

**Charakterisierung der Aleuriokonidien von  
*Aspergillus terreus* und Untersuchungen von  
Oberflächenantigenen von *Aspergillus fumigatus***

von Isabell Ute Henß

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

**Charakterisierung der Aleuriokonidien von  
*Aspergillus terreus* und Untersuchungen von  
Oberflächenantigenen von *Aspergillus fumigatus***

von Isabell Ute Henß

aus Hanau

München 2023

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:** Prof. Dr. Monika Rinder  
Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz  
Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner  
Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

**Tag der Promotion:** 11. Februar 2023

Für meine Eltern

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in folgender Publikation am 16.06.2022  
veröffentlicht:

Isabell Henß, Christoph Kleinemeier, Lea Strobel, Matthias Brock, Jürgen Löffler,  
Frank Ebel

**Characterization of *Aspergillus terreus* accessory conidia and their  
interactions with murine macrophages**

Frontiers in Microbiology, 16.06.2022

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>22</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>24</b>
<b>1.</b>	<b><i>Aspergillus</i> spp. ....</b>	<b>24</b>
1.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i> .....	24
1.1.1.	Taxonomie.....	24
1.1.2.	Habitat, Morphologie und Lebenszyklus .....	25
1.1.3.	Klinische Relevanz in der Humanmedizin.....	26
1.1.3.1.	Die allergische bronchopulmonale Aspergillose.....	27
1.1.3.2.	Das Aspergillom.....	27
1.1.3.3.	Die invasive Aspergillose.....	28
1.2.	<i>Aspergillus terreus</i> .....	29
1.2.1.	Taxonomie.....	29
1.2.2.	Habitat, Morphologie und Lebenszyklus .....	29
1.2.3.	Bedeutung in der Humanmedizin.....	29
1.2.4.	Aleuriokonidien.....	29
1.3.	Klinische Relevanz in der Veterinärmedizin .....	30
1.3.1.	Die Aspergillose des Hundes und der Katze.....	31
1.3.2.	Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel .....	32
1.3.3.	Die Aspergillose des Pferdes .....	34
1.3.4.	Die Aspergillose der Wiederkäuer .....	35
<b>2.</b>	<b>Weitere Pilzpathogene .....</b>	<b>37</b>
2.1.	<i>Lichtheimia</i> spp. ....	37
2.1.1.	Taxonomie.....	37
2.1.2.	Habitat, Morphologie und Lebenszyklus .....	37
2.1.3.	Bedeutung in der Humanmedizin.....	38
2.1.4.	Bedeutung in der Veterinärmedizin .....	39
2.2.	<i>Fusarium</i> spp.....	39
2.2.1.	Taxonomie.....	39
2.2.2.	Habitat, Morphologie und Lebenszyklus .....	40
2.2.3.	Bedeutung in der Humanmedizin.....	41
2.2.4.	Bedeutung in der Veterinärmedizin .....	42

<b>3.</b>	<b>Die Zellwand von <i>Aspergillus</i> spp.</b> .....	<b>43</b>
3.1.	Galaktosaminogalaktan .....	43
<b>4.</b>	<b>Immunantwort</b> .....	<b>44</b>
4.1.	Zytokine .....	44
4.2.	Rezeptoren.....	46
4.3.	Erste Welle der Immunabwehr gegen <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	47
4.4.	Adaptive Immunantwort .....	50
<b>5.</b>	<b>Monoklonale Antikörper</b> .....	<b>50</b>
5.1.	Allgemeines.....	51
5.2.	Therapeutische monoklonale Antikörper .....	51
5.3.	Monoklonale Antikörper im Einsatz gegen Schimmelpilzinfektionen .....	53
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>55</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemein</b> .....	<b>55</b>
1.1.	Chemikalien .....	55
1.2.	Materialien .....	55
1.3.	Organismen .....	55
1.4.	Oligonukleotide.....	57
1.5.	Antikörper .....	58
1.5.1.	Primäre Antikörper.....	58
1.5.2.	Sekundäre Antikörper .....	58
<b>2.</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>59</b>
2.1.	Nährmedien für die untersuchten filamentösen Pilze .....	59
2.2.	Selektionsmarker .....	63
2.3.	Anzucht der Pilzstämmen.....	63
2.3.1.	Anzucht der Pilzstämmen zur Herstellung neuer Sporensuspensionen .....	63
2.3.2.	Ernten der Sporen.....	64
2.3.3.	Bestimmung der Sporenkonzentration .....	64
2.3.4.	Anzucht in Flüssigkultur für Immunfluoreszenzfärbungen .....	64
2.3.5.	Anzucht für die Herstellung von Kulturüberstand .....	64
2.3.6.	Isolierung von Aleuriokonidien .....	65
<b>3.</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>65</b>
3.1.	Trichloressigsäure-Fällung zur Aufkonzentrierung von Kulturüberständen . .....	65



---

3.1.1.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	66
3.2.	Eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .. .....	66
3.3.	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Färbelösung.....	68
3.4.	Western Blot.....	69
3.5.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	71
<b>4.</b>	<b>Molekularbiologische und genetische Methoden .....</b>	<b>72</b>
4.1.	Isolierung von chromosomaler DNA .....	72
4.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	72
4.3.	Polymerase-Kettenreaktion .....	73
4.4.	PCR-Aufreinigung .....	74
4.5.	Agarose-Gelelektrophorese .....	74
4.6.	Herstellung eines Deletionskonstruktes mittels Fusions-PCR.....	75
4.7.	Transformation von <i>Aspergillus</i> .....	77
4.8.	Produktion antikörperhaltiger Hybridomüberstände und Aufreinigung monoklonaler Antikörper .....	79
4.8.1.	Produktion von antikörperhaltigen Hybridomüberständen.....	79
4.8.2.	Aufkonzentrierung von antikörperhaltigen Hybridomüberständen .....	79
4.8.3.	Reinigung von antikörperhaltigen Hybridomüberständen .....	80
<b>5.</b>	<b>Zellbiologische und mikroskopische Methoden .....</b>	<b>81</b>
5.1.	Immunfluoreszenzfärbungen von Pilzhyphen.....	81
5.2.	Proteinase K-Verdau .....	82
5.3.	Germination AB90-E8 und L10-1.....	83
5.4.	Antikörper-Hyphen-Inhibitionsversuch .....	83
5.5.	Kultivierung von J774-Makrophagen .....	83
5.6.	Herstellung von Makrophagen-Überstand .....	84
5.7.	Isolierung von murinen Knochenmarkszellen.....	84
5.8.	Isolierung von murinen neutrophilen Granulozyten .....	85
5.9.	Infektionsversuch mit <i>A. fumigatus</i> und neutrophilen Granulozyten.....	85
5.10.	FITC-Markierung Aleuriokonidien.....	86
5.11.	Phagozytose von Aleuriokonidien .....	86
5.12.	Einfluss von Laminarin und Mannan auf die Phagozytose.....	87
5.13.	Nachweis von angesäuerten Phagolysosomen .....	87
5.14.	Bestimmung des Durchmessers von Aleuriokonidien .....	88

---

5.15.	Bestimmung der Auskeimungsgeschwindigkeit von Aleuriokonidien.....	88
5.15.1.	Aleuriokonidien in drei verschiedenen Medien .....	88
5.15.2.	Bestimmung der Auskeimungsgeschwindigkeit .....	89
5.16.	Austrocknungsversuch .....	89
5.17.	Auskeimung im sauren pH.....	89
5.18.	Überleben der Aleuriokonidien in Makrophagen.....	90
5.19.	TNF $\alpha$ -Messung .....	90
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>92</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung der Aleuriokonidien von <i>Aspergillus terreus</i> .....</b>	<b>92</b>
1.1.	Immunfluoreszenzfärbungen mit 2G8 .....	92
1.2.	Immunfluoreszenzfärbungen mit L10-1.....	94
1.3.	Messung des Durchmessers ruhender und auskeimender Aleuriokonidien... .....	97
1.4.	Auskeimungsgeschwindigkeit.....	97
1.4.1.	Auskeimungsgeschwindigkeit in drei verschiedenen Medien .....	97
1.4.2.	Auskeimungsgeschwindigkeit im Vergleich zu phialidischen Konidien...99	
1.5.	Austrocknungsversuch .....	101
1.6.	Phagozytoseversuche mit murinen J774-Makrophagen.....	103
1.6.1.	Bestimmung der Phagozytoserate von Aleuriokonidien.....	103
1.6.2.	Einfluss von Laminarin und Mannan auf die Phagozytoserate.....	103
1.7.	Untersuchung von $\beta$ -Glukan und Galaktomannan während der Infektion ... .....	104
1.8.	Nachweis von angesäuerten Phagolysosomen .....	106
1.9.	Auskeimung im sauren pH.....	107
1.10.	Überleben der Aleuriokonidien in Makrophagen.....	108
1.11.	TNF $\alpha$ -Messung .....	109
<b>2.</b>	<b>Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Hyphen- Oberflächenantigenen.....</b>	<b>111</b>
2.1.	Aufkonzentrierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper AB90-E8 und AE183-3 .....	111
2.1.1.	Aufkonzentrierung des AB90-E8-Hybridomüberstandes .....	111
2.1.2.	Reinigung des AB90-E8-Hybridomüberstandes.....	112
2.1.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration von AB90-E8 .....	113
2.1.4.	Aufkonzentrierung des AE183-3-Hybridomüberstandes.....	114

---

2.1.5.	Reinigung des AE183-3-Hybridomüberstandes.....	114
2.1.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration von AE183-3 .....	115
2.2.	Charakterisierung des Antikörpers AB80-E8 .....	116
2.2.1.	Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörper-Verdünnungen .....	116
2.2.2.	Immunfluoreszenzfärbung <i>A. fumigatus</i> Wildtypen .....	118
2.2.3.	Immunfluoreszenzfärbung verschiedener <i>Aspergillus</i> Spezies.....	119
2.2.4.	Untersuchung der Expression des AB90-E8-Antigens während der Germination.....	120
2.2.5.	Immunfluoreszenzfärbung nach Proteinase K-Verdau .....	121
2.2.6.	Immunfluoreszenzfärbung der D141 $\Delta$ <i>glfA</i> -Mutante .....	122
2.2.7.	Hyphenwachstum-Inhibitionsversuch.....	123
2.2.8.	Infektionsversuch mit <i>A. fumigatus</i> und neutrophilen Granulozyten.....	125
2.3.	Charakterisierung des Antikörpers AE183-3 .....	129
2.3.1.	Immunfluoreszenzfärbung mit AE183-3 Verdünnungen.....	129
2.3.2.	Immunfluoreszenzfärbung mit Pilzen der Ordnung Mucorales.....	130
2.3.3.	Immunfluoreszenzfärbung nach Proteinase K-Verdau .....	132
2.4.	Charakterisierung des Antikörpers AD105-30-2 .....	133
2.4.1.	Immunfluoreszenzfärbung von <i>F. oxysporum</i> .....	133
2.4.2.	Immunfluoreszenzfärbungen von <i>A. fumigatus</i> .....	134
2.4.3.	Immunfluoreszenzfärbungen nach Proteinase K-Verdau .....	136
2.4.4.	Untersuchung der Zellwandmutanten $\Delta$ <i>glfA</i> und $\Delta$ <i>ags1-3</i> .....	137
2.4.5.	SDS-PAGE und Western Blot von konzentriertem Kulturüberstand .....	140
2.4.6.	ELISA von <i>Aspergillus</i> Zellwandbestandteilen .....	141
2.4.7.	ELISA von <i>F. oxysporum</i> Kulturüberstand.....	143
2.4.8.	ELISA von <i>A. fumigatus</i> Kulturüberstand .....	144
2.4.9.	ELISA von D141 $\Delta$ <i>glfA</i> Kulturüberstand.....	145
2.4.10.	Immunfluoreszenzfärbung von <i>F. oxysporum</i> mit anti-GAG, L10-1 und AD105-30-2 .....	146
2.4.11.	Galaktosaminogalaktan-Mutante $\Delta$ <i>gtb3</i> .....	147
2.4.11.1.	Herstellung der $\Delta$ <i>gtb3</i> -Mutante.....	148
2.4.11.2.	Immunfluoreszenzfärbung der $\Delta$ <i>gtb3</i> -Mutante .....	150
2.4.11.3.	ELISA der $\Delta$ <i>gtb3</i> -Mutante .....	152

---

<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>153</b>
1.	<b>Charakterisierung der Aleuriokonidien (AC) von <i>Aspergillus terreus</i>....</b> .....	<b>153</b>
2.	<b>Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) und ihren</b> <b>Antigenen .....</b>	<b>160</b>
2.1.	Der monoklonale Antikörper AB90-E8 und sein Antigen.....	160
2.2.	Der monoklonale Antikörper AE183-3 .....	166
2.3.	Der monoklonale Antikörper AD105-30-2 .....	167
2.3.1.	Galaktofuranose als potenzieller Bestandteil des AD105-30-2-Antigens	168
2.3.2.	Galaktosaminogalaktan als potenzielles Antigen von AD105-30-2 .....	170
2.4.	Monoklonale Antikörper als potenzielle Impfstoffe oder Mittel der Diagnostik .....	172
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>176</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>179</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>182</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>227</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

(w/v)	Gewichtsprozent
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AC	<i>accessory conidia</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AM	Alveolarmakrophagen
AMM	<i>Aspergillus Minimal Medium</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
<i>C.</i>	<i>Cunninghamella</i>
CBS	<i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures</i>
CFW	<i>calcofluor white</i>
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CR	<i>complement receptor</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGSC	<i>Fungal Genetics Stock Center</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
<i>G.</i>	<i>Galleria</i>

---

GAG	Galaktosaminogalaktan
Gal <sub>f</sub>	Galaktofuranose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlfA	UDP-Galaktopyranose-Mutase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	demineralisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes Wasser
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEPES (H)	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IA	Invasive Aspergillose
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPA	Invasive pulmonale Aspergillose
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Lichtheimia</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse
<i>M.</i>	<i>Mucor</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
n.s.	nicht signifikant
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

---

p.a.	pro analysi
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>phialidic conidia</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
R.	<i>Rhizopus</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>synthetic defined</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese
spp.	mehrere Spezies
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll Like Rezeptoren
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridinphosphat
V	Volt
x g	vielfache Erdbeschleunigung

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abbildung 1: peqGOLD pre-stained protein marker IV (VWR).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 2: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 3: Beispielbild der Auskeimungsstadien von AC.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden AC und in RPMI 1640 (H) inkubierten AC mit 2G8 (rot) und CFW (blau).....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung mit L10-1 (rot) von in AMM gewachsenen A. terreus At17-14 Hyphen.....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden AC und PC des A. terreus Stammes At17-14 mit L10-1.....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung von Hyphen mit AC der Stämme A. terreus SBUG844 und A. terreus T9 mit L10-1 (rot) und CFW (blau).....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung mit L10-1 (rot) von ausgekeimten AC nach sechs (A-D) beziehungsweise neun (E) Stunden in AMM, CFW (blau).....</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 9: Durchmesser der Konidienkörper ruhender und auskeimender AC.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 10: Auskeimung von AC in drei verschiedenen Medien.....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 11: Vergleich der Auskeimungsgeschwindigkeit in RPMI 1640 + 5 % FCS (H).....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 12: Vergleich der Auskeimungsgeschwindigkeit von AC und PC in Sabouraud-Medium.....</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 13: Auskeimung von Sporensuspensionen nach Austrocknung.....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 14: Phagozytose-Versuch mit AC von A. terreus At17-14 und J774-Zellen.....</i>	<i>103</i>
<i>Abbildung 15: Phagozytose von AC unter Einfluss von Laminarin (100 µg/ml) und Mannan (300 µg/ml).....</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 16: Freisetzung von Galaktomannan von internalisierten AC nach sechsständiger Inkubation.....</i>	<i>105</i>
<i>Abbildung 17: 2G8-Färbung von AC nach sechsständiger Infektion.....</i>	<i>106</i>
<i>Abbildung 18: Beispielbild der LysoTracker DND-26 Färbung.....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 19: Auswertung der Färbung durch LysoTracker DND-26 von AC, die sechs Stunden mit J774-Zellen inkubiert wurden.....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 20: Auskeimung von AC und PC von A. terreus und PC von A. fumigatus in AMM, pH 6,8 und pH 5,0.....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 21: Infektion von J774-Zellen mit AC.....</i>	<i>109</i>



Abbildung 22: TNF $\alpha$ -Messung des Mediums nach sechsstündiger Inkubation von J774-Makrophagen mit AC und PC von <i>A. terreus</i> At17-14.....	110
Abbildung 23: TNF $\alpha$ -Messung von Kulturüberstand infizierter J774-Makrophagen	110
Abbildung 24: Aufkonzentrierung des Hybridomüberstandes AB90-E8 .....	112
Abbildung 25: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels des aufgereinigten Antikörpers AB90-E8 .....	113
Abbildung 26: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels des aufgereinigten Antikörpers AE183-3.....	115
Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung <i>A. fumigatus</i> D141 Hyphen, die in RPMI 1640 (H) gewachsen waren, mit verschiedenen AB90-E8-Konzentrationen (rot).....	116
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von <i>A. fumigatus</i> D141 in verschiedenen Medien mit AB90-E8 (rot).....	117
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung mit AB90-E8 von in Sabouraud-Medium gewachsenen Hyphen von <i>A. fumigatus</i> Wildtypstämmen und drei klinischen <i>A. fumigatus</i> Isolaten .....	118
Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung mit AB90-E8 von in Sabouraud-Medium gewachsenen Hyphen verschiedener <i>Aspergillus</i> Spezies.....	119
Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung von <i>A. fumigatus</i> im frühen Stadium der Auskeimung .....	121
Abbildung 32: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AB90-E8-Antigen durch Proteinase K-Verdau zerstört wird .....	122
Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen D141 und D141 $\Delta$ glfA Hyphen mit AB90-E8 (rot). .....	123
Abbildung 34: Kontrollfärbung von <i>A. fumigatus</i> D141 mit AB90-E8 (rot) und AE183-3.....	124
Abbildung 35: Hyphenwachstum-Inhibitionsversuch mit AB90-E8 und AE183-3 .....	125
Abbildung 36: <i>A. fumigatus</i> D141 Mito GFP-Hyphen mit PMN nach fünfständiger Inkubation bei 37°C (blau) .....	126
Abbildung 37: Konfrontationsversuch von <i>A. fumigatus</i> D141 Mito GFP-Hyphen und PMN (blau) nach vorangegangener Opsonisierung mit AB90-E8 (rot) nach fünf Stunden.....	127
Abbildung 38: Ausschnitt der <i>A. fumigatus</i> D141 Mito GFP-Hyphenzellwand nach fünfständiger Inkubation bei 37°C.....	127
Abbildung 39: Schematische Zeichnung der mitochondrialen Fragmentierung modifiziert nach RUF (2021) .....	128

Abbildung 40: <i>A. fumigatus</i> D141 Mito GFP-Hyphen, grüner Fluoreszenzkanal .....	128
Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen <i>L. corymbifera</i> Hyphen mit verschiedenen AE183-3-Konzentrationen .....	129
Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung von <i>L. corymbifera</i> CBS 429.75 mit AE183-3 und CFW .....	130
Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Pilze der Ordnung Mucorales mit AE183-3 .....	131
Abbildung 44: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AE183-3-Antigen durch Proteinase K-Verdau zerstört wird .....	132
Abbildung 45: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen <i>F. oxysporum</i> Hyphen mit AB135-8 und AD105-30-2 .....	133
Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung von in AMM gewachsenen <i>A. fumigatus</i> Hyphen mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau) .....	134
Abbildung 47: Immunfluoreszenzfärbung von <i>A. fumigatus</i> Af293 in verschiedenen Medien mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau) .....	135
Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbung von <i>A. nidulans</i> A26 mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau) .....	135
Abbildung 49: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AD105-30-2-Antigen durch Proteinase K zerstört wird .....	136
Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbung von in RPMI 1640 (H) gewachsenen Hyphen des <i>A. fumigatus</i> Wildtypstammes D141 und D141 $\Delta$ glfA mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau) .....	137
Abbildung 51: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen <i>A. fumigatus</i> D141 $\Delta$ glfA, Komplementante und Wildtypstamm Hyphen mit AD105-30-2 (rot) .....	138
Abbildung 52: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen $\Delta$ ags1-3 Hyphen mit AD105-30-2 (rot) .....	139
Abbildung 53: SDS-Gel des konzentrierten Kulturüberstands nach Coomassiefärbung. ....	140
Abbildung 54: Western Blot-Färbung des konzentrierten Kulturüberstands mit L10-1 und AD105-30-2 .....	141
Abbildung 55: ELISA der Zellwandbestandteile (A) und GAG-Fraktionen (B) .....	142
Abbildung 56: ELISA mit <i>F. oxysporum</i> Kulturüberstand .....	143
Abbildung 57: ELISA von SD-Asp Kulturüberstand .....	144
Abbildung 58: ELISA von <i>A. fumigatus</i> D141 und D141 $\Delta$ glfA Kulturüberstand mit den	

---

<i>Antikörpern L10-1, AD105-30-2 und AB135-8.....</i>	<i>145</i>
<i>Abbildung 59: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen F. oxysporum Hyphen mit den Antikörpern (rot) AD105-30-2, L10-1, anti-GAG und CFW (blau).....</i>	<i>146</i>
<i>Abbildung 60: GAG Syntheseweg modifiziert nach SPETH et al. (2019) .....</i>	<i>147</i>
<i>Abbildung 61: Schematische Darstellung des Prinzips der Fusions-PCR. ....</i>	<i>148</i>
<i>Abbildung 62: Transformation in AfS35. Nach erfolgreicher Transformation sind auf beiden Platten, die Hygromycin B als Selektionsmarker enthalten, Klone gewachsen. Die ausgewählten Klone wurden genetisch durch mehrere PCR getestet. ....</i>	<i>149</i>
<i>Abbildung 63: Agarose-Gel der PCR-Produkte. Nachweis der Hygromycin-Resistenzkassette (A) und der Deletion des Gens gtb3 (B, C).....</i>	<i>149</i>
<i>Abbildung 64: Immunfluoreszenzfärbung der AfS35Δgtb3-Mutante mit L10-1 (rot) und CFW (blau). ....</i>	<i>150</i>
<i>Abbildung 65: Immunfluoreszenzfärbung der Δgtb3-Mutante und des entsprechenden Wildtypstamms Af293 mit AD105-30-2, L10-1 und anti-GAG .....</i>	<i>151</i>
<i>Abbildung 66: ELISA von AfS35 und AfS35Δgtb3 SD-Asp mit den Antikörpern L10-1 und AD105-30-2.....</i>	<i>152</i>

## TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von Aspergillus spp. (DE HOOG et al., 2000).</i>	25
<i>Tabelle 2: Verwendete Pilzstämme.</i>	55
<i>Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.</i>	57
<i>Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für das Konstrukt Af293Δgtb3 bzw. AfS35Δgtb3.</i>	57
<i>Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.</i>	58
<i>Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper.</i>	58
<i>Tabelle 7: Inhaltsstoffe der 20x Salzlösung ohne MgSO<sub>4</sub> und ohne Stickstoffquelle.</i>	59
<i>Tabelle 8: Inhaltsstoffe der 40 % Glukose-Lösung.</i>	59
<i>Tabelle 9: Inhaltsstoffe der 2 M Ammoniumtartrat-Lösung.</i>	59
<i>Tabelle 10: Inhaltsstoffe der 0,4 M MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O-Lösung.</i>	60
<i>Tabelle 11: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung I.</i>	60
<i>Tabelle 12: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung II.</i>	60
<i>Tabelle 13: Inhaltsstoffe von AMM-Flüssigmedium.</i>	60
<i>Tabelle 14: Inhaltsstoffe 2x Pepton (2 %).</i>	61
<i>Tabelle 15: Inhaltsstoffe der 2x Glukose (8 %).</i>	61
<i>Tabelle 16: Inhaltsstoffe der 2x Glukose (8 %) für Sabouraud-Agar.</i>	61
<i>Tabelle 17: Inhaltsstoffe der Lösung S.</i>	61
<i>Tabelle 18: Inhaltsstoffe der Lösung D.</i>	62
<i>Tabelle 19: Zusammensetzung SD-Medium.</i>	62
<i>Tabelle 20: Inhaltsstoffe des BSA-Mediums.</i>	62
<i>Tabelle 21: Inhaltsstoffe des 2x Sorbitol-Agars.</i>	62
<i>Tabelle 22: Inhaltsstoffe des 2x Sorbitol-Soft-Agars.</i>	63
<i>Tabelle 23: Verwendeter Selektionsmarker.</i>	63
<i>Tabelle 24: Zusammensetzung Trenngel (für zwei Gele).</i>	67
<i>Tabelle 25: Zusammensetzung Sammelgel (für zwei Gele).</i>	67
<i>Tabelle 26: Inhaltsstoffe 10x SDS-Laufpuffer.</i>	68
<i>Tabelle 27: Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung.</i>	68
<i>Tabelle 28: Zusammensetzung Schnellentfärber.</i>	69
<i>Tabelle 29: Zusammensetzung Transferpuffer.</i>	70
<i>Tabelle 30: Zusammensetzung Ponceau-Färbelösung.</i>	70
<i>Tabelle 31: Zusammensetzung TBS-T.</i>	70

---

<i>Tabelle 32: Einzelkomponente des Glycin-Puffers.</i> .....	70
<i>Tabelle 33: Zusammensetzung Glycin-Puffer</i> .....	70
<i>Tabelle 34: Zusammensetzung PBS.</i> .....	71
<i>Tabelle 35: Zusammensetzung Lösung 2.</i> .....	78
<i>Tabelle 36: Zusammensetzung Lösung 6.</i> .....	78
<i>Tabelle 37: Zusammensetzung Lösung 7.</i> .....	78
<i>Tabelle 38: Zusammensetzung Lösung 8.</i> .....	78
<i>Tabelle 39: Binding Buffer.</i> .....	80
<i>Tabelle 40: Elution Buffer.</i> .....	80
<i>Tabelle 41: Neutralization Buffer.</i> .....	80
<i>Tabelle 42: Proteinase K-Puffer.</i> .....	82
<i>Tabelle 43: Zusammensetzung der Proben für die Messung von TNF<math>\alpha</math> mit und ohne Laminarin.</i> .....	91
<i>Tabelle 44: Proteinkonzentrationen der Fraktionen des aufgereinigten Antikörpers AB90-E8.</i> .....	114
<i>Tabelle 45: Proteinkonzentrationen von AE183-3-Fraktionen, Vorlauf und Durchlauf</i> .....	115

## I. EINLEITUNG

Pilze sind weltweit verbreitet und Schätzungen zur Folge gibt es zwischen 2,2-3,8 Millionen verschiedene Arten (HAWKSWORTH und LÜCKING, 2017). Man findet sie ubiquitär in der Umwelt, wo sie unterschiedliche Habitate wie den Erdboden oder das Wasser bewohnen (LATGÉ, 1999). Die zu den Eukaryonten gehörenden Pilze weisen einen echten Zellkern mit Chromosomen und Zellorganellen wie die Mitochondrien und den Golgi-Apparat auf (GROß, 2013). Neben anderen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Parasiten sind auch Pilze in der Lage Infektionskrankheiten in Menschen und Tieren auszulösen. Als opportunistische Erreger nutzen viele Pilze die Abwehrschwäche ihrer Wirte und lösen somit oft schwerwiegende Erkrankungen aus. Im gesunden Wirt kann der Erreger jedoch meist schnell durch das Immunsystem eliminiert werden (LATGÉ, 1999).

