

**Charakterisierung der Gruppe III Hybrid Histidin Kinase
TcsC und des nachgeschalteten *High Osmolarity Glycerol*
(HOG) Signalwegs im pathogenen Schimmelpilz
*Aspergillus fumigatus***

von

Isabella Katharina Böhmer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Charakterisierung der Gruppe III Hybrid Histidin Kinase
TcsC und des nachgeschalteten *High Osmolarity Glycerol*
(HOG) Signalwegs im pathogenen Schimmelpilz
*Aspergillus fumigatus***

von Isabella Katharina Böhmer

aus Hann. Münden

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. Frank Ebel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Ebel

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning
Univ.-Prof. Dr. Manfred Gareis
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Für meine Lieben

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in folgender Publikation am 29.06.2019
vorveröffentlicht:

Isabella Böhmer, Anja Spadinger, Frank Ebel

**Functional comparison of the group III hybrid histidine kinases
TcsC of *Aspergillus fumigatus* and NikA of *Aspergillus nidulans***

Medical Mycology, im Druck (doi: 10.1093/mmy/myz069)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| A. EINLEITUNG | 22 |
| B. LITERATURÜBERSICHT | 26 |
| 1. <i>Aspergillus fumigatus</i> | 26 |
| 1.1. Taxonomie und Bedeutung | 26 |
| 1.2. Lebenszyklus, Habitat und Morphologie von <i>A. fumigatus</i> | 27 |
| 1.3. Bedeutung in der Humanmedizin..... | 30 |
| 1.3.1. Die invasive Aspergillose (IA)..... | 32 |
| 1.3.2. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) | 35 |
| 1.3.3. Das Aspergillom..... | 36 |
| 1.4. Bedeutung in der Veterinärmedizin | 37 |
| 1.4.1. Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel | 37 |
| 1.4.2. Die Aspergillose des Pferdes | 41 |
| 1.4.3. Die Aspergillose der Wiederkäuer | 43 |
| 1.4.4. Die Aspergillose des Hundes und der Katze | 45 |
| 1.4.5. Die Aspergillose der Primaten | 47 |
| 2. <i>Aspergillus nidulans</i> | 48 |
| 2.1. Taxonomie und Bedeutung | 48 |
| 2.2. Lebenszyklus, Habitat und Morphologie von <i>A. nidulans</i> | 49 |
| 2.3. Bedeutung in der Humanmedizin..... | 49 |
| 2.3.1. Die Chronische Granulomatose (CGD) | 49 |
| 2.3.2. Myzetome..... | 51 |
| 2.3.3. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) | 52 |
| 3. Diagnostik und Therapie von Aspergillosen..... | 52 |
| 3.1. Diagnostische Methoden in der Humanmedizin | 52 |
| 3.2. Aktueller Stand der antifungalen Therapie | 56 |
| 4. Der <i>High Osmolarity Glycerol</i> (HOG) Signalweg | 60 |
| 4.1. Die Antwort auf Stresssignale über den HOG-Signalweg in <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> und das Potential als Angriffspunkt für neue Therapieansätze | 61 |
| C. MATERIAL UND METHODEN | 68 |
| 1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide | 68 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2. | Organismenanzucht | 72 |
| 2.1. | Medien..... | 72 |
| 2.1.1. | Medien für <i>Escherichia coli</i> | 72 |
| 2.1.2. | Medien für die Anzucht von <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> | 72 |
| 2.2. | Selektionsmarker und Stressoren | 79 |
| 2.3. | Anzucht von <i>E. coli</i> | 80 |
| 2.4. | Anzucht von <i>Aspergillus</i> | 80 |
| 2.5. | Verschiedene Wachstumsversuche mit <i>Aspergillus</i> Stämmen..... | 82 |
| 2.5.1. | Tüpfeltests | 82 |
| 2.5.2. | Agardiffusionstests..... | 82 |
| 3. | Genetische und molekularbiologische Methoden..... | 83 |
| 3.1. | Amplifizierung von DNS-Fragmenten mittels PCR | 83 |
| 3.2. | Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> | 84 |
| 3.3. | Isolierung chromosomaler DNS aus <i>Aspergillus</i> | 85 |
| 3.4. | Konzentrationsbestimmung von DNS und anderen Nukleinsäure- Lösungen | 86 |
| 3.5. | Agarosegelelektrophorese | 86 |
| 3.6. | Extraktion von DNS aus Agarosegelen..... | 87 |
| 3.7. | Enzymatische Behandlung von Nucleinsäuren..... | 88 |
| 3.7.1. | Spaltung von DNS..... | 88 |
| 3.7.2. | Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen | 88 |
| 3.7.3. | Ligation von DNS-Fragmenten..... | 88 |
| 3.8. | Transformation von <i>E. coli</i> | 89 |
| 3.8.1. | Chemische Transformation | 89 |
| 3.8.1.1. | Herstellung chemisch kompetenter Zellen..... | 89 |
| 3.8.1.2. | Durchführung einer chemischen Transformation | 90 |
| 3.9. | Transformation von <i>Aspergillus</i> | 91 |
| 3.9.1. | Transformation von Protoplasten..... | 91 |
| 3.9.2. | Generierung und genetische Verifizierung der $\Delta nikA$ Deletion im Stamm A26..... | 93 |
| 3.9.3. | Generierung und genetische Verifizierung der Deletionsmutanten des HOG-Signalwegs im Stamm AfS35 | 95 |
| 3.10. | Sequenzierungen | 95 |
| 4. | Zellbiologische Methoden..... | 95 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.1. | Mikroskopische Untersuchungen..... | 95 |
| 4.1.1. | Lebendmikroskopie von <i>Aspergillus</i> | 96 |
| 4.1.2. | Mikroskopie von fixierten Präparaten..... | 96 |
| 4.1.2.1. | Fixierung von mikroskopischen Präparaten..... | 96 |
| 4.1.2.2. | Immunfluoreszenz von <i>Aspergillus</i> Hyphen mit spezifischen Antikörpern | 97 |
| 5. | Bioinformatische Methoden | 98 |
| D. | ERGEBNISSE | 100 |
| D. 1. | Vergleich der Gruppe III Histidin Kinasen TcsC von <i>Aspergillus fumigatus</i> und NikA von <i>Aspergillus nidulans</i> | 100 |
| 1.1. | Vergleich der Proteinsequenzen von TcsC und NikA | 100 |
| 1.2. | Darstellung des Genotyps der $\Delta nikA$ -Mutante | 102 |
| 1.3. | Vergleich der Phänotypen von $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$ | 103 |
| 1.3.1. | Wachstum in Anwesenheit von Fludioxonil | 106 |
| 1.3.2. | Vitalität ruhender Konidien der $\Delta nikA$ Mutante nach Lagerung..... | 108 |
| 1.3.3. | Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress | 109 |
| 1.3.4. | Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von oxidativem Stress | 111 |
| 1.3.5. | Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von Zellwandstressoren..... | 112 |
| 1.3.6. | Mikroskopische Betrachtung des Fludioxonileffekts..... | 113 |
| D. 2. | Analyse der Komponenten des HOG-Signalwegs in <i>Aspergillus fumigatus</i> | 123 |
| 2.1. | Darstellung der Genotypen der Mutanten des HOG-Signalwegs | 123 |
| 2.2. | Vergleich der Phänotypen der Mutanten des HOG-Signalwegs..... | 124 |
| 2.2.1. | Wachstum in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress | 125 |
| 2.2.2. | Wachstum der Mutanten in Anwesenheit von oxidativem Stress..... | 130 |
| 2.2.3. | Wachstum der Mutanten in Anwesenheit von Zellwandstress | 132 |
| 2.2.4. | Verhalten der Mutanten in Anwesenheit von Fludioxonil | 133 |

| | |
|---|------------|
| E. DISKUSSION | 148 |
| 1. Funktioneller Vergleich der Gruppe III Hybrid Histidin Kinasen TcsC von <i>A. fumigatus</i> und NikA von <i>A. nidulans</i> | 150 |
| 2. Vergleich der Mutanten des HOG-Signalwegs in <i>Aspergillus fumigatus</i> | 161 |
| F. ZUSAMMENFASSUNG | 178 |
| G. SUMMARY | 181 |
| H. ANHANG | 184 |
| I. LITERATURVERZEICHNIS | 190 |
| K. DANKSAGUNG | 206 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|--|
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| ABPA | allergisch bronchopulmonale Aspergillose |
| AID | autoinhibitorische Domäne |
| AIDS | <i>Acquired immune deficiency syndrome</i> |
| AMM | Aspergillus Minimal Medium |
| Amp | Ampicillin |
| bp | Basenpaare |
| CGD | <i>Chronic granulomatous disease</i> |
| CT | Computertomographie |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | Demineralisiertes Wasser |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DSMZ | Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FastAP | <i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> |
| FGSC | Fungal Genetics Stock Center |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| HATPase_c Domäne | <i>Histidine kinase-like ATPase catalytic domain</i> |
| HHK | Hybrid Histidin Kinase(n) |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HK | Histidin Kinase |
| HOG | <i>High Osmolarity Glycerol</i> |
| HPt | <i>Histidine-containing Phosphotransfer Protein</i> |
| Hyg B | Hygromycin B |
| IA | invasive Aspergillose |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IPA | invasive pulmonale Aspergillose |
| LB | Luria-Bertani |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| MAPKK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase |

| | |
|--------|--|
| MAPKKK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase |
| OD | Optische Dichte |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PNK | Polynucleotid-Kinase |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Pyr | Pyriithiamin |
| REC | <i>Receiver</i> -Domäne |
| RFP | rot fluoreszierendes Protein |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RR | <i>Response Regulator</i> |
| sp. | eine Spezies |
| spp. | mehrere Spezies |
| TcsC | <i>Two-component system C</i> |
| Tfb | Transformationspuffer |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| <i>Abbildung 1: Taxonomische Klassifikation von A. fumigatus</i> | 26 |
| <i>Abbildung 2: Lebenszyklus und Morphologie von A. fumigatus</i> | 29 |
| <i>Abbildung 3: Konfrontation mit A. fumigatus Konidien durch Inhalation</i> | 31 |
| <i>Abbildung 4: Von A. fumigatus verursachte Erkrankungen beim Menschen</i> | 32 |
| <i>Abbildung 5: Entwicklung einer invasiven Aspergillose in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Immunsuppression</i> | 34 |
| <i>Abbildung 6: Zellwandstruktur von A. fumigatus</i> | 54 |
| <i>Abbildung 7: Polysaccharidgerüst der Zellwand von A. fumigatus</i> | 55 |
| <i>Abbildung 8: Übersicht über die Gruppen der verfügbaren Antimykotika</i> | 59 |
| <i>Abbildung 9: Der HOG-Signalweg in A. fumigatus</i> | 62 |
| <i>Abbildung 10: Die Hybrid Histidin Kinase TcsC (Two-component system C) in A. fumigatus</i> | 64 |
| <i>Abbildung 11: Chemische Struktur von Pyrrolnitrin und dessen Derivaten Fenpiclonil und Fludioxonil</i> | 65 |
| <i>Abbildung 12: Vergleich der Proteinsequenzen der N-Termini von TcsC und Nika</i> | 101 |
| <i>Abbildung 13: Vorhersage und Vergleich der Domänen von TcsC und Nika mittels des SMART-Programms</i> | 101 |
| <i>Abbildung 14: Verifizierung der ΔnikA-Mutante per PCR</i> | 102 |
| <i>Abbildung 15: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten ΔtcsC und ΔnikA und der dazugehörigen Wildstämme auf AMM-Platten</i> | 103 |
| <i>Abbildung 16: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten ΔtcsC und ΔnikA und der dazugehörigen Wildstämme auf Czapek-Dox (CD)-Agar</i> | 104 |
| <i>Abbildung 17: Wachstum der ΔnikA-Mutante und der ΔnikA+nikA- sowie ΔnikA+tcsC-Komplementationen auf mit Spurenelementen supplementiertem CD-Agar</i> | 106 |
| <i>Abbildung 18: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten ΔtcsC und ΔnikA und der dazugehörigen Wildstämme auf einer AMM-Platte mit 1 μg/ml Fludioxonil</i> | 107 |
| <i>Abbildung 19: Wachstum der ΔnikA-Komplementationen ΔnikA+nikA und ΔnikA+tcsC in Anwesenheit von Fludioxonil</i> | 108 |
| <i>Abbildung 20: Vitalität von A. nidulans Konidien</i> | 109 |
| <i>Abbildung 21: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten ΔtcsC und ΔnikA</i> | |

| | |
|--|------------|
| <i>und der dazugehörigen Wildstämme auf AMM-Platten unter hyperosmolaren Bedingungen.....</i> | <i>110</i> |
| <i>Abbildung 22: Funktionelle Komplementation der $\Delta nika$-Mutante nach Expression des <i>tcsC</i> bzw. des <i>nika</i> Gens.</i> | <i>110</i> |
| <i>Abbildung 23: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme unter oxidativem Stress.</i> | <i>112</i> |
| <i>Abbildung 24: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme unter Zellwandstress.</i> | <i>113</i> |
| <i>Abbildung 25: Eine Behandlung mit Fludioxonil führt zu einer quantitativen Lyse.</i> | <i>115</i> |
| <i>Abbildung 26: Darstellung einer Färbung von <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> mit Calcofluor Weiß.</i> | <i>117</i> |
| <i>Abbildung 27: DAPI-Färbung von <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i>.</i> | <i>118</i> |
| <i>Abbildung 28: Abgebildet ist ein angeschwollener Keimling von <i>A. nidulans</i> nach 16-stündiger Inkubation in AMM mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil bei 37°C.</i> | <i>119</i> |
| <i>Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1.</i> | <i>120</i> |
| <i>Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung mit dem β-1,3- und β-1,6-Glukan-spezifischen monoklonalen Antikörper 2G8.....</i> | <i>121</i> |
| <i>Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1.</i> | <i>122</i> |
| <i>Abbildung 32: Genotypen des <i>A. fumitagus</i> Wildstammes AfS35 und der Mutanten des HOG-Signalwegs.</i> | <i>124</i> |
| <i>Abbildung 33: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs.....</i> | <i>125</i> |
| <i>Abbildung 34: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter hyperosmolaren Bedingungen.....</i> | <i>127</i> |
| <i>Abbildung 35: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter Stress durch hohe Salzkonzentrationen.....</i> | <i>129</i> |
| <i>Abbildung 36: Wachstum der abgebildeten Stämme bei hoher Salzkonzentration.</i> | <i>130</i> |
| <i>Abbildung 37: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter oxidativem Stress.</i> | <i>131</i> |
| <i>Abbildung 38: Wachstum der abgebildeten Stämme unter oxidativem Stress....</i> | <i>132</i> |
| <i>Abbildung 39: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter Zellwandstress.....</i> | <i>133</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>Abbildung 40: Wachstum der $\Delta skn7\Delta sakA$-Doppelmutante unter Zellwandstress.</i> | <i>133</i> |
| <i>Abbildung 41: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs in Anwesenheit von Fludioxonil.</i> | <i>135</i> |
| <i>Abbildung 42: Wachstum der abgebildeten Stämme unter oxidativem Stress und Fludioxonil.</i> | <i>136</i> |
| <i>Abbildung 43: 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat Färbung des <i>A. fumigatus</i> Wildstammes AfS35.</i> | <i>137</i> |
| <i>Abbildung 44: Ein hyperosmolares Medium schützt nicht vor Fludioxonil.</i> | <i>139</i> |
| <i>Abbildung 45: Effekt von Fludioxonil auf Protoplasten des <i>A. nidulans</i> Wildstammes.</i> | <i>140</i> |
| <i>Abbildung 46: Effekt von Fludioxonil auf Konidien und kurze Hyphen von <i>A. fumigatus</i> in Hemmhofversuchen.</i> | <i>142</i> |
| <i>Abbildung 47: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs in Anwesenheit von Fludioxonil.</i> | <i>144</i> |
| <i>Abbildung 48: Wachstum der abgebildeten Stämme in Anwesenheit von Fludioxonil.</i> | <i>145</i> |
| <i>Abbildung 49: Wachstum von AfS35 und $\Delta skn7$ in Anwesenheit von Fludioxonil.</i> | <i>146</i> |
| <i>Abbildung 50: Darstellung einer Calcofluor Weiß Färbung von (A) <i>A. fumigatus</i> AfS35, (B) $\Delta skn7\Delta sakA$, (C) $\Delta skn7$ und (D) $\Delta sakA$.</i> | <i>147</i> |

A. EINLEITUNG

Mikroorganismen stehen in ständigem Kontakt mit dem menschlichen und tierischen Organismus. Sie beeinflussen das Leben der Menschen und Tiere somit auf vielseitige Art und Weise. Einerseits sind sie Bestandteil der natürlich vorkommenden Flora des Darms und verschiedener Körperoberflächen, andererseits können sie aber auch krankheitsauslösender Natur sein.

Nicht nur Viren, Bakterien und Parasiten können Infektionskrankheiten auslösen, auch einige Pilze sind in der Lage dies zu tun. Schätzungen zufolge gibt es weltweit zwischen 2,2 - 3,8 Millionen verschiedene Pilzarten (HAWKSWORTH *et al.*, 2017).

Pilze kommen ubiquitär in unserer Umwelt vor, das heißt, sie sind überall in der Natur verbreitet und besiedeln annähernd jedes Habitat, vom Erdreich bis hin zu Gewässern (LATGÉ, 1999). Sie gehören zu den Eukaryonten, das heißt, sie unterscheiden sich grundlegend von Bakterien oder Viren. Ihre Zellen ähneln im Aufbau mehr denen der Säuger als der Bakterien. Sie besitzen einen echten Zellkern mit Chromosomen und Organellen wie Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat und 80S Ribosomen. Des Weiteren besitzen sie eine besondere Zellwand, die sich von denen der Pflanzen und Bakterien unterscheidet. Sie setzt sich vor allem aus den Hauptbestandteilen β -1,3-Glukan, Chitin und Galaktomannan zusammen (GROß, 2013, GOW *et al.*, 2017).

Nur ein paar der heute 120.000 bekannten Pilzspezies sind auch als Krankheitserreger bekannt (HAWKSWORTH *et al.*, 2017). Zumeist sind die pathogenen Pilze opportunistische Erreger, eine Infektion bedarf somit einer schon vorhandenen Abwehrschwäche des Patienten. Durch den häufigeren Einsatz von Immunsuppressiva in der Medizin, gewannen somit auch Pilzinfektionen an Bedeutung. Eine Infektion gesunder Menschen findet hingegen nur selten statt, da das Immunsystem in der Lage ist, den Pilz schnell zu eliminieren (MCCORMICK *et al.*, 2010).

Die Erforschung pathogener Pilze schreitet deutlich langsamer voran als die anderer krankheitserregender Mikroorganismen (BROWN *et al.*, 2012), dennoch spielen sie eine nicht zu unterschätzende Rolle als Auslöser schwerer Erkrankungen beim Menschen. Ein besonders großes Risiko, an einer gefürchteten invasiven Mykose

zu erkranken, besteht für immunsupprimierte Patienten. Somit gelten beispielsweise AIDS-Patienten, Patienten, die eine immunsuppressive Therapie erhalten, Patienten nach einer Organ- oder Stammzelltransplantation und Krebspatienten, aber auch Frühchen als besonders gefährdet (NUCCI *et al.*, 2005, HAMMOND *et al.*, 2010, NEOFYTOS *et al.*, 2013).

Zu den Auslösern invasiver Mykosen gehören auf der einen Seite Hefen wie *Cryptococcus* spp. und *Candida* spp. und auf der anderen Seite auch filamentöse Pilze. Zu den klinisch relevantesten filamentösen Pilzen gehört die Gattung *Aspergillus* (ENOCH *et al.*, 2006). Der wichtigste Vertreter ist *Aspergillus fumigatus*, welcher in der Lage ist, ernsthafte Erkrankungen hervorzurufen. Die Letalitätsrate einer durch *A. fumigatus* ausgelösten invasiven Aspergillose ist mit 40 % bis 90 % sehr hoch (LIN *et al.*, 2001). Häufig liegt dies darin begründet, dass die Diagnose nur sehr schwer und damit spät gestellt wird und sich auch die Therapie kompliziert gestaltet. Nicht selten bleibt ein zufriedenstellender Therapieerfolg aus.

Nicht nur in der Humanmedizin spielen Infektionen mit *Aspergillus* eine wichtige Rolle. Sie können auch in beinahe allen Säugetierarten und Vögeln nachgewiesen werden und nehmen somit auch in der Veterinärmedizin eine nicht zu vernachlässigende Rolle ein (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Neben der Infektion immunsupprimierter Tiere, ähnlich wie in der Humanmedizin, können auch bestimmte Vorerkrankungen, belastende Umweltbedingungen und begünstigende anatomische Strukturen zur Entwicklung einer Aspergillose führen. Zu letzteren zählen beispielsweise die Luftsäcke der Vögel oder auch der Luftsack des Pferdes. (ZMEILI *et al.*, 2007).

Leider wird die Therapie invasiver Mykosen durch die geringe zur Verfügung stehende Anzahl von Antimykotika erschwert. Es liegen lediglich drei Wirkstoffgruppen zur systemischen Behandlung vor: Polyene, Azole und Echinocandine. Mittel der ersten Wahl war lange das stark nephrotoxische Polyen Amphotericin B. Aufgrund seiner Nebenwirkungen, wurde es bei humanen Patienten durch das Azol Voriconazol abgelöst (BATES *et al.*, 2001). Leider kommt es durch die geringe Zahl verfügbarer Medikamente und die Verwendung vergleichbarer Substanzen als Pflanzenschutz in der Landwirtschaft in zunehmendem Maße zur Ausbildung von Resistenzen gegen Azole (AZEVEDO *et al.*, 2015). Die Gruppe der Echinocandine, zu denen zum Beispiel Caspofungin

gehört, unterscheidet sich in ihrem Wirkmechanismus von den Polyenen und Azolen, da diese die Zellwand und nicht die Zellmembran des Pilzes als Zielstruktur haben. Jedoch sind sie bei *A. fumigatus* nicht so gut wirksam und lediglich fungistatisch und kommen deshalb eher als Reservemedikament zum Einsatz, wenn andere Stoffe keine Wirksamkeit zeigen (MARR *et al.*, 2004).

Da Resistenzentwicklungen und die eingeschränkte Anzahl vorhandener Behandlungsmöglichkeiten eine erfolgreiche Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen erheblich erschweren, bedarf es dringend der Entwicklung neuer Methoden zur Therapie der Aspergillose bei Menschen und Tieren.

Eine mögliche Zielstruktur für neue antifungale Therapeutika ist der sogenannte *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalweg (SHOR *et al.*, 2015), welcher in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde. Er hilft den Pilzen, sich beispielsweise an eine hyperosmolare Umgebung anzupassen und spielt damit eine große Rolle zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Wasserhaushalt des Pilzes (BAHN, 2008).

Ein ungewöhnlicher Mechanismus, der nicht etwa durch das Ausschalten eines physiologischen Vorgangs, sondern die künstliche Aktivierung dieses HOG-Signalwegs durch beispielsweise antifungale Mittel wie das Phenylpyrrol-Derivat Fludioxonil zustande kommt, führt unter anderem zu einer Störung des osmotischen Gleichgewichts und dadurch einer massiven Schädigung des Pilzes (OKADA *et al.*, 2005). Bisher wird dies in der Landwirtschaft zur Bekämpfung pflanzenpathogener Pilzarten angewendet (KILANI *et al.*, 2016).

Doch auch in der Medizin könnte die künstliche Aktivierung des Signalwegs einen möglichen Angriffspunkt zur Bekämpfung von Mykosen in Mensch und Tier darstellen.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der genaueren Betrachtung der Bedeutung einzelner Komponenten des HOG-Signalwegs für die durch Fludioxonil verursachten Effekte.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. *Aspergillus fumigatus*

1.1. Taxonomie und Bedeutung

Bereits 1729 beschrieb der Florentiner Priester Pietro Antonio Micheli die Gattung *Aspergillus*. Da ihn das Aussehen der Sporenträger an einen Weihwasserwedel, „Aspergill“, erinnerte, benannte er die Gattung danach. Die heute gängige Bezeichnung als „Gießkannenschimmel“ beruft sich ebenfalls auf die unverwechselbare Form der Sporenträger. Der deutsche Arzt und Botaniker Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieb *A. fumigatus* erstmals 1863 (SCHMIDT, 1998). Der Name „fumigatus“ stammt vom lateinischen Wort „fumus“ und bedeutet Rauch. Die Farbe der Sporen, welche bei *A. fumigatus* charakteristisch gräulich-grün ist und die Art, wie diese sich in der Umgebung verteilen, wenn sie aufgewirbelt werden, führten zu dieser Namensgebung.

Lange war lediglich die vegetative Form von *A. fumigatus* bekannt, weshalb er zu den Fungi imperfecti gezählt wurde, die sich nicht sexuell vermehren können. Obwohl bereits das Wissen existierte, dass *A. fumigatus* alle notwendigen Gene zur sexuellen Vermehrung besitzt (GROßE *et al.*, 2008), konnte die sexuelle Form von *A. fumigatus* erst 2009 nachgewiesen werden. Dies führte schließlich zur Zuordnung zu der Klasse der *Ascomycota* (O’GORMAN *et al.*, 2009). Die taxonomische Einordnung von *A. fumigatus* ist in Abbildung 1 dargestellt.

| | |
|------------|---|
| Domäne | <i>Eucaryota</i> |
| Reich | <i>Fungi</i> (Pilze) |
| Abteilung | <i>Ascomycota</i> (Schlauchpilze) |
| Klasse | <i>Ascomycetes</i> (echte Schlauchpilze) |
| Ordnung | <i>Eurotiales</i> |
| Familie | <i>Trichocomaceae</i> |
| Gattung | <i>Aspergillus</i> (Gießkannenschimmel) |
| Hauptarten | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i> |

Abbildung 1: Taxonomische Klassifikation von *A. fumigatus*

(G.S. DE HOOG, 2000)

Es gibt zahlreiche pathogene Pilze. Von den rund 200 *Aspergillus* Arten zählen etwa 40 zu den pathogenen Arten (KLICH, 2006). Auf die von einigen dieser pathogenen Pilze ausgelösten Krankheiten wird in dieser Arbeit noch näher eingegangen.

Viele *Aspergillus* Arten werden bei der industriellen Herstellung von Pharmazeutika und Lebensmitteln herangezogen, da sie in der Lage sind viele Primär- und Sekundärmetabolite zu bilden. So wird *A. oryzae* beispielsweise zur Fermentation von Sake oder von Sojabohnen und Reis zu Sojasoße verwendet, *A. niger* für die Herstellung verschiedener Enzyme wie Amylasen, Pektinasen, Proteasen und Phytasen sowie von Zitronensäure und *A. terreus* für die Gewinnung von Lovostatin, einem Cholesterinsenker (DAGENAIS *et al.*, 2009) und dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (SALLAM *et al.*, 2003).

Doch können Metabolite auch negative Effekte mit sich ziehen. In der Landwirtschaft sind *Aspergillus* Arten vor allem als Lagerpilz gefürchtet. *A. flavus* und *A. parasiticus* produzieren dort das hochtoxische Mykotoxin Aflatoxin, welches karzinogen wirkt und nicht selten zu Leberkrebs führt. Nach chronischer Exposition schwächt es zudem das Immunsystem, behindert die Aufnahme wichtiger Spurenelemente und den Proteinmetabolismus (WILLIAMS *et al.*, 2004). Ein Verzehr des durch Aflatoxin kontaminierten Getreides kann schwerwiegende Erkrankungen oder gar den Tod herbeiführen und stellt vor allem in Entwicklungsländern ein Problem dar (DAGENAIS *et al.*, 2009). Auch die Exposition oder Aufnahme anderer Mykotoxine haben negative Effekte zur Folge. Die Bildung von Gliotoxin nach Inhalation von *A. fumigatus* führt beispielsweise zur Schädigung des Epithels der Lunge und somit zu einem verringerten Zilienschlag (AMITANI *et al.*, 1995).

1.2. Lebenszyklus, Habitat und Morphologie von *A. fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein Schimmelpilz, der weder Photo- noch Chemosynthese betreiben kann, also zu den saprotrophen Organismen gehört. Seine natürliche ökologische Nische ist der Boden, dort wächst und ernährt er sich ausschließlich von totem organischem Material. Er spielt in der Natur somit eine bedeutende Rolle im Recycling von Kohlenstoff und dem Stickstoffkreislauf. *A. fumigatus* ist zwar nicht der am häufigsten vorkommende, aber einer der ubiquitärsten Pilze. Er bildet

Konidien, die leicht durch die Luft verteilt werden, um seine Verbreitung und sein Überleben zu sichern. Jeder Konidienkopf produziert tausende dieser 2-3 μm großen asexuellen Sporen, die durch Erschütterungen und Luftzug über weite Strecken transportiert werden können und sich so überall in der Umwelt befinden (MULLINS *et al.*, 1976, LATGÉ, 1999).

Laut einer spanischen Studie befinden sich je nach Jahreszeit und Ort bis zu 85 Konidien von *A. fumigatus* in einem Kubikmeter Luft (GUINEA *et al.*, 2006). Somit inhaliert jeder Mensch am Tag mehrere hundert Sporen (LATGÉ, 1999).

Die Konidien sind in der Lage für eine lange Zeit in der Umwelt zu überleben, da sie große Mengen an Trehalose enthalten. Der als gut geeigneter Osmolyt wirkende Zucker führt dazu, dass die Zellintegrität der Sporen geschützt wird und sie gut bei verschiedensten Umweltbedingungen bestehen können (NI *et al.*, 2007). Weiterhin besitzt die Oberfläche inaktiver Konidien zwei hydrophobe Proteine, genannt RodAp und RodBp. Diese Hydrophobine sind kovalent an die Zellwand gebunden und werden in ihrer Gesamtheit als sogenannte „rodlet layer“ bezeichnet. Die hydrophobe Oberfläche begünstigt eine Verteilung in der Luft, schützt vor äußeren Einflüssen und maskiert gegen die Erkennung durch das Immunsystem (AIMANIANDA *et al.*, 2009). Des Weiteren enthalten Konidien das Pigment Melanin, welches ebenfalls eine schützende Rolle einnimmt. Es bewahrt sie beispielsweise vor enzymatischem Abbau und reaktiven Sauerstoffspezies (LANGFELDER *et al.*, 2003).

Damit aus der Spore ein vegetativer Pilz werden kann, bedarf es ihrer Auskeimung. Diese ist abhängig von verschiedenen äußeren Einflüssen wie vorhandenen Stickstoff- und Kohlenhydratquellen, Temperatur, Feuchtigkeitsgehalt und pH-Wert. *A. fumigatus* ist ein thermophiler Organismus, dessen Wachstumsbereich zwischen 30 - 55°C liegt. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 37°C. Doch auch ein Überleben des Pilzes bei Temperaturen bis zu 70°C ist noch möglich, *A. fumigatus* ist also zudem thermotolerant (LATGÉ, 1999). Die Fähigkeit unter vielen Temperatur- und Umweltbedingungen zu existieren, sowie viele andere Aspekte, machen *A. fumigatus* zu einem erfolgreichen Organismus.

Sind gute Bedingungen vorhanden, nehmen die Konidien Wasser auf, schwellen zunächst gleichmäßig auf das 1,5 - 3-fache ihrer ursprünglichen Größe an und verlieren ihre hydrophobe Schicht. Im nächsten Schritt formen sich Keimschläuche

an einem Pol der Konidien, die durch terminales Wachstum zur Bildung von Hyphen führen (ROHDE *et al.*, 2002). Sie bilden durch Wachstum ein dichtes Myzel aus verzweigten Hyphen. Diese Hyphen sind durch Septen in einzelne Kompartimente unterteilt und enthalten jeweils mehrere Kerne (coenocytisch). Die Septen besitzen jeweils eine Pore, die die Kommunikation zwischen den einzelnen Abschnitten durch Austausch von Zytoplasma und Zellorganellen wie Kernen, Mitochondrien oder Vakuolen ermöglichen. Gleichzeitig können die Poren auch durch sogenannte Woronin bodies geschlossen werden, die somit dem Schutz des Pilzes bei Verletzung eines dieser Kompartimente dienen (BLOEMENDAL *et al.*, 2013). Ist Myzel entstanden und steht dieses in Kontakt zur Luft, kommt es zur Sporulation, also zur Entstehung neuer Konidien.

Aus einzelnen Zellen des Myzels, die als Fußzellen dienen, bilden sich zunächst senkrecht Konidiophoren. An den Enden der Konidiophoren entstehen sogenannte Konidiophorenvesikel, aus denen sich die länglichen Phialiden ausstülpen. Von den Phialiden schnüren sich letztlich die Konidien ab und bilden lange Konidienketten (RAPER *et al.*, 1965). Die Konidien können nun wieder über die Luft verbreitet werden und ein neuer Lebenszyklus ist möglich.

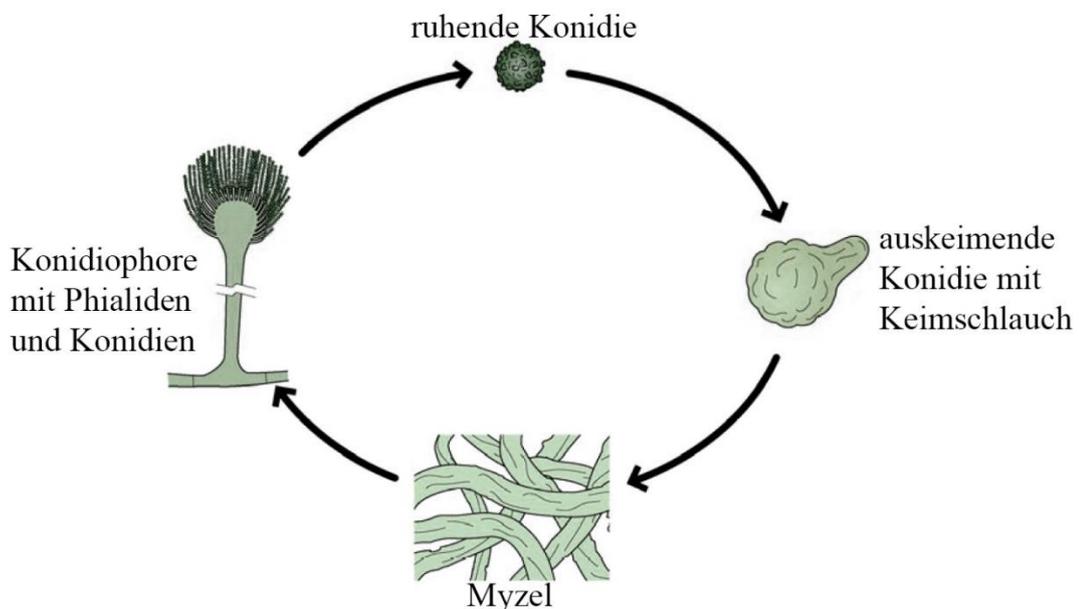


Abbildung 2: Lebenszyklus und Morphologie von *A. fumigatus*
(SCHWIENBACHER, 2005)

1.3. Bedeutung in der Humanmedizin

Jeder Mensch steht täglich mit den Sporen des ubiquitär vorkommenden Pilzes *A. fumigatus* in Kontakt. Obwohl so täglich mehrere hundert Sporen inhaliert werden (HOSPENTHAL *et al.*, 1998, LATGÉ, 1999), besteht kaum eine Gefahr für gesunde, immunkompetente Menschen.

Da *A. fumigatus* vor allem Menschen mit einem geschwächten Immunsystem, insbesondere neutropenische Patienten, angreift, gilt er als opportunistischer Krankheitserreger (DENNING, 1998). Bei ihnen kann eine Inhalation von Konidien zu verschiedenen Erkrankungen führen.

Man kann zwischen invasiven Erkrankungen, wie der invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA), nicht-invasiven Erkrankungen, zu denen die allergisch bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und das Aspergillom (Pilzball) zählen, und extrapulmonalen Ausprägungen der Aspergillose wie einer kutanen Infektion, Sinusitis, Keratitis oder Otitis, unterscheiden (RÜCHEL *et al.*, 1999).

Durch die Weiterentwicklung der Medizin und die Zunahme von Therapien zur Behandlung von Krebserkrankungen, Knochenmarks- und Organtransplantationen sowie AIDS Erkrankungen, gibt es heutzutage mehr Patienten, deren körpereigene Abwehr stark eingeschränkt ist und es kommt häufiger zu Infektionen mit *A. fumigatus*. Bei Patienten mit einem derart beeinträchtigten Immunsystem ist er in der Lage lebensbedrohliche, systemische Aspergillosen zu verursachen (LATGÉ, 1999, NUCCI *et al.*, 2005, HAMMOND *et al.*, 2010, NEOFYTOS *et al.*, 2013, RUHNKE *et al.*, 2015).

Kommt es zur Inhalation von Konidien von *A. fumigatus*, werden diese einerseits durch anatomische Barrieren wie die Zilien des respiratorischen Flimmerepithels abtransportiert, können jedoch aufgrund ihrer Größe von 2-3 µm das respiratorische Flimmerepithel und die mukoziliäre Clearance auch zum Teil passieren und so bis in die Bronchiolen und Lungenalveolen gelangen (LATGÉ, 1999). Zu einer Schwächung der mukoziliären Clearance kann es neben der mechanischen Reizung zusätzlich durch die Bildung des Mykotoxins Gliotoxin kommen, welches durch Epithelschädigung die Frequenz des Zilienschlags verringert (AMITANI *et al.*, 1995). Wurden die Konidien nicht vom Flimmerepithel abtransportiert und konnten bis in die Alveolen vordringen, treffen diese im gesunden Wirt auf Epithelzellen und Alveolarmakrophagen, wobei letztere sie durch Phagozytose eliminieren und gleichzeitig auch in der Lage sind, proinflammatorische Stoffe wie Chemo- und Zytokine freizusetzen. Diese führen zur Rekrutierung von

neutrophilen Granulozyten, welche für den seltenen Fall, dass Hyphen vorhanden sind, imstande sind, diese nicht von Makrophagen verdauten und schon ausgekeimten Konidien und Hyphen zu eliminieren (WESTON, 1990, DAGENAIS *et al.*, 2009). Diese örtliche Entzündungsreaktion bedingt somit in der Regel eine effiziente Eliminierung der eingeatmeten Konidien, tritt so im gesunden Menschen jedoch nur sehr vereinzelt auf.

Eine Beeinträchtigung oder Dysfunktion dieser Abwehrmechanismen, die keine Vernichtung der Konidien erlaubt, führt mit den Eigenschaften der Konidien allerdings dazu, dass diese überleben, auskeimen und in der Lunge wachsen können (DAGENAIS *et al.*, 2009).

In Abbildung 3 ist die Aufnahme der Konidien durch Inhalation dargestellt.

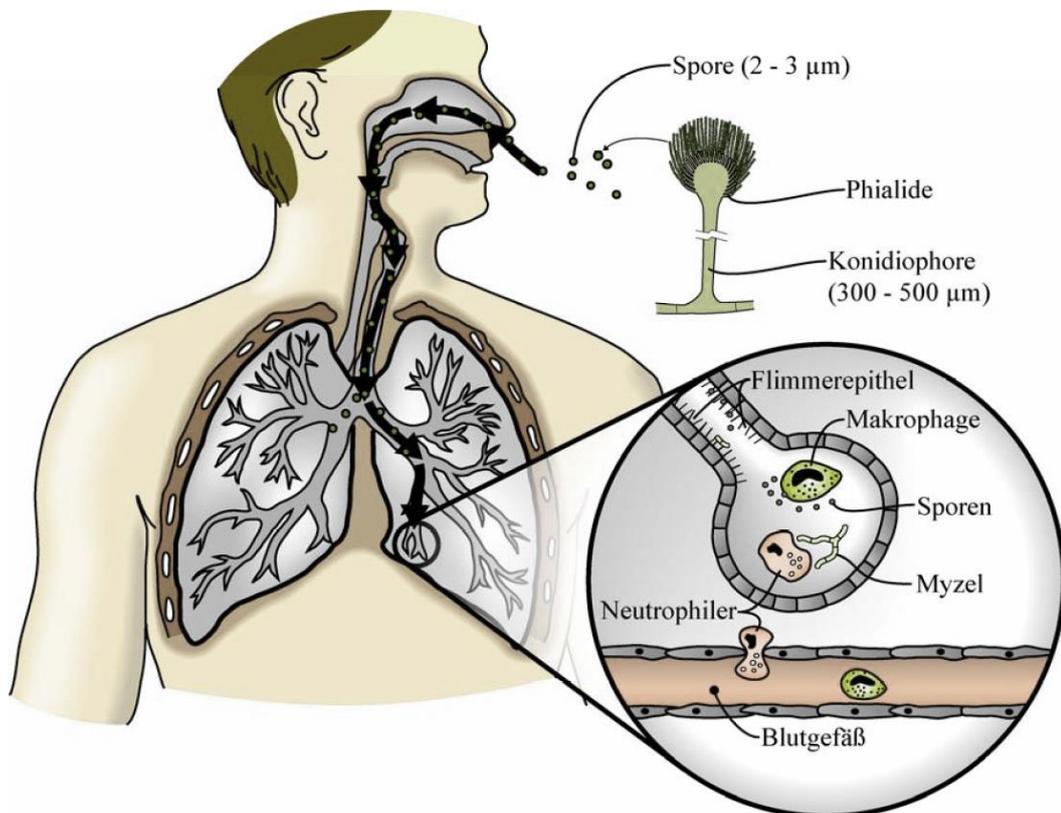


Abbildung 3: Konfrontation mit *A. fumigatus* Konidien durch Inhalation
(SCHWIENBACHER, 2005)

Auch allergische Erkrankungen durch Sporen und Hyphenproteine von *A. fumigatus* sind möglich. Hierbei kommt es zu keinem Wachstum des Pilzes, sondern zu allergischen Reaktionen durch wiederholte Exposition gegenüber Konidien bzw. Hyphen.

Zu den allergischen Erkrankungen gehören die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), bronchiales Asthma sowie die allergische Sinusitis und Alveolitis (LATGÉ, 1999).

In Abbildung 4 sind die wichtigsten Krankheiten, die *A. fumigatus* im Menschen auslösen kann, aufgeführt.

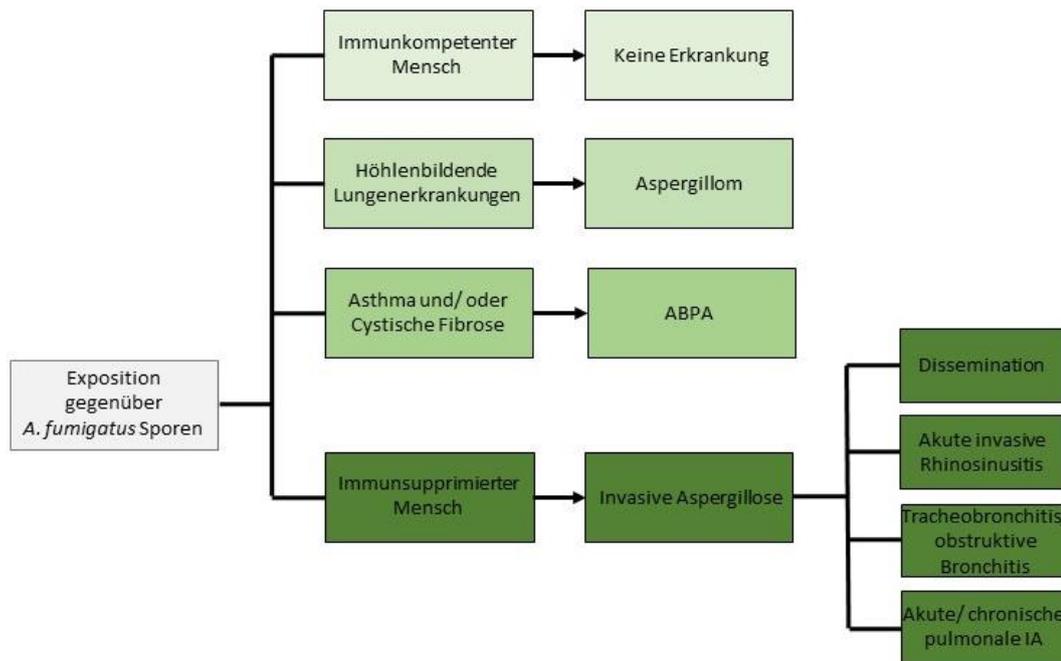


Abbildung 4: Von *A. fumigatus* verursachte Erkrankungen beim Menschen (BECK, 2014)

1.3.1. Die invasive Aspergillose (IA)

A. fumigatus wurde in den letzten Jahrzehnten zu dem wichtigsten durch die Luft verbreiteten fungalen Krankheitserreger. Die invasive Aspergillose (IA) ist die schwerwiegendste und am häufigsten vorkommende Erkrankung, die durch *A. fumigatus* hervorgerufen wird.

Sie betrifft nahezu ausschließlich immunsupprimierte Patienten.

Stark gefährdet sind Patienten:

- mit hämatologischen Neoplasien (vor allem Leukämie),
- nach Stammzell- und Organtransplantationen,
- die eine langandauernde Therapie mit Corticosteroiden erhalten,

- mit genetischen Immunitätsschwächen (wie z. B. der Chronischen Granulomatose (*chronic granulomatous disease*, CDG)) und
- AIDS Patienten
(DAGENAIS *et al.*, 2009).

Je nach auslösender Krankheit gibt es zwei Möglichkeiten für die zugrundeliegende Immunsuppression. Sie kann einerseits durch eine Neutropenie (also eine verringerte Zahl neutrophiler Granulozyten im Blut) bedingt sein, oder durch eine Beeinträchtigung der neutrophilen Granulozyten. Zu einer solchen Störung kann es zum einen durch die Gabe von Kortikosteroiden kommen, oder im Falle der Chronischen Granulomatose durch einen genetischen Defekt der NADPH-Oxidase (LEIDING *et al.*, 1993). Auch die Krankheitsverläufe bzw. pathologischen Veränderungen im Patienten unterscheiden sich je nach zugrundeliegender Immunsuppression voneinander.

Neutropenien sind vor allem typisch für Krebspatienten, da diese oft über einen langen Zeitraum mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid behandelt werden. Dieses lagert sich in die DNS ein und stört somit die Replikation, was letztlich zur Verringerung weißer Blutzellen, also auch neutrophiler Granulozyten führt. Dadurch ist die Entzündungsreaktion stark abgeschwächt und ein Hyphenwachstum ist ungehemmt möglich. Durch Invasion von Blutgefäßen und anschließende Dissemination in verschiedenste Organe kommt es unter anderem zu Blutungen und Thrombosen, die tödlich enden können (DAGENAIS *et al.*, 2009). Einen ganz anderen Verlauf nimmt die invasive Aspergillose bei Patienten, die eine lange Vorbehandlung mit Corticosteroiden erhielten. Das Immunsystem wird hier zwar in vielerlei Hinsicht beeinträchtigt, neutrophile Granulozyten werden jedoch weiterhin rekrutiert. Durch ihre Einwanderung in das betroffene Gewebe entstehen massive Entzündungsreaktionen, pyogranulomatöse Infiltrate und Gewebsnekrosen, wobei das Gewebe durch diese Reaktionen so stark geschädigt werden kann, dass eine Heilung nicht mehr möglich ist und der Patient stirbt (DAGENAIS *et al.*, 2009).

In Abbildung 5 ist dargestellt, welche pathologischen Folgen die IA bei welcher zugrundeliegenden Immunsuppression mit sich zieht.

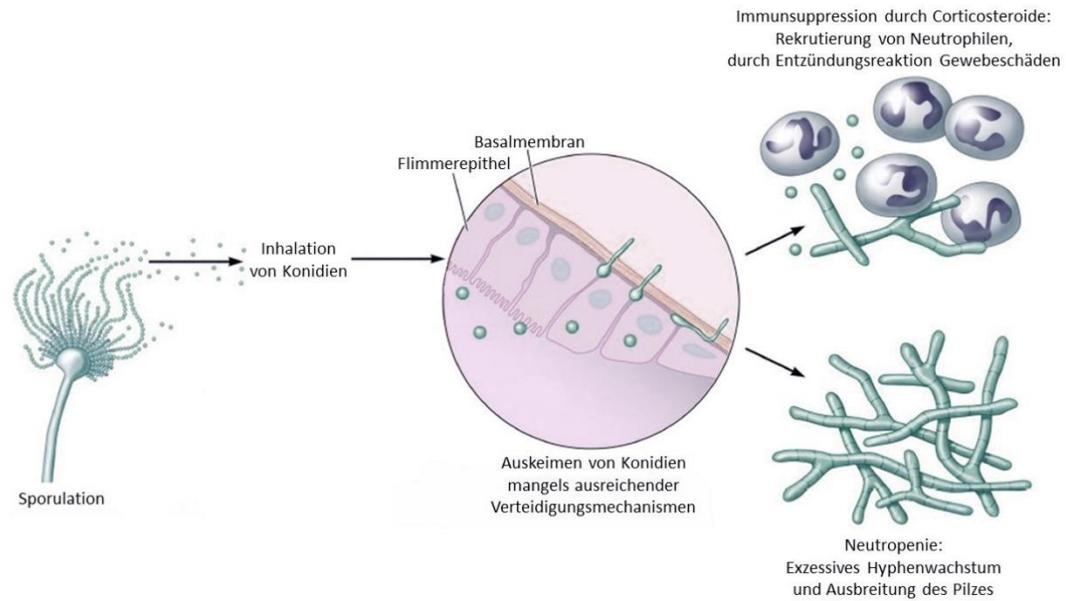


Abbildung 5: Entwicklung einer invasiven Aspergillose in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Immunsuppression

(modifiziert nach Dagenais und Keller, (DAGENAIS *et al.*, 2009))

Die invasive Aspergillose tritt je nach Ausgangssituation in vier verschiedenen Formen auf.

Diese sind zum einen die am häufigsten vorkommende akute oder chronische invasive pulmonale Aspergillose (IPA), die disseminierte Form mit Beteiligung anderer Organe wie dem Gehirn, der Leber, der Nieren oder des Herzens infolge hämatogener Streuung, die obstruktive Bronchitis oder Tracheobronchitis mit unterschiedlichen Invasionsgraden der Schleimhäute und die akute invasive Rhinosinusitis (DENNING, 1998).

Nach einer Infektion kommt es, wie auch bei anderen Aspergillosen, zunächst zu einem Wachstum innerhalb der Atemwege. Die invasive Aspergillose nimmt dann jedoch, wie ihr Name schon sagt, einen invasiven Verlauf, mit Durchbrechung anatomischer Barrieren, Infiltration von Parenchymenten, sowie hämatogener Streuung durch Invasion von Blutgefäßen (RÜCHEL *et al.*, 1999). Die Symptome sind, solange es sich nicht um die disseminierte Form der IA handelt, mit trockenem Husten, Dyspnoe, Brustschmerz, Hämoptysen und Fieber oftmals sehr unspezifisch. Bei der disseminierten Form, die häufig das Gehirn betrifft, sind die Symptome organspezifisch und auch bei geeigneter antifungaler Therapie liegen die Mortalitätsraten bei bis zu 90 % (THOMPSON *et al.*, 2008).

1.3.2. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) ist die schwerwiegendste allergische Lungenkomplikation, die durch *A. fumigatus* verursacht wird. Sie äußert sich in einer allergischen Reaktion auf inhalierte Konidien sowie Hyphenproteine und betrifft hauptsächlich Patienten mit veränderter Lungenfunktion. Dies sind beispielsweise Patienten, die an atopischem Asthma (1 - 2 %) oder cystischer Fibrose (2 - 25 %) leiden (LATGÉ, 1999, MATURU *et al.*, 2015).

Die ABPA entsteht durch eine überempfindliche Reaktion des Immunsystems auf Antigene von *A. fumigatus* (LATGÉ, 1999), welcher bei Patienten mit cystischer Fibrose häufig den zähen Schleim im Lumen der Bronchien besiedelt.

Die Pathogenese ist nicht vollständig geklärt, aber scheint durch eine starke allergische Reaktion gegen *Aspergillus* Hyphen, ausgelöst durch T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten, bedingt (WARDLAW *et al.*, 1992). Die ABPA kann in jedem Alter auftreten und zu pulmonaler Hypertonie, Cor pulmonale und im Endstadium der fibrotischen Lungenveränderungen auch zum Tod durch Lungenversagen führen, weshalb eine frühe Diagnose für die Behandlung der ABPA essentiell ist (WARDLAW *et al.*, 1992, VAUGHAN, 1993).

Die akute Form der ABPA tritt häufig als Verschlechterung eines unauffälligen chronischen Verlaufs der Krankheit auf und ist vor allem durch teils schwere proximale Bronchiektasien gekennzeichnet, die von zähem Schleim in den oberen Atemwegen ausgelöst werden. Dieser enthält die für Asthma typischen Charcot-Leyden Kristalle (bestehend aus kristallisiertem Protein, das in eosinophilen Granulozyten überexprimiert wird) und Hyphen, die jedoch nicht die Wände der Bronchien infiltrieren (WARDLAW *et al.*, 1992, SU, 2018).

Für die Diagnose der ABPA stehen die Rosenberg-Patterson Kriterien zur Verfügung. Hierbei sind bronchiales Asthma, eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Gehalts im Serum und spezifischer IgE und IgG gegen *Aspergillus*-Antigene, eine unmittelbare positive Hautreaktion auf injizierte Antigene von *Aspergillus* sowie zentrale Bronchiektasien essentiell (ROSENBERG *et al.*, 1977). Zu den weiteren diagnostischen Kriterien zählen Blut- und Sputumeosinophilie, Hyphen im Sputum, flüchtige Lungeninfiltrate und Serumantikörper gegen *A. fumigatus* (VAUGHAN, 1993).

Klinisch tritt die ABPA als bronchiales Asthma in Erscheinung, das von transienten

Lungeninfiltraten begleitet wird, die zu Bronchiektasien und schlussendlich zu einer Fibrose der Lunge führen (WARDLAW *et al.*, 1992). Weitere Symptome sind oftmals mit Fieber verbundenes Unwohlsein, Thoraxschmerzen, Atemnot und Husten, bei dem teilweise Schleimpfropfen abgehustet werden. Auch Hämoptysen und Myalgien können beobachtet werden. Oftmals genügt es schon, die Sporenbelastung zu verringern, um die Symptomatik zu lindern.

1.3.3. Das Aspergillom

Beim Aspergillom, welches oft auch als Pilzball bezeichnet wird, handelt es sich um eine lokal begrenzte Mykose, die nur in vorgeformten Hohlräumen des Atmungstrakts vorkommt. Diese begünstigen die Entstehung eines Aspergilloms und entstehen durch pulmonale Vorerkrankungen wie Sarkoidose, Histoplasmose, Tuberkulose, cystische Fibrose oder andere bullöse Lungenkrankheiten. Auch in chronisch obstruierten Nasennebenhöhlen tauchen Aspergillome auf.

Die Patienten sind häufig asymptomatisch, weshalb die Diagnose oft durch einen Zufallsbefund bei einer Computertomographie- oder Röntgenaufnahme gestellt wird. Aspergillome erscheinen dort als kugelige Massen, welche von halbmondförmigen strahlendurchlässigen Arealen umgeben sind. Bei peripher liegenden Aspergillomen ist auch eine Pleuraverdickung charakteristisch. Aspergillome sind ein kugelförmiges Konglomerat aus Hyphen, Fibrin, Mukus und Zelltrümmern, welches in einer proteinartigen Matrix eingebettet ist, in deren Peripherie auch sporulierende Strukturen existieren (LATGÉ, 1999, STEVENS *et al.*, 2000).

Das Wachstum der Hyphen in den bereits bestehenden Hohlräumen ist in der Regel nicht invasiv, jedoch kann sich aus Aspergillomen in einigen Fällen auch eine invasive Aspergillose entwickeln. Geschieht dies, kommt es nicht selten zu Rissen in Bronchialarterien oder Arterien der Hohlraumwand, was Hämoptysen zur Folge hat, die lebensbedrohlich werden können (CHOTIRMALL *et al.*, 2013).

Eine mögliche Therapie eines Aspergilloms ist die chirurgische Resektion, jedoch bringt diese hohe Morbiditäten und Mortalitäten mit sich, weshalb sie Patienten mit starker Hämoptyse und guter Lungenfunktion vorbehalten sein sollte. Bei Patienten mit stark eingeschränkter Lungenfunktion ist die chirurgische Resektion kontraindiziert. Zu den intra- und postoperativen Risiken gehören vor allem

Blutungen und bronchopleurale Fisteln. Oftmals entstehen postoperativ dichte Verklebungen und Verwachsungen der Gefäße im Operationsgebiet und auch Wundinfektionen durch *Aspergillus* sind möglich. Alternative Therapiemöglichkeiten sind beispielsweise die CT-gesteuerte Applikation von Antimykotika direkt in die Hohlräume, in denen sich die Aspergillome befinden, Applikation in die Bronchien, Inhalation von Antimykotika, eine systemische Gabe von Antimykotika oder Strahlentherapie (STEVENS *et al.*, 2000).

1.4. Bedeutung in der Veterinärmedizin

Wie in der Humanmedizin, spielen Infektionen mit *Aspergillus* auch in der Tiermedizin eine nicht zu unterschätzende Rolle. Sie können in annähernd allen domestizierten Tieren und Vögeln sowie wilden Tierarten nachgewiesen werden. Auch hier verursachen *Aspergillus* verschiedenste Krankheitsbilder wie lokale oder systemische Infektionen oder Allergien (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Oftmals ist die primäre Infektion im Respirationstrakt lokalisiert und kann dann systemisch werden, wobei die Prädilektionsstellen von Tierart zu Tierart variieren. Auch bei den Tieren ist eine Immunschwäche ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer Aspergillose (YAMAUCHI *et al.*, 2011). Vorerkrankungen, wie zum Beispiel die Tuberkulose, erhöhen ebenfalls das Risiko, an einer Aspergillose zu erkranken (ZMEILI *et al.*, 2007). Es können sich aber auch Umweltbedingungen wie eine defizitäre und unhygienische Haltung negativ auf das Immunsystem auswirken und dazu führen, dass gesunde Tiere eine Aspergillose entwickeln (JACOBSON *et al.*, 2000).

Die am häufigsten vorkommenden Formen der Aspergillose bei Tieren sind Infektionen des Respirationstraktes bei Vögeln (ARNÉ *et al.*, 2011), Luftsackmykosen bei Pferden, Aborte und Mastitiden bei Rindern, sinonasale Infektionen bei Katzen und Hunden und durch Pneumonien bedingte disseminierte Infektionen in Meeressäugern (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

1.4.1. Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel

Einer der häufigsten Auslöser respiratorischer Erkrankungen beim Vogel ist *A. fumigatus* (BEERNAERT *et al.*, 2010). Sowohl die Anatomie der Vögel als auch

bestimmte Charakteristika des Pilzes begünstigen eine Infektion mit *Aspergillus*. Der Atmungstrakt der Vögel unterscheidet sich maßgeblich von dem anderer Tierarten. Er besteht aus einem Lungen-Luftsacksystem, wobei die Funktion der Luftsäcke derer eines Blasebalgs ähnelt. Der erzeugte Luftstrom begünstigt eine Verteilung der Pilzsporen im Respirationstrakt. Des Weiteren haben Vögel kaum mukoziliäre Clearance (MAINA, 2006) und auch nur wenige respiratorische Makrophagen, womit ihre Abwehr gegenüber Sporen stark eingeschränkt ist und die eingeatmeten Konidien nur in geringem Maße eliminiert werden können (BROWN *et al.*, 1997, MAINA, 2006). Auch die Bildung von Gliotoxin durch *A. fumigatus* kann das Eindringen der Konidien in die Lunge begünstigen. Es hat mehrere immunsupprimierende Eigenschaften. Es schädigt die Epithelien, reduziert die Bildung mukoziliärer Clearance und verhindert die Phagozytose durch Makrophagen (AMITANI *et al.*, 1995). Zudem sind die Konidien von *A. fumigatus* aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage, problemlos physikalische Barrieren zu überwinden und tief in das Atmungssystem zu gelangen (KWON-CHUNG *et al.*, 2013).

Die Luftsäcke sind bei einer Infektion meist zuerst betroffen, da sie als erstes mit der eingeatmeten Luft, und somit auch den inhalierten Konidien, in Kontakt kommen, die sie dann wie Blasebälge durch die Lunge leiten (NARDONI *et al.*, 2006). Im Lungenparenchym werden die Konidien dann in den Atrien und Infundibula des Parabronchus von oberflächlichen Epithelzellen phagozytiert (MAINA, 2002). Anfällig für Aspergillosen sind prinzipiell alle Vogelarten (ARNÉ *et al.*, 2011).

Eine erhöhte Sporenkonzentration in der Umwelt wirkt prädisponierend. Bei Tieren in Gefangenschaft kommt es oft durch eine nicht artgerechte Haltung zu einer hohen Sporenbelastung. Dazu zählen beispielsweise schlechte Hygienebedingungen, falsch oder länger gelagertes Futter oder eine feuchte und warme Umgebung mit mangelhafter Luftzufuhr (BEERNAERT *et al.*, 2010). Doch auch bei Wildvögeln wie Möwen, sowie in Gefangenschaft gehaltenen Papageien und Pinguinen kommen Luftsackaspergillosen vor (ARNÉ *et al.*, 2011).

