

Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Lehrstuhl der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum



*Untersuchungen zur Wirkungsweise von
Echinocandin-Antimykotika auf den
humanpathogenen Schimmelpilz
Aspergillus fumigatus*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Loiko

aus
Kaufbeuren

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: *Prof. Dr. Johannes Wagener*

Mitberichterstatter: *PD Dr. Inge Kroidl*
PD Dr. Dimitrios Frangoulidis
PD Dr. Andreas Roggenkamp

Dekan: *Prof. Dr. med. Thomas Gudermann*

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2022

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG



Loiko Veronika

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Echinocandin-Antimykotika auf den humanpathogenen Schimmelpilz Aspergillus fumigatus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 24.05.2022

Ort, Datum

Veronika Loiko

Unterschrift Doktorandin

INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung	1
Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Publikationsliste	4
1. Einleitung.....	5
1.1. Der Schimmelpilz <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
1.2. Die medizinische Bedeutung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
1.2.1. Die durch <i>Aspergillus fumigatus</i> ausgelösten Krankheitsbilder im Steckbrief.....	6
1.2.2. Die Zellwand als Angriffspunkt für Antimykotika	8
1.3. Auswahl der Antimykotika bei invasiver Aspergillose	9
1.3.1. Polyene.....	9
1.3.2. Triazole	10
1.3.3. Echinocandine	10
1.4. Resistenzen und Anpassungsmechanismen gegen Antimykotika	11
1.4.1. Hintergründe zum Auftreten von Azolresistenzen.....	11
1.4.2. Resistenzmechanismen gegenüber Echinocandinen	12
1.4.3. Paradoxes Wachstum als eine Anpassungsreaktion auf Echinocandin-induzierten Stress	13
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
1.6. Zusammenfassung der Publikationen mit Darstellung des Eigenanteils	16
1.6.1. Zusammenfassung des Papers I.....	16
1.6.2. Zusammenfassung des Papers II.....	17
2. Zusammenfassung.....	19
2.1. Deutsche Zusammenfassung.....	19
2.2. English Abstract	20
3. Paper I	21
4. Paper II.....	22
5. Literaturverzeichnis	23
Anhang: Paper III	30
Danksagung.....	31

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
β-1,3-GS	β-1,3-Glukansynthase
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
CFW	Calcofluor white
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CPA	Chronische pulmonale Aspergillose
CWI	Cell wall integrity (pathway)
CYP450	Cytochrom P 450
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOG	High osmolarity glycerol (pathway)
hrCT	High resolution Computertomographie
IA	Invasive Aspergillose
Ig	Immunglobulin
MEC	Minimale effektive Konzentration (Minimal effective concentration)
MIC	Minimale Hemmkonzentration (Minimal inhibitory concentration)
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
spp.	Species

PUBLIKATIONSLISTE

The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the beta-1,3-Glucan Synthase Fks1

Loiko, V.; Wagener, J.; *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017, 61(2). DOI: 10.1128/aac.01690-16.

Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*

Geißel, B.; Loiko, V.; Klugherz, I.; Zhu, Z.; Wagener, N.; Kurzai, O.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Wagener, J.; *Nature communications*, 2018, 9(1):3098. DOI: 10.1038/s41467-018-05497-7.

Der im Folgenden aufgeführte Review-Artikel ist nicht Bestandteil der kumulativen Dissertation.

Recent Insights into the Paradoxical Effect of Echinocandins

Wagener, J.; Loiko, V.; *Journal of fungi*, 2018, 4(1):5. DOI: 10.3390/jof4010005.

1. EINLEITUNG

1.1. DER SCHIMMELPILZ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Schimmelpilze sind dem Menschen wohlbekannte Lebewesen. Aufgrund ihrer häufig saprophytären Lebensweise und der ubiquitären luftgetragenen Verteilung ihrer Sporen tauchen sie beispielsweise auf verderbenden Nahrungsmitteln oder anderem organischen Material auf (Samson et al. 2014). Neben der im Zentrum dieser Arbeit stehenden Spezies *Aspergillus fumigatus* aus der Gruppe der Askomyzeten finden sich hierunter eine Vielzahl verschiedener Schimmelpilzarten mit unterschiedlicher Morphologie. Betrachtet man das gesamte Spektrum der Pilze, wird die Zahl an verschiedenen Spezies weltweit auf etwa 1,5 Millionen geschätzt, die sich teilweise stark in Aussehen, Lebensform und ihrer Bedeutung für den Menschen unterscheiden (Hawksworth 2001).

Die Gattung *Aspergillus* verdankt ihren Namen der Form der Konidienträger (Konidiophoren), die den Erstbeschreiber Pierantonio Micheli an den in der Kirche verwendeten Weihwasserpregel, auch Aspergill genannt, erinnerte (Micheli und Gastone 1729). Die hydrophoben, etwa 2,5 bis 3,0 µm großen, bei der Spezies *A. fumigatus* blaugrünen Konidien lieferten den Beinamen in Anlehnung an das lateinische Wort *fumus* für Rauch (Fresenius 1863).

In der Gattung *Aspergillus* sind aktuell mehr als 250 Spezies bekannt, die wiederum in mehrere Komplexe eingeteilt werden. In der Humanmedizin am relevantesten sind die fünf Komplexe *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* und *Nidulante*; hiervon ist wiederum *A. fumigatus*, auch *A. fumigatus sensu strictu*, aus dem *Fumigati*-Komplex am bedeutendsten (Sugui et al. 2015). Dem *A. fumigatus sensu lato*-Komplex werden neben der namensgebenden noch elf, von einigen Experten sogar bis zu 63 weitere Spezies zugeordnet, darunter *A. udagawae*, *A. pseudofischeri*, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis*, die zum Teil nur durch molekulare Untersuchungen voneinander unterschieden werden können (Sugui et al. 2015; Frisvad und Larsen 2015).

1.2. DIE MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Unter allen Spezies der Gattung *Aspergillus* stellt *A. fumigatus* die mit Abstand häufigste krankheitsverursachende Spezies dar, insbesondere bei Infektionen der Lunge, gefolgt von *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans* (Kosmidis und Denning 2015; Garnacho-Montero et al. 2013). Interessanterweise wurden in drei bis sechs Prozent der Patienten mit invasiver Aspergillose (IA) von *A. fumigatus* abweichende Spezies aus dem *A. fumigatus sensu lato*-Komplex isoliert. Die tatsächliche Prävalenz von Infektionen durch *A. fumigatus sensu lato*-Spezies könnte jedoch höher liegen, da konventionelle Methoden oft nicht zur eindeutigen Differenzierung ausreichen und es dadurch zu einer Fehlidentifizierung als *A. fumigatus sensu strictu* kommt (Lamoth 2016; Sugui et al. 2015).

Aufgrund der aerogenen Verbreitung von Schimmelpilzsporen ist die Lunge das am häufigsten befallene Organ. Darüber hinaus können beispielsweise die Nasennebenhöhlen, der Gastrointestinaltrakt oder die Haut betroffen sein (Bennett 2009; Latgé 1999; Taccone et al. 2015; Kousha et al. 2011; Denning 1998).

Inhalierte Sporen gelangen aufgrund ihrer geringen Größe bis in die Alveolen (Latgé 1999). Selbst wenn sie nicht durch mukoziliäre Reinigung durch das Flimmerepithel aus den Atemwegen herausbefördert werden, bleibt dies meist folgenlos, da die Konidien durch verschiedene pathogenerkennende Rezeptoren der Alveolarmakrophagen erkannt, phagozytiert und abgetötet werden (Kousha et al. 2011; Drummond und Brown 2011). Liegt jedoch ein hyperreagibles, mäßig oder stark geschwächtes Immunsystem vor, kann es zu einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose, zu einer chronischen pulmonalen Aspergillose mit oder ohne Aspergillom oder zu einer invasiven Aspergillose kommen (Kousha et al. 2011).

1.2.1. DIE DURCH *ASPERGILLUS FUMIGATUS* AUSGELÖSTEN KRANKHEITSBILDER IM STECKBRIEF

Eine **allergische bronchopulmonale Aspergillose** (ABPA) kann sich durch eine Sensibilisierung auf *A. fumigatus* auf dem Boden einer atopischen Grunderkrankung oder zystischen Fibrose entwickeln (Latgé 1999; Kousha et al. 2011). So kann ein hyperreagibles Immunsystem auf die eingeatmeten Sporen durch Verstärkung eines bestehenden Asthmas bronchiale oder einer Allergie reagieren. Umstritten ist, ob eine hohe Sporenkonzentration in der unmittelbaren Atemluft allein ursächlich für die Entstehung einer ABPA ist (Tillie-Leblond und Tonnel 2005). Die Erkrankung kann sich klinisch als schlecht kontrolliertes Asthma mit Hämoptysen, Fieber, schwerem Krankheitsgefühl, Brustschmerzen und dem Abhusten von Schleim darstellen (Kousha et al. 2011; Tillie-Leblond und Tonnel 2005). Diagnostisch wegweisend sind neben der klinischen Symptomatik erhöhte *Aspergillus*-spezifische IgE-Level oder ein positiver *Aspergillus*-Hauttest (Richardson und Page 2017; Patterson et al. 2016). Die Therapie erfolgt durch orale Kortikosteroide, teilweise in Kombination mit Triazol-Antimykotika (Kousha et al. 2011; Patterson et al. 2016).

