taylor, P.R., 2006. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* 16, 422-430.
 95. Meier, A., Kirschning, C.J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F., 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* 5, 561-570.

96. Mennink-Kersten, M.A., Ruegebrink, D., Wasei, N., Melchers, W.J., Verweij, P.E., 2006. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin. Microbiol.* 44, 1711-1718.
97. Meshulam, T., Levitz, S.M., Christin, L., Diamond, R.D., 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *J Infect. Dis* 172, 1153-1156.
98. Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibatá-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P.A., Poulain, D., 2004. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol. Chem.* 279, 47952-47960.
99. Mircescu, M.M., Lipuma, L., van, R.N., Pamer, E.G., Hohl, T.M., 2009. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect. Dis.* 200, 647-656.
100. Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A., Shepherd, M.G., 1994. Purification and characterization of two forms of N-acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. *Microbiology* 140 (Pt 7), 1543-1553.
101. Mora-Montes, H.M., Ponce-Noyola, P., Villagomez-Castro, J.C., Gow, N.A., Flores-Carreón, A., Lopez-Romero, E., 2009. Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol* 4, 1167-1183.
102. Moragues, M.D., Omaetxebarria, M.J., Elguezabal, N., Sevilla, M.J., Conti, S., Polonelli, L., Ponton, J., 2003. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. *Infect. Immun.* 71, 5273-5279.
103. Morelle, W., Bernard, M., Debeaupuis, J.P., Buitrago, M., Tabouret, M., Latge, J.P., 2005. Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 4, 1308-1316.
104. Morgan, J., Wannemuehler, K.A., Marr, K.A., Hadley, S., Kontoyiannis, D.P., Walsh, T.J., Fridkin, S.K., Pappas, P.G., Warnock, D.W., 2005. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol.* 43 Suppl 1, S49-S58.
105. Mouyna, I., Kniemeyer, O., Jank, T., Loussert, C., Mellado, E., Aïmanianda, V., Beauvais, A., Wartenberg, D., Sarfati, J., Bayry, J., Prevost, M.C., Brakhage, A.A., Strahl, S., Huerre, M., Latge, J.P., 2010. Members of protein O-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Mol. Microbiol.* 76, 1205-1221.
106. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
107. Munro, S., 2001. What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett.* 498, 223-227.
108. Nagasu, T., Shimma, Y., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K., Suzuki, K., Jigami, Y., 1992. Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast* 8, 535-547.
109. Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., Jigami, Y., 1992. OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J* 11, 2511-2519.

110. Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W., Brown, A.J., Kullberg, B.J., 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin. Invest* 116, 1642-1650.
111. Netea, M.G., Warris, A., Van der Meer, J.W., Fenton, M.J., Verver-Janssen, T.J., Jacobs, L.E., Andresen, T., Verweij, P.E., Kullberg, B.J., 2003. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect. Dis.* 188, 320-326.
112. Ni, M., Yu, J.H., 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS. One.* 2, e970.
113. Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J.L., Garcia, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latge, J.P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M.A., Perteua, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., Rodriguez de, C.S., Rodriguez-Pena, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C.R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., Denning, D.W., 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156.
114. O'Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S., 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471-474.
115. Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A., 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30, 513-521.
116. Paris, S., Boisvieux-Ulrich, E., Crestani, B., Houcine, O., Taramelli, D., Lombardi, L., Latge, J.P., 1997. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* 65, 1510-1514.
117. Paris, S., Debeauvais, J.P., Cramer, R., Carey, M., Charles, F., Prevost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B., Latge, J.P., 2003. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1581-1588.
118. Park, S.J., Mehrad, B., 2009. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 535-551.
119. Pearson, C.L., Xu, K., Sharpless, K.E., Harris, S.D., 2004. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 15, 3658-3672.
120. Pedersen, L.L., Turco, S.J., 2003. Galactofuranose metabolism: a potential target for antimicrobial chemotherapy. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 259-266.
121. Ponton, J., Omaetxebarria, M.J., Elguezal, N., Alvarez, M., Moragues, M.D., 2001. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol.* 39 Suppl 1, 101-110.