Zu großen ökonomischen Verlusten in der Landwirtschaft, zum Beispiel in der Truthahnproduktion, kommt es vor allem durch spontane Ausbrüche, in denen die Mortalitätsrate bei bis zu 90% liegen kann. Auch in der Produktion anderer Geflügelarten spielt die Aspergillose eine Rolle. Verluste kommen jedoch auch

durch die erkrankungsbedingten verminderten Futtermittelnutzungen und Wachstumsraten zustande (ARNÉ *et al.*, 2011, SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Wie auch bei Menschen und anderen Tierarten kann ein geschwächtes Immunsystem prädisponierend für die Entwicklung einer Aspergillose sein. Eine Immunsupprimierung kann durch Stress durch beispielsweise eine Überbelegung des Stalls, falsche Ernährung (welche zu einer Hypovitaminose A führt) oder die langfristige Gabe von Antibiotika oder Glukokortikoiden hervorgerufen werden. Ist nun ein erhöhtes Sporenaufkommen oder geschwächtes Immunsystem vorhanden, können die Abwehrmechanismen die Konidien nicht erfolgreich eliminieren (BEERNAERT *et al.*, 2010).

Die Konidien keimen aus und entwickeln sich zu Hyphen, was zur Entwicklung von lose aufliegenden Plaques führen kann, wodurch es zu Obstruktionen der Bronchien oder der Trachea sowie zu einem Ausfüllen der Luftsäcke kommen kann. Auch kann es gelegentlich zur Sporulation kommen (NARDONI *et al.*, 2006, CACCIUTTOLO *et al.*, 2009). Schreitet das Hyphenwachstum im Inneren der Luftsäcke so weit voran, dass die Pilzhyphen diese ausfüllen, können sie die Luftsäcke penetrieren, was zu oberflächlichen Nekrosen und Serositiden der benachbarten Organe führen kann (TSAI *et al.*, 1992). Neben lokalen Infektionen sind aber auch disseminierte Aspergillosen möglich, bedingt durch hämatogene Streuung gefäß- und gewebeinvasiv wachsender Hyphen (BEERNAERT *et al.*, 2010). Zudem ist eine Verbreitung in andere Organe durch Makrophagen, die Konidien phagozytiert haben und durch das Interstitium in die Lymphbahnen und das Blut wandern, möglich (RICHARD *et al.*, 1983).

Die klinische Manifestation der Aspergillose bei Vögeln hängt von Faktoren wie der Immunantwort und eventuellen Vorerkrankungen des Vogels, der Infektionsdosis und der Sporenverteilung ab.

Bei Vögeln werden drei Krankheitsformen der Aspergillose unterschieden:

- die akute Aspergillose,
- die chronische Aspergillose und
- die Mykotoxikose

(SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Die akute Aspergillose entsteht durch das Inhalieren großer Sporenmengen, tritt

zumeist bei jungen Vögeln auf und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Klinisch äußert sich die akute Aspergillose meist unspezifisch, mit Symptomen wie Lethargie, Anorexie, Kümern, Bewegungsstörungen, respiratorischen Veränderungen, Polyurie und Polydypsie und plötzlichen Todesfällen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Bei älteren Tieren beinhalten die respiratorischen Symptome auch Dyspnoe mit Schnabelatmung, Schwanzwippen, Zyanosen, Keuchen bzw. pfeifende Atmung und nicht produktiven Husten (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Die chronische Aspergillose tritt nur sporadisch auf und wird für gewöhnlich mit einer Immunsuppression in Verbindung gebracht. Sie betrifft meist ältere Tiere, vor allem Elterntiere, deren Immunsystem durch schlechte Haltung beeinträchtigt ist und geht mit einer niedrigeren Mortalität einher. Die klinischen Symptome sind oft unspezifisch. Die Tiere zeigen Gewichtsabnahmen, reduziertes Allgemeinbefinden, verringerte Belastbarkeit und Dyspnoe nach Aktivität. Auch das Nervensystem kann in Mitleidenschaft gezogen werden, was sich durch Ataxien, Paresen, Torticollis oder Opisthotonus äußert und in einigen Fällen zu Erblindung führt. Weiterhin kann eine chronische Infektion zu Keratitis, Blepharitis und Keratokonjunktivitis führen (BECKMAN *et al.*, 1994, DALTON *et al.*, 2011), und auch chirurgische Wunden und die Haut können kolonisiert werden (MOHAMMED *et al.*, 1980). Bei der mit exsudativer Rhinitis verbundenen nasalen Aspergillose kann es zu Verformungen der Federn, der Nasenlöcher und der Wachshaut kommen (TSAI *et al.*, 1992).

Die dritte Form der Aspergillose bei Vögeln ist die Mykotoxikose. Sie wird durch die Aufnahme von mit Mykotoxinen kontaminiertem Futter ausgelöst. *A. fumigatus* ist in der Lage, verschiedene Mykotoxine zu bilden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). So kann er beispielsweise in der Lunge von Vögeln hohe Mengen Gliotoxin produzieren (RICHARD *et al.*, 1996), welches durch Beeinträchtigung der Phagozyten immunsuppressiv wirkt und somit zur Entwicklung einer Aspergillose beitragen kann (SCHLAM *et al.*, 2016). Ein weiteres Mykotoxin, welches von *Aspergillus* spp. wie *A. flavus* gebildet wird, ist Aflatoxin. Es ist durch seine Leber- und Nierenschäden verursachenden Eigenschaften hochtoxisch (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). In den 1960er Jahren führte es zu einer großen veterinärmedizinischen Krise im Vereinigten Königreich, bei der rund 100.000 Truthähne an der durch Aflatoxin ausgelösten „Turkey X disease“ starben

(BRADBURN *et al.*, 1994, RICHARD *et al.*, 1996). Auch Toxine wie Ochratoxin oder Sterigmatocystin können Mykotoxikosen in Geflügel auslösen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Da die aviäre Aspergillose von vielen unspezifischen klinischen Symptomen begleitet sein kann, ist die Diagnose sehr schwer. Eine Kombination verschiedener Methoden kann dabei helfen, sie zu diagnostizieren. Hier ist es möglich, beispielsweise Endoskopie, Röntgen, Computertomographie, Serologie, Zytologie, Histopathologie und Pilzkulturen heranzuziehen (ARNÉ *et al.*, 2011). Es sind oftmals pathologische Befunde wie Plaques, die auf belüfteten Strukturen durch Sporulation des Pilzes auch grün sein können, Granulome, oder käsige, weißlich-gelbe, unterschiedlich große Knötchen und nekrotisches Material in Atemwegen, Luftsäcken und Lunge aufzufinden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Betreffen die Infektionen auch andere Organe, sind auch dort Veränderungen wie Plaques oder Knoten zu finden (BEYTUT *et al.*, 2004, CACCIUTTOLO *et al.*, 2009).

1.4.2. Die Aspergillose des Pferdes

Die häufigsten durch *Aspergillus* ausgelösten Krankheiten beim Pferd sind:

- Luftsackmykosen und
- Pneumonien

(DOBESOVA *et al.*, 2012).

Die Prävalenz der lebensbedrohlichen equinen Aspergillose liegt in Europa zwischen 0,5 % und 17 % (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Die Luftsackmykose verläuft in der Regel asymptomatisch. Sie befällt für gewöhnlich den dorsalen Teil der medialen Luftsackbucht, in der sie sich durch fest mit dem Gewebe verbundene gelb-braune, klar abgesetzte, nekrotische Läsionen darstellt (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Diese können zur Diagnose endoskopisch dargestellt werden. Kommt es zu Erosionen der dort verlaufenden A. carotis interna oder externa oder der A. maxillaris, sind starke Blutungen zu beobachten, die in 34 - 60 % zum Tod durch Verbluten führen (GUILLOT *et al.*, 1997, SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Zu den prädisponierenden Faktoren für die Entwicklung einer Aspergillose zählen Enteritiden (HATTEL *et al.*, 1991), Immunsuppression, lang andauernde Antibiotikagabe, Endokrinopathien und

Neoplasien (CARRASCO *et al.*, 1996). Hingegen scheint es keine Rasse- oder Geschlechtsdisposition zu geben (LEPAGE *et al.*, 2004). Sind im Verlauf der Krankheit auch die kranialen Nerven betroffen, kommt es zu Dysphagien mit Nasenausfluss, Fazialisparesen, Horner-Syndrom oder Kehlkopfpeifen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Zu den Symptomen der pulmonalen Aspergillose bei Pferden zählen milde respiratorische Symptome wie Tachypnoe in Verbindung mit Atemgeräuschen und Fieber (JOHNSON *et al.*, 1999). Da die invasive pulmonale Aspergillose (IPA) schwer zu diagnostizieren ist, sollten neben den klinischen Anzeichen auch epidemiologische Gesichtspunkte, wie die Haltungsbedingungen des Pferdes, die unter Umständen die Entwicklung einer Aspergillose begünstigen, berücksichtigt werden (SWEENEY *et al.*, 1999).

Auch die Keratomykose, der meist eine Verletzung der Hornhaut vorhergeht, kommt beim Pferd relativ häufig und vor allem in wärmeren Klimazonen vor. Dabei reichen die Veränderungen von punktförmigen oberflächlichen Verletzungen bis hin zu ulzerativen Einschmelzungen und Korneaabszessen (SANSOM *et al.*, 2005). Letztere entstehen, wenn es zu einer Spontanheilung kleinerer Ulzera kommt und dabei Pilzhyphen im Stroma eingeschlossen werden. Langandauernde Antibiotikagabe kann zu einer Veränderung der normalen Konjunktivalflora führen und eine Pilzinfektion begünstigen; auch Glukokortikoidgabe unterstützt das Pilzwachstum (SANSOM *et al.*, 2005). Bei betroffenen Tieren werden vermehrter Tränenfluss, Blepharospasmus und Lichtscheue beobachtet (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Eine weitere, eher ungewöhnliche Form der Aspergillose des Pferdes ist die mit Dyspnoe und ein- oder beidseitigem mukopurulentem, teils auch blutigem Nasenausfluss einhergehende nasale Aspergillose (KENDALL *et al.*, 2008).

Die Diagnose einer Luftsackmykose oder Infektion der oberen Atemwege beim Pferd ist wegen der Ähnlichkeit zu anderen Erkrankungen schwierig. Es kommen beispielsweise auch Infektionen der retropharyngealen Lymphknoten, eine pharyngeale lymphoide Hyperplasie, pharyngeale Polypen, Pneumonien, oder virale und bakterielle Infektionen in Frage (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Der Nachweis der Erkrankung basiert auf der Evaluierung des klinischen Verlaufs und der Endoskopie (LUDWIG *et al.*, 2005, DOBESOVA *et al.*, 2012). Um eine klare

Diagnose zu stellen, sollte zusätzlich eine kulturelle Anzucht des Erregers erfolgen und histologisch Hyphen im Gewebe nachgewiesen werden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Auch serologische Tests können von Nutzen sein um die Aspergillose des Pferdes zu diagnostizieren (GUILLOT *et al.*, 1999).

1.4.3. Die Aspergillose der Wiederkäuer

In Wiederkäuern, vor allem Kühen, sind *Aspergillus* spp. und insbesondere *A. fumigatus*, dafür bekannt:

- Mastitiden,
- Plazentitiden und Aborte,
- Gastroenteritiden,
- Pneumonien und
- Mykotoxikosen auszulösen

(SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Rinder mit einem gesunden Immunsystem sind normalerweise resistent gegenüber Infektionen mit *A. fumigatus*. Milchkühe in der frühen Laktation, zwei bis vier Wochen nach der Kalbung, sind jedoch anfälliger für Infektionen, besonders das *Hemorrhagic bowel syndrome*, welches auch durch *Aspergillus* hervorgerufen werden kann (PUNTENNEY *et al.*, 2003).

A. fumigatus kommt recht häufig in Silage und Heu vor (COLE *et al.*, 1977). Eine Infektion erfolgt über die Nahrungsaufnahme. Die gastrointestinale Aspergillose betrifft hauptsächlich den Blättermagen, gefolgt von Pansen, Netzmagen und Labmagen (JENSEN *et al.*, 1994). Die betroffenen Tiere wurden oft über längere Zeit mit Breitspektrumantibiotika behandelt, hatten Durchfall oder Meläna und zeigten verminderte Pansenkontraktionen (JENSEN *et al.*, 1994). Die gastrointestinale Aspergillose kann durch Läsionen und hämatogene Streuung auch zu Sekundärinfektionen in anderen Organen führen.

So konnte gezeigt werden, dass die mykotische Plazentitis und Pneumonie auch sekundäre Infektionen nach einer gastrointestinalen Aspergillose sein können (HILL *et al.*, 1971, SARFATI *et al.*, 1996).

Die bronchopulmonale Aspergillose geht mit klinischen Zeichen wie schneller,

flacher und röchelnder Atmung, feuchtem Husten, Nasenausfluss und Fieber einher (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Sie nimmt häufig einen schnellen und schweren Verlauf. Die Lungen betroffener Tiere sind fleckig, schwer und hart und kollabieren nicht. Von der subakuten bis zur chronischen Form der mykotischen Pneumonie zeigen die Lungen multiple Granulome, die denen der Tuberkulose stark ähneln (MUNTZ, 1999). Histologisch zeigen sich neben den zahlreichen Hyphen zudem Oxalatkristalle, die aus der von etlichen *Aspergillus* spp., insbesondere *A. niger*, produzierten Oxalsäure entstehen (MUNTZ, 1999). Sie können lokal schwere Gewebeschäden hervorrufen, die teilweise zu starken Lungenblutungen führen können. Zudem übt die Oxalsäure einen toxischen Effekt auf Gewebe aus und kann so zu Gewebnekrosen führen (LEE *et al.*, 1986, MUNTZ, 1999).

Die mykotische Mastitis kommt vor allem bei kleinen Wiederkäuern vor, jedoch ist auch die Zahl der Mastitiden bei Kühen, ausgelöst durch *A. fumigatus*, gestiegen. Bei den kleinen Wiederkäuern sind vor allem Milchschafe betroffen, besonders, wenn sie vor der Geburt antibiotisch behandelt wurden (PEREZ *et al.*, 1998, LAS HERAS *et al.*, 2000).

Eine weitere Krankheit, die von *Aspergillus* spp. ausgelöst werden kann, ist die mykotische Plazentitis. Sie tritt sekundär nach einer disseminierten Infektion auf, vermutlich durch hämatogene Streuung von *Aspergillus* aus dem Verdauungstrakt (SARFATI *et al.*, 1996, SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Die oftmals unkomplizierten Verläufe ohne klinische Anzeichen sind häufig der Grund für Aborte im dritten Trimester der Trächtigkeit. Der Anteil des mykotischen Aborts an allen Aborten bei Rindern liegt weltweit zwischen 2 % und 20 % (KNUDTSON *et al.*, 1992). Auch frühere Aborte ab dem dritten Monat der Trächtigkeit sind möglich. Ist die Umgebung stark mit *Aspergillus* Konidien belastet, können auch mehrere gleichzeitige Aborte in einer Herde beobachtet werden. Häufig ist nach einem mykotischen Abort Nachgeburtverhalten zu beobachten, die folgenden Trächtigkeiten verlaufen meist jedoch wieder unkompliziert. Hin und wieder zeigen Rinder nach dem Abort Anzeichen einer Pneumonie oder Endometritis (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Zu einer Mykotoxikose kommt es durch die Aufnahme kontaminierter Silage. Von *Aspergillus* gebildete Mykotoxine wie Gliotoxin führen bei Rindern zu Abmagerung, Proteinmangel, Durchfall, reduziertem Allgemeinbefinden, Reizbarkeit und abnormalem Verhalten; auch Todesfälle sind möglich (COLE *et*

al., 1977). Des Weiteren kann Gliotoxin die Fermentation im Pansen und somit die Verdaulichkeit des Futters reduzieren (MORGAVI *et al.*, 2004). Wurde kontaminiertes Heu an kleine Wiederkäuer verfüttert, konnten verzögertes Wachstum und histopathologische Veränderungen in Niere und Leber beobachtet werden. Durch die Aufnahme von mit *A. clavatus* kontaminiertem Futter, der verschiedene, teils neurotoxisch wirkende, tremorgene Toxine produziert, kommt es unter anderem zu Paralysen und Paresen und anderen Gangabnormalitäten (LORETTI *et al.*, 2003).

Um eine mykotische Pneumonie beim Wiederkäuer zu erkennen, kann das Vorhandensein von Oxalatkristallen in zytologischen oder histologischen Präparaten aus Gewebe oder Auswürfen eine diagnostische Hilfe sein (MUNTZ, 1999). Treten Aborte auf, kann durch Nachweis von Pilzelementen (Hyphen), in Verbindung mit dem Vorliegen einer Plazentitis, fetaler Dermatitis oder Pneumonie bestimmt werden, ob dieser mykotischer Genese ist (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

1.4.4. Die Aspergillose des Hundes und der Katze

Die drei Hauptformen der Aspergillose bei Hunden sind:

- sinonasale,
- bronchopulmonale und
- disseminierte Infektionen.

(SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015)

Die am häufigsten vorkommende Form ist die sinonasale Aspergillose. Trotz der hohen Inzidenz ist diese, hauptsächlich bei meso- und dolichocephalen Rassen wie dem Deutschen Schäferhund und dem Rottweiler vorkommende Form, schwer zu therapieren (SHARMAN *et al.*, 2012, SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Von der sinonasalen Mykose sind eher junge Tiere betroffen. So sind 40 % der betroffenen Hunde unter drei Jahre und 80 % unter sieben Jahre alt. Sie ist nach nasalen Neoplasien mit einer Prävalenz von 7 - 34 % der zweithäufigste Grund für chronischen Nasenausfluss bei Hunden (TASKER *et al.*, 1999, SHARMAN *et al.*, 2010). Das häufigste Isolat aus diesen Patienten ist *A. fumigatus*, doch auch andere Spezies wie *A. flavus*, *A. niger* und *A. nidulans* und selten auch andere Pilzarten wie

Penicillium werden nachgewiesen (TALBOT *et al.*, 2014). Zu den klinischen Symptomen in fortgeschritteneren Stadien der Krankheit zählen Schmerzen, Ulzerationen des Nasenspiegels, mukopurulenter bis purulenter Nasenausfluss oder bilaterales Nasenbluten (PEETERS *et al.*, 2007). In sehr schwerwiegenden Fällen ist auch eine Zerstörung der Siebbeinplatte möglich (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Die bronchopulmonale Aspergillose kommt bei Hunden nur selten vor und geht mit unspezifischen Symptomen wie Husten, reduziertem Allgemeinbefinden und Fieber einher (ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2011). Auch die Diagnose ist oftmals schwer zu stellen, da in der bronchoalveolären Lavage, die viele Entzündungszellen enthält, vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten und nur selten Pilzelemente zu finden sind. Um die Diagnose stellen zu können, wird eine Kombination mehrerer diagnostischer Tests benötigt, da sonst falsch positive und falsch negative Ergebnisse möglich sind (PEETERS *et al.*, 2007). Es werden Mittel wie Endoskopie, Röntgen, Computertomographie, Zytologie, Histologie, Serologie, Pilzkultur oder DNS-Vervielfältigung herangezogen (BILLEN *et al.*, 2009).

Die disseminierte Aspergillose wird meist von *A. terreus* oder *A. deflexus* hervorgerufen und nur selten von *A. fumigatus*, *A. niger* oder *A. flaviceps* (SCHULTZ *et al.*, 2008). Sie ist bei Hunden zwar eher selten, nimmt aber meist einen sehr schweren Verlauf und endet tödlich. Hauptsächlich sind Deutsche Schäferhunde betroffen. Die klinischen Symptome sind mit Anorexie, Erbrechen und Gewichtsverlust, Lahmheit, Lethargie, Schwäche, Fieber, Hämaturie und Inkontinenz, neurologischen Defiziten und generalisierter Lymphadenopathie eher unspezifisch (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Auch Otomykosen kommen gelegentlich bei Hunden vor. Die betroffenen Tiere wurden zuvor meist mit diversen systemischen und topischen Antibiotika behandelt, was prädisponierend für die Entwicklung einer sekundären Infektion mit *Aspergillus* ist (COYNER, 2010).

Bei der Katze sind *Aspergillus* spp. für den Großteil der Erkrankungen des oberen Respirationstrakts verantwortlich. Es gibt die sinonasale und die sinoorbitale Form der Aspergillose (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015), wobei letztere sich aus einer sinonasalen Aspergillose entwickelt (BARRS *et al.*, 2012).

Die Zahl beobachteter orbitaler Aspergillosen nimmt zu, vermutlich aufgrund viral bedingter Immunschwächen (BARACHETTI *et al.*, 2009). Die Infektion breitet sich von der sinonasalen Form in periorbitale Bereiche aus, was zu einer erschweren Behandlung und schlechten Prognose führt (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Die sinoorbitale Aspergillose wird hauptsächlich von *A. felis* ausgelöst, seltener von Spezies wie *A. udagawae* oder *A. viridinutans* (BARRS *et al.*, 2013), die sinonasale Form, welche aufgrund besserer Therapiemöglichkeiten mit einer besseren Prognose einhergeht, meist von *A. fumigatus* (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Brachycephale Rassen wie Perserkatzen scheinen eine Prädisposition für nasale Mykosen zu haben (BARRS *et al.*, 2012).

Auch die Keratomykose kommt selten vor, sie wird mit einer Infektion mit dem Felinen Herpesvirus in Verbindung gebracht und sekundär von dem natürlich auf dem Auge vorkommenden *A. flavus* ausgelöst (LABELLE *et al.*, 2009).

Bei Hunden und Katzen erfolgt die Diagnose einer disseminierten Aspergillose mit Hilfe einer Kombination aus klinischen Anzeichen, bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie und Laborbefunden wie Serologie, Zytologie und Histopathologie. Da disseminierte Mykosen auch von anderen Pilzen hervorgerufen werden können, sollte stets auch eine Bestätigung des Erregers durch eine Pilzkultur erfolgen (SCHULTZ *et al.*, 2008). Für die Diagnosestellung der sinonasalen oder sinoorbitalen Aspergillose werden klinische Symptome, Computertomographie oder Röntgen und die Rhinoskopie herangezogen. Des Weiteren werden Serologie, Zytologie, Histopathologie und kulturelle Anzucht für eine klare Diagnosestellung empfohlen. Es sollten stets auch andere Ursachen chronischer Erkrankungen der Nase, wie Fremdkörper, Neoplasien, eine idiopathische lymphoplasmazelluläre Rhinitis oder von Zahnproblemen hervorgerufene Rhinitiden ausgeschlossen werden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Bei Katzen, die an einer sinonasalen oder sinoorbitalen Mykose leiden, liegt zudem oft eine Hyperglobulinämie vor, was vermutlich durch den chronischen Kontakt mit *Aspergillus* Antigenen bedingt ist (BARRS *et al.*, 2012).

1.4.5. Die Aspergillose der Primaten

Auch in nichtmenschlichen Primaten kommen Aspergillosen vor. Wie beim Menschen und anderen Tierarten ist dies insbesondere bei immunsupprimierten

Tieren der Fall (HAUSTEIN *et al.*, 2008).

In einer nach perforierendem Thoraxtrauma euthanasierten 18-jährigen Großen Weißnasenmeerkatze konnte beispielsweise eine systemische Aspergillose mit Beteiligung der Lunge und des Gehirns nachgewiesen werden. Das Tier litt vorberichtlich an Hyperadrenokortizismus (JURCZYNSKI *et al.*, 2012).

Eine besondere Relevanz kommt den Primaten zu, da Rhesusaffen, Javaneraffen und Paviane aufgrund der Ähnlichkeit ihres Immunsystems zu dem des Menschen als Versuchstiere für Organtransplantationen gehalten werden. Bei ihnen stellt die Exposition gegenüber *Aspergillus* eine wichtige Infektionsquelle dar (HAUSTEIN *et al.*, 2008). Sie infizieren sich meist ein bis sechs Monate nach der Organtransplantation, wobei sich die Infektionen meist als Pneumonie, Tracheobronchitis oder disseminierte Aspergillosen äußern (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Wie bei Wiederkäuern, sollte auch bei Primaten bei der Diagnose der pulmonalen Aspergillose an eine mögliche zugrunde liegende Tuberkuloseinfektion gedacht werden (YAMAUCHI *et al.*, 2011).

2. *Aspergillus nidulans*

2.1. Taxonomie und Bedeutung

Aspergillus nidulans, der sich auch sexuell vermehren kann (Teleomorph *Emericella nidulans*), ist ein Modellorganismus für filamentöse Pilze und somit einer der am besten beschriebenen filamentösen Schimmelpilze (RAPER *et al.*, 1965, G.S. DE HOOG, 2000). Seine genetische Erforschung geht bis in das Jahr 1945 zurück, in dem Pontecorvo begann, nach einem geeigneten Organismus für bestimmte Probleme der räumlichen Organisation der eukaryotischen Zelle zu suchen (PONTECORVO *et al.*, 1953). *A. nidulans*, bei dem es sich um einen haploiden Eukaryonten handelt, der auf einfachen Medien rasch Kolonien bildet und nur als niedrig pathogen gilt, eignete sich gut dafür. Um beispielsweise den Bezug des Genoms zum Metabolismus der Zelle zu verstehen, war es vonnöten dieses zu definieren. Somit war *A. nidulans* die erste *Aspergillus* Spezies, deren Genom sequenziert wurde. Mehr als 50 Jahre Forschung und ein somit gut erschlossener sexueller Zyklus und genetisches System machten *A. nidulans* zu

einem wichtigen Modellorganismus für die Erforschung der eukaryotischen Zellbiologie. Hierzu gehörten das Verständnis von metabolischer Regulation, Entwicklung, Kontrolle des Zellzyklus, Chromatinstruktur, Funktion des Zytoskeletts, DNS-Reparatur, pH-Kontrolle, Morphogenese, Struktur mitochondrialer DNS und genetischer Krankheiten des Menschen (GALAGAN *et al.*, 2005).

2.2. Lebenszyklus, Habitat und Morphologie von *A. nidulans*

A. nidulans ist phylogenetisch sehr nah verwandt mit *A. fumigatus* und auch Morphologie, Lebenszyklus und Habitat stimmen weitestgehend überein.

2.3. Bedeutung in der Humanmedizin

Auf die potentielle Pathogenität von *A. nidulans* als opportunistischer Krankheitserreger wurde weit weniger Augenmerk gelegt, als auf seine Erforschung. Doch auch hier spielt der als niedrig pathogen geltende Schimmelpilz *A. nidulans* eine Rolle und kann Infektionen hervorrufen.

Er ist unter anderem hauptverantwortlich für die Ausbildung invasiver Aspergillosen bei Patienten mit Chronischer Granulomatose, einer seltenen Erbkrankheit des Immunsystems, bei der die NADPH-Oxidase einen Defekt aufweist und Phagozyten keine Superoxid Anionen zur Herstellung reaktiver Sauerstoffradikale zur Immunabwehr bilden können (JONES *et al.*, 2008). Auch mit der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose wird *A. nidulans* oft in Verbindung gebracht. Bei Tieren löst *A. nidulans* dagegen kaum Krankheiten aus.

2.3.1. Die Chronische Granulomatose (CGD)

Die Chronische Granulomatose, (*chronic granulomatous disease* (CDG)), ist eine seltene, erblich bedingte, primäre Immunschwäche, mit einer Geburtsprävalenz von etwa 1:200.000. Sie wird meist X-chromosomal rezessiv vererbt (X-CDG) und betrifft somit in dem Fall ausschließlich männliche Patienten. Zugrunde liegt eine Mutation des Glykoprotein 91^{phox}, dessen Gen gp91^{phox} auf dem X-Chromosom liegt und für die β -Untereinheit des Cytochrom b kodiert, ein Hauptbestandteil der

Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH) Oxidase (SEGAL, 1996). Durch diesen Defekt in der NADPH-Oxidase, sind Phagozyten nicht in der Lage Superoxid-Anionen und folglich reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, die notwendig für die Eliminierung der von ihnen aufgenommenen Organismen sind (WINKELSTEIN *et al.*, 2000, JONES *et al.*, 2008).

Die drei weiteren möglichen Formen, die auch weibliche Patienten betreffen können, sind autosomal rezessiv vererbte Defekte in anderen Hauptbestandteilen der Oxidase. Betroffen sind hier die Gene p47^{phox}, p67^{phox} oder p22^{phox}, welches für die α -Untereinheit des Cytochrom b kodiert. Sie liegen auf unterschiedlichen Chromosomen (SEGAL, 1996).

Durch die Defekte der Oxidase leiden Patienten sehr oft an lebensbedrohlichen bakteriellen und mykotischen Infektionen sowie den entzündlichen Folgen. Für Patienten mit Chronischer Granulomatose stellen invasive Mykosen somit eine große Bedrohung dar. Oftmals sind invasive Infektionen mit Schimmelpilzen die ersten Manifestationen, die die zugrundeliegende Krankheit enthüllen.

A. nidulans ist der zweithäufigste bei Patienten mit CDG nachgewiesene Schimmelpilz, virulenter als *A. fumigatus* und löst fast ausschließlich invasive Infektionen aus, die besonders aggressiver Natur sind. Sie enden öfter tödlich als Infektionen mit *A. fumigatus*. Patienten werden häufig in den ersten Lebensjahren mit einer zervikalen oder inguinalen Lymphadenitis, Pneumonien, Osteomyelitiden, Leberabszessen oder Hautinfektionen vorstellig (SEGAL, 1996).

Zunächst betreffen Infektionen mit *Aspergillus* die Lunge, gefolgt von einer Gewebszerstörung und Verbreitung auf die benachbarten Strukturen der Brustwand. So kommt es auch häufig zu Osteomyelitiden (SEGAL *et al.*, 1998, DOTIS *et al.*, 2004).

Leider wird eine Diagnose durch die zumeist asymptomatische Erkrankung oder sehr schwachen klinischen Symptome, die schwierige Speziesidentifizierung und die niedrige Sensitivität der verfügbaren diagnostischen Mittel erschwert (HENRIET *et al.*, 2012).

A. nidulans bleibt ein sehr seltenes Pathogen in anderen Risikogruppen und scheint eine besonders einzigartige Interaktion mit dem Krankheitsgeschehen in CDG Patienten einzugehen. Für die fehlregulierte Entzündungsreaktion bei Infektionen

mit *A. nidulans* in CDG Patienten werden verschiedene immunologische Mechanismen wie z. B. eine fehlregulierte Zytokinproduktion diskutiert (HENRIET *et al.*, 2012).

Für die Therapie einer invasiven Aspergillose bei CDG Patienten, ausgelöst durch *A. nidulans*, eignen sich Azole, vor allem Posaconazol. Zwar ist keine pädiatrische Dosierung definiert, jedoch erweist es sich in der Salvage Therapie als effektiv und sicher (SEGAL *et al.*, 2005, GROLL *et al.*, 2008). Gegen Amphotericin B erscheint *A. nidulans* resistenter als *A. fumigatus* (VAN DER LINDEN *et al.*, 2011). Eine antifungale Therapie kombiniert mit einem frühen und umfassenden chirurgischen Debridement kann erfolgreich sein (SEGAL *et al.*, 1998, WINKELSTEIN *et al.*, 2000). Oft erhalten die Patienten auch Granulozyten über Transfusionen weißer Blutkörperchen (DOTIS *et al.*, 2004).

2.3.2. Myzetome

Myzetome sind chronische, subkutane Infektionen, die entweder von Pilzen (Eumyzetome) oder Bakterien (Actinomyzetome) ausgelöst werden. Verschiedene Pilzgattungen, wie zum Beispiel *Madurella* spp., *Exophiala* spp., *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. oder seltener auch *Aspergillus* spp. können Eumyzetome hervorrufen (HEMASHETTAR *et al.*, 2006, VERMA *et al.*, 2015). Es wird zwischen schwarzen und weißen Eumyzetomen (*black granule eumycetoma*, *white granule eumycetoma*) unterschieden. *Aspergillus* spp. rufen die weiße Form hervor (PRASANNA *et al.*, 2016).

Myzetome kommen überwiegend in den heißen und feuchten tropischen und subtropischen Gebieten vor und entstehen durch das Eindringen von Krankheitserregern in die tiefe Dermis oder Subcutis durch kleinste traumatische Verletzungen (VERMA *et al.*, 2015).

Zuerst beschrieben wurde *A. nidulans* 1906 von Nicolle und Pinoy, die ihn aus einem Myzetom eines tunesischen Patienten isolierten (VERALDI *et al.*, 2016). Neben *A. nidulans* können Infektionen beispielsweise auch von *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* oder *A. oryzae* hervorgerufen werden. Es sind zwar nur sehr wenige Fälle mit *A. nidulans* als Ursache bekannt, dennoch muss *A. nidulans* als potentiell Pathogen bei Eumyzetomen berücksichtigt werden (VERMA *et al.*, 2015, VERALDI *et al.*, 2016).

Meist liegen Immunsuppressionen oder Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus zugrunde (VERMA *et al.*, 2015, PRASANNA *et al.*, 2016, VERALDI *et al.*, 2016). Die Krankheit betrifft für gewöhnlich die Extremitäten und schreitet langsam voran. Verursacht wird eine chronische granulomatöse Infektion der Haut und subkutaner Gewebe mit Einbeziehung der darunterliegenden Faszien und Knochen. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine Schwellung des betroffenen Gewebes, Bildung mehrerer Knoten, Abszesse und nässender, granulomatöser Veränderungen (PRASANNA *et al.*, 2016).

Myzetome, ausgelöst durch *A. nidulans* sprechen gut auf eine Behandlung mit Itraconazol, Voriconazol oder Amphotericin B an (VERMA *et al.*, 2015). Da es einer völlig anderen Behandlung bakterieller Myzetome bedarf, ist eine genaue Identifikation des Erregers sehr wichtig für das Krankheitsmanagement (PRASANNA *et al.*, 2016).

2.3.3. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) wurde bei den durch *A. fumigatus* ausgelösten Krankheiten bereits beschrieben. Auch *A. nidulans* wird häufig mit ihr in Verbindung gebracht und es sind ebenfalls meist Patienten mit veränderter Lungenfunktion betroffen.

3. Diagnostik und Therapie von Aspergillosen

3.1. Diagnostische Methoden in der Humanmedizin

Da die Symptome der meisten durch *Aspergillus* ausgelösten Krankheiten lange Zeit nur schwach ausgeprägt und sehr unspezifisch sind, gestaltet sich auch die Diagnose schwierig und wird somit oft zu spät gestellt (WHEAT, 2006). Frühe Diagnosen sind für Patienten in der Regel aber sehr wichtig. Auch heute ist die Sterblichkeitsrate der Patienten mit invasiver Aspergillose durch die enormen Probleme bei Diagnosestellung und Therapie sehr hoch. Ohne die rechtzeitige Einleitung der geeigneten Therapie kann die Erkrankung jedoch ungebremst voranschreiten, was die Überlebenschancen deutlich verringert. Die diagnostischen Methoden sind beschränkt, und ihre oft zu spät verfügbaren Ergebnisse nicht ausreichend spezifisch und sensitiv (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Für die Diagnose invasiver Schimmelpilzinfektionen sind meist mehrere Untersuchungen möglich. Es gibt internationale Definitionen (DE PAUW *et al.*, 2008). Die Diagnose basiert auf klinischen Symptomen, kulturellem Erregernachweis, Histologie, serologischem Nachweis von Pilzbestandteilen und bildgebenden Verfahren (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Eine alleinige Kultivierung oder der mikroskopische Nachweis aus Sputum bzw. einer Bronchoalveolarlavage, ist als Diagnose nicht ausreichend, da eine normale Kolonisierung oder eine Kontamination nicht auszuschließen sind. Auch sind sie oft falsch negativ. Am aussagekräftigsten sind Kulturergebnisse, wenn die Immunsuppression des Patienten stark ausgeprägt ist. Insgesamt sind Kulturen aber dennoch hilfreich für eine Speziesidentifizierung und eine Diagnosestellung (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Als bestätigt gilt ein Fall, wenn ein Pilz aus Gewebe vom Infektionsort histologisch oder kulturell nachgewiesen wurde. Die Histologie stellt zwar eine geeignete Nachweismethode dar, es ist jedoch oftmals nicht ganz einfach, *Aspergillus* von anderen filamentösen Pilzen zu unterscheiden. Biopsien sind des Weiteren oft nicht ungefährlich, da neutropenische Patienten häufig auch an einer Thrombozytopenie leiden. Das Blutungsrisiko ist durch Gerinnungsstörungen somit stark erhöht (BARNES *et al.*, 2007). Es bedarf somit zunächst einiger Hinweise, beispielsweise einer auffälligen Computertomografie. Alleinig ist diese jedoch nicht ausreichend für eine Diagnosestellung, da auch andere Erkrankungen zu ähnlichen Auffälligkeiten führen (GREENE *et al.*, 2007, OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Trotzdem kann die Computertomographie wichtige Hinweise zur frühen Erkennung einer Aspergillose liefern. Diese können beispielsweise Halo-Zeichen in der Lunge sein, welche sich milchglasartig trüb um noduläre Massen darstellen. Auch umgekehrte Halo-Zeichen, bei denen sichelförmige oder gar vollständiger Ringe eine rundliche, milchglasartige Masse umgeben, können vorkommen (GEORGIADOU *et al.*, 2011). Das Röntgen eignet sich nicht für eine frühe Diagnose, da erkennbare Veränderungen durch die invasive Aspergillose meist erst recht spät auftreten. Auch mit vorhandenen Veränderungen ist eine eindeutige Diagnose nicht möglich, da auch hier andere Erkrankungen für die Auffälligkeiten in Frage kommen (BARNES *et al.*, 2007).

Wahrscheinlich ist eine Infektion, wenn ein Patient als Risikopatient gilt, spezifische klinische Symptome zeigt, der Pilz in Kultur und mikroskopisch

nachgewiesen wurde und indirekte Tests, wie z.B. Antigen- oder Galaktomannannachweise stattfanden (DE PAUW *et al.*, 2008). Nach einer Infektion ist der Nachweis des *Aspergillus*-Antigens Galaktomannan aus Serum oder Blut sehr schnell möglich. Galaktomannan ist ein Zellbestandteil des Pilzes, welcher während der Gewebsinvasion bzw. des Wachstums des Pilzes freigesetzt wird (BARNES *et al.*, 2007).

Die Zellwand von *A. fumigatus* setzt sich hauptsächlich aus den drei Polysacchariden β -1,3-Glukan, Chitin und Galaktomannan zusammen. Das Grundgerüst besteht aus β -1,3-Glukan und Chitin, während die mit ihm verbundenen Seitenketten aus Galaktomannan und linearem β -1,3/1,4-Glukan bestehen (LATGÉ *et al.*, 2005). Das Galaktomannan ist seinerseits aus linearem α -1,2/1,6-Mannan und kurzen β -1,5-Galaktofuranose-Seitenketten zusammengesetzt (LATGÉ *et al.*, 1994, GOW *et al.*, 2017). In Abbildung 6 ist die Zellwandstruktur von *A. fumigatus* dargestellt. Abbildung 7 zeigt, wie sich das Polysaccharidgerüst der Zellwand zusammensetzt.

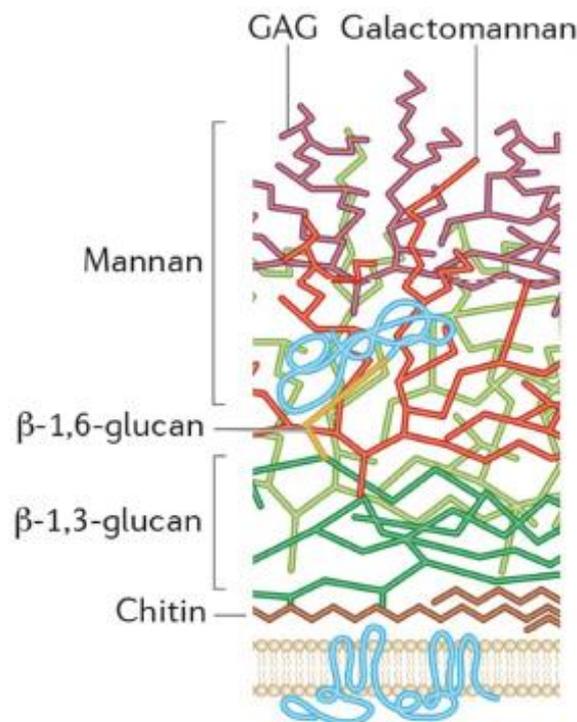


Abbildung 6: Zellwandstruktur von *A. fumigatus*

(GOW *et al.*, 2017)

GAG = Galaktosaminoglykan

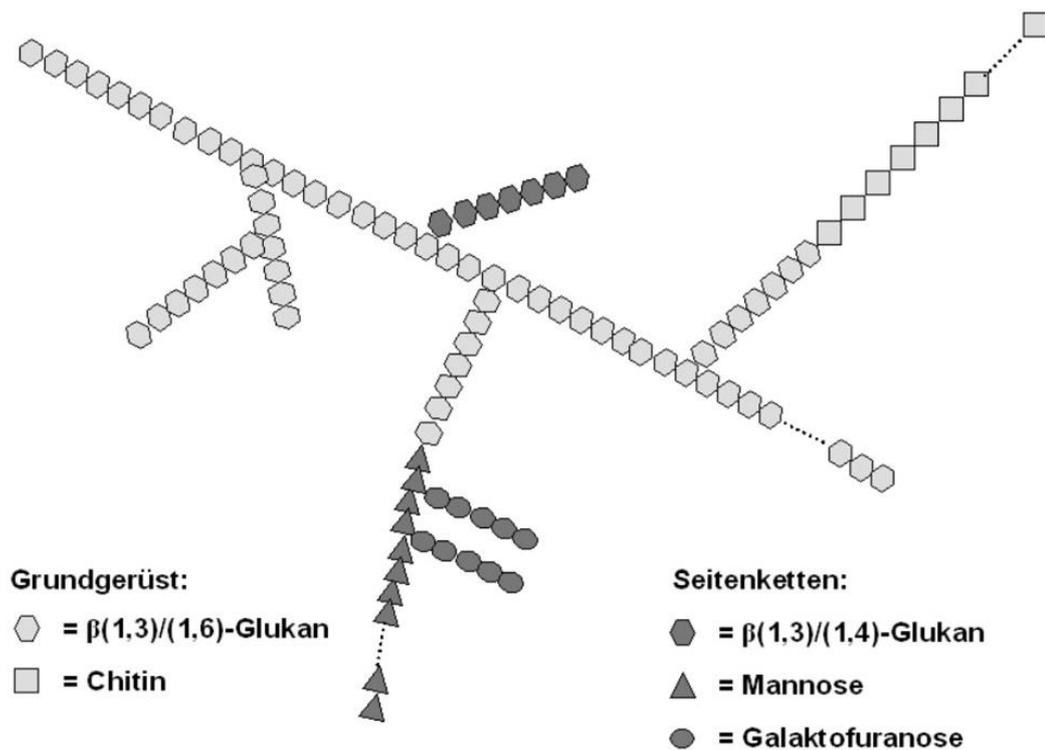


Abbildung 7: Polysaccharidgerüst der Zellwand von *A. fumigatus*

Das Grundgerüst setzt sich aus β -1,3-Glukan und Chitin zusammen. An diesem hängen Seitenketten, bestehend aus Galaktomannan und linearem β -1,3/1,4-Glukan.

Nach Heesemann (HEESEMAN, 2010)

Schon vor dem Auftreten klinischer Symptome ist der Nachweis des Galaktomannans in Körperflüssigkeiten möglich (MARR *et al.*, 2004). Er kann mit einem kommerziell erhältlichen Galaktomannan Assay, einem Sandwich-ELISA (Platelia™ Aspergillus Galactomannan EIA, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Frankreich) erfolgen (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Er zeichnet sich durch eine gute Standardisierung aus und weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf (PFEIFFER *et al.*, 2006). Leider liefert auch dieser kommerziell erhältliche Test zum Teil falsch positive Ergebnisse. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn es zum Einsatz von beta-Lactam Antibiotika kam, des Weiteren sind Kreuzreaktivitäten mit Fusarium-Antigenen möglich (NUCCI *et al.*, 2014, WIEDEMANN *et al.*, 2016). Die Pilzbürde des Patienten korreliert mit der Galaktomannanmenge und somit ist der Nachweis des Antigens zur Diagnose einer invasiven Aspergillose geeignet (MARR *et al.*, 2004), aber auch falsch negative Ergebnisse sind möglich. Sie entstehen durch eine zu niedrige Pilzbürde oder durch zuvor erfolgte antifungale Therapien (BARNES *et al.*, 2007).

Ein weiterer Zellwandbestandteil, der gut im Blut oder Serum nachzuweisen ist, und sich zum Nachweis einer Infektion eignet, ist das β -1,3-Glukan (BG). Auch hier existiert ein kommerziell erhältlicher Test, der Fungitell β -glucan (BG) Assay (Associates of Cape Cod, Inc. [ACCI], East Falmouth, Massachusetts, USA). Da das β -1,3-Glukan allerdings auch in Zellwänden anderer humanpathogener Pilze vorkommt, eignet es sich nur zur Diagnose einer invasiven Mykose, nicht aber einer Aspergillose. Aufgrund der hohen Zahl falsch positiver Ergebnisse, eignet sich der Test am ehesten zum Ausschluss einer invasiven Mykose (PICKERING *et al.*, 2005, SULAHIAN *et al.*, 2014).

Eine Diagnose über molekularbiologische Methoden wie die PCR, stellt einen guten Weg dar, eine Krankheit mit einer hohen Sensitivität nachzuweisen. Des Weiteren erhält man schneller Ergebnisse als beim kulturellen oder histologischen Nachweis (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Es werden mit vielversprechenden Ergebnissen spezifische *Aspergillus*-Gene amplifiziert, allerdings ist die Methode bisher weder standardisiert noch kommerziell erhältlich (DONNELLY, 2006, DE PAUW *et al.*, 2008). Auch kann die hohe Sensitivität dazu führen, dass man falsch positive Ergebnisse erhält, weshalb die Kombination der PCR mit weiteren Diagnostikverfahren empfohlen wird (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

3.2. Aktueller Stand der antifungalen Therapie

Zur Behandlung invasiver Mykosen stehen verschiedene Antimykotika zur Verfügung, die drei Wirkstoffgruppen zugeordnet werden können. Nicht nur aufgrund der geringen Auswahl an Therapeutika, sondern auch, weil diese nur zwei Zielstrukturen im Pilz, nämlich die Zellwand und die Zellmembran angreifen, gestaltet sich die Therapie von Mykosen schwierig. Trotz Therapie versterben viele Patienten, die an einer invasiven Aspergillose erkrankt sind. Die drei Wirkstoffgruppen sind die Polyene, Azole und Echinocandine (THOMPSON *et al.*, 2008).

Polyene:

Amphotericin B ist der Hauptvertreter der Polyene und war lange Zeit das am häufigsten verwendete Medikament bei Mykosen. Polyene binden an das Ergosterol der Zellmembran. Dies führt zum Zelltod durch Bildung von Ionenkanälen und somit einer Permeabilitätserhöhung.

Abgesehen von *A. terreus*, welcher eine natürliche Resistenz gegen Amphotericin B zeigt, wirkt es gegen die meisten *Aspergillus* Spezies. Jedoch ist die Anwendung mit zahlreichen, teils schweren Nebenwirkungen verbunden, die auf einer Wechselwirkung mit den Sterolen der humanen Zellen beruhen. Die schwerwiegendste ist die Nephrotoxizität des Wirkstoffs. Anscheinend wird diese durch eine direkte Zerstörung der renalen Tubuluszellen und deren damit verbundenen Nekrose hervorgerufen. Des Weiteren kommt es bei der Infusionstherapie häufig zu Nebenwirkungen, z.B. zu Myalgien, Gelenkschmerzen, Fieber, Schüttelfrost oder Erbrechen (BATES *et al.*, 2001).

Um die Morbidität und Mortalität zu senken, wurde in der Vergangenheit nach neuen antifungalen Wirkstoffen für die Therapie invasiver Mykosen gesucht. Eine neue Formulierung von Amphotericin B auf Lipidbasis verringert dessen nephrotoxischen und zum Teil auch die infusionsassoziierten Nebenwirkungen, führt jedoch auch dazu, dass für gleiche antifungale Effekte größere Mengen appliziert werden müssen, da es zunächst aus dem Phospholipidverband freigesetzt werden muss (THOMPSON *et al.*, 2008).

Triazole:

Auch die Triazole stellen eine nebenwirkungsärmere Alternative zu den Polyenen dar. Sie verhindern über die Hemmung der fungalen Cytochrom P450 Enzyme die Ergosterolbiosynthese und führen so zu einer Fehlfunktion der Zellmembran, was ein Wachstum verhindert und letztendlich zum Zelltod führt.

Die Nebenwirkungen der Azole beziehen sich hauptsächlich auf die Leber, da das humane Cytochrom P450 dort in hoher Zahl vorkommt. Besondere Vorsicht ist daher bei der Medikation mit weiteren Wirkstoffen geboten, die auch über das Cytochrom 450 wirken (THOMPSON *et al.*, 2008). Zwar wurde von einzelnen Resistenzen von *Aspergillus* spp. gegen Triazole berichtet, jedoch ist keine generelle Resistenz bestimmter Spezies bekannt. Die gängigsten Triazole sind Voriconazol, Itraconazol und Posaconazol.

Voriconazol kann intravenös oder oral verabreicht werden. Es ist aufgrund der besseren Wirksamkeit und geringeren Toxizität Amphotericin vorzuziehen und wird als Primärtherapie bei Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose empfohlen (STEINBACH *et al.*, 2003).

Itraconazol ist in Kapselform, als orale und intravenöse Lösung verfügbar. Die Aufnahme des Wirkstoffes bei Verabreichung in Kapselform ist von der Azidität des Magens abhängig und sollte daher nicht bei schwer oder lebensbedrohlich erkrankten Patienten angewendet werden. Da Toxizität und Bioverfügbarkeit unvorhersehbar sind, ist der Gebrauch für die Therapie invasiver Aspergillosen nicht empfehlenswert, bei nicht invasiven oder allergischen Erkrankungen stellt Itraconazol jedoch eine gute Alternative dar.

Posaconazol, das Itraconazol in seiner Struktur ähnelt, ist ein neueres Triazol. Es ist nur in oraler Form verfügbar und zwar gut verträglich, hält seinen Wirkspiegel aber nicht für längere Zeit aufrecht. Somit stellt es nicht das geeignetste Primärtherapeutikum dar. Es konnte sich bei schwer immunsupprimierten Patienten allerdings gut in der Prophylaxe behaupten und den Ausbruch einer Aspergillose oftmals verhindern bzw. die Überlebenschance der Patienten erhöhen (THOMPSON *et al.*, 2008).

Durch den prophylaktischen Einsatz bei Risikopatienten sowie den extensiven Gebrauch von Azolen in der Landwirtschaft seit Mitte der 1960er Jahre, welcher zu Belastungen der Luft, des Bodens und der Pflanzen führt, kommt es immer häufiger zur Bildung von Resistenzen humanpathogener Schimmelpilze gegenüber Azolen und somit zu medizinischen Problemen (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Echinocandine:

Bei den Echinocandinen handelt es sich um die neuste Klasse antifungaler Wirkstoffe. Zu ihnen zählen Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin. Sie wirken fungistatisch auf *Aspergillus*, indem sie die Synthese des in der Zellwand vieler pathogener Schimmelpilze vorkommenden Polysaccharids β -1,3-Glukan hemmen und die Zellwand somit schwächen. Ihre Wirkungsweise zielt also auf die Zellwand, was sie attraktiv für eine Kombinationstherapie mit den übrigen, anders wirkenden Antimykotika macht (THOMPSON *et al.*, 2008). Jedoch sind sie bei *A. fumigatus* nicht so gut wirksam, lediglich fungistatisch und kommen deshalb eher als Reservemedikament zum Einsatz, wenn andere Stoffe keine Wirksamkeit zeigen (MARR *et al.*, 2004).

Abbildung 8 zeigt eine Übersicht der verfügbaren Antimykotika.

| Wirkstoffgruppe | Vertreter | Wirkungsweise | Hauptnebenwirkungen |
|-----------------|---|--|----------------------------|
| Polyene | Amphotericin-B-Desoxycholat Liposomales Amphotericin B | Fungizid, durch Bindung an Ergosterol Porenbildung in der Zellmembran | Nephrotoxizität |
| Triazole | Itraconazol Voriconazol Posaconazol | Fungizid, durch Bindung an das Cytochrom P450 Enzym Hemmung der Ergosterolsynthese | Leberfunktionsstörungen |
| Echinocandine | Caspofungin Anidulafungin Micafungin | Fungistatisch (<i>Aspergillus</i>), durch Hemmung der β -1,3-Glukan-Synthese | Erhöhung der Transaminasen |

Abbildung 8: Übersicht über die Gruppen der verfügbaren Antimykotika

In der Tiermedizin gibt es verschiedene Behandlungsmöglichkeiten, wobei keine Therapie wirklich effektiv oder schlichtweg zu teuer ist.

Die Therapie von Aspergillosen bei Geflügel ist nahezu unmöglich. Auch Impfstoffe sind keine vorhanden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Bei anderen Vögeln werden verschiedene Managementstrategien empfohlen. So werden oft Einzel- oder Kombinationspräparate, wie zum Beispiel Amphotericin B und ein Azol, topisch oder systemisch verabreicht. Auch die chirurgische Entfernung von Granulomen, falls durchführbar, kann die Chance auf Genesung erhöhen (XAVIER *et al.*, 2007, SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Auch bei Hunden gestaltet sich die Behandlung einer disseminierten Aspergillose schwierig und die Prognosen sind meist ungünstig. Dies liegt nicht zuletzt daran,

dass die Hunde oft erst spät im Krankheitsverlauf vorgestellt werden (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Eine bis zu drei Jahre andauernde Langzeitbehandlung mit Azolen wie Itraconazol kann zwar die Infektion beseitigen und zu einem verlängerten Überleben führen, ist aber sehr teuer (ZHANG *et al.*, 2012). Die Therapie der sinonasalen Aspergillose gestaltet sich ebenfalls nicht einfach. Anders als beim Menschen, bei dem meist eine chirurgische Entfernung fungaler Plaques genügt (URI *et al.*, 2003), wird beim Hund nach endoskopischer Entfernung der Plaques eine topische Behandlung mit Azolen empfohlen (SHARMAN *et al.*, 2012). Die geläufigste Behandlungsmethode ist die Spülung der Nasenhöhle und der Nebenhöhlen mit Enilconazol oder Miconazol, je nach Schwere der Erkrankung in einfacher oder wiederholter Form (SHARMAN *et al.*, 2012).

Bei Wiederkäuern gestaltet sich eine Einzeltherapie aufgrund der Höhe der Kosten und Rückständen in Milch und Fleisch sehr schwierig, weswegen das Ziel hier hauptsächlich die Eliminierung prädisponierender Faktoren und eine unterstützende Behandlung sein sollten (SARFATI *et al.*, 1996).

Bei Pferden sollte eine Luftsackmykose chirurgisch und medikamentös behandelt werden (LEPAGE *et al.*, 2005). Hierbei kommen topisch oder systemisch Azole zum Einsatz. Betroffene Arterien sollten nahe ihres Ursprungs ligiert werden, um weitere, möglicherweise tödliche Blutungen zu vermeiden (LEPAGE *et al.*, 2005). Dies kann chirurgisch, durch Ballonkatheterisierung oder transarterielle Coil-Embolisation geschehen, wobei letztere zu den besten Ergebnissen führt (TELL, 2005).

4. Der *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalweg

Evolutionär bedingt sind Säugetiere und Pilze relativ eng miteinander verwandt. Somit kommen viele potentielle Angriffspunkte für Therapeutika auch bei Mensch und Tier vor. Um Pilze effizient und unschädlich für den Wirtsorganismus zu bekämpfen, bedarf es daher pilzspezifischer Angriffsstrukturen, die nicht im Wirt vorkommen. Dies ist ein wesentlicher Grund für die geringe Zahl zur Verfügung

stehender Antimykotika (SHOR *et al.*, 2015). Auch wegen einer mittlerweile nicht unbedenklichen Resistenzlage der Erreger, bedarf es dringend neuer Therapiemöglichkeiten für Infektionen mit *Aspergillus*.

4.1. Die Antwort auf Stresssignale über den HOG-Signalweg in *A. fumigatus* und *A. nidulans* und das Potential als Angriffspunkt für neue Therapieansätze

Damit Mikroorganismen in der Umwelt oder einem Wirtsorganismus überleben und sich vermehren können, bedarf es der Wahrnehmung von Stresssignalen und der Reaktion auf diese (BAHN *et al.*, 2006). Dies geschieht häufig durch Signalwege, welche meist verschiedene Bestandteile wie Rezeptoren bzw. Sensoren, Transkriptionsfaktoren und Kinasen beinhalten (BAHN, 2008). Der *High Osmolarity Glycerol*-, kurz HOG-Signalweg, ist in Pilzen und Säugern einer der am besten charakterisierten Signalwege. Er wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, wo er eine zentrale Funktion in der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes unter hyperosmotischen Bedingungen erfüllt. Neben Umweltsignalen spielt er auch eine essentielle Rolle bei der Antwort auf Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine sowie verschiedener Stressoren. So wird er neben osmotischem auch durch oxidativen Stress, Zellwandstress, erhöhte Temperaturen, UV-Strahlung und Schwermetallbelastung aktiviert (HOHMANN, 2002). Er ist an der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung, Zellwandintegrität, Morphogenese, Sporulation und an Infektionsprozessen beteiligt (HOHMANN, 2002, BAHN, 2008, DEFOSSE *et al.*, 2015).

Der HOG-Signalweg besteht aus zwei Abschnitten. Zum einen dem Zwei-Komponenten-System, welches eine Hybrid Histidin (Sensor-) Kinase, ein *Histidine-containing phosphotransfer protein* (HPT) und ein oder zwei *Response Regulatoren* umfasst. Histidin Kinasen sind in Bakterien und *S. cerevisiae* gut erforscht und an der Regulierung vieler physiologischer Prozesse beteiligt. Sie sitzen als Sensorproteine oft in der Zellmembran und sind in der Lage, intra- und extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel die Temperatur, Osmolarität und Licht wahrzunehmen und weiterzuleiten (MASCHER *et al.*, 2006, DEFOSSE *et al.*, 2015). Abbildung 9 zeigt die Komponenten des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus*.

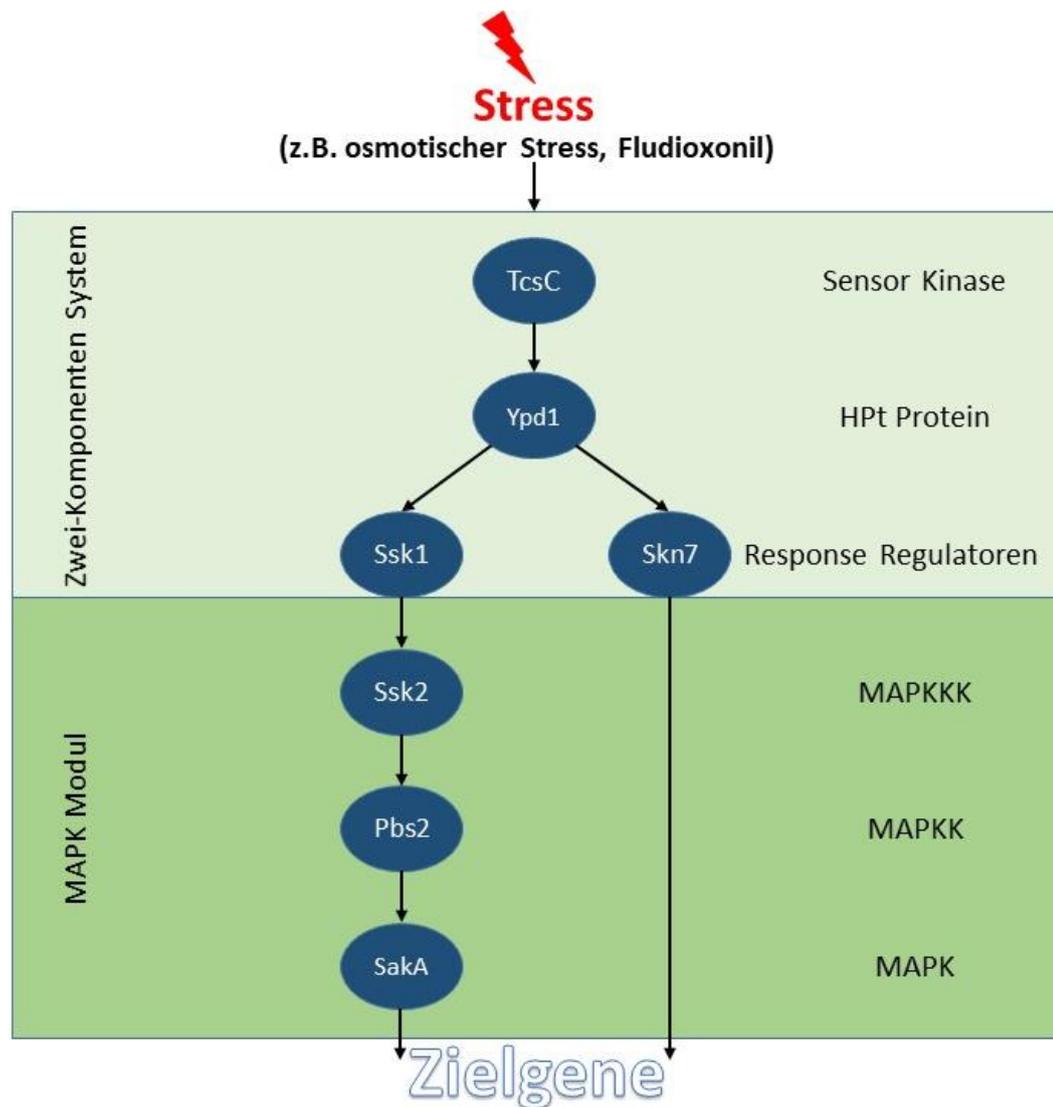


Abbildung 9: Der HOG-Signalweg in *A. fumigatus*

modifiziert nach Wiedemann, 2017 (WIEDEMANN, 2017)

HPT protein = *histidine-containing phosphotransfer protein*, MAPK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MAPKK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, MAPKKK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase

Stress-aktivierte Hybrid Histidin Kinasen (HHK) befähigen Pilze dazu, auf die verschiedensten Umweltbedingungen zu antworten, indem sie diese wahrnehmen und weiterleiten (DEFOSSE *et al.*, 2015, HERIVAUX *et al.*, 2016). HHK können derzeit anhand ihres N-terminalen Anteils in 16 Gruppen unterteilt werden (DEFOSSE *et al.*, 2015). Während die Funktion vieler Gruppen von HHK noch nicht charakterisiert ist, ist über Gruppe III HHK bereits sehr viel bekannt (DEFOSSE *et al.*, 2015). In den meisten Pilzen sind HHK der Gruppe III die wichtigsten Sensorkinasen des HOG-Signalwegs.