Die **chronische pulmonale Aspergillose** (CPA) tritt vorwiegend bei beispielsweise durch eine Kortikosteroid-Therapie mäßig eingeschränktem Immunsystem auf. Begünstigt wird sie durch zugrundeliegende oder abgelaufene kavitäre oder bullöse Lungenerkrankungen, beispielsweise Tuberkulose oder COPD (Kosmidis und Denning 2015). Im Rahmen einer CPA kann auch ein Aspergillom entstehen. Hierbei handelt es sich um einen abgetrennten Pilzball ohne Merkmale invasiven Wachstums. Dieser kann nicht nur in der Lunge, sondern in sämtlichen präformierten Körperhöhlen vorkommen (Kosmidis und Denning 2015). Neben Allgemeinsymptomen wie Gewichtsverlust, einem starken Krankheitsgefühl, Nachtschweiß und Appetitlosigkeit kann sich die CPA auch mit chronischem produktiven Husten, Dyspnoe, Brustschmerzen oder Hämoptysis

manifestieren (Kosmidis und Denning 2015). Mögliche radiologische Befunde sind Kavitäten mit oder ohne sichtbaren Pilzball, Infiltrate, Knötchen sowie eine Fibrose des Lungen- oder Pleuragewebes (Kosmidis und Denning 2015). Zur Diagnosestellung kann *Aspergillus*-spezifisches IgG untersucht werden (Richardson und Page 2017; Patterson et al. 2016). Außerdem ist der Nachweis von *Aspergillus* mittels Kultur oder PCR im Sputum, Biopsat oder Aspirat hilfreich (Patterson et al. 2016; Kosmidis und Denning 2015). Medikamente der ersten Wahl sind die Triazole Voriconazol und Itraconazol (Patterson et al. 2016; Kosmidis und Denning 2015; Ullmann et al. 2018). Liegt ein Aspergillom vor, sollte eine chirurgische Resektion erfolgen (Ullmann et al. 2018), gegebenenfalls begleitet von prä- und postoperativer Antimykotika-Gabe zur Verhinderung eines konsekutiven Empyems (Patterson et al. 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate einer CPA liegt insgesamt zwischen 50 und 85 % (Richardson und Page 2017; Kosmidis und Denning 2015).

Liegt dagegen eine deutliche Schwäche des Immunsystems vor, kann es zum invasiven Wachstum der in den Atemwegen auskeimenden Sporen aus der Atemluft und somit zu einer **invasiven Aspergillose (IA)** kommen, bei der es zur Infiltration ins Parenchymgewebe und Bronchial- und Gefäßsystem kommt (Kosmidis und Denning 2015). Eine Beteiligung anderer Organe, wie beispielsweise von Gehirn, Haut, Nieren, Augen oder Sinus, ist sowohl primär möglich als auch infolge einer Dissemination bei Einbruch in das Gefäßsystem (Kosmidis und Denning 2015).

Zu den klassischen Risikofaktoren zählen das Auftreten einer Neutropenie, hämatopoetische Stammzell- oder Organtransplantationen, eine prolongierte Hochdosis-Kortikosteroid- oder eine zytotoxische Therapie sowie das Vorliegen einer hämatoonkologischen, einer AIDS-Erkrankung oder einer septischen Granulomatose (Kousha et al. 2011; Denning 1998). Darüber hinaus wurden als weitere Risikofaktoren eine fortgeschrittene COPD mit oder ohne systemische Kortikosteroidbehandlung, die Notwendigkeit eines intensivstationären Aufenthalts sowie eine vorliegende Influenza-Infektion identifiziert (Kousha et al. 2011; Lilienfeld-Toal et al. 2019).

Die meist unspezifischen Symptome einer IA ähneln in der Regel denen einer Bronchopneumonie und können ein auf Antibiotika nicht ansprechendes Fieber, Husten, Auswurf, Atemnot sowie pleuritische Brustschmerzen beinhalten (Kousha et al. 2011; Denning 1998; Ruhnke et al. 2012). Weitere Symptome können im Rahmen einer hämatogenen Streuung in andere Organe auftreten (Denning 1998; Kousha et al. 2011).

Zum sicheren Nachweis einer pulmonalen invasiven Aspergillose ist eine histopathologische Untersuchung eines Biopsats notwendig (Patterson et al. 2016); die typischen septierten, verzweigten, das Lungengewebe infiltrierenden Hyphen lassen sich am besten nach pilzspezifischer PAS-, Grocott-Methenamin-Silber- oder CFW-Färbung des Präparats erkennen (Ruhnke et al. 2012). In Kombination mit einer von derselben Stelle stammenden *Aspergillus*-positiven Kultur beweist dies eine *Aspergillus*-Infektion (Kousha et al. 2011). Während Blutkulturen und *Aspergillus*-Antikörper

insbesondere bei immunsupprimierten Patienten typischerweise negative Ergebnisse bei IA liefern (Kousha et al. 2011; Ruhnke et al. 2012), wird die Untersuchung von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit empfohlen (Garnacho-Montero et al. 2013; Ullmann et al. 2018; Ruhnke et al. 2012). Neben dem Anfertigen einer Kultur kann es sinnvoll sein, auf das Vorliegen von Antigenen wie Galaktomannan und β -1,3-Glukan oder von Pilz-DNS mittels PCR zu testen (Kousha et al. 2011; Kosmidis und Denning 2015; Ullmann et al. 2018; Ruhnke et al. 2012). Die Kombination verschiedener Testmethoden kann bei der klinischen Einschätzung helfen (Kosmidis und Denning 2015; Ullmann et al. 2018). In der Bildgebung mittels hrCT zeigen sich als mögliche Befunde multiple Knoten, Halo-Zeichen sowie Luftsicheln, welche nicht als pathognomonisch, jedoch als hinweisend gewertet werden (Kousha et al. 2011; Ruhnke et al. 2012).

Zur Erstlinientherapie werden Voriconazol oder Isavuconazol über sechs bis zwölf Wochen empfohlen (Ullmann et al. 2018; Köhler et al. 2019; Lilienfeld-Toal et al. 2019). Neben den Azolen stehen noch Amphotericin B sowie Echinocandine zur Salvage-Therapie zur Verfügung (Patterson et al. 2016; Lilienfeld-Toal et al. 2019). Einige Versuche *in vitro* wie auch Studien *in vivo* ergaben Hinweise darauf, dass eine Kombination verschiedener Substanzen möglicherweise zu besseren Ergebnissen führt (Ledoux et al. 2017; Marr et al. 2015; Perea et al. 2002; Philip et al. 2005; Patterson et al. 2016). Trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist die Letalität einer IA mit 30 bis 100 % weiterhin sehr hoch (Kousha et al. 2011; Chowdhary et al. 2017; van Paassen et al. 2016; Beardsley et al. 2018; Montagna et al. 2013; Meersseman et al. 2004; Perea und Patterson 2002).

1.2.2. DIE ZELLWAND ALS ANGRIFFSPUNKT FÜR ANTIMYKOTIKA

Aus medizinischer Sicht ist die Zellwand pathogener Pilze vor allem aus drei Gründen relevant: Zum einen stellen ihre überwiegend nicht im menschlichen Körper vorkommenden Strukturen ein geeignetes Ziel für Antimykotika dar (Debono und Gordee 1994; Hector 1993). Zum anderen vermittelt sie die Interaktion mit Immunzellen (Lee und Sheppard 2016). Darüber hinaus können einzelne Komponenten zur Diagnostik herangezogen werden. So lassen sich beispielsweise Galaktomannan und β -1,3-Glukan im Serum von an IA erkrankten Patienten finden (Sarwar et al. 2020).

Die Zellwand der Pilze besteht aus verschiedenen Kohlenhydratketten (Beauvais und Latgé 2001; Wagener et al. 2020), vernetzt mit Proteinen (Debono und Gordee 1994), ergänzt durch Lipide und Pigmente (Latgé et al. 2017; Lee und Sheppard 2016). Soweit bekannt, ist β -1,3-Glukan der vorwiegende Zellwandbestandteil in allen Hefe- und Schimmelpilzen und bildet eine Art Gerüst für andere Polysaccharide (Beauvais et al. 2001; Fontaine et al. 2000; Wagener et al. 2020). β -1,3-Glukan ist aus medizinischer Sicht besonders hervorzuheben, da es durch den Dectin-1-Rezeptor der Immunzellen erkannt wird und zur Phagozytose führt (Drummond und Brown 2011). Es wird durch das Enzym β -1,3-Glukansynthase (β -1,3-GS, Fks1) hergestellt, das wiederum das

Drug Target für die Gruppe der Echinocandin-Antimykotika darstellt, welche fungizid auf Hefen und fungistatisch auf Aspergillen wirken (Dichtl et al. 2015).

Der Glukansynthasekomplex von *A. fumigatus* besteht aus zwei Bestandteilen, der katalytischen Untereinheit Fks1 sowie der Untereinheit Rho1, einer kleinemolekularen GTPase, die die β -1,3-GS-Aktivität reguliert (Beauvais et al. 2001; Perlin 2007; Wagener et al. 2020). Er befindet sich bei *A. fumigatus* an den apikalen Hyphen als dem Ort besonders starken Wachstums (Beauvais et al. 2001). Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die β -1,3-GS wie in allen anderen bisher untersuchten Pilzen essenziell für *A. fumigatus* ist (Beauvais et al. 2001). Dies konnte durch unsere Arbeitsgruppe jedoch durch die erfolgreiche Herstellung einer konditionellen *fks1*-Mutante sowie einer lebensfähigen *fks1*-Deletionsmutante widerlegt werden (Dichtl et al. 2015). Diese Mutanten zeichnen sich makroskopisch durch langsam wachsende Kolonien mit fehlender Sporenbildung sowie mikroskopisch durch irregulär und langsam wachsende, stark verzweigte Hyphen mit häufiger Zelllyse aus (Dichtl et al. 2015; Wagener et al. 2020). Diese Morphologie entspricht derjenigen von Wildtyp-Hyphen unter Einwirkung von Echinocandinen und liefert mit der Tatsache der Lebensfähigkeit der *fks1*-Deletionsmutante die Erklärung für die nur fungistatische Wirkung von Echinocandinen auf *A. fumigatus* (Dichtl et al. 2015; Wagener et al. 2020).

1.3. AUSWAHL DER ANTIMYKOTIKA BEI INVASIVER ASPERGILLOSE

Während eine chirurgische Entfernung nur in seltenen Fällen, wie bei einem abgekapselten Aspergillom, die Therapie der Wahl ist, müssen invasive *Aspergillus*-Infektionen in der Regel medikamentös therapiert werden (Patterson et al. 2016).