In der Humanmedizin kommt es durch die steigende Zahl von immunsupprimierten Patienten aufgrund von Krebstherapien und Organ- oder Stammzelltransplantationen somit auch zur steigenden Inzidenz von invasiven Mykosen (BROWN et al., 2012). Auslöser für diese invasiven Mykosen können zum einen Hefepilze wie *Candida albicans* oder aber filamentöse Schimmelpilze sein. Eine besonders wichtige Rolle bei den Schimmelpilzinfektionen spielen hierbei *Aspergillus (A.)* spp., wobei *A. fumigatus* den Großteil der Mykosen auslöst (DENNING, 1998). Die Mortalitätsrate kann bei erkrankten Patienten bis zu 50 % betragen (BROWN et al., 2012). Doch auch andere *Aspergillus* spp. wie *A. terreus* verursachen immer häufiger schwere Erkrankungen. Der Grund für die steigenden Inzidenzen ist bisher ungeklärt, doch ist bereits bekannt, dass *A. terreus* eine in vitro Resistenz gegenüber Amphotericin B besitzt und auch in der klinischen Anwendung schlecht auf den antimykotischen Wirkstoff anspricht (PFALLER und DIEKEMA, 2004). *A. terreus* ist zudem in der Lage sogenannte *accessory conidia*, die auch Aleuriokonidien genannt werden, zu bilden, die eine Rolle bei der Pathogenese und Dissemination spielen können (DEAK et al., 2011). Die Prognose bei invasiven Mykosen, die durch *A. terreus* verursacht wurden, ist schlecht und die Mortalitätsrate liegt bei 66 % (STEINBACH et al., 2004).

Neben *Aspergillus* spp. sind weitere Schimmelpilze wie Vertreter der Ordnung Mucorales sowie *Fusarium* spp. in der Lage invasive Mykosen zu verursachen. Der prozentuale Anteil ist im Vergleich zu Mykosen, die durch *Aspergillus* spp. ausgelöst werden, aber gering, es wird jedoch auch hier in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz beobachtet (LARCHER et al., 2021).

Auch in der Veterinärmedizin spielen Infektionen mit Schimmelpilzen eine Rolle. Bei nahezu allen Säugetieren und Vögeln können diese auftreten, jedoch unterscheiden sie sich oft je nach Tierart in ihrer Ausprägungsart (SEYEDMOUSAVI, 2018).

Im Vergleich zu anderen krankheitserregenden Mikroorganismen schreitet die Erforschung von Schimmelpilzinfektionen trotz der hohen Mortalitätsraten nur sehr langsam voran. Gleichzeitig stehen nur einige wenige antimykotische Wirkstoffe als Therapiemittel zur Verfügung. Aufgrund später und schwieriger Diagnosen gestaltet sich die Therapie zudem oft kompliziert und nicht erfolgreich (BROWN et al., 2012). Neben der Entwicklung neuer antimykotischer Wirkstoffe müssen daher auch andere therapeutische Ansätze in Betracht gezogen werden. In der Krebstherapie ist der Einsatz monoklonaler Antikörper bereits seit einigen Jahren etabliert. Auch für die Behandlung invasiver Mykosen kommen monoklonale Antikörper in Frage (ULRICH und EBEL, 2020).

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es die Aleuriokonidien von *A. terreus* näher zu charakterisieren und ihre Interaktion mit murinen J774-Makrophagen zu untersuchen. Im zweiten Teil der Arbeit sollten drei verschiedene monoklonale Antikörper charakterisiert und versucht werden ihre entsprechenden Oberflächenantigene auf der Zellwand von *A. fumigatus*, *Lichtheimia corymbifera* und *Fusarium oxysporum* zu identifizieren.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Aspergillus* spp.

#### 1.1. *Aspergillus fumigatus*

##### 1.1.1. Taxonomie

Schon 1729 wurde die Gattung *Aspergillus* das erste Mal von Pier Antonio Micheli beschrieben. Den Botaniker erinnerte die Wuchsform der Sporenträger an einen Weihwasserwedel (Aspergill) und er verlieh der Gattung so ihren Namen. Heute ist *Aspergillus* auch unter der Bezeichnung „Gießkannenschimmel“ bekannt, die ebenfalls auf die Form der Sporenträger zurückzuführen ist. Von den bisher fast 300 *Aspergillus* Spezies (HOUBRAKEN et al., 2014) sind nur einige wenige dafür bekannt pathogen zu sein. Zu den pathogenen Vertretern gehören *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans* (DENNING, 1998). In einer Veröffentlichung von J. B. Georg W. Fresenius im Jahr 1863 wurde die fakultativ pathogene Spezies *A. fumigatus* erstmalig erwähnt (SCHMIDT, 1998). Den Namen *A. fumigatus* („rauchender *Aspergillus*“) verdiente sich der Schimmelpilz durch die grau-grünliche Färbung der Sporen, die sich über die Luft wie eine Rauchwolke verbreiten können. Erst seit 2009 ist bekannt, dass *A. fumigatus* sich nicht nur vegetativ, sondern auch sexuell vermehren kann. Damit kann *A. fumigatus* der Klasse der *Ascomycota* zugeordnet werden (O'GORMAN et al., 2009). In Tabelle 1 wird die taxonomische Klassifikation von *Aspergillus* spp. dargestellt. Neben den fakultativ pathogenen *Aspergillus* Spezies gibt es auch Aspergillen, die in der Industrie ihre Anwendung bei der Herstellung von Lebensmitteln finden. So wird zum Beispiel *A. oryzae* zur Fermentation von Reis und Sojabohnen genutzt. Auch bei der Herstellung von Medikamenten wird sich die Produktion von Primär- und Sekundärmetaboliten durch *Aspergillus* spp. zu Nutze gemacht. So wird beispielsweise der Sekundärmetabolit Lovastatin von *A. terreus* als cholesterinsenkendes Arzneimittel eingesetzt (DAGENAIS und KELLER, 2009). In der Landwirtschaft gefürchtet wird jedoch beispielsweise *A. flavus*. Der Lagerpilz kann gesundheitsschädigende Aflatoxine produzieren und zur Entstehung von Leberkrebs beitragen (WILLIAMS et al., 2004).



Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von *Aspergillus* spp. (DE HOOG et al., 2000).

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

### 1.1.2. Habitat, Morphologie und Lebenszyklus

Der ubiquitär vorkommende Schimmelpilz *A. fumigatus* gehört zu den Saprophyten. Das bedeutet, dass er nicht in der Lage ist Chemo- oder Photosynthese zu betreiben. In seiner ökologischen Nische, dem Erdboden, bezieht der Pilz seine Nährstoffe ausschließlich aus totem organischem Material. Die asexuellen Sporen von *A. fumigatus*, auch Konidien genannt, haben einen Durchmesser von 2-3 µm und werden durch die Luft verbreitet (LATGÉ, 1999). Die Konidien dienen dem Pilz zum einen als Übertragungsweg und zum anderen als Überdauerungsform während schlechter Lebensbedingungen. Die Einlagerung großer Mengen Trehalose befähigt die Sporen über lange Zeit auch unter ungünstigen Bedingungen zu persistieren (NI und YU, 2007). Auf der Oberfläche der Konidien findet man eine hydrophobe Proteinhülle, die sogenannte *rodlet layer*, die aus den Hydrophobinen RodA und RodB besteht. Diese Hülle dient den Konidien als Schutz vor äußeren Einflüssen und gegenüber der Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen (PARIS et al., 2003). Die charakteristische grau-grüne Färbung der Sporen entsteht durch das in die Zellwand eingelagerte Pigment Melanin, das eine wichtige Rolle im Schutz gegenüber enzymatischem Abbau und reaktiven Sauerstoffspezies spielt (LANGFELDER et al., 2003).

Mit der Auskeimung der Konidien beginnt der Lebenszyklus von *Aspergillus*. Äußere Faktoren wie verfügbare Stickstoff- und Kohlenhydratquellen als auch Feuchtigkeitsgehalt, pH-Wert und Temperatur beeinflussen die Auskeimung. *A. fumigatus* ist ein thermophiler Aerobier. Sein Wachstumsbereich liegt zwischen 30 und 55°C, wobei seine optimale Wachstumstemperatur 37°C beträgt. Der Pilz

toleriert zudem höhere Temperaturen und überlebt bei bis zu 70°C (LATGÉ, 1999). Sobald sich Sporen auf einer Oberfläche angelagert haben und dort günstige Umweltbedingungen vorfinden, beginnen sie mit der Auskeimung. Durch die Spaltung der Trehalosepolymere und deren Umwandlung in Glycerin verändert sich der osmotische Druck. Dadurch kommt es zum Wassereinstrom und somit zum Anschwellen der Konidien (D'ENFERT, 1997). Die Konidien wachsen dabei isotrop. Als nächstes bildet sich an einem Pol der Konidie ein Keimschlauch aus. Hieraus entstehen durch terminales Wachstum die Hyphen (BALTUSSEN et al., 2020). Diese werden durch Septen in einzelne Kompartimente geteilt. Die Septen besitzen jedoch eine Pore, über die es zum Austausch von Zytoplasma und Zellorganellen kommt (BLOEMENDAL und KÜCK, 2013). Durch die Verzweigung der einzelnen Hyphen wird das sogenannte Myzel gebildet. Kommen Hyphen in Kontakt mit Luft bilden sie aus Fußzellen zunächst Konidiophore. Aus deren Vesikel stülpen sich dann Phialiden aus, die wiederum die neuen Konidien bilden. Durch Abschnürung in Ketten werden die neuen Sporen freigesetzt und können sich nun über die Luft weiterverbreiten.

### 1.1.3. Klinische Relevanz in der Humanmedizin

Durch das ubiquitäre Vorkommen von *A. fumigatus* atmet jeder Mensch mehrere hundert Sporen am Tag ein (LATGÉ, 1999). Ein gesunder, immunkompetenter Mensch kann die inhalierten Sporen jedoch umgehend durch Zellen des angeborenen Immunsystems eliminieren. Aufgrund ihrer geringen Größe können Sporen das Flimmerepithel und die mukoziliäre Clearance umgehen und somit bis tief in die Lunge vordringen (LATGÉ, 1999). Weiterhin kann das durch *A. fumigatus* produzierte Gliotoxin die Frequenz des Zilienschlags des respiratorischen Epithels verringern, was die mukoziliäre Clearance zusätzlich schwächt (AMITANI et al., 1995). Im immunkompetenten Menschen werden bis in die Alveolen vorgedrungene Sporen durch Alveolarmakrophagen (AM) umgehend phagozytiert. Gleichzeitig werden verschiedene Chemo- und Zytokine von diesen AM abgegeben, wodurch neutrophile Granulozyten (PMN) rekrutiert werden können, die wiederum in der Lage sind bisher nicht phagozytierte Konidien oder bereits entstandene Hyphen zu eliminieren (DAGENAIS und KELLER, 2009).

Stark gefährdet für eine Infektion mit *A. fumigatus* sind daher Menschen, deren Immunsystem geschwächt ist. Durch den Fortschritt der Medizin im Bereich der

Krebstherapie sowie der Knochenmarks- und Organtransplantationen gibt es heute deutlich mehr immungeschwächte Patienten, für die eine systemische Aspergillose lebensbedrohlich sein kann (LATGÉ, 1999; NUCCI und ANAISSIE, 2009).

Bei den durch *A. fumigatus* ausgelösten Erkrankungen differenziert man zwischen den nicht-invasiven und den invasiven Formen. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und das Aspergillom zählen zu den nicht-invasiven Formen.

#### **1.1.3.1. Die allergische bronchopulmonale Aspergillose**

Die ABPA ist eine der schwerwiegendsten allergischen Lungenerkrankungen, die durch *Aspergillus* Spezies verursacht wird (LATGÉ, 1999). Hierbei kommt es zu einer durch T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten ausgelösten allergischen Reaktion des Immunsystems auf Antigene von *A. fumigatus* (KNUTSEN et al., 1998). Dies hat eine starke Entzündungsreaktion der Bronchien und des Lungenparenchyms zur Folge (APTER und GREENBERGER, 1990). Zu den prädisponierenden Faktoren gehören unter anderem Vorerkrankungen wie Asthma oder zystische Fibrose (DENNING et al., 2013; MATURU und AGARWAL, 2015). ABPA kann altersunabhängig auftreten und manifestiert sich klinisch durch bronchiales Asthma mit transienten Lungeninfiltraten, die sich über Bronchiektasien bis zur Lungenfibrose entwickeln und somit auch zum Tod führen können (WARDLAW und GEDDES, 1992; VAUGHAN, 1993). Weiterhin können Thoraxschmerzen, Hämoptysen (MCCARTHY und PEPYS, 1971) und seltener auch ein Pneumothorax (RICKETTI et al., 1984) auftreten. Zur Diagnose der ABPA können die Rosenberg-Patterson Kriterien herangezogen werden. Zu den Hauptkriterien zählen dabei unter anderem das bronchiale Asthma, Lungeninfiltrate, plötzlich auftretende Hautreaktionen auf *A. fumigatus* Antigene, ein erhöhtes Gesamt-IgE (Ig = Immunglobulin) im Serum sowie erhöhte IgG- und IgE-Antikörperspiegel im Serum und zentrale Bronchiektasien (ROSENBERG et al., 1977).

#### **1.1.3.2. Das Aspergillom**

Das Aspergillom, oder auch Pilzball, entsteht durch Kolonisation und Proliferation des Pilzes in einem, zum Beispiel durch Tuberkulose gebildeten, Hohlraum der Lunge (LATGÉ und CHAMILOS, 2019). Auch andere Erkrankungen wie die Sarkoidose, bullöse Lungenerkrankungen oder die ABPA können durch ein Aspergillom kompliziert werden (HOURS et al., 2008; SMITH und DENNING,

2011). Der Pilzball besteht hauptsächlich aus Hyphen und extrazellulärer Matrix. (DENNING et al., 2016). Oft bleiben Patienten asymptomatisch und das Aspergillom ist ein Zufallsbefund bei der radiologischen Untersuchung (LATGÉ, 1999). Durch Hypheninvasion in die bronchialen Arterien kann es jedoch auch zu lebensgefährlichen Hämoptysen kommen (CHOTIRMALL et al., 2013). Eine chirurgische Entfernung des Aspergilloms geht mit hoher Morbidität und Mortalität einher und sollte daher nur Hochrisikopatienten mit lebensbedrohlichen Hämoptysen und guter Lungenfunktion vorbehalten sein (JEWKES et al., 1983). Neben dem chirurgischen Eingriff sind zudem Strahlentherapie (SHNEERSON et al., 1980), systemische Antimykotikagabe (HAMMERMAN et al., 1974; CAMPBELL et al., 1991) oder intrakavitär applizierte Antimykotikagabe (SHAPIRO et al., 1988; MUNK et al., 1993) möglich.

### 1.1.3.3. Die invasive Aspergillose

Die durch *Aspergillus* spp. ausgelöste invasive Aspergillose (IA) kann in immunsupprimierten Patienten einen schweren Erkrankungsverlauf zur Folge haben. Besonders gefährdet sind Patienten mit hämatologischen Neoplasien wie Leukämie, Organ- und Stammzelltransplantationspatienten, AIDS (= *Aquired Immunodeficiency Syndrome*)-Patienten, Patienten unter systemischer Kortikosteroidtherapie oder auch Patienten, die an chronischer Granulomatose (CGD) leiden (DAGENAIS und KELLER, 2009). Auch Virusinfektionen, ausgelöst beispielweise durch Influenzaviren oder den neuartigen SARS-Cov-2-Virus, können durch *A. fumigatus* Sekundärinfektionen zu einer IA führen (SCHAUWVLIEGHE et al., 2018; CHONG und NEU, 2021).

Die Immunsuppression der Patienten kann entweder durch eine Neutropenie, wie es beispielweise bei Krebspatienten der Fall ist, oder aber durch eine Beeinträchtigung der Funktion PMN, wie zum Beispiel durch einen genetischen Defekt des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasesystems bei CGD, kommen (LEIDING und HOLLAND, 1993). Zytostatika wie Cyclophosphamid werden über einen langen Zeitraum in der Krebstherapie eingesetzt. Das Medikament hat die Eigenschaft sich in die DNA (= *deoxyribonucleic acid*) einzulagern, was eine Störung der Replikation von weißen Blutzellen und somit auch von PMN zur Folge hat. Bei einer Infektion kommt es daher bei dieser Form der Immunsuppression zu einer stark abgeschwächten Entzündungsreaktion und gleichzeitig zu einem ungehinderten,

schnellen und massiven Hyphenwachstum, welches Thrombosen und Blutungen verursacht. Durch eine Angioinvasion kann es weiterhin zur Dissemination in andere Organe kommen (DAGENAIS und KELLER, 2009).

Generell lassen sich vier verschiedene Formen der IA unterscheiden. Dazu gehören die akute oder chronisch invasive pulmonale Aspergillose (IPA), die Tracheobronchitis oder obstruktive Bronchitis, die akute invasive Rhinosinusitis und die disseminierte Aspergillose (DENNING, 1998). Im frühen Stadium der IA sind Patienten oft symptomlos. Im Verlauf der Erkrankung treten trockener Husten, Dyspnoe und Fieber sowie Brustschmerzen und Hämoptysen auf. Bleibt eine IPA unbehandelt, kann sich daraus durch hämatogene Streuung eine disseminierte IA entwickeln (THOMPSON und PATTERSON, 2008). Die Mortalitätsrate bei an IA erkrankten Patienten beläuft sich auf bis zu 50 % (BROWN et al., 2012).

## **1.2. *Aspergillus terreus***

### **1.2.1. Taxonomie**

Erstmals beschrieben wurde die Sektion *Terrei*, die zur Untergattung *Circumdati* gehört, von RAPER und FENNELL (1965). *A. terreus* stellt den wichtigsten Vertreter dieser Sektion dar. Die Taxonomie stimmt ansonsten mit der von *A. fumigatus* überein.

### **1.2.2. Habitat, Morphologie und Lebenszyklus**

Das Habitat sowie Morphologie und Lebenszyklus von *A. terreus* stimmen weitestgehend mit denen von *A. fumigatus* überein.

### **1.2.3. Bedeutung in der Humanmedizin**

Neben *A. fumigatus* ist auch *A. terreus* in der Lage eine IA auslösen zu können. Zwar macht *A. terreus* mit etwa 5 % bislang nur einen geringen Anteil aller Schimmelpilzinfektionen aus (RISSLEGGGER et al., 2017), doch gewinnt er als Krankheitserreger zunehmend an Bedeutung. Dies ist unter anderem mit der Resistenz gegenüber dem antimykotischen Wirkstoff Amphotericin B und damit einhergehenden aggressiveren und stärker disseminierenden Verläufen zu erklären (SUTTON et al., 1999; WALSH et al., 2003).

### **1.2.4. Aleuriokonidien**

Neben den phialidischen Konidien (PC) können Vertreter des *A. terreus*

Spezieskomplexes weitere asexuelle Sporen, die sogenannten *accessory conidia* oder Aleuriokonidien (AC), bilden (LASS-FLÖRL et al., 2021). Diese werden nicht wie PC bei Kontakt mit Luft, sondern direkt an den Hyphen in flüssiger Umgebung gebildet (DEAK et al., 2009). Auch während einer Infektion werden AC gebildet. Sie wurden bereits in infiziertem Gewebe von Mäusen sowie *Galleria (G.) mellonella* Larven gefunden (SELIGSOHN et al., 1977; SLESIONA et al., 2012a; LACKNER et al., 2019). Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass AC eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Pilzes während einer Infektion spielen und so zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate führen können. LACKNER et al. (2019) überprüften diese Hypothese, indem sie 15 *A. terreus* Stämme in einem Infektionsmodell von *G. mellonella* Larven untersuchten. Sie konnten aber keine Hinweise auf eine höhere Virulenz der AC im Vergleich zu PC finden. DEAK et al. (2011) konnten jedoch zeigen, dass AC im Vergleich zu PC eine weitaus stärkere Entzündungsreaktion in infizierten Makrophagen und einem Mausmodell der pulmonalen Aspergillose auslösen konnten. Dieselbe Arbeitsgruppe entdeckte ebenfalls vereinzelte, abgrenzbare Bereiche mit  $\beta$ -Glukan auf der Oberfläche der AC und schlussfolgerte, dass die Exposition dieses wichtigen Pilzpathogen-assoziierten molekularen Musters für die starke Immunantwort verantwortlich sein könnte (DEAK et al., 2011).

### 1.3. Klinische Relevanz in der Veterinärmedizin

Weltweit finden sich *Aspergillus* Spezies bei nahezu allen Haussäugetieren, Vögeln und Wildtieren. Der Hauptauslöser für lokalisierte oder auch systemische Aspergillosen sowie Allergien ist hier ebenfalls *A. fumigatus*, wobei auch andere Spezies diese Krankheiten verursachen können (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Wie in der Humanmedizin spielt auch in der Tierwelt eine Immunsuppression eine wichtige Rolle bei der Infektion durch *Aspergillus* Spezies (YAMAUCHI et al., 2011). Weiterhin können auch ungünstige Umweltbedingungen wie eine zu hohe Luftfeuchtigkeit (JACOBSON et al., 2000) oder Grunderkrankungen wie Tuberkulose prädisponierende Faktoren darstellen (ZMEILI und SOUBANI, 2007). Je nach Tierart unterscheidet sich die Ausprägung der Erkrankung. Die häufigsten Aspergillosen sind hierbei Lungeninfektionen bei Vögeln, sinonasale Infektionen bei Hund und Katze, Luftsackmykosen beim Pferd sowie Aborte und Mastitiden bei Rindern (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

### 1.3.1. Die Aspergillose des Hundes und der Katze

Zu den drei Hauptformen der Aspergillose des Hundes zählen die sinonasalen, bronchopulmonalen sowie disseminierten Infektionen. An der am häufigsten vorkommenden sinonasalen Infektion, erkranken insbesondere meso- und dolichocephale Rassen wie der Deutschen Schäferhund oder der Rottweiler (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Das fortgeschrittene Stadium der Krankheit zeichnet sich durch mukopurulenten bis purulenten Nasenausfluss, Ulzerationen des Nasenspiegels und bilaterales Nasenbluten aus (PEETERS und CLERCX, 2007). Die Infektion ist neben nasalen Neoplasien der zweithäufigste Grund für Nasenausfluss bei Hunden (TASKER et al., 1999). Auslöser der sinonasalen Aspergillose sind neben *A. fumigatus*, der am häufigsten isoliert wird, auch *A. niger*, *A. nidulans* oder *A. flavus*. In wenigen Fällen werden auch *Penicillium* Spezies nachgewiesen (TALBOT et al., 2014).

Symptome der weitaus seltener vorkommenden bronchopulmonalen Aspergillose sind mit Fieber, Husten und Abgeschlagenheit oft unspezifisch (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2011). Durch die auftretende Entzündungsreaktion findet man bei der zytologischen Untersuchung einer bronchoalveolären Lavage vor allem PMN sowie Makrophagen, jedoch nur selten Pilzbestandteile (BILLEN et al., 2009).

An der eher gelegentlich auftretenden, aber meist tödlichen, disseminierten Aspergillose erkranken oft Schäferhunde. Im Gegensatz zur sinonasalen Aspergillose wird die disseminierte Aspergillose weitaus seltener von *A. fumigatus* ausgelöst. Haupterreger der Infektion sind *A. terreus* und *A. deflectus* (SCHULTZ et al., 2008). Als Symptome der disseminierten Aspergillose treten unter anderem Gewichtsverlust, Anorexie, Erbrechen, Lethargie, Ataxie mit Gangabnormalitäten und Diskospondylitis auf (ELAD, 2019).

Durch *Aspergillus* spp. verursachte Otomykosen bei Hunden wurden ebenfalls bereits beschrieben. Eine vorangegangene Behandlungen mit topischen und systemischen Antibiotika stellt hier einen prädisponierenden Faktor dar (COYNER, 2010).

Bei der Katze treten vor allem die sinonasale und sinoorbitale Form der Aspergillose auf. Insbesondere brachycephale Rassen wie die Perserkatze scheinen häufig zu erkranken (BARRS et al., 2012; BARRS und TALBOT, 2014). Auslöser

für die sinoorbitale Infektion ist hauptsächlich *A. felis*, aber auch *A. udagawae* oder *A. viridinutans* (KANO et al., 2008; BARRS et al., 2013). Sinonasale Infektionen hingegen werden vermehrt durch *A. fumigatus* ausgelöst (BARRS et al., 2012). Als prädisponierender Faktor für die sinoorbitale Infektion wird oft eine virusinduzierte Immunschwäche genannt. Die Erkrankung entwickelt sich aus einer sinonasalen Aspergillose und ihre Ausbreitung im periorbitalen Raum erschwert die Behandlung und verschlechtert die Prognose deutlich (HAMILTON et al., 2000; BARACHETTI et al., 2009).

Selten treten auch Keratomykosen durch Sekundärinfektion mit *A. flavus* auf. Die Primärinfektion erfolgt hier vermutlich durch feline Herpesviren (LABELLE et al., 2009).

Neben den klinischen Symptomen können Computertomographie, Röntgen oder Endoskopie eingesetzt werden, um die Diagnose einer disseminierten Aspergillose zu stellen. Auch Zytologie, Serologie und Histopathologie sowie insbesondere die kulturelle Anzucht sind wichtige Bestandteile einer sicheren Diagnosestellung (SCHULTZ et al., 2008).

### 1.3.2. Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel

Der Haupterreger der aviären Aspergillose, für die prinzipiell alle Vögel anfällig sein können, ist *A. fumigatus* (ARNÉ et al., 2011). Unhygienische, feuchte oder warme Umgebung erhöht die Sporenkonzentration in der Umwelt, was wiederum einen prädisponierenden Faktor für eine Aspergillose darstellt (BEERNAERT et al., 2010). Auch Infektionen mit anderen *Aspergillus* Spezies wie *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* oder *A. nidulans* treten vereinzelt auf (AKAN et al., 2002; MARTIN et al., 2007). Die besondere Anatomie des Lungen-Luftsacksystems macht Vögel im Vergleich zu Säugetieren anfälliger für Infektionen. Die neun Luftsäcke fungieren als Blasebalg und leiten die Luft durch die Lunge, wo der Gasaustausch stattfindet (BROWN et al., 1997; FEDDE, 1998). Sporen von *A. fumigatus* können in das Lungen-Luftsack-System eindringen, indem sie aufgrund ihrer geringen Größe physikalische Barrieren überwinden (ARNÉ et al., 2011). Im Vergleich zu Säugetieren besitzen Vögel eine schlechte mukoziliäre Clearance (MAINA, 2006) und nur eine geringe Anzahl an Makrophagen in der Lunge, was die Elimination des Erregers erschwert (BROWN et al., 1997). Durch eine Immunsuppression sowie große Mengen an inhalierten Sporen kann es zur



Ausbildung von loser aufliegender Plaque kommen. Diese Plaques können zu einer Obstruktion der Trachea oder der Bronchien führen oder sogar die Luftsäcke füllen (BEERNAERT et al., 2010). Kommt es zu einem ungehinderten Hyphenwachstum innerhalb der Luftsäcke, können diese durch die Pilzhyphen penetriert werden, was Serositiden oder Nekrosen benachbarter Organe zur Folge haben kann (TSAI et al., 1992). Auch kann es durch hämatogene Streuung zu disseminierten Aspergillosen kommen (BEERNAERT et al., 2010). Bei den Krankheitsverläufen der Vögel kann zwischen der akuten und der chronischen Aspergillose sowie der Mykotoxikose unterschieden werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Betroffen von der akuten Aspergillose sind oft junge Vögel, die eine hohe Anzahl an Sporen inhaliert haben. Zu den Symptomen gehören Anorexie, Lethargie, Kümern, respiratorische Symptome, Polyurie, Polydipsie und plötzliche Todesfälle. Die Erkrankung geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Küken infizieren sich oft während des Schlüpfens durch Sporenkontamination der Eischale (HAMET et al., 1991). Bei älteren Tieren treten Symptome wie Zyanosen, Dyspnoe mit Schnabelatmung, Keuchen, nicht produktiver Husten und Schwanzwippen auf (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die selten auftretende chronische Aspergillose wird meist durch eine Immunsuppression aufgrund schlechter Haltung ausgelöst und tritt vor allem bei älteren Tieren auf. Sie weist im Vergleich zur akuten Form jedoch eine geringere Mortalität auf (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Auffällig werden die betroffenen Tiere durch unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, reduzierte Aktivität, Dyspnoe nach Bewegung, aber auch Ataxie, Torticollis, Ophistotonus oder gar Erblindung nach Befall des Nervensystems (DYAR et al., 1984; AKAN et al., 2002; THRONE STEINLAGE et al., 2003).