Alle Gruppe III HHK in Pilzen weisen eine gemeinsame Architektur auf, bestehend aus drei Bereichen. Diese sind ein N-terminaler, ein zentraler und ein C-terminaler Bereich.

Der N-terminale Teil ist die Sensor-Domäne. Sie besteht aus einem Cluster sogenannter HAMP Domänen, welche jeweils eine Wiederholung von Alpha-Helix Motiven aus ca. 50 Aminosäuren sind. Die Anzahl der HAMP Domänen variiert bei verschiedenen Spezies in ihrer Anzahl. Somit ist die Sensor-Domäne hoch variabel in Sequenz und Länge (KILANI *et al.*, 2016). Die Abkürzung „HAMP“ steht für die Proteine, in denen diese Domänen vorkommen. Diese sind Histidin Kinasen, Adenylat Cyclasen, Methyl-akzeptierende Proteine und Phosphatasen (DEFOSSE *et al.*, 2015). Sowohl *A. fumigatus* als auch *A. nidulans* einzige Typ III Hybrid Histidin Kinasen TcsC bzw. Nika verfügen über sechs dieser HAMP-Domänen (MCCORMICK *et al.*, 2012), die eine funktionelle Einheit bilden. Im ersten Schritt der Signalkaskade wird ein externes Stresssignal durch diese Gruppe III HHK wahrgenommen. Diese ermöglichen weiterhin eine Veränderung der Aktivität der Hybrid Histidin Kinase, wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung (DEFOSSE *et al.*, 2015).

Der zentrale Bereich des Proteins besteht aus der Histidin Kinase (HisKA) und der HATPase_c Domäne (*Histidine kinase-like ATPase catalytic domain*) und den C-terminalen Bereich bildet die *Receiver* Domäne (REC), die hoch konserviert ist (DEFOSSE *et al.*, 2015).

Erfolgt nun eine Stresswahrnehmung durch den N-terminalen Bereich der Hybrid Histidin Kinase, kommt es zu vier Phosphorylierungen. Die Histidin Kinasen in Pilzen werden Hybrid Histidin Kinasen genannt, weil die ersten zwei Phosphorylierungsschritte, anders als bei Bakterien, im gleichen Protein stattfinden (DEFOSSE *et al.*, 2015). Zunächst erfolgt nach Wahrnehmung von Signalen eine Autophosphorylierung der Histidin Kinase Domäne (HisKA) an einem Histidinrest durch die HATPase_c Domäne. Es folgt eine intramolekulare Übertragung des Phosphatrests auf einen Aspartatrest der *Receiver* Domäne (REC) desselben Proteins (His → Asp) und schließlich die Übertragung der Phosphatgruppe auf einen Histidinrest des HPT Proteins Ypd1 (His → Asp → His), das dessen Transfer auf nachgeschaltete Proteine dient (FASSLER *et al.*, 2013). Ypd1 transferiert die Phosphatgruppe anschließend auf einen Aspartatrest der *Response Regulatoren* Ssk1 oder Skn7 (His → Asp → His → Asp) (FASSLER *et al.*, 2013, DEFOSSE *et*

al., 2015, SHOR *et al.*, 2015).

In Abbildung 10 sind eine Vorhersage der Domänen der Hybrid Histidin Kinase TcsC, sowie die Phosphorylierungsschritte dargestellt.

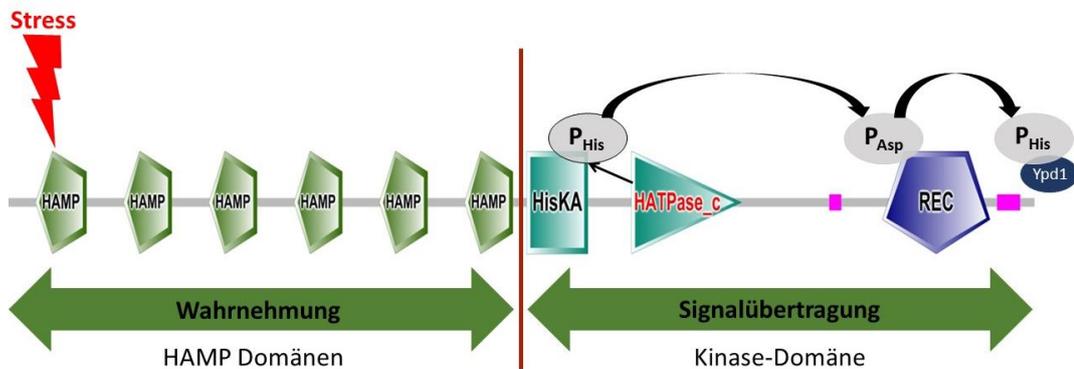


Abbildung 10: Die Hybrid Histidin Kinase TcsC (*Two-component system C*) in *A. fumigatus*

Quelle: Vorhersage der Domänen mittels des SMART-Programms (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Die violetten Bereiche stellen Regionen mit geringer Komplexität dar.

Durch die wahrgenommenen Signale ist der *Response Regulator* Skn7 (SrrA in *A. nidulans*) anschließend direkt in der Lage, die Expression von Zielgenen zu aktivieren, da er als Transkriptionsfaktor fungiert (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Wird der *Response Regulator* Ssk1 (SskA in *A. nidulans*) aktiviert, gibt dieser das Signal an den zweiten Abschnitt des HOG-Signalwegs, das Mitogen-aktivierte Protein Kinase Modul (MAPK Modul) weiter. Dieses besteht aus einer MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase), die durch eine MAPKK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase) (Pbs2 in *A. fumigatus* und PbsA in *A. nidulans*) aktiviert wird, die wiederum von einer MAPKKK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase) (Ssk2 in *A. fumigatus* und SskB in *A. nidulans*) aktiviert wird. Die Aktivierung des Moduls führt schlussendlich dazu, dass die phosphorylierte MAPK SakA in den Zellkern transloziert und es dadurch zur Expression bestimmter Zielgene kommt (MASCHER *et al.*, 2006, BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Wird der HOG-Signalweg nun also beispielsweise durch hyperosmotischen Stress aktiviert, werden Gene exprimiert, die für bestimmte Enzyme codieren, welche eine Schlüsselrolle in der Synthese von Glycerin einnehmen (z. B. Glycerin-3-

Phosphatase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase). Diese Enzyme werden hochreguliert, sind am Abbau von Trehalose zu Glycerin beteiligt, die Zahl osmotisch wirksamer Teilchen wird durch einen Einstrom von Ionen und die Zunahme an Glycerin erhöht und es kommt zur Erhaltung bzw. Wiederherstellung des intrazellulären Wasserhaushalts durch Wassereinstrom (LEW *et al.*, 2006, BAHN, 2008).

Auch eine künstliche Aktivierung des HOG-Signalwegs durch verschiedene chemische Substanzen ist möglich. Durch eine Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts und dem daraus resultierenden Einstrom von Wasser in das Zytoplasma, kommt es zu einer starken Schädigung des Pilzes. Beispiele für solche Substanzen wären zum einen das Phenylpyrrol-Derivat Fludioxonil und zum anderen das Dicarboximid Iprodion (OKADA *et al.*, 2005). Phenylpyrrole sind Derivate von Pyrrolnitrin, welches antimykotische Aktivität zeigt und von Pseudomonaden aus Tryptophan hergestellt werden kann (FLOSS *et al.*, 1971). Abbildung 11 zeigt die Strukturformel von Phenylpyrrol und chemischen Analoga Fludioxonil und Fenpiclonil.

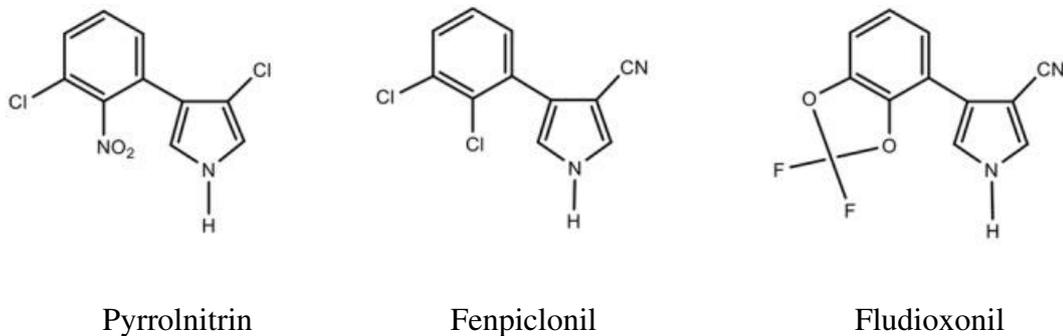


Abbildung 11: Chemische Struktur von Pyrrolnitrin und dessen Derivaten Fenpiclonil und Fludioxonil

(KILANI *et al.*, 2016)

Aufgrund ihres großen Wirkspektrums werden die Wirkstoffe in der Landwirtschaft zur Bekämpfung verschiedener Pflanzenpathogene eingesetzt. Dort werden sie zum Beispiel im Weinbau, in dem der Auslöser der Grauschimmelfäule, *Botrytis cinerea*, durch den Befall reifer (Edelfäule) oder unreifer Beeren (Rohfäule) der Weintraube massive Probleme verursacht, herangezogen (KOJIMA *et al.*, 2004, KILANI *et al.*, 2016).

Es konnte für einige Pilze gezeigt werden, dass Gruppe III Hybrid Histidin Kinasen die Wirkung dieser Stoffe durch die Aktivierung des HOG-Signalwegs vermitteln (KOJIMA *et al.*, 2004, HAGIWARA *et al.*, 2007, MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013).

Auch bei *A. fumigatus* führt der Einsatz von Fludioxonil zur Aktivierung des HOG-Signalwegs. Durch die Aktivierung der Gruppe III HHK und der daraus resultierenden Phosphorylierung der MAPK, imitiert Fludioxonil einen externen hyperosmolaren Druck. Dies führt zu einem unmittelbaren Wachstumsstopp des Pilzes und zu einem osmotischen Ungleichgewicht, wodurch es bei längerer Inkubation auch zu morphologischen Veränderungen wie einem Zellwandumbau, Anschwellen durch massiven Einstrom von Wasser und Lyse durch Platzen kommt (MCCORMICK *et al.*, 2012). Dabei ist der Effekt durch Fludioxonil nur solange zu beobachten, wie der Wirkstoff anwesend ist. Wird es entfernt, und es kam noch nicht zur Lyse durch Platzen, ist wieder ein normales Wachstum möglich. Fludioxonil wirkt somit zunächst fungistatisch und erst nach langer Inkubation fungizid (MCCORMICK *et al.*, 2012). Zumindest *in vitro* war es möglich, pathogene Schimmelpilze, die Infektionen in Mensch und Tier hervorrufen, mit Fludioxonil zu eliminieren (WIEDEMANN *et al.*, 2016).

Auch ein Einsatz in der Therapie wäre denkbar, jedoch stellte sich unter anderem in einem Eierinfektionsmodell heraus, dass Fludioxonil ungeeignet ist, da dessen Wirkung in proteinreichen Medien abnimmt, da es möglicherweise an Proteine bindet (persönliche Mitteilung von Prof. Frank Ebel).

Die essentielle Rolle von TcsC für die Aktivierung des HOG-Signalwegs wird durch die hohe Sensitivität entsprechender Deletionsmutanten gegenüber hyperosmotischem Stress und ihre Resistenz gegenüber Fludioxonil und Iprodion verdeutlicht (MCCORMICK *et al.*, 2012).

Dies und die Tatsache, dass Gruppe III HHK pilzspezifisch sind, macht sie zu einem attraktiven Angriffspunkt für neue antifungale Therapieansätze (SHOR *et al.*, 2015).

In dieser Arbeit wurden zunächst die Gruppe III HHK TcsC von *A. fumigatus* und NikA von *A. nidulans* miteinander verglichen. In einem zweiten Teil wurden dann die einzelnen Komponenten des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus* genauer analysiert, um deren jeweilige Aufgabe bei verschiedensten Stresssignalen zu untersuchen.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilze, Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide sind in den Tabellen 1 - 4 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Eigenschaften | Referenz |
|--|---|---|
| pSK379 | Amp, Pyr, <i>gpdA</i> Promoter | Prof. Sven Krappmann, Universität Erlangen |
| pSK379-hygro | Amp, HygB, <i>gpdA</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK379-hygro:: <i>nikA</i> | Amp, HygB, <i>gpdA</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK379-hygro:: <i>tcsC</i> | Amp, HygB, <i>gpdA</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK379-Phleo | Amp, <i>gpdA</i> Promotor | Dr. Johannes Wagener, Universität Würzburg |
| pSK379:: <i>sakA</i> | Amp, Pyr, <i>gpdA</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK379:: <i>skn7</i> mit <i>gpdA</i> - Promoter | Amp, Pyr, <i>gpdA</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK379:: <i>skn7</i> mit nativem-Promoter | Amp, Pyr, nativer <i>skn7</i> Promoter | diese Arbeit |
| pSK37-mRFP | Amp, Phleo | Dr. Johannes Wagener |

Tabelle 2: Verwendete Bakterien

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|---|--|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α K12 | F ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK- mK-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ -, <i>gyrA96</i> , <i>relA</i> , Δ (<i>lacZYA</i> -, <i>argF</i>)U169 | (HANAHAN, 1983) |

Tabelle 3: Verwendete Pilze

| Stamm | weitere Informationen | Quelle |
|-------------------------------|---|--|
| <i>A. fumigatus</i> AfS35 | <i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>akuA</i> | Prof. Sven Krappmann, Universität Erlangen (KRAPPMANN <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>A. fumigatus</i> ATCC46645 | Wildstamm, Patientenisolat | Prof. Axel Brakhage, Universität Jena |
| <i>A. fumigatus</i> D141 | Wildstamm, Patientenisolat | Prof. Sven Krappmann |
| <i>A. fumigatus</i> Af293 | Wildstamm | Prof. Utz Reichard, Universität Göttingen |
| <i>A. nidulans</i> FGSC A26 | Wildstamm, biA1 | FGSC (KÄFER, 1965) |
| <i>A. nidulans</i> FGSC A187 | Wildstamm, <i>pabaA1 ya2</i> | FGSC (BARRATT <i>et al.</i> , 1965) |
| <i>A. niger</i> DSM 737 | Wildstamm | Leibniz Institut DSMZ |
| <i>A. terreus</i> NIH 2624 | Wildstamm | Dr. Matthias Brock, University of Nottingham |

| | | |
|---|--|--|
| <i>A. oryzae</i> DSM 1862 | Wildstamm | Leibniz Institut DSMZ |
| <i>A. giganteus</i> DSM 1146 | Wildstamm | Leibniz Institut DSMZ |
| <i>A. clavatus</i> DSM 816 | Wildstamm | Leibniz Institut DSMZ |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta tcsC$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta tcsC$ | (MCCORMICK <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta skn7$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta skn7$ | diese Arbeit |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta skn7+skn7$ mit <i>gpdA</i> -Promoter | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta skn7+skn7$ | diese Arbeit |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta skn7+skn7$ mit nativem Promoter | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta skn7+skn7$ | diese Arbeit |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta ssk1$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta ssk1$ | Dr. Karl Dichtl, Universität München |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta sakA$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta sakA$ | Dr. Karl Dichtl, Universität München |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta sakA+sakA$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta sakA +$ <i>sakA</i> | diese Arbeit |
| <i>A. fumigatus</i> $\Delta skn7\Delta sakA$ | <i>A. fumigatus</i> , AfS35 $\Delta skn7\Delta sakA$ | diese Arbeit |
| <i>A. nidulans</i> RFP | <i>A. nidulans</i> , FGSC A26 RFP | |
| <i>A. nidulans</i> $\Delta nika$ | <i>A. nidulans</i> , FGSC A26 $\Delta nika$ | diese Arbeit |
| <i>A. nidulans</i> $\Delta nika + nika$ | <i>A. nidulans</i> A26 $\Delta nika+nika$ | diese Arbeit |
| <i>A. nidulans</i> $\Delta nika + tcsC$ | <i>A. nidulans</i> A26 $\Delta nika+tcsC$ | diese Arbeit |

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Interne Nummer |
|--------------------------|---|----------------|
| nikA-up-FOR | TCGTGCAGCAGCAGTCGCCCA | Vet 78 |
| nikA-up-REV-SfiI | GCGGCCTGAGTGGCCTTTGCCCTGGGATACT CA | Vet 79 |
| nikA-do-FOR-SfiI | GTGGCCATCTAGGCCAGCTGACTGGACGAGC AG | Vet 81 |
| nikA-do-REV | CATTAGGAGCTACGTCTAGAT | Vet 80 |
| nikA-700-FOR | TGTCCACTGGTCTGCGTT | Vet 137 |
| nikA-Rev | TCATGGTCTTACCCTATCTAT | Vet 138 |
| nikA-21-FOR | ATGGCTTGCGCGGACGAGACC | Vet 190 |
| NikA (EcoRV)-REV | TCATGGTCTTACCCTATCTATGGAGAGC | Vet 301 |
| TcsC-FOR-Long | ATGACTGGCGCAGACGAGACGCTCACAGC | Vet 6 |
| TcsC-REV-Long | TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTG ACCCGT | Vet 7 |
| TcsC AA 1-208 (PmeI)-REV | CAATGCCCGTCGCGTGTG | Vet 289 |
| Tk-fwd | AACTCTATCAGAGCTTGGTTG | Vet 102 |
| hph-rev | TTCCTTTGCCCTCGGACGAG | Julia 145 |
| pSilent Hyg-FOR | GCCGCGACGTTAACTGATATT | Vet 366 |
| Hygromycin- | ATCGGGAGCGCGGCCGAT | Vet 58 |

| | | |
|-------------------|-----------------------|-------------|
| REV | | |
| gpdA(p)FOR | CTTTGCCCGGTGTATGAAACC | Yannik 1 |
| psk379Umba u | ATGACTCACTACCCGAATGGG | Vet 348 |
| pSilentHygF OR | GCCGCGACGTAACTGATATT | Vet 366 |
| pSilentHygR EV | GCCAAGAGCGGATTCCTCAG | Vet 367 |

2. Organismenanzucht

2.1. Medien

2.1.1. Medien für *Escherichia coli*

E. coli DH5 α wurde in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen, welches die folgende Zusammensetzung hat:

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

Im Anschluss autoklavieren.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden diese in LB-Medium ohne Zusatz angezogen. Bei der Klonierung eines Plasmids in *E. coli* wurde dem Medium zur Selektion Ampicillin (Amp) in einer Konzentration 1 μ g/ml hinzugefügt (Stammlösung: 100 mg/ml). Zur Herstellung von LB-Amp Agarplatten wurde das Medium pro Liter mit zusätzlich mit 18 g Bactoagar (Difco) versetzt.

2.1.2. Medien für die Anzucht von *A. fumigatus* und *A. nidulans*

A. fumigatus und *A. nidulans* wurden mit den folgenden Medien angezogen:

Sabouraud-Medium:

Herstellung der Einzelkomponenten:

2 x Pepton (2 %):

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Pepton | 20 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Den pH-Wert von 7,0 mit NaOH oder HCl einstellen, autoklavieren.

2 x Glucose (8 %):

| | |
|-----------------------------------|------------|
| D-Glucose | 80 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Für die Herstellung des Sabouraud-Mediums werden die Einzelkomponenten zu gleichen Teilen gemischt.

Sabouraud-Agar:

Herstellung der Einzelkomponenten:

2 x SAB-Agar:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Agar-Agar 4 % | 20 g |
| D-Glucose 8 % | 40 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 500 ml |

2 x Pepton (2 %): (s. oben)

2 x SAB-Agar und 2 x Pepton (2 %) zu gleichen Teilen mischen und autoklavieren.

Aspergillus-Minimalmedium (AMM) ((HILL *et al.*, 2001):

| | |
|--|------------|
| 20 x Salzlösung (ohne NaNO ₃) | 50 ml |
| 40 % Glucose | 25 ml |
| 2 M C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ (Ammoniumtartrat) | 10 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 ml |
| Spurenelementlösung | 1 ml |
| für AMM-Agar: | |
| Agar | 20 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Für die Herstellung des Mediums ist kein erneutes Autoklavieren nötig, da die Einzelkomponenten bereits autoklaviert wurden.

Zur Anzucht von *A. nidulans* bedarf es zusätzlich der Zugabe von Biotin, gelöst in demineralisiertem Wasser, in einer Endkonzentration von 0,02 µg/ml.

Zur Herstellung von AMM-Agar wurde den oben genannten und autoklavierten Komponenten zusätzlich 20 g Agar hinzugefügt, was ein anschließendes Autoklavieren notwendig machte.

Für diese Arbeit wurde als Standard-Stickstoffquelle Ammoniumtartrat herangezogen.

Eine alternative N-Quelle ist NaNO₃. Wurde diese verwendet, kam die Salzlösung mit NaNO₃ zur Herstellung des Mediums zum Einsatz.

Herstellung der Einzelkomponenten:

Salzlösung (20 x) ohne MgSO₄, ohne N-Quelle:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| 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 |

Im Anschluss autoklavieren.

Salzlösung (20 x) ohne MgSO₄, mit Nitrat:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| NaNO ₃ | 120g |
| 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 |

Im Anschluss autoklavieren.

40% D-Glucose:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| D-Glucose | 400 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Im Anschluss autoklavieren (die Glucose löst sich erst beim Autoklavieren).

2 M Ammoniumtartrat-Lösung:

| | |
|--|-----------|
| C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ | 184,15 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 500 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

MgSO₄ (200 x):

| | |
|--|-----------|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 52 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 500 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Spurenelementlösung (nach Hunter) (HILL *et al.*, 2001):Lösung I: (Komponenten in der genannten Reihenfolge zugeben):

| | |
|--|-------|
| H ₂ O | 80 ml |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 1 g |
| EDTA | 10 g |

Der pH-Wert wurde mit KOH auf etwa 5,5 eingestellt (es entsteht eine goldgelbe Lösung)

Lösung II: (Komponenten in der genannten Reihenfolge zugeben):

| | |
|--|--------|
| H ₂ O | 80 ml |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 4,4 g |
| H ₃ BO ₃ | 2,2 g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 1,0 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,32 g |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0,32 g |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O | 0,22 g |

Die Lösungen I und II wurden zusammengegeben und der pH mit KOH auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde das Endvolumen von 200 ml mit H₂O_{dest.} eingestellt und die Spurenelementlösung zu 1 ml Aliquots eingefroren.

AMM-Agar mit Xylose statt Glucose:

| | |
|---|------------|
| 20 x Salzlösung (ohne NaNO ₃) | 50 ml |
| Xylose (2 %) | 50 ml |
| 2M C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ (Ammoniumtartrat) | 10 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 ml |
| Spurenelementlösung | 1 ml |
| Agar-Agar | 20 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Czapek-Dox-Agar (Merck KGaA, Darmstadt):

| | |
|-----------------------------------|------------|
| CD-Agar | 50g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Für die verschiedenen Versuche mit Czapek-Dox-Agar wurde dieser mit unterschiedlichen AMM-Komponenten substituiert. Es erfolgte jeweils entweder die Zugabe von Spurenelementen, Ammoniumtartrat oder Spurenelementen und Ammoniumtartrat.

Medien für Pilztransformationen:

2 x Sorbitol-Agar:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Agar-Agar | 10 g |
| D-Glucose | 5 g |
| Sorbitol | 109 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 250 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

2 x Soft-Agar:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Agar-Agar | 3,5 g |
| D-Glucose | 5 g |
| Sorbitol | 109 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 250 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Für das Gießen der jeweils zwei Transformationsplatten wurden 12,5 ml 2 x AMM ohne D-Glucose (mit Ammoniumtartrat) in eine 50 ml Röhre (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) vorgelegt und der jeweilige Selektionsmarker hinzu pipettiert. Anschließend wurden 12,5 ml des geschmolzenen, etwas abgekühlten 2 x Sorbitol-Agars dazugegeben, der Ansatz gut durchmischt und in die Petrischalen gegossen. Bei *A. nidulans* erfolgte eine zusätzliche Zugabe von Biotin in einer Endkonzentration von 0,02 µg/ml.

Der 2 x Soft-Agar wurde ebenfalls im Verhältnis 1:1 mit 2 x AMM ohne D-Glucose (mit Ammoniumtartrat) gemischt. Dies erfolgte jedoch schon in den Autoklavierflaschen. Für das Gießen der obersten Schicht der Transformationsplatten, wurde der Sorbitol-AMM-Softagar zunächst bei 53°C im

Wasserbad flüssig gehalten. Im letzten Schritt der Transformation wurden 5 ml des Soft-Agars mit dem Protoplastengemisch vermengt und dies auf die bereits vorhandenen Sorbitol-AMM-Platten gegeben. Bei *A. nidulans* wurde Biotin in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben

2 x Aspergillus-Minimalmedium (AMM) ohne D-Glucose:

| | |
|--|-----------|
| 20 x Salzlösung (ohne NaNO ₃) | 50 ml |
| 2 M C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ (Ammoniumtartrat) | 10 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 ml |
| Spurenelementlösung | 1 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 500 ml |

Die Komponenten wurden steril abgefüllt.

Lösungen für Pilztransformationen:

Lösung 1: (200 ml)

| | |
|--|-----------|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 59,6 g |
| 0,2 M Na ₂ HPO ₄ | 7,2 ml |
| 0,2 M NaH ₂ PO ₄ | 2,8 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 200 ml |

Die Komponenten wurden steril abgefüllt.

Der pH-Wert wurde anschließend auf 5,5 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert.

Lösung 2: (500 ml)

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Sorbitol | 91,1 g |
| 1 M TRIS-HCl, pH 7,5 | 5 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 500 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Lösung 3: (100 ml)

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Sorbitol | 18,22 g |
| 1 M TRIS-HCl, pH 7,5 | 1 ml |
| 1 M CaCl ₂ | 1 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 100 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Lösung 4/ PEG: (100 ml)

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Polyethylenglykol PEG 4000 | 60 g |
| 1 M TRIS-HCl, pH 7,5 | 1 ml |
| 1 M CaCl ₂ | 1 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 100 ml |

Im Anschluss autoklavieren.

Alle aufgezählten Medien und Lösungen wurden bei 121°C und 3 Bar für 20 min autoklaviert.

2.2. Selektionsmarker und Stressoren

Zur selektiven Anzucht bestimmter Stämme wurden den Medien entsprechende Selektionsmarker hinzugefügt.

| | |
|------------------------------------|--|
| Ampicillin | 100 µg/ml, in demineralisiertem Wasser |
| Pyriithiamin | 0,1 µg/ml, in 98% unvergälltem Ethanol |
| Hygromycin B (InvivoGen, Toulouse) | 200 µg/ml |

Um Pilzstämme unter bestimmten Stressbedingungen zu untersuchen, wurden dem jeweiligen Medium unterschiedliche Stressoren zugesetzt.

| | |
|-------------------------------|---|
| Fludioxonil | 1 µg/ml, in 98% unvergälltem Ethanol |
| Sorbit | 1,2 M und 2 M |
| Glycerin | 1,2 M und 2M |
| NaCl | 1 M |
| CaCl ₂ | 50, 100 und 500 mM |
| H ₂ O ₂ | 1 - 2 mM |
| t-BOOH | 0,1 - 0,4 mM |
| Menadion | 0,01 mM |
| Kongorot | 20 und 50 µM, in 98% unvergälltem Ethanol |
| Calcofluor Weiß | 15 - 25 µM |

2.3. Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde in sterilen Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium aerob unter Schütteln (140 rpm) bei 37°C angezogen. Die Lagerung bestimmter *E. coli* Klone über einen kürzeren Zeitraum erfolgte nach Ausplattieren und Anziehen auf LB-Ampicillin-Agarplatten bei 4°, für eine längere Lagerung wurde zu 700 µl einer flüssigen Übernachtskultur 300 µl Glycerin [50% (v/v)] hinzugegeben und diese dann bei -80°C eingefroren.

2.4. Anzucht von *Aspergillus*

Um neue Sporenstammlösungen zu erhalten, wurden schon vorhandene Sporenlösungen je nach Konzentration zunächst verdünnt (meist 1:200 – 1:500). Anschließend wurden Zellkulturflaschen (TC-Flasche T25, Standard; SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht), in die zuvor 12,5 ml Nähragar (je nach Bedarf mit Selektionsmarker) gegeben wurde, mit 100 µl dieser verdünnten Sporensuspension versehen. Um eine gute Verteilung der Sporen zu gewährleisten, wurden sterile Glaskügelchen hinzugegeben und die Flüssigkeit durch Schwenken der Flasche über den Agar verteilt. Die beimpften Zellkulturflaschen wurden im Anschluss bei 37°C (bei *A. nidulans* zum Teil auch 30°C) für mehrere Tage inkubiert. Nach etwa 2-5 Tagen bildeten sich auf dem gewachsenen Myzel dunkelgrüne oder bräunliche Sporen, die geerntet werden konnten. Hierzu wurden erneut sterile Glaskugeln in

die Flaschen gegeben, zwischen 5-10 ml steriles H₂O hinzupipettiert und die Sporen durch Schwenken und Schütteln von den Konidiophoren abgelöst. Die nun grünlich bis braun gefärbte Flüssigkeit wurde im Anschluss durch sterile, mit Miracloth Filtern (Merck) ausgekleidete Trichter geschüttet und von 15 oder 50 ml Röhren (SARSTEDT) aufgefangen. Je nach Dichte der Konidien wurde der Erntevorgang noch einige Male wiederholt. Die aufgefangene Sporensuspension konnte bei einer zu geringen Sporendichte noch abzentrifugiert werden und wurde anschließend in Einfrierröhrchen (CryoPure Gefäß, 1,8 ml; SARSTEDT) pipettiert, in denen sie mittelfristig bei 4°C gelagert wurden.

Um die Sporenkonzentration zu bestimmen, wurden verdünnte Sporensuspensionen (1:500 - 1:1.000) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die erhaltenen Konzentrationen lagen meist zwischen 1×10^7 und 1×10^9 Sporen/ml.

Eine alternative Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe eines Ultraspec10 Zelldichte-Messgerätes (Amersham Biosciences). Dieses misst bei 600 nm die optische Dichte (OD₆₀₀) einer verdünnten Sporensuspension, anhand derer unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration der Sporen pro ml errechnet wurde. Die Formel für die Berechnung lautet: $OD_{600} \times 2,24 \times 10^7 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Sporen/ml}$.

Für eine langfristige Lagerung wurden je nach Sporendichte 40 - 50 µl der Sporensuspension in ein Microbank™ Röhrchen (Pro-Lab Diagnostics, Canada) gegeben. Ein solches Röhrchen enthält 25 Mikrosphären und eine spezielle Kryokonservierungslösung. Durch die Mikrosphären wird gewährleistet, wiederholt Kulturen des ursprünglichen Organismus entnehmen zu können. Nach einer Wartezeit von mindestens 30 min, in der die Sporen sedimentieren konnten, wurde der Überstand abgenommen, bis die Mikrosphären, an denen sich die Sporen nun abgesetzt hatten, freigelegt wurden. Im Anschluss wurden die Sporen in die bei -80°C gelagerte Mikrobank Stammsammlung aufgenommen.

Für die Anzucht in Flüssigkulturen wurden angepasste Mengen der jeweiligen Sporensuspensionen in geeignete Gefäße, wie beispielsweise Erlenmeyerkolben, Röhren oder Mikrotiterplatten (TC-Platte, 24-Well, Standard, F; SARSTEDT) in die entweder Sabouraud- oder AMM Medium (ggf. mit Selektionsmarker) vorgelegt wurde, pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine aerobe Inkubation bei 30°C

oder 37°C, entweder im Brutschrank (24-Well-Platten) oder in Schüttelinkubatoren (Erlenmeyerkolben, Röhren), meist bei 140 rpm.

2.5. Verschiedene Wachstumsversuche mit *Aspergillus* Stämmen

2.5.1. Tüpfeltests

Für die Durchführung von Tüpfeltests wurden Platten mit AMM-Agar gegossen, der zuvor je nach Versuch mit verschiedenen Inhaltsstoffen (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.2.) supplementiert worden war. Die Konzentrationen von frisch isolierten Konidien-Suspensionen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ausgehend von einer Lösung mit 10^7 Sporen pro ml wurden Verdünnungsreihen (jeweils 1:10) angelegt; aus diesen Sporensuspensionen wurde jeweils 1 µl pro Tüpfel auf die Platten aufgebracht, d.h. je Platte wurden Tüpfel mit 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 Sporen aufgetragen. Diese Platten wurden im Anschluss für bis zu vier Tage meist bei 37°C inkubiert. Es erfolgte stets ein zusätzlicher Tüpfeltest auf einer Kontrollplatte ohne Stressor, um das Wachstum des untersuchten Stammes unter günstigen Bedingungen mit dem unter Stress vergleichen zu können. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde jeder Versuch mindestens zwei Mal durchgeführt.

2.5.2. Agardiffusionstests

Für Agardiffusionstests mit Fludioxonil wurden Sporen gleichmäßig auf AMM-Agarplatten verteilt, auf die anschließend Filterplättchen aufgebracht wurden, die mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs getränkt waren. Die nach bestimmten Inkubationszeiten gebildeten Hemmhöfe wurden fotografiert und im Anschluss miteinander verglichen. Auch hier fanden Doppelbestimmungen statt.

3. Genetische und molekularbiologische Methoden

3.1. Amplifizierung von DNS-Fragmenten mittels PCR

Um bestimmte DNS-Fragmente amplifizieren zu können, wurden entweder die Taq-Polymerase oder verschiedene Q5-High-Fidelity Polymerasen mit ihren dazugehörigen Puffersystemen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (MULLIS *et al.*, 1986) herangezogen.

Fanden PCRs zu analytischen Zwecken statt, also lediglich um bestimmte Stücke der DNS nachzuweisen, wurden die Reaktionen mit der *DreamTaq DNA-Polymerase* (ThermoFisher Scientific™) und einem Probenvolumen von 25 µl durchgeführt. Für Klonierungen und Ähnliches wurde dagegen die *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main) und ein Probenvolumen von 50 µl verwendet. Die PCR fand in einem Mastercycler® pro (Eppendorf AG, Hamburg) statt. Die Polymerisierungstemperatur war an die jeweiligen Angaben des Herstellers der Polymerase anzupassen, die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide (Metabion) (*annealing*) wurde mit Hilfe des Tm Calculators (NEB) (<http://tmcalculator.neb.com/>) ermittelt und richtete sich nach den jeweiligen Schmelztemperaturen. Das Protokoll für eine PCR mit dem DreamTaq PCR Master Mix (2 x) (ThermoFisher Scientific™) lautet zum Beispiel:

1. Initiale Denaturierung: 95°C, 1-3 min
2. Denaturierung: 95°C, 30 s
3. Annealing: Tm-5, 30 s
4. Elongation: 72°C, 1 min
5. Finale Elongation: 72°C, 5-15 min
6. Kühlung 4°C

Die Annealingtemperatur lag je nach Primerkombination zumeist zwischen 50-70°C. Die Elongationszeit von 1 min gilt für PCR Produkte bis 2.000 bp und sollte bei größeren Produkten um 1 min/kb verlängert werden. Die Schritte 1 und 5 finden einmalig statt, Schritt 2 - 4 werden 25 - 40 Mal wiederholt. Am Ende kühlte das Gerät die Proben auf 4°C herunter.

Anschließend erfolgte, falls nötig, eine Aufreinigung der Proben mit dem Aufreinigungskit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega GmbH, Mannheim) nach folgendem Protokoll:

Zunächst wird zu der Probe die gleiche Menge Membranbindungslösung pipettiert. Dieser Ansatz wird anschließend in eine Minisäule gegeben, die zuvor in ein Sammelröhrchen gesteckt wurde. Es folgt eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur, in der die Bindung des PCR Produkts an die Membran der Minisäule erfolgt. Danach wird der Ansatz für eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert, der Durchfluss im Anschluss verworfen und die Minisäule wieder auf die Sammelröhre gesteckt. Die nächsten Schritte stellen Waschschriffe dar. Im ersten dieser Schritte wurden 700 µl Membranwaschlösung hinzugegeben und der Ansatz erneut bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde der Schritt mit 500 µl Waschlösung und einer Zentrifugationsdauer von 5 min wiederholt. Anschließend an ein erneutes Leeren der Sammelröhre wurde der Ansatz ein weiteres Mal für 1 min zentrifugiert, um Ethanolreste vollständig zu entfernen. Um das PCR Produkt nun aus der Membran zu lösen, wurde die Minisäule in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, 50 µl Nuclease-freies Wasser hinzupipettiert, dies bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert und im Anschluss ein letztes Mal für eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen der Minisäule wird die nun gereinigte Probe bis zu deren Weiterverwendung mittelfristig bei 4°C oder bei längeren Zeiträumen -20°C gelagert.

3.2. Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des *PureYield™ Plasmid Midiprep System Kits* (Promega).

Die über Nacht in einem Erlenmeyerkolben angezogenen Bakterien wurden am nächsten Morgen in eine 50 ml Röhre (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bei 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3 ml „Cell Resuspension Solution“ resuspendiert. Nach Hinzufügen von 3 ml „Cell Lysis Solution“, 3 - 5-maligem Invertieren und einer 3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden 5 ml „Neutralization Solution“ hinzupipettiert und das Röhrchen etwa 5 -

10 Mal invertiert, um die Lösungen vollständig miteinander zu vermischen. Danach wurde das Lysat bei 15.000 g und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Für den folgenden Schritt wurde eine blaue Säule („PureYield™ Clearing Column“) auf eine weiße („PureYield™ Binding Column“) gesteckt und der Zentrifugationsüberstand vorsichtig in die blaue Säule geschüttet. Die aufeinander gesteckten Säulen wurden auf einer Vakuumapparatur platziert und diese eingeschaltet, bis die gesamte Flüssigkeit durch beide Säulen gelaufen war. Nach Ausschalten des Vakuums wurde die blaue Säule verworfen, 5 ml „Endotoxin Removal Wash“ hinzugefügt und das Vakuum wieder eingeschaltet. Im Anschluss wurden 20 ml „Column Wash Solution“ auf die Membran des weißen Röhrchens pipettiert und mit Hilfe des Vakuums durch diese gezogen. Die Vakuumapparatur wurde danach noch weitere 30 - 60 s laufen gelassen, um die Membran vollständig zu trocknen. Dann wurde das Röhrchen abgenommen, auf einem Papiertuch abgetupft und in ein frisches 50 ml Falcon gegeben. Nach Zugabe von 600 ml Nuclease-freiem Wasser auf die Membran und einer Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 5 min bei 3.220 g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert, das Filtrat im Anschluss in ein frisches 1,5 µl Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf Quality™) überführt und entweder direkt für Pilztransformationen verwendet oder eingefroren.

3.3. Isolierung chromosomaler DNS aus *Aspergillus*

Die Isolierung chromosomaler DNS erfolgte mit Hilfe des *MasterPure Yeast DNA Purification Kits* (Lucigen, Biosearch™ Technologies).

Für die Isolierung wurde am Vortag eine Übernachtkultur des Pilzes angesetzt. Es wurden dafür ca. 50 ml AMM-Medium (ggf. mit Resistenzmarker) in einen Erlenmeyerkolben gegeben, dieser dann mit einer Sporensuspension des gewünschten Pilzes (z. B. 50 µl, je nach Sporenkonzentration) beimpft und im Anschluss bei 37°C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Das gewachsene Myzel wurde am darauffolgenden Tag durch einen sterilen, mit Miracloth Filterpapier ausgelegten Trichter, geschüttet. Nach 1-2-maligem Waschen mit H₂O_{dest.} und gründlichem Abtropfen, wurde das Myzel mit einem Spatel geerntet und ca. eine Spatelspitze in ein DNA-Lysing Matrix Röhrchen gegeben, in das zuvor 225 µl „Yeast Cell Lysis Solution“ vorgelegt wurde. Das

Myzel wurde nun im MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G Instrument (ThermoFisher Scientific™) für 40 s bei 6 m/s mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Röhrchen für 30 min bei 65°C auf dem Heizblock inkubiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 112,5 µl MCP „Protein Precip Reagent“, wurde der Ansatz für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 µl Eppendorf Safe-Lock Tube gegeben, 375 µl Isopropanol hinzupipettiert und das Gefäß nach dem Verschließen mehrfach invertiert, bis die DNS als weiße Flöckchen ausfiel. Anschließend wurde der Ansatz bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 µl gekühltes, 70 % (v/v) Ethanol hinzugegeben um das Sediment zu waschen. Dann erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm, nach welchem erneut der Überstand verworfen und das zurückgebliebene Pellet bei geöffnetem Deckel schließlich bei 50°C im Heizblock getrocknet wurde. Zum getrockneten Pellet wurden dann 100 µl RNase in H₂O_{dest.} (1:500) gegeben. Die DNS kann im Anschluss direkt für die Durchführung von PCRs verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.4. Konzentrationsbestimmung von DNS und anderen Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte mit dem *NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spektrophotometer* (ThermoFisher Scientific™). Dieses Gerät misst die Probe photometrisch bei 260 und 280 nm gegen einen Leerwert (H₂O_{dest.}) und berechnet dann die Konzentration.

3.5. Agarosegelelektrophorese

Zur Größenbestimmung bzw. Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Die Standard-Agarosekonzentration (Agarose Standard, Roti®agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) betrug 1 % (w/v) in 1 x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE buffer 50 x; 1:50 verdünnt, PanReac AppliChem, Darmstadt). Um die DNS-Fragmente nach der Gelelektrophorese darstellen zu können, wurden dem Agarosegel pro 100 ml 4 µl des fluoreszierenden Farbstoffs *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (10.000X in water; Biotium, Fremont) zugefügt.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden diese im Verhältnis 1:6 mit dem Laufpuffer „DNA Gel Loading Dye (6x)“ (ThermoFisher Scientific™) für die visuelle Verfolgung markiert. Dies diente gleichzeitig der Erhöhung der Dichte der Probe, sodass sie in die Geltaschen pipettiert werden konnte.

Neben den Proben wurde der DNA-Leiter „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (ThermoFisher Scientific™) aufgetragen, welcher einzelne, chromatographisch gereinigte DNS Fragmente definierter Größe enthält und somit der Größenbestimmung und Quantifizierung der Proben diente. Die Auftrennung erfolgte anschließend in speziell angefertigten, mit TAE als Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammern für 45 - 90 min bei 140 oder 240 Volt (je nach Gelgröße/ Abstand von Kathode und Anode). Im Anschluss konnten die Gele mit dem „UVP GelStudio“ (AnalytikJena AG, Jena) Bildgerät (UV-Transilluminator) direkt unter UV-Licht angesehen und fotografiert werden.

3.6. Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „Monarch® DNA Gel Extraction“ Kit (NEB).

Zunächst wurde hierfür das Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein 2 µl Eppendorf Safe-Lock Tube überführt, gewogen und das vierfache Volumen an „Gel Dissolving Buffer“ hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Probe bei 50°C inkubiert und regelmäßig mit dem Vortex-Genie® 2 Shaker (Scientific Industries, Inc., New York) bei 2.700 rpm geschüttelt, bis das Gel vollständig gelöst war. Danach wurde die Probe in eine Säule mit einer Membran gegeben, diese in ein Sammelröhrchen gesteckt und bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 200 µl „DNA Wash Buffer“ hinzupipettiert und erneut für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 µl Eppendorf Safe-Lock Tube gegeben und dann entweder „DNA Elution Buffer“ oder RNase-freies Wasser hinzugegeben, wobei hier je nach erwarteter Konzentration meist Volumina zwischen 20 - 50 µl verwendet wurden. Zuletzt erfolgte zur Gewinnung des Eluats ein letzter Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 1 min.

3.7. Enzymatische Behandlung von Nucleinsäuren

3.7.1. Spaltung von DNS

Um Nucleinsäuren sequenzspezifisch zu spalten, wurden bestimmte Restriktionsendonucleasen (ThermoFisher Scientific™) verwendet. Die Reaktionsbedingungen wie Konzentrationen, Puffer und Reaktionstemperatur wurden an die Angaben des Herstellers angepasst. Anschließend wurden die Proben mithilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* (Promega) nach Herstellerprotokoll gereinigt und in einer Gelelektrophorese auf ihre vollständige Spaltung kontrolliert. Es wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: PmeI (FastDigest MssI), SfiI (FastDigest SfiI), EcoRV (Eco32I) (ThermoFisher Scientific™)

3.7.2. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen

5' Phosphorylierungen von DNS-Fragmenten wurden mit einer *T4-Polynucleotide Kinase* (T4 PNK, 10 U/μL; ThermoFisher Scientific™) durchgeführt, die Dephosphorylierung mit Hilfe einer thermosensitiven Alkalischen Phosphatase (*Fast AP* 1 U/μL; ThermoFisher Scientific™). Falls nötig, wurde die Enzymaktivität im Anschluss an die Reaktion durch Hitzeinaktivierung unterbrochen und die Probe mittels *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* (Promega) gereinigt. Alle Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt.

3.7.3. Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation von DNS-Fragmenten wurde die *T4-DNA-Ligase* (5 Weiss U/μL; ThermoFisher Scientific™) verwendet. Meistens wurde das Enzym in einer Konzentration von 1 U/μl eingesetzt. Bei sogenannten *blunt-end* Ligationen enden die verwendeten DNS-Fragmente ohne Basenüberhang. Für solche Ligationen dienen die *blunt-end* schneidenden Restriktionsenzyme PmeI und EcoRV. Bei *sticky-end* Ligationen wurden DNS-Fragmente mit komplementärem Basenüberhang ligiert. Solche Schnittstellen entstanden durch das Restriktionsenzym SfiI. Bei schwierigeren Ligationen, wie es zum Beispiel *blunt-end* Ligationen sind, wurde das Enzym in höheren Konzentrationen eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die Probe in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und so auf die Vollständigkeit der Ligationsreaktion überprüft.

3.8. Transformation von *E. coli*

3.8.1. Chemische Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von Genen durch freie DNS. „Kompetente Zellen“ sind Zellen, die dazu fähig sind, freie DNS aufzunehmen. Nachfolgend ist die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien beschrieben.

3.8.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode, einer Variante der Calciumchlorid-Methode (COHEN *et al.*, 1972). Dafür wurde eine Übernachtskultur der Bakterien 1:20 mit frischem LB-Medium verdünnt und für ca. 2 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator mit 140 rpm bis zu einer OD_{600 nm} von 0,56 bis 0,6 inkubiert. Die darauffolgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Kultur für 5 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 3.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 2/5 des Ausgangsvolumens an Transformationspuffer I (Tfb I) Puffer resuspendiert.

Nach erneuter Inkubation auf Eis für 5 min, wurden die Zellen wiederholt bei 3.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Darauf folgte die Resuspension des Sediments in 2/25 des Ausgangsvolumens Tfb II Puffer und eine Inkubation auf Eis für 15 min. Danach wurden die Zellen in vorgekühlten 1,5 µl Eppendorf Safe-Lock Tubes zu 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und schließlich bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer I (100 ml):

| | |
|----------------------------------|--------------------|
| K-Acetat pH 5,8 | 30 mM (0,3 g) |
| RbCl ₂ | 100 mM (1,21 g) |
| CaCl ₂ | 10 mM (0,15 g) |
| MnCl ₂ | 50 mM (1 g) |
| Glycerin | 15 % (v/v) (15 ml) |
| H ₂ O _{dest} | 85 ml |

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Essigsäure auf 5,8 eingestellt.

Transformationspuffer II Puffer (50 ml):

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| MOPS pH 7 | 10 mM (0,12 g) |
| CaCl ₂ | 75 mM (0,55 g) |
| RbCl ₂ | 10 mM (0,06 g) |
| Glycerin | 15 % (v/v) (7,5 ml) |
| H ₂ O _{dest.} | 42,5 ml |

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Essigsäure auf 6,5 eingestellt.

3.8.1.2. Durchführung einer chemischen Transformation

Die chemische Transformation erfolgte modifiziert nach der Methode von (HANAHAN, 1983). Nachdem die chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden ca. 5 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes (je nach Konstrukt 3.000 – 10.000 ng) steril hinzugefügt. Alle in dieser Arbeit herangezogenen Plasmide enthalten eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion der bei der Transformation entstehenden Klone. Plasmid-DNS wurde in geringeren Konzentrationen eingesetzt, lineare Ligationen, zum Beispiel Deletionskonstrukte mit einer Konzentration von 10.000 ng. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, wurde für 90 s ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Ein erneutes Abkühlen auf Eis folgte für 2 min. Daraufhin wurde 1 ml LB-Medium steril hinzugegeben und es fand eine einstündige Inkubation bei 37°C unter

Schütteln (400 rpm) statt. Im Anschluss wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf eine LB-Ampicillin Platte ausgestrichen. Der restliche Ansatz wurde dann bei 13.000 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen, das Sediment mit 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausplattiert. Schließlich wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.9. Transformation von *Aspergillus*

3.9.1. Transformation von Protoplasten

Bei Transformationen von *A. fumigatus* wurden Plasmide beziehungsweise lineare DNS-Konstrukte mit Hygromycin- oder Pyriithiamin-Resistenzkassette eingesetzt, bei *A. nidulans* ausschließlich Plasmide mit Hygromycin-Resistenzkassette. Zur Selektion der Transformationsklone wurde dem Anzuchtmedium der entsprechende Selektionsmarker zugesetzt.

Die Transformation von *Aspergillus* Protoplasten erfolgte nach einem von Prof. Sven Krappmann (persönliche Mitteilung) modifizierten Protokoll (YELTON *et al.*, 1984).

Am Tag vor der Transformation wurden pro Ansatz 50 ml AMM + D (Ammoniumtartrat) in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit frischen Sporen beimpft und für etwa 16 - 18 h bei 30 oder 37°C unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Am Morgen der Transformation erfolgte die Ernte des Myzels mit Hilfe eines *Nalgene™ Rapid-Flow™* sterilen Einweg-Flaschenaufsatzfilters mit SFCA-Membran (ThermoFisher Scientific™, Porengröße: 45 µm) und einer Vakuumpumpe.

Dabei sollte das Myzel keine großen Ballen, sondern lediglich einen feinen weißen Schleier im Medium und etwas Bodensatz geformt haben. Es wurde durch leichtes Schwenken und gegebenenfalls Lösen des Bodensatzes mit Hilfe eines abgeflamnten Spatels gelöst und in den Flaschenaufsatzfilter geschüttet und filtriert. Das auf der Membran zurückgebliebene Myzel wurde drei Mal mit sterilem H₂O_{dest.} gewaschen und im Anschluss mit einem abgeflamnten Spatel gerntet. Es wurde in einen frischen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt, in den 10 ml einer

Enzymlösung vorgelegt wurde (0,2 g Glucan X (Lysing Enzymes, von *Trichoderma harzianum*, Merck) in 10 ml Lösung 1 mittels Vortex lösen und dann sterilfiltrieren (0,45 µl Porengröße).

Danach folgte eine Inkubation für etwa 45 - 90 min bei 30 oder 37°C und 140 rpm zur Protoplastierung. Diese wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert, indem ca. 40 µl der Lösung auf einen Objektträger pipettiert und betrachtet wurden. Waren genug Protoplasten vorhanden, wurde das Protoplastengemisch durch einen doppelt mit Miracloth-Filter ausgekleideten Trichter in eine auf Eis gestellte 50 ml Röhre geschüttet um es von Myzelrückständen zu befreien.

Im Anschluss wurde der Filter mit 20 ml der kalten Lösung 2 nachgewaschen und das Eluat bei 2.800 g für 15 min bei 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, das Sediment in 1 ml kalter Lösung 2 durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Pipette und abgeschnittener blauer Pipettenspitze resuspendiert und in ein steriles 1,5 µl Eppendorf Safe-Lock Tube überführt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2.800 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand vorsichtig mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze abgenommen und das Protoplastenpellet in 400 µl kalter Lösung 3 resuspendiert. 10 µl dieser Protoplastenlösung wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit der Lösung 3 auf eine Konzentration von ca. 1×10^8 / ml verdünnt. Davon wurden 100 µl (1×10^7 Protoplasten) zu dem in eine 15 ml Röhre vorgelegten und dort gekühlten zu transformierenden Konstrukt gegeben. Die Konzentration der vorgelegten DNS-Lösung wurde bei Plasmiden zuvor auf 3 - 5 µg, für lineare DNS (z. B. Deletionskonstrukte) auf 10 µg eingestellt, wobei das Volumen maximal 30 µl betragen durfte. Im Anschluss wurden 50 µl Lösung 4 hinzugegeben, der Ansatz vorsichtig vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die langsame Zugabe von Lösung 4 in drei Schritten. Zunächst wurden nacheinander zweimal 500 µl, dann einmal 1 ml hinzupipettiert, wobei der Ansatz nach jeder Zugabe vorsichtig gemischt wurde, bis die Lösung homogen aussah. Anschließend wurde das Gemisch für 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 10 ml auf etwa 50°C abgekühlten AMM-Sorbitol-Weichagar (AMM-Agar 0,7% (w/v) + 1,2 M Sorbitol), mit dem die Protoplastenlösung durch Schwenken vermengt wurde. Dieses Gemisch wurde auf je zwei, die entsprechenden Selektionsmarker (Pyriithiamin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml, Hygromycin in einer Endkonzentration von 2

µg/ml) enthaltenden AMM-Sorbitol-Agarplatten (25 ml, AMM-Agar 2% (w/v) + 1,2 M Sorbitol) aufgegossen (ca. 6 ml pro Platte). Diese Platten wurden im Anschluss bei 37°C für etwa 3 Tage inkubiert.

Waren Einzelkolonien gewachsen, wurden diese mithilfe einer sterilen Öse abgenommen, auf eine neue Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarker überführt und ein Drei-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Die Gewinnung von Einzelkolonien musste an dieser Stelle erfolgen, da es sich bei Transformationskolonien zunächst um heterokaryontisches Material handelt, welches aus einzelnen Protoplasten, die jeweils mehrere Zellkerne enthalten, entstand. Um zu gewährleisten, dass der neue Stamm rein ist, war also die Auftrennung im Drei-Ösen-Ausstrich vonnöten. Die dort gewachsenen Einzelkolonien entstanden aus einkernigen Konidien. Durch DNS-Gewinnung aus diesen neu angezogenen Einzelkolonien und eine anschließende analytische PCR wurde geprüft, ob die Transformation erfolgreich war.

3.9.2. Generierung und genetische Verifizierung der $\Delta nika$ Deletion im Stamm A26

Die in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für alle Klonierungsexperimente wurde die Q5 High Fidelity Polymerase (NEB) verwendet. Um eine *nika* Deletionskassette zu generieren, wurden 1.000bp große, das *nika*-Gen (AN4479) flankierende Bereiche, amplifiziert. Hierfür wurden die Oligonukleotidpaare *nikA-up-FOR/ nikA-up-REV-SfiI* und *nikA-do-FOR-SfiI/ nikA-do-REV* verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Enzym SfiI (ThermoFisher Scientific™) verdaut und mit einer 4,8 kb großen Hygromycin B Resistenzkassette, die ebenfalls durch SfiI-Verdau aus dem Plasmid pSK528 (Anhang (1)) gewonnen wurde, ligiert.

Die verwendete Hygromycin B Resistenzkassette beinhaltet ein β -*rec/six*-System (HARTMANN *et al.*, 2010). Diese Hygromycin-Kassette besitzt eine *xyIP*-Promoter Sequenz, die in der Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen, in Anwesenheit von Glucose, die Resistenzkassette exprimiert. Wählt man jedoch ein Nährmedium, das als Kohlenhydratquelle Xylose statt Glucose enthält, aktiviert dieser *xyIP*-Promoter die Transkription eines β -*rec*-Gens, welches ihm

nachgeschaltet ist. Dieses codiert für eine β -Rekombinase, die die Hygromycin B-Resistenzkassette aus dem Konstrukt ausschneidet (HARTMANN *et al.*, 2010).

Bei Deletionen mit dieser Hyg B Resistenzkassette kann die Kassette im Anschluss also problemlos wieder entfernt werden, wodurch beispielsweise ein weiteres Deletionskonstrukt mit Hygromycin-Selektion oder bestimmte Gene in den Pilz eingebracht werden konnten (HARTMANN *et al.*, 2010).

Die entstandene Deletionskassette wurde durch Protoplastentransformation in den *A. nidulans* Stamm A26 eingebracht.

Um die Mutante im Anschluss zu verifizieren, wurde ein 729 bp großes Fragment am 3'-Ende von *nikA* mit Hilfe der Oligonukleotide *nikA*-700-FOR und *nikA*-Rev (Abbildung. 14, PCR 1) amplifiziert, sowie ein 212 bp großes Fragment, das sich in der Hygromycin B Resistenzkassette befand, mit Hilfe der Oligonukleotide *Tk*-fwd und *hph*-rev (Abb. 14, PCR 2).

Um die Deletionsmutanten anschließend zu komplementieren, wurde zunächst die Hygromycin B Resistenzkassette der Δ *nikA*-Mutante entfernt. Dies geschah, wie oben beschrieben, durch Wachstum der Mutante auf AMM Medium mit Xylose (HARTMANN *et al.*, 2010). Das *nikA*- und das *tcsC*-Gen wurden mit Hilfe der Oligonukleotidpaare *nikA*-21-FOR/ *nikA*-REV bzw. *tcsC*-FOR-Long/ *tcsC*-REV-Long von chromosomaler DNS der Stämme A26 und AfS35 amplifiziert. Die erhaltenen *blunt-end* PCR-Produkte wurden jeweils in die *PmeI*-Schnittstelle des Plasmids pSK379 (Anhang (2)) kloniert. Sie standen in diesen Konstrukten dann unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *A. nidulans* *gpdA* Promoters. Die Pyrithiamin Resistenzkassette des resultierenden Plasmids wurde anschließend durch die Hygromycin B Resistenzkassette des Plasmids pSILENT (Anhang (3)) ausgetauscht. Diese ist 1,8 kb groß.

Nach Protoplastentransformation der Δ *nikA*-Mutante wurden Hygromycin B resistente Klone isoliert und per PCR mit den Oligonukleotidkombinationen *Tk*-fwd/ *hph*-rev (Fragment der Hygromycin-Kassette des Deletionskonstrukts; 212 bp), pSilent *hyg*-FOR/ *hygromycin*-REV (Fragment der pSILENT Hygromycin B Resistenzkassette; 593 bp), *nikA*-700-FOR/ *nikA*-REV (Fragment des *nikA*-Gens; 729 bp) und *tcsC*-FOR-Long/ *tcsC* aa1-208-REV (Fragment des *tcsC*-Gens; 624 bp) analysiert.

3.9.3. Generierung und genetische Verifizierung der Deletionsmutanten des HOG-Signalwegs im Stamm AfS35

Die Generierung und genetische Analyse der Deletionsmutanten des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus* erfolgte wie unter 3.9.2. beschrieben. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Die Komplementationen der Deletionsmutanten erfolgten mit dem Plasmid pSK379, das eine Pyrithiamin Resistenzkassette enthält. Die jeweiligen Gene wurden in die PmeI-Schnittstelle (*blunt-end*) dieses Plasmids ligiert, ihre Ausrichtung mittels PCRs überprüft und die gesicherten Plasmide anschließend in den zu komplementierenden Stamm transformiert. Die entstandenen Mutanten wurden anschließend per PCR analysiert.