Bei den zuvor genannten Risikopatienten ist jedoch bereits die Vermeidung einer Pilzinfektion von großer Bedeutung. Hierzu werden Maßnahmen zur Gewährleistung hoher hygienischer Standards, nach Möglichkeit eine Unterbringung in Reinluftäumen sowie bei hohem Risiko eine Chemoprophylaxe mit den Wirkstoffen Posaconazol, Voriconazol oder Micafungin empfohlen (Patterson et al. 2016; Ullmann et al. 2018; Denning 1998; Köhler et al. 2019). Kommt es dennoch zu einer Infektion, stehen aktuell drei Klassen an Antimykotika zur Verfügung, welche im Folgenden mit Fokus auf die Behandlung der IA näher betrachtet werden.

1.3.1. POLYENE

Das lange als Erstlinientherapeutikum verwendete Amphotericin B gehört der Klasse der Polyene an (Moen et al. 2009). Seine Wirkung beruht auf einer irreversiblen Bindung von Ergosterol an extramembranöse Aggregate der Wirkstoffmoleküle und auf Porenbildung mit konsekutivem Verlust der osmotischen Stabilität, wodurch schließlich der Zelltod eintritt (Ghannoum und Rice 1999; Beauvais und Latgé 2001; Moen et al. 2009; Anderson et al. 2014). Es wird angenommen, dass darüber hinaus auch oxidationsabhängige Effekte und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

zur Wirksamkeit beitragen (Beauvais und Latgé 2001; Adler-Moore et al. 2016). Inzwischen werden weitgehend liposomale Rezeptierungen verwendet, welche ein besseres Nebenwirkungsprofil als die ursprüngliche Deoxycholat-Verbindung bei gleichwertiger Wirksamkeit aufweisen (Beauvais und Latgé 2001; Adler-Moore et al. 2016). Dennoch ist die Toxizität von Amphotericin B im Vergleich zu anderen Antimykotika hoch (Moen et al. 2009; Jenks und Hoenigl 2018), weshalb es seinen Stellenwert als Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung der IA verloren hat (Ullmann et al. 2018). Es steht weiterhin bei der Behandlung von *Aspergillus*-Infektionen bei Neugeborenen sowie bei Versagen einer Erstlinientherapie mit Azolen bei Erwachsenen oder bei hohen Resistenzraten zur Verfügung (Ullmann et al. 2018; Verweij et al. 2015). Seine fungizide Wirkung entfaltet es zudem auch auf andere Pilzarten, wie beispielsweise *Mucorales* oder *Candida* spp. (Hamill 2013).

1.3.2. TRIAZOLE

Seit den frühen 1990er Jahren wurden aus der Wirkstoffklasse der Triazole bisher Voriconazol, Posaconazol, Itraconazol und als jüngste Substanz Isavuconazol zugelassen (Hossain und Ghannoum 2000; Jenks und Hoenigl 2018; Patterson et al. 2016). Azole werden zur Erstlinientherapie der meisten durch *Aspergillus* spp. ausgelösten Infektionen herangezogen (Patterson et al. 2016) und erzielen ihre Wirkung durch Hemmung des für die Ergosterolbiosynthese zuständigen Enzyms Lanosterol-14 α -Demethylase (Hossain und Ghannoum 2000). Ergosterol ist ein für die Fluidität und Integrität wichtiger Bestandteil der Pilzmembran (Ghannoum und Rice 1999). Wird Lanosterol-14 α -Demethylase durch ein Azol gehemmt, kommt es zum Ergosterolmangel sowie zur Akkumulation von Vorläuferprodukten und daraus folgend zu einer veränderten Struktur und Funktion der Plasmamembran (Ghannoum und Rice 1999; Chowdhary et al. 2017; Beauvais und Latgé 2001). Aufgrund des von Cytochrom P450 (CYP450) abhängigen Wirkstoffmetabolismus ergibt sich ein problematisches Wechselwirkungspotenzial mit zahlreichen Medikamenten (Hossain und Ghannoum 2000). Seltene mögliche Nebenwirkungen sind Nieren- und Leberschäden, Sehstörungen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall (Jørgensen et al. 2014; Wang et al. 2015; Kousha et al. 2011). Während Triazole auf Hefen fungistatisch wirken, führen sie bei Schimmelpilzen zum Zelltod. Ein hierfür zugrundeliegender Mechanismus besteht in der Ausbildung von Zellwandkohlenhydrat-Patches, wie unsere Arbeitsgruppe in einer der im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Publikationen zeigen konnte (Geißel et al. 2018).

1.3.3. ECHINOCANDINE

Die Echinocandine, die jüngste Klasse der Antimykotika, haben als Zielstruktur das in der Zellwand lokalisierte Enzym β -1,3-GS. Durch Bindung hieran hemmen sie die Produktion des wichtigen Zellwandbestandteils β -1,3-Glukan (Douglas et al. 1997).

2001 wurde erstmalig Caspofungin in den USA als Mittel gegen invasive Pilzinfektionen zugelassen (Patil und Majumdar 2017; Chen et al. 2011). 2005 und 2006 folgten jeweils die klinischen Zulassungen für Micafungin und Anidulafungin (Chen et al. 2011). Weitere Echinocandine befinden sich in Entwicklung. So könnte das Spektrum der zugelassenen Echinocandine zum Beispiel bald durch das einmal wöchentlich anzuwendende CD101 (Rezafungin) erweitert werden (Sandison et al. 2017; Ong et al. 2016; Rauseo et al. 2020).

Echinocandin-Antimykotika können je nach Pilzart sowohl fungizid als auch fungistatisch wirken. In Hefen führt die durch die Hemmung der β -1,3-GS ausgelöste Zelllyse zum Tod des Pilzes (Cappelletty und Eiselstein-McKittrick 2007), bei Schimmelpilzen hingegen kommt es zum Wachstumsarrest (Hector 1993) und zu den kennzeichnenden kurzen, stark verzweigten Hyphen mit verdickten Zellwänden, die osmotisch instabil werden und zur Lyse neigen (Ghannoum und Rice 1999). Dieser Unterschied wird damit erklärt, dass *A. fumigatus* im Gegensatz zu beispielsweise *Candida* spp. ohne β -1,3-GS lebensfähig ist (Dichtl et al. 2015).

Echinocandine stehen als Mittel der ersten Wahl bei invasiver Candidiasis (Pappas et al. 2016) und bei IA als Mittel der weiteren Wahl zur Verfügung (Ullmann et al. 2018). In einigen Fällen wird eine Kombination mit Voriconazol bereits in der Erstlinientherapie empfohlen (Marr et al. 2015; Verweij et al. 2015). Ihr entscheidender Vorteil besteht in der im Vergleich zu anderen Antimykotika sehr guten Verträglichkeit. Mögliche Nebenwirkungen sind hepatotoxische Effekte, Phlebitiden, Ausschlag oder Übelkeit, welche jedoch selten in therapielimitierendem Ausmaß auftreten (Wang et al. 2015; Kousha et al. 2011). Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten oder CYP450-Interaktionen kommen kaum vor (Chen et al. 2011).

1.4. RESISTENZEN UND ANPASSUNGSMECHANISMEN GEGEN ANTIMYKOTIKA

Das Auftreten von Antimykotika-Resistenzen ist neben der Pilzspezies und Grunderkrankung, Immunstatus, Komorbiditäten, Compliance des Patienten, dem betroffenen Organ, der Dosierung und auftretenden Nebenwirkungen ein maßgeblicher Faktor für den Erfolg einer Therapie (Beardsley et al. 2018). Werden Resistenzen nicht rechtzeitig erkannt, kann dies zu höheren Mortalitätsraten führen, da eine wirksame Therapie erst verzögert – nach Versagen der Erstlinientherapie – eingesetzt wird (van Paassen et al. 2016).

1.4.1. HINTERGRÜNDE ZUM AUFTRETEN VON AZOLRESISTENZEN

Triazol-resistente Stämme treten sowohl unter *Candida* spp. als auch *Aspergillus* spp. auf. Neben der Zunahme von Infektionen durch Spezies aus dem *A. fumigatus sensu lato*-Komplex, welche teilweise mit einer anderen Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika einhergehen als *A. fumigatus sensu strictu* (Lamoth 2016), werden auch vermehrt *A. fumigatus sensu strictu*-Stämme mit Azol-Resistenzen isoliert (Goncalves et al. 2016). In den meisten Ländern gelten Resistenzen als ungewöhnlich, doch in

einzelnen europäischen klinischen Zentren, insbesondere nach langwieriger Azol-Behandlung bei chronischer kavitärer Aspergillose, scheint die Prävalenz auf bis zu 27 % zu steigen (Goncalves et al. 2016). Hohe Resistenzraten von bis zu 30 % bei Patienten ohne vorangehende antimykotische Therapie in den Niederlanden deuten auf eine Verbreitung resistenter Sporen über die Umwelt hin (Goncalves et al. 2016; Fisher et al. 2018). Ein Zusammenhang mit der verbreiteten Anwendung von Azolen in Landwirtschaft und Tierhaltung wird angenommen (Snelders et al. 2009; Snelders et al. 2008; van der Linden et al. 2015; Chowdhary et al. 2017; Abdolrasouli et al. 2018; Bromley et al. 2014).

Aktuell werden vier verschiedene Mechanismen als ursächlich für die Resistenzen angesehen. (1) Eine verstärkte Funktion von Effluxpumpen führt zu einer herabgesetzten intrazellulären Azol-Konzentration (Morschhauser 2010; Goncalves et al. 2016). Dieser Mechanismus wurde in *Aspergillus* nur *in vitro* untersucht und konnte in resistenten klinischen Isolaten bisher nur aufgrund einer niedrigen intrazellulären Azol-Konzentration vermutet werden (Denning et al. 1997). (2) Veränderungen der Zielstruktur Lanosterol-14 α -Demethylase (ERG11 in *Candida* spp., CYP51 in *Aspergillus* spp.) resultieren in einer reduzierten Affinität des Wirkstoffs zur Zielstruktur und/oder einer schwächeren Hemmung der Ergosterolbiosynthese aufgrund einer hochregulierten Enzymproduktion (Perea und Patterson 2002). Die Lanosterol-14 α -Demethylase in *Aspergillus* spp. wird von zwei Genen kodiert, *cyp51A* und *cyp51B*. In Triazol-resistenten klinischen Isolaten wurden bisher vor allem Veränderungen im Gen oder in der Promoterregion von *cyp51A* gefunden (Arendrup et al. 2008; Goncalves et al. 2016; Chowdhary et al. 2017; Wiederhold 2017). (3) Auch nicht-*cyp51A*-Mutationen wurden beschrieben (Chowdhary et al. 2017; Romero et al. 2019; Hagiwara et al. 2018), insbesondere Mutationen der HMG-CoA-Reduktase, die zu einem veränderten Ergosterolprofil führen (Rybak et al. 2019; Hagiwara et al. 2018). (4) Darüber hinaus wird auch die Induktion einer zellulären Stressantwort als ursächlich für Resistenzbildung genannt (Li et al. 2019).