Die Aufnahme toxischer Metaboliten über kontaminiertes Futter kann bei Vögeln Mykotoxikosen auslösen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). In der Vogellunge kann *A. fumigatus* große Mengen Gliotoxin produzieren (RICHARD et al., 1996). Die immunsupprimierende Wirkung des Gliotoxins, unter anderem durch die Beeinträchtigung der Phagozytenfunktionen, kann somit zur Entstehung einer Aspergillose beitragen (SCHLAM et al., 2016). Das von anderen *Aspergillus* Spezies, insbesondere von *A. flavus*, produzierte Aflatoxin kann bei Vögeln nach oraler Aufnahme Leber- und Nierenschäden auslösen und zum Tod führen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

### 1.3.3. Die Aspergillose des Pferdes

Die zwei häufigsten durch *Aspergillus* Spezies ausgelösten Erkrankungen beim Pferd sind die Luftsackmykose und die Pneumonie (BLOMME et al., 1998; DOBESOVA et al., 2012). Prädisponierende Faktoren hierfür sind unter anderem eine Vorerkrankung an einer Enteritis (HATTEL et al., 1991), langanhaltende Antibiotikatherapie, Immunsuppression sowie Endokrinopathien oder Neoplasien (CARRASCO et al., 1996). Rasse- oder Geschlechtsdispositionen konnten bisher nicht festgestellt werden (DOBESOVA et al., 2012). Bei der Luftsackmykose bilden sich, mit der Gewebeoberfläche der medialen Bucht eines Luftsacks fest verbundene, deutlich abgrenzbare, gelb-braune, nekrotisierende Läsionen (COOK, 1966). Solange darunter liegende Strukturen wie Nerven und Gefäße noch nicht betroffen sind, verläuft die Erkrankung oft asymptomatisch. Bei Befall und dadurch entstehende Erosion der *Arteria maxillaris* oder der *Arteria carotis interna* kann es zu lebensbedrohlichen Blutungen kommen. Eine Beteiligung der kranialen Nerven kann zur Dysphagie, Fazialisparese, Kehlkopfpfeifen und Horner-Syndrom führen. (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Die pulmonale Aspergillose ist gekennzeichnet durch milde respiratorische Symptome, Tachypnoe mit Atemgeräuschen und Fieber (PACE et al., 1994; JOHNSON et al., 1999).

Neben den zwei Hauptformen der Aspergillose des Pferdes tritt weitaus seltener eine nasale Aspergillose, die durch Dyspnoe, ein- oder beidseitigem mukopurulenten Nasenausfluss und Epistaxis gekennzeichnet ist, auf (KENDALL et al., 2008).

Eine häufiger vorkommende, unter anderem durch *Aspergillus* Spezies ausgelöste (WADA et al., 2013), Erkrankung des Pferdes ist die Keratomykose. Sie tritt vor allem in wärmeren Klimazonen bei vorangegangenen Hornhautverletzungen auf. Am Auge kann es so zu leichten, oberflächlichen, punktförmigen Verletzungen oder aber schwerwiegenden, ulzerativen Einschmelzungen sowie Korneaabszessen kommen (SANSOM et al., 2005). Zu den Symptomen zählen Blepharospasmus, vermehrter Tränenausfluss und Photophobie (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Eine Pilzinfektion wird durch langanhaltende topische Antibiotikagabe begünstigt, da die normale Konjunktivenflora durch die Medikamentengabe beeinträchtigt wird. Eine Glukokortikoidbehandlung kann ebenso zum Pilzwachstum beitragen (SANSOM et al., 2005).

Klare Diagnosen von Luftsackmykosen und Aspergillosen der oberen Atemwege

sind oft schwer zu treffen, da auch viele andere Erkrankungen wie Infektionen der retropharyngealen Lymphknoten, eine pharyngeale lymphoide Hyperplasie, pharyngeale Polypen, Pneumonien oder bakterielle oder virale Infektionen hinter den oft unspezifischen respiratorischen Symptomen stehen können (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Neben der Evaluierung des klinischen Verlaufs sollte auch eine endoskopische Untersuchung erfolgen. (LUDWIG et al., 2005; DOBESOVA et al., 2012). Bei der Diagnosefindung der invasiven pulmonalen Aspergillose sollten stets auch epidemiologische Gesichtspunkte, wie die Haltungsbedingungen, die eine Aspergillose begünstigen können, berücksichtigt werden (SWEENEY und HABECKER, 1999). Ein histologischer Nachweis der Hyphen im Gewebe und die kulturelle Anzucht des Erregers sollten zur sicheren Diagnosestellung durchgeführt werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Auch serologische Tests können bei der Diagnose der Aspergillose des Pferdes hilfreich sein (GUILLOT et al., 1999).

#### **1.3.4. Die Aspergillose der Wiederkäuer**

Zu den Haupterkrankungen der Wiederkäuer, die durch *Aspergillus* Spezies, insbesondere *A. fumigatus* ausgelöst werden, zählen mykotische Pneumonien, Gastroenteritis, Mastitis, Plazentitis und Abort. Tiere mit einem intakten Immunsystem sind resistent gegenüber einer Infektion, wohingegen Milchkühe in einer frühen Phase der Laktation sehr anfällig für eine Erkrankung sind (PUNTENNEY et al., 2003). Die Aufnahme von *A. fumigatus* erfolgt über die Nahrung, da Heu und Silage häufig kontaminiert sind (COLE et al., 1977). Bei der gastrointestinalen Form der Aspergillose ist am häufigsten der Blättermagen betroffen, gefolgt von Pansen, Netzmagen und Labmagen (JENSEN et al., 1994). Erkrankte Tiere standen zuvor oft unter langanhaltender Therapie mit Breitspektrumantibiotika, wiesen eine verminderte Pansenkontraktion auf und hatten Durchfall oder sogar Meläna (JENSEN et al., 1994). Durch hämatogene Streuung aus den primären gastrointestinalen Läsionen kann es zu mykotischer Plazentitis und mykotischer Pneumonie als Sekundärinfektion kommen (HILL et al., 1971; SARFATI et al., 1996).

Die mykotische Pneumonie zeichnet sich durch einen schnellen, oft schweren, Verlauf mit Fieber, Husten, Nasenausfluss sowie flacher und röchelnder Atmung aus (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). In der Lunge finden sich oft an Tuberkulose erinnernde Granulome und in der Histologie können neben zahlreichen Hyphen

auch Oxalatkristalle, die durch von *Aspergillus* spp. produzierte Oxalsäure entstanden sind, beobachtet werden (MUNTZ, 1999). Durch den toxischen Effekt der Oxalsäure auf das Gewebe können Gewebsnekrosen entstehen. Die Schädigung des Gewebes kann starke Blutungen zur Folge haben (LEE et al., 1986).

Im dritten Trimester der Trächtigkeit können *Aspergillus* Spezies zur mykotischen Plazentitis und somit zum Abort führen (KNUDTSON und KIRKBRIDE, 1992). Oft verläuft die Plazentitis symptomlos, bei hoher Sporenbelastung können jedoch mehrere Aborte gleichzeitig innerhalb der Herde auftreten. Auch Nachgeburtverhalten kann in manchen Fällen auftreten. Eine folgende Trächtigkeit verläuft in der Regel wieder problemlos (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Eine mykotische Mastitis, die durch *A. fumigatus* ausgelöst wird, tritt häufiger bei Milchschaafen als bei Milchkühen auf. Insbesondere Tiere, die vor der Geburt antibiotisch behandelt werden mussten, sind gefährdet (PÉREZ et al., 1998; LAS HERAS et al., 2000).

Das in Silage vorkommende Mykotoxin Gliotoxin kann bei Rindern Symptome wie Abmagerung, Durchfall, vermindertes Allgemeinbefinden auslösen oder auch zum Tode führen (COLE et al., 1977). Bei Ziegen können nach der Aufnahme kontaminierten Heues abnormales Wachstum und histopathologische Veränderungen an Leber und Nieren festgestellt werden. Ebenso setzt das Gliotoxin die Fermentationsfähigkeit herunter, was die Futterverdaulichkeit reduzieren kann (MORGAVI et al., 2004). Weiterhin konnte bei Milchkühen ein neurologisches Syndrom, nach Aufnahme von mit *A. clavatus* kontaminiertem Futter beobachtet werden. *A. clavatus* kann tremorgene Metaboliten produzieren, die Symptome wie Muskelzittern, Paresen, Paralysen und anderen Gangabnormalitäten auslösen (LORETTI et al., 2003).

## 2. Weitere Pilzpathogene

Neben *Aspergillus* spp. wurden in Teilen dieser Arbeit auch zwei weitere pathogene Pilze mit untersucht. Hierbei handelt es sich um Vertreter der Gattungen *Lichtheimia* spp. und *Fusarium* spp., die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

### 2.1. *Lichtheimia* spp.

#### 2.1.1. Taxonomie

Die Gattung *Lichtheimia* gehört zu der Familie *Lichtheimiaceae*, die wiederum der Ordnung Mucorales angehört (HOFFMANN et al., 2013). Zuerst beschrieben wurde *Lichtheimia* (*L.*) *corymbifera* von Cohn im Jahr 1884 unter dem Namen *Mucor corymbifer*. Zunächst wurden sie der mesophilen Gattung *Absidia* zugeordnet. Aufgrund ihrer Morphologie, ihres höheren Temperaturoptimum und ihrer molekularen Phylogenie wurden die thermotoleranten Spezies der Gattung *Absidia*, wozu auch Vertreter der heutigen Gattung *Lichtheimia* gehörten, neu eingeordnet und zu der Gattung *Mycocladius* gezählt (HOFFMANN et al., 2007). Der Name wurde jedoch noch einmal zu *Lichtheimia* korrigiert (HOFFMANN et al., 2009). Eine Mykose, die durch Vertreter der Ordnung Mucorales ausgelöst wird, bezeichnet man als Mukormykose. Innerhalb der Gattung *Lichtheimia* sind bisher *L. corymbifera* und *L. ramosa* bekannt dafür im Menschen eine Mukormykose auslösen zu können (GARCIA-HERMOSO et al., 2009).

#### 2.1.2. Habitat, Morphologie und Lebenszyklus

Vertreter der Ordnung Mucorales gehören zu den Saprophyten und sind weltweit verbreitet. Man findet sie vorwiegend im Erdboden und einige Spezies auch in verrottendem Material (RICHARDSON, 2009). *Lichtheimia* spp. werden zudem oft in Heu, Stroh oder auch Lebensmitteln wie Mehl und fermentierten Sojabohnen gefunden (KOTIMAA et al., 1991; REBOUX et al., 2006; HONG et al., 2012). Der Lebenszyklus der Mucorales beginnt mit der Freisetzung asexueller Sporangiosporen aus den Sporangien. Hieraus entstehen nur teilweise septierte Hyphen, die das Myzel bilden. Zur sexuellen Fortpflanzung kann es kommen, wenn zwei unterschiedliche Kreuzungstypen, (+) und (-), aufeinandertreffen und sich verbinden. Hierdurch entsteht eine sogenannte Zygosporangie, die zu haploidem Myzel auskeimt, welches wiederum asexuelle Sporangien produziert. *Lichtheimia* Spezies

haben im Vergleich zur *Absidia* Spezies ein höheres Temperaturoptimum, welches bei 37°C und höher liegt (PATERSON und LIMA, 2015).

### 2.1.3. Bedeutung in der Humanmedizin

*Rhizopus* spp. gelten als Hauptauslöser für Mukormykosen. Doch auch *Lichtheimia* spp. sind in der Lage schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen zu verursachen (RIBES et al., 2000).

Den größten prädisponierenden Faktor an einer rhino-orbital-cerebralen Mukormykose zu erkranken, stellt Diabetes mellitus dar (CHAKRABARTI et al., 2006; JEONG et al., 2019). Doch auch die Anzahl der Infektionen bei Patienten, die an einer angeborenen oder erworbenen Immunsuppression leiden, steigt kontinuierlich (PARK et al., 2011; AZIE et al., 2012). Neben einer Immunsuppression oder Diabeteserkrankung können auch beispielweise Traumata (PRAKASH et al., 2019), Eisenüberschuss (BOELAERT et al., 1993; REED et al., 2006) oder die Vorbehandlung mit dem Antimykotikum Voriconazol (IMHOF et al., 2004; SIWEK et al., 2004) zu einer Infektion führen.

Durch die Inhalation von Sporen in die Nasennebenhöhlen kommt es zunächst zu einer lokalen Infektion, die mit Symptomen einer akuten Sinusitis mit Fieber Kopfschmerzen und Nasenausfluss einhergeht (STEINBRINK und MICELI, 2021). Eine lokale Gewebsinvasion kann zum Verlust der Sehkraft und Hirnnervenlähmung führen (MATTINGLY und RAMAKRISHNAN, 2016). Die rhino-orbital-cerebrale Form tritt vor allem bei Diabetespatienten, und hier insbesondere bei Ketoazidose auf (CHAKRABARTI et al., 2006).

Nach Inhalation der Sporen kann es auch zu einer pulmonalen Form der Mukormykose kommen. Diese tritt vor allem bei Patienten mit Neutropenie oder nach Organtransplantationen auf (RIBES et al., 2000; RODEN et al., 2005). Klinisch manifestiert sich die pulmonale Mukormykose mit Fieber, Dyspnoe, Brustschmerzen und unproduktiven Husten. Hyphen können sich auf umliegendes Gewebe und Blutgefäße ausbreiten. Hierdurch kann es zu lebensbedrohlichen Hämoptysen kommen (LEE et al., 1999; HAMILOS et al., 2011).

Sowohl in immunkompetenten als auch immunsupprimierten Patienten kann zudem eine kutane Form der Mukormykose auftreten. Bei dieser Form scheint vor allem ein vorangegangenes Trauma die Eintrittspforte für den Erreger zu sein (ANDRESEN et al., 2005; NEBLETT FANFAIR et al., 2012; WARKENTIEN et

al., 2012). Die Infektion kann lokal begrenzt sein oder in tieferliegende Strukturen wie Knochen, Muskeln und Sehnen eindringen (RODEN et al., 2005). Die Infektion beginnt meist mit schmerzhaften Erythemen, die sich innerhalb kurzer Zeit zu einer nekrotisierenden Faszitis entwickeln können, was mit einer Mortalität bis zu 80 % einhergeht (RIBES et al., 2000).

Insbesondere immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantation oder mit hämatologischen Erkrankungen haben ein erhöhtes Risiko für eine disseminierte Infektion (JEONG et al., 2019). Die Mortalität kann hierbei bei bis zu 96 % liegen (RODEN et al., 2005).

#### **2.1.4. Bedeutung in der Veterinärmedizin**

In der Veterinärmedizin finden sich nur vereinzelt Fälle von Mukormykosen. Beim Hund treten beispielweise nasale (SHIRANI et al., 2008) oder auch systemisch und gastrohepatische (ALVES et al., 2020) Mukormykosen auf.

Zudem gibt es Berichte von Kälbern, die an rhino-cerebralen Mukormykose und Enzephalomalazie durch *L. ramosa* erkrankt waren (TANAKA et al., 2019; IWANAGA et al., 2021). Bei Rindern wird von gastrointestinalen Mukormykosen berichtet (JENSEN et al., 1994).

Auch beim Pferd werden nur vereinzelt Fälle von Mukormykosen beschrieben, die beispielweise durch *L. corymbifera* ausgelöst wurden (GUILLOT et al., 2000).

## **2.2. *Fusarium* spp.**

### **2.2.1. Taxonomie**

Erstmalig beschrieben wurde die Gattung *Fusarium* (*F.*), die zu den Ascomyceten gehört, unter dem Namen *Fusisporium* im Jahr 1809 (LINK, 1809). Der Ursprung des Namens geht auf das lateinische Wort *fusus* zurück, was auf Deutsch Spindel bedeutet und die Form der Sporen beschreibt. Ein Großteil der *Fusarium*-Spezies gehört zu den *Fungi imperfecti*, für die bisher keine sexuelle Fortpflanzung nachgewiesen werden konnte. Die wenig bekannten telemorphen Formen werden fast ausschließlich der Gattung *Gibberella* zugeordnet. WOLLENWEBER und REINKING (1935) legten den Grundstein der Taxonomie der Gattung *Fusarium* und teilten die 65 Spezies anhand ihrer ähnlichen Morphologie und Charakteristika in 16 Sektionen ein. Diese wurden wiederum in 55 Varietäten und 22 Formen unterteilt. Die Unterteilung der verschiedenen Sektionen wurde hierbei vor allem

anhand der Form und Anwesenheit von Mikrokonidien, Anwesenheit und Position der Chlamydosporen an den Hyphen und der Form der Makrokonidien und Basalzellen abgeleitet. GERLACH und NIRENBERG (1982) behielten die bereits beschriebenen Sektionen in ihrem taxonomischen System bei. NELSON et al. (1983) schlugen jedoch eine einfachere Einteilung in nur 12 Sektionen vor. Die Einteilung der Sektionen anhand der ähnlichen Morphologie und somit einer nur angenommenen, nahen genetischen Verwandtschaft wird aufgrund neuerer molekularbiologischen Forschungsergebnisse des Öfteren kritisiert (MORETTI, 2009).

Unter den *Fusarium* Spezies befinden sich wichtige Phytopathogene, die in der Landwirtschaft und im Gartenbau erhebliche ökologische und ökonomische Schäden verursachen können (DESJARDINS, 2003). Zudem sind Vertreter der Gattung in der Lage Myktoxine zu produzieren (DESJARDINS und PROCTOR, 2007). Diese können für Tier als auch Mensch gefährlich sein und zudem die Anfälligkeit für Infektionskrankheiten erhöhen, indem sie die Darmgesundheit sowie das angeborene und adaptive Immunsystem beeinträchtigen (ANTONISSEN et al., 2014).

### **2.2.2. Habitat, Morphologie und Lebenszyklus**

*Fusarium* spp. sind weitverbreitet und ihr Habitat ist der Erdboden sowie pflanzliches Material und andere organische Substrate. Aufgrund ihrer häufigen Assoziation mit Pflanzenwurzeln wird die Lebensweise auch als saprophytär oder parasitär beschrieben. *Fusarium* spp. findet man insbesondere auf fruchtbaren Kultur- und Weideböden, wohingegen sie in Waldböden eher selten vorkommen. *Fusarium* spp. können nicht nur in tropischen und gemäßigten Klimazonen, sondern auch in Regionen in denen extreme Klimabedingungen herrschen, wie beispielweise in der Wüste oder arktischen Gegenden, überleben (NELSON et al., 1994). Durch Wind und Regen können Sporen über weite Strecken verbreitet werden (GILBERT und FERNANDO, 2004).

*Fusarium* spp. können, wie bereits bei der Taxonomie kurz erwähnt, drei verschiedene Arten von Sporen, die Makrokonidien, Mikrokonidien und Chlamydosporen, produzieren (NELSON et al., 1983). Jedoch bilden nicht alle *Fusarium* Spezies alle drei Sporentypen aus. Makrokonidien werden entweder in den sogenannten Sporodochia produziert oder können durch Mono- und



Polyphialiden im Luftmyzel entstehen. Mikrokonidien werden im Luftmyzel, aber nicht in Sporodochia produziert. Sie variieren in ihrer Form und Größe. Die Chlamydosporen dienen *Fusarium* als Überdauerungsform. Sie besitzen eine dicke Zellwand und sind mit lipidartigem Material gefüllt (NELSON et al., 1994). Treffen Sporen auf ein geeignetes Substrat, beginnen sie bereits nach zwei Stunden anzuschwellen. Die ersten Keimschläuche bilden sich nach acht Stunden und nach 24 Stunden ist ein dichtes Myzelgeflecht entstanden (SEONG et al., 2008).

### 2.2.3. Bedeutung in der Humanmedizin

*Fusarium* Spezies können im Menschen abhängig vom Eintrittsort und Immunstatus verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen. In immunkompetenten Patienten lösen *Fusarium* Spezies vor allem Onychomykosen sowie Keratitis aus (DÓCZI et al., 2004; GUILHERMETTI et al., 2007). Aber auch andere durch *Fusarium* Spezies hervorgerufene Infektionen wie beispielweise Peritonitis nach peritonealer Dialyse (GAUR et al., 2010), Thrombophlebitis (MURRAY et al., 2003), Osteomyelitis (SIERRA-HOFFMAN et al., 2005), septische Arthritis (JAKLE et al., 1983), Sinusitis (KURIEN et al., 1992) oder Pneumonie (SANDER et al., 1998) wurden bereits beschrieben.

Im immunsupprimierten Patienten kommt es nahezu immer zu einem invasiven und häufig disseminierten Verlauf. Zu den klinischen Symptomen zählen im neutropenischen Patienten unter anderem Fieber, Myalgie, plötzlich auftretende erythematöse papulöse oder knotige, schmerzhafte Hautläsionen, die hin zur Nekrose führen können. Andere Organe wie Lunge (mit oder ohne Beteiligung der Nebenhöhlen), Leber, Milz, Nieren, aber auch die Gelenke können ebenfalls betroffen sein und Blutkulturen sind häufig positiv (NUCCI und ANAISSIE, 2006; NUCCI et al., 2015). Auslöser der invasiven Fusariose sind häufig Vertreter der *F. solani* und *F. oxysporum* Spezieskomplexe (DA ROSA et al., 2021).

Die Aufnahme von Lebensmitteln, die mit Mykotoxinen kontaminiert sind, kann beispielweise zur alimentären toxischen Aleukie führen. Hierbei kommt es zur Schädigung des Knochenmarkes, Nekrosen der Haut und Verminderung der Leukozytenzahl im Blutplasma. Nach Verzehr von überwintertem Getreide starben so zum Ende des zweiten Weltkrieges hunderte Menschen an der alimentären toxischen Aleukie (NELSON et al., 1994).

#### 2.2.4. Bedeutung in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin spielen Infektionen mit *Fusarium* spp. eher eine untergeordnete Rolle. Allerdings wird auch hier wie in der Humanmedizin eine Immundefizienz als prädisponierender Faktor vermutet. Auch Traumata können zu einer Infektion führen (VASCELLARI et al., 2011; SUGAHARA et al., 2014). Bei Hunden wurde unter anderem von Pyelonephritis (DAY und HOLT, 1994), Meningoenzephalitis (EVANS et al., 2004), Dermatomykose (KANO et al., 2011) und Onychomykose (NAMITOME et al., 2011) berichtet, die durch *Fusarium* spp. ausgelöst waren. Bei Katzen wurde bislang beispielweise eine pyogranulomatöse Rhinosinusitis (VASCELLARI et al., 2011) oder granulomatöse Pododermatitis (SUGAHARA et al., 2014) im Zusammenhang mit *Fusarium* spp. beschrieben.

Beim Pferd können *Fusarium* spp. wie auch *Aspergillus* spp. zu einer ulzerativen Keratitis führen. Dies geschieht durch das Eindringen des Erregers über Hornhauttraumata und daraus resultierenden Epitheldefekten (ANDREW et al., 1998). Durch mit den Mykotoxinen Fumonisin B1 und B2 belastete Futtermittel wie Heu kann es zu Ausbrüchen der Equinen Leukoenzephalomalazie kommen (VENDRUSCOLO et al., 2016). Die betroffenen Tiere zeigen unter anderem Apathie, Ataxie, Paresen der Lippen und Zunge und Unvermögen zu Trinken und zu Fressen (MARASAS et al., 1988). Der Tod kann bereits nach wenigen Stunden oder aber auch erst nach mehreren Tagen eintreten (NELSON et al., 1994).

Durch den Verzehr von Süßkartoffeln, die mit dem pathogenen Vertreter *F. solani* infiziert waren, kam es auch bei Rindern in Brasilien und Uruguay zu Erkrankungen. Hierbei wurden die Toxine allerdings von den infizierten Knollen der Süßkartoffel und nicht durch den Pilz selbst produziert. Die erkrankten Tiere zeigten akute respiratorische Atembeschwerden mit Dyspnoe, Husten, dilatierten Nasenlöcher und vermehrtem Speicheln (RIET-CORREA et al., 2013)

Durch die Aufnahme von mit *F. graminearum* kontaminiertem Getreide, welches das Toxin Zeralenon enthält, kann es bei Schweinen zu Hyperöstrogenismus kommen. Bei Zuchtsauen äußert sich die Wirkung des Toxins durch einen verlängerten Östrus und Eber zeigen eine verminderte Libido. Bei Jungsaunen führt das Toxin zum Anschwellen der Vulva und Milchdrüsen bis hin zum Vaginal- oder Rektalprolaps. Männliche Jungtiere unterlaufen einen Feminisierungseffekt mit vergrößerten Milchdrüsen (NELSON et al., 1994).

### 3. Die Zellwand von *Aspergillus* spp.

Die Zellwand von Pilzen hat viele verschiedene Funktionen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität und Lebensfähigkeit des Pilzes (GARCIA-RUBIO et al., 2020). Die Zusammensetzung der Zellwand wurde bislang vor allem bei Hefepilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* und filamentösen Schimmelpilzen wie *A. fumigatus* untersucht (OSHEROV und YARDEN, 2010). Bei vielen anderen Pilzen wie beispielweise denen der Ordnung Mucorales gibt es bislang wenig gesicherte Daten. Die Erforschung des Zellwandaufbaus ist jedoch von besonderer Bedeutung, weil sie unter anderem eine wichtige Zielstruktur für neue Therapieansätze darstellt (CORTÉS et al., 2019). Im folgenden Text soll auf die Zellwand von *A. fumigatus* genauer eingegangen werden.

Die Zellwand von *Aspergillus* spp. ist bereits gut erforscht und es konnte gezeigt werden, dass 90 % der Zellwand aus verschiedenen Polysacchariden bestehen (LATGÉ et al., 2017). Das Grundgerüst der Zellwand wird von  $\beta$ -1,3/1,6-Glukan gebildet, das mit Chitin über eine  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung verbunden ist (LATGÉ et al., 2005). Bei *A. fumigatus* ist Galaktomannan kovalent an dieses Grundgerüst gebunden (FONTAINE et al., 2000). Galaktomannan besteht wiederum aus linearem  $\alpha$ -Mannan mit sich wiederholenden Mannose Oligosaccharideinheiten und kurzen Galaktofuranose-Seitenketten (LATGÉ et al., 1994). Weiterhin sind  $\alpha$ -1,3-Glukan, Glykoproteine und das Heteropolysaccharide Galaktosaminogalaktan in der fibrillären Zellwandstruktur eingebettet (LATGÉ und CALDERONE, 2006). Je nach Umweltbedingungen kann sich das Mengenverhältnis der einzelnen Komponenten stark unterscheiden (LATGÉ, 2010).

#### 3.1. Galaktosaminogalaktan

Während des Wachstums in vitro und in vivo bilden *A. fumigatus* Hyphen eine extrazelluläre Matrix (ECM), die aus verschiedenen Polysacchariden besteht. Durch diese ECM werden Hyphen miteinander verbunden (BEAUVAIS et al., 2007). Das aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und Galaktosamin bestehende Galaktosaminogalaktan (GAG) ist nicht nur Bestandteil der Zellwand, sondern auch dieser ECM (FONTAINE et al., 2011; GRAVELAT et al., 2013). GAG kommt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an Wirtszellen und bei der

Biofilmformation zu. Auch verdeckt GAG  $\beta$ -1,3-Glukan, sodass dieses nicht mehr von Immunzell-Rezeptoren wie Dectin-1 erkannt werden kann (GRAVELAT et al., 2013). Die Produktion von zellwandassoziiertem GAG korreliert mit der Virulenz der verschiedenen *Aspergillus* Spezies. Pathogene *Aspergillus* Spezies wie *A. fumigatus* produzieren viel GAG und sind resistenter gegenüber dem Abtöten durch *neutrophil extracellular traps* (NET) (LEE et al., 2015). Zudem hat GAG einen anti-inflammatorischen Effekt, da es die Bildung des Interleukin-1-Rezeptor-Agonisten induziert (GRESNIGT et al., 2014). Widersprüchlicherweise zeigte eine andere Arbeitsgruppe jedoch, dass GAG auch das Inflammasom aktiviert (BRIARD et al., 2020).