3.10. Sequenzierungen

Sequenzierungen von verschiedensten DNS-Fragmenten wurden von der Firma Eurofins Genomics (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg; vormals GATC, Konstanz) durchgeführt. Eine Analyse der Sequenzierungsdaten und die Erstellung schematischer Darstellungen von Plasmid-DNS erfolgte mithilfe der Programme *SeqBuilder Pro* (DNASTAR) und *Chromas* (Version 2.6.5, Technelysium).

4. Zellbiologische Methoden

4.1. Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Untersuchungen von Präparaten erfolgten an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM LB, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) sowie dem konfokalen Mikroskop „*Zeiss LSM 880 confocal laser scanning microscope*“ (Carl Zeiss, Jena). Die Bilder des Leica Mikroskops wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (MicroMax), gesteuert durch die Software Leica Application Suite X (LAS-X; Leica Microsystems), aufgenommen. Die anschließende Verarbeitung der Bilder erfolgte über die ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software (Carl Zeiss, Jena) und über das Bildbearbeitungsprogramm

Adobe Photoshop.

4.1.1. Lebendmikroskopie von *Aspergillus*

Für die Beobachtung von *A. fumigatus* und *A. nidulans* Protoplasten wurden diese in eine *Life Cell Imaging*-Kammer (15 µl-Slide 8 Well; Ibidi GmbH, Gräfelfing) gegeben und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop „Zeiss LSM 880 confocal laser scanning microscope“ (Carl Zeiss, Jena) beobachtet. Es wurden mehrere Aufnahmen angefertigt.

Eine andere Möglichkeit war das direkte Fotografieren von Konidien oder Hyphen in einer 24-Well Platte oder das Betrachten direkt nach der Entnahme der runden Deckgläschen, auf denen Hyphen gewachsen waren. Dazu wurden die Deckgläschen verkehrt herum auf einen Objektträger gelegt, auf den zuvor ein Tropfen PBS gegeben wurde.

Je nach Versuch wurden dem Nährmedium unterschiedliche Stressoren zugesetzt und die Reaktion der Konidien oder Hyphen analysiert.

4.1.2. Mikroskopie von fixierten Präparaten

4.1.2.1. Fixierung von mikroskopischen Präparaten

Um Hyphen oder Sporen zu fixieren, wurden diese für 5 min mit 3,7 % Formaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) behandelt. Falls eine Lagerung der Präparate notwendig war, erfolgte diese in PBS. Vor einer Weiterverarbeitung wurden die Präparate mit zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen.

10 x PBS:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| NaCl | 160 g |
| KCl | 4 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 28,8 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4,8 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 2000 ml |

Den pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren.

4.1.2.2. Immunfluoreszenz von *Aspergillus* Hyphen mit spezifischen Antikörpern

Hyphen oder Keimlinge wurden in einer 24-Platte auf runden Glas-Deckgläschen angezogen und zunächst mit Formaldehyd fixiert, dann mit PBS gewaschen und in einer Plastikbox auf mit mit H₂O getränktes Whatman-Papier gelegt (feuchte Kammer). Dann erfolgte die Zugabe von primären Antikörpern (anti Galaktomannan: L10-1 (IgM): eigene Arbeitsgruppe; anti β -1,3-Glukan: 2G8 (IgG): Antonella Torosantucci, Istituto Superiore di Sanità, Rom (TOROSANTUCCI *et al.*, 2005)), die an verschiedene Oberflächenantigene binden und eine 30-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C. Im Anschluss wurden die Deckgläschen dreimal vorsichtig in frischem PBS geschwenkt, um ungebundenen Antikörper abzuwaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit einem 1:100 in PBS verdünnten sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Cy3-markiertes Ziege anti-Maus Immunglobulin G (IgG) + Immunglobulin M (IgM); Dianova GmbH, Hamburg).

Färbungen mit Calcofluor Weiß (ThermoFisher Scientific™) fanden in einer Konzentration von 25 μ M (in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur statt.

Alle Proben wurden nach erneutem Waschen in PBS mit der Oberfläche nach unten auf einen Objektträger, auf den zuvor ein Tropfen Eindeckmedium (VECTASHIELD® *Antifade Mounting Medium*), entweder mit oder ohne den Zellkernfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame) gegeben wurde, gelegt. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die Deckgläschen im Anschluss mit Nagellack rundum luftdicht versiegelt. Die Auswertung und das Anfertigen von Fotos der Präparate erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM LB, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) oder dem konfokalen Mikroskop „Zeiss LSM 880 confocal laser scanning microscope“ (Carl Zeiss, Jena). Die Bilder des Leica Mikroskops wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (MicroMax), gesteuert durch die Software Leica Application Suite X (LAS-X; Leica Microsystems), aufgenommen.

5. Bioinformatische Methoden

Proteinsequenzen und die zugehörigen Gene wurden von der Website *Aspergillus Genome Database* (<https://www.aspgd.org/>) bezogen.

Die Vorhersage von Domänen eines Proteins und schematische Darstellungen wurden mit Hilfe des Online-Programmes *SMART* des European Molecular Biology Laboratory (<https://smart.embl-heidelberg.de/>) generiert und Sequenzvergleiche erfolgten durch das Onlinetool *Multiple Sequence Alignment - Clustal Omega* des European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

D. ERGEBNISSE

Der HOG-Signalweg spielt eine große Rolle in der Stressbewältigung sowie der Pathogenität vieler Pilze und eignet sich aufgrund der fatalen Aktivierung durch Substanzen wie Fludioxonil potentiell als therapeutisches Ziel (MCCORMICK *et al.*, 2012). Bisher untersuchte unsere Arbeitsgruppe lediglich die Sensorkinase TcsC in *A. fumigatus* (MCCORMICK *et al.*, 2012, WIEDEMANN *et al.*, 2016, SPADINGER, 2018).

NikA, das zu TcsC homologe Protein in dem schwach pathogenen Modellorganismus *A. nidulans*, sowie einige weitere Komponenten des HOG-Signalwegs dieses Pilzes wurden von anderen Gruppen bereits untersucht, wobei z.T. widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden (HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007, HAGIWARA *et al.*, 2009).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die beiden Gruppe III Hybrid Histidin Kinasen TcsC und NikA direkt verglichen werden.

D. 1. Vergleich der Gruppe III Histidin Kinasen TcsC von *Aspergillus fumigatus* und NikA von *Aspergillus nidulans*

1.1. Vergleich der Proteinsequenzen von TcsC und NikA

Die Proteinsequenzen von TcsC (*A. fumigatus*) und NikA (*A. nidulans*) wurden von der Aspergillus Genome Database (<http://www.aspgd.org/>) entnommen. Sie besitzen 87% Übereinstimmung (*identity*) und 91% Ähnlichkeit (*similarity*). Ein vollständiger Vergleich der somit sehr ähnlichen Proteinsequenzen mittels Protein Blast (NCBI) befindet sich im Anhang unter (4). Die N-Termini der beiden Proteine (TcsC_{AA 1-208} – NikA_{AA 1-170}) unterscheiden sich mit 45% Übereinstimmung und 56% Ähnlichkeit deutlicher voneinander. Deren Vergleich ist in Abbildung 12 dargestellt.

| | | |
|------|---|-----|
| TcsC | MTGADETLTAASAILQTLARGPDASISD---PNSSHKTNGCDTKFAKLPGEPSQAKAAF | 57 |
| Nika | MACADETLTAAAI IQNLVREAPSSGSPSFEFNFSPQSTNGV-DSLPLKLPGEPSLAKVRF | 59 |
| | *: *****:*.*. * * * * :*** .: ***** **.* | |
| TcsC | EFELEALIRRVRHLEFQVVSHQPYPRPAPELPLSSTKNSDFLWLFGLSRLSSHEGAASNS | 117 |
| Nika | ENELEALVRRIRHMEVQSQNHHTQHAEH----- | 87 |
| | * *****:*.:.*. * .: .: | |
| TcsC | SCGMQQETSRRRQRTRRIRREAEDNEADEALDDDDSDDDVDSRTRLVREEDISYLRNHVQ | 177 |
| Nika | ----TQHLHKRRKS----SKDTEPEILDESGAASDEDEEGATTLVREEDISYLRNVVQ | 139 |
| | *. :***: :*: * **: . .:*.: .: * *****:*** | |
| TcsC | KQAEEIFQKDI IAQVRDELLQEEHTRRALTKVENEDVVLLERELKHKQANEAFQKAL | 237 |
| Nika | KQAEEIFQKNIIITQVREELQLQEVQTRRALTKVENEDVVLLERELKHKQANEAFQKAL | 199 |
| | *****:*.:***:*** ** :***** | |

Abbildung 12: Vergleich der Proteinsequenzen der N-Termini von TcsC und Nika

Der Bereich TcsC_{AA 1-172} – Nika_{AA 1-134} weist 45% Übereinstimmung und 56% Ähnlichkeit (Protein Blast NCBI) auf.

- . ähnliche Aminosäuren
- : sehr ähnliche Aminosäuren
- * identische Aminosäuren

Die N-terminale Region ist bei Hybrid Histidin Kinasen gruppenspezifisch. Gruppe III HHK, zu denen TcsC und Nika gehören, weisen hier einen gemeinsamen Aufbau mit einer typischen Domänenstruktur auf. Diese besteht aus einer Wiederholung von HAMP-Domänen, was ganz charakteristisch für die Architektur der Gruppe III HHK ist. Sowohl TcsC als auch Nika besitzen sechs dieser HAMP-Domänen. Sie sind sich in ihrem Aufbau also sehr ähnlich. Die zentrale Region besteht aus der Histidin Kinase und der HATPase, die C-terminale Region aus der Receiver-Domäne. Dieser Aufbau ist in allen HHK konserviert (DEFOSSE *et al.*, 2015). Der Aufbau von TcsC und Nika ist in Abbildung 13 dargestellt.

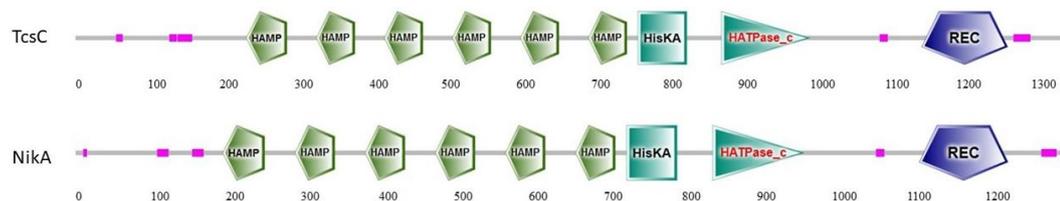


Abbildung 13: Vorhersage und Vergleich der Domänen von TcsC und Nika mittels des SMART-Programms

(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) Die violetten Bereiche stellen Regionen mit geringer Komplexität dar.

1.2. Darstellung des Genotyps der $\Delta nikA$ -Mutante

Um die Eigenschaften und Funktionen von TcsC und NikA vergleichen zu können, wurden die dazugehörigen Deletionsmutanten miteinander verglichen. Die $\Delta tcsC$ -Mutante ging bereits aus einer früheren Studie hervor (MCCORMICK *et al.*, 2012), die $\Delta nikA$ -Mutante wurde in dieser Arbeit hergestellt.

Die Herstellung der $\Delta nikA$ -Mutante wurde bereits im Methodenteil beschrieben. Durch Protoplastentransformation wurde in den *A. nidulans* Stamm A26 eine Deletionskassette, bestehend aus den flankierenden Bereichen von *nikA* und einer 4,8 kb großen Hygromycin B Resistenzkassette, an die Stelle des *nikA*-Gens kloniert.

Im Anschluss wurde die Mutante per PCR verifiziert. Dafür wurde ein 729 bp großes Fragment am 3'-Ende von *nikA* (PCR 1) amplifiziert, sowie ein 212 bp großes Fragment, das sich in der Hygromycin B Resistenzkassette befand (PCR 2). In Abbildung 14 ist dies dargestellt.

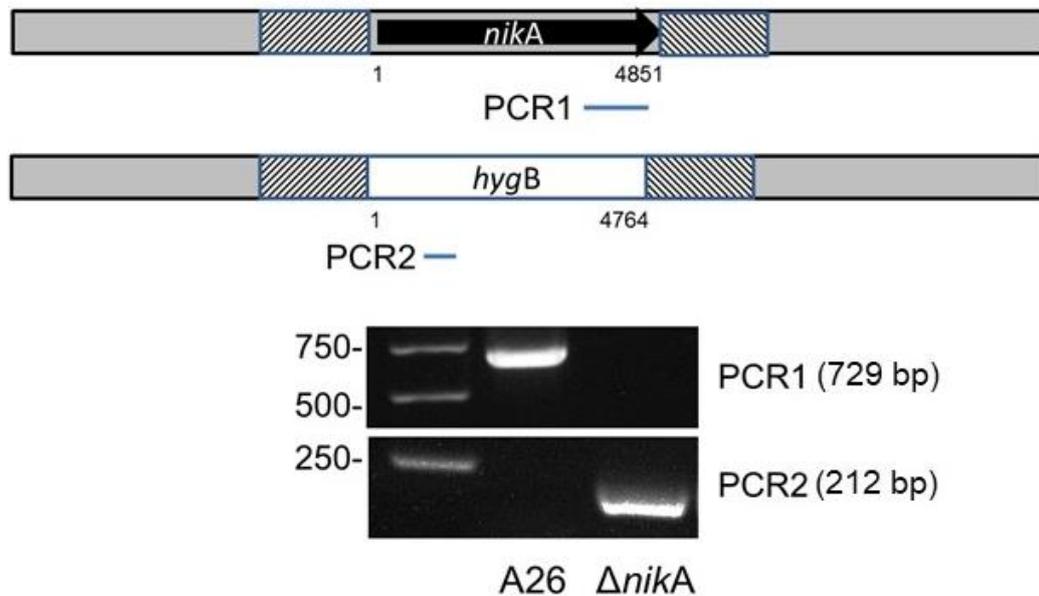


Abbildung 14: Verifizierung der $\Delta nikA$ -Mutante per PCR

Es konnte ein Klon isoliert werden, der sich in der PCR vom Wildtyp deutlich unterschied und die für eine $\Delta nikA$ -Mutante zu erwartenden Ergebnisse lieferte. Ein 729 bp großes Fragment aus dem 3'-Bereich von *nikA* war in der Mutante nicht nachweisbar (PCR 1), dafür aber ein 212 bp Fragment aus der Hygromycin B Resistenzkassette (PCR 2).

1.3. Vergleich der Phänotypen von $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$

Ließ man die Mutanten und ihre dazugehörigen Wildstämme bei 37°C auf Sabouraud- oder AMM-Agar wachsen, zeigten diese alle ein normales Wachstum. Während die Kolonien der $\Delta tcsC$ Mutante einen charakteristischen weißen Rand besitzen (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013), war dies bei der $\Delta nika$ -Mutante nicht zu beobachten. Diese zeigte bei einem verlängerten Wachstum von 72h bei 37°C jedoch eine deutlich andere Morphologie mit gefurchten Kolonien, die einen fransigen Rand aufwiesen, allerdings nur etwas weniger stark sporulierten. Zuvor wurde in einer vorherigen Studie ein Sporulationsdefekt der $\Delta nika$ -Mutante beschrieben (HAGIWARA *et al.*, 2009).

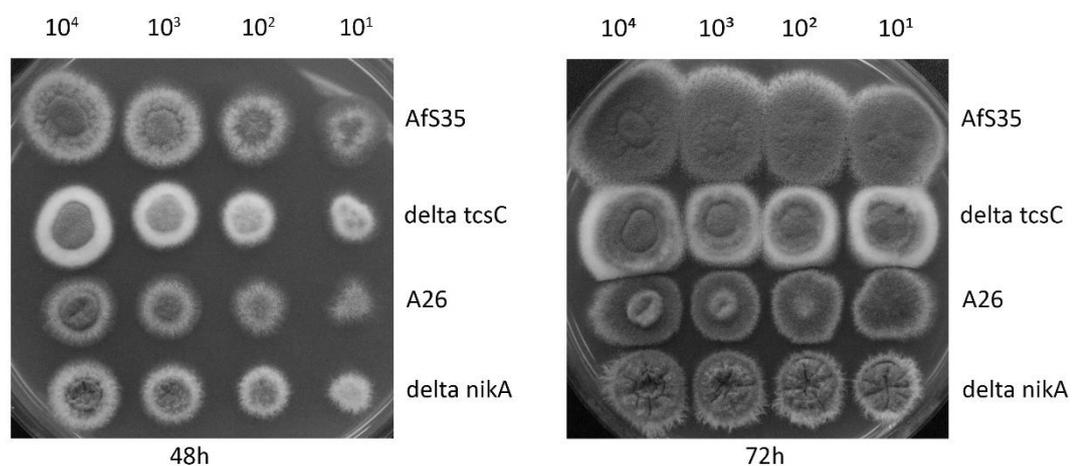


Abbildung 15: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme auf AMM-Platten

Die Tüpfel der abgebildeten Stämme enthielten die angegebenen Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h und 72h.

Ebenfalls beschrieben wurde ein eingeschränktes Wachstum der $\Delta nika$ -Mutante auf Czapek-Dox (CD) Agar. Ein solches vermindertes Wachstum konnte in dieser Arbeit weder auf Sabouraud- (Daten nicht gezeigt) noch auf AMM-Agar beobachtet werden (Abbildung 15).

In einem neuen Versuch auf CD-Agar zeigten dann jedoch alle Stämme ein unnatürliches Wachstum. Die Wildtyp-Stämme formten große, ausgebreitete Kolonien, was ein charakteristisches Bild für Wachstum unter schlechten Wachstumsbedingungen ist, während die Deletionsmutanten kompakte, weiße, zuckerhutförmige Kolonien bildeten (Abbildung 16 (A)).

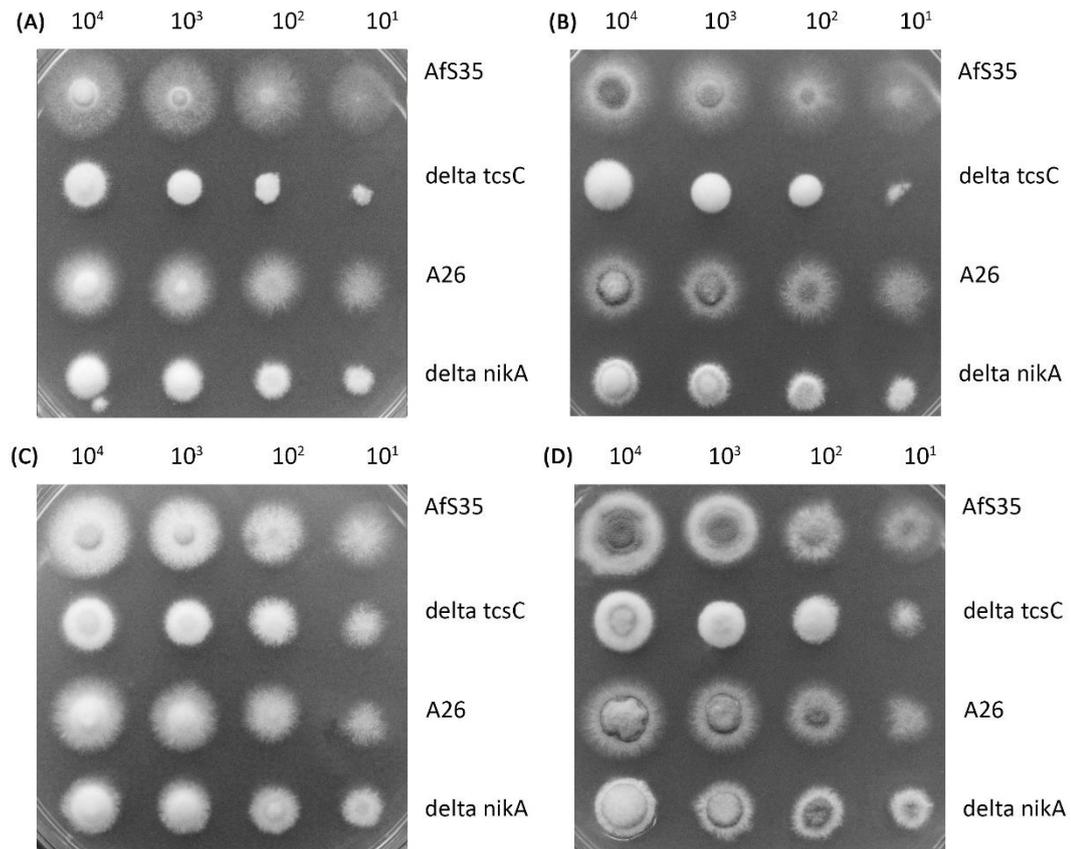


Abbildung 16: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme auf Czapek-Dox (CD)-Agar

(A) CD-Agar, Supplementation des CD-Agars mit (B) AMM-Spurenelementen, (C) Ammonium, (D) Spurenelementen und Ammonium. Die Tüpfel enthielten die angegebenen Sporenzahlen. Inkubation bei 37°C für 48h.

Sowohl der AMM- als auch CD-Agar sind definierte Minimalmedien, wobei das eingeschränkte Wachstum auf CD-Agar dafür spricht, dass diesem ein Bestandteil fehlt, der zu einem normalen Wachstum von *Aspergillus* beiträgt. Die genaue Betrachtung der Zusammensetzung beider Medien zeigte zwei deutliche Unterschiede. Lediglich AMM enthält ein komplettes Set Spurenelemente und auch die Stickstoffquelle der beiden Medien unterscheidet sich. Während diese bei AMM-Agar Ammonium ist, enthält CD-Agar Nitrat als Stickstoffquelle.

Um dem Wachstumsunterschied auf den Grund zu gehen, wurde der CD-Agar für drei weitere Tüpfeltests je mit AMM-Spuren, Ammoniumtartrat oder Spurenelementen sowie Ammoniumtartrat supplementiert. Auf reinem CD-Agar formten die Elternstämme flache, ausgebreitete Kolonien, während die Kolonien der beiden Mutanten klein und zuckerhutförmig waren. Außerdem zeigten alle

Stämme keinerlei Sporulation (Abbildung 16 (A)). Eine Ergänzung mit Spurenelementen verbesserte das Wachstum und stellte die Sporulation der Wildstämme wieder her (Abbildung 16 (B)). Die Supplementation mit Ammonium führte zu einem besseren Wachstum aller Stämme (Abbildung 16 (C)) und lediglich die Supplementation mit sowohl Spurenelementen als auch Ammoniumtartrat stellte Wachstum und Sporulation aller Stämme zu einem Großteil wieder her (Abbildung 16 (D)).

NikA und TcsC sind sehr homolog, unterscheiden sich aber in ihrem N-terminalen Bereich. Um die in dieser Arbeit generierte $\Delta nikA$ -Mutante auch phänotypisch zu verifizieren, und die Rolle von NikA und TcsC bei den jeweiligen Unterschieden zwischen *A. fumigatus* und *A. nidulans* zu ermitteln, wurde die $\Delta nikA$ -Mutante mit *nikA* aber auch mit *tcsC* komplementiert, wobei beide Gene hinter den *gpdA* Promoter kloniert wurden. Die Komplementation der $\Delta nikA$ -Mutante mit *nikA* bzw. *tcsC*, stellte den Phänotyp des Wildtyps wieder her. Es wurde gezeigt, dass CD kein optimales Medium für *Aspergillus* ist und TcsC bzw. NikA benötigt werden, um mit diesen mangelhaften Gegebenheiten zurechtzukommen.

Bei einem Tüpfeltest auf CD-Agar, der mit Spurenelementen supplementiert wurde, zeigte sich, dass sowohl $\Delta nikA + nikA$ als auch $\Delta nikA + tcsC$ den Phänotyp des *A. nidulans* Wildstammes wiederherstellten. (Um den Erfolg der Komplementation besser zu visualisieren, wurde nicht zusätzlich Ammoniumtartrat supplementiert. Dies hätte auch die $\Delta nikA$ -Mutante wieder normal wachsen lassen und es wäre kein Unterschied zu sehen gewesen.) Dies ist in Abbildung 17 dargestellt.

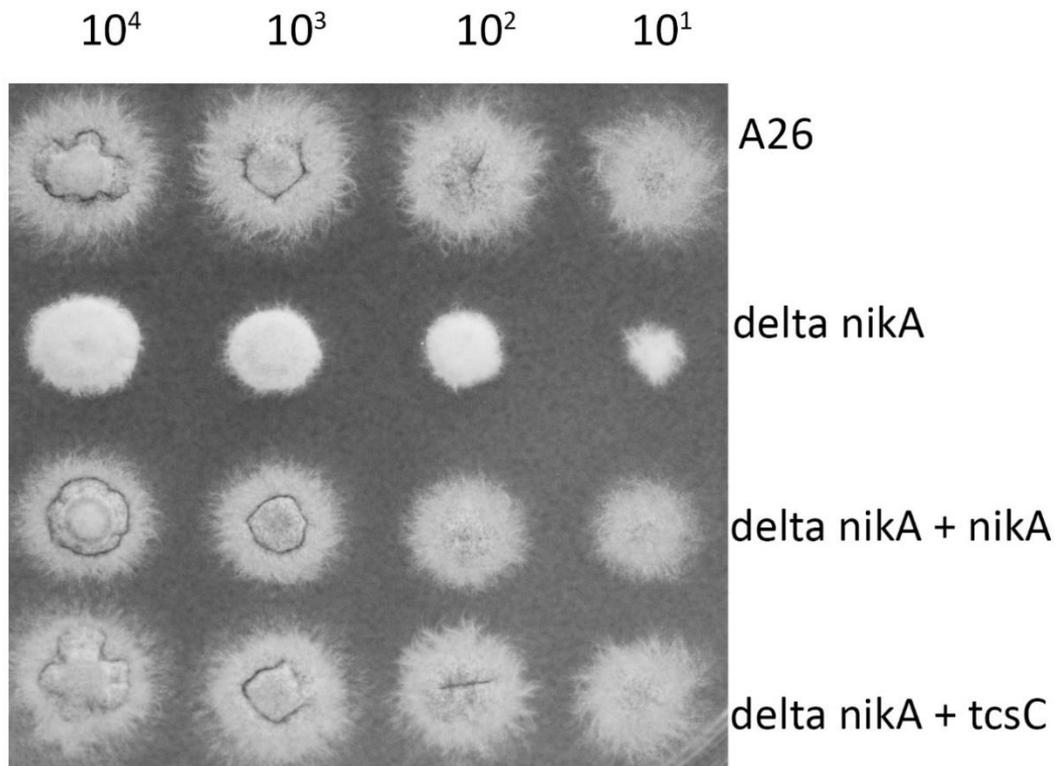


Abbildung 17: Wachstum der $\Delta nikA$ -Mutante und der $\Delta nikA+nika$ - sowie $\Delta nikA+tcsC$ -Komplementationen auf mit Spurenelementen supplementiertem CD-Agar

Während die $\Delta nikA$ -Mutante ein gehemmtes Wachstum zeigt, konnte das für den Wildtyp typische durch die Komplementation mit *nikA* bzw. *tcsC* wiederhergestellt werden. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

1.3.1. Wachstum in Anwesenheit von Fludioxonil

Ein besonderes Kennzeichen von Gruppe III HHK-Mutanten ist ihre Resistenz gegenüber antifungalen Wirkstoffen wie Fludioxonil oder Iprodion. Wie auch schon in vorherigen Studien, wuchsen auch die $\Delta tcsC$ - und $\Delta nikA$ -Mutante in dieser Arbeit in Anwesenheit von 1 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil, während die Wildtyp-Stämme in ihrem Wachstum stark eingeschränkt waren. Lediglich die $\Delta nikA$ -Mutante formte dabei oftmals weiße Kolonien aus Luftmyzel ohne starke Sporulation.

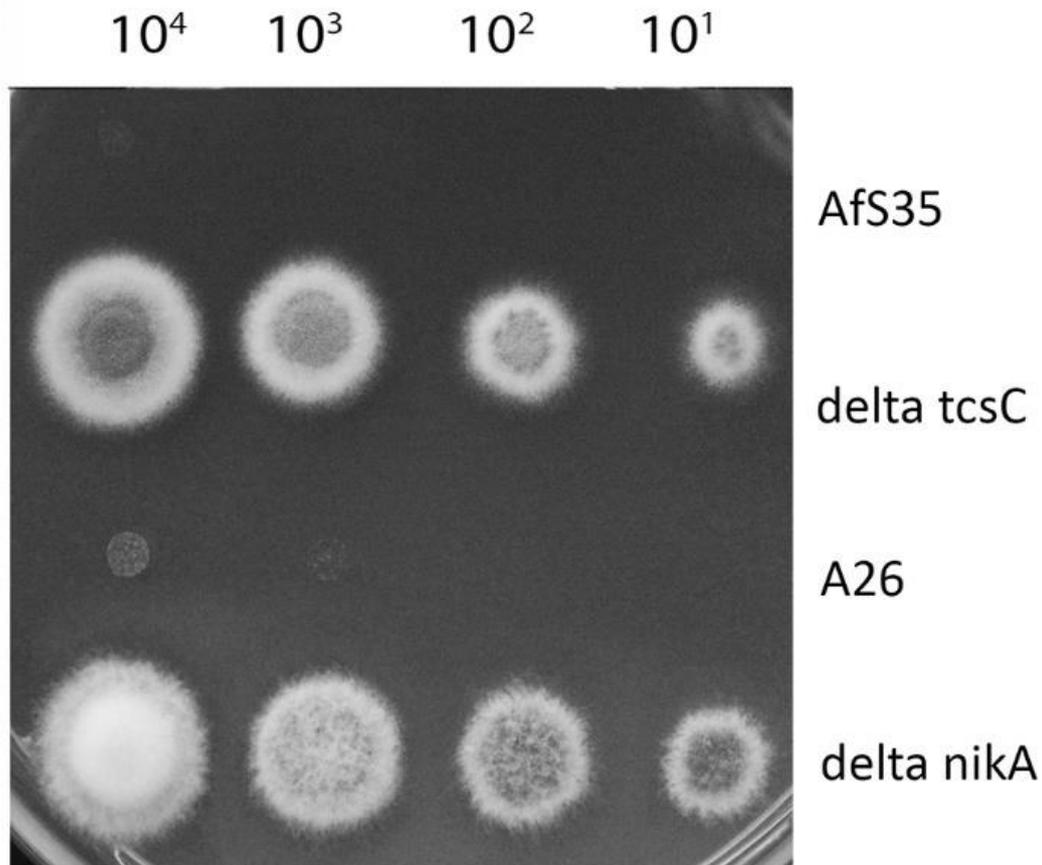


Abbildung 18: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme auf einer AMM-Platte mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil

Die Tüpfel enthielten die angegebenen Sporenmengen. Inkubation bei 37°C für 48h.

Durch die Komplementation der $\Delta nika$ -Mutante mit *nika* bzw. *tcsC* wurde das für den Wildstamm typische Wachstum wiederhergestellt. Die Stämme $\Delta nika+nika$ und $\Delta nika+tcsC$ waren nicht mehr in der Lage, in Anwesenheit von Fludioxonil zu wachsen, wobei dies in Flüssigkultur besser darzustellen war. Auf einem Tüpfeltest mit Fludioxonil kam es zu spontanen Resistenzen und somit auskeimenden Konidien, was sich in einem leichten Wachstum der Komplementanten darstellte.

In einer 24-Well-Mikrotiterplatte in AMM inkubierte Konidien der Komplementanten wuchsen ohne Zugabe von Fludioxonil normal, wurde jedoch Fludioxonil zugegeben, kam es zu keinem Wachstum. Lediglich einzelne Konidien der $\Delta nika+tcsC$ Kreuzkomplementation keimten leicht aus, zeigten jedoch eine auch beim Wildstamm auftretende Morphologie mit kurzen, angeschwollenen Keimlingen.

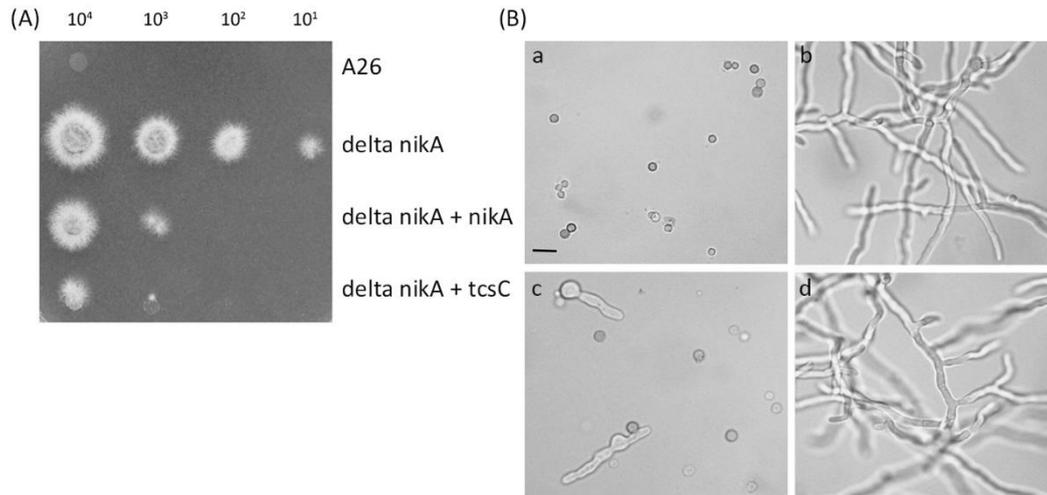


Abbildung 19: Wachstum der $\Delta nikA$ -Komplementationen $\Delta nikA+nika$ und $\Delta nikA+tcsC$ in Anwesenheit von Fludioxonil

(A) Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 µg/ml Fludioxonil. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h. (B) a: $\Delta nikA + nika$ in AMM + 2 µg/ml Fludioxonil, b: $\Delta nikA + nika$ in AMM; c: $\Delta nikA+tcsC$ in AMM + 2 µg/ml Fludioxonil, d: $\Delta nikA+tcsC$ in AMM. Inkubation bei 37°C für 16h. Die Länge des Maßstabbalkens in Bild (B) a beträgt 10µm und gilt für alle Aufnahmen.

1.3.2. Vitalität ruhender Konidien der $\Delta nikA$ Mutante nach Lagerung

In einer vorangegangenen Studie wurde beobachtet, dass Konidien einer $\Delta nikA$ -Mutante von *A. nidulans* ihre Vitalität bei einer Lagerung bei 4°C in Wasser schon nach zwölf Tagen verlieren (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). Da ein solcher Phänotyp weitere Experimente mit der $\Delta nikA$ -Mutante stark beeinträchtigt oder gar verhindert hätte, wurde die hier generierte Mutante unter gleichen Bedingungen getestet. Dafür wurden frisch isolierte Sporen bei 4°C in sterilem, doppelt destilliertem Wasser gelagert, an Tag 2, 35 und 70 jeweils 5×10^5 Sporen in 1 ml AMM in einer 24-Well-Mikrotiterplatte inkubiert und nach einer ca. 14-stündigen Inkubation bei 37°C analysiert. Hierfür wurden in je drei voneinander unabhängigen Experimenten je 100 Konidien gezählt und der prozentuale Anteil ausgekeimter zu nicht ausgekeimten Sporen bestimmt. Sogar nach einer verlängerten Lagerung von bis zu 70 Tagen behielten die Konidien ihre Vitalität und keimten normal aus (Abbildung 20). Selbiges galt für Konidien der $\Delta tcsC$ Mutante (Daten nicht gezeigt).

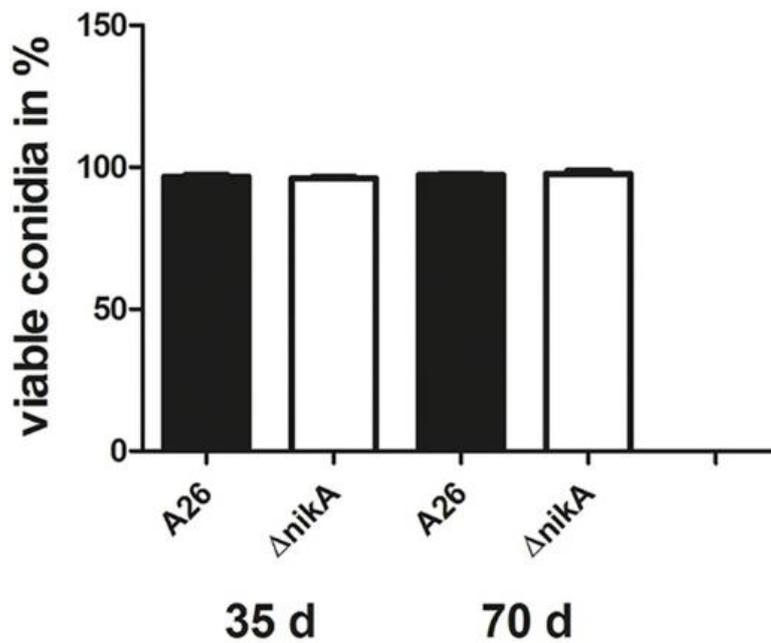


Abbildung 20: Vitalität von *A. nidulans* Konidien

Vitalität der in destilliertem Wasser bei 4°C gelagerten Konidien von *A. nidulans* und seiner $\Delta nikA$ -Mutante nach 35 und 70 Tagen.

1.3.3. Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress

Da der HOG-Signalweg Pilze dazu befähigt, mit hyperosmolarem Stress umzugehen (HOHMANN, 2002), wurden die Stämme auch auf Platten mit entweder 1 M NaCl oder 2 M Sorbit getestet. Beide Mutanten waren im Vergleich zu ihren Wildtypen deutlich in ihrem Wachstum eingeschränkt. Bemerkenswerterweise wies die $\Delta tcsC$ -Mutante einen stärkeren Wachstumsdefekt auf als die $\Delta nikA$ -Mutante.

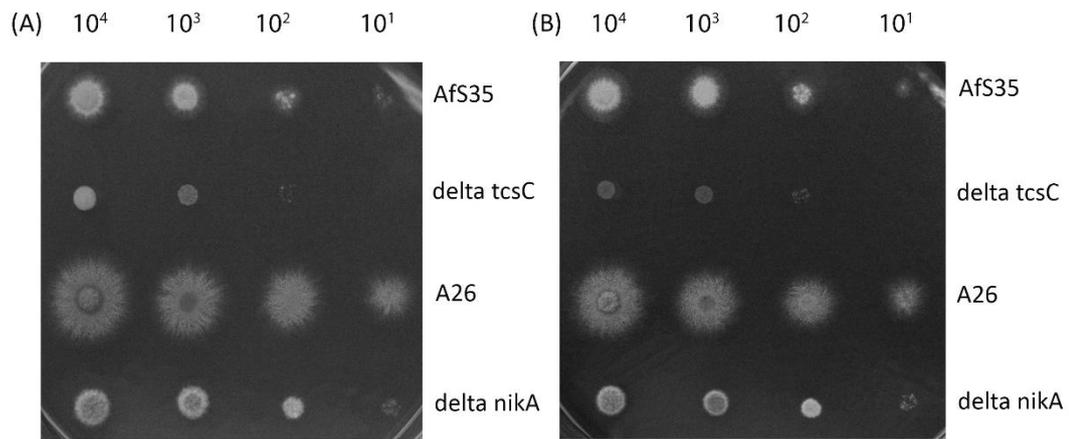


Abbildung 21: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$ und der dazugehörigen Wildstämme auf AMM-Platten unter hyperosmolaren Bedingungen.

Die Tüpfeltestplatten wurden entweder mit (A) 1 M NaCl oder (B) 2 M Sorbit supplementiert. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

Da die $\Delta nikA$ -Mutante einen Wachstumsdefekt in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress zeigte, wurden weitere Tüpfeltests mit den Komplementanten $\Delta nikA+nika$ und $\Delta nikA+tcsC$ durchgeführt. Sowohl auf mit Natriumchlorid als auch mit Sorbit supplementierten AMM-Platten war der Phänotyp des *A. nidulans* Wildstammes durch die Komplementationen weitgehend wiederhergestellt, wobei die Komplementation mit dem *tcsC* Gen besser war als mit dem *nikA* Gen.

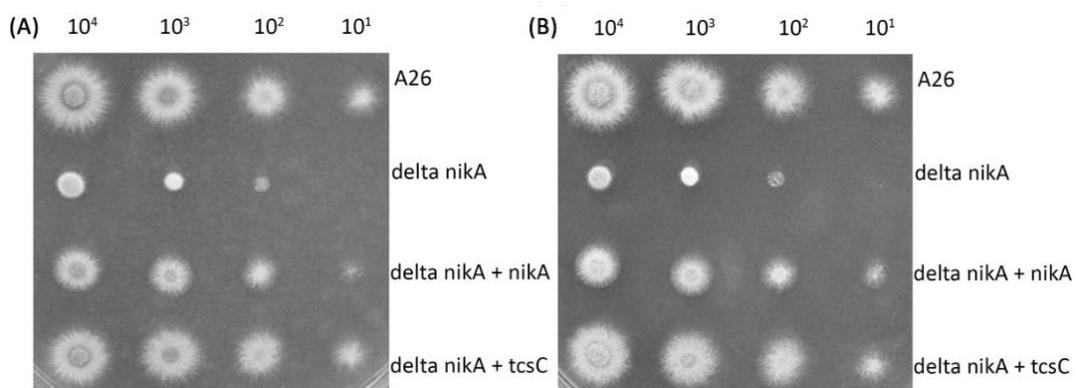


Abbildung 22: Funktionelle Komplementation der $\Delta nikA$ -Mutante nach Expression des *tcsC* bzw. des *nikA* Gens.

Wachstum von A26, der $\Delta nikA$ -Mutante und der $\Delta nikA+nika$ - sowie $\Delta nikA+tcsC$ -

Komplementanten auf AMM-Platten unter hyperosmolaren Bedingungen. Die Komplementanten sind wieder in der Lage, unter hyperosmolaren Bedingungen zu wachsen. Die Tüpfeltests wurden mit (A) 1 M NaCl und (B) 2 M Sorbit supplementiert. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

1.3.4. Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von oxidativem Stress

Eine weitere wichtige Funktion des HOG-Signalwegs ist die Adaptation an oxidativen Stress (FASSLER *et al.*, 2011). Wie in Abbildung 23 (A) dargestellt, beeinträchtigt die Zugabe von 1,5 mM H₂O₂ das Wachstum der $\Delta tcsC$ - und $\Delta nikA$ -Mutanten etwas stärker als das der korrespondierenden Wildstämme.

Interessanterweise ist *A. nidulans* A26 insgesamt resistenter gegenüber H₂O₂ als *A. fumigatus* AfS35. Ein ähnliches Bild wurde bei der Zugabe von 0,4 mM tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) beobachtet (Abb. 23 (B)). Die Durchführung eines Tüpfeltests auf AMM-Agar, der 0,01 mM Menadion enthält, zeigte, dass die Gruppe III HHK für die Bewältigung dieses Stressors, der Superoxid-Anionen generiert, entbehrlich sind. Das Wachstum der Mutanten glich dem der Wildstämme. Auch hier waren die *A. nidulans* Stämme resistenter als die entsprechenden *A. fumigatus* Stämme. Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass TcsC und NikA zwar in die adaptative Antwort auf H₂O₂ und t-BOOH involviert sind, jedoch nicht in die Antwort auf Menadion.

Das für den Wildstamm von *A. nidulans* typische Wachstum unter oxidativem Stress konnte durch Komplementation der $\Delta nikA$ -Mutante mit *nikA* bzw. *tcsC* wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt.)

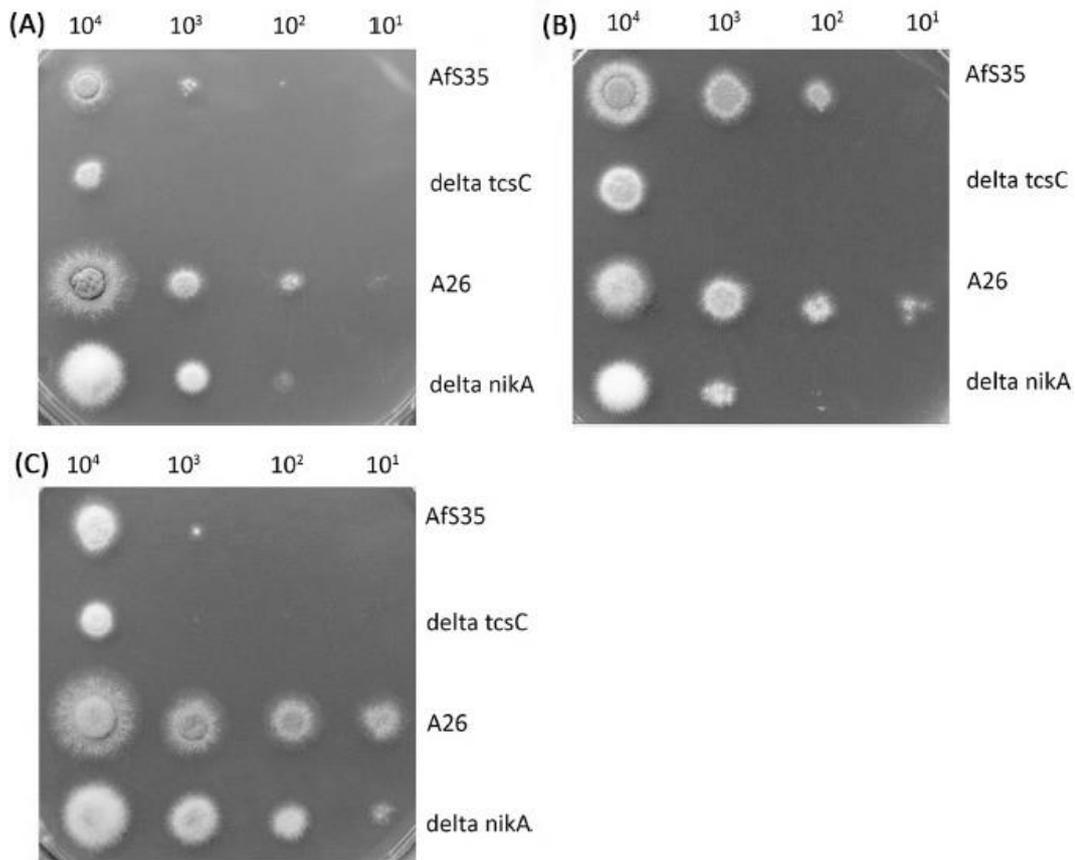


Abbildung 23: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme unter oxidativem Stress.

Die Tüpfeltestplatten wurden entweder mit (A) 1,5 mM H_2O_2 , (B) 0,4 mM t-BOOH oder (C) 0,01 mM Menadion supplementiert. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

1.3.5. Wachstum der beiden Gruppe III HHK-Mutanten in Anwesenheit von Zellwandstressoren

Die Deletion von *tcsC* führt in *A. fumigatus* zu einer verstärkten Resistenz gegenüber den Zellwandstressoren Kongorot (Congo Red, CR) und Calcofluor Weiß (Calcofluor white, CFW) (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013). Da es für die $\Delta nika$ -Mutante keine Daten gab, wurden Tüpfeltests auf AMM-Agar durchgeführt, die entweder 50 μ M Kongorot (Abbildung 24 (A)), 20 μ M Kongorot (B), oder 25 μ M Calcofluor Weiß (C) enthielten. Nach einer Inkubation von 48h bei 37°C war deutlich zu erkennen, dass die $\Delta tcsC$ -Mutante besser wuchs als der *A. fumigatus* Wildstamm. Dagegen zeigten die $\Delta nika$ -Mutante und der *A. nidulans* Wildstamm ein vergleichbares Wachstum, das dem der $\Delta tcsC$ -Mutante ähnelte. Auf Platten, die 25 μ g Kongorot pro ml AMM-Agar enthielten,

wiesen alle Stämme außer die $\Delta tcsC$ -Mutante einen roten Ring um die Kolonien auf (Abbildung 24 (B), (D)).

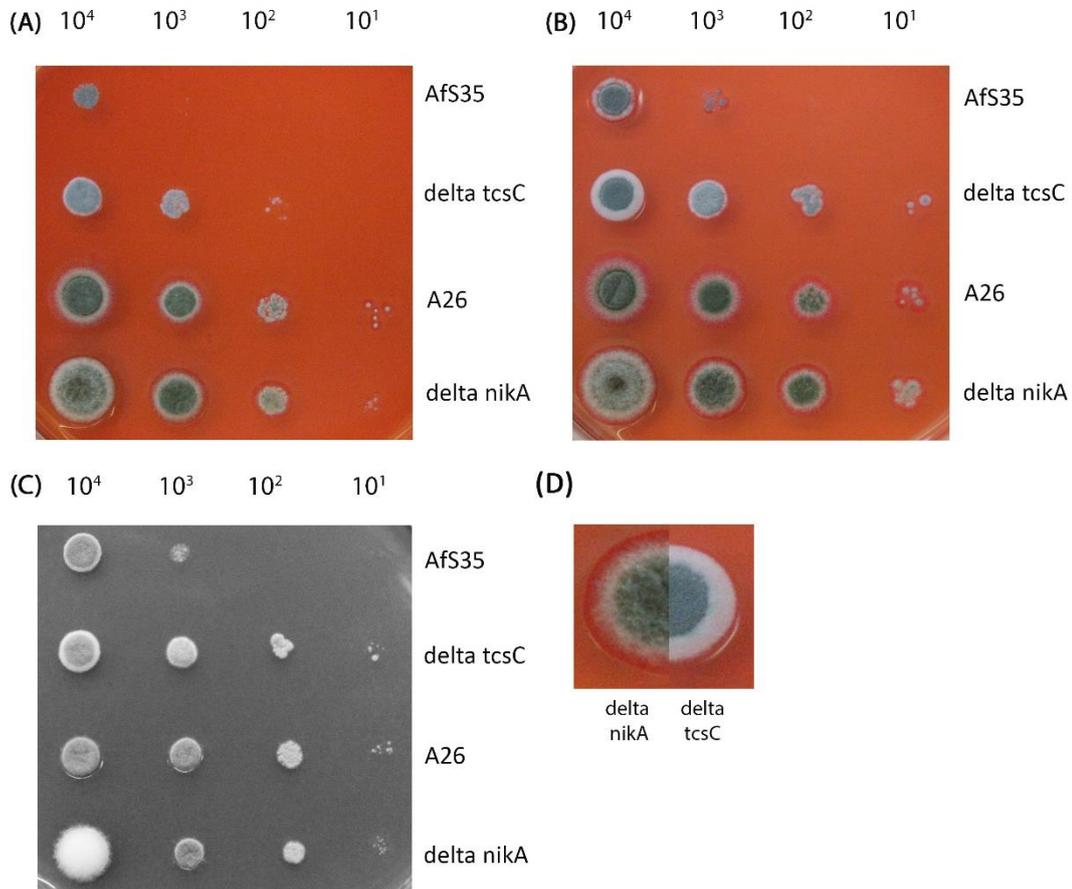


Abbildung 24: Wachstum der beiden Gruppe III HHK Mutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ und der dazugehörigen Wildstämme unter Zellwandstress.

Die Tüpfeltestplatten wurden mit (A) 50 μ M Kongorot, (B) 20 μ M Kongorot oder (C) 25 μ M Calcofluor Weiß supplementiert. (D) ist ein direkter Vergleich der Morphologie jeweils einer Kolonie der $\Delta nika$ - und $\Delta tcsC$ -Mutanten auf einer mit 25 μ M Kongorot supplementierten AMM-Platte. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

1.3.6. Mikroskopische Betrachtung des Fludioxonileffekts

Wie vermutet und oben beschrieben, wuchsen die $\Delta tcsC$ - und die $\Delta nika$ -Mutante gut auf AMM-Platten mit Fludioxonil (Abbildung 18). Um die Phänotypen unter dem Einfluss von Fludioxonil noch genauer zu erforschen, wurden behandelte Proben mikroskopisch analysiert. In vorherigen Studien wurde beobachtet, dass die

Hyphen von *A. fumigatus* nach längerer Behandlung mit Fludioxonil massiv anschwellen und später lysieren. Letzteres wurde durch einen Stamm, der zytosolisches GFP exprimiert, visualisiert (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Um zu überprüfen, wie sich *A. nidulans* verhält, wurde auch hier ein fluoreszierender Stamm herangezogen, der in dem Fall zytosolisches RFP exprimiert. Hyphen dieses Stammes wurden bis zu 72h bei 37°C mit 1 µg/ml Fludioxonil in AMM inkubiert. Auch hier zeigten sich wie bei *A. fumigatus* ein leichtes Anschwellen und Lyse der Zellen, welche sich durch den annähernd vollständigen Verlust der roten Fluoreszenz verdeutlichte. Während am Zeitpunkt Null eine starke und homogene Fluoreszenz zu sehen war, war diese nach 72h nur noch sehr schwach und in wenigen Kompartimenten zu sehen. Die Durchlichtbilder zeigen das typische, Fludioxonil-bedingte Anschwellen nur in moderatem Ausmaß (Abbildung 25).

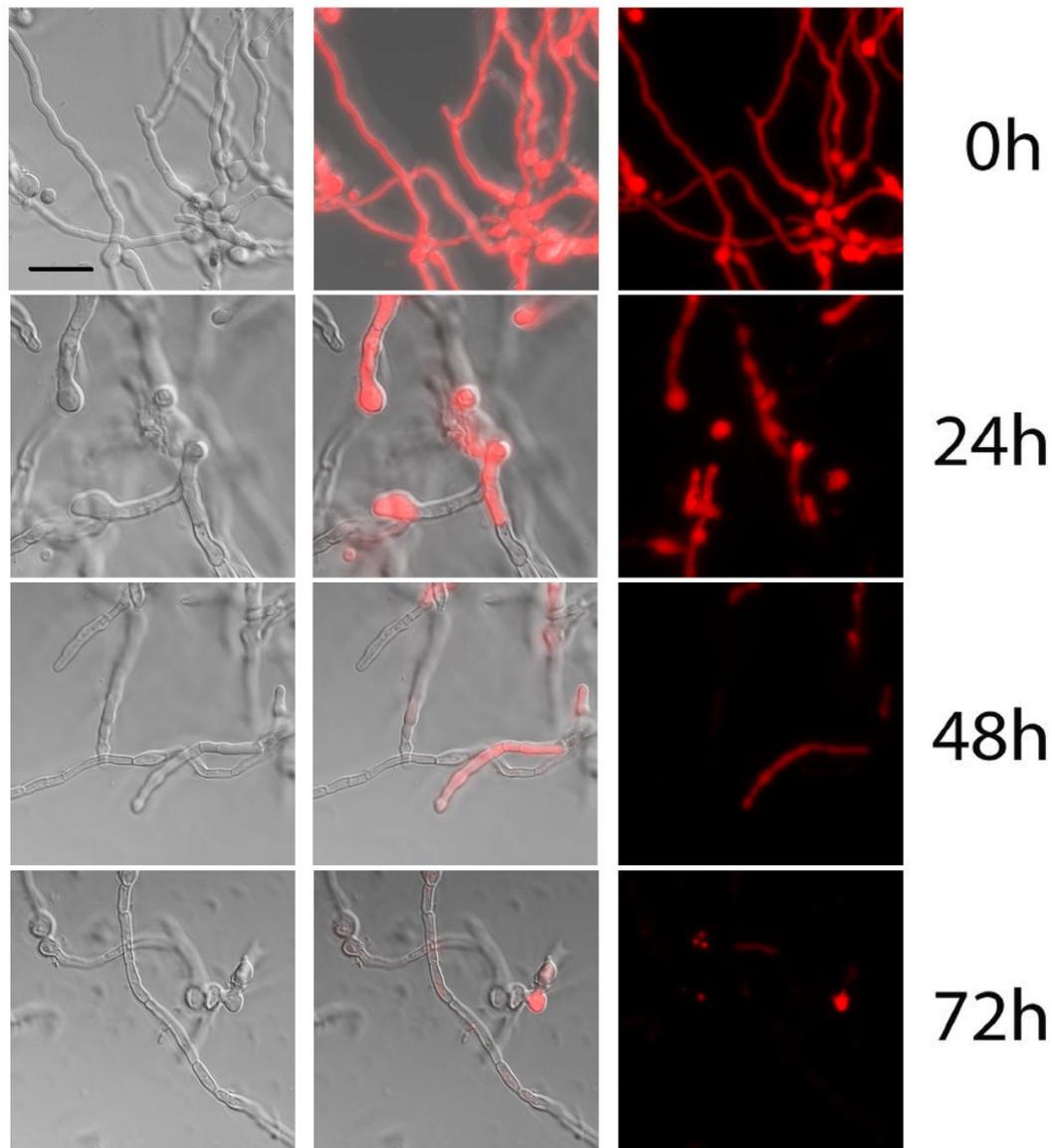


Abbildung 25: Eine Behandlung mit Fludioxonil führt zu einer quantitativen Lyse.

Zytosolisches RFP exprimierende Hyphen von *A. nidulans* wurden bis zu 72h bei 37°C mit 1 µg/ml Fludioxonil in AMM inkubiert. Die zum Zeitpunkt Null starke und homogene Fluoreszenz, war nach 72h nur noch in wenigen Kompartimenten zu sehen. Links: Durchlichtbilder, Mitte: Overlay, Rechts: Fluoreszenzaufnahmen. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 15 µm und gilt für alle Aufnahmen.

Reorganisation der Zellwand unter dem Einfluss von Fludioxonil

Um den Einfluss von Fludioxonil auf die Zellwand zu visualisieren, wurden Konidien in einer 24-Well-Mikrotiterplatte in je 1 ml AMM-Medium mit 2 µg/ml Fludioxonil für 16h bei 37°C inkubiert. Während die Mutanten normal wuchsen,

waren die beiden Wildstämme in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt.

Die Zellwand von *A. fumigatus* und *A. nidulans* setzt sich hauptsächlich aus den drei Polysacchariden β -1,3-Glukan, Chitin und Galaktomannan zusammen (LATGÉ *et al.*, 2005). Wie in einer vorherigen Studie beschrieben, führt Fludioxonil zu einer Freisetzung des Zellwandbestandteils Galaktomannan (WIEDEMANN *et al.*, 2016).

Calcofluor Weiß ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an das Chitin des Grundgerüsts bindet. In einer Studie von Dichtl *et al.* wurde eine *A. fumigatus* $\Delta fks1$ -Mutante generiert, die kein β -1,3-Glukan bilden kann. In ihr kommt es zu einem kompensatorischen Anstieg des Chitins, was mit einer massiven Freisetzung von Galaktomannan einhergeht (DICHTL *et al.*, 2015). Da dieser Phänotyp dem des Fludioxonileffekts ähnelt, betrachteten wir, ob und wie sich der Chitingehalt der Zellwand von *A. fumigatus* und *A. nidulans* unter Einfluss von Fludioxonil ändert.

Die Färbung mit Calcofluor Weiß zeigte eine starke Einlagerung von Chitin in die Zellwand beider mit Fludioxonil angezogenen Wildstämme (Abbildung 26).

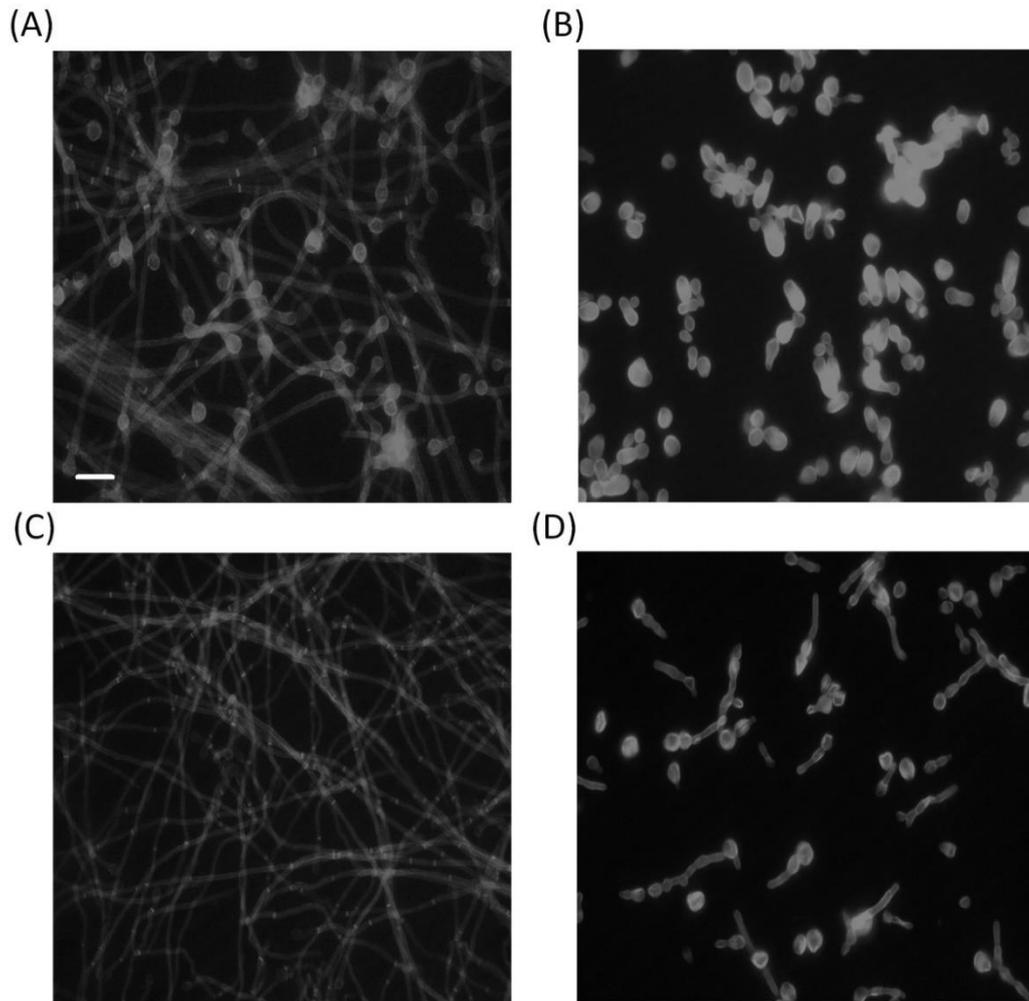


Abbildung 26: Darstellung einer Färbung von *A. fumigatus* und *A. nidulans* mit Calcofluor Weiß.