122. Reichard,U., Buttner,S., Eiffert,H., Staib,F., Ruchel,R., 1990. Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol.* 33, 243-251.
123. Reiss,E., Lehmann,P.F., 1979. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* 25, 357-365.
124. Rohde,M., Schwienbacher,M., Nikolaus,T., Heesemann,J., Ebel,F., 2002. Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 99-105.
125. Roilides,E., Uhlig,K., Venzon,D., Pizzo,P.A., Walsh,T.J., 1993. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect. Immun.* 61, 1185-1193.
126. Romani,L., 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 1-23.
127. Rosas,M., Liddiard,K., Kimberg,M., Faro-Trindade,I., McDonald,J.U., Williams,D.L., Brown,G.D., Taylor,P.R., 2008. The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol.* 181, 3549-3557.
128. Ruchel,R., Dellmann,A., Schaffrinski,M., Donhuijsen,K., 2004. [Fungus detection--a simple method. Screening with optical brighteners]. *Pathologe* 25, 235-237.
129. Saitou,N., Nei,M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
130. SANFORD,K.K., EARLE,W.R., LIKELY,G.D., 1948. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl. Cancer Inst.* 9, 229-246.
131. Schaffner,A., Douglas,H., Braude,A., 1982. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin. Invest* 69, 617-631.
132. Schaffner,A., Douglas,H., Braude,A.I., Davis,C.E., 1983. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect. Immun.* 42, 1109-1115.
133. Schmalhorst,P.S., Krappmann,S., Vervecken,W., Rohde,M., Muller,M., Braus,G.H., Contreras,R., Braun,A., Bakker,H., Routier,F.H., 2008. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 7, 1268-1277.
134. Schmit,J.C., Brody,S., 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev.* 40, 1-41.
135. Schwienbacher,M. Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden. 2005.
Ref Type: Thesis/Dissertation
136. Sentandreu,R., Northcote,D.H., 1968. The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochem. J* 109, 419-432.
137. Serrano-Gomez,D., Dominguez-Soto,A., Ancochea,J., Jimenez-Heffernan,J.A., Leal,J.A., Corbi,A.L., 2004. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin

- mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 173, 5635-5643.
138. Simenel,C., Coddeville,B., Delepierre,M., Latge,J.P., Fontaine,T., 2008. Glycosylinositolphosphoceramides in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 18, 84-96.
139. Simons,K., Toomre,D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
140. Spiro,R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R-56R.
141. Standiford,T.J., Kunkel,S.L., Basha,M.A., Chensue,S.W., Lynch,J.P., III, Toews,G.B., Westwick,J., Strieter,R.M., 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin. Invest* 86, 1945-1953.
142. Steele,C., Rapaka,R.R., Metz,A., Pop,S.M., Williams,D.L., Gordon,S., Kolls,J.K., Brown,G.D., 2005. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS. Pathog.* 1, e42.
143. Steinbach,W.J., Cramer,R.A., Jr., Perfect,B.Z., Asfaw,Y.G., Sauer,T.C., Najvar,L.K., Kirkpatrick,W.R., Patterson,T.F., Benjamin,D.K., Jr., Heitman,J., Perfect,J.R., 2006. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 5, 1091-1103.
144. Styren,D., Goris,A., Sarfati,J., Latge,J.P., 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin. Microbiol.* 33, 497-500.
145. Sugimoto,Y., Sakoh,H., Yamada,K., 2004. IPC synthase as a useful target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 4, 311-322.
146. Takayanagi,T., Kimura,A., Chiba,S., Ajisaka,K., 1994. Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing alpha-D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* alpha-D-glucosidase. *Carbohydr. Res.* 256, 149-158.
147. Toledo,M.S., Lavery,S.B., Bennion,B., Guimaraes,L.L., Castle,S.A., Lindsey,R., Momany,M., Park,C., Straus,A.H., Takahashi,H.K., 2007. Analysis of glycosylinositol phosphorylceramides expressed by the opportunistic mycopathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Lipid Res.* 48, 1801-1824.
148. Torosantucci,A., Bromuro,C., Chiani,P., De,B.F., Berti,F., Galli,C., Norelli,F., Bellucci,C., Polonelli,L., Costantino,P., Rappuoli,R., Cassone,A., 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp. Med* 202, 597-606.
149. Torosantucci,A., Chiani,P., Bromuro,C., De,B.F., Palma,A.S., Liu,Y., Mignogna,G., Maras,B., Colone,M., Stringaro,A., Zamboni,S., Feizi,T., Cassone,A., 2009. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS. One.* 4, e5392.
150. Tronchin,G., Pihet,M., Lopes-Bezerra,L.M., Bouchara,J.P., 2008. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 46, 749-772.
151. Uemura,S., Kihara,A., Inokuchi,J., Igarashi,Y., 2003. Csg1p and newly identified Csh1p function in mannosylinositol phosphorylceramide synthesis by interacting with Csg2p. *J Biol. Chem.* 278, 45049-45055.