1.4.2. RESISTENZMECHANISMEN GEGENÜBER ECHINOCANDINEN

Auch wenn Resistenzen gegenüber Echinocandinen als ausgesprochen selten gelten, zeigen einzelne Studien und Fallberichte eine Zunahme vor allem bei *Candida* spp., während die Datenlage zu *Aspergillus* spp. stark begrenzt ist (Wiederhold 2016).

Als dominierender Mechanismus von Echinocandin-Resistenzen wird eine veränderte β -1,3-GS beschrieben (Perlin 2007; Walker et al. 2010). So wurden in resistenten Isolaten von *Candida* spp. mehrfach Punktmutationen in den die β -1,3-GS kodierenden Genen nachgewiesen (Goncalves et al. 2016; Fekkar et al. 2013; Alexander et al. 2013; Wiederhold 2016; Garcia-Effron et al. 2009). Analog hierzu weisen *in vitro*-Studien in *Aspergillus* spp. auf derartige Mutationen in der β -1,3-GS als möglichen Resistenzmechanismus auch in dieser Gattung hin (Rocha et al. 2007; Walker et al. 2010; Gardiner et al. 2005); derartige Mutationen konnten jedoch bisher nur in

Einzelfällen in resistenten klinischen Isolaten dieser Gattung nachgewiesen werden (Jiménez-Ortígoza et al. 2017).

Weiterhin wurde eine veränderte Zellwandzusammensetzung im Sinne einer Erhöhung der Chitinproduktion als Kompensationsmechanismus vielfach diskutiert (Goncalves et al. 2016; Gardiner et al. 2005; Walker et al. 2010; García-Rodríguez et al. 2000). Einige *in vitro* hergestellte *C. albicans*-Mutanten mit einem erhöhten Chitingehalt wurden mit einer Caspofungin-Resistenz assoziiert, so dass es sich hierbei durchaus um einen möglichen Resistenzmechanismus oder einen begleitenden Prozess handeln könnte (Plaine et al. 2008).

Neuere Untersuchungen klinischer Isolate von *A. fumigatus* ohne auffindbare Mutationen in der β -1,3-GS weisen darauf hin, dass eine durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte veränderte Anordnung von Lipiden in der Plasmamembran um die β -1,3-GS deren Caspofungin-Empfindlichkeit herabsetzt (Satish et al. 2019). Diese Ergebnisse sind insbesondere mit den von uns zuvor publizierten Ergebnissen vereinbar, welche ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind (Loiko und Wagener 2017).

1.4.3. PARADOXES WACHSTUM ALS EINE ANPASSUNGSREAKTION AUF ECHINOCANDIN-INDUZIERTEN STRESS

Bereits in Versuchen mit dem frühen Echinocandin Cilofungin fiel auf, dass einige Stämme der Spezies *C. albicans* und *C. tropicalis* in dessen Gegenwart Wachstum bei Konzentrationen zeigten, die oberhalb derer mit partieller Hemmung lagen (Hall et al. 1988). Dieses Echinocandin-spezifische „paradoxe Wachstum“ bestätigte sich später bei Empfindlichkeitstestungen in Verdünnungsplatten auch bei anderen Pilzspezies der Gattungen *Candida* und *Aspergillus* (Chamilos et al. 2007; Antachopoulos et al. 2007). Dabei handelt es sich um die Fähigkeit einiger Stämme in der Gegenwart von hohen Echinocandin-Konzentrationen weit oberhalb der minimalen effektiven Konzentration (MEC) bzw. der minimalen Hemmkonzentration (MIC) zu wachsen, obwohl sie bei ebenfalls über der MEC/MIC liegenden niedrigeren Konzentrationen gehemmt beziehungsweise abgetötet werden (Wagener und Loiko 2017).

Die Frage, ob paradoxes Wachstum nur ein *in vitro* zu beobachtendes Phänomen ist oder auch *in vivo* eine wichtige Rolle spielt, wurde vielfach diskutiert, jedoch nicht abschließend geklärt (Wagener und Loiko 2017). Tiermodelle liefern Hinweise auf ein Vorhandensein dieses Effekts *in vivo* (Wagener und Loiko 2017). Das Auftreten von paradoxem Wachstum ist abhängig von der Spezies, ihrer Wachstumsform, dem Echinocandin, der Einwirkzeit, dem Medium und seinen Zusätzen (Antachopoulos et al. 2008; Fleischhacker et al. 2008; Stevens et al. 2004; Chamilos et al. 2007; Steinbach et al. 2015; Wagener und Loiko 2017; Loiko und Wagener 2017). Es konnte widerlegt werden, dass Mutationen im Gen *fts1* oder Ausfällung oder Zerfall des Echinocandins für diesen Effekt verantwortlich sind (Stevens et al. 2005; Rueda et al. 2014). Mikrokolonien, die zuvor bei

hoher Echinocandin-Konzentration paradox gewachsen sind, sind in neuem Medium mit mittlerer Konzentration wieder uneingeschränkt empfindlich (Stevens et al. 2004). Die molekularen Grundlagen dieses Phänomens konnten bisher nicht geklärt werden, es wurden jedoch einige Pathways damit assoziiert. So wurde gezeigt, dass der vor dem Auftreten paradoxen Wachstums beobachtete Anstieg des Zellwandchitins eng mit dem CWI- und dem HOG-Pathway verknüpft ist (Walker et al. 2008; Dichtl et al. 2012) und abhängig von Calcineurin und Heat Shock Protein 90 abläuft (Fortwendel et al. 2009; Lamoth et al. 2012; Lamoth et al. 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass paradoxes Wachstum auf einem Wiedereinsetzen der β -1,3-GS nach vorheriger starker Hemmung ebendieser basiert (Loiko und Wagener 2017). Die oben genannten Effekte können deshalb als notwendige Kompensationsmechanismen verstanden werden, welche durch eine verbesserte Überlebensfähigkeit das Aussprossen paradoxer Hyphen überhaupt erst ermöglichen (Wagener und Loiko 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten durch die Experimente einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden, die zudem beobachtete, dass die Lokalisation von Fks1 in Anwesenheit von Caspofungin von den Hyphenspitzen zu den Vakuolen hin wechselt (Moreno-Velasquez et al. 2017). Bei beständiger Exposition gegenüber hohen Caspofungin-Konzentrationen wird dies rückgängig gemacht, was als Voraussetzung für die wiederhergestellte Funktionsfähigkeit der β -1,3-GS verstanden werden kann (Moreno-Velasquez et al. 2017). Einen weiteren Baustein im Verständnis dieser Prozesse lieferten Satish et al. durch die Beobachtung, dass eine veränderte Zusammensetzung der Lipide in der Plasmamembran zu einer geringeren Caspofungin-Empfindlichkeit führt (Satish et al. 2019).

1.5. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Azole und Echinocandine sind wichtige Medikamente in der Therapie humaner Pilzinfektionen, welche mit einer schwierigen Diagnosefindung sowie einer hohen Mortalität trotz Therapie einhergehen. Die zunehmende Inzidenz aufgrund einer steigenden Zahl an Risikopatienten (Kousha et al. 2011) sowie das Auftreten von Resistenzen machen die genaue Untersuchung der Wirkmechanismen von Antimykotika notwendig. Dies kann letztlich dabei helfen, die Entstehung von Resistenzen besser zu verstehen, bestehende Therapien zu verbessern und neue zu entwickeln. Echinocandine mögen aktuell eine untergeordnete Rolle in der Monotherapie von *Aspergillus*-Infektionen spielen. Insbesondere vor dem Hintergrund zunehmender Resistenzen gegenüber Azolen sind sie jedoch wegen ihrer guten Verträglichkeit und verschwindend niedriger Resistenzraten von Interesse und werden in einigen Fällen in Kombination mit einem Azol empfohlen (Marr et al. 2015).

Der zugrundeliegende Wirkmechanismus von Azolen auf Aspergillen und Hefen ist der gleiche, ebenso der von Echinocandinen. Dennoch gibt es je nach Pilzspezies Unterschiede darin, ob die

Wirkung fungizid oder fungistatisch ist. In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, welche Eigenschaften für diese grundlegenden Unterschiede verantwortlich sind.

Die Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse zu diesen Fragen und stellen ausgewählte Vorgänge im Schimmelpilz *A. fumigatus* infolge einer Exposition gegenüber Echinocandin- und Azol-Antimykotika dar.

1.6. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN MIT DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS

1.6.1. ZUSAMMENFASSUNG DES PAPERS I

The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the beta-1,3-Glucan Synthase Fks1

Loiko, V.; Wagener, J.; 2017. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(2). DOI: 10.1128/aac.01690-16.