(A) *A. fumigatus* nach Inkubation in AMM. (B) *A. fumigatus* nach Inkubation in AMM mit 2 µg/ml Fludioxonil. (C) *A. nidulans* nach Inkubation in AMM, (D) *A. nidulans* nach Inkubation in AMM mit 2 µg/ml Fludioxonil. Eine Behandlung mit Fludioxonil führt zu einer vermehrten Einlagerung von Chitin. Die Inkubation erfolgte für 16h bei 37°C. Der Balken in Bild A repräsentiert 10 µm und gilt für alle Aufnahmen.

Ein weiterer Effekt durch Inkubation mit Fludioxonil ist in Abbildung 27 dargestellt. Konidien von *A. fumigatus* und *A. nidulans*, die für 16h bei 37°C in AMM-Medium inkubiert wurden, wuchsen zu einem dichten Hyphengeflecht heran und die Hyphen zeigten in einer DAPI-Färbung (DNS-bindender Farbstoff) eine normale Zellkernzahl (Abbildung 27 (A) und (C)). Wurden dem Medium 2 µg/ml Fludioxonil zugesetzt, schollen die Konidien lediglich an, oder keimten leicht aus und enthielten eine höhere Zahl Zellkerne (Abbildung 27 (B) und (D)). Eine Behandlung mit Fludioxonil führt zu einer erhöhten Zellkernzahl.

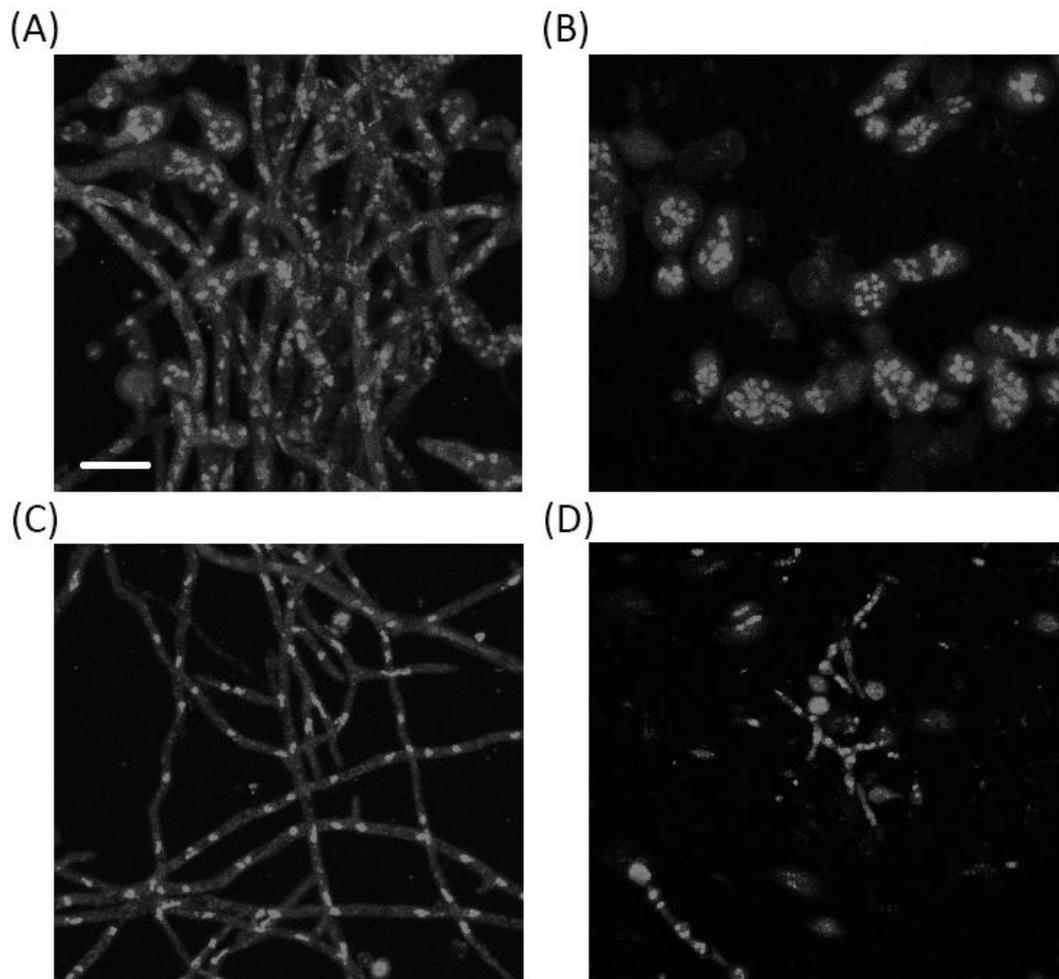


Abbildung 27: DAPI-Färbung von *A. fumigatus* und *A. nidulans*.

(A) *A. fumigatus* nach Inkubation in AMM, (B) *A. fumigatus* nach Inkubation in AMM mit 2 µg/ml Fludioxonil. Zu sehen sind angeschwollene Konidien mit einer hohen Zellkernzahl. (C) *A. nidulans* nach Inkubation in AMM, (D) *A. nidulans* nach Inkubation in AMM mit 2µg/ml Fludioxonil. Auch hier zeigt sich eine erhöhte Zellkernzahl. Die Inkubation erfolgte für 16h bei 37°C. Der Balken in Bild A repräsentiert 10 µm und gilt für alle Aufnahmen.

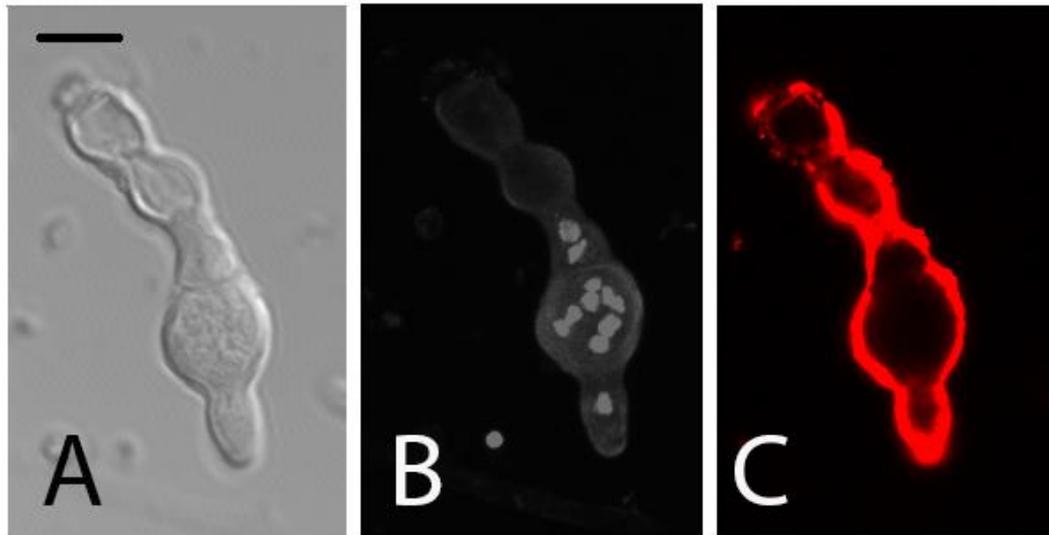


Abbildung 28: Abgebildet ist ein angeschwollener Keimling von *A. nidulans* nach 16-stündiger Inkubation in AMM mit 2 µg/ml Fludioxonil bei 37°C.

(A) Durchlichtaufnahme, (B) Darstellung der Zellkerne durch DAPI-Färbung, (C) Färbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1. Der Balken in Bild A repräsentiert 5 µm und gilt für alle Aufnahmen.

Neben den Gemeinsamkeiten, konnten aber auch einige Unterschiede zwischen den beiden Wildstämmen ausgemacht werden. Wie schon zuvor beschrieben, führt Fludioxonil zu einer Freisetzung des Zellwandbestandteils Galaktomannan (WIEDEMANN *et al.*, 2016), was zu einer schwachen und gesprenkelten Färbung mit spezifischen Antikörpern führt. In starkem Kontrast dazu, führte eine Fludioxonil-Behandlung bei *A. nidulans* A26 zu einer starken und homogenen Galaktomannanfärbung (Abbildung 28: C), (Abbildung 29: D-F).

Es wurden jeweils Konidien von *A. fumigatus* AfS35 (Abbildung 29: A - C) und *A. nidulans* A26 (Abbildung 29: D - F) in AMM, welches 2 µg/ml Fludioxonil enthielt, für 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben fixiert, mit dem primären Antikörper L10-1 und daraufhin mit dem Cy3-markiertem anti-Maus IgM/IgG Sekundärantikörper gefärbt.

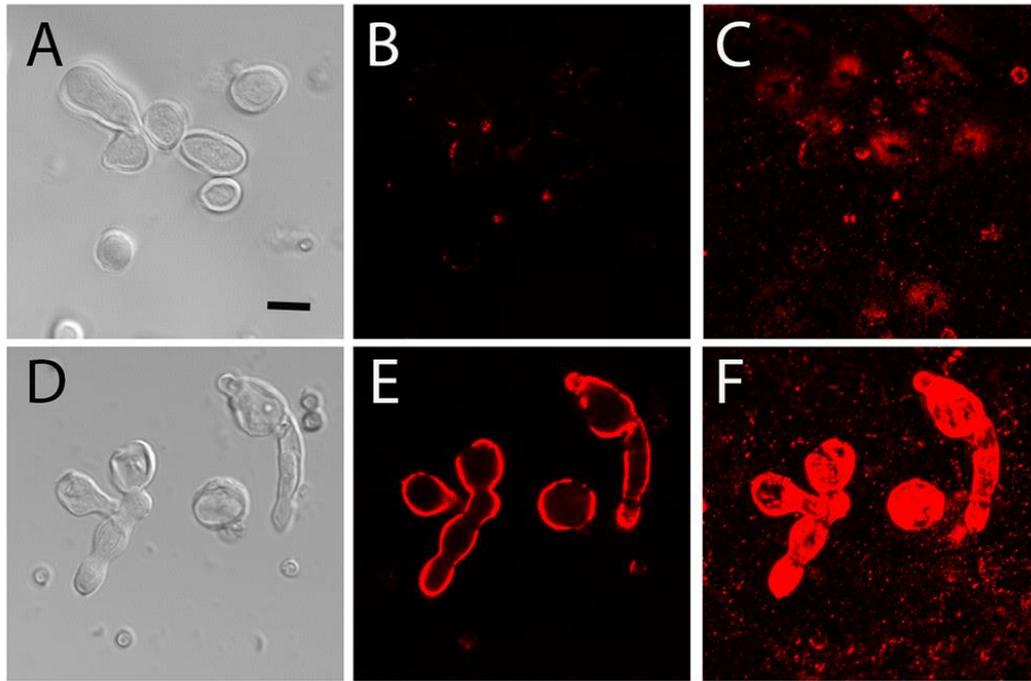


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1.

Es wurden jeweils Konidien von *A. fumigatus* AfS35 (A-C) und *A. nidulans* A26 (D-F) in AMM, welches 2 µg/ml Fludioxonil enthält, für 18h bei 37°C inkubiert und anschließend gefärbt. A und D: Durchlichtaufnahmen, B und E zeigen jeweils nur eine konfokale Ebene, C und F sind Maximum-Projektionen eines Bildstapels. Der Balken in Bild A repräsentiert 5 µm und gilt für alle Bilder.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für den Stamm *A. nidulans* A187 beobachtet, während drei weitere *A. fumigatus* Stämme (ATCC46645, D141, Af293) dasselbe Bild wie *A. fumigatus* AfS35 zeigten. Dies weist auf eine grundlegend andere Antwort auf Fludioxonil in *A. fumigatus* und *A. nidulans* hin. Um die Analyse auszuweiten wurden weitere Stämme einbezogen, die *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. giganteus* und *A. clavatus* repräsentierten (siehe Tabelle 3). All diese Stämme glichen *A. fumigatus* und zeigten in Anwesenheit von Fludioxonil eine erhöhte Einlagerung von Chitin in die Zellwand sowie eine stärkere Abgabe von Galaktomannan.

Um die Verteilung von β -1,3- und β -1,6-Glukan zu untersuchen, wurden erneut jeweils Konidien von *A. fumigatus* AfS35 (Abbildung 30 A – C) und *A. nidulans* A26 (D - F) in AMM, welches 2 µg/ml Fludioxonil enthält, für 18 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper 2G8 gefärbt. Dieser

erkennt β -1,3- und β -1,6-Glukane (TOROSANTUCCI *et al.*, 2005) und zeigte ein ähnliches Färbemuster wie jenes, das für Galaktomannan beobachtet wurde. Auch hier war unter dem Einfluss von Fludioxonil bei *A. fumigatus* eine gesprenkelte, schwache Färbung, während bei *A. nidulans* eine homogene Färbung zu sehen war.

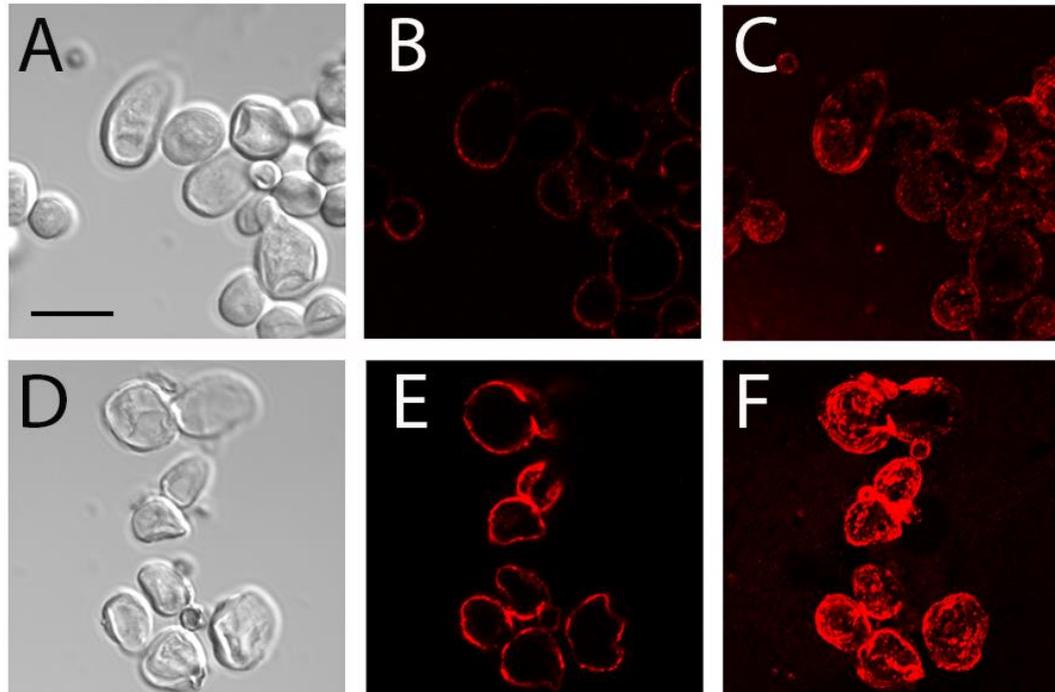


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung mit dem β -1,3- und β -1,6-Glukan-spezifischen monoklonalen Antikörper 2G8.

Es wurden jeweils Konidien von *A. fumigatus* Afs35 (A - C) und *A. nidulans* A26 (D - F) in AMM mit 2 μ g/ml Fludioxonil für 18h bei 37°C inkubiert. A und D: Durchlichtaufnahmen, B und E zeigen jeweils nur eine konfokale Ebene, C und F sind Maximum-Projektionen eines Bildstapels. Der Balken in Bild A repräsentiert 10 μ m und gilt für alle Bilder.

Die Rolle von TcsC und NikA bei den jeweiligen Unterschieden zwischen *A. fumigatus* und *A. nidulans*, wurde, wie oben beschrieben, durch die Komplementation der Δ *nikA*-Mutante mit *nikA* bzw. *tcsC* genauer untersucht. Die Gene wurden in beiden Fällen vom gleichen Promoter exprimiert. Die Komplementationen zeigten die charakteristischen morphologischen Veränderungen des *A. nidulans* Wildstammes unter dem Einfluss von Fludioxonil, die Empfindlichkeit gegenüber Fludioxonil wurde also wiederhergestellt. Genauso wie die Wildstämme von *A. nidulans*, zeigten beide komplementierten Stämme

nach Behandlung mit Fludioxonil eine starke und homogene Färbung mit dem Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1.

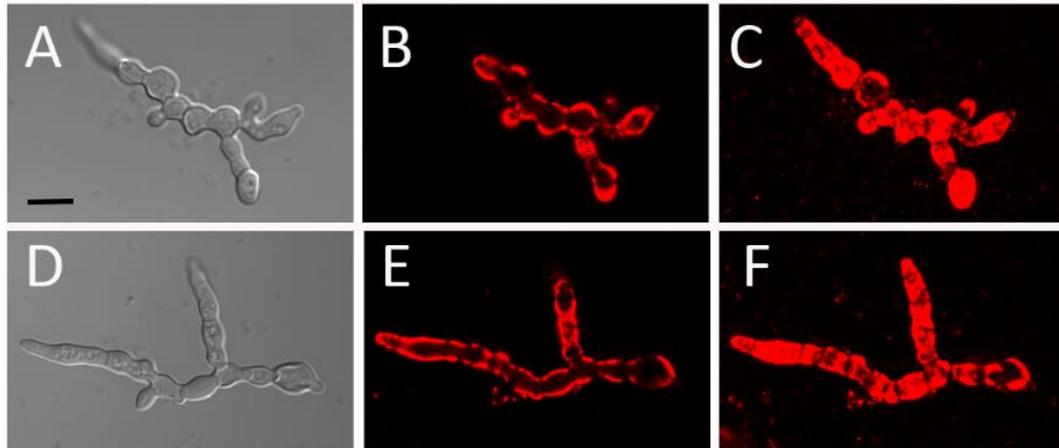


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1.

Es wurden jeweils Konidien der komplementierten $\Delta nikA$ -Mutante, nämlich $\Delta nikA+nika$ (A-C) und $\Delta nikA+tcsC$ (D-F), in AMM mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil für 18 h bei 37°C inkubiert. A und D: Durchlichtaufnahmen, B und E zeigen jeweils nur eine konfokale Ebene, C und F sind Maximum-Projektionen eines ganzen Bildstapels. Der Balken in Bild A repräsentiert 10 μm und gilt für alle Bilder.

D. 2. Analyse der Komponenten des HOG-Signalwegs in *Aspergillus fumigatus*

Wie bereits im ersten Teil der Ergebnisse beschrieben, liegt unser besonderes Interesse am HOG-Signalweg darin begründet, dass antifungale Wirkstoffe wie Fludioxonil eine schädliche Aktivierung des Signalwegs in dem pathogenen Schimmelpilz *A. fumigatus* sowie vielen anderen wichtigen pathogenen Pilzen verursachen können. Der HOG-Signalweg spielt somit nicht nur eine große Rolle in der Stressbewältigung sowie der Pathogenität des Pilzes, sondern eignet sich potentiell als therapeutisches Ziel (WIEDEMANN *et al.*, 2016).

Einige der Komponenten des HOG-Signalwegs wurden bereits detailliert im Modellorganismus *A. nidulans* analysiert (HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007, HAGIWARA *et al.*, 2009).

In *A. fumigatus* untersuchte unsere Arbeitsgruppe bisher lediglich die Sensorkinase TcsC (MCCORMICK *et al.*, 2012, WIEDEMANN *et al.*, 2016, SPADINGER, 2018).

Im Zuge dieser Arbeit wurden die funktionellen Aufgaben weiterer Proteine des HOG-Signalwegs miteinander verglichen. Dazu erfolgte die Herstellung einer $\Delta skn7$ -Mutante. Die $\Delta tcsC$ -Mutante stammte aus einer vorherigen Studie (MCCORMICK *et al.*, 2012) und $\Delta ssk1$ und $\Delta saka$ wurden von Dr. Karl Dichtl zur Verfügung gestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Mutanten komplementiert und schließlich auch noch eine $\Delta skn7\Delta saka$ -Doppelmutante generiert.

Mit diesem Set an Mutanten und dem *A. fumigatus* Wildstamm wurden anschließend verschiedenste Untersuchungen durchgeführt.

2.1. Darstellung der Genotypen der Mutanten des HOG-Signalwegs

Um die generierten Stämme genetisch zu überprüfen, erfolgten mehrere PCRs, in denen jeweils die entsprechenden Gene und die in den Pilz klonierte Hygromycin B Resistenzkassette als Marker für die Integration des jeweiligen Deletionskonstrukts amplifiziert wurden. Als Kontrolle diente der *A. fumigatus* Wildstamm AfS35. In ihm waren alle Gene nachweisbar und die Hyg B Kassette selbstverständlich nicht (Abbildung 32, erste Reihe). Bei den jeweiligen

Deletionsmutanten waren die jeweils deletierten Gene nicht nachweisbar, wohl aber die Hygromycin B Resistenzkassette (Abbildung 32).

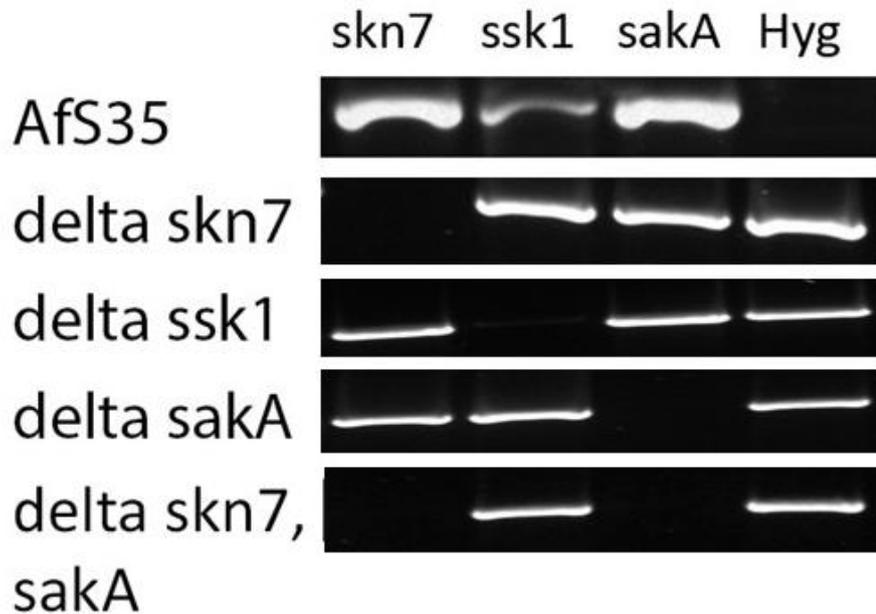


Abbildung 32: Genotypen des *A. fumigatus* Wildstammes AfS35 und der Mutanten des HOG-Signalwegs.

Nachweis aller Gene im Wildstamm. Bei den Mutanten fehlt das jeweils deletierte Gen, stattdessen konnte eine Hygromycin B Resistenzkassette detektiert werden.

2.2. Vergleich der Phänotypen der Mutanten des HOG-Signalwegs

In einem ersten Ansatz wurden die Einzelmutanten $\Delta tcsC$, $\Delta skn7$, $\Delta sakA$ und $\Delta ssk1$ sowie der Ausgangsstamm AfS35 hinsichtlich ihres Wachstums auf AMM und Sabouraud miteinander verglichen.

Nach 48-stündiger Inkubation auf Sabouraud und AMM-Platten entwickelten alle Stämme Kolonien vergleichbarer Größe und mit zentral sporulierenden Flächen, die für ein normales Wachstum und eine normale Sporulation sprechen (Abbildung 33, Daten für Sabouraud nicht gezeigt).

Dennoch zeigten $\Delta tcsC$, $\Delta sakA$ und $\Delta ssk1$ im Gegensatz zu AfS35 und der $\Delta skn7$ -Mutante einen auffälligen weißen, dichten Rand nicht sporulierenden Myzels, wie es bereits für die $\Delta tcsC$ -Mutante beschrieben wurde (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013). Der Rand der Kolonien der $\Delta skn7$ -Mutante hingegen

gestaltete sich schmaler und ähnelte dem Ausgangsstamm.

Zur phänotypischen Kontrolle der Deletionen (die Deletionsmutanten sind Hygromycin-resistent durch ihre Hygromycin B Resistenzkassette) erfolgte ein weiterer Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 200 µg/ml Hygromycin B. Der Wildstamm von *A. fumigatus*, AfS35 wuchs erwartungsgemäß nicht, während die Deletionsmutanten ein annähernd normales Wachstum zeigten (Abbildung 33 (B)).

Die $\Delta skn7$ -Mutante zeigt im Vergleich zur $\Delta sakA$ - und $\Delta ssk1$ -Mutante einen auffälligen Phänotyp, da sie besonders gut wächst. Sowohl $\Delta sakA$ als auch $\Delta ssk1$ wachsen im ersten bzw. den ersten beiden Tüpfeln normal, sind also Hygromycin-resistent, in den folgenden Tüpfeln aber schwächer, während $\Delta skn7$ in allen Tüpfeln gut wächst.

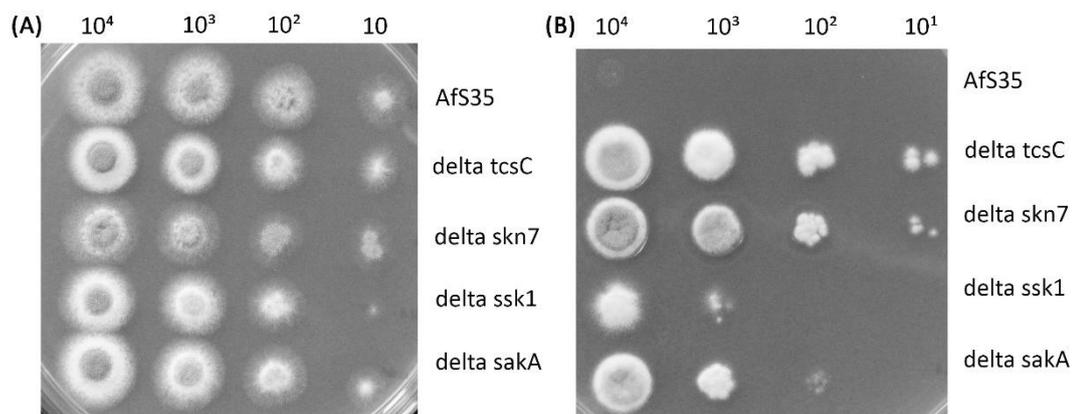


Abbildung 33: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs.

Tüpfeltests (A) auf einer AMM-Platte. (B) auf einer AMM-Platte mit 200 µg/ml Hygromycin. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

2.2.1. Wachstum in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress

Der HOG-Signalweg wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und ist dort sehr gut erforscht. Das Protein HOG1 in *S. cerevisiae*, welches in *A. fumigatus* SakA entspricht, vermittelt die durch Glycerinproduktion vermittelte Anpassung des osmotischen Innendrucks an eine hyperosmolare Umgebung (HOHMANN, 2002). In der Literatur ist für *A. nidulans* ebenfalls beschrieben, dass SskA, welches Ssk1 in *A. fumigatus* entspricht, wichtig für die Vermittlung des osmolaren Effekts

von Sorbit und Natriumchlorid ist (HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine $\Delta srrA$ -Mutante von *A. nidulans* (entspricht $\Delta skn7$ in *A. fumigatus*) besser als die $\Delta sskA$ -Mutante wuchs und zudem eine bessere Sporulation zeigte (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Nach den bisher für *A. nidulans* und *S. cerevisiae* publizierten Daten wird die Anpassung an eine hyperosmotische Umgebung durch die Ssk1- und SakA-homologen Proteine vermittelt. In dieser Arbeit wurde die Situation in *A. fumigatus* untersucht.

Anders als erwartet, war hier zu beobachten, dass die Antwort auf hyperosmolaren Stress nicht immer von SakA abhängig ist. Auf Tüpfeltests, bei denen dem AMM-Agar Sorbit in einer Konzentration von 1,2 bzw. 2 M hinzugefügt wurde, schien SakA sogar entbehrlich. Die $\Delta sakA$ -Mutante wuchs ähnlich wie der Wildtyp, die Kolonien waren lediglich etwas kleiner. Auch die $\Delta ssk1$ -Mutante glich in ihrem Wachstum dem Wildtyp, mit etwas kleineren Kolonien, zeigte bei einer Konzentration von 2 M Sorbit jedoch noch etwas deutlichere Einschränkungen als die $\Delta sakA$ -Mutante. Die $\Delta skn7$ -Mutante wuchs unbeeindruckt. Lediglich die $\Delta tcsC$ -Mutante zeigte eine deutliche Wachstumseinschränkung in Anwesenheit von Sorbit. Sie ist somit als einzige der untersuchten Mutanten nicht in der Lage, sich an eine hyperosmolare Umgebung anzupassen (Abbildung 34 (A) und (B)). Auch in Anwesenheit von 1,2 M Glycerin zeigten sich ähnliche Phänotypen (Abbildung 34 (C)). Um mit Sorbit als Stressor zurechtzukommen, scheint der Pilz von den hier untersuchten Proteinen lediglich TcsC zu benötigen.

Interessanterweise erwies sich die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante in Gegenwart von 2 M Sorbit als ebenso sensitiv wie die $\Delta tcsC$ -Mutante. Beide Stämme waren nicht in der Lage zu wachsen (Abbildung 34 (D)).

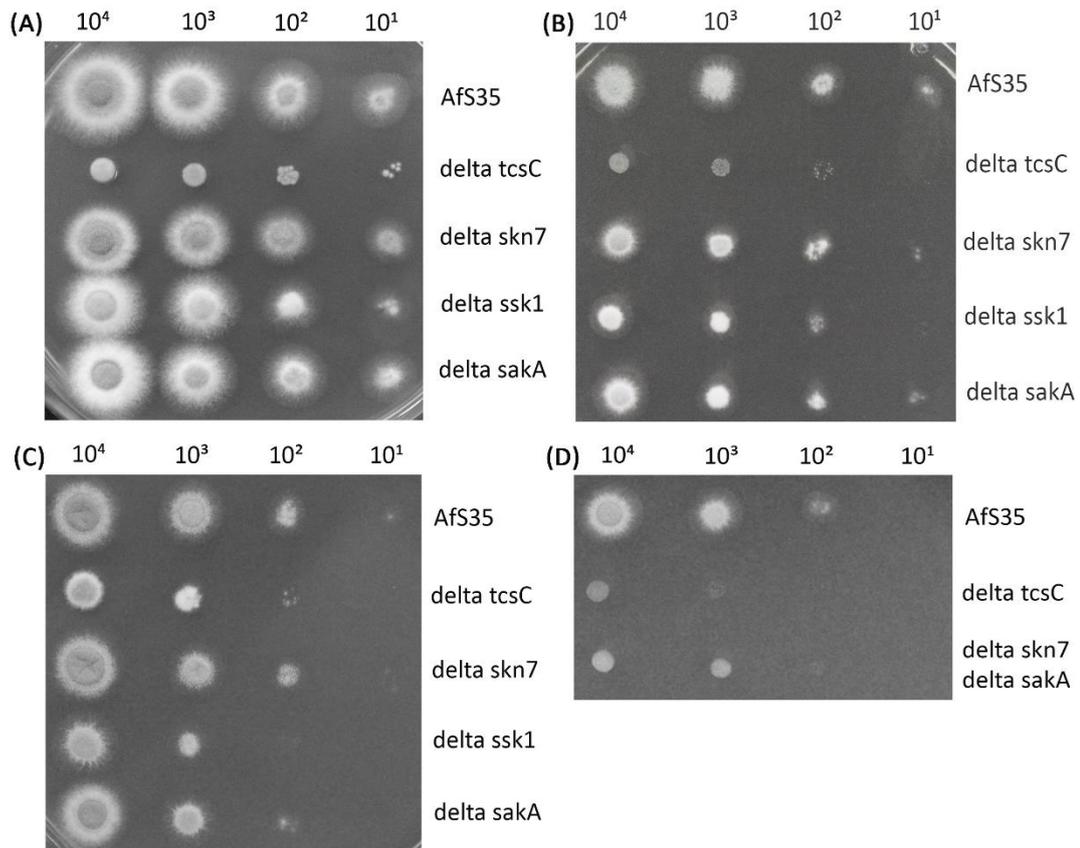


Abbildung 34: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter hyperosmolaren Bedingungen.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 1,2 M Sorbit, (B) 2 M Sorbit, (C) 1,2 M Glycerin, (D) 2 M Sorbit. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

Ein ganz anderes Bild zeigte sich bei einem Tüpfeltest, der mit 1 M NaCl supplementiert wurde. Hier war auch für die $\Delta sakA$ - und die $\Delta ssk1$ -Mutante eine deutliche Wachstumseinschränkung zu beobachten, wobei diese sich bei der $\Delta ssk1$ -Mutante deutlicher abzeichnete. Dennoch begegnen sie dem Stress durch hohe Salzkonzentrationen noch so, dass sie in der Lage sind zu überleben (Abb. 35 (A)). Die $\Delta skn7$ -Mutante wuchs ähnlich wie der Wildtyp. Auch in Anwesenheit von 1 M KCl wurde ein ähnliches Bild beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass TcsC und der Ssk1/ SakA-Hauptast des HOG-Signalwegs entscheidend für die adaptive Antwort auf Stress durch hohe Salzkonzentrationen sind.

Ein weiterer Stoff, der untersucht wurde, ist Calciumchlorid (CaCl_2). In einer vorangegangenen Studie wurde beschrieben, dass es in Anwesenheit von CaCl_2 bei der $\Delta tcsC$ -Mutante bereits ab einer Konzentration von 50 mM zu einem zuckerhutförmigen Wachstum kommt und sie bei einer Konzentration von 500 mM CaCl_2 in ihrem Wachstum komplett inhibiert wird. Die Bildung eines solchen Luftmyzels kam beim Wildstamm erst bei einer Konzentration von 500 mM CaCl_2 zustande (MCCORMICK *et al.*, 2012). Um die Phänotypen der anderen Mutanten des HOG-Signalwegs unter diesen Bedingungen zu überprüfen, erfolgten Tüpfeltests auf Platten, die mit 50, 100 und 500 mM CaCl_2 supplementiert wurden. Bei einer Konzentration von 50 mM CaCl_2 waren keine deutlichen Unterschiede im Wachstum zu beobachten. Wurden 100 mM CaCl_2 zugesetzt, zeigte die $\Delta tcsC$ -Mutante bereits deutlich kleinere Kolonien und einen breiteren weißen, sporenfreien Rand. Alle anderen Mutanten glichen in ihrem Wachstum dem Wildstamm. Bei einer Konzentration von 500 mM CaCl_2 zeigten alle getüpfelten Stämme ein beeinträchtigtes Wachstum (Abbildung 35 (C) und (D)). Die Kolonien des Wildtyps waren nach einer Inkubation von 48h deutlich kleiner als bei einer CaCl_2 -Konzentration von 100 mM, aber dennoch in der Lage nach 72h große, komplett sporulierende Kolonien zu bilden. Die $\Delta tcsC$ -Mutante wurde am stärksten eingeschränkt und zeigte sowohl nach 48 als auch nach 72h nur sehr kleine, weiße oder in der niedrigsten Sporenkonzentration gar fehlende Kolonien. Auch die $\Delta ssk1$ -Mutante wurde stark beeinträchtigt und unterschied sich nur leicht von $\Delta tcsC$. Am resistantesten zeigte sich nach dem *A. fumigatus* Wildstamm die $\Delta skn7$ -Mutante. Auch die $\Delta sakA$ -Mutante wuchs ähnlich gut. Sie bildeten nach 48h weiße, kompakte Kolonien, die nach 72h eine deutliche Sporulation aufwiesen.

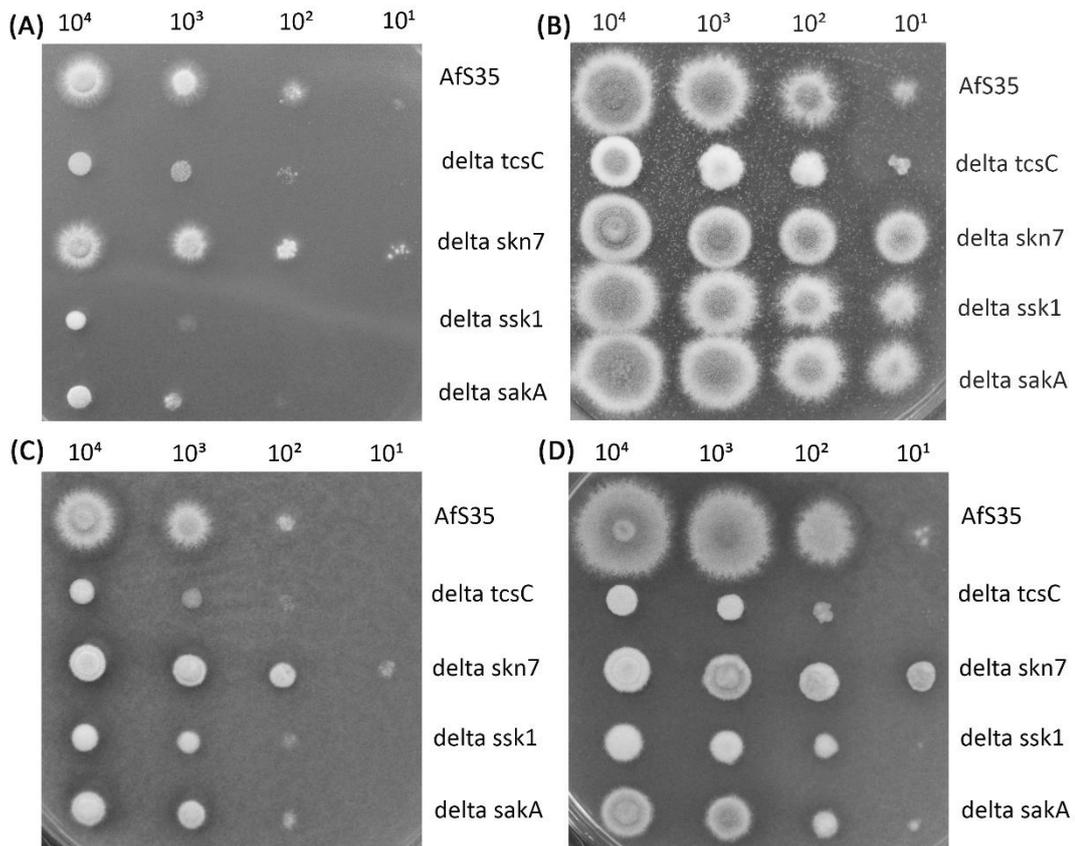


Abbildung 35: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter Stress durch hohe Salzkonzentrationen.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 1 M NaCl, (B) 100 mM $CaCl_2$, (C) 500 mM $CaCl_2$, (D) 500 mM $CaCl_2$. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h (A), (B) und (C) bzw. 72h (D).

Die Generierung einer $\Delta sakA + sakA$ -Komplementante stellte das Wachstum der $\Delta sakA$ -Mutante unter hohen Salzkonzentrationen wieder her. Ihr Phänotyp in Gegenwart von 1 M NaCl glich dem des *A. fumigatus* Ausgangsstammes (Abbildung 36).

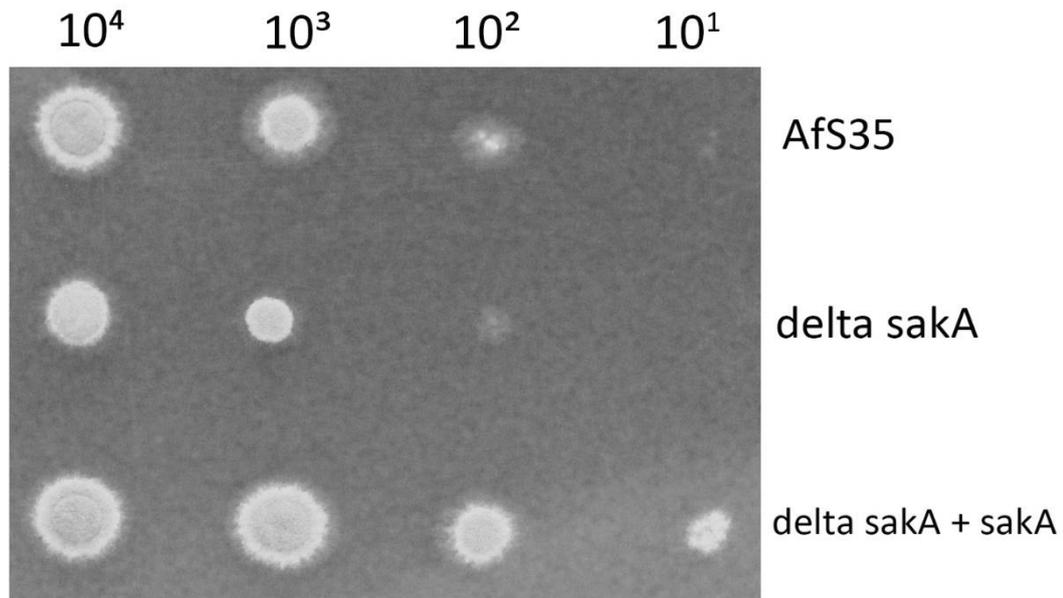


Abbildung 36: Wachstum der abgebildeten Stämme bei hoher Salzkonzentration.

Tüpfeltest auf einer AMM-Platte mit 1 M NaCl. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

2.2.2. Wachstum der Mutanten in Anwesenheit von oxidativem Stress

Es wurde bereits für andere Pilze gezeigt, dass der HOG-Signalweg auch für die Anpassung an oxidativen Stress benötigt wird, wobei in verschiedenen Pilzen Skn7 eine entscheidende Rolle in dem Prozess zugeschrieben werden konnte (FASSLER *et al.*, 2011). In einer vorangegangenen Studie wurde beschrieben, dass eine $\Delta skn7$ -Mutante von *A. fumigatus* einen Wachstumsdefekt in Anwesenheit von oxidativem Stress wie H_2O_2 und t-BOOH aufweist. Bei dem Superoxid-Anion bildenden Stoff Menadion war dies jedoch nicht der Fall (LAMARRE *et al.*, 2007). Für *A. nidulans* wurde ebenfalls die Beobachtung gemacht, dass eine $\Delta srrA$ -Mutante (SrrA entspricht Skn7 bei *A. fumigatus*) nicht in der Lage war, in Anwesenheit von H_2O_2 oder t-BOOH zu wachsen (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Um diese Beobachtungen für die in dieser Arbeit generierte *A. fumigatus* $\Delta skn7$ -Mutante, sowie die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante zu überprüfen, wurden Tests unter selbigen Bedingungen durchgeführt. Es erfolgten Tüpfeltests auf AMM-Agar, supplementiert mit 1 mM H_2O_2 und 2 mM H_2O_2 sowie 0,1 mM t-BOOH und 0,2 mM t-BOOH (Abbildung 37). Auch hier ergab sich das Bild, dass die $\Delta skn7$ -Mutante nicht mit dieser Art oxidativem Stress umgehen kann und keinerlei

Wachstum zeigte. Sowohl die $\Delta tcsC$ - als auch die $\Delta sakA$ -Mutante wuchsen eingeschränkter als der Wildtyp, wenn auch nur zu einem geringen Ausmaß. Die $\Delta ssk1$ -Mutante war in ihrem Wachstum noch etwas stärker beeinträchtigt.

Erst bei 2 mM H_2O_2 wird der Hauptast des HOG-Signalwegs relevant, die $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutanten sind hier nicht mehr in der Lage zu wachsen. Der *A. fumigatus* Wildstamm AfS35 und die $\Delta tcsC$ -Mutante wachsen auch bei dieser Konzentration noch, sind in ihrem Wachstum allerdings etwas eingeschränkt. Auch die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante ist nicht in der Lage, in Anwesenheit von oxidativem Stress zu wachsen.

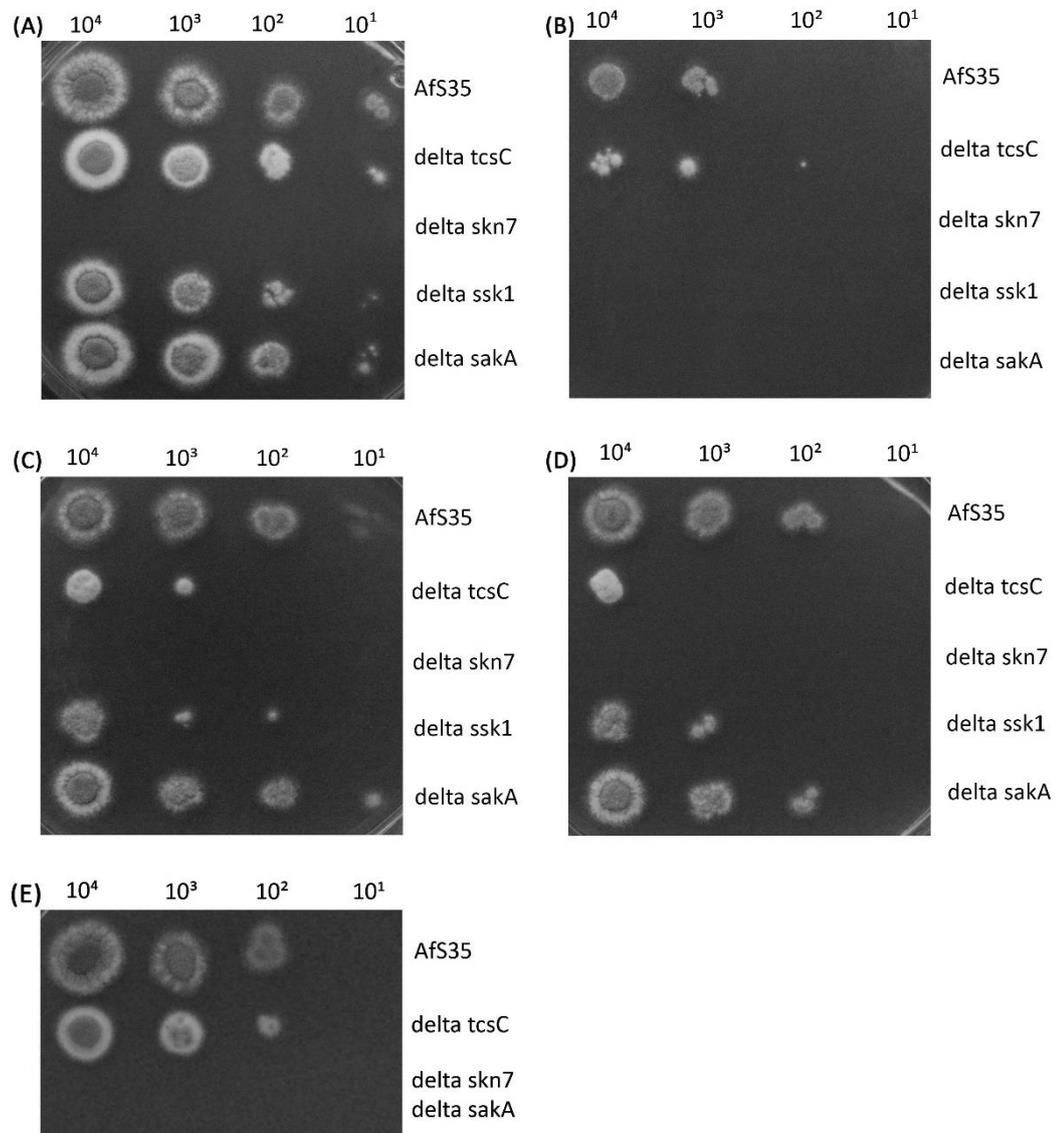


Abbildung 37: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter oxidativem Stress.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 1 mM H₂O₂, (B) 2 mM H₂O₂, (C) 0,1 mM t-BOOH und (D) 0,2 mM t-BOOH. (E) 1 mM H₂O₂. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

Um die wichtige Rolle von Skn7 zu verifizieren, komplementierten wir die $\Delta skn7$ -Mutante, worauf später noch genauer eingegangen wird. Die Komplementation der $\Delta skn7$ -Mutante führte zu einer Resistenz gegenüber 1 mM H₂O₂ (Abb. 38 (A)) und 0,2 mM t-BOOH (Abb. 38 (B)), die der des Wildstammes gleich.

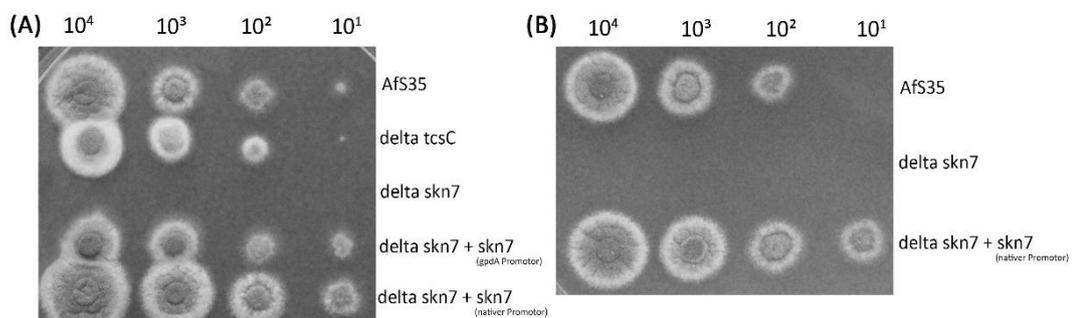


Abbildung 38: Wachstum der abgebildeten Stämme unter oxidativem Stress.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 1 mM H₂O₂ und (B) 0,2 mM t-BOOH. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

2.2.3. Wachstum der Mutanten in Anwesenheit von Zellwandstress

Kongorot und Calcofluor Weiß sind häufig verwendete Zellwandstressoren, die an Chitinketten binden (RAM *et al.*, 2006). Wie zuvor beschrieben, ist die $\Delta tcsC$ -Mutante resistenter gegenüber Zellwandstress als der Wildstamm (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013).

Um zu untersuchen wie sich die *A. fumigatus* Mutanten des HOG-Signalwegs in Gegenwart von Zellwandstress verhalten, wurden Tüpfeltests auf AMM-Platten mit den Kongorot und Calcofluor Weiß durchgeführt.

In Gegenwart beider Stressoren zeigten sich die $\Delta tcsC$ - und die $\Delta skn7$ -Mutante deutlich resistenter als der Wildstamm und auch als die übrigen, untersuchten Stämme (Abbildung 39). Die $\Delta skn7\Delta saka$ -Doppelmutante zeigte sich vergleichbar resistent gegenüber Kongorot wie die $\Delta tcsC$ - und die $\Delta skn7$ -Mutante (Abbildung

40). Ein ähnliches Bild ergab sich bei einem Tüpfeltest mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Calcofluor Weiß. Die ΔtcsC - und die Δskn7 -Mutante wuchsen deutlich besser als die übrigen Stämme, die $\Delta\text{skn7}\Delta\text{sakA}$ -Doppelmutante ähnelte ΔtcsC .

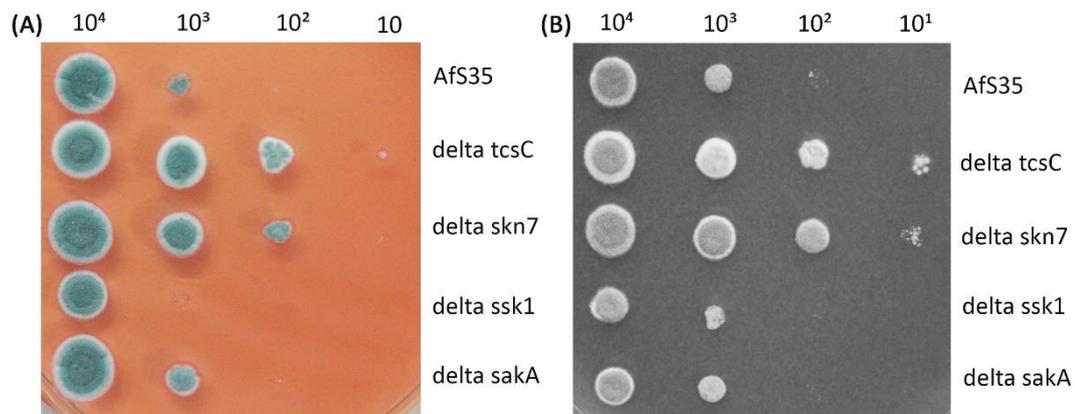


Abbildung 39: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs unter Zellwandstress.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kongorot, (B) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Calcofluor Weiß. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

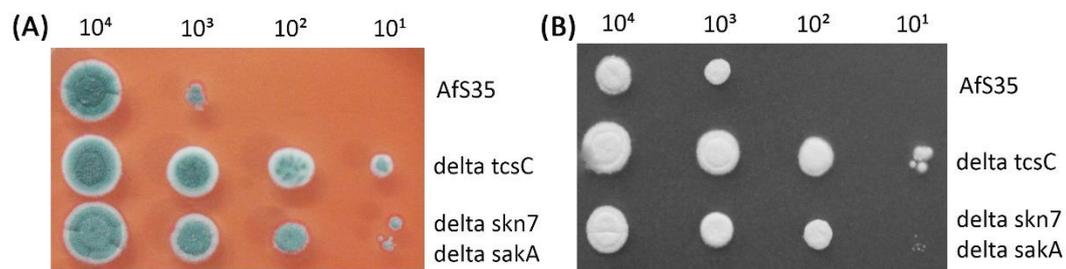


Abbildung 40: Wachstum der $\Delta\text{skn7}\Delta\text{sakA}$ -Doppelmutante unter Zellwandstress.

Tüpfeltest auf einer AMM-Platte mit (A) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kongorot, (B) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Calcofluor Weiß. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

2.2.4. Verhalten der Mutanten in Anwesenheit von Fludioxonil

Die Zielstruktur des antifungalen Mittels Fludioxonil sind Gruppe III HHK. Es ist durch die Aktivierung der Gruppe III HHK TcsC in der Lage, *A. fumigatus* durch einen Prozess, der durch massives Schwellen der Pilzzellen, Ansammlung einer erhöhten Anzahl Zellkerne, vermehrte Entstehung von Septen und Abgabe der

Zellwandbestandteile Galaktomannan und β -1,3-Glukan gekennzeichnet ist, zu töten (WIEDEMANN *et al.*, 2016)

Es war bereits bekannt, dass TcsC für den antifungalen Effekt von Fludioxonil benötigt wird (MCCORMICK *et al.*, 2012). In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, welche anderen Bestandteile des HOG-Signalwegs noch für diesen Effekt benötigt werden. Deshalb testeten wir an dieser Stelle, wie sich die anderen Mutanten des HOG-Signalwegs in Anwesenheit von Fludioxonil verhalten (Abbildung 41).

In Gegenwart von 1 μ g/ml Fludioxonil wuchs die $\Delta tcsC$ Mutante wie erwartet gut. Der Wildtyp-Stamm von *A. fumigatus* AfS35 hingegen war stark sensitiv gegenüber Fludioxonil und nicht in der Lage zu wachsen. Auch die $\Delta sakA$ - und die $\Delta ssk1$ -Mutante konnten nicht wachsen. Die $\Delta skn7$ -Mutante hingegen wuchs zwar kompakter und etwas langsamer als die $\Delta tcsC$ -Mutante, aber dennoch deutlich besser als der Wildtyp, die $\Delta sakA$ - und $\Delta ssk1$ -Mutante. Die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante zeigt ein ähnlich gutes Wachstum wie die $\Delta tcsC$ -Mutante.

Anschließend wurde auch das Auskeimverhalten von Konidien der $\Delta tcsC$ - und der $\Delta skn7$ -Mutante im Vergleich zum *A. fumigatus* Wildtyp in Flüssigkultur in Anwesenheit von Fludioxonil betrachtet (Abbildung 41 (D)). Dazu wurden die entsprechenden Konidien jeweils für 16h in AMM mit 2 μ g/ml Fludioxonil inkubiert und im Anschluss miteinander verglichen. Beim *A. fumigatus* Wildstamm AfS35 kam es zu keinem Wachstum. Die Konidien sind lediglich angeschwollen, aber nicht ausgekeimt. Die $\Delta tcsC$ -Mutante wuchs wie erwartet unbeeindruckt und bildete über Nacht bereits kurze Hyphen mit normaler Morphologie. Die $\Delta skn7$ -Mutante ähnelte der $\Delta tcsC$ -Mutante in ihrem Phänotyp und wuchs ebenfalls annähernd uneingeschränkt.

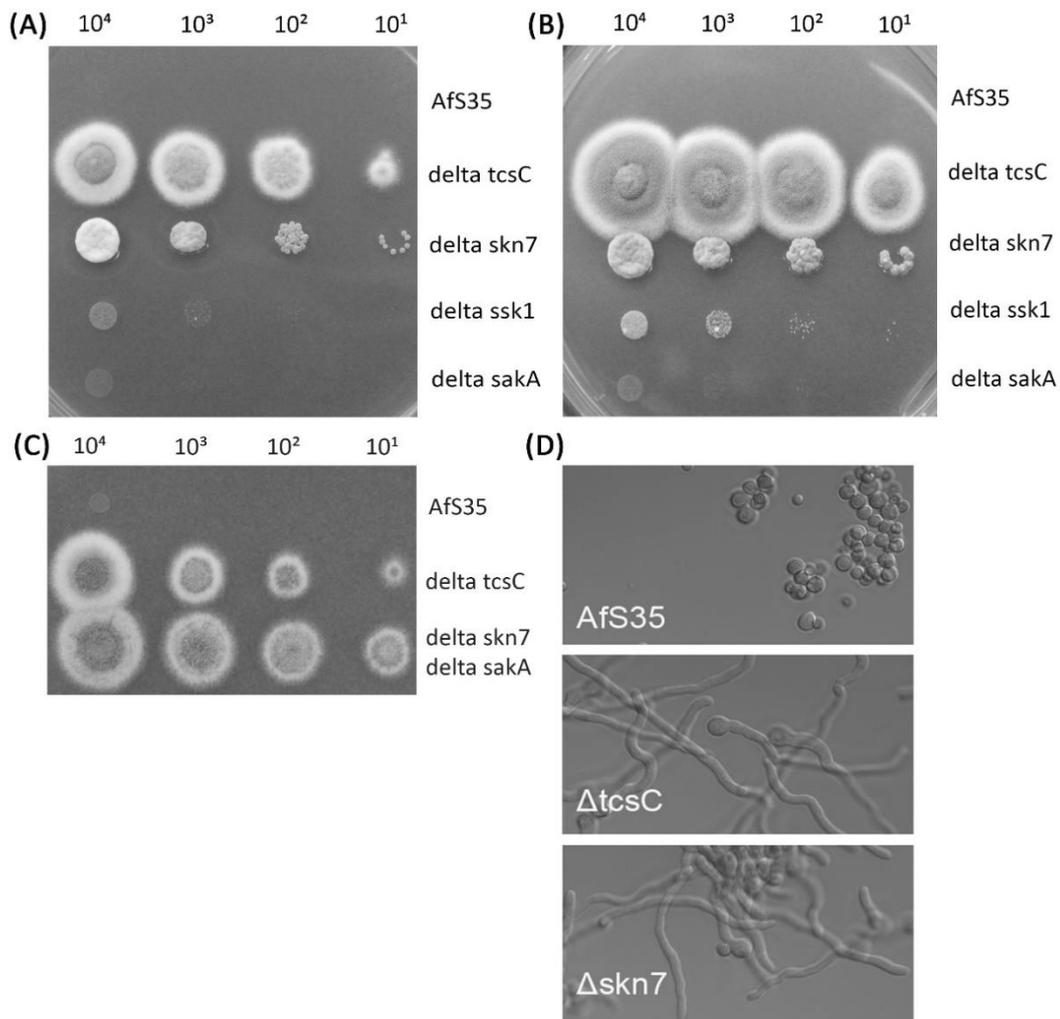


Abbildung 41: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs in Anwesenheit von Fludioxonil.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil. (A) und (C) nach 48h Inkubation bei 37°C, (B) nach 72h Inkubation bei 37°C. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. (D) zeigt das Auskeimverhalten von Konidien des *A. fumigatus* Wildstammes sowie der $\Delta tcsC$ - und $\Delta skn7$ -Mutante über Nacht in Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil in AMM-Medium.