Bei der Synthese von GAG sind drei Enzyme essenziell. Zunächst wird durch die Uge3-Glukose-4-Epimerase UDP(=Uridinphosphat)-Glukose und N-Acetylglukosamin in UDP-Galaktose und UDP-Acetylgalaktosamin verwandelt (GRAVELAT et al., 2013; LEE et al., 2014). Diese Bauteile werden durch die Glykosyltransferase Gtb3 verbunden und über die Membran in den extrazellulären Raum transportiert. Abschließend werden N-Acetylgalaktosamine in der Polysaccharidkette von der Deacetylase Agd3 deacetyliert. Durch die Deacetylierung wird das Polymer kationisch. Dieser Schritt ist essenziell für die Biofilmbildung und Adhäsion der Hyphen auf Oberflächen (LEE et al., 2016).

#### **4. Immunantwort**

Trifft ein Organismus auf ein Pathogen, werden eine Reihe verschiedener Abwehrmechanismen ausgelöst, um den Erreger zu eliminieren und eine Infektion zu verhindern. Voraussetzung hierfür ist die Erkennung des Pathogens durch Rezeptoren und die Vermittlung der Reaktion durch Zytokine (ROMANI, 2004). Die Immunantwort kann hierbei je nach Pilzspezies variieren (SHOHAM und LEVITZ, 2005). Im folgenden Text soll der Fokus insbesondere auf die Immunantwort auf *A. fumigatus* gelegt werden.

##### **4.1. Zytokine**

Zytokine sind Proteine, mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa. Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert und nehmen Einfluss auf das Verhalten nahe gelegener Zellen, die entsprechende Rezeptoren besitzen (MURPHY und WEAVER, 2017c). Sie agieren als Mediatoren und regulieren Wachstum, Überleben, Differenzierung und Effektorfunktionen von Zellen. Sie spielen daher

eine übergeordnete Rolle in der Regulation entzündlicher Prozesse, der Immunantwort während einer Infektion oder von neurologischen und endokrinologischen Autoimmunerkrankungen (HEINRICH et al., 1998). Zytokine kann man in die Hauptgruppen Interleukine (IL), Chemokine, Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF) und koloniestimulierende Faktoren unterteilen.

Chemokine dienen der Anlockung von Zellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der Infektion. Sie lassen sich aufgrund der Anordnung ihrer N-terminalen Cysteine in verschiedene Gruppen einteilen. Eine Gruppe besitzt zwei Cysteine direkt nebeneinander (CC), in den anderen Gruppen werden die Cysteine dagegen durch eine oder mehrere Aminosäuren getrennt (CXC oder CX<sub>3</sub>C) (ZLOTNIK und YOSHIE, 2000). Besondere Bedeutung kommen im Zusammenhang mit *A. fumigatus* dem Liganden 10 (CXCL10) und 20 (CCL20) zu. MEZGER et al. (2008) konnten zeigen, dass das Vorkommen von *Single Nucleotide Polymorphisms* im CXCL10-Gen, das Risiko an einer invasiven Aspergillose zu erkranken, stark beeinflusst.

Nach Konfrontation mit *A. fumigatus* wird das CCL20-Gen am stärksten hochreguliert. Durch dieses Chemokin werden vorrangig chemotaktische Effekte auf Lymphozyten, die das CCL20 über ihren Chemokinrezeptor 6 binden, ausgeübt (BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2006).

Der hauptsächlich durch Monozyten und daraus abgeleitete Zellen wie AM oder dendritische Zellen produzierte TNF $\alpha$  zählt zu den ersten Zytokinen, das nach Erstkontakt mit einem Erreger ausgeschüttet wird. TNF $\alpha$  wirkt als Pyrogen und löst die Akute Phase Reaktion aus. Hierbei werden Proteine wie das Serumamyloidprotein, das C-reaktive Protein, das mannosebindende Lektin oder Fibrinogen produziert, die alle Pathogene binden können (CECILIANI et al., 2002). Diese Funktionen teilt sich TNF $\alpha$  mit weiteren Pyrogenen wie IL-1 $\beta$  und IL-6 (DINARELLO et al., 1986; ANDUS et al., 1988; RAMADORI et al., 1988). Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Mangel an TNF $\alpha$  in immunsupprimierten Tieren zu einer erhöhten Mortalität nach Infektion durch *A. fumigatus* führt (MEHRAD et al., 1999). Auch das proinflammatorische Zytokin IL-12 wird nach Kontakt mit *A. fumigatus* von Zellen des Immunsystems gebildet. CENCI et al. (1998) konnten beobachten, dass die Produktion von IL-12, TNF $\alpha$ , und IFN $\gamma$  in Mäusen zu einer Resistenz gegenüber *A. fumigatus* führen kann.

## 4.2. Rezeptoren

Professionelle Phagozyten wie Makrophagen, PMN und dendritische Zellen erkennen Pathogene über *pattern recognition receptors* (PRR) auf ihrer Oberfläche. PRR sind in der Lage sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) zu erkennen, Strukturen, die auf Pathogenen, aber nicht im Wirt vorkommen (VAN DE VEERDONK et al., 2008). Zu den wichtigsten Rezeptoren in der Erkennung von *A. fumigatus* gehören Dectin-1, Toll Like Rezeptor (TLR) 2, TLR 4 sowie Komplementrezeptor 3 (GRESNIGT et al., 2012; GAZENDAM et al., 2016).

PMN, Makrophagen und dendritische Zellen können  $\beta$ -Glukan auf der Zellwand von *A. fumigatus* über ihren C-Typ Lektin Rezeptor Dectin-1 erkennen (WERNER et al., 2009). Der *non-TLR*-PRR Dectin-1 erkennt sowohl lösliches als auch partikuläres  $\beta$ -1,3-Glukan und  $\beta$ -1,6-Glukan (BROWN und GORDON, 2001). Der Rezeptor nimmt Einfluss auf die Phagozytose und induziert den respiratorischen Burst (HERRE et al., 2004; UNDERHILL et al., 2005). Zudem wird nach Bindung von  $\beta$ -Glukan an den Rezeptor die Produktion von Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2, IL-10 oder IL-12 induziert (GANTNER et al., 2003; STEELE et al., 2003; ROGERS et al., 2005).

Den Komplementrezeptor 3 (CR3), der aus den Untereinheiten CD11b und CD18 besteht, findet man auf eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen als auch auf Monozyten und natürlichen Killerzellen (TSONI und BROWN, 2008). Die Lektindomäne von CR3 ist ebenfalls in der Lage  $\beta$ -Glukan zu erkennen. Nach Bindung des Liganden kann CR3 verschiedene zelluläre Antworten wie Adhäsion und Migration sowie Phagozytose oder Zytotoxizität auslösen (WRIGHT und SILVERSTEIN, 1982; PLOW und ZHANG, 1997; XIA et al., 1999; TSIKITIS et al., 2004; LAVIGNE et al., 2006).

TLR erkennen PAMP wie beispielweise Lipopeptide, Peptidoglykan oder Zymosan (TLR 2) und Lipopolysaccharid (TLR 4), ein Bestandteil der Membran von gramnegativen Bakterien (KAWAI und AKIRA, 2010). Insbesondere TLR 2 und TLR 4 spielen in der Erkennung des Pilzes eine wichtige Rolle (WANG et al., 2001; MEIER et al., 2003; BRAEDEL et al., 2004).

Die Bindung eines Pathogens an Dectin-1 und TLR aktiviert den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor  $\kappa$ B* und induziert dadurch die proinflammatorische Zytokin- und Chemokinproduktion (WERNER et al., 2009).

### 4.3. Erste Welle der Immunabwehr gegen *Aspergillus fumigatus*

Werden Sporen eingeatmet, gelangen sie in die Lunge, wo sie das Gewebe infizieren und in die tiefen Atemwege eindringen. Der Tracheobronchialbaum ist mit Epithelzellen ausgekleidet, die Zilien besitzen und durch den Zilienschlag Schmutz und Schleimstoffe abtransportieren können (WANNER et al., 1996). Sie sind somit die erste physikalische und biologische Barriere, die von den Sporen überwunden werden muss (BIGOT et al., 2020). Epithelzellen gehören zu den nicht-professionellen Phagozyten. Alveolarepithelzellen, auch Pneumozyten genannt, können in Typ I und Typ II unterschieden werden. Die Typ II Pneumozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Alveolarraums und sind somit direkt mit eingeatmeten Partikeln konfrontiert. PARIS et al. (1997) konnten zeigen, dass Sporen von *A. fumigatus* von tracheobronchialen Epithelzellen und Typ II Pneumozyten in vitro phagozytiert werden. Phagozytierte Sporen können jedoch in den angesäuerten Lysosomen überleben und auskeimen und sich so in der Lunge weiter ausbreiten (WASYLNKA und MOORE, 2003). Die Manipulation der Wirtszell-Apoptose ist eine bekannte Strategie vieler Pathogene, um eine Infektion voranzutreiben (FAHERTY und MAURELLI, 2008). Auch *A. fumigatus* ist in der Lage die Produktion von TNF $\alpha$  in Epithelzellen zu inhibieren und somit die Apoptose der Zelle zu verhindern (BERKOVA et al., 2006). AMIN et al. (2014) konnten zeigen, dass das Dihydroxynaphthalen-Melanin von *A. fumigatus* essenziell für diesen anti-apoptotischen Effekt in Epithelzellen ist.

AM gehören wie PMN und dendritische Zellen zu den professionellen Phagozyten. Ruhende *A. fumigatus* Sporen sind durch ihre hydrophobe Proteinschicht geschützt und können so nicht von Immunzellen entdeckt werden (AIMANIANDA et al., 2009). Erst beim Prozess des beginnenden Auskeimens verlieren die Sporen ihre Schutzschicht und PRR wie Dectin-1 sind in der Lage Moleküle auf der Konidienoberfläche zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen (LATGÉ, 2010). Die Aufnahme der Konidien in die AM erfolgt über die Ausbildung von Pseudopodien, die die Sporen umschließen, was mit der Polymerisation von filamentösem Aktin einhergeht. Nach der Internalisierung kommt es zur Reifung des Phagosoms und zu einer Fusion mit Lysosomen zu einem Phagolysosom, was mit einer Ansäuerung einhergeht und Konidien abtöten kann (IBRAHIM-GRANET et al., 2003). Bei der Eliminierung und dem Abtöten von *A. fumigatus* durch AM

scheinen zudem reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch Aktivierung des NADPH-Oxidasesystems produziert werden, essenziell zu sein (BRAKHAGE et al., 2010). Bei CGD-Patienten finden sich Mutationen in den Genen, die für das NADPH-Oxidasesystem kodieren, wodurch die ROS Produktion gestört ist. Diese Erkrankung stellt dadurch einen prädisponierenden Faktor dar, um an einer schweren Aspergillose zu erkranken (SEGAL et al., 2000). Auch in vitro und in vivo konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des NADPH-Oxidasesystems dazu führte, dass nahezu 100 % der phagozytierten Konidien auskeimten (PHILIPPE et al., 2003).

Somit scheinen sowohl nicht-oxidative als auch oxidative Mechanismen bei der Beseitigung des Erregers eine Rolle zu spielen. Neben der Phagozytose und dem Abtöten der Sporen schütten AM gleichzeitig auch Zytokine und Chemokine wie TNF $\alpha$ , *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1, MIP-2, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, IL-1 $\alpha$  und IL-2 $\beta$  aus, um weitere Immunzellen zu aktivieren und zum Infektionsort zu locken (STEELE et al., 2005; GERSUK et al., 2006).

PMN zählen zu den polymorphkernigen Granulozyten. Die Einteilung in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten leitet sich von der Färbung der Granula der jeweiligen Zellen ab. PMN werden durch AM zum Ort der Infektion gelockt. Prozentual machen PMN den größten Anteil aller Immunzellen aus und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Pathogenen (SEGAL, 2005). Eine Neutropenie stellt einen der größten Risikofaktoren dar, an einer IA schwer zu erkranken (LATGÉ und CHAMILOS, 2019). Den PMN stehen drei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um Pathogene zu eliminieren: Phagozytose, Degranulation und Produktion von ROS sowie die Ausbildung von NET.

Konidien, die nicht von AM internalisiert wurden, können von angelockten PMN phagozytiert werden (BEHNSEN et al., 2007). In den Granula der PMN finden sich zudem antimikrobielle Stoffe, die durch Degranulation in die Umgebung freigesetzt werden und so die Auskeimung der Konidien verhindern können (BRAKHAGE et al., 2010). Zu diesen antimikrobiellen Proteinen zählen beispielweise Cathepsin G, Elastase, Lysozym, Defensin oder Proteinase 3 (SEGAL, 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *A. fumigatus* Konidien in der Lage sind, sich während der Co-Inkubation mit PMN umzuprogrammieren und ihren Stoffwechsel während der



Auskeimung an die Wirtsumgebung anzupassen (SUGUI et al., 2008). Weiterhin können Hyphen Sekundärmetabolite wie Gliotoxin oder Fumagillin bilden, welche die Immunantwort der PMN herabsetzen (SPIKES et al., 2008; FALLON et al., 2010). Durch Aktivierung des NADPH-Oxidasesystems sind PMN in der Lage ROS zu produzieren, die dem extrazellulären Abtöten von *A. fumigatus* Hyphen dienen (GAZENDAM et al., 2016). Diese Freisetzung wird auch als respiratorischer oder oxidativer Burst bezeichnet. Hierbei lösen angeschwollene Konidien eine weitaus stärkere Reaktion aus als ruhende Konidien (LEVITZ und FARRELL, 1990). RUBIN-BEJERANO et al. (2007) konnten zeigen, dass insbesondere das seltenere auf der Zellwand von *A. fumigatus* vorkommende  $\beta$ -1,6-Glukan die Phagozytose und Produktion von ROS begünstigt.

Gelingt es nicht die Konidien von *A. fumigatus* zu eliminieren und kommt es zur Formation von Hyphen, können PMN NET ausbilden. NET können in der Auseinandersetzung mit verschiedenen Pathogenen gebildet werden. Die PMN werden durch Stimuli wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), IL-8 oder allein durch die Anwesenheit von Bakterien oder Pilzen aktiviert und ein Anteil der Zellen leitet daraufhin ein „Selbstmordprogramm“ ein, was zur Bildung der NET führt (BRINKMANN und ZYCHLINSKY, 2007). NET bestehen aus Chromatin und Bestandteilen der neutrophilen Granula wie beispielsweise Myeloperoxidase, Elastase, Cathepsin B oder Lactoferrin (BRINKMANN et al., 2004). Mithilfe der NET sind PMN in der Lage das Hyphenwachstum zu reduzieren, indem sie das für das Pilzwachstum benötigte Zink und Eisen unbrauchbar machen. Dies geschieht durch die Chelatbildung, das heißt Zink- und Eisenionen werden durch Calprotectin beziehungsweise Lactoferrin gebunden (ZAREMBER et al., 2007; URBAN et al., 2009). Die Bildung von NET setzt ebenfalls einen respiratorischen Burst voraus (BRINKMANN und ZYCHLINSKY, 2007; FUCHS et al., 2007). Die Formation von NET scheint jedoch nicht essenziell zum Abtöten des Erregers zu sein, sondern eher ein Mechanismus, um die Ausbreitung und das Wachstum des Pilzes einzudämmen (BRUNS et al., 2010; MCCORMICK et al., 2010).

Dendritische Zellen (DC) haben lange, fingerförmige Fortsätze, die an Dendriten von Nervenzellen erinnern. Ihre Fähigkeit das Immunsystem zu regulieren, wurde erstmals von STEINMAN und COHN (1973) beschrieben. Sie sind als professionelle Phagozyten in der Lage sowohl Konidien als auch kurze Hyphen zu phagozytieren und setzen dabei IL-4, IL-10 und IL-12 frei. Sie transportieren diese

zudem zu ableitenden Lymphknoten und der Milz, wo sie eine T-Zellantwort induzieren (BOZZA et al., 2002).

#### **4.4. Adaptive Immunantwort**

Wird ein Erreger nicht durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems eliminiert, wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Diese Aktivierung ist elementar, um sich etablierende Infektionen zu kontrollieren. DC dienen hierbei als Vermittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die Aufnahme von Antigen führt zur Ausreifung der DC, wodurch sie ihre Phagozytosefähigkeit verlieren. Gleichzeitig wird die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Proteinen und kostimulatorischen B7-Molekülen (CD80/CD86) erhöht (GARRETT et al., 2000). DC gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen und tragen die Antigene als Peptid-MHC-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche, wodurch unter anderem Antigen-spezifische T-Lymphozyten zur Proliferation angeregt werden.

Zur Abwehr von Pilzpathogenen tragen sowohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei (HUFFNAGLE und DEEPE, 2003; CARVALHO et al., 2012; POTENZA et al., 2013). Zu den wichtigsten Effektorfunktionen der T-Zellen gehören die Zytotoxizität und Zytokinsekretion (CUTLER et al., 2007). Die vorherrschende adaptive Immunreaktion auf Pilzpathogene ist eine T<sub>H</sub>1-Antwort (ROMANI, 2004). Dies geht mit der Produktion von IL-12, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  einher und ist essenziell, um eine protektive Immunantwort auszulösen. Eine T<sub>H</sub>2-Antwort ist durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert, sie gilt als nicht protektiv und ist mit allergischen Krankheitsbildern assoziiert. Eine T<sub>H</sub>2-Antwort wird mit Fortschritt und zunehmendem Schweregrad einer Infektion assoziiert (HUFFNAGLE und DEEPE, 2003).

### **5. Monoklonale Antikörper**

Bislang stehen für die Behandlung von invasiven Mykosen nur drei Wirkstoffgruppen zur Verfügung, die Polyene, die Echinocandine und die Azole. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe gestaltet sich schwierig, da sich Pilze metabolisch sehr ähnlich zu Säugetierzellen verhalten und demnach wenig Pathogen-spezifische Zielstrukturen bieten (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). Im Moment fokussieren sich die Therapeutika auf Zielstrukturen auf der Zellwand oder der Plasmamembran des Pilzes (ODDS et al., 2003). Allerdings

werden zunehmend Resistenzen gegenüber den oben genannten Wirkstoffen beschrieben (LIMA et al., 2019; ARASTEHFAR et al., 2020). Daher ist die Entwicklung neuer Therapeutika unabdingbar. Im Einsatz gegen invasive Mykosen könnten monoklonale Antikörper (mAk) solch einen neuen therapeutischen Weg darstellen (ULRICH und EBEL, 2020).

### **5.1. Allgemeines**

Als Teil des adaptiven Immunsystems sind Antikörper wichtiger Bestandteil bei der Bekämpfung von Infektionen. Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten enthalten konstante und variable Regionen. Durch die variablen Regionen einer leichten und einer schweren Kette wird eine Antigenbindungsstelle gebildet. Jeder Antikörper besitzt somit zwei identische Antigenbindungsstellen, über die Antikörper kleine molekulare Strukturen, die sogenannten Epitope, eines Antigenmoleküls erkennen und binden können. Der Bereich, in der ein Antikörper ein Antigen bindet, wird auch als Antigen-bindendes-Fragment (Fab) bezeichnet. Die Effektorfunktion eines jeden Antikörpers wird über die konstante Region, das sogenannte *fragment crystallisable* (Fc)-Fragment, bestimmt. Es gibt insgesamt fünf Hauptisotypen von Immunglobulinen, die sich in ihren Fc-Abschnitten unterscheiden: IgG, IgM, IgD, IgE und IgA, wobei sich IgG-Antikörper noch in die Unterklassen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> unterteilen lassen. Die verschiedenen Isotypen unterscheiden sich in der Struktur ihrer konstanten Regionen der schweren Ketten und somit auch in ihrer Funktion (MURPHY und WEAVER, 2017a). Die Antigen-Antikörper Bindung ist hoch spezifisch und kann sich in Therapie und Diagnostik zu Nutze gemacht werden. Bereits 1976 wurden die ersten mAk produziert. Hierbei entstand nach Immunisierung von Mäusen mittels Fusion von Mäusemilzzellen und einer Myelomzelllinie eine Hybridomzelllinie, die Antikörper gegen Schaferythrozyten produzierte (KÖHLER und MILSTEIN, 1976).

### **5.2. Therapeutische monoklonale Antikörper**

Um mAk muriner Herkunft überhaupt therapeutisch für den Menschen nutzbar zu machen und die Immunogenität herabzusetzen, wurden verschiedene Techniken entwickelt. Bei der Chimärisierung wird das murine Fc-Fragment durch ein humanes Fc-Fragment ersetzt. Das murine Fab-Fragment wird hierbei mit einem

humanen IgG-Grundgerüst verbunden (MORRISON et al., 1984). Bei der Humanisierung von mAk werden die murinen, hypervariablen Regionen, auch *complementarity determining regions*, in eine humane Fab-Region integriert und auf ein humanes IgG Grundgerüst gesetzt (JONES et al., 1986). Eine weitere Methode humane mAk zu produzieren, ist die Immunisierung transgener Mäuse mit humanen Immunglobulin-Genen und anschließender Hybridomtechnologie (GREEN et al., 1994; LONBERG et al., 1994). Eingesetzt werden mAk heute vor allem bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und in der Krebstherapie.

Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel die rheumatische Arthritis, zeichnen sich durch starke Entzündungsreaktionen aus. Der proinflammatorische TNF $\alpha$  ist bekannt dafür, ein Mediator für entzündungsfördernde Zytokine zu sein. Eine Blockierung von TNF $\alpha$  kann demnach die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie beispielsweise IL-1 und IL-6 reduzieren. In einer klinischen Studie mit Patienten mit rheumatischer Arthritis konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen TNF $\alpha$  die IL-1 Produktion von Synovialzellen signifikant reduzierten (BRENNAN et al., 1989; FELDMANN und MAINI, 2003). Die langanhaltende anti-TNF $\alpha$  Therapie wird von Patienten gut vertragen und hält die Krankheitsaktivität niedrig (KIEVIT et al., 2011). Anti-TNF $\alpha$  Therapie wird weiterhin beispielsweise bei Morbus Crohn (DERKX et al., 1993), ulzerativer Colitis (BHATTACHARYA und OSTERMAN, 2020) oder Psoriasis (COTTONE et al., 2019) eingesetzt. Neben anti-TNF $\alpha$ -mAk wurden weitere mAk gegen verschiedene Zytokinrezeptoren (KANG et al., 2015) oder deren Untereinheiten (FEAGAN et al., 2016) entwickelt, die gegen oben genannte entzündliche Erkrankungen eingesetzt werden.

Auch in der Krebstherapie sind mAk etabliert. Die Behandlung solider Tumore mit mAk begann mit dem humanisierten epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (HER) 2-Antikörper Trastuzumab (CARTER et al., 1992). HER2 reguliert das Zellwachstum und wird zum Beispiel bei Brust- oder Ovarienkrebs überexprimiert, was mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und verminderter Überlebensrate einhergeht (SLAMON et al., 1987). Die Überexprimierung von HER2 induziert außerdem eine Resistenz gegenüber TNF $\alpha$  (HUDZIAK et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, dass mAk gegen HER2 das Wachstum von HER2-überexprimierenden Tumorzellen inhibieren konnten (LEWIS et al., 1993; CERAN et al., 2012).

Das CD20 Antigen findet man auf der Oberfläche von normalen, aber auch neoplastischen B-Zellen. Durch Bindung des anti-CD20 mAk Rituximab an CD20 kommt es zur Apoptose, Zellyse durch komplementabhängiger Toxizität sowie antikörperabhängiger, zellvermittelter Zytotoxizität (REFF et al., 1994). Zudem wurden Tumorzellen durch die Anwendung des Antikörper sensitiver gegenüber Chemotherapeutika (DEMIDEM et al., 1997).

### 5.3. Monoklonale Antikörper im Einsatz gegen Schimmelpilzinfektionen

Durch die ansteigenden Inzidenzen von Schimmelpilzinfektionen, insbesondere in immunsupprimierten Patienten, wird die Suche nach neuen antimykotischen Therapeutika immer relevanter. Für viele bakterielle oder virale Erreger gibt es bereits effiziente Impfungen, doch für Pilzpathogene ist dies noch nicht der Fall. Der Einsatz von mAk kann aber auch in Bezug auf Mykosen ein neuer Therapieansatz oder von prophylaktischem Nutzen sein. Die Voraussetzung für eine Antigen-Antikörper-Bindung ist die Zugänglichkeit des Antigens. Oberflächenantigene oder sekretierte Proteine können solche Antigene sein. Die Zellwand von Pilzen besteht zum Großteil aus Polysacchariden, aber auch Proteinen. Da diese Strukturen im menschlichen Organismus nicht vorkommen, stellt die Zellwand eine wichtige Zielstruktur für neue Therapieansätze dar (CORTÉS et al., 2019). Weiterhin können mAk auch als Opsonine dienen. In der zytoplasmatischen Membran von Phagozyten befinden sich Fc  $\gamma$ - Rezeptoren, die gebundene IgG erkennen können. GAZENDAM et al. (2016) konnten bereits zeigen, dass eine Opsonisierung von *A. fumigatus* Hyphen durch IgG-Antikörper für das Abtöten durch PMN nötig ist.

In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Studien zu mAk und Impfstoffentwicklungen bei pathogenen Pilzen durchgeführt (ULRICH und EBEL, 2020). Einige besonders wichtige Arbeiten über *A. fumigatus* werden im folgenden Text beschrieben.

CENCI et al. (2002) konnten beispielweise mit einem antiidiotypischen mAk, der einem Hefe-Killer-Toxin nachempfunden wurde, nicht nur einen protektiven Effekt nach passiver Immunisierung von Mäusen, sondern auch eine Inhibition des Hyphenwachstums in vitro nachweisen. Auch der  $\beta$ -Glukan-spezifische mAk 2G8 zeigte einen ähnlichen protektiven Effekt und verlangsamte ebenso das Hyphenwachstum (TOROSANTUCCI et al., 2009). Weiterhin konnte durch eine

passive Immunisierung von immunsupprimierten Mäusen mit dem *A. fumigatus* rekombinanten Proteinimpfstoff AF.KEX1 eine verringerte Mortalität sowie eine verringerte Pilzbelastung der Lunge festgestellt werden (RAYENS et al., 2021). Ebenso zeigte ein IgG<sub>1</sub>-mAk, der gegen ein Glykoprotein der Zellwand gerichtet ist, einen inhibitorischen Effekt auf das Hyphenwachstum und konnte sogar *A. fumigatus* Hyphen in vitro abtöten. Im Mausmodell konnte zudem eine erhöhte Überlebensrate festgestellt werden (CHATURVEDI et al., 2005).

Auch für Antikörper der IgM-Subklasse konnte bereits ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. Nach passiver Immunisierung von Mäusen mit einem IgM mAk, der ein Sialyllacto-N-Tetraose-Epitop erkennt und *A. fumigatus* Konidien und Hyphen bindet, wurde ein protektiver Effekt sowohl nach intravenöser als auch intratrachealer Applikation festgestellt (WHARTON et al., 2015).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Allgemein

##### 1.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angemerkt, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Carl Roth, Serva und Sigma-Aldrich, im Reinheitsgrad zur Analyse „p.a.“ beziehungsweise „reinst“ verwendet.