Die Hintergründe des vielfach vorbeschriebenen paradoxen Wachstums sind nach wie vor nicht abschließend geklärt. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich auch in unseren Versuchen bei einer Inkubation von Sporen in Anwesenheit von Caspofungin in Konzentrationen weit oberhalb der MEC zunächst das typische Bild gehemmten Wachstums mit kurzen, stark verzweigten, dicken Hyphen. Darauf folgte nach einigen Tagen ein Wiederaussproießen von Hyphen, die morphologisch denen bei ungehemmtem Wachstum gleichen. Caspofungin erzielt seine Wirkung durch Hemmung der β -1,3-GS. Es stellte sich also die Frage, wie sich das Drug Target in paradox wachsenden Hyphen verhält. Für die Experimente verwendeten wir die Farbstoffe Anilinblau für β -1,3-Glucan und CFW für Chitin sowie eine konditionelle *fks1*-Mutante, die unter reprimierten Bedingungen keine β -1,3-GS und somit auch kein β -1,3-Glucan enthält. Wir konnten zeigen, dass in der Zellwand paradox wachsender Hyphen wieder β -1,3-Glucan zu finden ist. Nachdem der Zellwandgehalt an Chitin sich während der Hemmphase erhöht, normalisiert sich dieser wieder in den paradox wachsenden Hyphen. Repression der β -1,3-GS führt zu einem Ausbleiben paradoxen Wachstums sowie zu einer erhöhten Caspofungin-Resistenz, wohingegen eine Überexpression in einer erhöhten Empfindlichkeit resultiert. Zudem ist ein Unterschied im β -1,3-Glucan-Gehalt der Hyphen abhängig von der Caspofungin-Konzentration zu erkennen. Beide untersuchten Konzentrationen, 1 und 8 $\mu\text{g/ml}$, liegen oberhalb der MEC. Im ersten Fall jedoch lässt sich die Zellwand mit Anilinblau anfärben, enthält folglich β -1,3-Glucan. Erst bei einer Konzentration, bei der später paradoxes Wachstum auftritt, ist während der Hemmphase kein beziehungsweise deutlich weniger β -1,3-Glucan zu erkennen.

Lange wurde vermutet, dass eine Hochregulation des Zellwandchitins eine zentrale Rolle im paradoxen Wachstum spielt, da die Zellwand von durch Caspofungin gehemmten Hyphen einen erhöhten Chitingehalt aufweist. Für paradox wachsende Hyphen gilt dies jedoch nicht. Interessant ist dagegen, dass wieder β -1,3-Glucan produziert wird. Folglich muss die Funktionsfähigkeit der β -1,3-GS wiederhergestellt werden. Wir konnten zwei Voraussetzungen für paradoxes Wachstum identifizieren: Zum einen ist das Vorhandensein der β -1,3-GS essenziell, zum anderen muss diese stark genug gehemmt werden, damit darauffolgend paradoxes Wachstum auftritt.

Diese Ergebnisse konnten durch die Studien einer anderen Arbeitsgruppe untermauert werden. Darin zeigte sich zudem, dass die initiale Hemmung und die Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit der β -1,3-GS mit einer Veränderung ihrer Lokalisation einhergeht (Moreno-Velasquez et al. 2017).

Die Erstellung und Veröffentlichung dieser Publikation erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Wagener. Ich erhob die Daten für alle Versuche, führte die Auswertung und Statistik durch und erstellte die Abbildungen. Darüber hinaus war ich an Literaturrecherche, Formulierung und Korrektur der Publikation beteiligt.

1.6.2. ZUSAMMENFASSUNG DES PAPERS II

Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*

Geißel, B.; Loiko, V.; Klugherz, I.; Zhu, Z.; Wagener, N.; Kurzai, O.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Wagener, J.; 2018. *Nature communications* 9(1). DOI: 10.1038/s41467-018-05497-7.

Azol-Antimykotika wirken je nach Pilzspezies fungistatisch oder fungizid durch Hemmung der Ergosterolbiosynthese. Während Echinocandine auf *Aspergillus* wachstumshemmend wirken, entfalten Azole bekannterweise eine fungizide Wirkung auf diese Spezies. In den Versuchen meiner Kollegin Bernadette Geißel konnte der Vorgang des Azol-induzierten Zelluntergangs näher beleuchtet werden. Hierin konnte die Aktivierung des Cell-Wall-Salvage-Systems sowie auch eine wachstumshemmende Komponente zusätzlich zur fungiziden beobachtet werden. Bei mikroskopischer Betrachtung des Vorgangs zeigten sich an einigen Stellen der Zellwand β -1,3-Glukan- und Chitin-haltige Patches, kurz bevor es zur Einstülpung der Membran und zum Zelltod kam. Durch genetische Repression der Zielstruktur der Azole, CYP51, ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren.

Eine genauere Untersuchung der einzelnen Wirkungskomponenten ermöglichten die konditionellen Atmungsketten-Mutanten *rip1_{delOn}* und *cycA_{delOn}*. Bei diesen stellte meine Kollegin Isabel Klugherz fest, dass erst eine deutlich höhere Voriconazol-Konzentration zum Tod der Hyphen führte, wohingegen die Wachstumshemmung bereits bei gleichen Konzentrationen wie beim Wildtyp auftrat.

Aus diesen Beobachtungen heraus ergaben sich die Fragen, welche Rolle die β -1,3-GS bei der Patch-Bildung spielt, ob ein Zusammenhang zwischen Voriconazol-Empfindlichkeit und Patch-Bildung hergestellt werden kann und ob sich daraus Anwendungen für die Klinik ableiten lassen. Zur Beantwortung dieser Fragen trugen meine Versuche im Rahmen dieser Veröffentlichung bei.

Es zeigte sich, dass bei den Atmungsketten-Mutanten auch die Zellwand-Patches erst bei höheren, tödlich verlaufenden Konzentrationen auftraten. Dies ließ eine Assoziation von exzessiver

Patch-Bildung mit niedrigerem Überleben vermuten. Durch Erfassung des Verhältnisses der kumulativen Patch-Durchmesser zur Kompartimentlänge in toten und lebendigen Hyphen ließ sich diese Annahme bestätigen. Wir konnten zudem zeigen, dass eine gleichzeitige Inhibition der β -1,3-GS die Entstehung der Patches reduzierte und den Voriconazol-bedingten Untergang der Kompartimente hinauszögerte. Die Wirksamkeit des Azols und die Empfindlichkeit des Pilzes korrelierten folglich mit der Bildung von Patches. Dies bestätigte die Untersuchung Azol-resistenter klinischer Isolate, in denen keine Patches entstanden.

Durch diese Experimente konnte ein Modell entworfen werden, nach dem die fungizide Wirkung der Azole auf einer punktuell verstärkten Synthese von Zellwandkohlenhydraten, nicht zuletzt durch die β -1,3-GS, beruht. Hierdurch kommt es zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran. Die Abwesenheit derartiger Patches in Azol-resistenten klinischen Isolaten weist auf einen möglichen klinischen Anwendungsbereich in der Identifikation von Azol-Resistenzen hin.

Mein Beitrag zu dieser Publikation bestand in der Durchführung und Darstellung einzelner Versuche. Für die Abbildung 6a-c, 8c und die ergänzende Abbildung S2 erhob ich die Daten, wertete sie aus und erstellte die Abbildungen. Ebenso wurden die in den Abbildungen 7a-d gezeigten Experimente von mir durchgeführt. Die Planung der in Abbildungen 7a-d dargestellten Experimente basierte dabei auf Vorexperimenten meiner Kollegin Bernadette Geißel.

Die in der Arbeit in Abbildung 5a-c und 9 dargestellten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Isabel Klugherz durchgeführt.

Zudem basiert die Abbildung 2b meiner Kollegin Frau Geißel auf einer durch mich im Vorfeld etablierten Färbemethode mit Anilinblau. Auch bei dieser Publikation war ich an der Formulierung und Korrektur der Publikation beteiligt.

2. ZUSAMMENFASSUNG

2.1. DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG

Echinocandin-Antimykotika entfalten ihre Wirkung durch Hemmung der β -1,3-Glukansynthase (β -1,3-GS). Sie werden in der Therapie verschiedener Pilzkrankungen eingesetzt, ausgelöst beispielsweise durch *Aspergillus* spp. oder *Candida* spp.

Bereits in frühen Studien mit dieser Antimykotika-Klasse zeigte sich der so genannte „paradoxe Effekt“. Bei niedrigen Konzentrationen oberhalb der minimalen Hemmkonzentration wird das Pilzwachstum gehemmt. Bei höheren Konzentrationen kommt es nach einigen Tagen der Inkubation zu paradoxem Wachstum, bei dem der Pilz wieder in einer Form zu wachsen beginnt, die ungehemmtem Wachstum gleicht. Bei sehr hohen Hemmstoffkonzentrationen wiederum ist dies nicht zu beobachten. Die Ursache dieses Phänomens ist bis heute nicht abschließend geklärt.

Im Rahmen der Dissertation wurde der paradoxe Effekt des Echinocandin-Antimykotikums Caspofungin unter Verwendung des opportunistisch pathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* als Modellorganismus untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass der paradoxe Effekt auf einer Wiederaufnahme der Funktionsfähigkeit der β -1,3-GS basiert. Das Vorhandensein der β -1,3-GS ließ sich als essenzielle Voraussetzung für die Manifestation des paradoxen Effekts identifizieren. Eine initiale Wachstumshemmung konnte bei allen Konzentrationen oberhalb der minimal effektiven Konzentration (MEC) beobachtet werden, unabhängig davon, ob im weiteren Verlauf paradoxes Wachstum auftrat. Es zeigte sich jedoch, dass dem paradoxen Wachstum eine stärkere Hemmung der β -1,3-GS vorangeht. Bei sehr hohen Caspofungin-Konzentrationen trat eine zusätzliche, von der β -1,3-GS unabhängige antifungale Wirkung auf. Repression der β -1,3-GS auf genetischer Ebene führte zwar zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Echinocandinen, verhinderte jedoch auch das Auftreten des paradoxen Wachstums.

Im Rahmen der Dissertation konnte zudem die Rolle der β -1,3-GS bei der Toxizität der Azol-Antimykotika nachgewiesen werden. Azol-Antimykotika führen durch Hemmung der Ergosterol-Biosynthese zu einem Integritätsverlust der Plasmamembran des Pilzes und wirken im Gegensatz zu Echinocandinen fungizid auf *Aspergillus* spp. Diese fungizide Wirkung beruht auf mehreren Komponenten. Als eine davon konnte die übermäßige Produktion von Zellwandzuckern, insbesondere von β -1,3-Glukan und Chitin, beobachtet werden. Die übermäßige Zellwandsynthese führte zu mikroskopisch sichtbaren Zellwandverdickungen und ließ sich mit schlechterem Überleben des Schimmelpilzes assoziieren. Inhibierung der β -1,3-GS führte zu einer reduzierten Zellwandsynthese und einem verzögerten Zelltod. Diese Beobachtung unterstreicht die wesentliche Bedeutung der β -1,3-GS bei der Entstehung der Zellwandverdickungen und somit für die fungizide Wirkung der Azol-Antimykotika.