Um die wichtige Rolle von Skn7 zu verifizieren, komplementierten wir die $\Delta skn7$ -Mutante. Zunächst wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem das *skn7* Gen von einem starken *gpdA* Promotor exprimiert wurde. Hier wurde die Sensitivität gegenüber Fludioxonil zwar wiederhergestellt, jedoch nicht zu dem Grad, wie es beim Wildtyp der Fall ist (Abbildung 42 (C)). Auch in Anwesenheit von 1 mM H_2O_2 zeigte diese Komplementante ein verbessertes Wachstum, jedoch waren die Kolonien kleiner als die des Wildstammes (Abbildung 42 (A)), es kam also nur zu einer partiellen

Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Deshalb generierten wir ein weiteres Komplementationskonstrukt, bei dem *skn7* von seinem nativen Promotor exprimiert wurde. Die Expression dieses Konstrukts stellte die Sensitivität gegenüber Fludioxonil nun vollständig wieder her (Abbildung 42 (C)) und auch die Resistenz gegenüber 1 mM H₂O₂ (Abbildung 42 (A)) und 0,2 mM t-BOOH (Abbildung 42 (B)) glich der des Wildstammes.

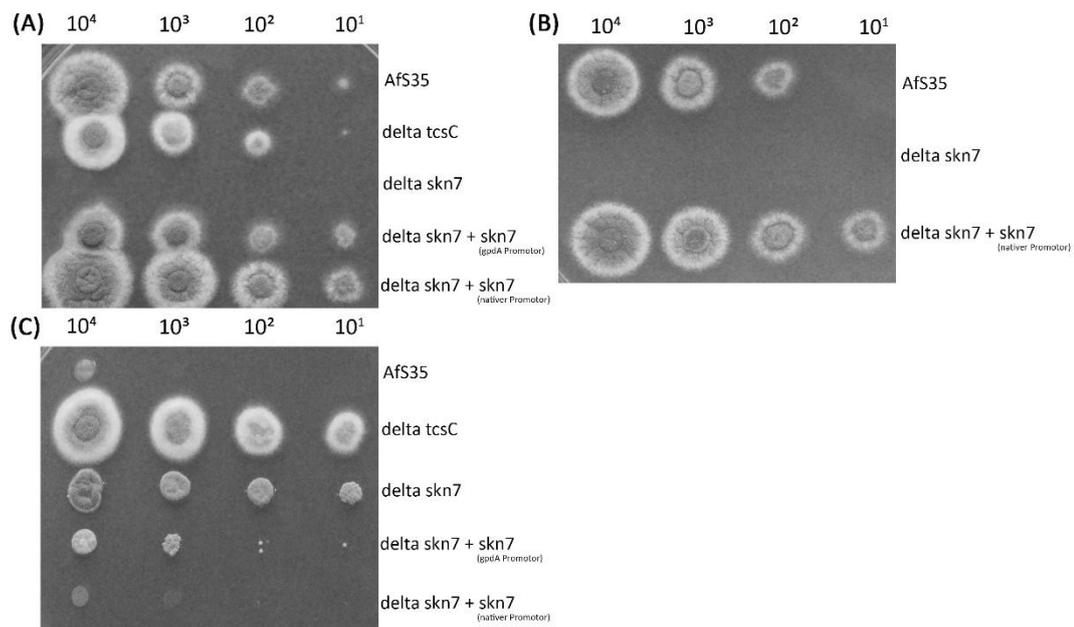


Abbildung 42: Wachstum der abgebildeten Stämme unter oxidativem Stress und Fludioxonil.

Tüpfeltests auf AMM-Platten mit (A) 1 mM H₂O₂, (B) 0,2 mM t-BOOH und (C) 1 µg/ml Fludioxonil. Die Tüpfel enthielten die angegebene Sporenzahl. Inkubation bei 37°C für 48h.

Hagiwara *et al.* beschreiben eine Fludioxonil-bedingte Expression der normalerweise Konidien-spezifischen Katalase CatA in Hyphen des *A. nidulans* Wildstammes (HAGIWARA *et al.*, 2007). Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass Fludioxonil zu einem inneren oxidativen Stress führt. Verschiedene publizierte Daten beschreiben zudem, dass es während des Zellwachstums lebender Organismen in Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommt (SEMIGHINI *et al.*, 2008, HAYASHI *et al.*, 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ebenfalls untersucht, ob Fludioxonil auch

einen inneren oxidativen Stress durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den betroffenen Hyphen auslöst. Dafür wurden Konidien, die mit oder ohne Fludioxonil inkubiert wurden, mit dem reaktive Sauerstoffspezies färbenden 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat behandelt.

Für die mit Fludioxonil behandelte $\Delta skn7$ -Mutante zeigte eine Färbung mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat im Vergleich zu einer unbehandelten $\Delta skn7$ -Mutante keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Beim *A. fumigatus* Wildtyp war jedoch ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die in Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil angezogenen Konidien schwellen ganz typisch an und die Färbung mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat ließ deutlich stärker gefärbte intrazelluläre Strukturen erkennen. Die Kontrolle, die nur in AMM anwuchs, zeigte dagegen eine schwache, homogene grüne Färbung (Abbildung 43).

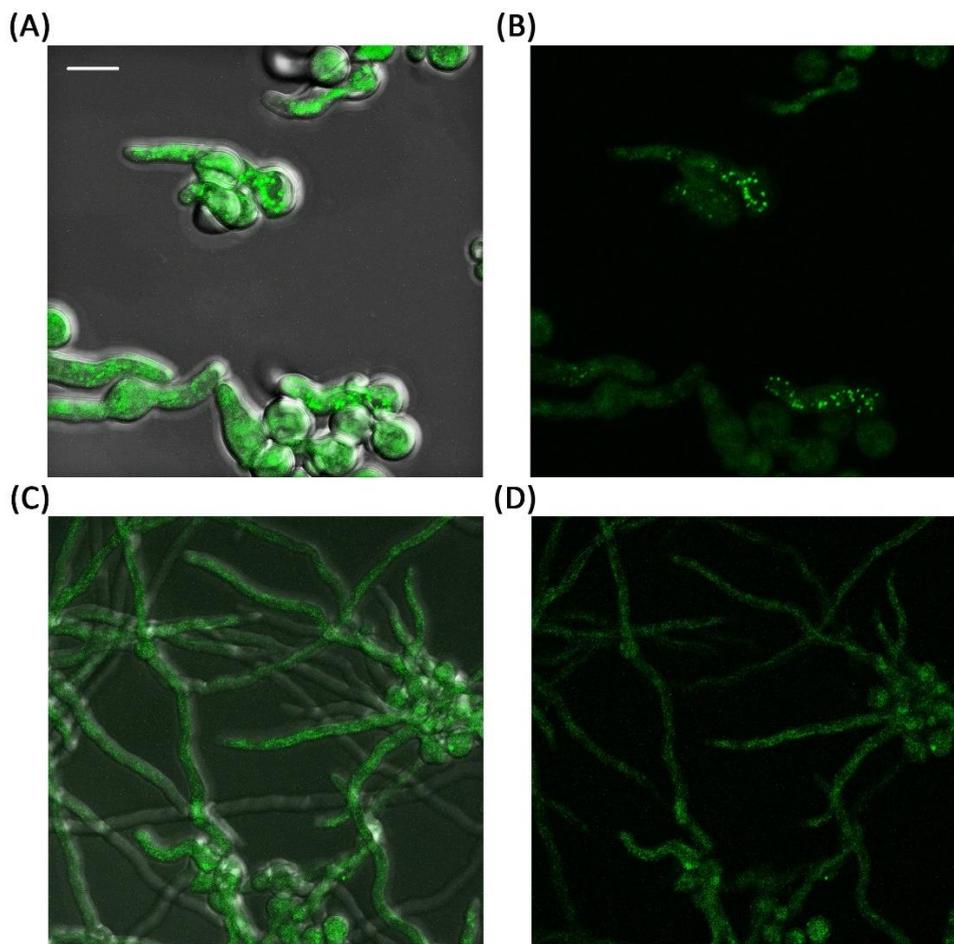


Abbildung 43: 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat Färbung des *A. fumigatus* Wildstammes AfS35.

(A) und (B) zeigen Aufnahmen der in Anwesenheit von 2 µg/ml Fludioxonil angezogenen Konidien. (C) und (D) die Kontrolle. Inkubation für 16h bei 37°C. (A) und (C) zeigen Overlayaufnahmen, (B) und (D) sind Fluoreszenzaufnahmen. Der Balken in Bild A repräsentiert 5 µm und gilt für alle Bilder.

In *Neurospora crassa* führt Fludioxonil zu einem Anstieg des inneren osmotischen Drucks und einer Erhöhung der Glycerin-Konzentration was zu einem Einstrom von Wasser führt (LEW, 2010). Dieser Vorgang könnte das für *A. fumigatus* und andere Pilze beobachtete Anschwellen erklären.

Um zu testen, ob es durch Fludioxonil in *A. fumigatus* zu einer Erhöhung des intrazellulären osmotischen Drucks kommt, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob Fludioxonil auch in hyperosmolarem Medium ein Anschwellen verursacht. Dazu wurde überprüft, wie sich Konidien von *A. fumigatus* verhalten, wenn sie in AMM, supplementiert mit 2 µg/ml Fludioxonil und 1,2 M Sorbit, inkubiert werden. Wir verglichen ihr Wachstum mit dem von Konidien, die lediglich in AMM-Medium mit 2 µg/ml Fludioxonil angezogen wurden. Wie für Konidien des Wildstammes typisch, waren diese nicht in der Lage zu wachsen. Sie schwollen lediglich an oder entwickelten sich bestenfalls zu kurzen Keimlingen. Doch auch in Anwesenheit von 1,2 M Sorbit kam es zu keinem deutlich anderen Effekt. Auch diese Konidien schwollen nur an oder keimten leicht aus (Abbildung 44 (A)). Im Anschluss wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen und die angeschwollenen Konidien bzw. Keimlinge wurden in AMM bzw. AMM + 1,2 M Sorbit inkubiert.

Es wurden Aufnahmen 8 (Abbildung 44 (B)) und 48h (Abb. 44 (C)) nach Medienwechsel angefertigt. Die Konidien, die in normalem AMM inkubiert wurden, zeigten bereits nach acht Stunden die Tendenz, weiter auszukeimen. Die Anzahl an Keimlingen stieg an. Nach 24h waren kurze Hyphen entstanden (Daten nicht gezeigt), nach 48h hatten diese sich zu einem Geflecht aus Hyphen entwickelt. Der Fludioxonil-Effekt konnte also rückgängig gemacht werden und der Pilz erholte sich.

Anders sah es bei den Konidien aus, die in AMM + 1,2 M Sorbit inkubiert wurden. Diese zeigten auch nach 48h noch keine Tendenz sich zu erholen. Es waren

lediglich angeschwollene Konidien oder kurze Keimschläuche zu sehen. Das hyperosmolare Medium konnte also den Fludioxonil-Effekt nicht abmildern.

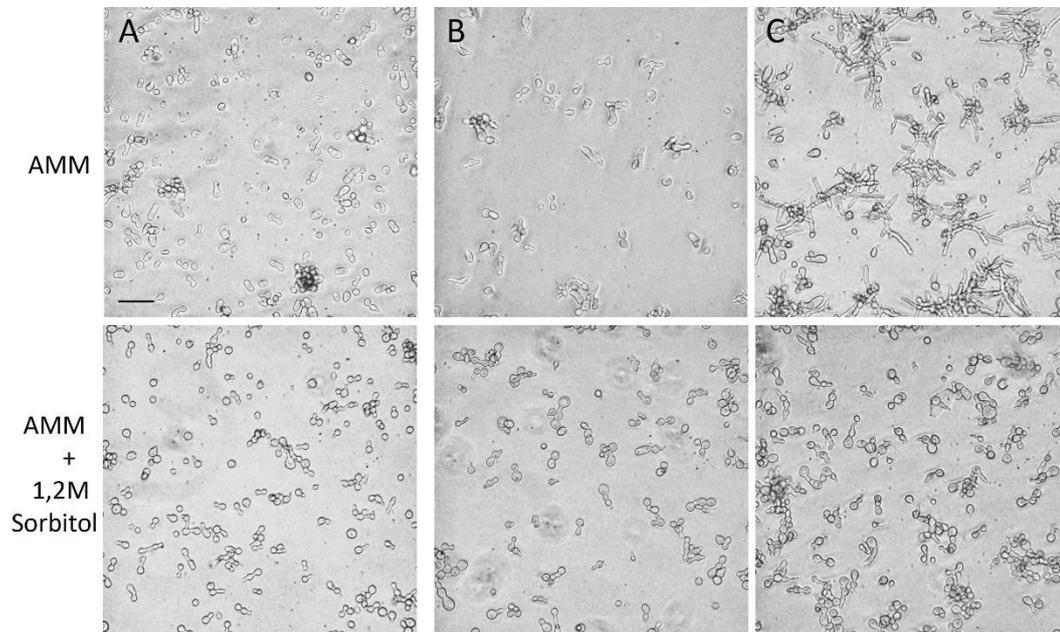


Abbildung 44: Ein hyperosmolares Medium schützt nicht vor Fludioxonil.

(A) Wachstum von *A. fumigatus* AfS35 Konidien in AMM-Medium bzw. AMM-Medium + 1,2 M Sorbit für 16h in Anwesenheit von 2 µg/ml Fludioxonil. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation für insgesamt 48h ohne Fludioxonil. (B) Aufnahme nach 8h Inkubation ohne Fludioxonil, (C) nach 48h Inkubation ohne Fludioxonil. Der Balken in Bild A repräsentiert 15 µm und gilt für alle Bilder.

Ein weiterer Versuch, um zu überprüfen, ob Fludioxonil durch eine Erhöhung des inneren osmotischen Drucks zu einem Anschwellen führt, wurde mit Protoplasten des *A. nidulans* Wildstammes durchgeführt.

Da die Messung des inneren osmotischen Drucks von *A. fumigatus* Hyphen sehr schwierig ist, erfolgte dieser Versuch mit Protoplasten dieses Stammes der ebenfalls empfindlich gegenüber Fludioxonil ist, wie im ersten Teil der Ergebnisse in Kapitel D. 1. 1.3. (Wachstum in Anwesenheit von Fludioxonil) beschrieben.

Hierzu wurden zunächst Protoplasten des *A. nidulans* Stammes A26 durch Inkubation von Myzel mit Lysing Enzymes gewonnen. Da der innere osmotische Druck des Zytoplasmas höher ist, als der des einfachen Mediums, wurde dem AMM zur Osmoprotektion 1,2 M Sorbit zugesetzt. Somit wurden zum einen die sehr

empfindlichen Protoplasten geschützt und zum anderen gewährleistet, dass wenn ein Effekt zu beobachten wäre, dieser nur durch eine Veränderung des inneren osmotischen Drucks durch Fludioxonilwirkung zustande gekommen sein konnte.

In einem der Ansätze wurde zusätzlich 2 µg/ml Fludioxonil zugegeben (Abbildung 45 (A)). In einem benachbarten Well wurde kein Fludioxonil zugegeben (Abbildung 45 (B)). Die Bilder unter (A) wurden vor Zugabe von Fludioxonil (A₁) und nach 4 (A₂) und 20 h (A₃) Inkubation bei 37°C mit Fludioxonil aufgenommen. Die Morphologie der Protoplasten änderte sich im Laufe der Zeit nicht. Im Ansatz ohne Fludioxonil (B) hatten sich nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C kleine Keimlinge oder kurze Hyphen gebildet. Nach einem Wechsel des Mediums bei Ansatz (A) zu AMM ohne Fludioxonil wurde dieser für weitere 20 h bei 37°C inkubiert (Abb. 45 (C)). Die Bildung von Hyphen in (C) zeigt, dass die angeschwollenen Konidien noch vital waren. Die angeschwollene Erscheinung der Hyphen und die ungewöhnlich hohe Septenzahl sind höchstwahrscheinlich Resten von Fludioxonil im Medium geschuldet. Da die Protoplasten nicht gut an die Oberfläche adhärirten, konnte das Medium mit Fludioxonil nicht vollständig entfernt werden.

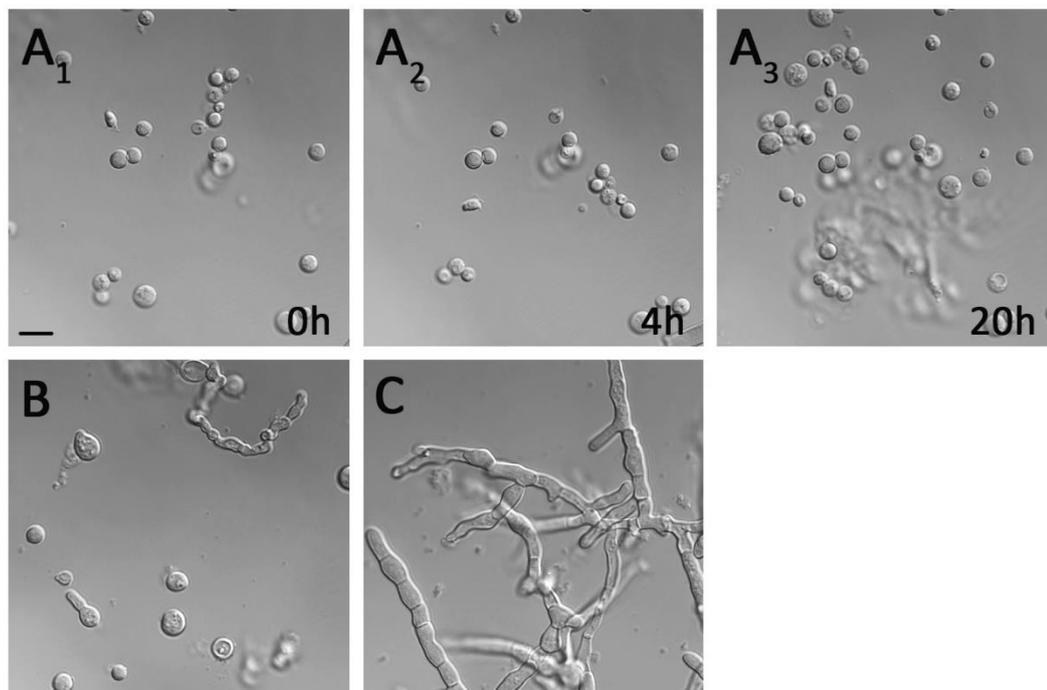


Abbildung 45: Effekt von Fludioxonil auf Protoplasten des *A. nidulans* Wildstammes.

Protoplasten des *A. nidulans* Stammes A26 wurden in AMM inkubiert, welches mit 1,2 M

Sorbit und in Ansatz (A) 2 µg/ml Fludioxonil supplementiert wurde. (A) Die Bilder wurden (A₁) vor Zugabe von Fludioxonil und nach (A₂) 4 und (A₃) 20 h Inkubation bei 37°C mit Fludioxonil aufgenommen. Protoplasten, die in einem benachbarten Well, lediglich in AMM mit 1,2 M Sorbit, aber ohne Fludioxonil für 20 h kultiviert wurden, sind in (B) zu sehen. (C) Bei Ansatz (A) erfolgte nach 20 h (A₃) ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation für 20 h bei 37°C ohne Fludioxonil folgte. Der Balken in Bild A repräsentiert 10 µm und gilt für alle Bilder.

Ein letzter Versuch, um einen möglicherweise osmoprotektiven, eindämmenden Effekt von Sorbit auf die Fludioxonilwirkung zu überprüfen, erfolgte auf AMM-Platten, auf denen Hemmhofversuche mit Fludioxonil durchgeführt wurden.

Es wurden zwei AMM-Platten (Abbildung 46 (A) und (C)) und zwei AMM-Platten mit 1,2 M Sorbit (Abbildung 46 (B) und (D)) gegossen und anschließend Konidien von *A. fumigatus* gleichmäßig auf diesen verteilt.

In einem ersten Ansatz wurden direkt Filterplättchen aufgelegt, die mit 2, 5 und 10 µg Fludioxonil getränkt waren (Abbildung 46 (A) und (B)). Die Platten wurden anschließend für 30 h bei 30°C inkubiert.

Bei einem zweiten Ansatz wurden die Konidien gleichmäßig verteilt und die Platten zunächst ohne Filterplättchen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, sodass am nächsten Tag zwar noch kein Myzel entstanden war, die Konidien sich aber zu Keimlingen oder kurzen Hyphen entwickelt hatten. Erst dann wurden Filterplättchen, getränkt mit 2, 5 und 10 µg Fludioxonil aufgebracht und die Platten über Nacht bei 30°C inkubiert (Abbildung 46 (C) und (D)).

Alle Platten wurden anschließend fotografiert und die entstandenen Hemmhöfe miteinander verglichen.

Die Hemmhöfe, die in Ansatz (A) und (B) entstanden, also bei Zugabe von Fludioxonil zu Konidien, waren deutlich größer als jene, die sich bildeten, wenn die Zugabe erst erfolgte, nachdem bereits Keimlinge oder kurze Hyphen entstanden waren (C) und (D). Die entstandenen Hemmhöfe waren jeweils 0,7 - 1,1 cm kleiner, wenn die Zugabe der mit Fludioxonil getränkten Filterplättchen erst später erfolgte. Konidien sind also deutlich empfindlicher gegenüber Fludioxonil als Hyphen.

Auch zwischen den AMM- bzw. AMM + 1,2 M Sorbit-Platten gab es Unterschiede.

Sowohl die Konidien als auch die Keimlinge bzw. Hyphen waren in Anwesenheit von Sorbit resistenter gegenüber Fludioxonil, was sich in kleineren Hemmhöfen äußerte. Die Hemmhöfe der Platten mit Sorbit waren jeweils 0,3 - 0,5 cm kleiner (B) und (D) als die Hemmhöfe auf den Platten ohne Sorbit (A) und (C), was zeigt, dass Sorbit hier durchaus einen protektiven Effekt auf die Zellen ausübt. Aufgrund des Fludioxonileffekts steht die Zellwand des Pilzes unter Druck. 1,2 M Sorbit wird auch eingesetzt um *A. fumigatus* Protoplasten zu stabilisieren, also den inneren osmotischen Druck dieser zellwandlosen Zellen zu kompensieren. Durch den höheren äußeren osmotischen Druck der Sorbit-Lösung kommt es jedoch zu einer Stabilisierung, die bei Fludioxonil-behandelten Pilzen den Druck auf die Zellwand kompensieren kann. Es kommt somit zu einer gewissen Abschwächung des Fludioxonileffekts.

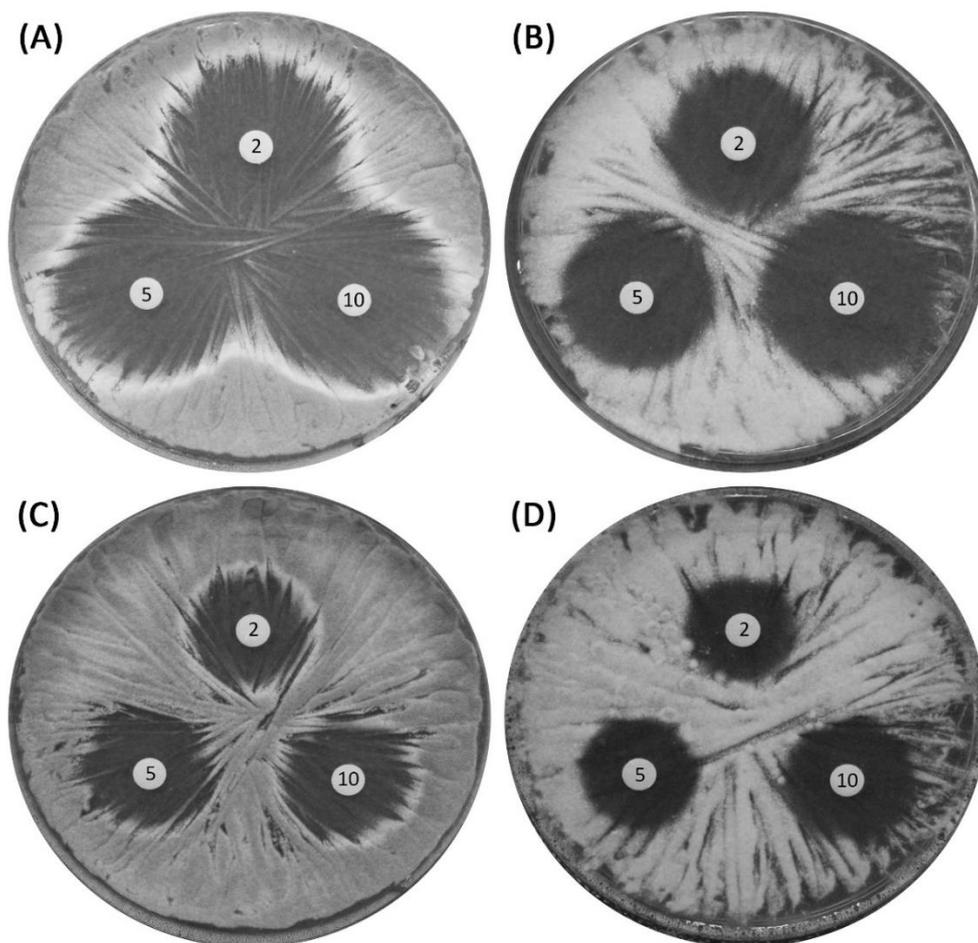


Abbildung 46: Effekt von Fludioxonil auf Konidien und kurze Hyphen von *A. fumigatus* in Hemmhofversuchen.

Die Versuche wurden auf Platten aus AMM-Agar (A) und (C) bzw. AMM-Agar + 1,2 M Sorbit (B) und (D) durchgeführt. In allen Ansätzen wurden Konidien von *A. fumigatus*

gleichmäßig verteilt. Mit 2, 5 und 10 µg Fludioxonil getränkte Filterplättchen wurden entweder direkt nach dem Ausplattieren (A und B) oder nach Vorinkubation über Nacht bei Raumtemperatur (C und D) aufgelegt. Alle Platten wurden anschließend nochmals über Nacht bei 30°C inkubiert. Ausmessung der Hemmhöhe: (A) 2 µg: 3,0 cm, 5 µg: 3,5 cm, 10 µg: 3,7 cm; (B) 2 µg: 2,5 cm, 5 µg: 2,8 cm, 10 µg: 3,0 cm; (C) 2 µg: 2,2 cm, 5 µg: 2,4 cm, 10 µg: 2,6 cm; (D) 2 µg: 1,8 cm, 5 µg: 2,0 cm, 10 µg: 2,2 cm.

Reorganisation der Zellwand unter dem Einfluss von Fludioxonil

Wie von Wiedemann *et al.* beschrieben, kommt es durch Behandlung mit Fludioxonil beim *A. fumigatus* Wildstamm zur Freisetzung des Zellwandbestandteils Galaktomannan, was zu einer schwachen und gepunkteten Färbung bei der Immunfluoreszenz mit dem Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1 führt (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Um zu überprüfen, ob dies auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Deletionsmutanten des HOG-Signalwegs der Fall ist, wurden diese zusammen mit dem Wildstamm unter gleichen Bedingungen angezogen und der Fludioxonil-Effekt auf das Galaktomannan der Zellwand analysiert. Dazu wurden Konidien der jeweiligen Stämme für 16h bei 37°C mit 2 µg/ml Fludioxonil inkubiert und anschließend in einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1 behandelt. Hierbei zeigten sowohl die $\Delta ssk1$ - (Abbildung 47, (B)) als auch die $\Delta sakA$ -Mutante (Abbildung 47, (C)) einen Phänotyp, der dem des *A. fumigatus* Wildstammes (Abbildung 47, (A)) stark ähnelte, sie schwollen lediglich an oder bildeten kurze Keimlinge und gaben Galaktomannan ab. Die $\Delta skn7$ -Mutante hingegen wuchs, wie auch bereits in vorangegangenen Versuchen, nahezu unbeeindruckt und gab auch etwas weniger Galaktomannan ab. Die Färbung wirkt zwar etwas schwächer und diffuser, war aber nach wie vor homogen (Abbildung 47, (D)).

Eine Färbung der Präparate mit dem DNS-Farbstoff DAPI zeigte, dass sich bei der $\Delta ssk1$ - und der $\Delta sakA$ -Mutante die Zellkernzahl durch die Inkubation mit Fludioxonil erhöhte, wie es auch für den *A. fumigatus* Wildstamm typisch ist. Diese Beobachtung war bei der $\Delta skn7$ -Mutante nicht zu machen. In Abbildung 47 sind die Aufnahmen dargestellt.

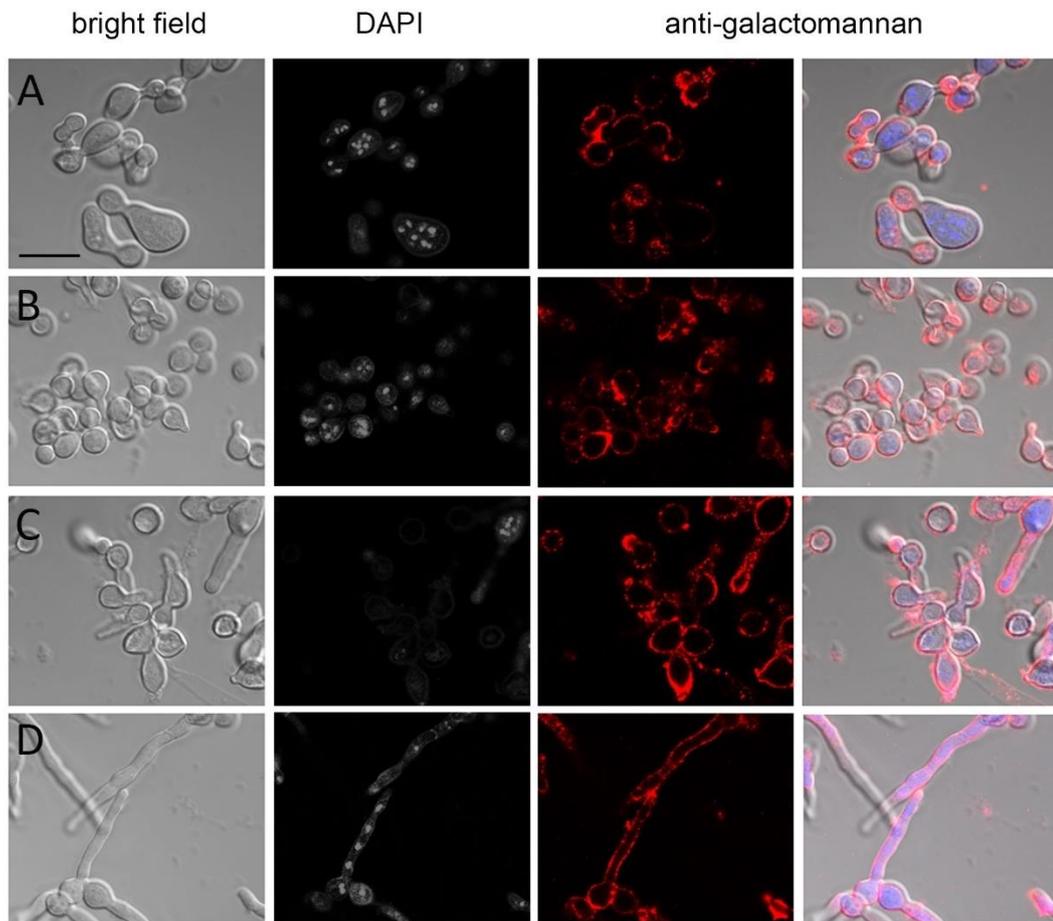


Abbildung 47: Wachstum der Mutanten des HOG-Signalwegs in Anwesenheit von Fludioxonil.

Inkubation von Konidien der Stämme (A) AfS35, (B) $\Delta ssk1$, (C) $\Delta saka$ und (D) $\Delta skn7$ in AMM-Medium mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil für 16h. Von links nach rechts: Durchlichtaufnahmen, DAPI-Färbungen zur Darstellung der Zellkerne, Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1, Overlay-Aufnahme aller drei Bilder. Jede Aufnahme zeigt eine einzige optische Ebene. Der Balken in Bild A repräsentiert 15 μm und gilt für alle Bilder.

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, wie sich die Doppelmutante $\Delta skn7\Delta saka$ verhält, wenn sie in AMM-Medium mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil inkubiert wird. Hierfür wurden Konidien der Stämme AfS35 (Abbildung 48, (A)), $\Delta saka$ (Abb. 48, (B)), $\Delta skn7$ (Abb. 48, (C)) und $\Delta skn7\Delta saka$ (Abb. 48, (D)) für 16h inkubiert und im Anschluss mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1 behandelt.

Sowohl der Wildstamm, als auch die $\Delta saka$ - und die $\Delta skn7$ -Mutante verhielten sich wie im vorherigen Versuch. Die $\Delta skn7\Delta saka$ -Doppelmutante wuchs ohne

Einschränkung und zeigte eine homogene Färbung der über Nacht entstandenen Hyphen, setzte also kein Galaktomannan frei (Abbildung 48, (D)).

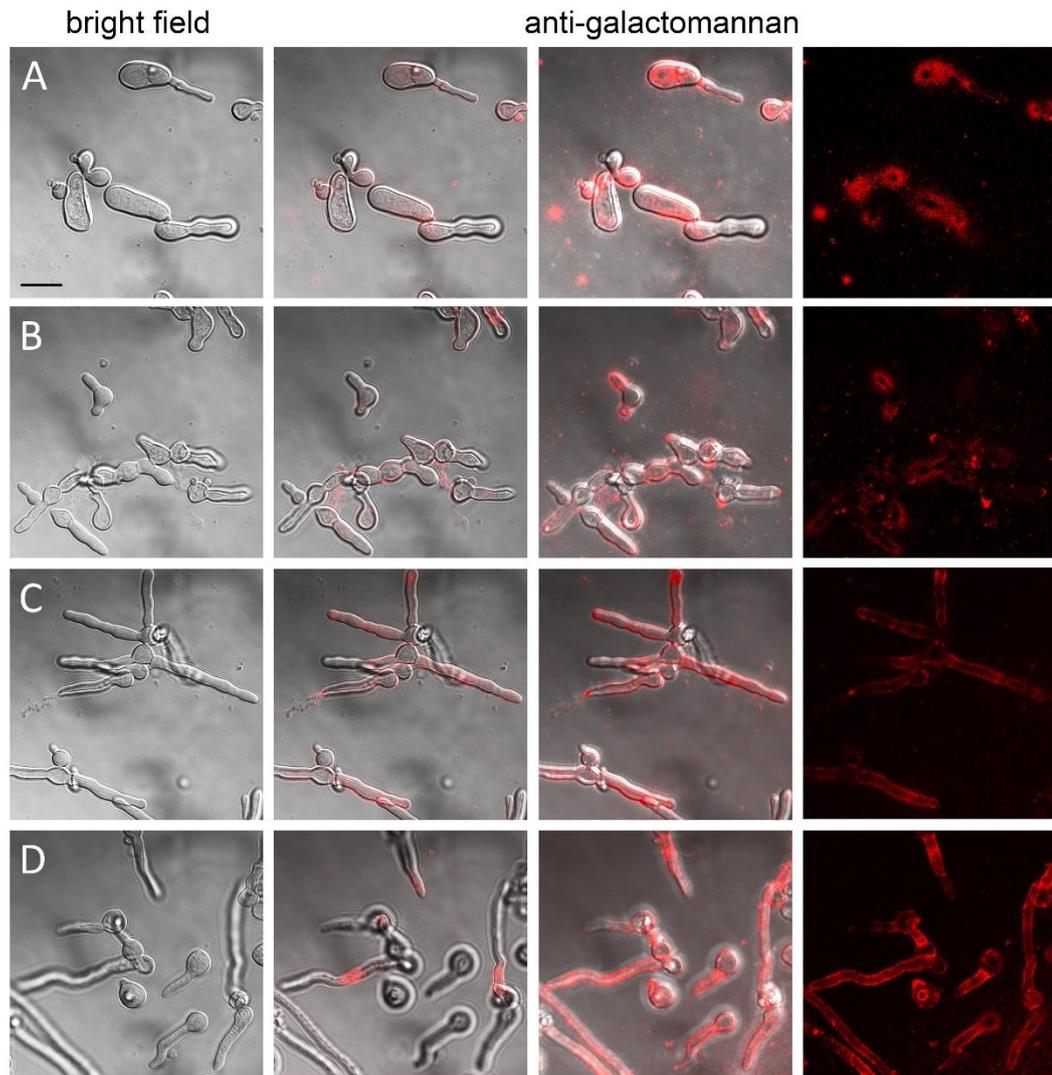


Abbildung 48: Wachstum der abgebildeten Stämme in Anwesenheit von Fludioxonil.

Inkubation von Konidien der Stämme (A) AfS35, (B) $\Delta saka$, (C) $\Delta skn7$ und (D) $\Delta skn7\Delta saka$ in AMM-Medium mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil für 16h. Von links nach rechts: Durchlichtaufnahmen, Aufnahmen jeweils einer optischen Ebene der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1, Maximum-Projektion aller Ebenen der L10-1 Färbung mit bzw. ohne Durchlichtkanal (3. bzw. 4. Spalte). Der Balken in Bild A repräsentiert 10 μm und gilt für alle Bilder.

Der durch Fludioxonil in der $\Delta skn7$ -Mutante ausgelöste Effekt auf Galaktomannan wurde noch in einem weiteren Versuch untersucht (Abbildung 49). (A) zeigt die für *A. fumigatus* Wildtyp-Hyphen typische gleichmässige Galaktomannan-Färbung. Konidien wurden dafür über Nacht in AMM angezogen. (B) zeigt Wildtyp Konidien, die über Nacht mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil inkubiert wurden. Sie keimen nicht aus und es kam zu einer starken Freisetzung von Galaktomannan. In (C) ist die $\Delta skn7$ -Mutante dargestellt, die über Nacht in Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil kultiviert wurde. Sie war, wie auch in vorangegangenen Versuchen, in der Lage zu wachsen und auch die Galaktomannanfärbung war stark, wenn auch etwas schwächer und diffuser als bei er Wildtyp-Kontrolle. Es kam zu keiner Abgabe von Galaktomannan.

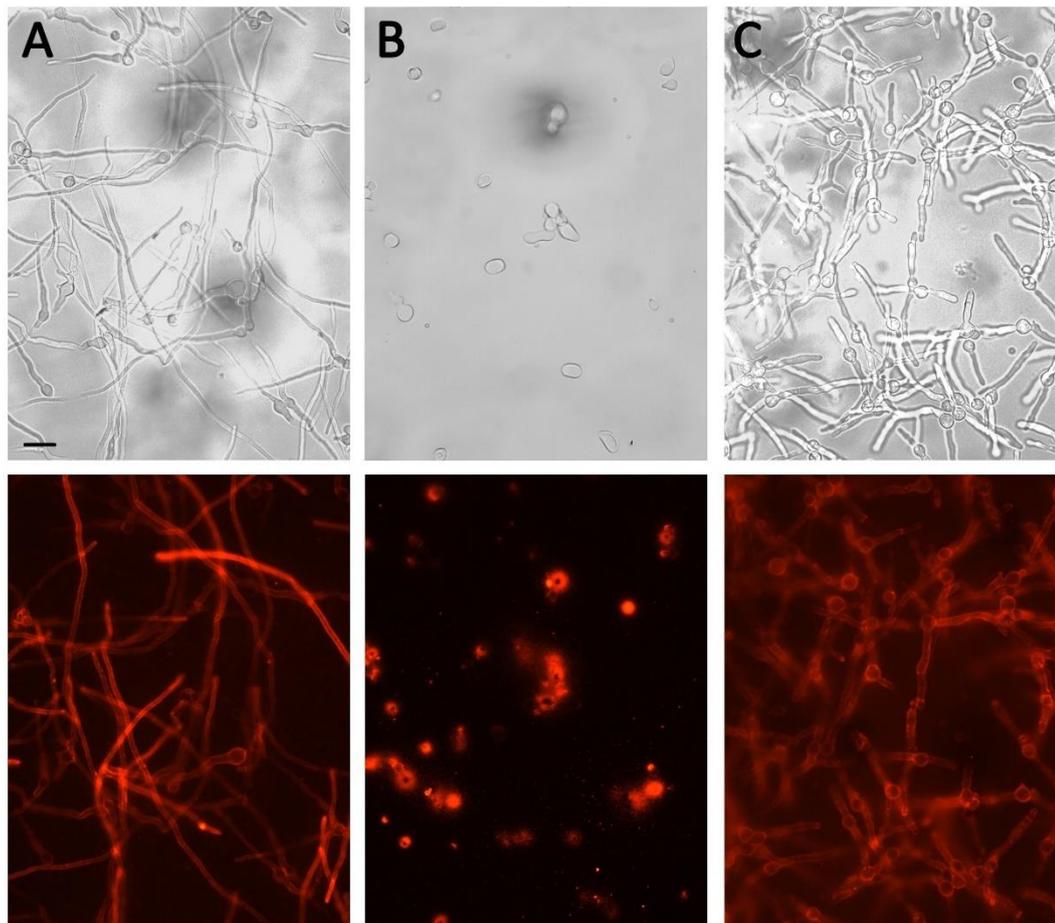


Abbildung 49: Wachstum von AfS35 und $\Delta skn7$ in Anwesenheit von Fludioxonil.

Inkubation von Konidien der Stämme (A) AfS35 in AMM, (B) AfS35 in AMM + 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil und (C) $\Delta skn7$ in AMM + 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil für 16h. Oben: Durchlichtaufnahmen, unten: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-

spezifischen monoklonalen Antikörper L10-1. Der Balken in Bild A repräsentiert 15 μm und gilt für alle Bilder.

Da es bei der $\Delta tcsC$ - und $\Delta skn7$ -Mutante zu keiner Freisetzung von Galaktomannan aus der Zellwand kommt, erfolgte auch eine Betrachtung des Fludioxonil-Effekts auf das Chitin der Zellwand für die einzelnen HOG-Mutanten von *A. fumigatus*.

Dazu wurden Konidien der Stämme AfS35, $\Delta skn7\Delta sakA$, $\Delta skn7$ und $\Delta sakA$ über Nacht jeweils einmal in AMM und einmal in AMM mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil inkubiert und am nächsten Tag mit Calcofluor Weiß gefärbt (Abbildung 50).

Die Behandlung mit Fludioxonil führte zu einem stark eingeschränkten Wachstum sowie der vermehrten Einlagerung von Chitin bei AfS35 (A) sowie der $\Delta sakA$ -Mutante (D). Die $\Delta skn7$ -Mutante (C) und vor allem die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante (B) wurden in ihrem Wachstum nahezu gar nicht eingeschränkt. Auch erfolgte keine vermehrte Einlagerung von Chitin in die Zellwand dieser beiden Mutanten.

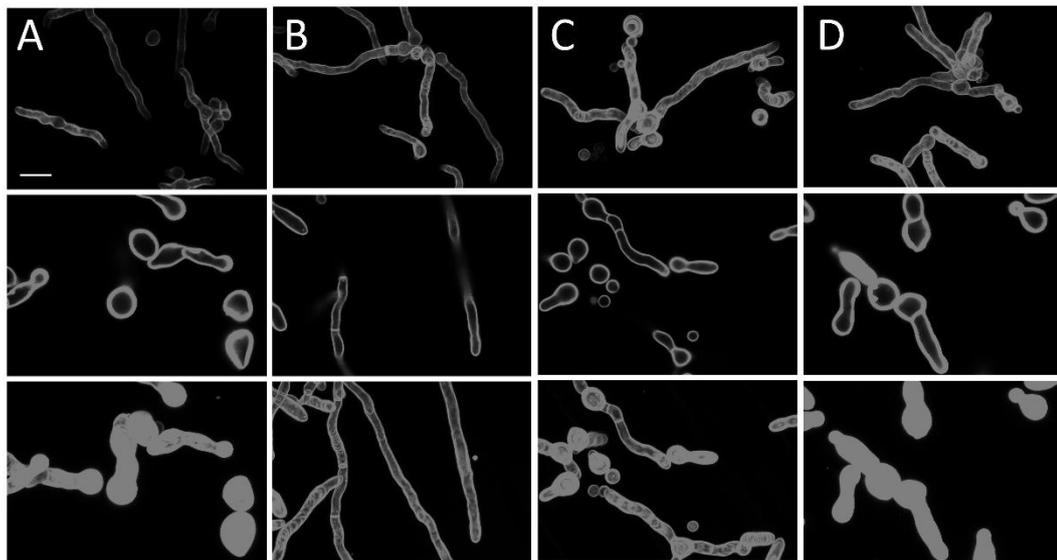


Abbildung 50: Darstellung einer Calcofluor Weiß Färbung von (A) *A. fumigatus* AfS35, (B) $\Delta skn7\Delta sakA$, (C) $\Delta skn7$ und (D) $\Delta sakA$.

Die Inkubation erfolgte für 16h in AMM bei 37°C. Obere Reihe: Kontrolle, mittlere Reihe: nach Inkubation in AMM + 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil, Aufnahme einer Ebene, untere Reihe: nach Inkubation in AMM + 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil, Maximum-Projektion aller Ebenen. Der Balken in Bild A repräsentiert 5 μm und gilt für alle Bilder.

E. DISKUSSION

Der HOG-Signalweg und die Gruppe III Hybrid Histidin Kinasen als potentieller Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika

Aspergillus spp. führen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zu teils schweren Erkrankungen mit hohen Mortalitätsraten. Um Pilze effizient und unschädlich für den Wirtsorganismus zu bekämpfen, bedarf es pilzspezifischer Angriffsstrukturen, die nicht im Wirt vorkommen. Dies ist ein wesentlicher Grund für die geringe Zahl zur Verfügung stehender Antimykotika (SHOR *et al.*, 2015). Auch wegen zunehmender Resistenzprobleme antifungaler Wirkstoffe, die in der Humanmedizin Anwendung finden, werden neue Therapiestrategien benötigt. Wie McCormick *et al.* zeigen konnten, sind Gruppe III HHK, die Hauptsensorproteine und Regulatoren des HOG-Signalwegs, welche eine Rolle in der Pathogenität des Pilzes spielen und dazu beitragen Stress zu widerstehen, die Zielstruktur antifungaler Wirkstoffe wie Fludioxonil oder Iprodion (MCCORMICK *et al.*, 2012). Außerdem kommen sie nicht in Säugern vor. Sie stellen somit interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antimykotika dar (SHOR *et al.*, 2015, PERFECT, 2017). Bisher werden Substanzen wie Fludioxonil in der Landwirtschaft zur Bekämpfung pflanzenpathogener Pilzarten angewendet (KILANI *et al.*, 2016). Der Einsatz dieser Wirkstoffe ist durch einen ungewöhnlichen Mechanismus, nämlich die künstliche Aktivierung dieses Signalwegs und nicht etwa das Ausschalten eines physiologischen Vorgangs charakterisiert. Die Aktivierung führt unter anderem zu einer Störung des osmotischen Gleichgewichts und dadurch einer massiven Schädigung des Pilzes (OKADA *et al.*, 2005).

Die Deletion von Genen, die für Gruppe III HHK codieren, führt zwar nicht zum Tod des Organismus, jedoch lassen sich einige andere Effekte beobachten, die unter anderem negative Folgen für den Pilz haben. So zeigen Deletionsmutanten der Gruppe III HHK beispielsweise eine verminderte Sporulation, reduzierte Pathogenität und erhöhte Osmosensitivität, doch auch eine Resistenz gegenüber verschiedenen antifungalen Wirkstoffen wie dem Phenylpyrrol-Derivat Fludioxonil (HAGIWARA *et al.*, 2007, MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013, KILANI *et al.*, 2016). Werden die Gene wieder eingebracht, sind die betroffenen Pilze sensitiv gegenüber diesen Stoffen. Gruppe III HHK stellen also

wahrscheinlich das direkte Ziel von Phenylpyrrolen dar (KILANI *et al.*, 2016). Fludioxonil bedingt nach den bisher publizierten Daten einen dramatischen Anstieg des inneren osmotischen Drucks von *A. fumigatus* und somit einen massiven Einstrom von Wasser in die Pilzzelle. Nach einem unmittelbaren Wachstumsstopp folgt bei längerer Inkubation ein Prozess, der durch massives Schwellen der Pilzzellen, Ansammlung einer erhöhten Anzahl Zellkerne, vermehrte Entstehung von Septen und Freisetzung der Zellwandbestandteile Galaktomannan, gekennzeichnet ist (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Letztlich führt dies zum Aufplatzen und damit zum Tod des Pilzes. Dies konnte in einer früheren Arbeit anhand eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus* Stammes gezeigt werden, der nach 72h Inkubation mit Fludioxonil seine grüne Fluoreszenz annähernd vollständig verlor (WIEDEMANN *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch für *A. nidulans* gilt, denn auch bei dem hier etablierten, RFP-exprimierenden Stamm, war nach 72h in den meisten seiner Kompartimente kein rotes Fluoreszenzsignal mehr nachweisbar.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sollte TcsC, die Gruppe III HHK des pathogenen Schimmelpilzes *A. fumigatus*, näher charakterisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden dafür die homologen Gene *tcsC* von *A. fumigatus* und *nikA* des nur schwach pathogenen Modellorganismus *A. nidulans* miteinander verglichen. Die jeweiligen Deletionsmutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$, wie auch andere Komponenten des HOG-Signalwegs, wurden in vorangegangenen Studien bereits charakterisiert, jedoch gab es teilweise große Diskrepanzen zwischen parallelen Studien (HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007, HAGIWARA *et al.*, 2009, HAGIWARA *et al.*, 2013). Deshalb erfolgte in dieser Arbeit ein direkter Vergleich der beiden Wildstämme und ihrer Gruppe III HHK-Deletionsmutanten.

Im zweiten Teil erfolgte dann die genauere Analyse der Bedeutung einzelner Komponenten des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus*.

1. Funktioneller Vergleich der Gruppe III Hybrid Histidin Kinasen TcsC von *A. fumigatus* und NikA von *A. nidulans*

Um die beiden Gruppe III HHK miteinander vergleichen zu können, musste zunächst eine $\Delta nikA$ -Mutante generiert werden. Um auszuschließen, dass polare Effekte, die durch die Deletionen der Gene verursacht werden können, einen Einfluss auf die beobachteten Phänotypen haben, wurden die beiden Mutanten-Stämme auch wieder komplementiert. Für die $\Delta tcsC$ -Mutante wurde die erfolgreiche Komplementation bereits in einer vorhergegangenen Studie beschrieben (MCCORMICK *et al.*, 2012). In dieser Arbeit erfolgte die $\Delta nikA + nikA$ Komplementation. Die Wiedereinbringung der jeweiligen Gene stellte wildtypähnliche Phänotypen unter verschiedensten Stresskonditionen, die weiter unten diskutiert werden, wieder her. Damit konnte gezeigt werden, dass alle für die Deletionsmutanten beobachteten Phänotypen durch den Verlust des jeweiligen Gens verursacht wurden.

Zur Charakterisierung von NikA existieren zwei publizierte Studien.

In einer Studie von Hagiwara *et al.* wurde neben einem Sporulationsdefekt auch ein deutlich eingeschränktes Wachstum der $\Delta nikA$ -Mutante auf Czapek-Dox (CD) Agar beschrieben (HAGIWARA *et al.*, 2009). Vargas-Pérez *et al.* beschrieben ein mäßig reduziertes radiäres Wachstum auf einem Minimalmedium und zudem einen Vitalitätsverlust von $\Delta nikA$ Konidien nach Lagerung. Schon nach 8 Tagen war eine rapide Abnahme der Konidienvitalität zu verzeichnen (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Für die Charakterisierung von TcsC gibt es ebenfalls zwei Studien.

McCormick *et al.* beschrieben für die $\Delta tcsC$ -Mutante, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, dass sie weder eine Wachstumseinschränkung noch einen Sporulationsdefekt hat oder ihre Konidien auch keinen Verlust der Vitalität aufweisen (MCCORMICK *et al.*, 2012). Eine Studie von Hagiwara *et al.* beschreibt hingegen eine leicht reduzierte Sporulation und die Entstehung abnormer Hyphen für eine $\Delta tcsC$ -Mutante (HAGIWARA *et al.*, 2013).

Da die bisherige Datenlage uneinheitlich war, erfolgte in dieser Arbeit erstmals ein direkter Vergleich der beiden Mutanten. Zunächst wurden sie auf Sabouraud- und auf AMM-Agar wachsen gelassen. Sabouraud enthält Hefeextrakt als komplexen

Bestandteil und stellt somit ein komplexes Medium dar, AMM hingegen ist ein Minimalmedium. Auf beiden Medien zeigten die Deletionsmutanten und die dazugehörigen Wildstämme ein normales, vergleichbares Wachstum. Lediglich die Morphologie der Mutanten unterschied sich von der der Wildstämme. Die Kolonien der $\Delta tcsC$ -Mutante wiesen einen weißen, Konidien-freien Rand auf, der bereits zuvor beschrieben wurde (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013) und der möglicherweise für die durch Hagiwara *et al.* beobachtete geringere Sporulation dieser Mutante verantwortlich ist. Die Morphologie der $\Delta nikA$ -Mutante zeichnete sich nach 72-stündiger Inkubation durch einen fransigen Rand und eine gefurchte Oberfläche der Kolonien aus. Ein Wachstumsdefekt oder eine verminderte Sporulation konnte jedoch weder auf Sabouraud- noch auf AMM-Agar beobachtet werden. Dies steht insbesondere zu der Studie von Hagiwara *et al.*, im Widerspruch in der ein stark eingeschränktes Wachstum der $\Delta nikA$ -Mutante auf CD-Agar, festgestellt wurde. Aufgrund des dort beobachteten Phänotyps der $\Delta nikA$ -Mutante fand auch ein Wachstumsvergleich auf CD-Medium statt, das wie AMM ein Minimalmedium ist. Dort zeigten alle vier Stämme ein beeinträchtigt Wachstum. Die Mutanten bildeten kleine, kompakte und kuppelförmige Kolonien, was einen typischen Stressphänotyp darstellt (MCCORMICK *et al.*, 2012), während die Wildstämme flächige Kolonien mit geringer Myzelmasse bildeten. Dieses Bild ist typisch für ein Wachstum unter Mangelbedingungen, wenn die Hyphen durch ein ausgreifendes Wachstum versuchen neue, nährstoffreichere Gebiete zu erreichen. Diese Daten zeigen, dass CD-Agar sowohl für *A. fumigatus* als auch *A. nidulans* ein Mangelmedium ist. Anders als von Hagiwara *et al.* beschrieben, war in dieser Arbeit der beschriebene Wachstumsdefekt nicht für die $\Delta nikA$ -Mutante charakteristisch, sondern bei allen Stämmen zu verzeichnen.

Um genauer zu verstehen, warum sich das Wachstum auf den Minimalmedien CD und AMM so deutlich voneinander unterscheidet, betrachteten wir die Zusammensetzung der Medien genauer. CD-Agar unterscheidet sich vom AMM-Agar vor allem dahingehend, dass er lediglich Eisen und sonst keine Spurenelemente und eine andere Stickstoffquelle enthält. Beim CD-Agar ist diese Natriumnitrat, beim AMM-Agar das besser verfügbare Ammoniumtartrat. Erst die Supplementierung des CD-Agars mit AMM-Spurenelementen und Ammonium, ließ alle Stämme wieder annähernd normal wachsen und sporulieren. Die $\Delta tcsC$ - und die $\Delta nikA$ -Mutante zeigten im Vergleich zu den Wildtypen, die lediglich ein

für Mangelbedingungen typisches Wachstum zeigten, auf CD-Agar einen deutlichen Stressphänotyp. TcsC und NikA scheinen also, zumindest zu einem gewissen Ausmaß benötigt zu werden, um mit einer schlechten Spurenelement- und Ammoniumversorgung umgehen zu können.

Eine Studie von Vargas-Pérez *et al.* beschrieb weiterhin einen Verlust der Vitalität der Konidien einer bei 4°C gelagerten $\Delta nikA$ -Mutante (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). Für eine $\Delta tcsC$ -Mutante ist ein solcher Verlust nicht beschrieben, wurde bisher aber auch nicht explizit untersucht. Da die Lagerung der Sporen in destilliertem Wasser bei 4°C im Labor Standard ist und ein Vitalitätsverlust Konsequenzen für weitere Versuche mit sich ziehen würde, wurde auch getestet, ob die Vitalität der $\Delta nikA$ - und der $\Delta tcsC$ -Mutante nach einer Lagerung bei 4°C für bis zu 70 Tage erhalten bleibt. Annähernd 100% der Sporen keimten zu allen Zeitpunkten aus, d.h. für keine der beiden Mutanten konnte ein Verlust der Vitalität beobachtet werden.

Wachstum der Gruppe III HHK Deletionsmutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$ unter hyperosmolarem Stress und unter Fludioxonil

Dass Gruppe III HHK und der HOG-Signalweg die adaptive Antwort auf hyperosmolaren Stress und den schädlichen Effekt von antifungalen Stoffen wie Fludioxonil oder Iprodion vermitteln, ist wohletabliert. Für eine *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ -Mutante beschrieb eine vorangegangene Studie eine vollständige Resistenz gegenüber Fludioxonil und eine Wachstumsinhibition unter hyperosmolaren Bedingungen (MCCORMICK *et al.*, 2012). Eine weitere Studie erhob vergleichbare Daten für eine weitere *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ -Mutante (HAGIWARA *et al.*, 2013).

Für eine $\Delta nikA$ -Mutante von *A. nidulans* beschrieben Hagiwara *et al.*, dass sie in Anwesenheit von hyperosmolarem Stress nur zu einem schwachen Wachstum in der Lage war und vollständig resistent gegenüber Fludioxonil (HAGIWARA *et al.*, 2007, HAGIWARA *et al.*, 2009). In einer anderen Studie zeigte eine weitere $\Delta nikA$ -Mutante ebenfalls eine vollständige Resistenz gegenüber Fludioxonil, wies aber nur eine leichte Sensitivität gegenüber hyperosmolarem Stress auf. Die Ergebnisse dieser Studie implizieren, dass NikA bei *A. nidulans*, anders als bei anderen Pilzen, wie zum Beispiel *N. crassa*, eine weniger wichtige Rolle in der Auseinandersetzung

mit hyperosmotischem Stress einzunehmen scheint, was darauf hindeutet, dass hier eine andere Sensorkinase diese Stresssignale an die Reponse Regulatoren SrrA und SskA weiterleitet (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Da es also auch hier eine teilweise uneinheitliche Datenlage gab, wurde in einem direkten Vergleich analysiert, wie stark die Anpassungsreaktion auf Fludioxonil sowie hohen Konzentrationen an Sorbit und NaCl von den beiden untersuchten Gruppe III HHK abhängt.

Auf Platten mit Fludioxonil zeigten beide Deletionsmutanten eine vollständige Resistenz, was mit allen zuvor erhobenen Daten übereinstimmt. TcsC und NikA vermitteln also die Wirkung von Fludioxonil.

In Anwesenheit von hyperosmolarem Stress zeigten beide Mutanten einen deutlichen Stressphänotyp und waren im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen deutlich in ihrem Wachstum eingeschränkt. Bemerkenswerterweise wies die $\Delta tcsC$ -Mutante einen stärkeren Wachstumsdefekt auf als die $\Delta nikA$ -Mutante. Die hier erhobenen Ergebnisse stehen also im Einklang mit den Studien von McCormick *et al.* und Hagiwara *et al.*. Beide Mutanten sind ohne TcsC und NikA nicht zu einer (vollständigen) Anpassung an hyperosmolaren Stress in der Lage. Die publizierten Daten von Vargas-Pérez *et al.* stehen hingegen, zumindest zum Teil, im Widerspruch zu den Beobachtungen dieser Arbeit und der erwähnten Publikationen. Zwar war die erhöhte Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress bei der $\Delta nikA$ -Mutante etwas weniger ausgeprägt als bei der $\Delta tcsC$ -Mutante, sie war aber dennoch deutlich in ihrem Wachstum eingeschränkt. Dies weist also auf eine Funktion von TcsC und NikA in der Anpassung an hyperosmolaren Stress hin.