152. Uemura,S., Kihara,A., Iwaki,S., Inokuchi,J., Igarashi,Y., 2007b. Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding protein Csg2. *J Biol. Chem.* 282, 8613-8621.
153. Uemura,S., Kihara,A., Iwaki,S., Inokuchi,J., Igarashi,Y., 2007a. Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding protein Csg2. *J Biol. Chem.* 282, 8613-8621.
154. Ui,M., Okada,T., Hazeki,K., Hazeki,O., 1995. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.* 20, 303-307.
155. Urban,C.F., Ermert,D., Schmid,M., bu-Abed,U., Goosmann,C., Nacken,W., Brinkmann,V., Jungblut,P.R., Zychlinsky,A., 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5, e1000639.
156. van,d., V, Marijnissen,R.J., Kullberg,B.J., Koenen,H.J., Cheng,S.C., Joosten,I., van den Berg,W.B., Williams,D.L., Van der Meer,J.W., Joosten,L.A., Netea,M.G., 2009. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host. Microbe* 5, 329-340.
157. Wagener,J., Echtenacher,B., Rohde,M., Kotz,A., Krappmann,S., Heesemann,J., Ebel,F., 2008. The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot. Cell* 7, 1661-1673.
158. Wallis,G.L., Easton,R.L., Jolly,K., Hemming,F.W., Peberdy,J.F., 2001. Galactofuranoic-oligomannose N-linked glycans of alpha-galactosidase A from *Aspergillus niger*. *Eur. J Biochem.* 268, 4134-4143.
159. Wang,G.L., Jiang,B.H., Rue,E.A., Semenza,G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5510-5514.
160. Wang,J.E., Warris,A., Ellingsen,E.A., Jorgensen,P.F., Flo,T.H., Espevik,T., Solberg,R., Verweij,P.E., Aasen,A.O., 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect. Immun.* 69, 2402-2406.
161. Wasylnka,J.A., Moore,M.M., 2003. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J Cell Sci* 116, 1579-1587.
162. Wendland,J., Walther,A., 2005. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 421-429.
163. Werner,J.L., Metz,A.E., Horn,D., Schoeb,T.R., Hewitt,M.M., Schwiebert,L.M., Faro-Trindade,I., Brown,G.D., Steele,C., 2009. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol.* 182, 4938-4946.
164. Wiggins,C.A., Munro,S., 1998. Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7945-7950.
165. Zanni,E., Farina,F., Ricci,A., Mancini,P., Frank,C., Palleschi,C., Uccelletti,D., 2009. The Golgi alpha-1,6 mannosyltransferase KIOch1p of *Kluyveromyces lactis* is required for Ca²⁺/calmodulin-based signaling and for proper mitochondrial functionality. *BMC. Cell Biol.* 10, 86.

166. Zhang,Z., Liu,R., Noordhoek,J.A., Kauffman,H.F., 2005. Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect.* 51, 375-382.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| α | anti |
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AMM | Aspergillus-Minimalmedium |
| Amp | Ampicillin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Carb | Carbenicillin |
| C-Terminus | Carboxy-terminaler Teil eines Proteins |
| dest. | destilliert |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DC-SIGN | <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>et al</i> | <i>et alteri</i> |
| Fa. | Firma |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum |
| G-CSF | <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> |