2.2. ENGLISH ABSTRACT

Echinocandin antifungals inhibit the β -1,3-glucan synthase (β -1,3-GS). They are used to treat various fungal infections caused, for example, by *Aspergillus* spp. or *Candida* spp.

Early studies showed a so-called paradoxical effect of the echinocandin class of antifungals. Fungal growth is inhibited at low echinocandin concentrations above the minimum inhibitory concentration. At higher concentrations, paradoxical growth occurs after a few days of incubation; the fungus begins to grow in a similar way to unrestrained growth. At very high inhibitor concentrations, no paradoxical growth can be observed. To date, the cause of this phenomenon is not fully understood.

As part of the dissertation, the paradoxical effect of the echinocandin caspofungin was examined using the opportunistic pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* as a model organism. For the first time, it was shown that the paradoxical effect is based on the resumption of the functionality of the β -1,3-GS. The presence of the β -1,3-GS was identified as an essential prerequisite for the manifestation of the paradoxical effect. An initial inhibition of growth was observed at all caspofungin concentrations above the minimal effective concentration (MEC) regardless of whether paradoxical growth occurred later on. However, the paradoxical growth was preceded by a stronger inhibition of β -1,3-GS. At very high caspofungin concentrations an additional, β -1,3-GS independent antifungal effect occurred. The suppression of β -1,3-GS on genetic level led to increased echinocandin resistance while at the same time paradoxical growth was prevented.

In addition, the role of the β -1,3-GS in the toxicity of azole antimycotics could be demonstrated within the scope of the dissertation. By inhibiting ergosterol biosynthesis, azole antifungals lead to a loss of the integrity of the fungal plasma membrane and, in contrast to echinocandins, exert a fungicidal effect on *Aspergillus* spp. This fungicidal effect is based on several components. As one of these, excessive production of cell wall sugars, particularly β -1,3-glucan and chitin, was observed. The excessive cell wall synthesis resulted in microscopically visible thickenings of the cell wall and was associated with poorer survival of the mold. The inhibition of β -1,3-GS led to a decreased cell wall synthesis and a delayed cell death. This observation underlines the relevance of the β -1,3-GS for the formation of the cell wall thickenings and consequently for the fungicidal effect of azole antimycotics.

3. PAPER I

The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the beta-1,3-Glucan Synthase Fks1

Loiko, V.; Wagener, J.; *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017, 61(2). DOI: 10.1128/aac.01690-16.

4. PAPER II

Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*

Geißel, B.; Loiko, V.; Klugherz, I.; Zhu, Z.; Wagener, N.; Kurzai, O.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Wagener, J.;
Nature communications, 2018, 9(1):3098. DOI: 10.1038/s41467-018-05497-7.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdolrasouli, A.; Petrou, M. A.; Park, H.; Rhodes, J. L.; Rawson, T. M.; Moore, L. S. P. et al. (2018): Surveillance for Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in a Centralized Diagnostic Mycology Service, London, United Kingdom, 1998-2017. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 2234. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02234.
- Adler-Moore, J. P.; Gangneux, J.-P.; Pappas, P. G. (2016): Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. In: *Medical mycology* 54 (3), S. 223–231. DOI: 10.1093/mmy/myv111.
- Alexander, B. D.; Johnson, M. D.; Pfeiffer, C. D.; Jiménez-Ortigosa, C.; Catania, J.; Booker, R. et al. (2013): Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (12), S. 1724–1732. DOI: 10.1093/cid/cit136.
- Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D. et al. (2014): Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. In: *Nature chemical biology* 10 (5), S. 400–406. DOI: 10.1038/nchembio.1496.
- Antachopoulos, C.; Meletiadis, J.; Sein, T.; Roilides, E.; Walsh, T. J. (2007): Concentration-dependent effects of caspofungin on the metabolic activity of *Aspergillus* species. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51 (3), S. 881–887. DOI: 10.1128/AAC.01160-06.
- Antachopoulos, C.; Meletiadis, J.; Sein, T.; Roilides, E.; Walsh, T. J. (2008): Comparative *In Vitro* Pharmacodynamics of Caspofungin, Micafungin, and Anidulafungin against Germinated and Nongerminated *Aspergillus* Conidia. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (1), S. 321–328. DOI: 10.1128/AAC.00699-07.
- Arendrup, M. C.; Perkhof, S.; Howard, S. J.; Garcia-Effron, G.; Vishukumar, A.; Perlín, D. S.; Lass-Flörl, C. (2008): Establishing *in vitro-in vivo* correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10), S. 3504–3511. DOI: 10.1128/AAC.00190-08.
- Beardsley, J.; Halliday, C. L.; Chen, S. C.-A.; Sorrell, T. C. (2018): Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. In: *Future microbiology* 13, S. 1175–1191. DOI: 10.2217/fmb-2018-0059.
- Beauvais, A.; Bruneau, J. M.; Mol, P. C.; Buitrago, M. J.; Legrand, R.; Latgé, J.-P. (2001): Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. In: *Journal of bacteriology* 183 (7), S. 2273–2279. DOI: 10.1128/JB.183.7.2273-2279.2001.
- Beauvais, A.; Latgé, J.-P. (2001): Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. In: *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 4 (1), S. 38–49. DOI: 10.1054/drup.2001.0185.
- Bennett, J. W. (2009): *Aspergillus*: a primer for the novice. In: *Medical mycology* 47 Suppl 1, S5-12. DOI: 10.1080/13693780802712515.
- Bromley, M. J.; van Muijlwijk, G.; Fraczek, M. G.; Robson, G.; Verweij, P. E.; Denning, D. W.; Bowyer, P. (2014): Occurrence of azole-resistant species of *Aspergillus* in the UK environment. In: *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2 (4), S. 276–279. DOI: 10.1016/j.jgar.2014.05.004.
- Cappelletty, D.; Eiselstein-McKittrick, K. (2007/02/24 (2007): The echinocandins. In: *Pharmacotherapy* 27 (3), S. 369–388. DOI: 10.1592/phco.27.3.369.
- Chamilos, G.; Lewis, R. E.; Albert, N. D.; Kontoyiannis, D. P. (2007): Paradoxical Effect of Echinocandins across *Candida* Species *In Vitro*: Evidence for Echinocandin-Specific and *Candida* Species-Related Differences. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (6), S. 2257–2259. DOI: 10.1128/AAC.00095-07.
- Chen, S. C.-A.; Slavin, M. A.; Sorrell, T. C. (2010/12/24 (2011): Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. a comparison. In: *Drugs* 71 (1), S. 11–41. DOI: 10.2165/11585270-000000000-00000.

- Chowdhary, A.; Sharma, C.; Meis, J. F. (2017): Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. In: *J Infect Dis* 216 (suppl_3), S436-S444. DOI: 10.1093/infdis/jix210.
- Debono, M.; Gordee, R. S. (1994): Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. In: *Annual review of microbiology* 48, S. 471–497. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002351.
- Denning, D. W. (1998): Invasive aspergillosis. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26 (4), 781-803; quiz 804-5. DOI: 10.1086/513943.
- Denning, D. W.; Venkateswarlu, K.; Oakley, K. L.; Anderson, M. J.; Manning, N. J.; Stevens, D. A. et al. (1997): Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (6), S. 1364–1368.
- Dichtl, K.; Helmschrott, C.; Dirr, F.; Wagener, J. (2012): Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. In: *Molecular microbiology* 83 (3), S. 506–519. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07946.x.
- Dichtl, K.; Samantaray, S.; Aimaniananda, V.; Zhu, Z.; Prévost, M.-C.; Latgé, J.-P. et al. (2015): *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. In: *Molecular microbiology* 95 (3), S. 458–471. DOI: 10.1111/mmi.12877.
- Douglas, C. M.; D'Ippolito, J. A.; Shei, G. J.; Meinz, M.; Onishi, J.; Marrinan, J. A. et al. (1997): Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (11), S. 2471–2479.
- Drummond, R. A.; Brown, G. D. (2011): The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. In: *Current Opinion in Microbiology* 14 (4), S. 392–399. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.001.
- Fekkar, A.; Meyer, I.; Brossas, J. Y.; Dannaoui, E.; Palous, M.; Uzunov, M. et al. (2013): Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. In: *Antimicrob Agents Chemother* 57 (5), S. 2380–2382. DOI: 10.1128/AAC.02037-12.
- Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. (2018): Worldwide emergence of resistance to anti-fungal drugs challenges human health and food security. In: *Science (New York, N.Y.)* 360 (6390), S. 739–742. DOI: 10.1126/science.aap7999.
- Fleischhacker, M.; Radecke, C.; Schulz, B.; Ruhnke, M. (2008): Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. In: *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 27 (2), S. 127–131. DOI: 10.1007/s10096-007-0411-4.
- Fontaine, T.; Simenel, C.; Dubreucq, G.; Adam, O.; Delepierre, M.; Lemoine, J. et al. (2000): Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (36), S. 27594–27607. DOI: 10.1074/jbc.M909975199.
- Fortwendel, J. R.; Juvvadi, P. R.; Pinchai, N.; Perfect, B. Z.; Alspaugh, J. A.; Perfect, J. R.; Steinbach, W. J. (2009): Differential Effects of Inhibiting Chitin and 1,3- β -d-Glucan Synthesis in Ras and Calcineurin Mutants of *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2), S. 476–482. DOI: 10.1128/AAC.01154-08.
- Fresenius, Georg (1863): Beiträge zur Mykologie. Frankfurt a. M.: Brönnner.
- Frisvad, J. C.; Larsen, T. O. (2015): Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section *Fumigati*. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 1485. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01485.
- Garcia-Effron, G.; Lee, S.; Park, S.; Cleary, J. D.; Perlin, D. S. (2009): Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3- β -d-Glucan Synthase: Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (9), S. 3690–3699. DOI: 10.1128/AAC.00443-09.