In von Lew *et al.* publizierten Daten wird beschrieben, dass es bei hyperosmolaren Bedingungen in *N. crassa* zu einer schnell einsetzenden Akkumulation von Ionen aus dem extrazellulären Medium und einer Synthese von Osmolyten kommt (LEW *et al.*, 2006). Die Aktivierung der HOG MAPK führt zur Expression von Genen für die Glycerin-Biosynthese, die schließlich zu einer Anpassung des osmotischen Gradienten führt (LEW, 2010). In den $\Delta tcsC$ - und $\Delta nikA$ -Mutanten kommt es somit wahrscheinlich nicht, oder im Falle von $\Delta nikA$, nur zu einem gewissen Ausmaß, zu der beschriebenen vermehrten Synthese von Glycerin. Eine Regulierung des Wasserhaushalts dieser Hyphen, vor allem derer von $\Delta tcsC$, kommt somit nicht

zustande. Ob dies wirklich so ist, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden, in denen die intrazellulären Glycerin-Konzentration bestimmt werden sollten.

Hagiwara *et al.* beschreiben mit der Expression der normalerweise Konidien-spezifischen Katalase CatA in Fludioxonil-behandelten Hyphen des *A. nidulans* Wildstammes eine weitere interessante Beobachtung. Für Hyphen einer $\Delta nikA$ -Mutante galt dies jedoch nicht (HAGIWARA *et al.*, 2007). Dass bei der $\Delta nikA$ -Mutante keine erhöhte Expression von CatA auszumachen war, deutet darauf hin, dass NikA für die Expression von CatA benötigt wird. Vermutlich kommt es auch zu keiner vermehrten Bildung von CatB und anderer wichtiger Entgiftungsenzyme. Diese Beobachtungen implizieren, dass Fludioxonil zu einem inneren oxidativen Stress führt, worauf in einem späteren Teil dieser Arbeit noch weiter eingegangen werden wird.

Wachstum der Gruppe III HHK Deletionsmutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$ unter Zellwandstress

Die Zellwand der Pilze schützt sie vor mechanischem sowie physikalisch-chemischem Stress und spielt eine große Rolle beim pilzlichen Wachstum. Die Aspergillus Zellwand besteht hauptsächlich aus den drei Polysacchariden β -1,3/1,6-Glukan, Chitin und Galaktomannan (LATGÉ *et al.*, 2005).

Kongorot und Calcofluor Weiß sind Zellwandstressoren, die an das Chitin der Zellwand binden, somit Stress auslösen und den Zellwand-Integritäts-Signalweg aktivieren.

Das Wachstum der Gruppe III HHK-Deletionsmutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nikA$ unter Zellwandstress war deutlich unterschiedlich.

In Versuchen mit Platten, die entweder Kongorot oder Calcofluor Weiß enthielten, zeigte sich eine im Vergleich zum Wildstamm erhöhte Widerstandsfähigkeit der $\Delta tcsC$ -Mutante, wohingegen die $\Delta nikA$ -Mutante und der *A. nidulans* Wildstamm ähnliche Resistenzausprägungen aufwiesen. Der Verlust der Gruppe III HHK TcsC in *A. fumigatus* hat somit positive Auswirkungen auf die Auseinandersetzung mit dem durch die Stressoren induzierten Zellwandstress. *A. nidulans* hingegen scheint generell eine höhere Resistenz gegenüber Zellwandstress aufzuweisen als *A. fumigatus*. Es gibt also deutliche Unterschiede zwischen den beiden Wildtyp-

Stämmen.

Die $\Delta tcsC$ -Mutante weist mit ihrer erhöhten Resistenz gegenüber Zellwandstressoren wie Kongorot und Calcofluor Weiß ein auffälliges Merkmal auf (MCCORMICK *et al.*, 2012, HAGIWARA *et al.*, 2013). Dies könnte auf veränderte Zellwandeigenschaften dieser Mutante hindeuten wodurch es zu einer anderen Interaktion zwischen dem eingesetzten Stressor und der Zielstruktur in der Zellwand kommt. Hinweise dafür lieferte eine Studie, die tatsächlich eine leicht reduzierte Zellwanddicke für eine $\Delta tcsC$ -Mutante nachwies (HAGIWARA *et al.*, 2013). Aufgrund anderer Zellwandeigenschaften binden Zellwandstressoren möglicherweise anders oder weniger gut an das Chitin der $\Delta tcsC$ -Mutante. Für eine solche Erklärung spricht ebenfalls, dass alle Stämme außer der $\Delta tcsC$ -Mutante auf Platten, die Kongorot enthielten, einen roten Ring um die Kolonien aufwiesen. In der Peripherie der Kolonien befinden sich die Spitzen der Hyphen, also neu gebildete Pilzstrukturen, die sich durch das Wachstum in ständigen Umbauprozessen befinden. Man könnte daher annehmen, dass Kongorot vor allem auf Hyphenspitzen wirkt. Der fehlende rote Rand der Kolonien der $\Delta tcsC$ -Mutante impliziert, dass Kongorot in deren Peripherie schlechter bindet, was für eine reduzierte Interaktion zwischen den Hyphenspitzen der $\Delta tcsC$ -Mutante und Kongorot sprechen könnte.

Eine andere Erklärung für die verstärkte Resistenz der $\Delta tcsC$ -Mutante könnte ein anderer Ablauf der Signaltransduktion sein. Käme TcsC hier die Aufgabe eines Signalmoleküls zu, bliebe die Übertragung an die Pilzzelle aus und es wäre für diese gar kein Zellwandstress vorhanden.

Um den Vorgängen genauer auf den Grund zu gehen, bedarf es an dieser Stelle weiterer Untersuchungen.

Zellwandveränderungen durch Fludioxonil

Bei der mikroskopischen Analyse von Fludioxonil-behandelten Keimschläuchen zeigte sich in dieser Arbeit, dass sowohl der *A. fumigatus* als auch der *A. nidulans* Wildstamm mit einem Wachstumsstopp und massivem Anschwellen, das anschließend zur Lyse dieser Pilzelemente führte, reagierten. Wie zuvor schon für *A. fumigatus* berichtet (WIEDEMANN *et al.*, 2016), enthielten die angeschwollenen Zellen beider Wildtyp-Stämme ungewöhnlich viele Zellkerne

und lagerten vermehrt Chitin in ihre Zellwand ein, was sich durch eine Färbung mit Calcofluor Weiß zeigen ließ. Beide Mutanten waren resistent gegenüber Fludioxonil und wiesen keinen dieser Phänotypen auf. Die Beobachtungen für *A. fumigatus* ließen sich also auch auf *A. nidulans* übertragen.

Neben Chitin enthält die pilzliche Zellwand zudem β -1,3-Glukan. Galaktomannan ist ein weiterer wichtiger Zellwandbestandteil, der bei *Aspergillus* spp. und einigen anderen Pilzen vorkommt. Es setzt sich aus α -1,2/1,6-Mannan und kurzen β -1,5-Galaktofuranose-Seitenketten zusammen (LATGÉ *et al.*, 1994). Während des Wachstums von *Aspergillus* wird Galaktomannan z. T. freigesetzt und kann in einer Bronchoalveolären Lavage, Blut und Liquor nachgewiesen werden. Somit spielt der Nachweis dieses Zellwandbestandteils in der serologischen Diagnostik von *Aspergillus*-Infektionen eine wichtige Rolle (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

In einer vorangegangenen Arbeit wurde für *A. fumigatus* beobachtet, dass es zu strukturellen Veränderungen der Zellwand unter Fludioxonileinfluss kommt. Neben einer verstärkten Einlagerung von Chitin kam es zu einer vermehrten Abgabe von Galaktomannan (WIEDEMANN *et al.*, 2016).

Um vermeintlichen Unterschieden der Zellwanddynamiken von *A. fumigatus* und *A. nidulans* auf den Grund zu gehen, erfolgte ein mikroskopischer Vergleich der mit zwei unterschiedlichen Zellwandantikörpern gefärbten Stämme. Ein auffälliger Unterschied in der Reaktion auf Fludioxonil der *A. fumigatus* und *A. nidulans* Wildstämme zeigte sich bei der Immunfluoreszenz mit Antikörpern, die die Zellwandbestandteile Galaktomannan und β -1,3/ β -1,6-Glukan erkennen. Wie in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben, löst Fludioxonil in *A. fumigatus* sowohl bei Hyphen und Keimlingen als auch bei Konidien eine massive Freisetzung des Galaktomannans aus, was zu einer schwachen und gesprenkelten Immunfluoreszenz-Färbung führt (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Auch in dieser Arbeit wurde eine stark reduzierte Färbung Fludioxonil-behandelter Keimschläuche und Konidien von *A. fumigatus* für Galaktomannan, aber auch für β -1,3/ β -1,6-Glukane beobachtet. Es zeigte sich nur ein gepunktetes Muster auf den Hyphen und Konidien und rund um die Zellen waren Galaktomannan-positive Halo-Bereiche zu sehen. Im Gegensatz dazu behielt *A. nidulans* in beiden Fällen trotz Fludioxonil-Behandlung eine starke und homogene Färbung bei. Dies zeigt einen Hauptunterschied der Fludioxonil-bedingten Zellwandveränderungen bei *A. fumigatus* und *A. nidulans*. Die Analyse mehrerer anderer *A. fumigatus*-

(ATCC46645, D141, AF293) und eines weiteren *A. nidulans*-Stammes (A187) sowie von Stämmen der *Aspergillus* Spezies *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. giganteus* und *A. clavatus* deutet darauf hin, dass das für *A. fumigatus* beobachtete Muster für die gesamte Gattung repräsentativ ist, während die für *A. nidulans* gemachten Beobachtungen einzigartig zu sein scheinen.

Ist ein Pilz Zellwandstress ausgesetzt, bildet er kompensatorisch vermehrt Chitin, um die Integrität der Zellwand zu erhalten. Dies konnte in einer Studie für *S. cerevisiae*, aber auch für *A. niger* sowie *Fusarium oxysporum* und *Penicillium chrysogenum* nachgewiesen werden. Das erhöhte Chitinlevel in der Zellwand ging in *A. niger* mit einer erhöhten Transkription von *gfaA* einher, welches für die Glutamin-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase codiert, das Enzym, das die Chitinsynthese auslöst. Caspofungin inhibiert die β -1,3-Glukan Synthase und führt ebenfalls zu einer gesteigerten Expression von *gfaA* und somit einem kompensatorischen Anstieg des Chitins. Diese Beobachtungen implizieren, dass Zellwandstress bei Pilzen im Allgemeinen zu einer Aktivierung der Chitin-Biosynthese führt (RAM *et al.*, 2004).

In einer Studie von Dichtl *et. al* wurde eine *A. fumigatus* β -1,3-Glukan Synthase Mutante ($\Delta fks1$) generiert, die kein β -1,3-Glukan bilden kann. In dieser zellwandgeschwächten Mutante kommt es stattdessen zu einer kompensatorischen Einlagerung von Chitin, die mit einer massiven Freisetzung von Galaktomannan einhergeht (DICHTL *et al.*, 2015). β -1,3-Glukan und Galaktomannan scheinen also miteinander assoziiert zu sein. Bei Nichtvorhandensein oder der Freisetzung von β -1,3-Glukan scheint die Zellwand auch Galaktomannan nicht richtig binden zu können und setzt dieses ebenfalls frei.

Der Phänotyp, der sich bei Inaktivität von Fks1 zeigt, ähnelt hierbei also stark dem des Fludioxonileffekts. Es ist anzunehmen, dass Fludioxonil zunächst eine Freisetzung von β -1,3-Glukan auslöst, welche die Freisetzung von Galaktomannan und die verstärkte Einlagerung von Chitin nach sich zieht.

Die pilzliche Zellwand ist ein dreidimensionales Netzwerk, in dem die einzelnen Bestandteile über kovalente Bindungen miteinander verbunden sind. Das β -1,3-Glukan bildet dabei das Grundgerüst der Zellwand aus einem verzweigten Geflecht aus langen Ketten und Seitenketten. Es ist kovalent an das Chitin und das Galaktomannan gebunden. Galaktomannan ist im Vergleich zum β -1,3-Glukan eher

kurz, mit ebenfalls kurzen Seitenketten und kommt in vielen Pilzspezies gar nicht vor (GOW *et al.*, 2017).

Die Beobachtung, dass es zu einem Verlust von Galaktomannan kommt, wenn die Zellwand kein β -1,3-Glukan enthält, lässt vermuten, dass dieses mit dem β -1,3-Glukan verbunden ist. Ist dieses jedoch nicht vorhanden, kann das Galaktomannan keine kovalente Bindung eingehen, hat somit keinen richtigen Halt in der Zellwand und wird freigesetzt. Die Vermutung, dass die beobachteten Veränderungen primär auf dem Verlust von β -1,3-Glukan basieren und die Freisetzung von Galaktomannan sekundär folgt, liegt also nahe.

Der HOG- und der Zellwand-Integritäts-Signalweg, welcher Zellwanddynamiken auslöst und kontrolliert, sind in *A. fumigatus* funktionell verbunden (BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016). Die aktuell erhobenen Daten deuten darauf hin, dass TcsC und der HOG-Signalweg möglicherweise enger mit dem Zellwand-Integritätsweg kommunizieren und verbunden sind, als es bei *A. nidulans* der Fall ist.

Wachstum der Gruppe III HHK Deletionsmutanten $\Delta tcsC$ und $\Delta nika$ unter oxidativem Stress

In früheren Studien wurde gezeigt, dass der HOG-Signalweg auch bei der Anpassung an oxidativen Stress benötigt wird. In verschiedenen Pilzen konnte dabei Skn7 eine besondere Bedeutung in diesem Prozess zugeschrieben werden (FASSLER *et al.*, 2011). Unklar ist jedoch, welche Sensorproteine in diesen Vorgang involviert sind.

In Studien, die die Rolle der Gruppe III HHK in *A. fumigatus* und *A. nidulans* untersuchten, spielten drei Verbindungen eine Rolle, die oxidativen Stress auslösen können: H_2O_2 , t-BOOH und Menadion.

Eine Studie von Vargas-Pérez *et al.* beschrieb die Resistenz einer $\Delta nika$ -Mutante von *A. nidulans* gegenüber H_2O_2 in einer Konzentration von bis zu 4 mM und gegenüber 0,5 mM t-BOOH. Die Mutante zeigte nur ein leicht reduziertes Wachstum, mit 4 mM H_2O_2 wurde jedoch auch eine sehr hohe Konzentration verwendet (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). In einer anderen Studie wird ebenfalls erläutert, dass Nika in Gegenwart von oxidativem Stress entbehrlich ist

(FURUKAWA *et al.*, 2005).

Für die $\Delta tcsC$ -Mutante wurde zuvor von McCormick *et al.* beschrieben, dass sie keine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress in Form von H_2O_2 und t-BOOH aufweist (MCCORMICK *et al.*, 2012). Eine andere Studie deutete ebenfalls auf keine besondere Aufgabe von TcsC bei Exposition gegenüber oxidativem Stress hin. Eine $\Delta tcsC$ -Mutante zeigte in Anwesenheit von H_2O_2 kein reduziertes Wachstum im Vergleich zum *A. fumigatus* Wildstamm. In dieser Studie wurde ebenfalls der Effekt durch Menadion betrachtet. Auch hier zeigte sich im Vergleich zum *A. fumigatus* Wildstamm kein Phänotyp der $\Delta tcsC$ -Mutante (HAGIWARA *et al.*, 2013).

Aufgrund der Beobachtungen erfolgte auch in dieser Arbeit eine Analyse des Effekts von oxidativem Stress auf *A. fumigatus* und *A. nidulans* und die Gruppe III HHK-Deletionsmutanten, wobei ebenfalls die drei in den vorangegangenen Studien verwendeten Substanzen eingesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass NikA und TcsC für ein Wachstum in Gegenwart von H_2O_2 oder t-BOOH benötigt werden, in Anwesenheit von Menadion allerdings verzichtbar sind. Menadion ist für die Entstehung von Superoxid-Radikalen verantwortlich, induziert also die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bemerkenswert ist auch die Beobachtung, dass sowohl der Wildstamm von *A. nidulans* als auch die $\Delta nika$ -Mutante deutlich resistenter gegenüber oxidativem Stress waren, als die jeweiligen *A. fumigatus* Stämme. Es scheint in *A. nidulans* somit zu einer effektiveren Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies zu kommen als in *A. fumigatus*.

Die beobachteten Effekte in Anwesenheit von H_2O_2 und t-BOOH decken sich also zum Teil mit den von Vargas-Pérez *et al.* erhobenen Daten, wobei sich $\Delta nika$ dort deutlich resistenter als in der vorliegenden Arbeit zeigt. Die $\Delta nika$ - und auch die $\Delta tcsC$ -Mutante zeigten sich etwas sensitiver als ihre dazugehörigen Wildstämme, waren allerdings nicht so stark eingeschränkt wie beispielsweise unter hyperosmotischem Stress. Dem HOG-Signalweg mit NikA und TcsC scheint hier also zumindest eine Teilaufgabe bei der Wahrnehmung und Auseinandersetzung mit oxidativem Stress durch H_2O_2 oder t-BOOH zuzukommen. Dennoch waren beide Mutanten in der Lage zu wachsen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Stressreaktion hier nicht nur über die Gruppe III HHK erfolgt und wahrscheinlich noch andere Sensorproteine an diesem Vorgang beteiligt sind, da Skn7/SrrA eine deutlich wichtigere Aufgabe bei oxidativem Stress zukommt als

TcsC/NikA (LAMARRE *et al.*, 2007). Eine genauere Betrachtung von Skn7 erfolgte im zweiten Teil der Arbeit und wird an späterer Stelle diskutiert werden.

Menadion wurde zuvor nur von Hagiwara *et al.* getestet und für eine $\Delta tcsC$ -Mutante ergab sich dort kein Phänotyp, was auch die hier erfolgten Versuche ergaben.

H₂O₂ und das von Menadion induzierte Superoxidradikal sind unterschiedliche reaktive Sauerstoffspezies, deren Eliminierung durch ebenfalls unterschiedliche Entgiftungsenzyme erfolgt. Die Resistenz gegenüber H₂O₂ wird meist über Katalasen vermittelt. In *Aspergillus* werden die Katalasen CatB und CatA bei oxidativem Stress gebildet und führen zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies. CatB tritt in der Zellwand auf und ist Hyphen-spezifisch, CatA kommt hingegen intrazellulär im Zytoplasma vor und ist normalerweise Konidien-spezifisch (KAWASAKI *et al.*, 1997). Da auch t-BOOH zu H₂O₂ zerfällt, werden zur Eliminierung dieser beiden oxidativen Verbindungen Katalasen benötigt. Superoxid-Radikale, deren Bildung durch Menadion induziert wird, werden dagegen von der Superoxid-Dismutase abgebaut.

Die unterschiedlichen Phänotypen der Deletionsmutanten kommen also sehr wahrscheinlich dadurch zustande, dass der $\Delta tcsC$ - und der $\Delta nikA$ -Mutante Katalasen zum Abbau von H₂O₂ fehlen. TcsC und NikA scheinen also in die Bildung von Katalasen involviert und das eingeschränkte Wachstum der Deletionsmutanten lässt sich hier höchstwahrscheinlich durch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, die in hohen Konzentrationen zu schweren Zellschäden führen, erklären.

Die Bedeutung von Katalasen wird an einer späteren Stelle auch noch im Zusammenhang mit Fludioxonil erläutert werden.

Die Syntanie von *tcsC* und *nikA* und der Ausschluss ihres Einflusses auf die unterschiedlichen Phänotypen von *A. fumigatus* und *A. nidulans*

Um eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede der beiden *Aspergillus* Stämme zu finden, erfolgte ein Vergleich der Syntanie von *tcsC* und *nikA* mit Hilfe der Genomsequenzen, die auf AspGD (*Aspergillus* Genome Database, <http://aspgd.org/>) abrufbar sind. Im Allgemeinen ist die Umgebung der Gene *tcsC*, *nikA* und deren Homologe in anderen *Aspergillus* spp. gut konserviert. Der *A.*

fumigatus Stamm AF293 (von dem die Genomsequenz stammt) und der *A. nidulans* Stamm A26 unterscheiden sich jedoch jeweils in einem ihrer flankierenden Gene von anderen Stämmen. Das downstream von *nikA* liegende Gen ist ausschließlich in *A. nidulans* Stamm FGSC A4 vorzufinden, wohingegen Stamm AF293 ein nicht charakterisiertes, offenes Leseraster mit Homologien zu Transposonsequenzen (Afu2g03570) im upstream Bereich von *tcsC* beherbergt, welches in *A. fumigatus* Stamm A1163 und vielen weiteren Aspergilli nicht vorkommt. Mit Hilfe einer PCR konnte Afu2g03570 auch im Stamm AfS35, der in dieser Studie verwendet wurde, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Unterschiede könnten einen Effekt auf die Phänotypen der Deletionsmutanten haben. Um dies auszuschließen, erfolgte neben der Komplementation der $\Delta nikA$ -Mutante mit *nikA* auch ihre Kreuzkomplementation mit *tcsC* und die Charakterisierung der beiden generierten Stämme und somit eine genauere Betrachtung der Rolle der Gene. Die Einbringung der beiden Gene, deren Expression in beiden Fällen durch den gleichen Promoter erfolgte, stellte die für den *A. nidulans* Wildstamm charakteristischen Phänotypen unter verschiedensten Stresskonditionen wie CD-Agar, Fludioxonil, hyperosmolarem Stress und oxidativem Stress wieder her. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss der Syntänie auf die Phänotypen der Gruppe III HHK-Mutanten, die in dieser Arbeit analysiert wurden und dafür, dass die Unterschiede von *A. fumigatus* und *A. nidulans* nicht durch die Gruppe III HHK *tcsC* und *nikA* zustande kommen, sondern durch deren Einbettung in ein unterschiedliches Signalnetzwerk.

2. Vergleich der Mutanten des HOG-Signalwegs in *Aspergillus fumigatus*

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte eine genauere Analyse der TcsC nachgeschalteten Proteine des HOG-Signalwegs. Dieser verzweigt sich auf Höhe der *Response Regulatoren* Ssk1 und Skn7 zu zwei Ästen, wobei Ssk1 noch ein MAPK Modul mit Saka als MAPK nachgeschaltet ist. Um die jeweiligen Aufgaben der Proteine zu charakterisieren, musste ein Vergleich der jeweiligen Deletionsmutanten untereinander und mit dem *A. fumigatus* Wildstamm erfolgen. Zu Beginn dieser Arbeit standen bereits zwei Deletionsmutanten zur Verfügung: $\Delta ssk1$ und $\Delta saka$. Im Zuge dieser Arbeit wurden eine $\Delta skn7$ -Mutante und eine

$\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante generiert. Alle Stämme waren vital und in der Lage normal zu wachsen, also keines der Gene essentiell für die Überlebensfähigkeit des Pilzes.

Des Weiteren erfolgte zum Ausschluss polarer Effekte, die durch Gendelektionen zustande kommen und einen Einfluss auf Phänotypen haben können, eine Komplementation der $\Delta sakA$ - und der $\Delta skn7$ -Mutante mit den jeweiligen Genen. Diese stellten die für den Wildstamm typischen Phänotypen unter verschiedensten Stressbedingungen, die weiter unten diskutiert werden, wieder her. So konnte gezeigt werden, dass alle für die Deletionsmutanten beobachteten Phänotypen durch den Verlust des jeweiligen Gens verursacht wurden.

Wachstum der HOG-Mutanten unter hyperosmolarem Stress

Der HOG-Signalweg wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und ist dort sehr gut erforscht. Das Protein HOG1 in *S. cerevisiae*, welches in *A. fumigatus* SakA entspricht, induziert die durch Glycerinproduktion vermittelte Anpassung des osmotischen Innendrucks an eine hyperosmolare Umgebung (HOHMANN, 2002).

Für *A. nidulans* wurden zuvor widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. In einer Studie wurde beschrieben, dass beide *Response Regulator*-Mutanten ($\Delta sskA$ und $\Delta srrA$) in Anwesenheit von 0,8 M KCl und 1 M Sorbit lediglich leicht in ihrem Wachstum eingeschränkt waren (HAGIWARA *et al.*, 2007).

In einer anderen war eine $\Delta sskA$ -Mutante (entspricht $\Delta ssk1$ in *A. fumigatus*) dagegen hoch sensitiv gegenüber 1,2 M Sorbit, in Anwesenheit von 0,6 M NaCl jedoch etwas weniger empfindlich (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). Eine $\Delta srrA\Delta sskA$ -Doppelmutante erwies sich als noch empfindlicher gegenüber hyperosmolarem Stress als die $\Delta sskA$ -Mutante, eine $\Delta nikA$ -Mutante hingegen wies nur eine Teil- oder gar keine Sensitivität gegenüber hyperosmolarem Stress auf und wuchs unerwartet besser als die $\Delta srrA\Delta sskA$ -Doppelmutante. Auch eine $\Delta sakA$ -Mutante war weniger empfindlich als $\Delta sskA$ (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Nach den bisher für *A. nidulans* und *S. cerevisiae* publizierten Daten wird die Anpassung an eine hyperosmotische Umgebung also durch die Ssk1- und SakA-homologen Proteine vermittelt.

Eine frühere Studie von McCormick *et al.* beschrieb eine vollständige

Wachstumshemmung einer *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ -Mutante unter hyperosmolaren Bedingungen (MCCORMICK *et al.*, 2012). Hagiwara *et al.* beobachteten eine Wachstumseinschränkung auch für eine $\Delta ssk1$ - und eine $\Delta saka$ -Mutante, jedoch nicht zu dem Ausmaß, wie es für eine $\Delta tcsC$ -Mutante verzeichnet wurde (HAGIWARA *et al.*, 2013).

Aufgrund der unterschiedlichen Beobachtungen vorangegangener Arbeiten, erfolgte in dieser Arbeit ebenfalls eine Betrachtung der HOG-Mutanten von *A. fumigatus* unter hyperosmolarem Stress. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Ssk1-/SakA-Hauptast des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus* während des Wachstums in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen wichtig ist (1 M NaCl oder KCl), jedoch in Anwesenheit von 2 M Sorbit entbehrlich ist, was in den bisherigen Studien so nicht beschrieben wurde. Da Salze in wässriger Lösung dissoziieren entsprechen sich die osmotischen Teilchenzahlen von 1 M NaCl und 2 M Sorbit. Da beide Mutanten in Anwesenheit von Sorbit ähnlich gut wuchsen wie der Wildstamm, scheint in *A. fumigatus* die Antwort auf hyperosmotischen Stress nicht immer abhängig von SakA zu sein. Die $\Delta skn7$ -Mutante wuchs unbeeindruckt von hyperosmolarem Stress. Skn7 spielt bei der physiologischen Anpassung an hyperosmolare Bedingungen also keine Rolle. Die $\Delta tcsC$ Mutante erwies sich als hoch sensitiv gegenüber hohen Sorbit- und Salzkonzentrationen. Für die adaptive Antwort auf Stress durch hohe Salzkonzentrationen sind in *A. fumigatus* also TcsC und der Ssk1/ SakA-Hauptast des HOG-Signalwegs entscheidend, während TcsC das einzige der untersuchten Proteine des HOG-Signalwegs ist, das für ein Wachstum in Anwesenheit von hohen Sorbit- oder Glycerin-Konzentrationen eindeutig benötigt wird. Dies steht im Einklang mit den von McCormick *et al.* (2012) und Hagiwara *et al.* (2013) publizierten Daten. Die $\Delta skn7\Delta saka$ -Doppelmutante zeigt einen mit $\Delta tcsC$ vergleichbaren Phänotyp, das heißt erst die Ausschaltung beider Arme des HOG-Signalwegs kann eine Anpassung an hyperosmolaren Stress verhindern. Skn7 und SakA sind also individuell in der Lage eine Adaptation an hohe Sorbitkonzentrationen auszulösen, spielen also gleichermaßen eine Rolle in der Anpassung von *A. fumigatus* an hyperosmolare Bedingungen.

Auch die Einzelmutanten der *Response Regulatoren* in *A. nidulans* und *A. fumigatus* unterscheiden sich deutlich voneinander. Während in *A. nidulans* vor allem der $\Delta sskA$ -Mutante Wachstumseinschränkungen in Anwesenheit von

hyperosmolarem Stress aufwies (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007), zeigte sich dies bei den *A. fumigatus* Mutanten nur bei Stress durch hohe Salzkonzentrationen. Diese Beobachtung unterscheidet sich auch von den von Hagiwara *et al.* (2013) beobachteten Phänotypen. Dort waren die $\Delta ssk1$ - und die $\Delta sakA$ -Mutante zwar nicht so stark wie die $\Delta tcsC$ -Mutante in ihrem Wachstum eingeschränkt, zeigten jedoch sowohl bei Stress durch NaCl als auch durch Sorbit eine erhöhte Sensitivität, die in dieser Arbeit in Anwesenheit von Sorbit nicht zu verzeichnen war.

Bei *N. crassa* kommt es durch eine hyperosmolare Umgebung zunächst zu einem, vermutlich von der MAPK-Kaskade unabhängigen, Einstrom von Ionen aus dem extrazellulären Raum und etwas später zu einer Expression von Genen für die Biosynthese von Glycerin und anderer Osmolyten. So kommt es schließlich zu einer Anpassung des inneren osmotischen Drucks (LEW *et al.*, 2006, LEW, 2010).

Da sich die $\Delta tcsC$ -Mutante nicht an Stress durch Sorbit anpassen kann, kommt es in ihr also wahrscheinlich nicht zu der beschriebenen vermehrten Synthese von Glycerin. Eine Regulierung des Wasserhaushalts kommt somit nicht zustande. Die $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutanten sind hingegen in der Lage Glycerin zu synthetisieren, die $\Delta skn7$ -Mutante sogar in ähnlichem Ausmaß wie der Wildtyp. Erst die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante ist, wie die $\Delta tcsC$ -Mutante nicht mehr zu einer ausreichenden Biosynthese von Glycerin in der Lage.

Durch hohe Salzkonzentration wurden alle Deletionsmutanten stark in ihrem Wachstum eingeschränkt. Lediglich die $\Delta skn7$ -Mutante wuchs ähnlich gut wie der *A. fumigatus* Wildstamm. Da sich die $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutanten gut an hyperosmolaren Stress in Form von Sorbit oder Glycerin anpassen konnten, hier jedoch kaum in der Lage waren zu wachsen, liegt die Vermutung nahe, dass hier keine Anpassung durch die Synthese von Glycerin erfolgen muss, sondern andere Anpassungsreaktionen vonnöten sind. Auch möglich wäre, dass eine Glycerin-Synthese zwar wichtig ist, aber durch beide *Response Regulatoren* ausgelöst werden kann, hier aber noch ein zusätzlicher Stress durch die Wirkung der hohen Ionenkonzentration auftritt. Die Zahl der osmotisch wirksamen Teilchen bei 1 M NaCl entspricht der bei 2 M Sorbitol. Dies spricht dafür, dass der beobachtete Effekt bei hohen Salzkonzentrationen also vermutlich eher durch die Wirkung der hohen Ionenkonzentration, nicht aber der osmotischen Teilchen zustande kommt. Die Ionen stellen eine andere Form von Stress, zusätzlich zum hyperosmolaren dar und spielen hier möglicherweise eine Rolle bei verschiedenen Transportprozessen im

Pilz. Die genaue Ergründung der Vorgänge bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Wachstum der HOG-Mutanten unter oxidativem Stress

Im Wirt führen während des Oxidativen Burst von Phagozyten gebildete reaktive Sauerstoffspezies zu einer effektiven Eliminierung von *A. fumigatus* (PHILIPPE *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass der HOG-Signalweg auch hier eine Rolle spielt und für die Anpassung an oxidativen Stress benötigt wird, wobei in verschiedenen Pilzen Skn7 eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird (FASSLER *et al.*, 2011).

Lamarre *et al.* beobachteten für eine $\Delta skn7$ -Mutante von *A. fumigatus* eine deutlich stärkere Sensitivität gegenüber H_2O_2 und t-BOOH als für den Wildstamm, in Anwesenheit des Superoxid-Anion bildenden Menadions zeigten beide Stämme dagegen eine ähnliche Resistenz (LAMARRE *et al.*, 2007). In einer Studie von Hagiwara *et al.* zeigte sich keine Wachstumseinschränkung für eine $\Delta tcsC$ -, $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutante in Anwesenheit H_2O_2 oder Menadion im Vergleich zum *A. fumigatus* Wildstamm (HAGIWARA *et al.*, 2013).

Ein ähnliches Muster ergab sich auch in einer Studie von Vargas-Pérez *et al.* bei einer $\Delta srrA$ -Mutante in *A. nidulans*. SrrA stellt den in *A. nidulans* homologen *Response Regulator* zu Skn7 in *A. fumigatus* dar. In der erwähnten Studie führte H_2O_2 zu einer hohen Catalase B (CatB) Aktivität in Hyphen des *A. nidulans* Wildstammes. Diese Induktion von CatB durch H_2O_2 war stark abhängig von SrrA und deutlich weniger abhängig von Saka (VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). Hagiwara *et al.* beschrieben dagegen für eine $\Delta sskA$ - und eine $\Delta srrA$ -Mutante in *A. nidulans* eine Hypersensitivität von gegenüber H_2O_2 und eine stark beeinträchtigte Expression des CatB Gens (HAGIWARA *et al.*, 2007).

Für zu Skn7 homologe *Response Regulator*-Mutanten von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. neoformans* wurden ebenso ähnliche Ergebnisse festgehalten (SINGH *et al.*, 2004, WORMLEY *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit generierte $\Delta skn7$ -Mutante zeigte sich, in Übereinstimmung mit den publizierten Daten, als hoch sensitiv gegenüber H_2O_2 . Eine Konzentration von 1 mM genügte bereits, um ihr Wachstum vollständig zu verhindern, wohingegen der Hauptast des HOG-Signalwegs, bestehend aus Ssk1 und Saka erst bei einer Konzentration von 2 mM relevant wurde. Die Rolle von Skn7 als Hauptakteur bei

der adaptiven Antwort auf durch H_2O_2 verursachten oxidativen Stress stimmt somit gut mit vorherigen Daten aus *A. fumigatus* (LAMARRE *et al.*, 2007) und anderen Pilzen (FASSLER *et al.*, 2011) überein. Der *A. fumigatus* Wildstamm war auch bei hohen H_2O_2 - und t-BOOH-Konzentrationen noch in der Lage zu wachsen, wenn auch mit Wachstumseinschränkung. Die ΔtcsC -Mutante wuchs zwar auch, aber zeigte eine sehr deutliche Wachstumseinschränkung. TcsC ist also, wie bereits im ersten Teil beschrieben, zu einem geringen Teil in die Antwort auf oxidativen Stress durch H_2O_2 oder t-BOOH einbezogen. Die von uns generierte $\Delta\text{skn7}\Delta\text{sakA}$ -Doppelmutante war hingegen nicht in der Lage, in Anwesenheit von oxidativem Stress zu wachsen. Die Ausschaltung des Skn7-Nebenastes führt also zum vollständigen Verlust der Anpassungsfähigkeit an oxidativen Stress durch H_2O_2 und t-BOOH und spricht für eine große Rolle von Skn7 bei der Resistenz gegenüber diesen reaktiven Sauerstoffspezies.

Gegenüber Menadion, einem Stoff, der Superoxid-Radikale bildet, zeigte die Δskn7 -Mutante eine mit dem Wildstamm vergleichbare Resistenz. Diese Beobachtung stimmt mit den oben erwähnten Studien von Lamarre *et al.* und Hagiwara *et al.* über *A. fumigatus* überein.

Steigen die reaktiven Sauerstoffspezies außerhalb der Pilzzelle über ein bestimmtes Level, beginnen die Zellen mit einer Neusynthese antioxidativer Proteine (WORMLEY *et al.*, 2005).

In *S. cerevisiae* induziert SKN7 als Antwort auf oxidativen Stress die Expression von Genen, die für Enzyme wie Katalasen, Superoxid-Dismutasen (SOD), Thioredoxin (TRX), Thioredoxin-Reduktasen (TRR) und -Peroxygenasen und Glutathion-Reduktasen (GLR) codieren, die zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies wie H_2O_2 führen (MORGAN *et al.*, 1997, LEE *et al.*, 1999, MOYE-ROWLEY, 2003). In anderen Studien wurde beschrieben, dass die Bildung entgiftender Enzyme, wie beispielsweise von Superoxid-Dismutasen und Katalasen, in einer ΔSKN7 -Mutante von *S. cerevisiae* ausbleibt (MORGAN *et al.*, 1997, LEE *et al.*, 1999). Vargas-Pérez *et al.* und Hagiwara *et al.* berichteten für *A. nidulans* ebenfalls von einer fehlenden Expression der Katalasen CatA und CatB in ΔsrrA -Mutanten (HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007).

Die hier verwendete Δskn7 -Mutante ist also vermutlich ebenfalls nicht in der Lage, die für die Entgiftung von H_2O_2 und t-BOOH benötigten Katalasen verstärkt zu

bilden, weshalb es zu keiner Entgiftung dieser reaktiven Sauerstoffspezies kommt. Menadion bildet Superoxid-Radikale, die vor allem durch die Superoxid-Dismutase entgiftet werden. Skn7 scheint somit in *A. fumigatus* vor allem die Aufgabe zuzukommen, die Expression von Katalase-Genen zu induzieren, während die Bildung von Superoxid-Dismutasen unabhängig von Skn7 zu sein scheint.

Die akkumulierten reaktiven Sauerstoffspezies führen schließlich zu Zellschäden, die bei einer $\Delta skn7$ -Mutante ein Wachstum vollständig verhindern.

Wachstum der HOG-Mutanten unter Zellwandstress

Die Zellwandstressoren Kongorot und Calcofluor Weiß binden an das Chitin der Zellwand und lösen somit Stress über den Zellwand-Integritäts-Signalweg aus. In der Hefe *S. cerevisiae* übernimmt Skn7 die Regulation der Zellwandsynthese und den Erhalt der Zellwandintegrität (LI *et al.*, 2002). HOG1, welches SakA in *A. fumigatus* entspricht, wird, wie eine Studie zeigte, für die Wirkung von Calcofluor Weiß benötigt. Das Ausschalten von Genen eines Armes des HOG-Signalwegs in *S. cerevisiae* führt zu Teilresistenzen gegenüber Calcofluor Weiß. Eine vollständige Resistenz tritt erst ein, wenn beide Wege des Signalwegs unterbrochen werden (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 2000).

Im ersten Teil dieser Arbeit zeigte sich die $\Delta tcsC$ -Mutante deutlich resistent gegenüber den Zellwandstressoren Kongorot und Calcofluor Weiß. Dies stellt ein charakteristisches Merkmal der Mutante dar. Um die Aufgaben der nachgeschalteten Proteine des HOG-Signalwegs zu analysieren, erfolgte auch ein direkter Vergleich derer mit $\Delta tcsC$ und dem *A. fumigatus* Wildstamm.

Es zeigte sich, dass das Wachstum unter Zellwandstress, verglichen mit den zuvor getesteten Stressoren, einen Sonderfall darstellt. Hier sind einige Deletionsmutanten des HOG-Signalwegs in ihrem Wachstum nämlich resistenter als der Wildstamm, wie es auch Garcia-Rodriguez *et al.* für *S. cerevisiae* beobachtet haben (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Die $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutanten waren ungefähr so sensitiv gegenüber Kongorot und Calcofluor Weiß, wie der Wildstamm. Die $\Delta skn7$ -Mutante hingegen zeigte, wie zuvor auch die $\Delta tcsC$ -Mutante, eine deutlich höhere Resistenz gegenüber diesen beiden Zellwandstressoren als der *A. fumigatus* Wildstamm. Die $\Delta skn7\Delta sakA$ -

Doppelmutante war ebenfalls vergleichbar resistent gegenüber beiden Stressoren wie die $\Delta tcsC$ - und die $\Delta skn7$ -Mutante.

Es ist also deutlich zu erkennen, dass die Gruppe III HHK TcsC die Sensitivität gegenüber diesen Zellwandstressoren vermittelt. Wie bereits beschrieben, impliziert dies veränderte Zellwandeigenschaften der $\Delta tcsC$ -Mutante und Hagiwara *et al.* konnten, wie weiter oben bereits beschrieben, tatsächlich eine geringere Zellwanddicke einer $\Delta tcsC$ -Mutante nachweisen (HAGIWARA *et al.*, 2013). Mögliche Erklärungen für die beobachteten Phänomene wurden bereits im ersten Diskussionsteil diskutiert. Da sich auch die $\Delta skn7$ -Mutante vergleichbar resistent gegenüber Zellwandstressoren wie die $\Delta tcsC$ -Mutante zeigte, scheint Skn7 eine ähnlich große Aufgabe in der Vermittlung der Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren zuzukommen.

Möglicherweise hat auch die $\Delta skn7$ -Mutante eine andere Zellwand. Dadurch kommt es eventuell auch bei der $\Delta skn7$ -Mutante zu einer anderen Interaktion mit dem jeweils eingesetzten Zellwandstressor und der Zielstruktur in ihrer Zellwand, möglicherweise in Form einer anderen Bindung an das Chitin. Auch hier bedarf es weiterer Forschungsarbeit.

Kongorot hemmt zusätzlich die Enzyme, die für die Verbindung von Chitin mit den Glukanen der Zellwand zuständig sind (RAM *et al.*, 2006). Die bessere Resistenz der $\Delta skn7$ -Mutante suggeriert eine funktionelle Verbindung von Skn7 zu Reorganisationen der Zellwand, wie es auch in der Hefe *S. cerevisiae* der Fall ist (LI *et al.*, 2002).

Ein möglicher Zusammenhang wird im Folgenden noch genauer betrachtet.

Effekte durch Fludioxonil

Wachstum der HOG-Mutanten in Anwesenheit von Fludioxonil

Wie McCormick *et al.* zeigen konnten, sind Gruppe III HHK das Ziel antifungaler Wirkstoffe wie Fludioxonil oder Iprodion. Die $\Delta tcsC$ -Mutante ist resistent gegenüber Fludioxonil und Iprodion (MCCORMICK *et al.*, 2012). Eine weitere Studie erhob vergleichbare Daten für eine weitere *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ -Mutante (HAGIWARA *et al.*, 2013). Desweiteren beschrieb die Studie von Hagiwara *et al.* eine mit dem Wildstamm von *A. fumigatus* vergleichbare Resistenz einer $\Delta ssk1$ -

und $\Delta sakA$ -Mutante.

Auch in dieser Arbeit konnten die Daten der vorangegangenen Studien erneut belegt werden.

Auf Platten mit Fludioxonil wuchs die $\Delta tcsC$ -Mutante völlig unbeeindruckt. Der *A. fumigatus* Wildstamm ist in Anwesenheit von Fludioxonil in seinem Wachstum vollständig inhibiert. Die $\Delta ssk1$ - und $\Delta sakA$ -Mutanten zeigten sich genauso sensitiv gegenüber Fludioxonil wie der Wildstamm. Die $\Delta skn7$ -Mutante ist unter diesen Bedingungen allerdings überraschenderweise imstande zu wachsen, wenn auch kompakter und nicht so effizient wie die $\Delta tcsC$ -Mutante. Auch die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante zeigt ein ähnlich gutes Wachstum wie die $\Delta tcsC$ -Mutante. In Flüssigkultur mit Fludioxonil wuchs $\Delta tcsC$ ebenfalls unbeeindruckt und zeigte eine normale Morphologie. Obwohl in Flüssigkultur sogar 2 $\mu\text{g/ml}$ Fludioxonil zum Einsatz kamen, also die doppelte Konzentration im Vergleich zum Einsatz in Agar-Platten, ähnelte die $\Delta skn7$ -Mutante hier der $\Delta tcsC$ -Mutante und wuchs nahezu so resistent wie sie. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die $\Delta skn7$ -Mutante in Flüssigkultur noch resistenter gegenüber Fludioxonil ist als auf Platten und *Skn7* eine große Rolle bei der schädlichen Wirkung von Fludioxonil spielt. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass auf Platten ein direkter Kontakt zur Luft besteht, der Pilz also mehr Sauerstoff ausgesetzt ist und somit mehr reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen. Das kompaktere Wachstum der $\Delta skn7$ -Mutante könnte dadurch bedingt sein, dass sie in Anwesenheit von Sauerstoff möglicherweise bereits einem oxidativen Stress ausgesetzt ist, gegenüber dem sie, wie bereits weiter vorne beschrieben, stark sensitiv ist und Fludioxonil in dem Fall nur einen kleinen zusätzlichen Stressor darstellt. Da eine Inkubation in Flüssigkultur weniger Kontakt zu Sauerstoff bedeutet, hat die $\Delta skn7$ -Mutante dort deutlich weniger Probleme ungehindert zu wachsen.

Die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante zeigte eine mit $\Delta tcsC$ vergleichbare Resistenz. Dies deutet darauf hin, dass *SakA* ebenfalls eine Rolle bei der antifungalen Aktivität von Fludioxonil spielt, wenn auch keine so große wie *Skn7*. In Flüssigkultur mit Fludioxonil zeigte die $\Delta sakA$ -Mutante das auch beim Wildtyp auftretende massive Anschwellen. Dies ist insofern bemerkenswert da in *S. cerevisiae* das homologe HOG1p eigentlich eine Schlüsselrolle beim Anstieg des inneren osmotischen Drucks spielt.

Um die wichtige Rolle von Skn7 zu verifizieren, komplementierten wir die $\Delta skn7$ -Mutante. Bei einer Komplementation mit einem durch den vergleichsweise starken *gpdA*-Promoter exprimierten Gen, wurde der durch oxidativen Stress induzierte wildtypische Phänotyp voll, aber der Fludioxonil-assoziierte Phänotyp nur zum Teil wiederhergestellt. Eine dem Wildtyp-entsprechende Sensitivität gegenüber Fludioxonil konnte erst mit einer Komplementation erreicht werden, bei der das *skn7* Gen von seinem nativen Promoter aus exprimiert wurde.

Die Funktion von Skn7 unter Fludioxonil-Stress wird vermutlich durch eine Überexpression des Skn7-Proteins gestört, ein Effekt, der bei oxidativem Stress nicht auftritt.

In einer vorangegangenen Studie konnte festgestellt werden, dass es unter Stress durch Fludioxonil und durch hypersomolaren Stress beim *A. fumigatus* Wildtyp zu einer Hyperphosphorylierung der MAPK SakA kommt. Diese Hyperphosphorylierung kam jedoch nicht bei einer $\Delta tcsC$ -Mutante zustande, die sich bekannterweise nicht an hyperosmotischen Stress anpassen kann und resistent gegenüber Fludioxonil ist (MCCORMICK *et al.*, 2012).

Nach aktuellem Wissensstand bedingt Fludioxonil einen dramatischen Anstieg des inneren osmotischen Drucks von *A. fumigatus* und somit einen massiven Einstrom von Wasser in die Pilzzelle. Man nimmt also an, dass die Wirkung von Fludioxonil darauf beruht, dass sich die Pilzzellen an einen nicht existenten hyperosmotischen Stress anzupassen versuchen. Physiologischerweise führt hyperosmolarer Stress dazu, dass bestimmte Gene exprimiert werden, die zu einer Erhöhung osmotisch wirksamer Teilchen und vermehrter Glycerinproduktion im Pilz führen und so das osmotische Gleichgewicht wiederherstellen (HOHMANN, 2002, BAHN, 2008).

Bei *N. crassa* konnte bereits beobachtet werden, dass es unter hyperosmolarem Stress innerhalb der ersten 10 - 15 min zunächst zu einem Einstrom von Ionen in das Zytoplasma kommt (LEW *et al.*, 2006). Darauf folgte etwas später eine verstärkte Bildung von Glycerin, die zu einem Ausgleich im Wasserhaushalt führt (LEW *et al.*, 2007, LEW *et al.*, 2009, LEW, 2010, KILANI *et al.*, 2016). Eine Studie von Ochiai *et al.* beschreibt auch bei *N. crassa* eine vollständige Resistenz einer Gruppe III HHK-Mutante gegenüber Fludioxonil und eine starke Osmosensitivität (OCHIAI *et al.*, 2001)

Die Bindung von Fludioxonil an die Gruppe III HHK und eine nachgeschaltete

Aktivierung des HOG-Signalwegs führt also möglicherweise analog zu verschiedenen Vorgängen, wie einem Influx von Ionen und einer erhöhten Glycerin-Biosynthese. Dies hat einen erhöhten intrazellulären Druck und eine erhöhte Membranspannung zur Folge und könnte die typischen Fludioxonil-bedingten Veränderungen erklären.

Die Unfähigkeit unserer $\Delta sakA$ -Mutante in Anwesenheit von Fludioxonil zu wachsen, spricht hingegen gegen eine alleinige Vermittlung dieses Stresses durch SakA. Vielmehr scheint neben TcsC Skn7 hier eine große Rolle zuzukommen. Auch dass die $\Delta sakA$ -Mutante, wie weiter oben beschrieben, bei hyperosmolarem Stress durchaus in der Lage war zu wachsen, deutet darauf hin, dass SakA hier eine deutlich kleinere Aufgabe zukommt, als bisher angenommen.

Reorganisation der Zellwand durch Fludioxonil

Wie oben bereits beschrieben, erfolgt die Lyse Fludioxonil-behandelter *A. fumigatus* Zellen nach aktuellem Erkenntnisstand durch das dramatische Anschwellen der Zellen. Lew *et al.* beobachteten für *N. crassa* einen Fludioxonil-bedingten Einstrom von Ionen und einen Anstieg des inneren osmotischen Drucks durch die Erhöhung der Glycerin-Konzentration, was zu einem Einstrom von Wasser führte (LEW, 2010). Dieser Vorgang könnte auch das für *A. fumigatus* und andere Pilze beobachtete Anschwellen erklären. SakA, bzw. die zu Ssk1 und SkaA homologen Proteine, können in vielen Pilzen eine Erhöhung des intrazellulären osmotischen Drucks vermitteln (HOHMANN, 2002, HAGIWARA *et al.*, 2007, VARGAS-PÉREZ *et al.*, 2007). In *A. fumigatus* ist SakA aber z.B. in Gegenwart von hohen Sorbit-Konzentrationen nicht wichtig.

Das unter Fludioxonil-Einwirkung beobachtete Anschwellen geht auf ein Wechselspiel zwischen der osmotischen Druckdifferenz zwischen Zytoplasma und Außenraum und der Rigidität der Zellwand zurück. Bisher wird die Wirkung von Fludioxonil weitgehend durch eine Erhöhung des internen osmotischen Drucks erklärt.

Alternativ wäre ein Anschwellen auch durch eine Fludioxonil-induzierte Schwächung der Zellwand möglich.

In der Hefe *S. cerevisiae* übernimmt Skn7 die Regulation der Zellwandsynthese und

den Erhalt der Zellwandintegrität (LI *et al.*, 2002, FASSLER *et al.*, 2011). Die bessere Resistenz der $\Delta skn7$ -Mutante von *A. fumigatus* gegenüber Zellwandstressoren suggeriert auch in *A. fumigatus* eine funktionelle Verbindung von Skn7 zu Reorganisationen der Zellwand. Auch die nur leicht schwächere Resistenz gegenüber Fludioxonil der $\Delta skn7$ -Mutante auf Platten im Vergleich zur $\Delta tcsC$ -Mutante unterstützt die Theorie, dass die Wirkungsweise von Fludioxonil nicht nur auf einer unphysiologischen Erhöhung des osmotischen Innendrucks der Pilzzellen beruht, sondern ebenfalls auf einer Schwächung der Zellwand.

Für *A. fumigatus* wurde in einer vorangegangenen Arbeit beobachtet, dass es durch Fludioxonileinfluss zu einer verstärkten Einlagerung von Chitin und einer vermehrten Abgabe von Galaktomannan aus der Zellwand kommt (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Die Fludioxonil-bedingten Reorganisationen der Zellwand (Galaktomannan, β -1,3-Glukan, Chitin), die auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, deuten zusätzlich auf eine solche Wirkungsweise hin. Um die Effekte genauer zu analysieren, wurden die verschiedenen Zellwandbestandteile der HOG-Mutanten unter dem Einfluss von Fludioxonil untersucht.

Durch eine Behandlung mit Fludioxonil kommt es beim *A. fumigatus* Wildstamm zu einer Abgabe des Zellwandbestandteils Galaktomannan. Die Folge ist eine schwache und gepunktete Färbung bei der Immunfluoreszenz mit dem Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1 (WIEDEMANN *et al.*, 2016), was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die Betrachtung der HOG-Mutanten von *A. fumigatus* zeigte dasselbe Bild für die $\Delta ssk1$ - und die $\Delta sakA$ -Mutante. Wurde Fludioxonil direkt zu Konidien gegeben, waren weder der Wildstamm noch $\Delta ssk1$ oder $\Delta sakA$ in der Lage zu wachsen. Die Konidien schwollen lediglich an und bei der Galaktomannanfärbung zeigte sich eine sehr schwache, gesprenkelte Färbung, bei der teilweise deutlich zu erkennen war, dass das Galaktomannan von der Zellwand abgegeben worden war, da Galaktomannan-positive Halo-Bereiche auftraten. Die $\Delta skn7$ -Mutante wuchs, auch wenn Fludioxonil direkt zu ihren Konidien gegeben wurde, annähernd so gut wie $\Delta tcsC$. Es entstanden Hyphen, die eine homogene Galaktomannanfärbung zeigten. Die $\Delta skn7\Delta sakA$ -Doppelmutante wuchs wie $\Delta tcsC$ ohne Einschränkung und zeigte eine homogene Färbung der Hyphen.

Bei der Färbung mit dem β -1,3-Glukan-spezifischen Antikörper 2G8 zeigte sich für alle getesteten Stämme ein mit der Galaktomannanfärbung vergleichbares Bild.

ΔtcsC, *Δskn7* und *Δskn7ΔsakA* gaben kein β-1,3-Glukan ab, während es beim *A. fumigatus* Wildstamm, *Δssk1* und *ΔsakA* zu einer Freisetzung von β-1,3-Glukan kam.

Den Einfluss von Fludioxonil auf das Chitin der Zellwand wurde mit dem Farbstoff Calcofluor Weiß visualisiert, der an das Chitin bindet. Hier kam es beim Wildstamm, *ΔsakA* und *Δssk1* zu einer vermehrten Einlagerung unter Fludioxonil-Einfluss, bei *ΔtcsC*, *Δskn7* und *Δskn7ΔsakA* jedoch nicht.

Diese Daten zeigen, dass bei Fludioxonil-empfindlichen Stämmen Galaktomannan und β-1,3-Glukan abgegeben werden, während vermehrt Chitin in die Zellwand eingelagert wird. Bei Fludioxonil-unempfindlichen Stämmen (*ΔtcsC*-, *Δskn7*- und *Δskn7ΔsakA*-Mutanten) tritt dieser Zellwandumbau hingegen nicht auf.

Hier kommt es bei den Fludioxonil-empfindlich Stämmen, wie im ersten Diskussionsteil bereits diskutiert, also vermutlich zu einer Freisetzung von β-1,3-Glukan aus der Zellwand, die sekundär den Verlust von Galaktomannan und die vermehrte Einlagerung von Chitin mit sich zieht. Weder die *ΔtcsC*-Mutante, die, wie Hagiwara *et al.* bereits herausfanden, eine andere Zellwandarchitektur aufweist (HAGIWARA *et al.*, 2013), noch *Δskn7* reagierten mit einer Freisetzung von β-1,3-Glukan und Galaktomannan aus der Zellwand.

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Fludioxonil bei empfindlichen Stämmen also eindeutig auch zu einer Veränderung der Zellwandzusammensetzung führt, die durchaus auch zu dessen Effekt beitragen kann. Womöglich ist der primäre Fludioxonil-Effekt sogar eine Schwächung der Zellwand und die Erhöhung des osmotischen Innendrucks lediglich eine sekundäre Wirkung. Die Ergründung der genauen Mechanismen der antifungalen Aktivität von Fludioxonil bedarf weiterer Analysen.

Nähere Betrachtung der Veränderung des inneren osmotischen Drucks durch Fludioxonil

Um einer möglichen Veränderung des inneren osmotischen Drucks durch Fludioxonil auf den Grund zu gehen, wurde in mehreren Versuchen überprüft, ob es im *A. fumigatus* Wildstamm auch zu den Fludioxonil-typischen Veränderungen kommt, wenn dem umgebenden Medium Sorbit zugesetzt wird.

Zunächst erfolgte ein Versuch, in dem getestet wurde, ob Fludioxonil bei *A. fumigatus* auch in hyperosmolarem Medium ein Anschwellen verursacht. Dazu wurde überprüft, wie sich Konidien von *A. fumigatus* verhalten, wenn sie in AMM plus 2 µg/ml Fludioxonil mit und ohne Zusatz von 1,2 M Sorbit inkubiert werden. In beiden Ansätzen schwollen die Konidien lediglich an oder entwickelten sich bestenfalls zu kurzen Keimlingen. Nach einem Mediumwechsel wurden die Ansätze ohne Fludioxonil weiterinkubiert. Die in AMM inkubierten Konidien erholten sich schnell und wuchsen zu einem dichten Hyphengeflecht heran. Der Fludioxonil-Effekt konnte also rückgängig gemacht werden und der Pilz erholte sich. Die Konidien in AMM mit 1,2 M Sorbit erholten sich jedoch auch nach 48h nicht. Das hyperosmolare Medium konnte den Fludioxonil-Effekt also nicht abmildern, sondern scheint ihn eher verstärkt zu haben.

In einem weiteren Versuch wurden Protoplasten des *A. nidulans* Wildstammes herangezogen. Dem AMM, in dem sie inkubiert wurden, wurde zur Osmoprotektion 1,2 M Sorbit zugesetzt, da der innere osmotische Druck der Protoplasten höher als der des Mediums ist. Dadurch wurde zum einen ein Schutz der sehr empfindlichen Protoplasten gewährleistet. Sollte Fludioxonil eine weitere Erhöhung des inneren osmotischen Drucks auslösen, so müsste dies unmittelbar zu einem Anschwellen führen, da die Protoplasten einen Druckanstieg nicht über ihre Zellwand ausgleichen könnten. Doch auch nach langer Inkubation war hier weder ein Anschwellen noch ein Auskeimen zu beobachten. Die Protoplasten im Ansatz ohne Fludioxonil keimten in Anwesenheit von 1,2 M Sorbit nur leicht aus. Dies könnte auf dem annähernd osmotischen Gleichgewicht zwischen der Pilzzelle und dem umgebenden Medium beruhen, kommt der Vorgang des Auskeimens doch physiologischerweise durch einen kontrollierten Einstrom von Wasser in die Zelle zustande (ROHDE *et al.*, 2002). Aus den Protoplasten, die zuvor in Anwesenheit von Fludioxonil inkubiert wurden, bildeten sich nach einem Mediumwechsel Hyphen. Sie hatten ihre Vitalität also nicht verloren. Dennoch wiesen die entstehenden Hyphen eine ungewöhnlich hohe Septenzahl auf und erschienen angeschwollen. Dies legt die Vermutung nahe, dass noch Reste von Fludioxonil im Medium vorhanden waren. Da Protoplasten im Allgemeinen nicht gut an Oberflächen adhäreren, konnte das mit Fludioxonil versetzte Medium nicht vollständig entfernt werden.

Als letztes erfolgten Agardiffusionstests auf AMM- bzw. AMM + 1,2 M Sorbit-

Platten. Wurden Fludioxonil-getränkte Filterplättchen direkt auf frisch ausgestrichene Konidien von *A. fumigatus* gegeben, bildeten sich deutlich größere Hemmhöfe, als bei der Zugabe der Filterplättchen zu Keimlingen bzw. kurzen Hyphen. Konidien sind also deutlich empfindlicher gegenüber Fludioxonil als Hyphen. Ein weiterer Effekt war beim Vergleich der AMM- mit den AMM + 1,2 M Sorbit-Platten zu sehen. Hier waren sowohl die Konidien als auch die kurzen Hyphen in Anwesenheit von Sorbit resistenter gegenüber Fludioxonil, was sich in kleineren Hemmhöfen äußerte. Es konnte also gezeigt werden, dass Sorbit hier durchaus einen protektiven Effekt auf die Zellen ausübt. Wie oben bereits diskutiert, scheint Fludioxonil die Zellwand zu schwächen. Durch den höheren äußeren osmotischen Druck durch Sorbit kommt es vermutlich zu einer Stabilisierung, die den Druck auf die Zellwand kompensiert und so den Fludioxonil-Effekt abschwächt.

Es scheint also darauf anzukommen, ob ein Pilz in flüssigem Medium oder auf Platten wächst, um einen protektiven Effekt durch eine hyperosmolare Umgebung zu erzielen. In Flüssigmedium war weder bei Konidien noch bei Protoplasten eine Abschwächung des Fludioxonileffekts durch 1,2M Sorbit zu beobachten, auf Agar-Platten zeigte sich hingegen ein schützender Effekt. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Pilz auf Platten, anders als in Flüssigkultur, in dauerhaftem Kontakt zu Sauerstoff steht und dieser für die Vorgänge, die zu einer vermehrten Glycerinproduktion führen, benötigt wird. Möglicherweise kommt es in Flüssigkultur zwar zu dem von Lew *et al.* beschriebenen Einstrom von Ionen in die Pilzzelle, aber aufgrund einer nicht so effektiven Bildung von Glycerin dennoch zu keiner ausreichenden Produktion osmotisch wirksamer Teilchen. Somit wäre der Effekt nicht ausreichend für eine Auskeimung. Ein anderer, oder möglicherweise ergänzender Grund könnte die Wirkung von Fludioxonil auf die Zellwand sein. Wie zuvor beschrieben, kommt es zu Veränderungen der pilzlichen Zellwand durch Fludioxonil, die möglicherweise einen schwächenden Effekt auf diese haben (Verlust von β -1,3-Glukan und Galaktomannan). Da Fludioxonil zum einen Druck auf die Zellwand ausübt und diese zum anderen in ihrer Struktur zu schwächen scheint, könnte eine Erhöhung des äußeren osmotischen Drucks, zumindest auf Platten, zu einer Stabilisierung bzw. Kompensation des Drucks auf die Zellwand führen. Warum es in Flüssigmedium nicht zu einer osmoprotektiven Wirkung durch Sorbit kommt, oder zumindest zu keinem ausreichenden Effekt, muss noch näher

untersucht werden.