| | |
|-------------------------------|---|
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GPI | Glycophosphatidylinositol |
| GSL | Glycosphingolipid |
| HCS | <i>Hybridoma cloning serum</i> |
| HIF1 | <i>Hypoxia-induced factor 1</i> |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| Hyg | Hygromycin |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IPC | Inositol-Phosphorylcramid |
| kb | Kilobasen |
| LB | Luria-Bertani |
| Mb | Megabsaen |
| M-CSF | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MIP | <i>Macrophage inflammatory protein</i> |
| MIPC | Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid |
| M(IP) ₂ C | Mannosyl-di-Inositol-Phosphorylceramid |
| MitA | GDP-Mannose:Inositol-Phosphorylceramid-Transferase A |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| NCTC | <i>National Collection of Type Cultures</i> |
| NFκB | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| N-Terminus | Amino-terminaler Teil eines Proteins |
| Och1 | <i>Outer chain protein 1</i> |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAMP | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| pH | <i>potentia Hydrogenii</i> |
| PRR | <i>Pattern recognition receptor</i> |
| ptrA | Pyriithiamin |
| RFP | Rot-fluoreszierendes Protein |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies |

| | |
|--------------|--|
| RPMI | <i>Royal Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SUR1 | <i>Suppressor of the phenotypes of rvs 161 and 167 mutants</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolet |
| v/v | <i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen |
| WT | Wildyp |
| w/v | <i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

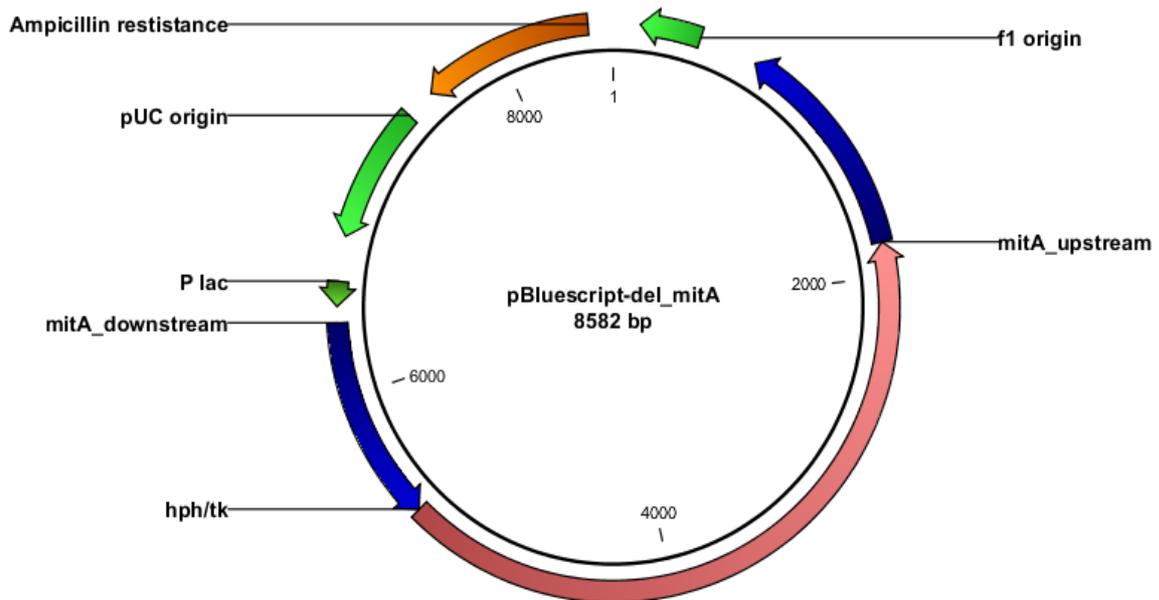
Einheiten

| | |
|-------|--------------------------------|
| A | Ampere |
| °C | Grad Celcius |
| cm | Centimeter |
| Da | Dalton |
| g | Gramm |
| x g | x-faches der Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| l | Liter |
| M | Mol pro Liter |
| min | Minute |
| s | Sekunde |
| U | Unit |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |

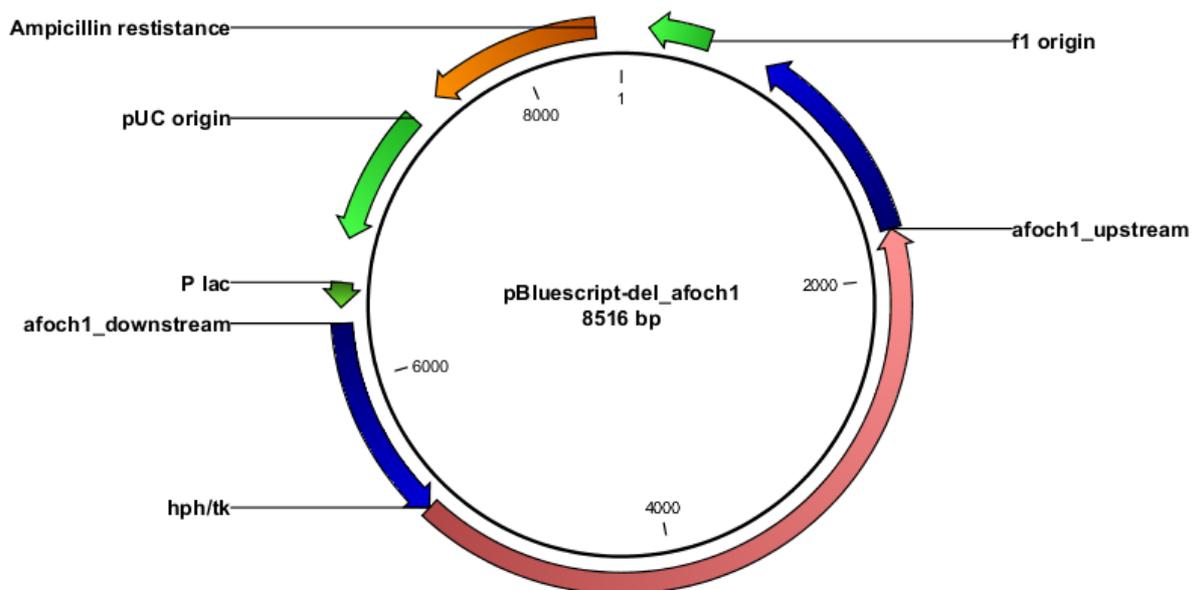
8 Anhang

Plasmide: Deletionskonstrukte

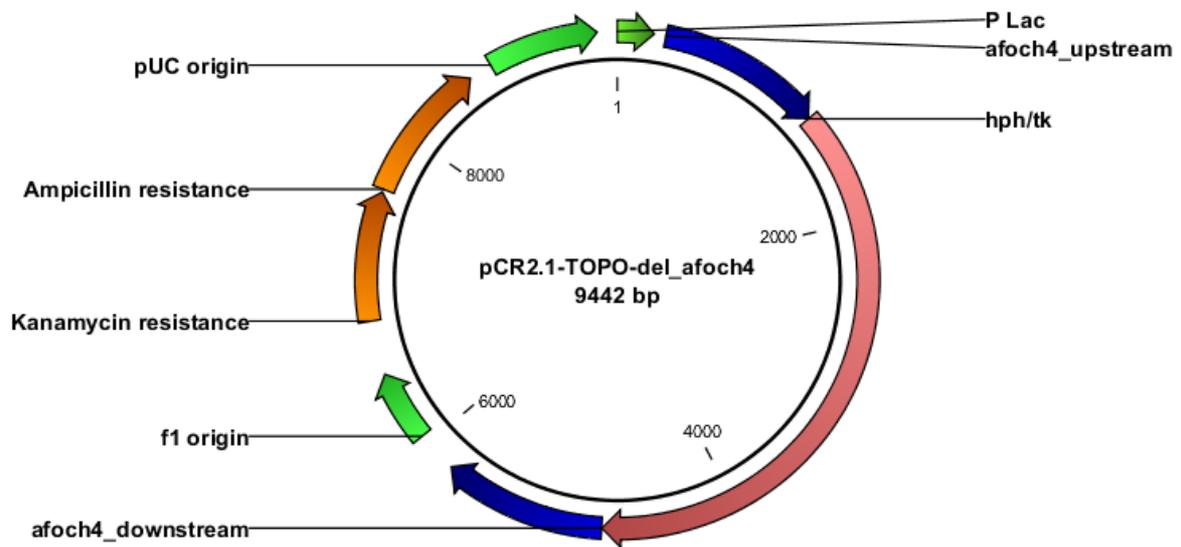
Konstrukt zur Deletion von *mitA* (AFUA_6G04680) im Vektor *pBluescript*