- García-Rodríguez, L. J.; Trilla, J. A.; Castro, C.; Valdivieso, M. H.; Durán, A.; Roncero, C. (2000): Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS letters* 478 (1-2), S. 84–88. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01835-4.
- Gardiner, R. E.; Souteropoulos, P.; Park, S.; Perlin, D. S. (2005): Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. In: *Medical mycology* 43 Suppl 1, S299-305. DOI: 10.1080/13693780400029023.
- Garnacho-Montero, J.; Olaechea, P.; Alvarez-Lerma, F.; Alvarez-Rocha, L.; Blanquer, J.; Galvan, B. et al. 2013/07/03 (2013): Epidemiology, diagnosis and treatment of fungal respiratory infections in the critically ill patient. In: *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* 26 (2), S. 173–188.
- Geißel, B.; Loiko, V.; Klugherz, I.; Zhu, Z.; Wagener, N.; Kurzai, O. et al. 2018/08/08 (2018): Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3098. DOI: 10.1038/s41467-018-05497-7.
- Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. (1999): Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. In: *Clinical microbiology reviews* 12 (4), S. 501–517.
- Goncalves, S. S.; Souza, A. C. R.; Chowdhary, A.; Meis, J. F.; Colombo, A. L. 2016/01/27 (2016): Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. In: *Mycoses* 59 (4), S. 198–219. DOI: 10.1111/myc.12469.
- Hagiwara, D.; Arai, T.; Takahashi, H.; Kusuya, Y.; Watanabe, A.; Kamei, K. (2018): Non-*cyp51A* Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolates with Mutation in HMG-CoA Reductase. In: *Emerging infectious diseases* 24 (10), S. 1889–1897. DOI: 10.3201/eid2410.180730.
- Hall, G. S.; Myles, C.; Pratt, K. J.; Washington, J. A. (1988): Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32 (9), S. 1331–1335. DOI: 10.1128/AAC.32.9.1331.
- Hamill, R. J. (2013): Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. In: *Drugs* 73 (9), S. 919–934. DOI: 10.1007/s40265-013-0069-4.
- Hawksworth, D. L. (2001): The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. In: *Mycological Research* 105 (12), S. 1422–1432. DOI: 10.1017/S0953756201004725.
- Hector, R. F. (1993): Compounds active against cell walls of medically important fungi. In: *Clinical microbiology reviews* 6 (1), S. 1–21. DOI: 10.1128/cmr.6.1.1.
- Hossain, M. A.; Ghannoum, M. A. (2000): New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. In: *Expert opinion on investigational drugs* 9 (8), S. 1797–1813. DOI: 10.1517/13543784.9.8.1797.
- Jenks, J. D.; Hoenigl, M. 2018/08/22 (2018): Treatment of Aspergillosis. In: *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 4 (3). DOI: 10.3390/jof4030098.
- Jiménez-Ortigosa, C.; Moore, C. B.; Denning, D. W.; Perlin, D. S. (2017): Emergence of Echinocandin Resistance Due to a Point Mutation in the *fks1* Gene of *Aspergillus fumigatus* in a Patient with Chronic Pulmonary Aspergillosis. In: *Antimicrob Agents Chemother* 61 (12). DOI: 10.1128/AAC.01277-17.
- Jørgensen, K. J.; Gøtzsche, P. C.; Dalbøge, C. S.; Johansen, H. K. (2014): Voriconazole versus amphotericin B or fluconazole in cancer patients with neutropenia. In: *Cochrane Database Syst Rev* 2014 (2), CD004707-CD004707. DOI: 10.1002/14651858.CD004707.pub3.
- Köhler, P.; Cornely, O. A.; Vehreschild, J. J. 2019/05/24 (2019): [Fungal infections]. In: *Der Internist*. DOI: 10.1007/s00108-019-0618-3.

- Kosmidis, C.; Denning, D. W. 2014/10/31 (2015): The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. In: *Thorax* 70 (3), S. 270–277. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
- Kousha, M.; Tadi, R.; Soubani, A. O. (2011): Pulmonary aspergillosis: a clinical review. In: *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society* 20 (121), S. 156–174. DOI: 10.1183/09059180.00001011.
- Lamoth, F. (2016): *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 683. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00683.
- Lamoth, F.; Juvvadi, P. R.; Fortwendel, J. R.; Steinbach, W. J. (2012): Heat Shock Protein 90 Is Required for Conidiation and Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. In: *Eukaryotic Cell* 11 (11), S. 1324–1332. DOI: 10.1128/EC.00032-12.
- Lamoth, F.; Juvvadi, P. R.; Gehrke, C.; Asfaw, Y. G.; Steinbach, W. J. (2014): Transcriptional Activation of Heat Shock Protein 90 Mediated Via a Proximal Promoter Region as Trigger of Caspofungin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *J Infect Dis* 209 (3), S. 473–481. DOI: 10.1093/infdis/jit530.
- Latgé, J.-P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. In: *Clinical microbiology reviews* 12 (2), S. 310–350.
- Latgé, J.-P.; Beauvais, A.; Chamilos, G. (2017): The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. In: *Annual review of microbiology* 71, S. 99–116. DOI: 10.1146/annurev-micro-030117-020406.
- Ledoux, M.-P.; Toussaint, E.; Denis, J.; Herbrecht, R. 2017/03/30 (2017): New pharmacological opportunities for the treatment of invasive mould diseases. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 72 (suppl_1), i48-i58. DOI: 10.1093/jac/dkx033.
- Lee, M. J.; Sheppard, D. C. (2016): Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 54 (3), S. 232–242. DOI: 10.1007/s12275-016-6045-4.
- Li, Y.; Zhang, Y.; Lu, L. 2019/03/01 (2019): Calcium signaling pathway is involved in non-CYP51 azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Medical mycology* 57 (Supplement_2), S233-s238. DOI: 10.1093/mmy/myy075.
- Lilienfeld-Toal, M. von; Wagener, J.; Einsele, H.; Cornely, O. A.; Kurzai, O. (2019): Invasive Fungal Infection. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 116 (16), S. 271–278. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0271.
- Loiko, V.; Wagener, J. 2016/11/23 (2017): The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the beta-1,3-Glucan Synthase Fks1. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (2). DOI: 10.1128/aac.01690-16.
- Marr, K. A.; Schlamm, H. T.; Herbrecht, R.; Rottinghaus, S. T.; Bow, E. J.; Cornely, O. A. et al. (2015): Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. In: *Annals of internal medicine* 162 (2), S. 81–89. DOI: 10.7326/M13-2508.
- Meersseman, W.; Vandecasteele, S. J.; Wilmer, A.; Verbeken, E.; Peetermans, W. E.; van Wijngaerden, E. (2004): Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 170 (6), S. 621–625. DOI: 10.1164/rccm.200401-093OC.
- Micheli, Pierantonio; Gastone, Gian (1729): Nova Plantarvm Genera Ivxta Tovrnefortii Methodvm Disposita. Quibus Plantæ MDCCCC recensentur, scilicet fere MCCCC nondum observatæ, reliquæ suis sedibus restitutæ; quarum vero figuram exhibere visum fuit, ex ad DL æneis Tabulis CVIII. graphice expressæ sunt; Adnotationibus, atque Observationibus, præcipue Fungorum, Mucorum, affinuimque Plantarum sationem, ortum, & incrementum spectantibus, interdum adiectis. Florentiæ: Paperini.
- Moen, M. D.; Lyseng-Williamson, K. A.; Scott, L. J. 2009/03/12 (2009): Liposomal amphotericin B. a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. In: *Drugs* 69 (3), S. 361–392. DOI: 10.2165/00003495-200969030-00010.

- Montagna, M. T.; Caggiano, G.; Lovero, G.; Giglio, O. de; Coretti, C.; Cuna, T. et al. (2013): Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). In: *Infection* 41 (3), S. 645–653. DOI: 10.1007/s15010-013-0432-0.
- Moreno-Velasquez, S. D.; Seidel, C.; Juvvadi, P. R.; Steinbach, W. J.; Read, N. D. 2017/08/02 (2017): Caspofungin-Mediated Growth Inhibition and Paradoxical Growth in *Aspergillus fumigatus* Involve Fungicidal Hyphal Tip Lysis Coupled with Regenerative Intrahyphal Growth and Dynamic Changes in beta-1,3-Glucan Synthase Localization. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (10). DOI: 10.1128/aac.00710-17.
- Morschhauser, J. (2010): Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. In: *Fungal genetics and biology: FG & B* 47 (2), S. 94–106. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.08.002.
- Ong, V.; Hough, G.; Schlosser, M.; Bartizal, K.; Balkovec, J. M.; James, K. D.; Krishnan, B. R. (2016): Preclinical Evaluation of the Stability, Safety, and Efficacy of CD101, a Novel Echinocandin. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (11), S. 6872–6879. DOI: 10.1128/AAC.00701-16.
- Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D. R.; Clancy, C. J.; Marr, K. A.; Ostrosky-Zeichner, L. et al. (2016): Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. In: *Clin Infect Dis* 62 (4), S. 409–417. DOI: 10.1093/cid/civ1194.
- Patil, A.; Majumdar, S. 2017/07/27 (2017): Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 69 (12), S. 1635–1660. DOI: 10.1111/jphp.12780.
- Patterson, T. F.; Thompson, G. R., 3rd; Denning, D. W.; Fishman, J. A.; Hadley, S.; Herbrecht, R. et al. 2016/08/03 (2016): Executive Summary. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (4), S. 433–442. DOI: 10.1093/cid/ciw444.
- Perea, S.; Gonzalez, G.; Fothergill, A. W.; Kirkpatrick, W. R.; Rinaldi, M. G.; Patterson, T. F. (2002): *In vitro* interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (9), S. 3039–3041. DOI: 10.1128/aac.46.9.3039-3041.2002.
- Perea, S.; Patterson, T. F. (2002): Antifungal resistance in pathogenic fungi. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35 (9), S. 1073–1080. DOI: 10.1086/344058.
- Perlin, D. S. (2007): Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. In: *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 10 (3), S. 121–130. DOI: 10.1016/j.drug.2007.04.002.
- Philip, A.; Odabasi, Z.; Rodriguez, J.; Paetznick, V. L.; Chen, E.; Rex, J. H.; Ostrosky-Zeichner, L. (2005): *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (8), S. 3572–3574. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3572-3574.2005.
- Plaine, A.; Walker, L.; Da Costa, G.; Mora-Montes, H. M.; McKinnon, A.; Gow, N. A. R. et al. (2008): Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. In: *Fungal genetics and biology: FG & B* 45 (10), S. 1404–1414. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.08.003.
- Rauseo, A. M.; Coler-Reilly, A.; Larson, L.; Spec, A. (2020): Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. In: *Open Forum Infectious Diseases* 7 (2), ofaa016. DOI: 10.1093/ofid/ofaa016.
- Richardson, M. D.; Page, I. D. 2016/11/07 (2017): *Aspergillus* serology. Have we arrived yet? In: *Medical mycology* 55 (1), S. 48–55. DOI: 10.1093/mmy/myw116.
- Rocha, E. M. F.; Garcia-Effron, G.; Park, S.; Perlin, D. S. (2007): A Ser678Pro substitution in Fks1p confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 51 (11), S. 4174–4176. DOI: 10.1128/AAC.00917-07.