##### 1.2. Materialien

Es wurden, sofern nicht anders angegeben, Röhren, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten, Petrischalen und Sterilfilter der Firma SARSTEDT AG & CO KG verwendet.

##### 1.3. Organismen

Die für diese Arbeit verwendeten Pilzstämme sowie Zelllinien sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Pilzstämme.

Stamm	Beschreibung	Bezugsquelle
<i>A. nidulans</i> FGSC A26	Wildstamm	Prof. Dr. Reinhard Fischer, Karlsruher Institut für Technologie
<i>A. niger</i> DSM 737	Wildstamm	Leibniz Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (=DSMZ)
<i>A. oryzae</i> DSM 1863	Wildstamm	Leibniz Institut, DSMZ
<i>A. fischeri</i> DSM 3700	Wildstamm	Leibniz Institut, DSMZ
<i>A. giganteus</i> DSM 1146	Wildstamm	Leibniz Institut, DSMZ
<i>A. terreus</i> NIH 2624	Wildstamm	Dr. Matthias Brock, University of Nottingham
<i>A. terreus</i> SBUG 844	Wildstamm	Dr. Matthias Brock, University of Nottingham
<i>A. terreus</i> T9	Wildstamm	Prof. Dr. Cornelia Lass-Flörl, Medizinische Universität Innsbruck

<i>A. terreus</i> At17-14 DSM 113823	Wildstamm, Patientenisolat	eigene Arbeitsgruppe
<i>A. fumigatus</i> AfS35	<i>A. fumigatus</i> D141 $\DeltaakuA$	Prof. Dr. Sven Krappmann, Universität Erlangen
<i>A. fumigatus</i> D141	Wildstamm, Patientenisolat	Prof. Dr. Sven Krappmann, Universität Erlangen
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	Wildstamm, Patientenisolat	Prof. Dr. Axel Brakhage, Hans-Knöll-Institut, Jena
<i>A. fumigatus</i> Af293	Wildstamm	Prof. Dr. Axel Brakhage, Hans-Knöll-Institut, Jena
<i>A. fumigatus</i> $\Delta glfA$	<i>A. fumigatus</i> , D141, $\Delta glfA$	Prof. Dr. Françoise Routier, Medizinische Hochschule Hannover, (SCHMALHORST et al., 2008)
<i>A. fumigatus</i> Mito GFP (= <i>green fluorescent protein</i> )	<i>A. fumigatus</i> , D141 Mito GFP	(MCCORMICK et al., 2010)
<i>A. fumigatus</i> $\Delta ags1-3$	<i>A. fumigatus</i> AfS35, $\Delta ags1-3$	Dr. Karl Dichtl, Max von Pettenkofer-Institut
<i>A. fumigatus</i> $\Delta gtb3$	<i>A. fumigatus</i> , Af293, $\Delta gtb3$	diese Arbeit
<i>A. fumigatus</i> 1014	Wildstamm, Patientenisolat	Max von Pettenkofer-Institut
<i>A. fumigatus</i> 1016	Wildstamm, Patientenisolat	Max von Pettenkofer-Institut
<i>A. fumigatus</i> 1018	Wildstamm, Patientenisolat	Max von Pettenkofer-Institut
<i>L. ramosa</i> B12-11.08.0095	Wildstamm	PD Dr. Volker Rickerts, Robert-Koch-Institut
<i>Rhizopus. oryzae</i> VA69749	Wildstamm	PD Dr. Volker Rickerts, Robert-Koch-Institut
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> CBS 187.84	Wildstamm	Dr. Sebastian Wurzer, Würzburg
<i>Mucor circinelloides</i> CBS394.68	Wildstamm	CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
<i>L. corymbifera</i> CBS 429.75	Wildstamm	CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
<i>F. oxysporum</i> DSM 62316	Wildstamm	Leibniz Institut, DSMZ



Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
J774A	murine Makrophagen-Zelllinie	Leibniz Institut, DSMZ
AB90-E8	Hybridom	T. Kakoschke
AE183-3	Hybridom	A. Wiedemann
AD105-30-2	Hybridom	A. Wiedemann

#### 1.4. Oligonukleotide

Die für das Konstrukt Af293 $\Delta$ *gtb3* beziehungsweise AfS35 $\Delta$ *gtb3* verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion hergestellt und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für das Konstrukt Af293 $\Delta$ *gtb3* bzw. AfS35 $\Delta$ *gtb3*. Kleinegeschriebene Sequenzen stellen die komplementären Überhänge zur Hygromycin B-Resistenzkassette dar.

Bezeichnung	Sequenz
<i>gtb3</i> -up FOR	GAATGGCTGCCACGCTGTT
<i>gtb3</i> -up REV	gccccaaaagtgtctcttcaatatcagttaacgtcgcggc GATGGTATGATTAGAGACTA
<i>gtb3</i> -do FOR	tcgtcaagagacctacgagactgaggaatccgctcttggc ATCTATCTATCCTGCCCTAC
<i>gtb3</i> -do REV	CTTTTACGAGGCGCACGAC
<i>gtb3</i> nest-do REV	TGGCGATCTGGGGATGGAG
<i>gtb3</i> nest-up FOR	CTTCTTAGTCCGGGTGCATG
<i>gtb3</i> -FOR	ATGGGTTTTATCGTCGCGACT
<i>gtb3</i> -intern-REV	CACTGCAGAGATCGCTGGATG
<i>gtb3</i> -REV	AGTGTGCAAATTCAGGATTTTC
<i>gtb3</i> -intern-FOR	GTCATCACCTCCACCATG
pSilent Hyg FOR	GCCGCGACGTAACTGATATT
pSilent Hyg REV	GCCAAGAGCGGATTCCTCAG

## 1.5. Antikörper

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper werden in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt.

### 1.5.1. Primäre Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.

Name	Konzentration	Bezugsquelle
AB90-E8	1 µg/ml	diese Arbeit
AE183-3	1 µg/ml	diese Arbeit
L10-1	Kulturüberstand	eigene Arbeitsgruppe
AD105-30-2	Kulturüberstand	eigene Arbeitsgruppe
AB135-8	Kulturüberstand	eigene Arbeitsgruppe
anti-GAG	20 µg/ml	Dr. V. Aimanianda, Institut Pasteur, Paris
2G8	16 µg/ml	A. Torosantucci und A. Cassone, Istituto Superiore di Sanità, Rom

### 1.5.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper.

Name	Konzentration	Bezugsquelle
Ziege-anti-Maus IgG+IgM (H+L) Cy3	Stammlösung: 1 mg/ml verwendete Konzentration: 5 µg/ml	Dianova
Ziege-anti-Maus IgM Cy3	Stammlösung: 1 mg/ml verwendete Konzentration: 5 µg/ml	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG Fc Alexa Fluor 488	Stammlösung: 1 mg/ml verwendete Konzentration: 5 µg/ml	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG+IgM-HRP (= horseradish peroxidase)	Stammlösung: 0,8 mg/ml Verwendete Konzentration: 0,4 µg/ml	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG+IgM (H+L) - Alkalische Phosphatase	Stammlösung: 0,6 mg/ml Verwendete Konzentration: 0,6 µg/ml	Dianova

## 2. Mikrobiologische Methoden

### 2.1. Nährmedien für die untersuchten filamentösen Pilze

Die aufgeführten Nährmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, stets bei 121°C und drei bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

#### *Aspergillus Minimal Medium (AMM):*

Zunächst wurden die Einzelkomponenten des Mediums hergestellt und autoklaviert beziehungsweise sterilfiltriert. Die Inhaltsstoffe der Einzelkomponenten sind in den Tabellen 7-12 aufgeführt. Aus den Komponenten konnte anschließend das AMM steril fertiggestellt werden. Ein erneutes Autoklavieren war somit nicht nötig. Ammoniumtartrat wurde als Standardstickstoffquelle verwendet. Ein Einstellen des pH-Wertes war nicht von Nöten, da er bereits bei 6,8 lag. Für die Herstellung von AMM-Agar wurde zusätzlich 20 g Agar in einen Liter Medium gegeben und autoklaviert. Je nach Bedarf wurde nach Fertigstellung des Flüssigmediums beziehungsweise des autoklavierten Agars ein Selektionsmarker in der gewünschten Endkonzentration hinzugefügt, um selektive Bedingungen zu schaffen.

Herstellung der Einzelkomponenten des AMM:

Tabelle 7: Inhaltsstoffe der 20x Salzlösung ohne MgSO<sub>4</sub> und ohne Stickstoffquelle.

KCl	10,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,9 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Tabelle 8: Inhaltsstoffe der 40 % Glukose-Lösung.

D-Glukose	400 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Tabelle 9: Inhaltsstoffe der 2 M Ammoniumtartrat-Lösung.

C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (Ammoniumtartrat)	184,15 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

Tabelle 10: Inhaltsstoffe der 0,4 M MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O-Lösung.

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	52 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

Tabelle 11: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung I.

EDTA	10 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 80 ml

In genannter Reihenfolge zugeben. Anschließend mit KOH auf pH auf 5,5 einstellen.

Tabelle 12: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung II.

ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4,4 g
MgCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,2 g
COCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,32 g
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,32 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,22 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	80 ml

In genannter Reihenfolge zugeben.

Nun konnten die Lösungen I und II in gleichen Teilen zusammengegeben werden und der pH mit KOH auf 6,5 eingestellt werden. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt, sterilfiltriert (0,45 µm Porendurchmesser) und zu je 1 ml aliquotiert. Die aliquotierte Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Die Einzelkomponenten für AMM werden, wie in Tabelle 13 angegeben, gemischt.

Tabelle 13: Inhaltsstoffe von AMM-Flüssigmedium.

20 x Salzlösung (ohne NaNO <sub>3</sub> )	50 ml
40 % Glukose	25 ml
2 M C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (Ammoniumtartrat)	10 ml
0,4 M MgSO <sub>4</sub>	5 ml
Spurenelementlösung	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**Sabouraud-Medium:**

Zur Herstellung von Sabouraud-Flüssigmedium wurden zunächst die beiden Einzelkomponenten, wie in Tabelle 14 und Tabelle 15 angegeben, hergestellt und autoklaviert.

Tabelle 14: Inhaltsstoffe 2x Pepton (2 %).

Pepton	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

pH 7,0 einstellen mit NaOH oder HCl.

Tabelle 15: Inhaltsstoffe der 2x Glukose (8 %).

D-Glukose	80 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Nach Autoklavieren der Einzelbestandteile wurden diese zu gleichen Teilen gemischt, um Sabouraud-Medium herzustellen.

**Sabouraud-Agar:**

Zur Herstellung von Sabouraud-Agar wurden 20 g Agar zur 2x Glukose gegeben und diese zu gleichen Teilen mit 2x Pepton gemischt und erneut autoklaviert (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Inhaltsstoffe der 2x Glukose (8 %) für Sabouraud-Agar.

Agar-Agar 4 %	20 g
D-Glukose 8 %	40 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

2x Pepton (2 %): siehe oben.

***Synthetic Defined (SD)-Medium:***

Zur Herstellung von SD-Medium wurden zunächst die Einzelkomponenten, wie in Tabelle 17 und Tabelle 18 angegeben, hergestellt und autoklaviert.

Tabelle 17: Inhaltsstoffe der Lösung S.

<i>Yeast Nitrogen Base</i>	1,7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Ammoniumpersulfat (APS)	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Tabelle 18: Inhaltsstoffe der Lösung D.

2 % Glukose	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Für 200 ml SD-Medium wurden die Komponenten, wie in Tabelle 19 angegeben, gemischt.

Tabelle 19: Zusammensetzung SD-Medium.

Lösung S	40 ml
Lösung D	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	150 ml

### **Bovines Serum Albumin (BSA)-Medium:**

BSA-Medium wurde aus den folgenden Einzelkomponenten zusammen gemischt:

Tabelle 20: Inhaltsstoffe des BSA-Mediums.

20x Salzlösung (ohne NaNO <sub>3</sub> )	5 ml
1 % BSA	1 g
0,4 M MgSO <sub>4</sub> (200 x)	0,5 ml
Spurenelementlösung	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml

Sterilfiltrieren

### **Sorbitol-Agar:**

Für Pilztransformation mit *A. fumigatus* wurden Sorbitol-Agarplatten (siehe Tabelle 21) und Sorbitol-Soft-Agar (siehe Tabelle 22) benötigt.

Tabelle 21: Inhaltsstoffe des 2x Sorbitol-Agars.

Agar-Agar 4 %	10 g
D-Glukose	5 g
Sorbitol	109 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 250 ml

Autoklavieren

Tabelle 22: Inhaltsstoffe des 2x Sorbitol-Soft-Agars.

Agar-Agar 4 %	3,5 g
D-Glukose	5 g
Sorbitol	109 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 250 ml

Autoklavieren

Für die Agarplatten der Pilztransformation wurden 12,5 ml AMM mit dem entsprechendem Selektionsmarker in eine 50 ml Röhre vorgelegt und anschließend 12,5 ml des geschmolzenen, auf circa 50°C abgekühlten, 2x Sorbitol-Agars hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen wird der Inhalt in eine Petrischale gegossen.

## 2.2. Selektionsmarker

Der verwendete Selektionsmarker ist in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Verwendeter Selektionsmarker.

Selektionsmarker	Konzentration	gelöst in:	Firma
Hygromycin B	200 µg/ml	HEPES Puffer	InvivoGen

## 2.3. Anzucht der Pilzstämmen

### 2.3.1. Anzucht der Pilzstämmen zur Herstellung neuer Sporensuspensionen

Um für die Versuche neue Sporenstammuspensionen herzustellen, wurden Sporen aus bereits vorhandenen Suspensionen auf Nähragar in Zellkulturflaschen (TC-Flasche T25, Standard) ausgebracht. Hierzu wurden zunächst 13 ml Sabouraud beziehungsweise AMM-Agar (je nach Bedarf mit Selektionsmarker) in die Flaschen gefüllt. Nun wurden die vorhandenen Sporenlösungen je nach Konzentration mit flüssigem Sabouraud-Medium beziehungsweise AMM-Medium verdünnt und auf den Agar gegeben. Für die bessere Verteilung der Sporen wurden sterile Glaskugeln mit in die Flasche gegeben und der Inhalt durch leichtes Schwenken über den Agar verteilt. Die beimpften Flaschen wurden nun für zwei bis fünf Tage bei 30-37°C inkubiert. Sobald sich eine Sporenschicht auf dem Myzel gebildet hat, konnten die Sporen geerntet werden.

### 2.3.2. Ernten der Sporen

Für das Ernten der Sporen wurden erneut sterile Glaskugeln in die Zellkulturflaschen gegeben. Mit 5-10 ml sterilem 0,01 % Tween 20-Wasser wurden die Sporen durch Schwenken vom Myzel gelöst. Die daraufhin entstandene Sporensuspension wurde anschließend durch einen autoklavierten Trichter (A. Hartenstein), der mit Miracloth (Merck) ausgekleidet war, geschüttet und in einer 15 ml Röhre aufgefangen.

### 2.3.3. Bestimmung der Sporenkonzentration

Zur Bestimmung der Sporenkonzentration von *A. fumigatus* wurde das Gerät Ultrospec10 (Amersham Biosciences) verwendet. Hierzu wird die optische Dichte (OD) einer verdünnten Sporensuspension (1:50-1:100) bei 600 nm gemessen. Mit der Formel  $OD_{600} \times 2,24 \times 10^7 \times \text{Verdünnungsfaktor}$  kann die Sporenkonzentration pro ml berechnet werden. Die Sporensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 8°C gelagert.

### 2.3.4. Anzucht in Flüssigkultur für Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Anzucht von *Aspergillus* spp., Mucorales und *F. oxysporum* in Flüssigmedium wurden jeweils eine entsprechende Menge Medium (siehe Punkt 2.1) mit Sporen angeimpft und entweder in eine 24-Well Mikrotiterplatte mit runden Deckgläsern (A. Hartenstein) oder in eine *Life Cell Imaging*-Kammer ( $\mu$ -Slide 8 Well, Ibidi) gegeben. Anschließend wurden die Pilze bei 26°C (*F. oxysporum*), 30°C (Mucorales, *Aspergillus* spp.) oder 37°C (*Aspergillus* spp.) im Brutschrank aerob inkubiert.

### 2.3.5. Anzucht für die Herstellung von Kulturüberstand

Für die Herstellung von Kulturüberständen wurden die jeweiligen Pilzstämme in einem Erlenmeyerkolben in 50 ml Medium (Sabouraud-Medium oder SD-Medium) angezogen. Die Ansätze wurden fünf Tage schüttelnd (140 rpm = *revolutions per minute*) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie durch einen sterilen Trichter, der mit Miracloth ausgekleidet war, filtriert, um das Myzel vom Kulturüberstand zu trennen. Der Kulturüberstand wurde in einer 50 ml Röhre aufgefangen. Das Myzel wurde anschließend getrocknet und gewogen.



### 2.3.6. Isolierung von Aleuriokonidien

Um AC zu isolieren, wurden zunächst  $7,5 \times 10^5$  Sporen der *A. terreus* Stämme At17-14, T9 oder SBUG844 in 40 ml Sabouraud-Medium in eine 50 ml Röhre pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 140 rpm für fünf Tage. Jeden Tag wurde Myzel, das auf der Oberfläche schwamm, mit einem sterilen Tupfer abgenommen, damit sich keine PC bilden konnten. Das restliche Myzel wurde mit einer sterilen 10 ml-Pipette nach unten gedrückt. Nach fünftägiger Inkubation wurden die Röhren kräftig geschüttelt, damit sich die AC von den Hyphen lösten. Nun wurde der Inhalt der Röhre durch einen sterilen Trichter mit drei Lagen Miracloth gegeben, um die AC vom restlichen Myzel zu trennen. Nach einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei  $10.000 \times g$  (= vielfache Erdbeschleunigung) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. In jede Röhre wurden nun 10 ml steriles  $H_2O_{demin.}$  pipettiert und das Pellet resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Gegebenenfalls wurde der Waschschrift mit  $H_2O_{demin.}$  wiederholt, um sicherzustellen, dass keinerlei Medium mehr in der Sporensuspension verblieb. Hiernach wurde der Überstand wieder vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml  $H_2O_{demin.}$  gelöst. Die AC wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

## 3. Proteinchemische Methoden

### 3.1. Trichloressigsäure-Fällung zur Aufkonzentrierung von Kulturüberständen

Um Kulturüberstände aufzukonzentrieren, wurde die Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid* = TCA)-Fällung verwendet. Für die Anzucht von *A. fumigatus* wurden 100 ml AMM mit  $2 \times 10^9$  frisch geernteten Sporen in einem Erlenmeyerkolben beimpft und fünf Tage schüttelnd (140 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens durch einen sterilen Trichter mit Miracloth gefiltert und der Überstand in zwei 50 ml Röhren aufgefangen. Der gewonnene Überstand (40 ml) wurde in einer 50 ml Röhre mit 5 ml 100%iger TCA-Lösung (Sigma-Aldrich) versetzt und bei 8°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und  $9.000 \times g$  für 60 Minuten. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment luftgetrocknet. Nun wurde das getrocknete Sediment mit 200  $\mu$ l 1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), pH 8,8 resuspendiert und erneut bei

1.000 x g zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf) überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Ein *Bradford Protein Assay* wurde durchgeführt, um die Konzentration der gereinigten Antikörper zu messen. Hierzu wurde zunächst das *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad) 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> verdünnt. Nun wurden jeweils 10 µl der zu untersuchenden Proben im dreifachen Ansatz in eine 96-Well Platte pipettiert. Um eine Eichkurve anlegen zu können, wurde als Proteinstandard BSA in H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> in den Konzentrationen 0-0,5 mg/ml angesetzt. Auch hier wurden je 10 µl im Dreifachansatz in die Wells pipettiert. Nun konnten 200 µl des verdünnten *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* mit einer Mehrfachpipette in die Wells gegeben und gemischt werden. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Platte bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Mikroplatten-Reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) gemessen.

### 3.2. Eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine zunächst durch Hitze denaturiert, wodurch sich das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide an diese anlagern kann und die Eigenladung der Proteine überdeckt. Nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes werden Proteine nun durch den Siebeffekt des Polyacrylamidgels ihrer Größe nach aufgetrennt.

Für die SDS-PAGE wurde das Bio-RAD MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY Elektrophoresesystem, die MiniGel Twin-Kammer sowie Glasplatten, Kämmen und Spacer der Firma Biometra verwendet.

Zunächst wurden zwei passende Glasplatten mit einer Silikondichtung versetzt, die durch drei Klammern fixiert wurde. Nun konnte die Lösung des Trenngels (siehe Tabelle 24) zwischen die Glasplatten gegossen werden und vorsichtig mit 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> überschichtet werden. Nach Auspolymerisieren und Entfernen des H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wurde die Lösung des Sammelgels (siehe Tabelle 25) auf das Trenngel gegeben und ein Kamm zwischen die beiden Platten in die Lösung gesteckt. Durch den Kamm bilden sich Taschen im Sammelgel, in die später die Proben gegeben werden

können. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proben, da es einen anderen pH-Wert und größere Poren besitzt. Erst im Trenngel werden die Proben anhand ihrer Größe aufgetrennt. Nach Auspolymerisieren konnte das fertige Gel nun in die Kammer eingesetzt werden. Die Proben wurden gegebenenfalls zunächst mit 0,5 M TRIS, pH 6,8, vorverdünnt und anschließend 3+1 mit Probenpuffer 4 x *RotiLoad1* (Carl Roth) versetzt. Die Proben wurden bei 95°C für fünf Minuten erhitzt und danach bei 14.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer (siehe Tabelle 26) bis zur Markierung befüllt, sodass das ganze Gel überschichtet war. Es wurden jeweils 13 µl der Proben und 7 µl des Molekulargewichts-Markers *peq.Gold Protein Marker IV* (VWR) in die Geltaschen pipettiert. Der Versuch wurde zunächst bei 120 Volt (V) gestartet, bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel gelaufen waren. Danach wurde die Spannung auf 150 V angehoben und das Gel 1-1,5 Stunden weiterlaufen gelassen, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Tabelle 24: Zusammensetzung Trenngel (für zwei Gele).

T*	7,5 %	10 %	12 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	7,4 ml	6,1 ml	3,6 ml
1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
30 % Acrylamidlösung	3,0 ml	5,0 ml	7,5 ml
10 % SDS-Lösung	150 µl	150 µl	150 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	20 µl	20 µl	20 µl
25 % APS	20 µl	20 µl	20 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	7,4 ml	6,1 ml	3,6 ml

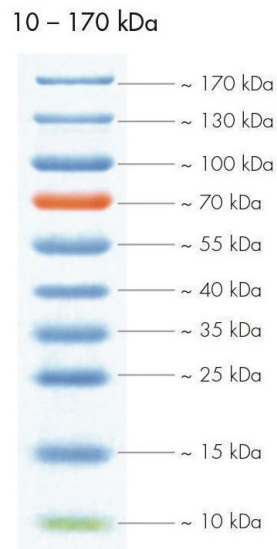
\*= Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid im fertigen Gel

Tabelle 25: Zusammensetzung Sammelgel (für zwei Gele).

H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2,9 ml
0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8	1,25 ml
30 % Acrylamid	0,85 ml
10 % SDS- Lösung	50 µl
TEMED	10 µl
25 % APS	10 µl

Tabelle 26: Inhaltsstoffe 10x SDS-Laufpuffer.

TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml



4 – 20 % SDS-PAGE

Abbildung 1: *peqGOLD pre-stained protein marker IV* (VWR).

### 3.3. Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Färbelösung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine müssen diese durch eine Färbung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde *Coomassie Brilliant Blue R250* (Serva) verwendet und die Färbelösung, wie in Tabelle 27 angegeben, angesetzt. Die Gele wurden nach der SDS-PAGE für mindestens zwei Stunden in die Coomassie-Färbelösung gelegt. Die Färbung erfolgte unter leichtem Schwenken auf einem Taumler bei RT. Im Anschluss wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült und für mindestens eine Stunde in eine Entfärbelösung (siehe Tabelle 28) gelegt.

Tabelle 27: Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung.

<i>Coomassie Brilliant Blue R 250</i>	2 g
Ethanol	100 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800 ml

Tabelle 28: Zusammensetzung Schnellentfärber.

H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	500 ml
Essigsäure	100 ml
Methanol	400 ml

### 3.4. Western Blot

Um Proteine nach einer SDS-PAGE auf eine Membran zu blotten und anschließend zu färben, wurde ein Nassblot in einer Kammer der Firma BioRad durchgeführt. Zunächst wurde neuer Transferpuffer hergestellt (siehe Tabelle 29). Des Weiteren wurden zwei Blottingpapiere (A. Hartenstein) und eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) auf etwa die Größe des Gels zugeschnitten und zusammen mit zwei Schwämmen in den Puffer gelegt. Das Polyacrylamidgel aus der SDS-PAGE wurde ebenfalls für ein paar Minuten in den Transferpuffer gelegt. Nun konnte die Blotapparatur mit der schwarzen Seite nach unten folgendermaßen zusammengebaut werden: Schwamm, Papier, Gel, Membran, Papier, Schwamm

Nach Einhängen der Blotapparatur wurde die Kammer mit Transferpuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde ein Kühlakku mit in die Kammer gelegt. Ein Magnetrührer wurde auf dem Boden der Kammer platziert. Die Kammer mit der Blotapparatur wurde über Nacht (16 Stunden) auf einen Magnetrührer gestellt und bei 30 V geblottet.

Am nächsten Tag wurde der Blot auseinander gebaut und die Membran mit *Ponceau*-Lösung (siehe Tabelle 30) gefärbt, um diese auf vorhandene Banden zu überprüfen. Danach wurde die Membran für circa 30 Minuten mit 1,5 % BSA in TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T, siehe Tabelle 31) abgesättigt. Nun konnte der primäre Antikörper auf den Blot gegeben werden und eine Stunde bei RT auf dem Taumler inkubiert werden. Anschließend wurde der Blot dreimal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase konjugierte, Antikörper Ziege-anti-Maus IgG+IgM (H+L) (Dianova, Stammlösung: 0,6 mg/ml) wurde in TBS-T 1:1000 verdünnt, auf den Blot gegeben und dieser wiederum eine Stunde bei RT auf dem Taumler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde der Blot kurz mit Glycin-Puffer (siehe Tabelle 32 und Tabelle 33) abgespült und danach in die Entwicklungslösung BCIP (= 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), die in der Konzentration 1 mg/ml in Glycin-Puffer, pH 10, gelöst war, gelegt.

Tabelle 29: Zusammensetzung Transferpuffer.

25 mM TRIS	3,03 g
192 mM Glycin	14,4 g
0,1 % SDS	1 g
20 % Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Tabelle 30: Zusammensetzung Ponceau-Färbelösung.

<i>Ponceau-S-Red</i>	2,5 g
Essigsäure	25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	475 ml

Tabelle 31: Zusammensetzung TBS-T.

40 mM TRIS	4,84 g
273 mM NaCl	15,98 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
Tween 20	100 µl

Tabelle 32: Einzelkomponente des Glycin-Puffers.