Konstrukt zur Deletion von *afoch1* (AFUA_5G08580) im Vektor *pBluescript*

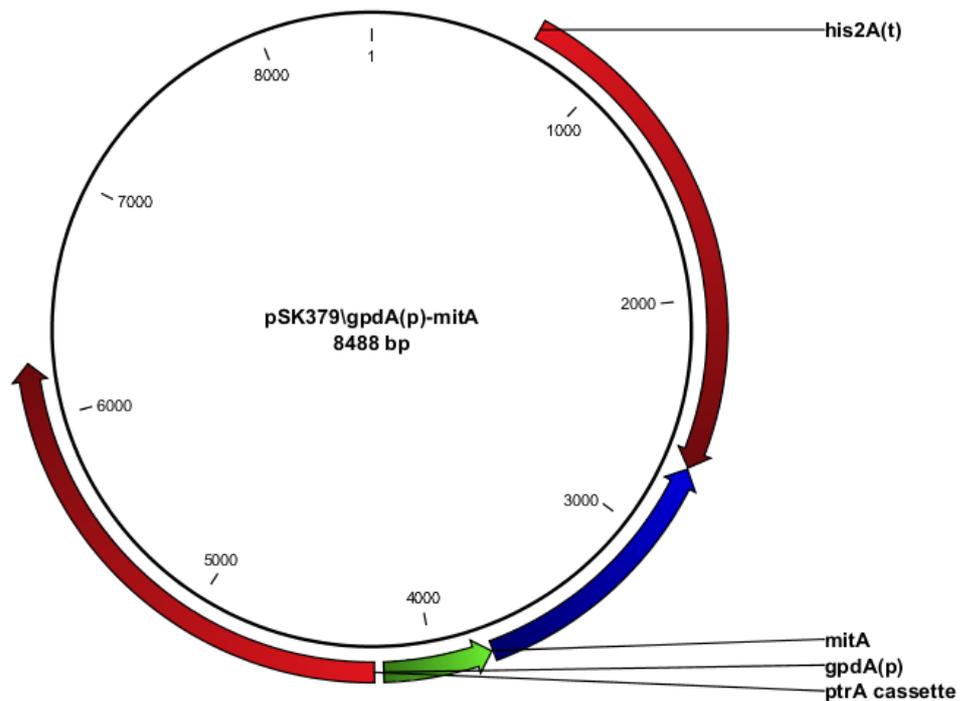


Konstrukt zur Deletion von *afoch4* (AFUA 1G01380) im Vektor *pCR2.1-TOPO*