- Romero, M.; Messina, F.; Marin, E.; Arechavala, A.; Depardo, R.; Walker, L. et al. 2019/05/24 (2019): Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. When Local Epidemiology Breaks the Norm. In: *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 5 (2). DOI: 10.3390/jof5020041.
- Rueda, C.; Cuenca-Estrella, M.; Zaragoza, O. (2014): Paradoxical Growth of *Candida albicans* in the Presence of Caspofungin Is Associated with Multiple Cell Wall Rearrangements and Decreased Virulence. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (2), S. 1071–1083. DOI: 10.1128/AAC.00946-13.
- Ruhnke, M.; Böhme, A.; Buchheidt, D.; Cornely, O. A.; Donhuijsen, K.; Einsele, H. et al. (2012): Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology - guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (4), S. 823–833. DOI: 10.1093/annonc/mdr407.
- Rybak, J. M.; Ge, W.; Wiederhold, N. P.; Parker, J. E.; Kelly, S. L.; Rogers, P. D.; Fortwendel, J. R. (2019): Mutations in *bmg1*, Challenging the Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *mBio* 10 (2). DOI: 10.1128/mBio.00437-19.
- Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraeken, J.; Hong, S.-B.; v. Hubka; Klaassen, C.H.W. et al. (2014): Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. In: *Studies in Mycology* 78, S. 141–173. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- Sandison, T.; Ong, V.; Lee, J.; Thye, D. (2017): Safety and Pharmacokinetics of CD101 IV, a Novel Echinocandin, in Healthy Adults. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (2), e01627-16. DOI: 10.1128/AAC.01627-16.
- Sarwar, M.; Gardezi, S. A. H.; Zaman, G.; Ikram, A.; Satti, L.; Khadim, M. T. (2020): Evaluation of galactomannan and beta-d-glucan assays for the diagnosis of invasive aspergillosis in clinically suspected cases. In: *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 70 (3), S. 442–446. DOI: 10.5455/JPMA.1476.
- Satish, S.; Jiménez-Ortigosa, C.; Zhao, Y.; Lee, M. H.; Dolgov, E.; Krüger, T. et al. (2019): Stress-Induced Changes in the Lipid Microenvironment of β -(1,3)-d-Glucan Synthase Cause Clinically Important Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *mBio* 10 (3). DOI: 10.1128/mBio.00779-19.
- Snelders, E.; Huis In 't Veld, R. A. G.; Rijs, A. J. M. M.; Kema, G. H. J.; Melchers, W. J. G.; Verweij, P. E. (2009): Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (12), S. 4053–4057. DOI: 10.1128/AEM.00231-09.
- Snelders, E.; van der Lee, H. A. L.; Kuijpers, J.; Rijs, A. J. M. M.; Varga, J.; Samson, R. A. et al. (2008): Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. In: *PLoS medicine* 5 (11), e219. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050219.
- Steinbach, W. J.; Lamoth, F.; Juvvadi, P. R. 2015/11/15 (2015): Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 61 Suppl 6, S669-77. DOI: 10.1093/cid/civ725.
- Stevens, D. A.; Espiritu, M.; Parmar, R. (2004): Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at High Drug Concentrations. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (9), S. 3407–3411. DOI: 10.1128/AAC.48.9.3407-3411.2004.
- Stevens, D. A.; White, T. C.; Perlin, D. S.; Selitrennikoff, C. P. (2005): Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. In: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 51 (3), S. 173–178. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.10.006.
- Sugui, J. A.; Kwon-Chung, K. J.; Juvvadi, P. R.; Latgé, J.-P.; Steinbach, W. J. (2015): *Aspergillus fumigatus* and related species. In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 5 (2), a019786-a019786. DOI: 10.1101/cshperspect.a019786.

- Taccone, F. S.; van den Abeele, A.-M.; Bulpa, P.; Misset, B.; Meersseman, W.; Cardoso, T. et al. (2015): Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. In: *Critical care (London, England)* 19, S. 7. DOI: 10.1186/s13054-014-0722-7.
- Tillie-Leblond, I.; Tonnel, A.-B. (2005): Allergic bronchopulmonary aspergillosis. In: *Allergy* 60 (8), S. 1004–1013. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00887.x.
- Ullmann, A. J.; Aguado, J. M.; Arikan-Akdagli, S.; Denning, D. W.; Groll, A. H.; Lagrou, K. et al. 2018/03/17 (2018): Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases. executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24 Suppl 1, e1-e38. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
- van der Linden, J. W. M.; Arendrup, M. C.; Warris, A.; Lagrou, K.; Pelloux, H.; Hauser, P. M. et al. (2015): Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Emerging infectious diseases* 21 (6), S. 1041–1044. DOI: 10.3201/eid2106.140717.
- van Paassen, J.; Russcher, A.; In 't Veld-van Wingerden, Astrid Wm; Verweij, P. E.; Kuijper, E. J. (2016): Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013. In: *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21 (30). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.30.30300.
- Verweij, P. E.; Ananda-Rajah, M.; Andes, D. R.; Arendrup, M. C.; Brüggemann, R. J.; Chowdhary, A. et al. (2015): International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. In: *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 21-22, S. 30–40. DOI: 10.1016/j.drug.2015.08.001.
- Wagener, J.; Loiko, V. 2018/01/27 (2017): Recent Insights into the Paradoxical Effect of Echinocandins. In: *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 4 (1). DOI: 10.3390/jof4010005.
- Wagener, J.; Striegler, K.; Wagener, N. (2020): α - and β -1,3-Glucan Synthesis and Remodeling. In: *Current topics in microbiology and immunology*. DOI: 10.1007/82_2020_200.
- Walker, L. A.; Gow, N. A. R.; Munro, C. A. (2010): Fungal echinocandin resistance. In: *Fungal genetics and biology: FG & B* 47 (2), S. 117–126. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.09.003.
- Walker, L. A.; Munro, C. A.; Bruijn, I. d.; Lenardon, M. D.; McKinnon, A.; Gow, N. A. R. (2008): Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. In: *PLOS Pathogens* 4 (4), e1000040. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000040.
- Wang, J. F.; Xue, Y.; Zhu, X. B.; Fan, H. 2014/12/17 (2015): Efficacy and safety of echinocandins versus triazoles for the prophylaxis and treatment of fungal infections. a meta-analysis of RCTs. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 34 (4), S. 651–659. DOI: 10.1007/s10096-014-2287-4.
- Wiederhold, N. P. (2016): Echinocandin Resistance in *Candida* Species: a Review of Recent Developments. In: *Current Infectious Disease Reports* 18 (12), S. 42. DOI: 10.1007/s11908-016-0549-2.
- Wiederhold, N. P. (2017): Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. In: *Infection and drug resistance* 10, S. 249. DOI: 10.2147/IDR.S124918.

ANHANG: PAPER III

Recent Insights into the Paradoxical Effect of Echinocandins

Wagener, J.; Loiko, V.; *Journal of fungi*, 2018, 4(1):5. DOI: 10.3390/jof4010005.

Darstellung des Eigenanteils des beigefügten Reviews

Das Review entstand durch Dr. Johannes Wagener und mich. Ich war an der Literaturrecherche, Ausformulierung, Erstellung der Abbildung und Korrektur beteiligt.

DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Johannes Wagener für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, durch die mir ein Einblick in die beeindruckende Welt der Pilze gewährt wurde. Ich bedanke mich für die exzellente Betreuung, bei der es nie an wertvollen Anregungen, konstruktiven Diskussionen von Ideen, Experimenten und Texten oder unermüdlicher Motivation gefehlt hat.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Mitbetreuer Dr. med. Karl Dichtl für die jederzeitige, nicht weniger engagierte Unterstützung, nicht zuletzt bei der Findung des Forschungsvorhabens sowie bei der sorgfältigen Einarbeitung in bestehende Arbeitstechniken.

So viele Personen in der Laborgemeinschaft haben dazu beigetragen, dass ich mich immer wieder gerne an die im Labor verbrachte Zeit zurückerinnere. Mein Dank gilt Bernadette Geißel, Miriam Wagner und Isabel Klugherz für die kollegiale Zusammenarbeit an der gemeinsamen Publikation. Danke an Dominik Ruf und Yannick Leonhardt für die gegenseitige Unterstützung als FöFoLe-Kommilitonen. Herzlichen Dank darüber hinaus auch an Annegret Vagellas, Sara und Tamara Kakoschke, Victor Brantl, Helena Schrattenecker, Laura Sturm, Anja Spadinger und Emilia Sieger für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die abwechselnde Pflege angesetzter Pilzzöglinge in wochenendlichen, abendlichen oder nächtlichen Sitzungen und die gegenseitige moralische Unterstützung.

Auch an das Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU München richte ich meinen Dank für die Möglichkeit des Austauschs mit Gleichgesinnten aus verschiedenen medizinischen Fachbereichen und Forschungsgruppen sowie für die finanzielle Unterstützung des Promotionsvorhabens.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank auch meiner Familie und Freunden für die stetige Unterstützung und das engagierte Lektorat.