1 M MgCl <sub>2</sub>	9,52 g	ad 100 ml
250 mM ZnCl <sub>2</sub>	3,4 g	ad 100 ml
1 M Glycin, pH 10	37,5 g	ad 500 ml

Tabelle 33: Zusammensetzung Glycin-Puffer

1 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml
250 mM ZnCl <sub>2</sub>	4 ml
1 M Glycin, pH 10	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

### 3.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für ein ELISA von Kulturüberständen wurde eine *Nunc MaxiSorp* ELISA-Platte (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zunächst wurden die jeweiligen Proben gegebenenfalls mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt und anschließend drei Teile der Probe mit einem Teil 0,1 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6, versetzt. Es wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  im dreifachen Ansatz in die Wells gegeben. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich phosphatgepufferte Salzlösung (*Phosphate buffered saline* = PBS, siehe Tabelle 34) mit 0,1 M Bicarbonatpuffer im gleichen Verhältnis versetzt und in die Wells pipettiert. Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgeklopft und die Wells für 30 Minuten mit je 250  $\mu\text{l}$  1,5 % BSA in TBS-T abgesättigt. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurden 150  $\mu\text{l}$  des ersten Antikörpers in die Wells pipettiert und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nun wurde die Flüssigkeit abgeklopft und alle Wells dreimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  des verdünnten Sekundärantikörpers Ziege-anti-Maus IgG+IgM-HRP (Dianova, 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in die Wells pipettiert und wiederum eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Ausklopfen der Flüssigkeit und Waschen mit TBS-T konnten nun 100  $\mu\text{l}$  des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrats (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und der Farbumschlag beobachtet werden. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde die ELISA-Platte im Mikroplatten-Reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) photometrisch bei Wellenlänge 650 nm gemessen.

Tabelle 34: Zusammensetzung PBS.

136 mM NaCl	8 g
2,6 M KCL	0,2 g
10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,44 g
1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,24 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

## 4. Molekularbiologische und genetische Methoden

### 4.1. Isolierung von chromosomaler DNA

Zur Vorbereitung der Isolierung von DNA wurde je 1 ml AMM mit einer entsprechenden Menge Sporen in ein Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf) gegeben. Je nach Bedarf wurde das Medium zusätzlich mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt. Es erfolgte eine Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C und 140 rpm über Nacht. Zur Isolierung der DNA wurde das *MasterPure Yeast DNA Purification Kit* (Lucigen) verwendet.

Das Myzel wurde nun direkt aus dem Mikrozentrifugenröhrchen entnommen und in ein *DNA-Lysing Matrix Tube*, in dem bereits 225 µl *Yeast Cell Lysis Solution* vorgelegt wurde, überführt. Das Myzel wurde daraufhin im *Fast Prep 24* (MP Biomedicals) bei 6 m/s für 40 Sekunden aufgeschlossen und anschließend bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Nach einer fünfminütigen Abkühlung auf Eis wurden je 112,5 µl *MCP Protein Precip Reagent* in die *DNA-Lysing Matrix Tubes* gegeben und für zehn Minuten bei 10.600 x g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf) pipettiert und 375 µl Isopropanol dazu gegeben. Durch mehrmaliges Invertieren erkannte man bereits erste ausgefallene DNA. Nun wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Der daraufhin entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl gekühltem 70 % Ethanol resuspendiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 x g wurde der Überstand erneut abgenommen und die Proben mit geöffnetem Deckel für circa 20 Minuten auf einem Heizblock bei 50°C getrocknet. Als letzter Schritt wurde zunächst 1 µl RNase (Stammlösung: 5 mg/ml), die ein Bestandteil des *MasterPure Yeast DNA Purification Kits* war, in 500 µl Nuklease-freiem Wasser gegeben und jeweils 100 µl zu den Proben pipettiert.

### 4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung der in 4.1 isolierten DNA, wurden die Proben mittels Biophotometer (Eppendorf) photometrisch bei 260 nm und 280 nm gegen einen Leerwert (H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) gemessen und die Konzentration berechnet. Die Proben wurde anschließend bei -20°C gelagert.



### 4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann genutzt werden, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Für analytische Zwecke wurde die *DreamTaq PCR Master Mix (2x)* (Thermo Fisher Scientific) mit einem Probenvolumen von 25  $\mu\text{l}$  verwendet. Sollte mit dem PCR Produkt weitergearbeitet werden, wie zum Beispiel bei Klonierungen, so wurde die *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 2x Master Mix* (New England Biolabs) genutzt. Hierbei wurde ein Probenvolumen von 50  $\mu\text{l}$  verwendet. Es wurden synthetisch hergestellte Primer (Metabion) in einer 1:5 Verdünnung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  (Stammlösung: 100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt und die PCR im Mastercycler pro (Eppendorf) durchgeführt. Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden mithilfe des *NEB Tm Calculators* (<http://tmcalculator.neb.com>) errechnet. Die Ansätze wurden folgendermaßen zusammen pipettiert:

<b><i>DreamTaq PCR Master Mix (2x)</i></b>	12,5 $\mu\text{l}$
<i>Forward-Primer</i>	1,25 $\mu\text{l}$
<i>Reverse-Primer</i>	1,25 $\mu\text{l}$
<i>Template</i>	X $\mu\text{l}$
Nuklease-freies $\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{l}$ – X ( <i>Template</i> )
<b><i>Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 2x Master Mix</i></b>	25 $\mu\text{l}$
<i>Forward-Primer</i>	2,5 $\mu\text{l}$
<i>Reverse-Primer</i>	2,5 $\mu\text{l}$
<i>Template</i>	X $\mu\text{l}$
Nuklease-freies $\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{l}$ – X ( <i>Template</i> )

Ein beispielhaftes Protokoll für die *Q5 High-Fidelity Polymerase* (New England Biolabs) lautet wie folgt:

Initiale Denaturierung:	98°C	30 Sekunden	
Denaturierung:	98°C	10 Sekunden	} 30-35 Zyklen
<i>Annealing</i> :	61°C	20 Sekunden	
Elongation:	72°C	40 Sekunden	
<i>Last Delay</i> :	72°C	2 Minuten	
Kühlen:	4°C	dauerhaft	

Je nach ermittelter *Annealing*-Temperatur der Primer lag diese zwischen 50-70°C. Die Elongationszeit betrug für PCR-Produkte bis 2000 Basenpaare (bp) eine Minute. Bei größeren Produkten sollte die Elongationszeit um eine Minute pro

Kilobase (kb) verlängert werden.

#### 4.4. PCR-Aufreinigung

Um PCR-Produkte aufzureinigen wurde das Aufreinigungskit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) verwendet.

Das PCR-Produkt wurde hierfür zunächst mit der gleichen Menge *Membrane Binding Buffer* versetzt. Nun wurde eine Minisäule auf ein Sammelröhrchen gesteckt und die Probe hinein pipettiert und für circa eine Minute bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde dann bei 16.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 700 µl *Membrane Washing Solution* auf die Säule pipettiert und alles erneut bei 16.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Waschschrift mit 500 µl wiederholt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die Probe noch einmal eine Minute leer zentrifugiert, um letzte Ethanolreste zu entfernen. Die Säule wurde nun in ein Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt und 50 µl Nuklease-freies Wasser darauf pipettiert. Hierdurch wurde das PCR-Produkt von der Säule gelöst. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei 37°C wurde der Ansatz ein weiteres Mal bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend konnte die Säule entfernt werden und das gereinigte PCR-Produkt im Biophotometer gemessen werden. Die Lagerung des PCR-Produktes erfolgte bei -20°C.

#### 4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zur Größenbestimmung aufzutrennen, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde die Standard-Agarosekonzentration (Agarose Standard, ROTI-Garose für die DNA/RNA-Elektrophorese; Carl Roth) von 1 % (w/v) in 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Buffer 50x, PanReac AppliChem, 1:50 verdünnt) verwendet. Zudem wurden dem Agarosegel 4 µl pro 100 ml vom fluoreszierenden Farbstoff *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (10.000x in Wasser; Biotium) zugesetzt. Die Proben wurden zunächst 1:6 verdünnt. Hierbei wurden 1 µl der Probe, 1 µl *DNA Gel Loading Dye* (6x) (Thermo Fisher Scientific) und 4 µl Nuklease-freies Wasser auf einem Stück Parafilm vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zur Quantifizierung und Größenbestimmung der Proben wurde der *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, siehe Abbildung 2) aufgetragen, welcher DNA-Fragmente definierter Größe enthält. In einer Gelelektrophoresekammer mit TAE-Laufpuffer

erfolgte die Auftrennung für 90 Minuten bei 90 V. Unter UV-Licht (UV-Transilluminator) wurde das Gel im *UVP GelStudio* (AnalytikJena) angesehen und fotografiert.

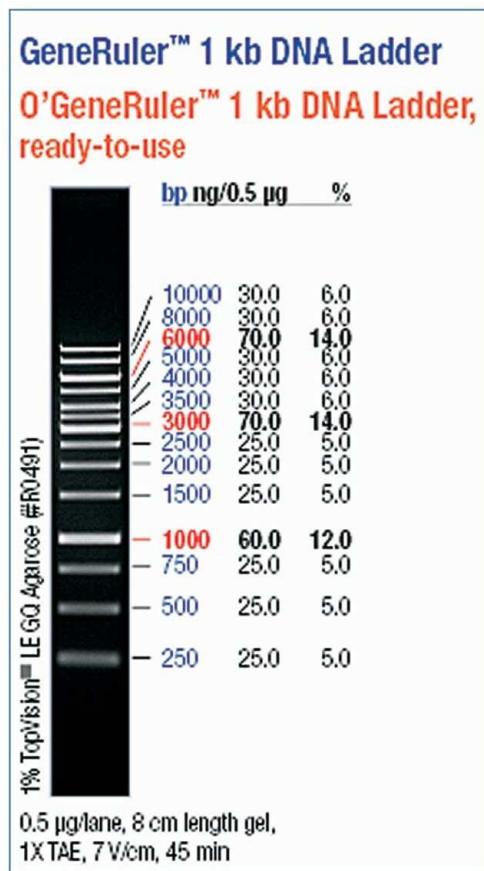


Abbildung 2: *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fischer Scientific).

#### 4.6. Herstellung eines Deletionskonstruktes mittels Fusions-PCR

Zur Herstellung eines Deletionskonstruktes kann zum einen die Methode mittels *SfiI*-Verdau oder aber die einer Fusions-PCR verwendet werden. Für die Methode der Fusions-PCR wurden zunächst insgesamt acht Primer hergestellt. Als erstes wurden nun circa 1000 bp-lange Bereiche des *Upstream*- und *Downstream*-Bereichs des zu deletierenden Genes mithilfe der entsprechenden *Forward*- und *Reverse*-Primer (*gtb3*-up FOR, *gtb3*-up REV, *gtb3*-do FOR, *gtb3*-do REV) nach Standardprotokoll (siehe 4.3) amplifiziert. Der *Upstream-Reverse* sowie der *Downstream-Forward*-Primer (*gtb3*-up REV, *gtb3*-do FOR) wiesen hierbei einen circa 20 bp-langen komplementären Überhang zu einer Hygromycin B-Resistenzkassette auf. Auch die Hygromycin B-Resistenzkassette wurde mit Primern (pSilent Hyg FOR, pSilent Hyg REV) amplifiziert. Hierbei diente das

Plasmid pSK379-RFP als Template, da die Hygromycin-Resistenzkassette aus *pSilent* in diesem Plasmid integriert ist. Alle PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und die Konzentration im Biophotometer gemessen. Nun konnte die erste eigentliche Fusions-PCR durchgeführt werden. Hierzu wurden jeweils 100 ng des *Upstream*-Fragments und 100 ng der Hygromycin B-Resistenzkassette eingesetzt und die PCR zunächst ohne Primer nach folgendem Protokoll gestartet: Nach der initialen Denaturierung (98°C, 30 Sekunden) wurden neun Wiederholungen der folgenden Schritte durchgeführt:

Denaturierung:	98°C	10 Sekunden
<i>Annealing</i> :	70°C	30 Sekunden
Elongation:	72°C	105 Sekunden

Anschließend wurden die flankierenden Primer (*gtb3*-up FOR und *pSilent Hyg* REV) hinzugegeben und die PCR mit 30 Zyklen erneut gestartet.

Das Amplifikat wurde in einer Gelelektrophorese getestet. Nach erfolgreicher Fusion des *Upstream*-Fragments mit der Hygromycin B-Resistenzkassette wurde das Fragment aufgereinigt und gemessen. Nun konnte die zweite Fusions-PCR durchgeführt werden. Hierfür wurden 150 ng der *Upstream*-Hygromycin-Amplifikats und 60 ng des *Downstream*-Fragments eingesetzt und die PCR erneut ohne Primer gestartet. Die Einstellungen lauteten wie folgt:

Initiale Denaturierung:	98°C	30 Sekunden
Denaturierung:	98°C	10 Sekunden
<i>Annealing</i> :	68°C	30 Sekunden
Elongation:	72°C	125 Sekunden

Nach neun Zyklen wurden *nested*-Primer (*gtb3* nest-up FOR, *gtb3* nest-do REV) hinzugefügt und die PCR mit 30 Zyklen erneut gestartet. Das Endprodukt wurde nach Protokoll aufgereinigt und in einer Gelelektrophorese kontrolliert. Nach erfolgreicher Fusion konnte das Konstrukt in *A. fumigatus* transformiert werden.

#### 4.7. Transformation von *Aspergillus*

Das lineare DNA-Konstrukt für die Transformation in *Aspergillus* enthielt eine Hygromycin B-Resistenzkassette. Dementsprechend wurde zu Selektionszwecken der Transformationsklone dieser Selektionsmarker in das Anzuchtmedium gegeben.

Zur Vorbereitung der Transformation wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur der *A. fumigatus* Stämme AfS35 beziehungsweise Af293 in 50 ml AMM in einem Erlenmeyerkolben angesetzt. Dieser wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag sollte das Myzel keine großen Ballen geformt haben, sondern sich durch leichtes Schütteln vom Boden lösen. Nun konnte der Ansatz durch einen Trichter, der mit Miracloth ausgekleidet war, filtriert werden. Durch die Zugabe von sterilem Wasser wurde auch das restliche Myzel aus dem Kolben gespült. Nun wurden 0,2 g *Lysing Enzymes* (Sigma-Aldrich) in eine 50 ml Röhre abgewogen und 10 ml Lösung 2 (siehe Tabelle 35) zugegeben. Die Lösung wurde gevortext, durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und in einen Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt. Mit einem abgeflammt Spatel wurde Myzel zur *Lysing Enzymes*-Lösung gegeben und kurz geschwenkt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C schüttelnd (140 rpm) inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation konnte die Protoplasten-Suspension durch einen Trichter, der mit einer doppelten Lage Miracloth ausgekleidet war, filtriert werden. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis. Zu den Protoplasten wurde das zweifache Volumen kalter Lösung 6 (siehe Tabelle 36) gegeben und für 15 Minuten bei 2.800 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abgenommen. Das vorhandene Pellet wurde in 1 ml kalter Lösung 6 resuspendiert und in 1,5 ml Röhrchen überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 2.800 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 400 µl kalter Lösung 7 (siehe Tabelle 37) gelöst. Währenddessen wurden 30 µl DNA der zu transformierenden Konstrukte in eine 15 ml Röhre vorgelegt und auf Eis gestellt. Zu den vorgelegten Konstrukten wurden 100 µl Protoplasten-Suspension pipettiert und 50 µl Lösung 8 (siehe Tabelle 38) zu dem Ansatz gegeben. Dieser wurde vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Lösung 8 dazu gegeben und gemischt, bis die Lösung homogen aussah. Dies wurde erneut mit 500 µl und 1 ml Lösung 8 wiederholt und nach vorsichtigem Mischen für 35 Minuten bei RT inkubiert. Zu jedem Konstrukt wurden daraufhin

10 ml, im Wasserbad flüssig gehaltener, Sorbitol-Softagar ohne Selektionsmarker gegeben. Das Protoplasten-Softagar-Gemisch wurde auf zwei, am Vortag vorbereitete, Sorbitol-AMM-Platten mit Selektionsmarker (Hygromycin B: 200 µg/ml, Sorbitol: 0,218 g/ml) gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für drei Tage bei 37°C inkubiert.

Die durch die Transformation entstandenen Einzelkolonien wurden nun auf neue Agarplatten mit Selektionsmarker überführt. Hierbei wurde mit einer sterilen Öse ein Drei-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Von den neuen Einzelkolonien der Transformationsklone wurde DNA gewonnen und in einer analytischen PCR geprüft, ob die Transformation erfolgreich war.

Tabelle 35: Zusammensetzung Lösung 2.

1,2 M MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	59,6 g
MNa <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung (0,2 M)	7,2 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung (0,2 M)	2,8 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 200 ml

pH auf 5,5 eingestellt und bei 4°C gelagert

Tabelle 36: Zusammensetzung Lösung 6.

1 M Sorbitol	91,1 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

Autoklavieren

Tabelle 37: Zusammensetzung Lösung 7.

1 M Sorbitol	18,22 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 M)	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml

Autoklavieren

Tabelle 38: Zusammensetzung Lösung 8.

Polyethylenglycol 4000	60 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 M)	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml

Autoklavieren

#### **4.8. Produktion antikörperhaltiger Hybridomüberstände und Aufreinigung monoklonaler Antikörper**

Die verwendeten Hybridomzelllinien sind durch die Arbeiten von Tamara Kakoschke und Annegret Wiedemann in der eigenen Arbeitsgruppe entstanden.

##### **4.8.1. Produktion von antikörperhaltigen Hybridomüberständen**

Die Hybridomzellen wurden zunächst aufgetaut und in frischem Medium aufgenommen. In einer 15 ml Röhre wurden die Zellen bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In zwei Wells einer 6-Well Platte (TPP) wurden jeweils 5 ml OptiMEM-Medium (Thermo Fisher Scientific) mit 5 % Fetalen Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) gegeben und die Hybridomzellen darauf aufgeteilt. Hybridomzellen, die sich in den folgenden Tagen nur mäßig teilten, wurden erneut umgesetzt und es wurde zu dem frischen Medium 1 % *Hybridoma Fusion and Cloning Supplement* (Roche) hinzugegeben. Nach drei Tagen wurde der Überstand erneut bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und die Zellen auf zwei Zellkulturschalen (13 cm Durchmesser, TPP) aufgeteilt. Wiederum zwei Tage später, wenn die Zellen das Medium weitgehend verbraucht hatten, was sich an einem Farbumschlag ins Gelbliche zeigte, konnte der Inhalt der Petrischalen abzentrifugiert und die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt werden. Die Flasche wurde mit Opti-MEM-Medium + 2 % FCS aufgefüllt. Nun konnte regelmäßig zellfreier, antikörperhaltiger Kulturüberstand geerntet werden, indem die Zellen, wie oben beschrieben, abzentrifugiert wurden und der Kulturüberstand in eine sterile Flasche überführt wurde.

##### **4.8.2. Aufkonzentrierung von antikörperhaltigen Hybridomüberständen**

Für die Reinigung der mAk wurden die in 4.8.1 gewonnenen Hybridomüberstände zunächst aufkonzentriert. Hierfür wurden jeweils circa 20 ml des Überstandes durch einen 0,2 µm Sterilfilter in einen 100 kDa Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin20, Satorius Stedim Biotech) gefiltert und bei 8°C und 3.000 x g für circa 25-30 Minuten zentrifugiert. Die Hybridomüberstände konnten so etwa 20-fach aufkonzentriert werden. Das gewonnene Konzentrat wurde in eine sterile 50 ml Röhre überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das Filtrat wurde in sterile Flaschen überführt und bei 8°C gelagert.

### 4.8.3. Reinigung von antikörperhaltigen Hybridomüberständen

Für die aufzureinigenden mAk war bekannt, dass sie zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse gehören. Zur Reinigung wurde die *Pierce Protein G Chromatography Cartridge* 1 ml (Thermo Fisher Scientific) nach Herstelleranleitung verwendet. Zunächst wurde der aufkonzentrierte Hybridomüberstand in gleichen Teilen mit dem *Binding Buffer* (siehe Tabelle 39) verdünnt. Nach Anschließen an eine Schlauchpumpe (PP-1080, VWR) wurde die Säule mit 5-10 ml *Binding Buffer* equilibriert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug hierbei 1 ml/min. Nun konnte die verdünnte Probe mit konstanter Geschwindigkeit über die Säule laufen gelassen werden. Der Durchlauf wurde aufgefangen, da sich dort nicht-gebundene Antikörper befinden können. Nachdem die Probe komplett über die Säule gelaufen war, wurde die Säule mit 5-10 ml *Binding Buffer* gewaschen. Nun wurden 2-5 ml *Elution Buffer* (siehe Tabelle 40) hinzugeben und 1 ml Fraktionen gesammelt. Um den physiologischen pH wiederherzustellen, wurden je 100 µl *Neutralization Buffer* (siehe Tabelle 41) zu den Fraktionen gegeben. Anschließend wurde direkt eine SDS-PAGE mit den Proben sowie dem Durchlauf durchgeführt.

Tabelle 39: *Binding Buffer*.

50 mM Natriumacetat, pH 5,0	6,8 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1000 ml

pH 5,0 einstellen

Tabelle 40: *Elution Buffer*.

0,1 M Glycin	0,75 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 ml

pH 2-3 einstellen

Tabelle 41: *Neutralization Buffer*.

1 M TRIS	12,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 ml

pH 7,5-9,0 einstellen und sterilfiltrieren



## 5. Zellbiologische und mikroskopische Methoden

### 5.1. Immunfluoreszenzfärbungen von Pilzhypen

Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden Sporen der jeweils verwendeten Stämme in 1 ml des geeigneten Mediums (Sabouraud-Medium, AMM, SD-Medium, BSA-Medium, RPMI 1640 (H = 25 mM HEPES gepuffert), RPMI 1640 + 5 % FCS (H) in 24-Well Platten mit runden Glas-Deckgläsern oder in *Life Cell Imaging*-Kammern ( $\mu$ -slide 8-well, Ibidi) ausgesät. Für Immunfluoreszenzfärbungen von *Fusarium* spp. wurden die *Life Cell Imaging*-Kammern mit 300  $\mu$ l Poly-L-Lysin (15  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) für zwei Stunden bei RT vorinkubiert und anschließend einmal mit Medium gewaschen, bevor die Sporen in Medium ausgesät wurden. Für Färbungen der  $\Delta$ *gtb3*-Mutante wurden die Kammern mit dem zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse gehörende Antikörper AB90-E8 beschichtet. Hierfür wurde der Antikörper auf eine Konzentration von 2  $\mu$ g/ml eingestellt und anschließend 3+1 mit 0,1 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6 gemischt. Diese Lösung wurde dann in die Kammern gegeben und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nun wurden die Kammern einmal mit Medium gewaschen und die Sporen in frischem Medium ausgesät. Je nach Stamm wurden sie über Nacht bei 26-37°C inkubiert und am nächsten Tag mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für fünf Minuten fixiert und mit PBS gewaschen. Handelte es sich um Hyphen, die sich leicht von Oberflächen ablösen, wurden die Überstände stets vorsichtig mit einer 2 ml-Spritze mit aufgesetzter 26G Kanüle (Braun) abgenommen.

Zum Absättigen wurden die Hyphen mit 10 % Ziegen Serum (Dianova) in PBS für 30 Minuten bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde der jeweilige primäre Antikörper auf die Hyphen gegeben und bei 30°C für eine Stunde inkubiert. Hierfür wurden Antikörper-Überstände (L10-1, AD105-30-2, AB135-8) oder gereinigter Antikörper (AB90-E8: 1  $\mu$ g/ml, AE183-3: 1  $\mu$ g/ml, anti-GAG: 20  $\mu$ g/ml) verwendet. Nach dreimaligem Waschen in PBS konnte anschließend der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper ( $\alpha$ -Maus IgG/IgM Cy 3,5  $\mu$ g/ml, Dianova) dazugegeben und die Hyphen erneut bei 30°C für eine Stunde inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen konnte nun gegebenenfalls eine Färbung mit CFW (= *calcofluor white*, 3,5  $\mu$ g/ml in PBS). für 15-20 Minuten durchgeführt werden. Nach der Inkubation wurden die Hyphen gewaschen und die Deckgläser umgekehrt auf einen Tropfen *Vectashield Antifade Mounting Medium* (Vector Laboratories) auf Objektträger gelegt. Um sie vor

Austrocknung zu schützen, wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet. Zur Betrachtung der Präparate wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM5000 B, Leica Microsystem) sowie ein konfokales Mikroskop (Zeiss LSM 880 *confocal laser scanning microscope*, Carl Zeiss) verwendet. Für Fotoaufnahmen des Leica Mikroskops wurde die Software *Leica Application Suite X* (LAS-X; Leica Microsystems) und die Mikroskop-Kamera DFC3000 G (Leica Microsystems) verwendet. Für die Fotoaufnahmen des konfokalen Mikroskops wurde die ZEN Mikroskopie-Software (Carl Zeiss) genutzt. Die Weiterverarbeitung der Aufnahmen beider Mikroskope wurde mittels *Adobe Photoshop* durchgeführt.

## 5.2. Proteinase K-Verdau

Für den Verdau durch Proteinase K wurde zunächst ein Puffer hergestellt (siehe Tabelle 42). Die Pilzhyphen wurden über Nacht in RPMI 1640 (H) beziehungsweise Sabouraud-Medium auf Deckgläsern in einer 24-Well Platte angezogen und am nächsten Tag für fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und mit PBS gewaschen worden. Die Proteinase K (Sigma-Aldrich) wurde in der Konzentration 100 µg/ml in Puffer gelöst, zu den Hyphen gegeben und bei 50°C für zwei Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz lediglich in Puffer ohne Proteinase K inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und mit den jeweiligen Antikörpern nach Immunfluoreszenzprotokoll gefärbt.

Tabelle 42: Proteinase K-Puffer.

50 mM TRIS-HCl, pH 7,5	0,785 g
5 mM CaCl <sub>2</sub>	0,056 g
0,5 % SDS	0,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml

### 5.3. Germination AB90-E8 und L10-1

Für diesen Versuch wurden *A. fumigatus* Af293 Sporen in einer 24-Well Platte auf Deckgläsern in RPMI 1640 (H) ausgesät und für fünf Stunden in 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Hyphen fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung nach Protokoll durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden der Galaktomannan-spezifische Antikörper L10-1 (Überstand) und AB90-E8 (1 µg/ml in PBS) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde für L10-1 der Ziege-anti-Maus IgM Cy3 (5 µg/ml, Dianova) und für AB90-E8 der Ziege-anti-Maus IgG Fc Alexa Fluor 488 (5 µg/ml, Dianova) eingesetzt. Fotos wurden im konfokalen Mikroskop aufgenommen (LSM 880, Carl Zeiss).

### 5.4. Antikörper-Hyphen-Inhibitionsversuch

Um zu überprüfen, ob Antikörper einen inhibitorischen Effekt auf das Hyphenwachstum haben, wurden jeweils  $3 \times 10^4$  *A. fumigatus* D141 Sporen in Wells einer *Life Cell Imaging*-Kammer (µ-Slide 8-Well; Ibidi) in RPMI 1640 (H) ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach circa sechs Stunden waren kurze Hyphen gewachsen. Nun konnten Fotos im konfokalen Mikroskop (LSM 880, Carl Zeiss) aufgenommen werden, um die Länge der Hyphen zum Startzeitpunkt zu ermitteln. Anschließend wurden zwei verschiedenen Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg/ml in die Kammern gegeben. Die Proben wurden für zwei Stunden weiter in 37°C inkubiert und anschließend erneut Fotos aufgenommen. Daraufhin konnten die Längen der Hyphen mithilfe der ZEN Mikroskopie-Software (Carl Zeiss) ausgemessen werden und mittels Student's *t*-test statistisch ausgewertet werden.

### 5.5. Kultivierung von J774-Makrophagen

Zellen der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 wurden stets in RPMI 1640 + 5 % FCS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Umsetzen der Zellen wurde das alte Medium abgenommen und die Zellkulturschale (TPP, 13 cm Durchmesser) zunächst einmal mit PBS gespült. Danach wurden 3 ml Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) auf die Zellen pipettiert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden anschließend 4 ml frisches RPMI 1640 + 5 % FCS hinzugegeben und die Zellen mit einer 10 ml-Pipette vom Boden der Zellkulturschale abgespült. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml frischem Medium aufgenommen und gegebenenfalls mit

einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit Medium verdünnt (1:20-1:50, je nach Zellkonzentration) und anschließend zum gleichen Teil mit Trypanblau (Carl Roth) versetzt und auf die Zählkammer aufgebracht. Nach Auszählen von vier großen Eckquadraten wurde der Mittelwert der Zellen berechnet und anhand folgender Formel konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden:

Mittelwert ausgezählter Zellen \* 2 \* Verdünnungsfaktor \* 10.000 = X Zellen/ml

Nach der Ermittlung der Zellzahl pro ml wurden für die jeweiligen Versuche entsprechend viele Zellen in die Mikrotiterplatten oder Petrischalen eingesetzt.