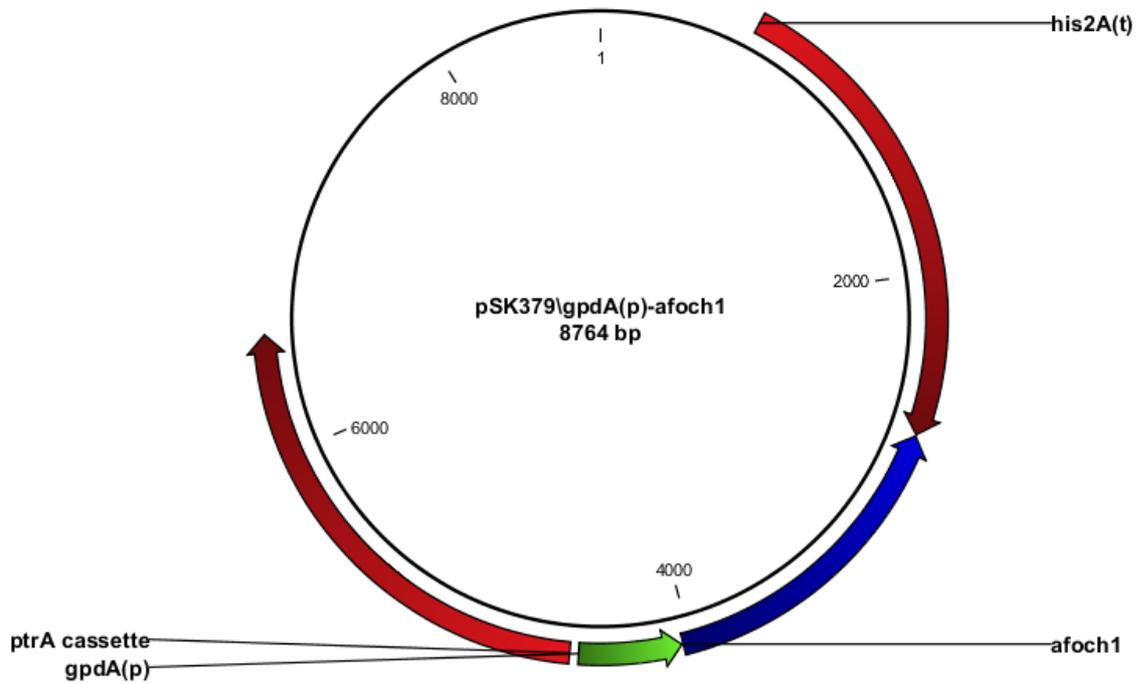


Plasmide: Komplementationskonstrukte

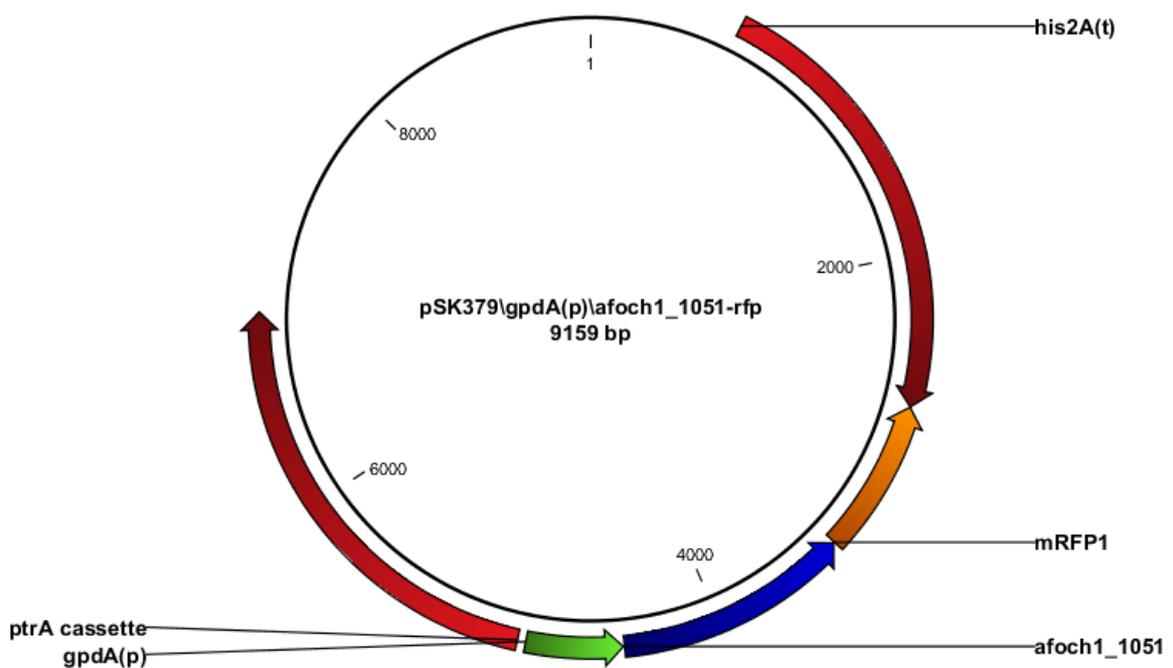
mitA (AFUA 6G04680) im Vektor pSK379 zur Komplementation der Δ *mitA*-Mutante