Löst Fludioxonil einen inneren oxidativen Stress aus?

Hagiwara *et al.* beschreiben eine Fludioxonil-bedingte Expression der normalerweise Konidien-spezifischen Katalase CatA in Hyphen des *A. nidulans* Wildstammes (HAGIWARA *et al.*, 2007). Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass Fludioxonil zu einem inneren oxidativen Stress führt.

In dieser Arbeit wurde mithilfe des Farbstoffs 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat überprüft, ob Fludioxonil in *A. fumigatus* Hyphen auch einen inneren oxidativen Stress durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies auslöst. Für eine Fludioxonil-behandelte $\Delta skn7$ -Mutante war im Vergleich zu einer unbehandelten $\Delta skn7$ -Mutante kein Unterschied in der Färbung zu sehen. Beide Stämme zeigten eine schwache, homogen grüne Färbung. Die mit Fludioxonil angezogenen Konidien des *A. fumigatus* Wildstammes zeigten bei einer Färbung mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat jedoch stark gefärbte intrazelluläre Strukturen, während die Kontrolle nur eine schwache, homogene Färbung aufwies. Es gibt also Hinweise auf reaktive Sauerstoffspezies beim Wildtyp, bei der $\Delta skn7$ -Mutante jedoch nicht. Da sich diese, wie weiter vorne beschrieben, ziemlich resistent gegenüber Fludioxonil zeigt, aber hoch sensitiv gegenüber oxidativem Stress ist, spricht hier nichts für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Beim *A. fumigatus* Wildstamm kam es hingegen zur Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies in bestimmten Kompartimenten.

Die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies geschieht zum Großteil durch die Mitochondrien (HAYASHI *et al.*, 2014). Bei den stärker gefärbten Kompartimenten im *A. fumigatus* Wildstamm könnte es sich also um Mitochondrien handeln, die durch Fludioxonil zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies angeregt wurden.

Eine vorherige Studie beschreibt, dass eine Germination von *Aspergillus* spp. nur in Anwesenheit von Sauerstoff stattfindet und aktive Mitochondrien nur in Sporen vorzufinden waren, die sich in der Auskeimung befanden (TAUBITZ *et al.*, 2007). Verschiedene publizierte Daten beschreiben zudem, dass es während des Zellwachstums lebender Organismen in Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung

reaktiver Sauerstoffspezies kommt (SEMIGHINI *et al.*, 2008, HAYASHI *et al.*, 2014). Die Mechanismen, die zu einem apikalen Wachstum von Hyphen führen, sind bisher nicht ergründet, wobei Studien darauf hinweisen, dass auch hier reaktive Sauerstoffspezies eine Rolle spielen (SEMIGHINI *et al.*, 2008). Auch bei *A. nidulans* scheinen Signale durch reaktive Sauerstoffspezies essentiell für ein normales apikales Wachstum zu sein. Dort konnten Semighini *et al.* in den Hyphenspitzen reaktive Sauerstoffspezies nachweisen und das dynamische Muster, in dem sie während der Germination und des Hyphenwachstums auftauchen, deutet darauf hin, dass das Wachstum mit ihrem Auftreten korreliert (SEMIGHINI *et al.*, 2008). Eine Studie von Oh *et al.* beschreibt ebenfalls die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies während des Germinationsprozesses von *A. nidulans* Konidien (OH *et al.*, 2010). Navarro *et al.* verzeichneten für *A. nidulans* zudem eine Akkumulation von Konidien-spezifischer CatA zu Beginn des Germinationsprozesses (NAVARRO *et al.*, 1998).

Aufgrund der Daten dieser Studien überprüften wir, ob unsere Beobachtung wirklich auf einem Effekt von Fludioxonil beruht, oder es auch bei der normalen Auskeimung von *A. fumigatus* Konidien zu einer Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies kommt. Dafür wurden Konidien während der normalen Germination mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat gefärbt. Hier waren, anders als in Fludioxonil-behandelten Konidien, jedoch keine stärker gefärbten intrazellulären Strukturen zu erkennen. Es spricht also vieles dafür, dass die beobachtete Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im *A. fumigatus* Wildstamm dem Fludioxonil-Effekt zuzuschreiben ist. Neben den bereits beschriebenen schädlichen Effekten, führt Fludioxonil in empfindlichen Stämmen also auch zu einem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies. Dies verdeutlicht, dass Fludioxonil eine sehr weit aufgestellte Wirkungsweise hat, die in weiteren Studien genauer analysiert werden muss.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit einem direkten Vergleich der Gruppe III HHK des pathogenen Schimmelpilzes *A. fumigatus* und des Modellorganismus *A. nidulans* sowie der genaueren Analyse der Komponenten des *High Osmolarity Glycerol* (HOG)-Signalwegs in *Aspergillus fumigatus*. Der Signalweg stellt einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antifungaler Therapeutika dar. Er ist für Pilze spezifisch und führt dort unter physiologischen Bedingungen zu einer Adaption an externe Stressoren, wie zum Beispiel eine hyperosmolare Umgebung. Doch auch eine pharmakologische Aktivierung, beispielsweise durch das Phenylpyrrol-Derivat Fludioxonil ist möglich. Diese führt nach bisherigen Erkenntnissen zu einer Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts und einer Entgleisung des Wasserhaushalts des Pilzes. Neben einem unmittelbaren Wachstumsstopp kommt es zu massiven Schäden bis hin zur Lyse (MCCORMICK *et al.*, 2012, WIEDEMANN *et al.*, 2016).

A. fumigatus ist ein wichtiger Erreger in der Human- und Veterinärmedizin. Die begrenzte Zahl verfügbarer Antimykotika und die zunehmenden Resistenzen des Erregers, nicht zuletzt durch den Einsatz in der Landwirtschaft, machen unzweifelhaft deutlich, dass ein dringender Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Aspergillosen besteht.

Fludioxonil wirkt, wie in dieser Arbeit sowohl für die Wildstämme von *A. fumigatus* und *A. nidulans* als auch für einige Mutanten des HOG-Signalwegs von *A. fumigatus* beobachtet werden konnte, sowohl auf Hyphen als auch auf ruhende Konidien. Diese schwellen in Anwesenheit von Fludioxonil lediglich an, sind jedoch nicht in der Lage auszukeimen, was für mögliche therapeutische Ansätze sehr wichtig ist. Leider nimmt die Wirkung von Fludioxonil in proteinreichem Medium ab, was es für den therapeutischen Einsatz ungeeignet macht. Neben Fludioxonil sind jedoch auch weitere antifungale Mittel wie Iprodion oder Quintozene, die einen deutlich unterschiedlichen chemischen Aufbau aufweisen, in der Lage den HOG-Signalweg zu aktivieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es auch weitere Wirkstoffe mit entsprechender Wirkung gibt, die das Potential für einen therapeutischen Einsatz haben.

Die Daten, die im ersten Teil dieser Arbeit erhoben wurden, zeigen Gemeinsamkeiten und Unterschiede von *A. fumigatus* und *A. nidulans*.

Unterschiedliche Phänotypen der beiden Stämme, können zum Teil mit den Gruppe III HHK in Zusammenhang gebracht werden. Wie schon in vorherigen Studien beschrieben, werden TcsC und NikA für die antifungale Aktivität von Fludioxonil und die Anpassung an hyperosmolaren Stress benötigt. Die hier erhobenen Daten deuten weiterhin darauf hin, dass beide Kinasen wichtig für die adaptive Antwort auf ungünstige Wachstumsbedingungen und die Resistenz gegenüber oxidativem Stress sind. Bemerkenswerterweise scheinen TcsC und NikA unterschiedlich in das Signalnetzwerk, das die Zellwanddynamik kontrolliert, eingebunden zu sein. Dies zeigt sich an der ausgeprägten Resistenz der $\Delta tcsC$ -Mutante gegenüber Zellwandstressoren und den deutlich unterschiedlichen, durch Fludioxonil ausgelösten Zellwandveränderungen der beiden Wildstämme. Ein Verlust der Zellwandbestandteile β -1,3-Glukan und Galaktomannan durch Fludioxonil konnte bei sechs *Aspergillus* Spezies beobachtet werden, jedoch nicht bei *A. nidulans*. Dieser für *A. nidulans* charakteristische Phänotyp ist unabhängig von NikA, wie durch Kreuzkomplementation der $\Delta nikA$ -Mutante mit *tcsC*, gezeigt werden konnte. Die erhobenen Daten deuten also darauf hin, dass TcsC und NikA in ähnliche, aber nicht identische Regulierungsnetzwerke eingebunden sind.

Die genauere Betrachtung einzelner, TcsC nachgeschalteter Proteine des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus* im zweiten Teil dieser Arbeit, ergab einige interessante Ergebnisse. Es wurde herausgefunden, dass dem *Response Regulator* Skn7 deutlich mehr Aufgaben zukommen, als bisher erwartet wurde und er neben TcsC eine sehr große Rolle in der Vermittlung verschiedener Stresssignale einnimmt. Vor allem in Bezug auf die Wirkung von Fludioxonil scheint Skn7 eine sehr wichtige Aufgabe zuzukommen. Die erhöhte Resistenz der $\Delta skn7$ -Mutante gegenüber Fludioxonil und Zellwandstress deuten darauf hin, dass Skn7 hier neben TcsC die Sensitivität gegenüber diesen Stoffen vermittelt und $\Delta skn7$, wie $\Delta tcsC$ eine im Vergleich zum Wildstamm veränderte Zellwand hat. Auch kam es, ähnlich wie bei $\Delta tcsC$, zu keiner Fludioxonil-bedingten Neuorganisation der Zellwand von $\Delta skn7$. In ihnen kam es, anders als beim Wildtyp, $\Delta ssk1$ und $\Delta sakA$ zu keiner Freisetzung von β -1,3-Glukan und Galaktomannan und dementsprechend auch zu keiner vermehrten Einlagerung von Chitin. Außerdem vermittelt Skn7 die Anpassung an oxidativen Stress, was durch eine vollständige Wachstumshemmung einer $\Delta skn7$ -Mutante in Anwesenheit oxidativer Stressoren, zu deren Entgiftung es Katalasen bedarf, deutlich wurde. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Skn7 wie TcsC

interessante Zielstrukturen im HOG-Signalweg darstellen, die genauer untersucht werden sollten. Desweiteren nimmt die MAPK SakA, vor allem in der Antwort auf hyperosmolaren Stress, eine deutlich kleinere Rolle ein, als bisher angenommen. Bei Stress durch Sorbit und Glycerin war SakA sogar entbehrlich und die $\Delta sakA$ -Mutante in der Lage zu wachsen. Von den hier untersuchten Proteinen wurde lediglich TcsC unbedingt benötigt, damit sich der Pilz mit diesem Stress auseinandersetzen konnte. Bisher wurde vermutet, dass Fludioxonil allein über eine massive Erhöhung des internen osmotischen Drucks wirkt. SakA scheint allerdings nicht die Sensitivität gegenüber Fludioxonil zu vermitteln, da die $\Delta sakA$ -Mutante ähnlich sensitiv gegenüber Fludioxonil war wie der Wildstamm. Vielmehr ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit, dass neben TcsC der *Response Regulator* Skn7 das Protein ist, das den Fludioxonil-Effekt vermittelt, da sich die $\Delta skn7$ -Mutante als resistent gegenüber Fludioxonil erwies. In dieser Arbeit wurden zudem weitere Hinweise darauf gefunden, dass es womöglich auch zu einem Zellwandschwächenden Effekt durch Fludioxonil kommt, der dem Anschwellen vorausgeht und dieses unter Umständen erst ermöglicht oder zumindest erleichtert. Der Verlust von β -1,3-Glukan, des damit assoziierten Galaktomannans und die kompensatorische Einlagerung von Chitin sprechen für eine durch TcsC und Skn7 vermittelte Wirkung von Fludioxonils auf die Zellwand, die diese schwächt. Weiterhin lieferte diese Arbeit Hinweise auf eine Fludioxonil-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im *A. fumigatus* Wildstamm, die sehr wahrscheinlich auch zur schädigenden Wirkung dieses Wirkstoffs beitragen.

Fludioxonil scheint also einen sehr komplexen Wirkungsmechanismus zu haben, der nicht auf einem alleinigen Effekt beruht. Es bedarf weiterer Forschungsarbeit, um den genauen Mechanismen aufzuklären und die entsprechenden Rollen der Proteine des HOG-Signalwegs noch genauer zu charakterisieren.

G. SUMMARY

The present work dealt with a direct comparison of the group III HHKs of the pathogenic mould *A. fumigatus* and the model organism *A. nidulans* as well as a more detailed analysis of the components of the *High Osmolarity Glycerol* (HOG) pathway in *A. fumigatus*. The pathway is an interesting target for the development of new antifungal therapeutics. It is specific for fungi and leads under physiological conditions to an adaptation to external stressors such as hyperosmolar environments. However, pharmacological activation, for example by the phenylpyrrole derivative fludioxonil, is also possible. According to current knowledge, this leads to a shift in the osmotic equilibrium and a derailment of the water balance of the fungus, which can lead to its death. In addition to an immediate stop in growth, the fungus suffers massive damage, including lysis (MCCORMICK et al., 2012, WIEDEMANN et al., 2016).

A. fumigatus is an important pathogen in human and veterinary medicine. The limited number of available antimycotics and the increasing resistance of the pathogen, not least due to its use in agriculture, undoubtedly make it clear that there is an urgent need for new therapeutic options for the treatment of aspergillosis.

Fludioxonil acts on hyphae as well as on dormant conidia, as could be observed in this work for the wild strains of *A. fumigatus* and *A. nidulans* as well as for some mutants of the HOG pathway of *A. fumigatus*. In the presence of fludioxonil, these conidia only swell, but are not able to germinate, which is a very important finding for possible therapeutic approaches. Unfortunately, the effect of fludioxonil in protein-rich media decreases, making it unsuitable for therapeutic use. In addition to fludioxonil, other antifungal agents such as iprodione or quintozone, which have a clearly different chemical structure, are also able to activate the HOG pathway. This suggests that other substances are also able to do so and have potential for therapeutic use.

The data collected in the first part of this study reveal similarities and differences between *A. fumigatus* and *A. nidulans*. Different phenotypes of the two strains can in part be related to group III HHKs. As described in previous studies, TcsC and NikA are required for the antifungal activity of fludioxonil and adaptation to hyperosmolar stress. The data collected here further suggest that both kinases are

important for the adaptive response to adverse growth conditions and resistance to oxidative stress. Remarkably, TcsC and NikA appear to be differently involved in the signaling network that controls cell wall dynamics. Proof of this is the pronounced resistance of the $\Delta tcsC$ mutant to cell wall stressors and the clearly different and Group III HHK-dependent cell wall changes of the two wild strains caused by fludioxonil. A fludioxonil-induced loss of the cell wall components β -1,3-glucan and galactomannan was observed in six *Aspergillus* species but not in *A. nidulans*. This distinct phenotype of *A. nidulans* is independent of NikA, as could be demonstrated by cross-complementation of the $\Delta nikA$ mutant with *tcsC*. The collected data suggest that TcsC and NikA are integrated into similar but not identical regulatory networks.

A closer examination of individual TcsC downstream proteins of the HOG signalling pathway in *A. fumigatus* in the second part of this paper yielded also several interesting results. It was found that the response regulator Skn7 has significantly more tasks than previously expected and, in addition to TcsC, plays a very important role in the mediation of various stress signals. Especially with regard to the effect of fludioxonil, Skn7 seems to be very important. The increased resistance of the $\Delta skn7$ mutant to fludioxonil and cell wall stress indicates that Skn7, in addition to TcsC, mediates sensitivity to these substances and $\Delta skn7$, like $\Delta tcsC$, seems to have a modified cell wall compared to the wild strain. Also, there was no fludioxonil-triggered reorganization of the cell wall similar for $\Delta skn7$ and for $\Delta tcsC$. It came to no release of β -1,3-glucan and galactomannan and accordingly also to no increased incorporation of chitin in both strains, $\Delta skn7$ and $\Delta tcsC$, which is in striking contrast to the results obtained with the wild type, $\Delta ssk1$ and $\Delta sakA$. In addition, Skn7 is essential for the adaptive response triggered by oxidative stress, which became clear by a complete growth inhibition of the $\Delta skn7$ mutant in the presence of oxidative stress that can be eliminated by catalases. All these results suggest that Skn7, like TcsC, may be an interesting target structure in the HOG pathway that should be further investigated.

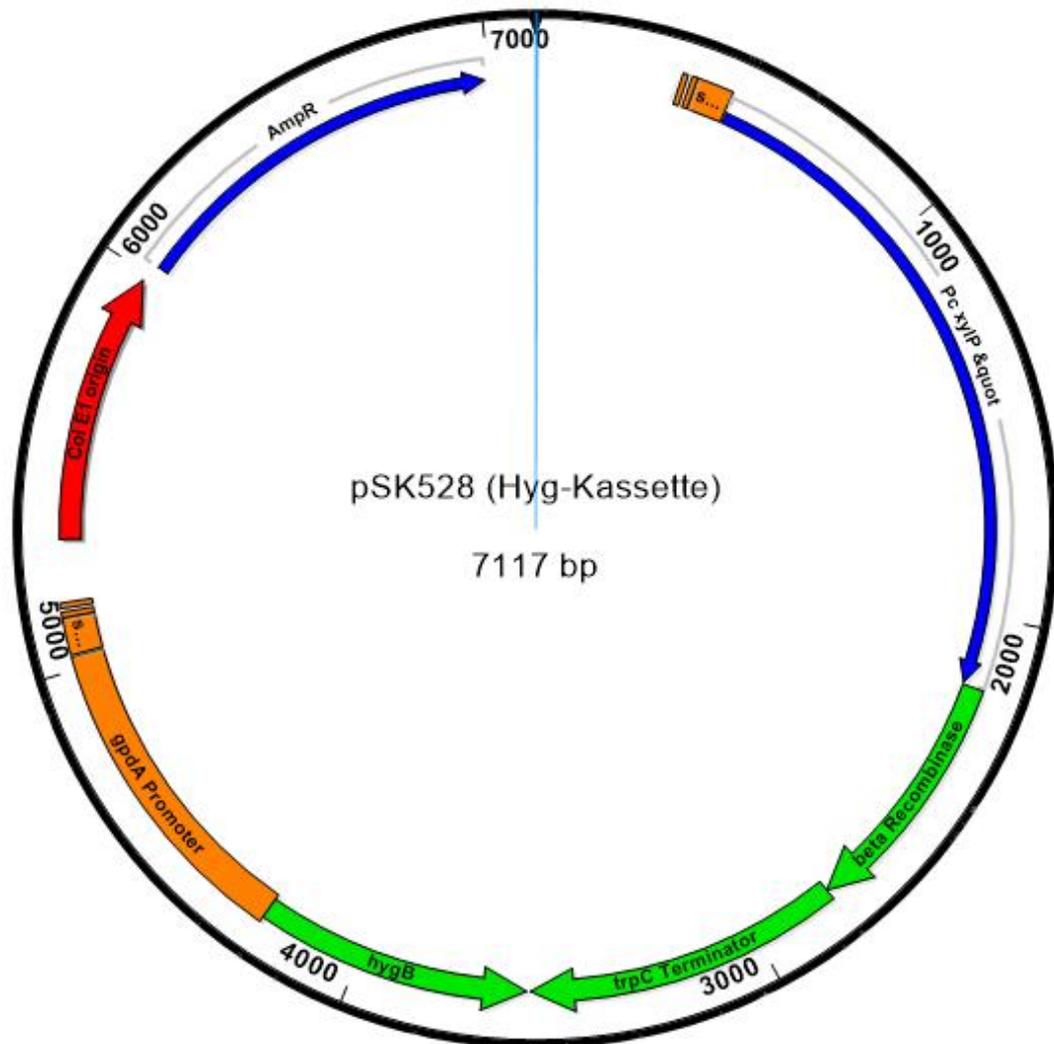
According to the results of this study, the MAPK SakA plays a much smaller role than previously assumed, especially in the response to hyperosmolar stress. In stress caused by sorbitol and glycerol, SakA was even dispensable and the $\Delta sakA$ mutant was able to grow. Of the proteins investigated here, only TcsC was absolutely necessary for the fungus to deal with this type of stress.

So far it has been assumed that fludioxonil works only by initiating a massive increase in the internal osmotic pressure. However, SakA does not seem to mediate the sensitivity to fludioxonil, since our $\Delta sakA$ mutant was as sensitive as the *A. fumigatus* wild type. Rather, the results of this work showed that the response regulator Skn7 is, besides TcsC, the protein that mediates the fludioxonil effect, since the $\Delta skn7$ mutant proved to be largely resistant to this agent. In this work, further evidence was found that fludioxonil might also lead to a cell wall weakening effect that precedes the swelling and may even make it possible or at least facilitate it. The loss of β -1,3-glucan and the galactomannan associated with it as well as the compensatory incorporation of chitin hints to an interaction of fludioxonil with the cell wall that weakens it. In addition, this work provided evidence for a fludioxonil-triggered production of reactive oxygen species in the *A. fumigatus* wild strain, which probably also contributes to the damaging effect of this substance.

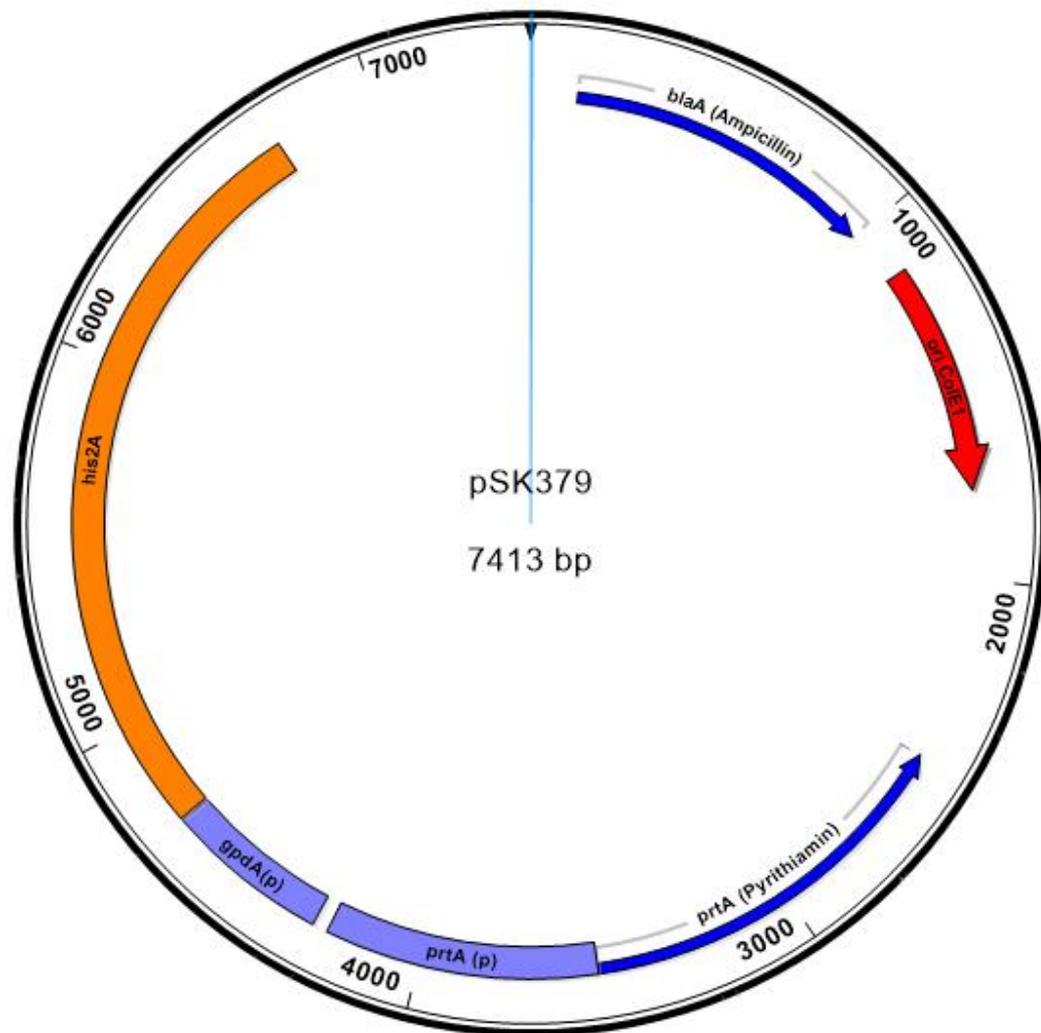
Fludioxonil seems to have a very complex mechanism of action, which is not based on a single effect. Further research is clearly needed to understand the exact mechanisms induced by fludioxonil and to characterize the corresponding roles of the different proteins of the HOG pathway.

H. ANHANG

(1) pSK528

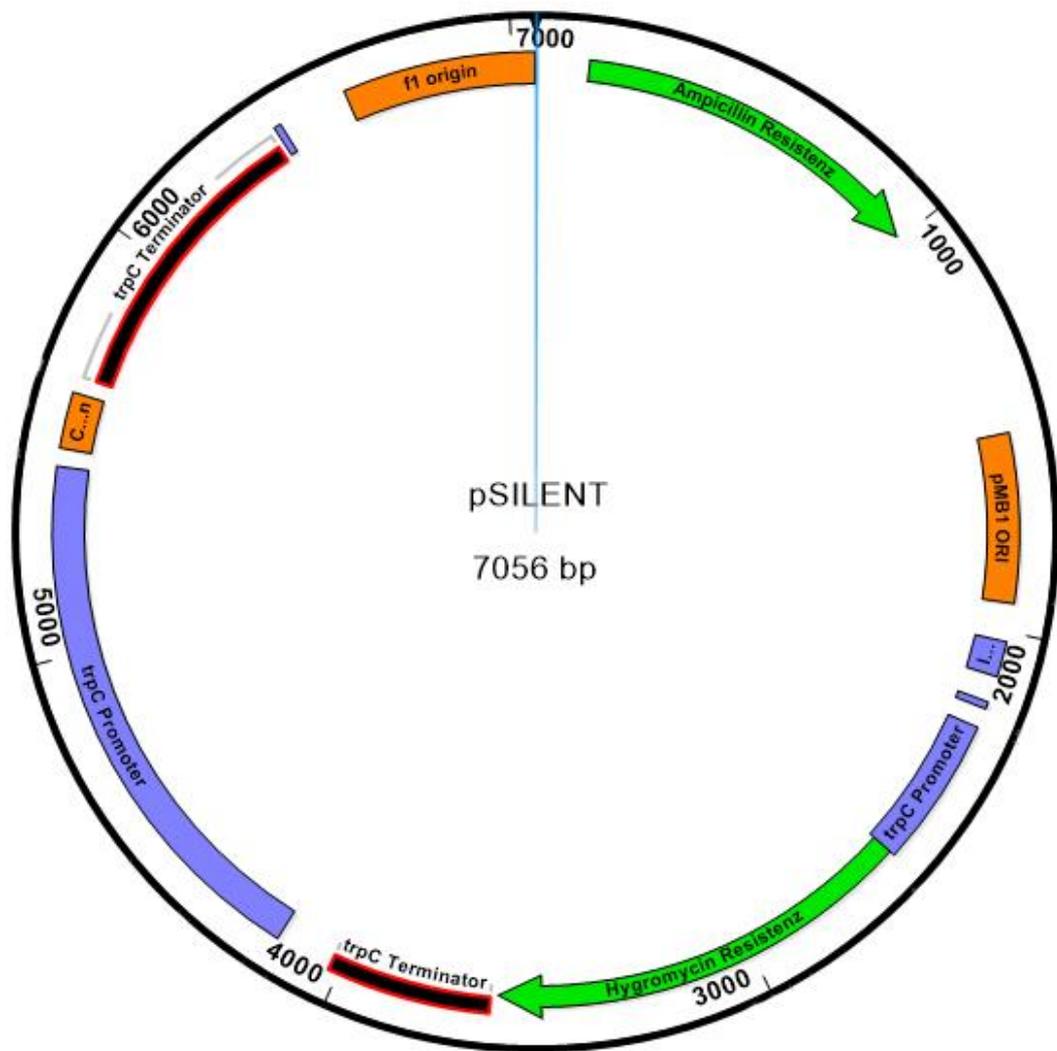


(2) pSK379



Das Plasmid pSK379 enthält eine Gensequenz des Histon 2A-Locus von AfS35, genannt his2A, womit eine homologe Integration der Gensequenzen des Plasmids in das Chromosom des Pilzes ermöglicht wird.

(3) pSilent



(4) Alignment der Aminosäure-Sequenzen von TcsC und NikA (Protein Blast
Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

| | | |
|------|--|------|
| . | ähnliche Aminosäuren | |
| : | sehr ähnliche Aminosäuren | |
| * | identische Aminosäuren | |
| TcsC | MTGADELTAASAILQTLARGPDASISD---PNSSHKTNGCDTKFAKLPGEPSQAKAAF | 57 |
| NikA | MACADEILTAASAI IQNLVREAPSSGSPSFEFNFSQSTNGV-DSLPKLPGEPSLAKVRF | 59 |
| | *: *****:*:*:*:* * * * * :*** .: ***** *. * | |
| TcsC | EFELEALIRRVRHLEFQVVSHQPYPRPAPELPLSSTKNSDFLWLFGLSRLSSHEGAASNS | 117 |
| NikA | ENELEALVRRIRHMEVQSQQNHTQHAH----- | 87 |
| | * *****:*:*:*:* * .: : | |
| TcsC | SCGMQQETSRRRQRTRRIRREAEDNEADEALDDDDSDDDVDSRTRLVREEDISYLRNHVQ | 177 |
| NikA | ----TQHLHKRRKS----SKDTEPEILDESDGAASDEDEEGATTLVREEDISYLRNVQ | 139 |
| | * . :** : : * : . . : * : . * *****:* | |
| TcsC | KQAEEIFSQKDIIAQVRDELQQEHTRRALTKVENEDVLLERELRKHQQANEAFQKAL | 237 |
| NikA | KQAEEIFSQKNIITQVREELQEQVQTRRALTKVENEDVLLERELRKHQQANEAFQKAL | 199 |
| | *****:*:*:*:* * * :***** | |
| TcsC | REIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVSRVAREVGT | 297 |
| NikA | REIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVSRVAREVGT | 259 |
| | ***** | |
| TcsC | EGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTQVREIAAVTTAVAHGDSLQKIESRAQG | 357 |
| NikA | EGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTQVREIAVVTAVAHGDSLQKIESRAQG | 319 |
| | ***** | |
| TcsC | EILELQQTINTMVDQLRTFATEVIRVARDVGTGVLGGQAQIEGVQGMWNETLVNNA | 417 |
| NikA | EILELQQTINTMVDQLRTFATEVIRVARDVGTGVLGGQAQIEGVQGMWNETLVNNA | 379 |
| | ***** | |
| TcsC | NNLITQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFAQEVTKIAK | 477 |
| NikA | NNLITQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFAQEVTKIAK | 439 |
| | ***** | |
| TcsC | EVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANLITQVREIADVTTAVAKGDLTKKVTA | 537 |
| NikA | EVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANLITQVREIADVTTAVAKGDLTKKVTA | 499 |
| | *****:***** | |
| TcsC | NVQGEIILDKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGDGTLGGQAKVDNVEGKWKDLTDNV | 597 |
| NikA | NVQGEIILDKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGDGTLGGQAKVDNVEGKWKDLTDNV | 559 |
| | ***** | |
| TcsC | NTMAQNLSQVRSISDVTQAIKAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRLAKFATELK | 657 |
| NikA | NTMAQNLSQVRSISDVTQAIKAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRLAKFATELK | 619 |
| | ***** | |
| TcsC | KVARDVGVGDKMGGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDAATDGDFTK | 717 |
| NikA | KVARDVGVGDKMGGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDAATDGDFTK | 679 |
| | ***** | |
| TcsC | LITVNASGEMDELKRKINKMVSNLRDSIQRNAAAREAAELANRTKSEFLANMSHEIRTPM | 777 |
| NikA | LITVNASGEMDELKRKINKMVSNLRDSIQRNAAAREAAELANRTKSEFLANMSHEIRTPM | 739 |
| | ***** | |
| TcsC | NGIIGMTQLTLDLTDLTKPYTREMLNVVHNLANSLLTIIDDLISKIEANRMVIESIPFT | 837 |
| NikA | NGIIGMTQLTLDLTDLTKPYTREMLNVVHNLANSLLTIIDDLISKIEANRMVIESIPFT | 799 |
| | ***** | |
| TcsC | VRGTVFNALKTLAVKANEKFLSLTYQVDNTPDYVIGDPFRLRQIILNLVGNAIKFTFEG | 897 |
| NikA | VRGTVFNALKTLAVKANEKFLSLTYQVDNTPDYVIGDPFRLRQIILNLVGNAIKFTFEG | 859 |
| | ***** | |
| TcsC | EVKLTIRKSDREQCAPNEYAFEFVSDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTTRRFGGTGL | 957 |
| NikA | EVKLTICKSDREQCAANEYAFEFVSDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTTRRFGGTGL | 919 |
| | ***** | |
| TcsC | GLSISKRLVNLMGGDVWVTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLMPYKHHRVLFID | 1017 |
| NikA | GLSISKRLVNLMGGDVWVTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQILPYKNHRVLFID | 979 |
| | *****:.*:***** | |

| | | |
|------|---|------|
| TcsC | KGQNGLQAENIIKMLKQLELEPIVVRDEHDVPPPEIQDPSGKESGHAYDVIIVDSVDTAR | 1077 |
| NikA | KGENGPEAENVLKMMLKLDLEPLVVRNEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVIIVDSVNTAR | 1039 |
| | **:* :* | |
| TcsC | LLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCQPIDLGNGLPALEGRSTPI | 1137 |
| NikA | MLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCEPIDLGNGLPALEGRSTPI | 1099 |
| | ;*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** | |
| TcsC | TTDHSRSFDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVGNGLAVEAVKRRYDVIILMDVQ | 1197 |
| NikA | TTDHSRSFDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVGNGLAVEAVKRRYDVIILMDVQ | 1159 |
| | *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** | |
| TcsC | MPVMGGFEATGKIREYEREAGLSRPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLSKPLKQNM | 1257 |
| NikA | MPVMGGFEATGKIREYERDSGLSRPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLSKPLKQNM | 1219 |
| | *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** | |
| TcsC | MQTILKCATLGGSLLEKSKESSLSSGEIHHHSEG-----KRPGMETRSITASGSIDRGF | 1312 |
| NikA | MQTILKCATLGGSLLEKSKESSLSSGEMHHVHTGPDGKSQRPGMEGRSITSSSATSRTL | 1279 |
| | *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** | |
| TcsC | SSPAAAKDDEIAMERVSDYRSPKAV* | 1337 |
| NikA | ASTSAERTEQLSIDRVRP*----- | 1297 |
| | :* :* : : : : : : : * | |

I. LITERATURVERZEICHNIS

Adamama-Moraitou, K. K., et al. (2011). "*Aspergillus fumigatus* Bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd Dog." J Am Anim Hosp Assoc **47**(2): e13-18.

Aimanianda, V., et al. (2009). "Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores." Nature **460**(7259): 1117-1121.

Amitani, R., et al. (1995). "Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium." Infect Immun **63**(9): 3266-3271.

Arné, P., et al. (2011). "*Aspergillus fumigatus* in Poultry." Int J Microbiol **2011**: 746356.

Azevedo, M.-M., et al. (2015). "Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(34): 7463-7468.

Bahn, Y. S. (2008). "Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway." Eukaryot Cell **7**(12): 2017-2036.

Bahn, Y. S., et al. (2006). "A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*." Mol Biol Cell **17**(7): 3122-3135.

Barachetti, L., et al. (2009). "Bilateral orbital and nasal aspergillosis in a cat." Vet Ophthalmol **12**(3): 176-182.

Barnes, P. D. and K. A. Marr (2007). "Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients." Br J Haematol **139**(4): 519-531.

Barratt, R. W., et al. (1965). "Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*." Genetics **52**(1): 233-246.

Barrs, V. R., et al. (2012). "Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes." Vet J **191**(1): 58-64.

Barrs, V. R., et al. (2013). "*Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs." PLoS One **8**(6): e64871.

Bates, D. W., et al. (2001). "Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy." Clinical Infectious Diseases **32**(5): 686-693.

Beck, J. (2014). Woronin Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphen-Septum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses pathogenen Schimmelpilzes, Imu.

Beckman, B. J., et al. (1994). "*Aspergillus fumigatus* keratitis with intraocular invasion in 15-day-old chicks." Avian Dis **38**(3): 660-665.

Beernaert, L. A., et al. (2010). "*Aspergillus* infections in birds: a review." Avian Pathol **39**(5): 325-331.

Beytut, E., et al. (2004). "Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis." Acta Vet Hung **52**(1): 71-84.

Billen, F., et al. (2009). "Effect of sampling method and incubation temperature on fungal culture in canine sinonasal aspergillosis." J Small Anim Pract **50**(2): 67-72.

Bloemendal, S. and U. Kuck (2013). "Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review." Naturwissenschaften **100**(1): 3-19.

Bradburn, N., et al. (1994). "The aetiology of turkey 'X' disease." **35**(3): 817.

Brown, G. D., et al. (2012). "Hidden killers: human fungal infections." Sci Transl Med **4**(165): 165rv113.

Brown, R. E., et al. (1997). "The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality." Environ Health Perspect **105**(2): 188-200.

Bruder Nascimento, A. C., et al. (2016). "Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence." Mol Microbiol **100**(5): 841-859.

Cacciuttolo, E., et al. (2009). "Anatomopathological aspects of avian aspergillosis." Vet Res Commun **33**(6): 521-527.

Carrasco, L., et al. (1996). "Chronic bronchopulmonary aspergillosis in a horse with Cushing's syndrome." Mycoses **39**(11-12): 443-447.

Chotirmall, S. H., et al. (2013). "*Aspergillus*-associated airway disease,

- inflammation, and the innate immune response." Biomed Res Int **2013**: 723129.
- Cohen, S. N., et al. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." **69**(8): 2110-2114.
- Cole, R. J., et al. (1977). "Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage." J Agric Food Chem **25**(4): 826-830.
- Coyner, K. (2010). "Otomycosis due to *Aspergillus* spp. in a dog: case report and literature review." Vet Dermatol **21**(6): 613-618.
- Dagenais, T. R. and N. P. Keller (2009). "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis." Clin Microbiol Rev **22**(3): 447-465.
- Dalton, J. R. and H. Ainsworth (2011). "Mycotic keratoconjunctivitis in 12-day-old red-legged partridges (*Alectoris rufa*)." Vet Rec **168**(22): 590.
- De Pauw, B., et al. (2008). "Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group." Clin Infect Dis **46**(12): 1813-1821.
- Defosse, T. A., et al. (2015). "Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi." Mol Microbiol **95**(6): 914-924.
- Denning, D. W. (1998). "Invasive aspergillosis." Clin Infect Dis **26**(4): 781-803; quiz 804-785.
- Dichtl, K., et al. (2015). "*Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall beta-1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors." Mol Microbiol **95**(3): 458-471.
- Dobesova, O., et al. (2012). "Guttural pouch mycosis in horses: a retrospective study of 28 cases." Vet Rec **171**(22): 561.
- Donnelly, J. P. (2006). "Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go." Clin Infect Dis **42**(4): 487-489.
- Dotis, J. and E. Roilides (2004). "Osteomyelitis due to *Aspergillus* spp. in patients with chronic granulomatous disease: comparison of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*." Int J Infect Dis **8**(2): 103-110.
- Enoch, D. A., et al. (2006). "Invasive fungal infections: a review of epidemiology

and management options." Journal of Medical Microbiology **55**(7): 809-818.

Fassler, J. S. and A. H. West (2011). "Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence." Eukaryot Cell **10**(2): 156-167.

Fassler, J. S. and A. H. West (2013). "Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways." Eukaryot Cell **12**(8): 1052-1060.

Floss, H. G., et al. (1971). "Further studies on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by *Pseudomonas*." Biochem Biophys Res Commun **45**(3): 781-787.

Furukawa, K., et al. (2005). "*Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress." Mol Microbiol **56**(5): 1246-1261.

G.S. de Hoog, J. G., J. Gené, M.J. Figueras (2000). Atlas of Clinical Fungi.

Galagan, J. E., et al. (2005). "Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*." Nature **438**(7071): 1105-1115.

Garcia-Rodriguez, L. J., et al. (2000). "Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions." J Bacteriol **182**(9): 2428-2437.

Georgiadou, S. P., et al. (2011). "The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts." Clin Infect Dis **52**(9): 1144-1155.

Gow, N. A. R., et al. (2017). "The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function." Microbiol Spectr **5**(3).

Greene, R. E., et al. (2007). "Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign." Clin Infect Dis **44**(3): 373-379.

Groll, A. H. and T. Lehrnbecher (2008). "Posaconazole for paediatric patients: status of development and future perspectives." Mycoses **51 Suppl 2**: 5-11.

Groß, U. (2013). Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Georg Thieme Verlag.

Große, V. and S. Krappmann (2008). "The Asexual Pathogen *Aspergillus fumigatus* Expresses Functional Determinants of *Aspergillus nidulans* Sexual Development." Eukaryot Cell **7**(10): 1724-1732.

Guillot, J., et al. (1997). "*Emericella nidulans* as an agent of guttural pouch mycosis in a horse." J Med Vet Mycol **35**(6): 433-435.

Guillot, J., et al. (1999). "Comparative study of serological tests for the diagnosis of equine aspergillosis." Vet Rec **145**(12): 348-349.

Guinea, J., et al. (2006). "Outdoor environmental levels of *Aspergillus* spp. conidia over a wide geographical area." Med Mycol **44**(4): 349-356.

Hagiwara, D., et al. (2007). "The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*." Biosci Biotechnol Biochem **71**(4): 1003-1014.

Hagiwara, D., et al. (2007). "Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses." Biosci Biotechnol Biochem **71**(3): 844-847.

Hagiwara, D., et al. (2009). "Characterization of NikA histidine kinase and two response regulators with special reference to osmotic adaptation and asexual development in *Aspergillus nidulans*." Biosci Biotechnol Biochem **73**(7): 1566-1571.

Hagiwara, D., et al. (2013). "NikA/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*." PLoS One **8**(12): e80881.

Hammond, S. P., et al. (2010). "Invasive fungal disease in patients treated for newly diagnosed acute leukemia." Am J Hematol **85**(9): 695-699.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Hartmann, T., et al. (2010). "Validation of a self-excising marker in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* by employing the beta-rec/six site-specific recombination system." Appl Environ Microbiol **76**(18): 6313-6317.

Hattel, A. L., et al. (1991). "Pulmonary aspergillosis associated with acute enteritis in a horse." J Am Vet Med Assoc **199**(5): 589-590.

Haustein, S. V., et al. (2008). "Nonhuman primate infections after organ transplantation." ILAR J **49**(2): 209-219.

Hawksworth, D. L. and R. Lucking (2017). "Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species." Microbiol Spectr **5**(4).

Hayashi, S., et al. (2014). "Control of reactive oxygen species (ROS) production through histidine kinases in *Aspergillus nidulans* under different growth conditions." FEBS Open Bio **4**: 90-95.

Heesemann, L. (2010). Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Moleküle des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, Imu.

Hemashettar, B. M., et al. (2006). "*Phaeoacremonium krajdinii*, a cause of white grain eumycetoma." J Clin Microbiol **44**(12): 4619-4622.

Henriet, S. S., et al. (2012). "*Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction." J Infect Dis **206**(7): 1128-1137.

Herivaux, A., et al. (2016). "Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family." PLoS Pathog **12**(7): e1005683.

Hill, M. W., et al. (1971). "Pathogenesis of experimental bovine mycotic placentitis produced by *Aspergillus fumigatus*." Vet Pathol **8**(2): 175-192.

Hill, T. W. and E. J. F. G. R. Kafer (2001). "Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions." **48**(1): 20-21.

Hohmann, S. (2002). "Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts." Microbiol Mol Biol Rev **66**(2): 300-372.

Hospenthal, D. R., et al. (1998). "Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation." Med Mycol **36**(3): 165-168.

Jacobson, E. R., et al. (2000). Mycotic diseases of reptiles. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Elsevier.

Jensen, H. E., et al. (1994). "Gastrointestinal aspergillosis and zygomycosis of cattle." Vet Pathol **31**(1): 28-36.

Johnson, P., et al. (1999). "Sudden death of two horses associated with pulmonary aspergillosis." The Veterinary Record **145**(1): 16-20.

Jones, L. B., et al. (2008). "Special article: chronic granulomatous disease in the

United Kingdom and Ireland: a comprehensive national patient-based registry." Clin Exp Immunol **152**(2): 211-218.

Jurczynski, K., et al. (2012). "Invasive aspergillosis in a putty-nosed monkey (*Cercopithecus nictitans*) with adrenocortical Cushing's syndrome." J Med Primatol **41**(3): 172-175.

Käfer, E. (1965). "Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*." Genetics **52**(1): 217-232.

Kawasaki, L., et al. (1997). "Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress." J Bacteriol **179**(10): 3284-3292.

Kendall, A., et al. (2008). "Enilconazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis." J Vet Intern Med **22**(5): 1239-1242.

Kilani, J. and S. Fillinger (2016). "Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance." Front Microbiol **7**: 2014.

Klich, M. A. (2006). "Identification of clinically relevant aspergilli." Med Mycol **44**(Supplement_1): S127-s131.

Knudtson, W. U. and C. A. Kirkbride (1992). "Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA)." J Vet Diagn Invest **4**(2): 181-185.

Kojima, K., et al. (2004). "Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway." Mol Microbiol **53**(6): 1785-1796.

Krappmann, S., et al. (2006). "Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background." **5**(1): 212-215.

Kwon-Chung, K. J. and J. A. Sogui (2013). "*Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?" PLoS Pathog **9**(12): e1003743.

Labelle, A. L., et al. (2009). "*Aspergillus flavus* keratomycosis in a cat treated with topical 1% voriconazole solution." Vet Ophthalmol **12**(1): 48-52.

Lamarre, C., et al. (2007). "Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*." Fungal Genet Biol **44**(7): 682-690.

Langfelder, K., et al. (2003). "Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi." Fungal Genet Biol **38**(2): 143-158.

Las Heras, A., et al. (2000). "Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy." Vet Rec **147**(20): 578-580.

Latgé, J. P. (1999). "*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis." Clin Microbiol Rev **12**(2): 310-350.

Latgé, J. P., et al. (1994). "Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*." Infect Immun **62**(12): 5424-5433.

Latgé, J. P., et al. (2005). "Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*." Med Mycol **43 Suppl 1**: S15-22.

Lee, J., et al. (1999). "Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast." J Biol Chem **274**(23): 16040-16046.

Lee, S. H., et al. (1986). "Pulmonary aspergillosis and the importance of oxalate crystal recognition in cytology specimens." Arch Pathol Lab Med **110**(12): 1176-1179.

Leiding, J. W. and S. M. Holland (1993). Chronic Granulomatous Disease. GeneReviews((R)). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA), University of Washington, Seattle.

Lepage, O. M., et al. (2004). "The mystery of fungal infection in the guttural pouches." Vet J **168**(1): 60-64.

Lepage, O. M. and C. Piccot-Crezollet (2005). "Transarterial coil embolisation in 31 horses (1999-2002) with guttural pouch mycosis: a 2-year follow-up." Equine Vet J **37**(5): 430-434.

Lew, R. R. (2010). "Turgor and net ion flux responses to activation of the osmotic MAP kinase cascade by fludioxonil in the filamentous fungus *Neurospora crassa*." Fungal Genet Biol **47**(8): 721-726.

Lew, R. R. and N. N. Levina (2007). "Turgor regulation in the osmosensitive cut mutant of *Neurospora crassa*." Microbiology **153**(Pt 5): 1530-1537.

Lew, R. R., et al. (2006). "Role of a mitogen-activated protein kinase cascade in ion flux-mediated turgor regulation in fungi." Eukaryot Cell **5**(3): 480-487.

Lew, R. R. and S. Nasserifar (2009). "Transient responses during hyperosmotic shock in the filamentous fungus *Neurospora crassa*." Microbiology **155**(Pt 3): 903-

911.

Li, S., et al. (2002). "The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p." Mol Biol Cell **13**(2): 412-424.

Lin, S. J., et al. (2001). "Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature." Clin Infect Dis **32**(3): 358-366.

Loretti, A. P., et al. (2003). "Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*." J Vet Diagn Invest **15**(2): 123-132.

Ludwig, A., et al. (2005). "Fungal isolation and identification in 21 cases of guttural pouch mycosis in horses (1998-2002)." Vet J **169**(3): 457-461.

Maina, J. N. (2002). "Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives." Biol Rev Camb Philos Soc **77**(1): 97-152.

Maina, J. N. (2006). "Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone." Biol Rev Camb Philos Soc **81**(4): 545-579.

Marr, K. A., et al. (2004). "Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance." J Infect Dis **190**(3): 641-649.

Marr, K. A., et al. (2004). "Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis." Clin Infect Dis **39**(6): 797-802.

Mascher, T., et al. (2006). "Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 910-938.

Maturu, V. N. and R. Agarwal (2015). "Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis." Clin Exp Allergy **45**(12): 1765-1778.

McCormick, A., et al. (2012). "The Two-Component Sensor Kinase TcsC and Its Role in Stress Resistance of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*." PLoS One **7**(6): e38262.

McCormick, A., et al. (2010). "*Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen." Cellular Microbiology **12**(11): 1535-1543.

Mohammed, M. A., et al. (1980). "Natural and experimental nodular dermatomycosis in chickens." Avian Pathol **9**(2): 185-192.

Morgan, B. A., et al. (1997). "The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **16**(5): 1035-1044.

Morgavi, D. P., et al. (2004). "Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation." Food Addit Contam **21**(9): 871-878.

Moye-Rowley, W. S. (2003). "Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences." Eukaryot Cell **2**(3): 381-389.

Mullins, J., et al. (1976). "Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres)." Clin Allergy **6**(3): 209-217.

Mullis, K., et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Muntz, F. H. (1999). "Oxalate-producing pulmonary aspergillosis in an alpaca." Vet Pathol **36**(6): 631-632.

Nardoni, S., et al. (2006). "Aspergillosis in *Larus cachinnans micaellis*: survey of eight cases." Mycopathologia **161**(5): 317-321.

Navarro, R. E. and J. Aguirre (1998). "Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development." J Bacteriol **180**(21): 5733-5738.

Neofytos, D., et al. (2013). "Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy." Diagn Microbiol Infect Dis **75**(2): 144-149.

Ni, M. and J. H. Yu (2007). "A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*." PLoS One **2**(10): e970.

Nucci, M., et al. (2014). "Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing." PLoS One **9**(1): e87784.

Nucci, M. and K. A. Marr (2005). "Emerging Fungal Diseases." Clinical Infectious Diseases **41**(4): 521-526.

O'Gorman, C. M., et al. (2009). "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic

fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*." Nature **457**(7228): 471-474.

Ochiai, N., et al. (2001). "Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*." Pest Manag Sci **57**(5): 437-442.

Oh, Y. T., et al. (2010). "Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genet Biol **47**(3): 246-253.

Okada, A., et al. (2005). "Pyrrolnitrin Interferes with Osmotic Signal Transduction in *Neurospora crassa*." Journal of Pesticide Science **30**(4): 378-383.

Ostrosky-Zeichner, L. (2012). "Invasive mycoses: diagnostic challenges." Am J Med **125**(1 Suppl): S14-24.

Peeters, D. and C. Clercx (2007). "Update on canine sinonasal aspergillosis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **37**(5): 901-916, vi.

Perez, V., et al. (1998). "Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep." Vet Pathol **35**(4): 235-240.

Perfect, J. R. (2017). "The antifungal pipeline: a reality check." Nat Rev Drug Discov **16**(9): 603-616.

Pfeiffer, C. D., et al. (2006). "Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis." Clin Infect Dis **42**(10): 1417-1427.

Philippe, B., et al. (2003). "Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates." Infect Immun **71**(6): 3034-3042.

Pickering, J. W., et al. (2005). "Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections." J Clin Microbiol **43**(12): 5957-5962.

Pontecorvo, G., et al. (1953). "The genetics of *Aspergillus nidulans*." Adv Genet **5**: 141-238.

Prasanna, S., et al. (2016). "A case of *Aspergillus nidulans* causing white granule mycetoma." Med J Armed Forces India **72**(1): 88-90.

Puntenney, S. B., et al. (2003). Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome. Southwest Nutrition & Management Conference, Pheonix, University of Arizona, Department of Animal Science, Tuscon.

Ram, A. F., et al. (2004). "The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall." Microbiology **150**(Pt 10): 3315-3326.

Ram, A. F. and F. M. Klis (2006). "Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red." Nat Protoc **1**(5): 2253-2256.

Raper, K. B. and D. I. Fennell (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams and Wilkins.

Richard, J. L., et al. (1996). "Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius." Mycopathologia **134**(3): 167-170.

Richard, J. L. and J. R. Thurston (1983). "Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure." Avian Dis **27**(4): 1025-1033.

Rohde, M., et al. (2002). "Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia." FEMS Microbiol Lett **206**(1): 99-105.

Rosenberg, M., et al. (1977). "Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Ann Intern Med **86**(4): 405-414.

Rüchel, R. and U. Reichard (1999). "Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis." Contrib Microbiol **2**: 21-43.

Ruhnke, M., et al. (2015). "Estimated burden of fungal infections in Germany." Mycoses **58 Suppl 5**: 22-28.

Sallam, L. A., et al. (2003). "Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*." J Gen Appl Microbiol **49**(6): 321-328.

Sansom, J., et al. (2005). "Keratomycosis in six horses in the United Kingdom." Vet Rec **156**(1): 13-17.

Sarfati, J., et al. (1996). "Route of infections in bovine aspergillosis." J Med Vet Mycol **34**(6): 379-383.

Schlam, D., et al. (2016). "Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis." MBio **7**(2):

e02242.

Schmidt, A. (1998). "Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*." Mycoses **41**: 89-91.

Schultz, R. M., et al. (2008). "Clinicopathologic and diagnostic imaging characteristics of systemic aspergillosis in 30 dogs." J Vet Intern Med **22**(4): 851-859.

Schwiebacher, M. A. (2005). Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden, Technische Universität München.

Segal, A. W. (1996). "The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease." Mol Med Today **2**(3): 129-135.

Segal, B. H., et al. (2005). "Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection." Clin Infect Dis **40**(11): 1684-1688.

Segal, B. H., et al. (1998). "*Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease." Medicine (Baltimore) **77**(5): 345-354.

Semighini, C. P. and S. D. Harris (2008). "Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species." Genetics **179**(4): 1919-1932.

Seyedmousavi, S., et al. (2015). "*Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease." Medical Mycology **53**(8): 765-797.

Sharman, M., et al. (2010). "Multi-centre assessment of mycotic rhinosinusitis in dogs: a retrospective study of initial treatment success (1998 to 2008)." J Small Anim Pract **51**(8): 423-427.

Sharman, M. J. and C. S. Mansfield (2012). "Sinonasal aspergillosis in dogs: a review." J Small Anim Pract **53**(8): 434-444.

Shor, E. and N. Chauhan (2015). "A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets." PLoS Pathog **11**(2): e1004632.

Singh, P., et al. (2004). "SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis." Infect Immun **72**(4): 2390-2394.

Spadinger, A. (2018). Die Aktivierung der Signalkinase TcsC und des High Osmolarity Glycerol (HOG) Signalwegs in *Aspergillus fumigatus* als neue Strategie zur Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen, lmu.

Steinbach, W. J. and D. A. Stevens (2003). "Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis." Clin Infect Dis **37 Suppl 3**: S157-187.

Stevens, D. A., et al. (2000). "Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*." Clin Infect Dis **30**(4): 696-709.

Su, J. (2018). "A Brief History of Charcot-Leyden Crystal Protein/Galectin-10 Research." Molecules **23**(11).

Sulahian, A., et al. (2014). "Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis." J Clin Microbiol **52**(7): 2328-2333.

Sweeney, C. R. and P. L. Habecker (1999). "Pulmonary aspergillosis in horses: 29 cases (1974-1997)." J Am Vet Med Assoc **214**(6): 808-811.

Talbot, J. J., et al. (2014). "What causes canine sino-nasal aspergillosis? A molecular approach to species identification." Vet J **200**(1): 17-21.

Tasker, S., et al. (1999). "Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases." J Small Anim Pract **40**(10): 473-478.

Taubitz, A., et al. (2007). "Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*." Curr Microbiol **54**(5): 354-360.

Tell, L. A. (2005). "Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine." Med Mycol **43 Suppl 1**: S71-73.

Thompson, G. R., 3rd and T. F. Patterson (2008). "Pulmonary aspergillosis." Semin Respir Crit Care Med **29**(2): 103-110.

Torosantucci, A., et al. (2005). "A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens." J Exp Med **202**(5): 597-606.

Tsai, S. S., et al. (1992). "Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions." Avian Pathol **21**(4): 699-709.

Uri, N., et al. (2003). "Classification of fungal sinusitis in immunocompetent

patients." Otolaryngol Head Neck Surg **129**(4): 372-378.

Van Der Linden, J. W., et al. (2011). "*Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents." Med Mycol **49** Suppl 1: S82-89.

Vargas-Pérez, I., et al. (2007). "Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Eukaryot Cell **6**(9): 1570-1583.

Vaughan, L. M. (1993). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis." Clin Pharm **12**(1): 24-33.

Veraldi, S., et al. (2016). "Mycetoma Caused by *Aspergillus nidulans*." Acta Derm Venereol **96**(1): 118-119.

Verma, R., et al. (2015). "First reported case of *Aspergillus nidulans* eumycetoma in a sporotrichoid distribution." Int J Dermatol **54**(1): 74-77.

Wardlaw, A. and D. M. Geddes (1992). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review." J R Soc Med **85**(12): 747-751.

Weston, M. W. (1990). "Invasive pulmonary aspergillosis in the early postcardiac transplantation period." Clin Cardiol **13**(6): 443-446.

Wheat, L. J. (2006). "Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host." Transpl Infect Dis **8**(3): 128-139.

Wiedemann, A. (2017). *Neue Ansätze für die Diagnostik und die Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen*. München, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wiedemann, A., et al. (2016). "Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species." Int J Med Microbiol **306**(6): 381-390.

Wiedemann, A., et al. (2016). "Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds." Int J Med Microbiol **306**(8): 642-651.

Williams, J. H., et al. (2004). "Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions." Am J Clin Nutr **80**(5): 1106-1122.

Winkelstein, J. A., et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**(3): 155-169.

Wormley, F. L., Jr., et al. (2005). "Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **73**(8): 5022-5030.

Xavier, M. O., et al. (2007). "Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins." **38**(3): 480-484.

Yamauchi, H., et al. (2011). "Thoracic mass in a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*)." Vet Pathol **48**(4): E1-5.

Yelton, M. M., et al. (1984). "Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(5): 1470-1474.

Zhang, S., et al. (2012). "*Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis." J Clin Microbiol **50**(1): 187-191.

Zmeili, O. S. and A. O. Soubani (2007). "Pulmonary aspergillosis: a clinical update." Qjm **100**(6): 317-334.

K. DANKSAGUNG

An allererster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel bedanken. Dir gebührt mein größter Dank. Danke für die intensive Betreuung, die vielen Ratschläge, deine Hilfe, das stets offene Ohr, deine große Geduld und dein Vertrauen. Danke, dass ich Teil deiner Arbeitsgruppe sein durfte.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Reinhard Straubinger für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die Integration in sein Team. Weiterhin danke ich meinen Kollegen Astrid Thomas und Christoph Kleinemeier, die stets halfen, wo sie konnten.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen beiden Kolleginnen Eli und Anna bedanken, mit denen jeder Arbeitstag noch viel schöner war. Es hat wirklich viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Die gemeinsamen Kaffee- und Suppenpausen im Englischen Garten oder der Königin werden mir sehr fehlen.

Danke an alle Mitglieder der AG Straubinger für die schöne Zeit und das angenehme Arbeitsklima am Institut.

Mein letztes und nicht zu kleines Dankeschön geht an meine Familie, meine Freunde und meine Liebe. Danke, dass ihr mich auf unterschiedlichste Weise während der Zeit meiner Promotion unterstützt und immer wieder motiviert habt. Danke, dass ihr immer da wart, mir gut zusprach, mir Halt und Kraft gabt und meine ein oder andere Laune oder Krise ertragen habt. Herz, danke, dass du immer an mich geglaubt hast. Du bist mein Ruhepol und meine größte Stütze.