### **5.6. Herstellung von Makrophagen-Überstand**

Für die Herstellung von Makrophagen-Überstand wurde die murine Zelllinie J774 verwendet. Diese wurde in RPMI 1640 + 5 % FCS kultiviert. Für den Infektionsversuch wurden  $5 \times 10^6$  J774-Zellen in einer Zellkulturpetrischale (TPP) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, sodass ein gleichmäßiger Zellrasen entstand. Am nächsten Tag wurde das Medium von der Petrischale abgenommen und 20 ml neues RPMI 1640 + 5 % FCS hinzugegeben. Nun wurden  $1 \times 10^8$  Sporen des *A. fumigatus* Stammes D141 in die Petrischale gegeben und in 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach sieben Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter inkubiert. Nach 16 Stunden wurde der Überstand abgenommen und bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **5.7. Isolierung von murinen Knochenmarkszellen**

Zur Isolierung von murinen Knochenmarkszellen wurden C57-BI-Mäuse der PBS-Kontrollgruppe euthanasiert und Femur und Tibia frei präpariert. Die Knochen wurden nach kurzem Eintauchen in 70 % Ethanol mit Minimalverlust an den Enden gekappt und mit je 10 ml *Hanks' Salt Solution* (HBSS) durchgespült. Die Suspension wurde in einer 50 ml Röhre aufgefangen und vorsichtig resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen für zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml HBSS resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 5.8. Isolierung von murinen neutrophilen Granulozyten

Aus den in 5.7 gewonnenen Knochenmarkszellen wurden PMN mit dem *EasySep Mouse Neutrophil Enrichment Kit* (StemCell) nach Herstelleranweisung isoliert.

Hierzu wurden die Knochenmarkszellen in 1 ml HBSS resuspendiert und 50  $\mu$ l Rattenserum hinzugegeben. Der Ansatz wurde nun in eine 5 ml Röhre mit Rundboden überführt und 50  $\mu$ l *Enrichment Cocktail* hinein pipettiert. Nach kurzem Mischen und 15-minütiger Inkubation bei 2-8°C wurden die Zellen gewaschen. Dafür wurde das Röhrchen mit HBSS aufgefüllt und mit 300 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml HBSS resuspendiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l *Biotin Selection Cocktail* hinzugegeben, mit den Zellen gemischt und für 15 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Nun konnten 150  $\mu$ l *Magnetic Particles* zum Ansatz pipettiert und für zehn Minuten bei 2-8°C inkubiert werden. Nach dieser Inkubation wurde das Röhrchen auf 2,5 ml mit HBSS aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Das Röhrchen wurde in einer sterilen Werkbank bei RT ohne Deckel für drei Minuten in den Magneten gestellt. Dann konnte der Inhalt durch vorsichtiges Abkippen in ein neues Gefäß überführt werden und die Zellen in folgenden Versuchen direkt eingesetzt werden.

### 5.9. Infektionsversuch mit *A. fumigatus* und neutrophilen Granulozyten

Für den Infektionsversuch wurden zunächst  $7 \times 10^4$  Sporen des GFP-exprimierenden Stammes *A. fumigatus* D141 Mito GFP in einer 24-Well Platte auf runden Deckgläsern in Sabouraud-Medium ausgesät und in 37°C vorgezogen bis kurze Hyphen gewachsen waren. Nun wurden die Hyphen mit dem Antikörper AB90-E8 (1  $\mu$ g/ml) für eine Stunde in RPMI 1640 vorinkubiert. Die in 5.8 isolierten PMN wurden für 30 Minuten bei 37°C mit *Cell Tracker Blue* (Thermo Fisher Scientific, 1:1000 in RPMI 1640) inkubiert. Anschließend wurden je  $5,5 \times 10^5$  PMN zu den Hyphen gegeben. Zusätzlich wurden 5 % Mausserum und 10 % Makrophagen-Überstand (siehe 5.6) hinzugegeben. Nach fünfstündiger Inkubation in 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Ansätze für fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen. Nun wurden die Präparate mit 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS permeabilisiert, mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus IgG+IgM Cy 3 (7,5  $\mu$ g/ml, Dianova) gefärbt. Fotos wurden im konfokalen Mikroskop aufgenommen (LSM 880, Carl Zeiss).

### 5.10. FITC-Markierung Aleuriokonidien

Für die Markierung der AC mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) wurde zunächst FITC in der Konzentration 0,1 mg/ml in 0,1 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6 angesetzt. Nun wurde die AC-Suspension bei 10.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die AC wurden in 1 ml der FITC-Lösung resuspendiert und über Nacht auf einem rotierenden Tisch bei 8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die AC erneut bei 10.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, die FITC-Lösung abgenommen und die Konidien wurden mehrmals mit PBS gewaschen. Die FITC-markierten AC wurden in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> aufgenommen und anschließend mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems) auf grüne Fluoreszenz kontrolliert.

### 5.11. Phagozytose von Aleuriokonidien

J774-Zellen wurden für diesen Versuch auf Deckgläsern ausgesät, sodass über Nacht ein möglichst konfluenter Zellrasen entstand. Die Deckgläser wurden in eine 24-Well Platte überführt, mit 1 ml frischem RPMI 1640 + 5 % FCS versetzt und mit FITC-markierten AC infiziert (MOI: eine AC pro zwei Makrophagen). Die Inkubation wurde in 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> fortgesetzt. Nach einer, drei und fünf Stunden wurden die Proben fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und mit dem anti-Galaktomannan Antikörper L10-1 gefärbt. Nach Inkubation mit L10-1 wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus IgG+IgM-Cy 3 (7,5 µg/ml, Dianova) inkubiert. Die Proben wurden erneut dreimal in PBS gewaschen, mit *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories) eingedeckt und im konfokalen Mikroskop (LSM 880, Carl Zeiss) betrachtet und fotografiert. Zur Auswertung wurden alle grün- und rotfluoreszierenden AC ausgezählt. Da die Zellwand der J774-Zellen für den Antikörper L10-1 nicht durchlässig ist, war davon auszugehen, dass phagozytierte AC keine rote Fluoreszenz aufwiesen. Rotfluoreszierende AC lagen somit im extrazellulären Raum. So konnte die Anzahl an extra- und intrazellulären AC bestimmt werden.

### 5.12. Einfluss von Laminarin und Mannan auf die Phagozytose

Um zu überprüfen, ob die vorausgegangene Sättigung des Dectin-1-Rezeptors mit  $\beta$ -1-3-Glukan und des Mannose-Rezeptors durch Mannan einen Einfluss auf die Phagozytoserate der AC hat, wurden J774-Zellen zunächst auf Deckgläsern angezogen, sodass sie einen gleichmäßigen Zellrasen bildeten. Nun wurden die Deckgläser in eine 24-Well Platte überführt und frisches Zellkulturmedium hinzugefügt. Laminarin (Sigma-Aldrich), ein lösliches  $\beta$ -1-3-Glukan, wurde in der Endkonzentration 100  $\mu$ g/ml eingesetzt und Mannan (Sigma-Aldrich) wurde in der Endkonzentration 300  $\mu$ g/ml eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle nur mit Zellkulturmedium mitgeführt. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angesetzt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Anschließend wurden FITC-markierte AC hinzugegeben und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert (MOI: eine AC pro zwei Makrophagen). Nach einer Stunde wurden alle Proben fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Um zu evaluieren, welche AC intra-beziehungsweise extrazellulär lagen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Proben mit L10-1 nach Protokoll durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde der Ziege-anti-Maus IgG+IgM Cy 3 (7,5  $\mu$ g/ml, Dianova) verwendet. Fotos wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM 880 (Carl Zeiss) aufgenommen.

### 5.13. Nachweis von angesäuerten Phagolysosomen

Für diesen Versuch wurden J774-Zellen in eine *Life Cell Imaging*-Kammer (35 mm  $\mu$ -Dish, Ibidi) in RPMI 1640 + 5% FCS ausgesät, sodass ein konfluenten Zellrasen entstand. Für Live-Mikroskopie wurde das Medium zusätzlich mit 25 mM HEPES versetzt. Nun wurde der *LysoTracker* DND-26 (Thermo Fisher Scientific) in der Endkonzentration 1  $\mu$ M zu den Zellen gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit AC (MOI: eine AC pro zwei Makrophagen) infiziert. Die Probe wurde nun in einer 37°C-Inkubationskammer, die an das konfokale Mikroskop angeschlossen war, weiter inkubiert und es wurden Fotos zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen.

### 5.14. Bestimmung des Durchmessers von Aleuriokonidien

Um den Durchmesser der Konidien zu bestimmen, wurden ruhende AC und AC, die sechs Stunden in Sabouraud-Medium bei 37°C inkubiert worden waren, mit einem 40x Objektiv eines DM750 Mikroskop (Leica Microsystems) betrachtet. Fotos wurden mit einer ICC50 W Kamera (Leica Microsystems) aufgenommen. Der Durchmesser der Konidienkörper wurde mit dem Programm *Leica Application Suite V4* ausgemessen.

### 5.15. Bestimmung der Auskeimungsgeschwindigkeit von Aleuriokonidien

#### 5.15.1. Aleuriokonidien in drei verschiedenen Medien

Um zu untersuchen, wie sich die Auskeimungsgeschwindigkeit in verschiedenen Medien verhält, wurden AC in einer 24-Well Platte in Sabouraud-Medium, RPMI 1640 + 5 % FCS sowie AMM ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach einer, vier und acht Stunden wurden Fotos mit einer Canon EOS 600 D, die auf ein Leica DM IL LED (Leica Microsystems) aufgeschraubt war, aufgenommen. Die Auskeimungsstadien wurden in ruhende Konidien, geschwollene Konidien, Keimlinge und Hyphen unterteilt und drei Gruppen mit je 60 Ereignissen ausgezählt. Als angeschwollene Konidien wurden jene gezählt, die eindeutig an Größe zugenommen hatten, aber noch keinen Keimschlauch ausgebildet hatten. Als Keimling wurden Hyphenansätze unter 20 µm definiert. Alle Hyphenansätze über 20 µm wurde als Hyphe definiert (Abbildung 3).

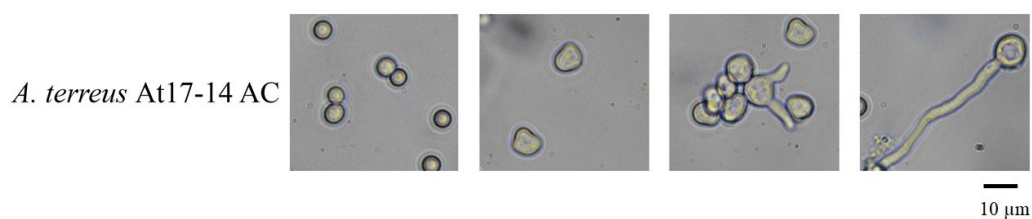


Abbildung 3: Beispielbild der Auskeimungsstadien von AC. Von links nach rechts: ruhende AC, angeschwollene AC, Keimling, Hyphe.



### 5.15.2. Bestimmung der Auskeimungsgeschwindigkeit

Für den Vergleich der Auskeimungsgeschwindigkeit wurden  $4 \times 10^5$  AC sowie PC von *A. terreus* At17-14, *A. terreus* SBUG844 und *A. fumigatus* D141 in eine 24-Well Platte in je 1 ml drei verschiedener Medien ausgesät und bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl 37%igem Formaldehyd wurden die Proben jeweils nach einer, dreieinhalb, sieben und neun Stunden fixiert. Die Proben wurden im DM IL LED (Leica Microsystems) Mikroskop betrachtet und Bilder wurden mit einer Canon EOS 600 D aufgenommen. Die Auskeimungsstadien wurden in ruhende Konidien, geschwollene Konidien, Keimlinge und Hyphen unterteilt (siehe Abbildung 3) und je drei Gruppen mit 100 Ereignissen ausgezählt.

### 5.16. Austrocknungsversuch

Um AC und PC von *A. terreus* At17-14 und *A. fumigatus* D141 auszutrocknen, wurden je 4 µl einer Sporensuspension in eine *Life-Cell Imaging*-Kammer (35 mm µ-Dish, Ibidi) gegeben und mit einer Pipettenspitze verteilt. Die Kammer wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde je 2 ml Sabouraud-Medium in alle Wells pipettiert. Zusätzlich wurden Sporen derselben Sporensuspensionen, die nicht ausgetrocknet worden waren, in *Life Cell Imaging*-Kammern gegeben und ebenfalls mit Medium aufgefüllt. Nun wurden die Sporen bei 37°C inkubiert. Nach 14 Stunden wurde die Proben mit 100 µl 37%igem Formaldehyd fixiert. Die Proben wurden mit einem 10x Objektiv im DM IL LED (Leica Microsystems) betrachtet und mit einer Canon EOS 600 D Kamera fotografiert.

### 5.17. Auskeimung im sauren pH

Zunächst wurde für diesen Versuch AMM hergestellt und der pH mit HCl auf 5,0 eingestellt. Der normale pH-Wert von AMM liegt bei 6,8. Nun wurden AC sowie PC von *A. terreus* At17-14 und *A. fumigatus* Af293 in AMM, pH 5,0 und AMM, pH 6,8 ausgesät und bei 37°C inkubiert. Die AC wurden nach sieben Stunden und die PC nach 14 Stunden fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend im DM IL LED Mikroskop betrachtet und mit einer Canon 600EOS D Kamera fotografiert.

### 5.18. Überleben der Aleuriokonidien in Makrophagen

J774-Zellen wurden über Nacht in einer 24-Well Platte auf Deckgläsern so ausgesät, dass am nächsten Tag ein konfluenter Zellrasen entstanden war. Nun wurden die Zellen mit FITC-markierten AC infiziert (MOI: eine AC pro zwei Makrophagen) und für eine Stunde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch neues Medium ersetzt, das zusätzlich das Antimykotikum Itraconazol (Sigma, eingesetzte Konzentration: 0,05 µg/ml) beinhaltete, um extrazelluläre Konidien abzutöten. Diese Konzentration war in einem Vorversuch als geeignet identifiziert worden. Nach sechs Stunden wurde eine Probe fünf Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Die restlichen Proben wurden insgesamt für 24 Stunden inkubiert und anschließend fixiert. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit CFW (3,5 µg/ml in PBS) wurde nach Protokoll durchgeführt.

### 5.19. TNF $\alpha$ -Messung

Für die Messung von TNF $\alpha$  wurden zunächst J774-Zellen in Wells einer 96-Well Platte in RPMI 1640 + 5 % FCS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> angezogen, bis ein gleichmäßiger Zellrasen entstanden war. Aus allen Wells wurden 50 µl des alten Mediums entfernt, sodass 120 µl in den Wells verblieben.

Sporensuspensionen von AC und PC wurden abzentrifugiert (10.000 x g) und der Überstand abgenommen. Nun konnten die entsprechenden Mengen AC (MOI: zwei AC pro Makrophagen) und PC (MOI: zehn PC pro Makrophagen) in einem Volumen von 30 µl RPMI 1640 resuspendiert und zu den Zellen gegeben werden. Zusätzlich wurden 70 µl frisches Medium in jedes Well pipettiert. In Kontroll-Wells mit J774-Zellen ohne Sporen wurden je 100 µl frisches Medium gegeben. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angelegt.

Für den Versuch der TNF $\alpha$ -Messung unter Einfluss von Laminarin wurde dieses in der Konzentration 1 mg/ml in RPMI 1640 (H) gelöst und anschließend in der Endkonzentration 100 µg/ml eingesetzt. Die Sporensuspension der AC wurden abzentrifugiert (10.000 x g), der Überstand abgenommen und in einem Volumen von 20 µl RPMI 1640 resuspendiert und zu den jeweiligen Proben gegeben (MOI: zwei AC pro Makrophagen). Alle Proben wurden im Dreifachansatz angelegt. Die Zusammensetzung der Proben dieses Versuchs ist Tabelle 43 zu entnehmen.

Tabelle 43: Zusammensetzung der Proben für die Messung von TNF $\alpha$  mit und ohne Laminarin.

	RPMI 1640 + 5 % FCS	AC in RPMI 1640	Laminarin 1 mg/ml in RPMI 1640(H)
Probe 1	100 $\mu$ l	-	-
Probe 2	80 $\mu$ l	20 $\mu$ l	-
Probe 3	75,6 $\mu$ l	-	24,4 $\mu$ l
Probe 4	55,6 $\mu$ l	20 $\mu$ l	24,4 $\mu$ l

Der ELISA *MAXTM Deluxe Set Mouse TNF- $\alpha$*  (BioLegend) zur Ermittlung der TNF $\alpha$ -Konzentration wurde im Labor der AG Löffler der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg durch Lea Strobel durchgeführt. Es wurden jeweils 25  $\mu$ l Probe sowie eine 1:10 Verdünnung der Probe im Dreifachansatz nach Herstelleranweisung eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente eine Avidin-HRP-konjugierter Antikörper. Als Entwicklungslösung wurde TMB-Substrat verwendet. Die Absorption wurde bei 450 und 570 nm in einem *NanoQuant infinite M200 pro* Mikroplatten-Reader (Tecan) ermittelt.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Charakterisierung der Aleuriokonidien von *Aspergillus terreus*

*A. terreus* besitzt die Besonderheit neben PC zusätzlich AC bilden zu können. Diese werden im Gegensatz zu PC nicht bei Kontakt mit Luft, sondern während des Wachstums in flüssigen Umweltbedingungen direkt an der Hyphenoberfläche gebildet. Ziel dieses Teils der Arbeit war es, AC eines klinischen Isolates zu charakterisieren. Insbesondere die Interaktion der AC mit murinen Makrophagen war hierbei von großem Interesse und sollte näher untersucht werden.

Der Stamm *A. terreus* At17-14 wurde aus der Niere eines Hundes isoliert, der an einer systemischen Mykose verstarb. Dieser Stamm wurde in der DSMZ hinterlegt und erhielt die Stammmnummer DSM 113823. Die *A. terreus* Stämme T9 und SBUG844 wurden als Vergleichsstämme herangezogen.

#### 1.1. Immunfluoreszenzfärbungen mit 2G8

Für die Immunfluoreszenzfärbung mit dem  $\beta$ -Glukan-spezifischen Antikörper 2G8 wurden ruhende AC sowie AC, die für fünf Stunden in RPMI 1640 (H) bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert worden waren, gefärbt. Das Chitin der Zellwand wurde zusätzlich durch CFW gefärbt. In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass ruhende AC, die bereits von den Hyphen gelöst waren, eine punkthafte oder ringförmige Färbung mit dem Antikörper 2G8 aufwiesen. AC, die hingegen noch fest an den Hyphen verankert und noch nicht abgelöst waren, wiesen auf ihrer gesamten Oberfläche keine Färbung mit 2G8 auf. Somit ist auf diesen AC noch kein  $\beta$ -Glukan für den Antikörper zugänglich. Die Färbungen von ruhenden, bereits abgelösten, AC konzentrierten sich teilweise auf einen Pol der Konidie, welcher eventuell die Kontaktstelle zur Hyphe, an der die Konidie gewachsen war, darstellt. Bereits ausgekeimte AC waren hingegen deutlich positiv. Entweder beschränkte sich die Färbung hierbei auf kragenähnliche Strukturen in dem Bereich zwischen Konidie und daraus entstandenen Keimschlauch oder sie zeigten eine ungleichmäßige Färbung über die gesamte Konidienoberfläche.

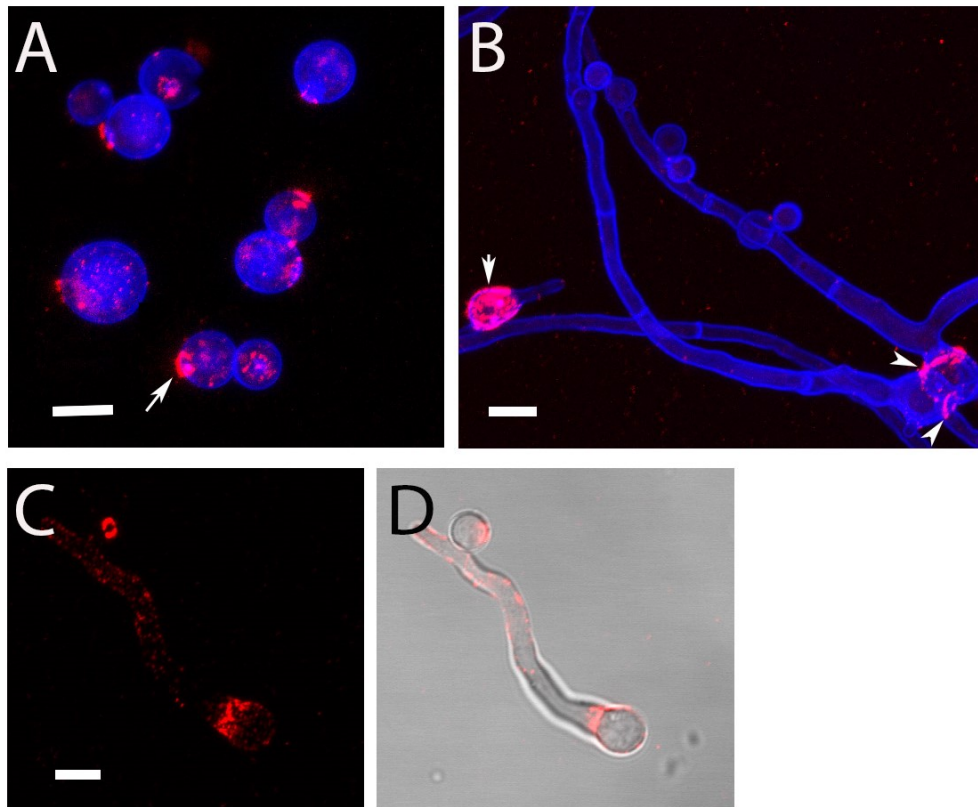


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden AC und in RPMI 1640 (H) inkubierten AC mit 2G8 (rot) und CFW (blau). **A:** Ruhende AC weisen eine punkthafte, unregelmäßige Färbung auf. Der Pfeil zeigt eine ringförmige  $\beta$ -Glukan-positive Struktur. **B:** AC, die noch nicht von den Hyphen gelöst sind, weisen keine Färbung mit 2G8 auf. Der Pfeil zeigt eine AC, die bereits ausgekeimt ist und die über ihre ganze Oberfläche  $\beta$ -Glukan-positiv ist. Die Pfeilspitzen zeigen eine  $\beta$ -Glukan-Färbung des proximalen Teils des entstehenden Keimschlauchs. **C:** Eine ausgekeimte AC weist eine punkthafte, kragenähnliche Färbung am Übergang zwischen Konidienkörper und Keimschlauch auf. **D:** Überlagerung mit Durchlicht von C. Die Maßstäbe in A-C repräsentieren 5  $\mu$ m.

## 1.2. Immunfluoreszenzfärbungen mit L10-1

Galaktomannan ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus*. Daher sollten auch die AC von *A. terreus* auf die Anwesenheit dieses Polysaccharides untersucht werden. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1 durchgeführt. AC von den *A. terreus* Stämmen At17-14, SBUG844 und T9 wurden hierfür über Nacht in AMM angezogen und am nächsten Tag fixiert. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass AC von At17-14 von L10-1 stark angefärbt wurden. Die Färbung war hierbei homogen über die ganzen Konidienoberfläche verteilt. Insgesamt waren 92,9 % ( $\pm 2.6$  %) der isolierten AC des Stammes At17-14 stark Galaktomannan-positiv. Sich neu bildende AC waren bereits, bevor sie überhaupt im Durchlicht sichtbar wurden, stark Galaktomannan-positiv. Hyphen von At17-14 hingegen wurden teilweise schwächer und unregelmäßiger mit L10-1 angefärbt. Als Nebenbefund fiel noch auf, dass im Bereich der Septen die Hyphen Galaktomannan-negativ waren.

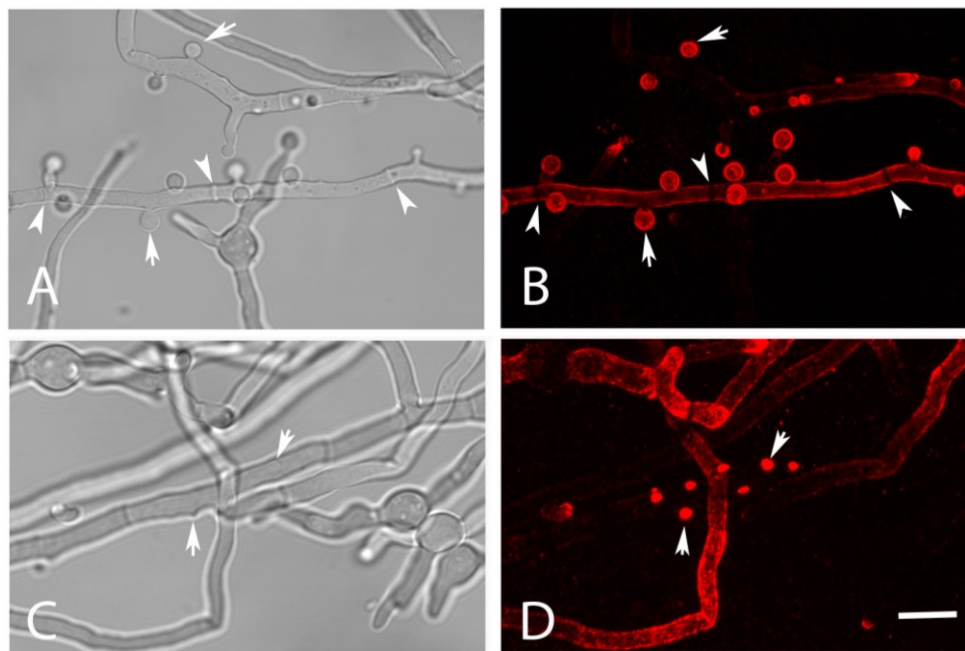


Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung mit L10-1 (rot) von in AMM gewachsenen *A. terreus* At17-14 Hyphen. A+C zeigen die Durchlichtaufnahmen, B+D zeigen den roten Fluoreszenzkanal. A/B: Reife AC sind stark Galaktomannan-positiv (Pfeile). Im Bereich der Septen sind die Hyphen Galaktomannan-negativ (Pfeilspitzen). C/D: Neu entstehende AC sind im roten Fluoreszenzkanal bereits deutlich sichtbar (Pfeile in D). Die Hyphen sind unregelmäßiger und weniger stark durch L10-1 gefärbt. Der Maßstab in D repräsentiert 10  $\mu\text{m}$  und ist für alle Bilder gültig.

Zusätzlich wurde eine Färbung von ruhenden AC und PC von *A. terreus* At17-14 angefertigt. In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich, dass PC im Gegensatz zu AC nur sehr schwach oder gar nicht mit L10-1 angefärbt wurden (Abbildung 6).

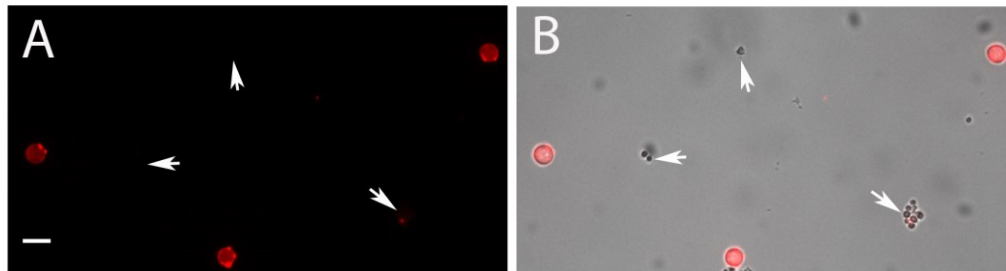


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden AC und PC des *A. terreus* Stammes At17-14 mit L10-1. **A** zeigt die Färbung durch L10-1 (rot). **B** zeigt die Überlagerung des Durchlichts mit dem roten Fluoreszenzkanal. AC sind über ihre ganze Oberfläche Galaktomannan-positiv (rot). PC sind weitestgehend negativ (Pfeile). Der Maßstab in **A** repräsentiert 5 µm und ist für alle Bilder gültig.