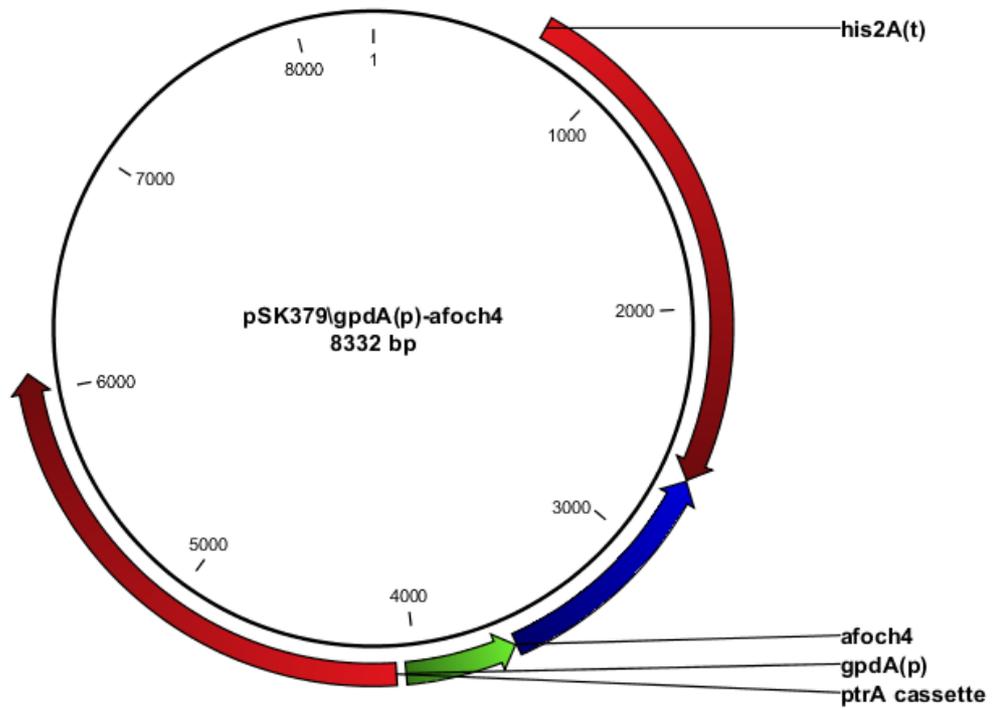
afoch1 (AFUA_5G08580) im Vektor pSK379 zur Komplementation der $\Delta afoch1$ -Mutante



afoch1 (AFUA_5G08580) im Vektor pSK379-RFP zur Lokalisation von AfOch1



afoc41 (AFUA 1G01380) im Vektor pSK379 zur Komplementation der Δ *afoch4*-Mutante



Lebenslauf

Name: Andrea Kotz

Geburtsdatum: 12.07.1981

Geburtsort: Landsberg am Lech

1987-1991 Besuch der Grundschule Landsberg-Erpfting

1991-2000 Besuch des Dominikus-Zimmermann-Gymnasiums Landsberg am Lech
Abschluss: Abitur

2000-2006 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Schwerpunkt Mikrobiologie

Nebenfächer: Zoologie/Zellbiologie, Genetik, Ökologie

Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann:
Diversität und Verbreitung von Bakterien des Phylums *Chloroflexi* an natürlichen Standorten

Abschluss: Diplom

2007-2010 Experimentelle Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Ebel

Danksagung

Für die Übernahme des Erstgutachtens und die Bereitschaft diese Arbeit vor der biologischen Fakultät zu vertreten danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Ebel für die Betreuung dieser Arbeit, sein Interesse an deren Fortgang und seine ständige Präsenz. Durch seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Ratschläge und Erfahrung war er maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt.

Von großer Bedeutung war die gesamte AG Aspergillus durch das wunderbare Arbeitsklima, die immerwährende Unterstützung, die häufigen hilfreichen Diskussionen und die vielen fröhlichen Momente im Labor. Danke an Tina, Marzena, Johannes, Julia, Karl, Franziska und Allison!

Für die Analyse der Sphingolipide und Glycoproteine sowie die Überlassung der Δglf -Mutante möchte ich Herrn Jakob Engel und Frau Prof. Dr. Françoise Routier am Institut für Zelluläre Chemie der Universität Hannover danken.

Herrn Dr. Bernd Echtenacher am Institut für Immunologie an der Universität Regensburg und Frau Dr. Ilse Jacobsen in der Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen am HKI in Jena danke ich für die Durchführung der Mausinfektionen.

Bei Herrn Michael Ok und Herrn Dr. Jürgen Löffler am Universitätsklinikum Regensburg bedanke ich mich für die Analyse der Cytokin-Produktion durch humane dendritische Zellen.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Manfred Rohde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Besonders wichtig waren für mich die angenehme Ablenkung, die Aufmunterungen und guten Ratschläge bei allen wissenschaftlichen aber auch sonstigen Problemen durch die Teilnehmerinnen unserer Mittagsrunde, wobei mir vor allem meine Freundinnen Iris, Steffi, Tina, Beate, Claudia sowie Bettina zur Seite standen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre stetige Unterstützung mein Studium und diese Arbeit ermöglichten, sowie meiner gesamten Familie, meinem Freundeskreis und meinem Freund Benjamin für die Aufmunterungen und die Geduld, die mir entgegengebracht wurden.