Auch die AC der Vergleichsstämme *A. terreus* SBUG844 und T9 waren stark Galaktomannan-positiv (Abbildung 7). Die Hyphen zeigten auch hier eine schwächere und ungleichmäßigere Färbung mit L10-1. Durch CFW wurde das Chitin der Hyphenzellwand angefärbt.

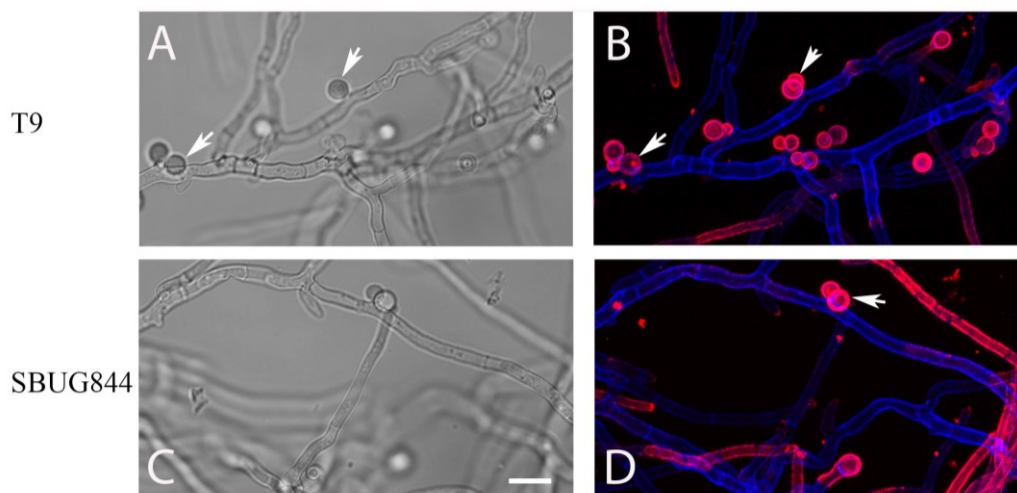


Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung von Hyphen mit AC der Stämme *A. terreus* SBUG844 und *A. terreus* T9 mit L10-1 (rot) und CFW (blau). **A+C** zeigen die Durchlichtaufnahmen. **B+D** zeigen die Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals. AC sind bei diesen zwei Stämmen ebenfalls stark Galaktomannan-positiv (Pfeile). Der Maßstab in **C** repräsentiert 10 µm und ist für alle Bilder gültig.

In einer weiteren Immunfluoreszenzfärbung von AC von At17-14, die für sechs und neun Stunden in AMM inkubiert wurden, ist zu erkennen, dass AC bei der Auskeimung mehrere Keimschläuche bilden. Auch konnte beobachtet werden, dass die Anfangsbereiche der Hyphen eine schwächere L10-1 Färbung aufwiesen als der Rest der Hyphen. Bereits nach neun Stunden wurde ein verzweigtes Hyphennetz gebildet.

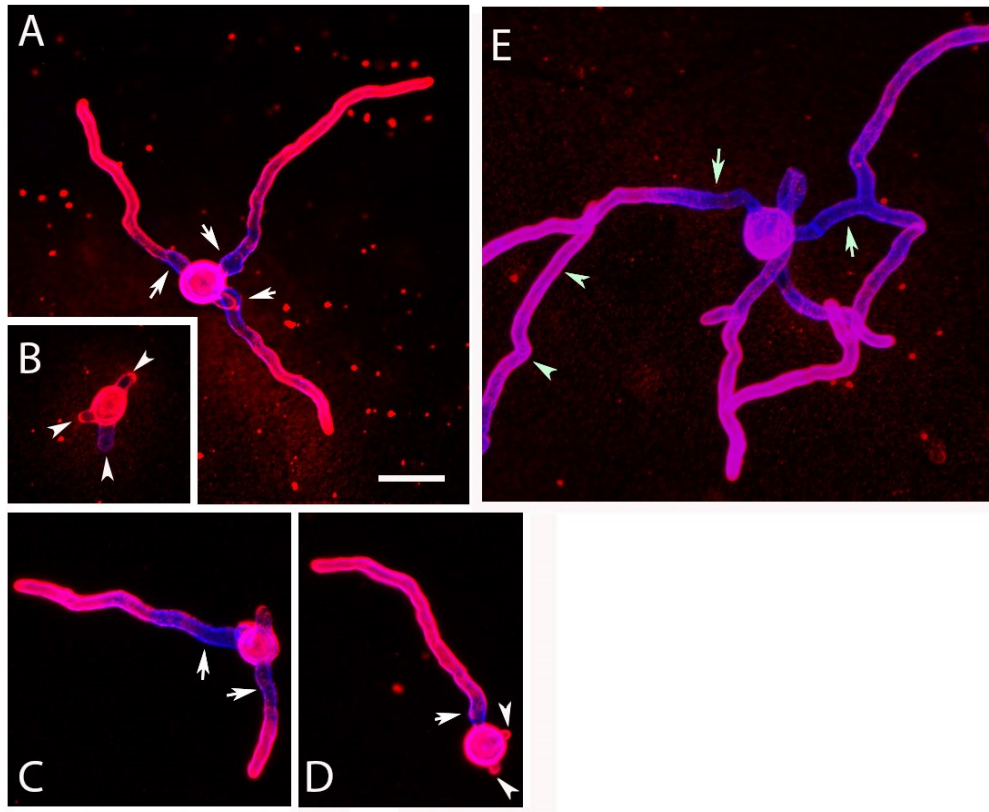


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung mit L10-1 (rot) von ausgekeimten AC nach sechs (A-D) beziehungsweise neun (E) Stunden in AMM, CFW (blau). Bereiche der Hyphen proximal der Konidienkörper weisen eine schwächere L10-1 Färbung auf (Pfeile in A, C, D, E). Keimschläuche entstehen an mehreren Seiten der AC (Pfeilspitzen in B+D). Die Pfeilspitzen in E zeigen eine Hyphe, die nicht Teil des Hyphengeflechts ist, welches aus der zentralen AC entstanden ist. Der Maßstab in A repräsentiert 10 µm und ist für alle Bilder gültig.



### 1.3. Messung des Durchmessers ruhender und auskeimender Aleuriokonidien

Im Lebenszyklus von *Aspergillus* stellt das Anschwellen der PC einen wichtigen Schritt im Auskeimungsprozess dar. Um die Auskeimung von AC weiter zu untersuchen, wurde der Durchmesser des Konidienkörpers ruhender sowie AC, die nach sechs Stunden in Sabouraud-Medium bei 37°C bereits ausgekeimt waren, ausgemessen. Es zeigte sich, dass die AC beim Auskeimen etwa ein Drittel in ihrem Durchmesser zunahmen (Abbildung 9). Im Vergleich zu PC, die bei ihrer Auskeimung etwa um das 1,5-3-fache im Durchmesser zunehmen (ROHDE et al., 2002) scheinen AC daher weniger stark isotrop zu wachsen.

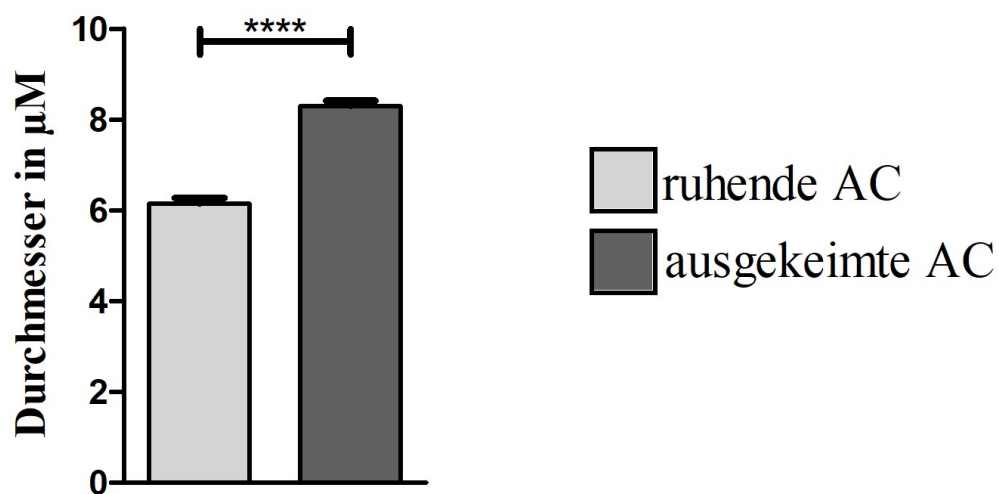


Abbildung 9: Durchmesser der Konidienkörper ruhender und auskeimender AC. Es wurden je drei Gruppen mit je 25 Konidienkörpern ausgemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten Student's *t*-test. \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

### 1.4. Auskeimungsgeschwindigkeit

Die Auskeimungsgeschwindigkeit von AC wurde zunächst in drei Medien verglichen. Anschließend wurden AC und PC von *A. terreus* At17-14, *A. terreus* SBUG844 und *A. fumigatus* D141 in zwei Medien verglichen.

#### 1.4.1. Auskeimungsgeschwindigkeit in drei verschiedenen Medien

Die Auskeimungsgeschwindigkeit der AC wurde zunächst in AMM, Sabouraud-Medium und RPMI 1640 + 5 % FCS (H) verglichen (Abbildung 10). Zur Auswertung wurde zwischen ruhenden Konidien, geschwollenen Konidien, Keimlingen ( $< 20 \mu\text{m}$ ) und Hyphen ( $> 20 \mu\text{m}$ ) unterschieden (siehe III.5.15.1, Abbildung 3). Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die AC in Sabouraud-

Medium am schnellsten auskeimten und bereits nach vier Stunden Keimlinge und kurze Hyphen bildeten. Nach acht Stunden waren 80 % der AC ausgekeimt und hatten Hyphen gebildet. In RPMI 1640 + 5 % FCS (H) war ebenfalls ein schnelles Wachstum erkennbar. Auch hier waren nach vier Stunden neben vielen geschwollenen Konidien auch bereits Keimlinge und einige kurze Hyphen zu sehen. Nach acht Stunden hatten etwa 73 % der AC Hyphen gebildet. In AMM keimten die AC am langsamsten und unregelmäßigsten aus. Hier waren selbst nach acht Stunden erst circa 30 % zu Hyphen ausgewachsen. Die meisten AC befanden sich zu diesem Zeitpunkt jedoch noch im ruhenden oder angeschwollenen Stadium (62 %).

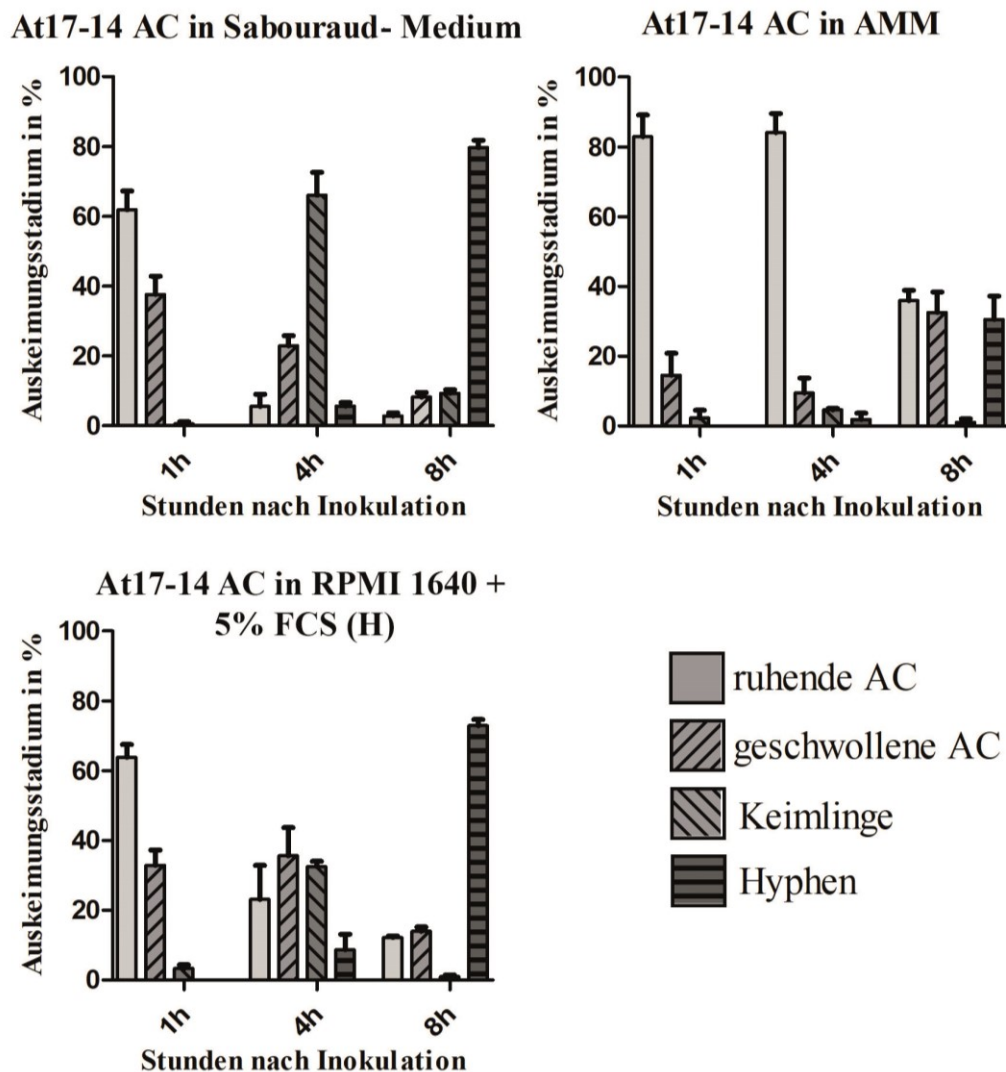


Abbildung 10: Auskeimung von AC in drei verschiedenen Medien. Es wurden drei Gruppen mit je 60 Ereignissen ausgezählt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

#### **1.4.2. Auskeimungsgeschwindigkeit im Vergleich zu phialidischen Konidien**

Da im vorherigen Versuch festgestellt wurde, dass AC in Sabouraud-Medium und RPMI 1640 + 5 % FCS (H) am schnellsten und gleichmäßigsten auskeimten, wurden diese Medien gewählt. Die AC und PC von *A. terreus* At17-14 wurden mit den PC der Stämme *A. terreus* SBUG844 und *A. fumigatus* D141 verglichen (Abbildung 11). Es zeigte sich, dass die AC sogar schneller auskeimten als die PC von *A. fumigatus*. Über 80 % der AC waren nach sieben Stunden sowohl in Sabouraud-Medium als auch RPMI 1640 + 5 % FCS (H) bereits ausgekeimt. Bei den PC von *A. fumigatus* waren zu diesem Zeitpunkt circa 60 % ausgekeimt. Die PC von *A. terreus* hingegen waren selbst nach neun Stunden noch im ruhenden oder angeschwollenen Zustand. In Sabouraud-Medium zeigte sich, dass die PC von *A. terreus* im Vergleich zu RPMI 1640 + 5 % FCS (H) früher anschwellen und teilweise nach neun Stunden Keimlinge gebildet hatten (Abbildung 12). Insgesamt sind PC von *A. terreus* jedoch deutlich langsamer in ihrer Auskeimungsgeschwindigkeit sowohl im Vergleich zu AC von *A. terreus* als auch zu PC von *A. fumigatus*.

## RPMI 1640 + 5% FCS (H)

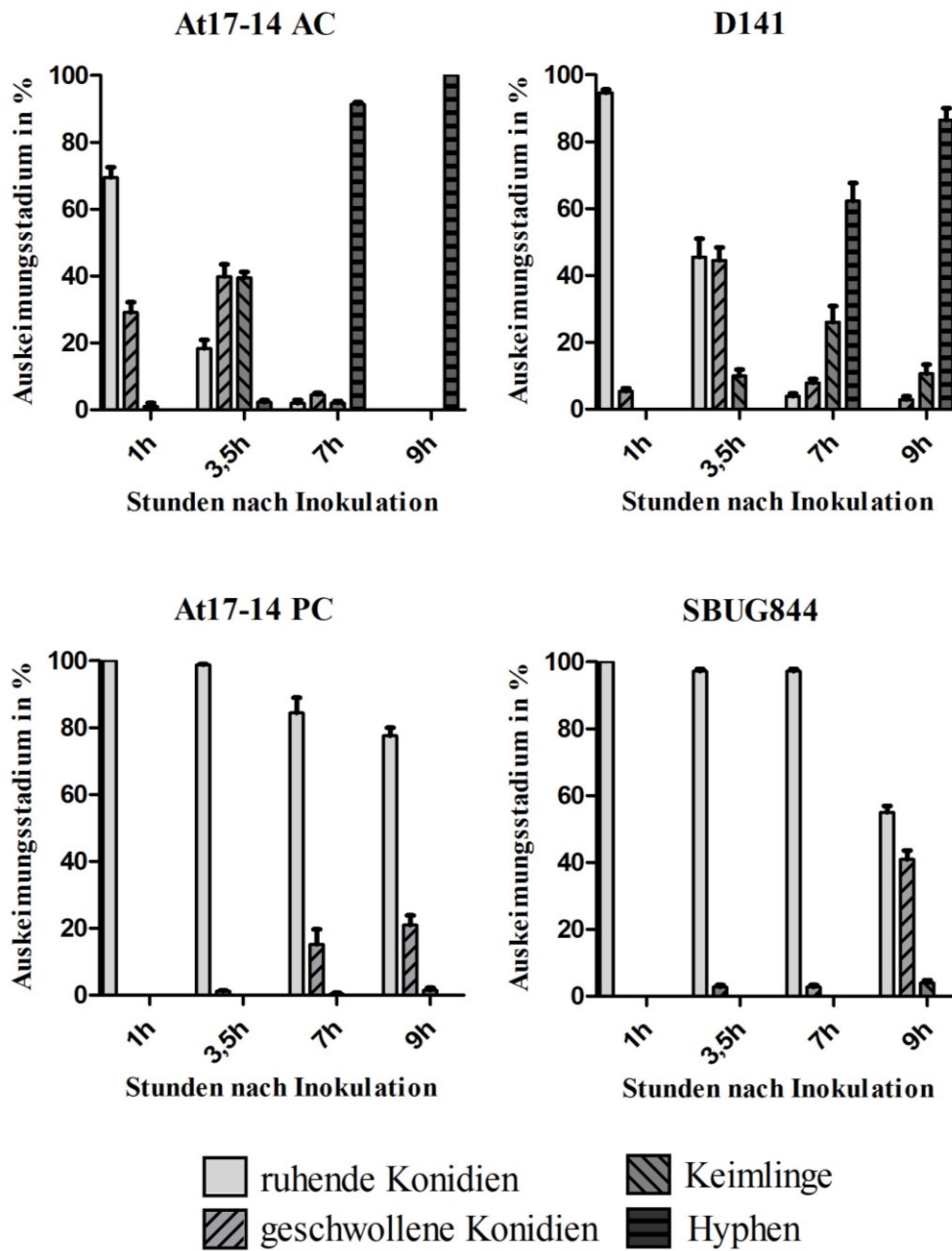


Abbildung 11: Vergleich der Auskeimungsgeschwindigkeit in RPMI 1640 + 5 % FCS (H). Es wurden je drei Gruppen mit je 100 Ereignissen ausgezählt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

## Sabouraud - Medium

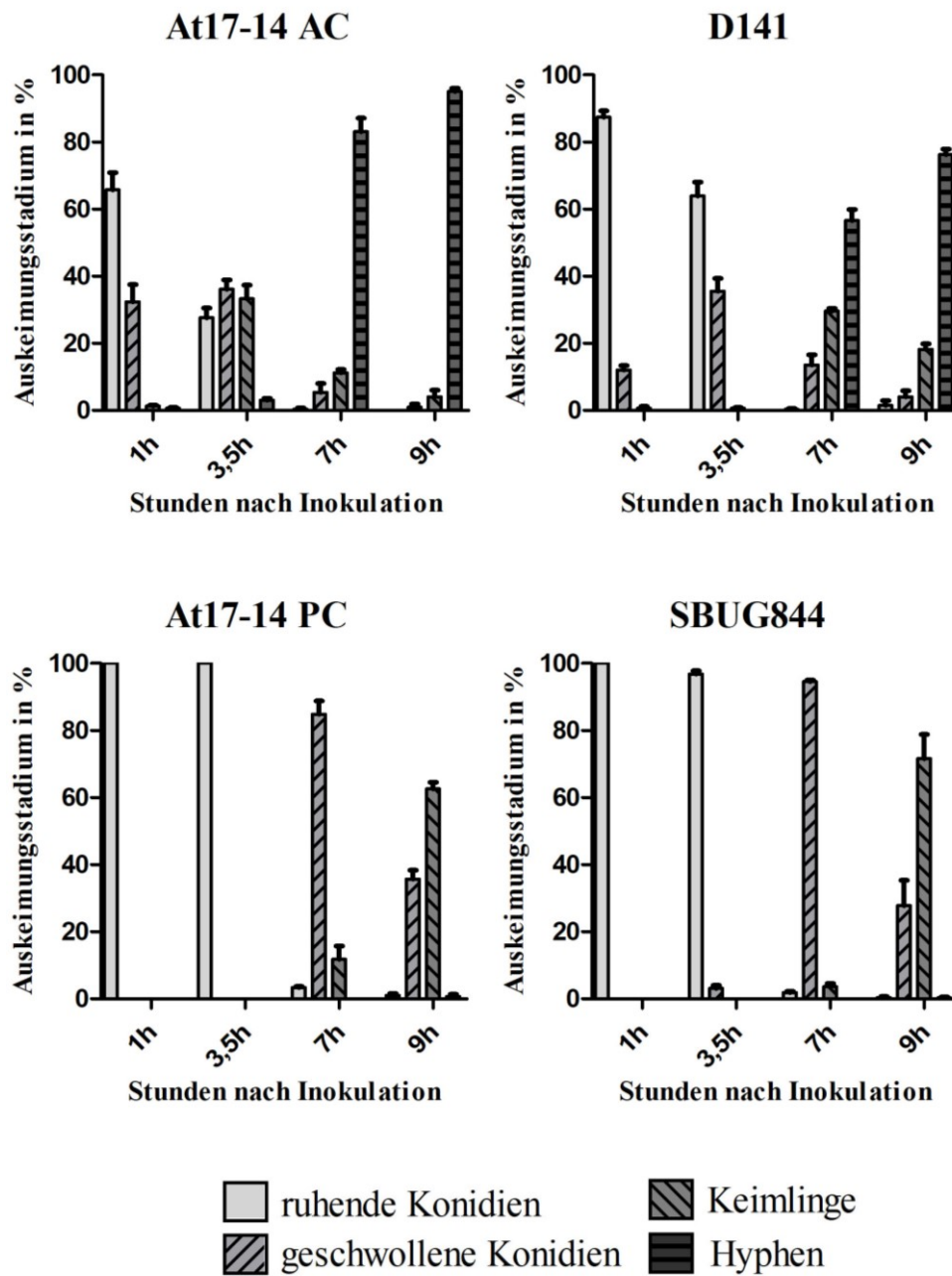


Abbildung 12: Vergleich der Auskeimungsgeschwindigkeit von AC und PC in Sabouraud-Medium. Es wurden je drei Gruppen mit je 100 Ereignissen ausgezählt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

### 1.5. Austrocknungsversuch

Sporen dienen Schimmelpilzen als Überdauerungsform bei schlechten Lebensbedingungen. Um zu evaluieren, ob AC und PC von *A. terreus* sich im Vergleich zu PC von *A. fumigatus* bei einer Austrocknung unterschiedlich verhalten, wurden Sporensuspensionen über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend in Sabouraud-Medium aufgenommen und für 14 Stunden weiter

inkubiert. Im Vergleich zu PC scheinen AC eine Austrocknung nur schlecht zu tolerieren. In vorherigen Versuchen keimten AC in Sabouraud-Medium bereits nach einigen Stunden aus. Nach der Austrocknung der Sporensuspension verblieben die meisten AC auch nach 14 Stunden noch im ruhenden Zustand (Abbildung 13). Der Großteil der PC von *A. terreus* keimte im Gegensatz zu den AC aus. Auffällig hierbei waren jedoch vereinzelte Bereiche zwischen den Hyphen, in denen die Konidien weiterhin im ruhenden Zustand verblieben. PC von *A. fumigatus* keimten gleichmäßig aus und es fanden sich nur vereinzelt ruhende Konidien.

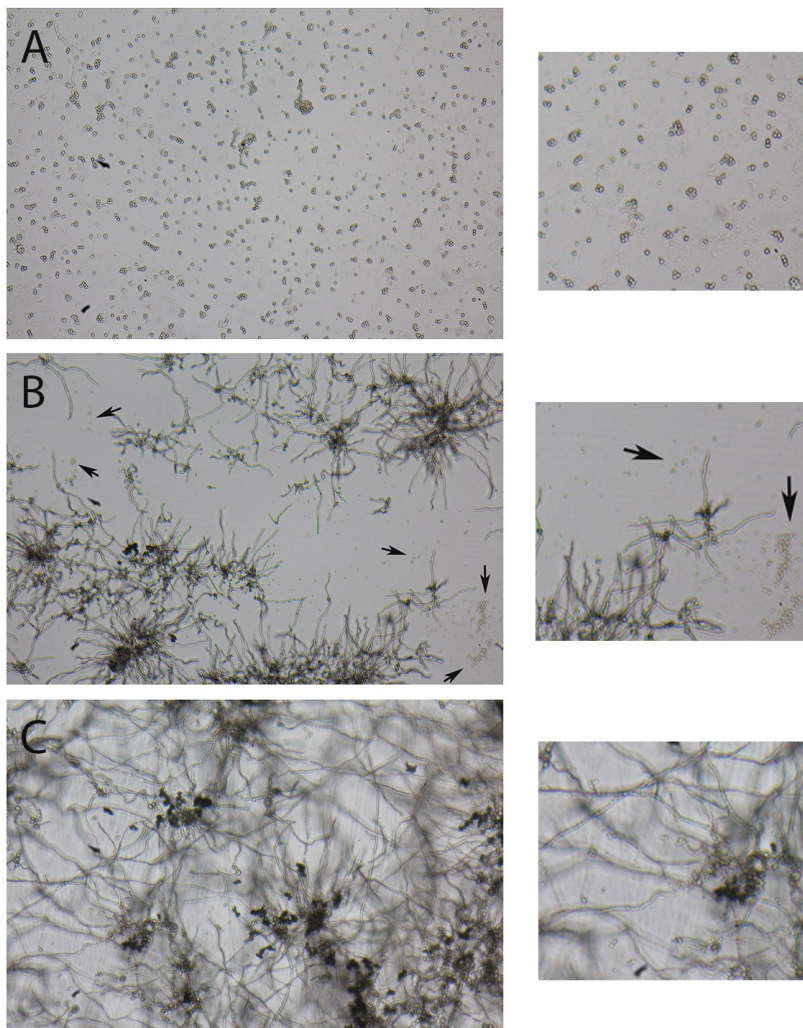


Abbildung 13: Auskeimung von Sporensuspensionen nach Austrocknung. **A:** AC von *A. terreus* **B:** PC von *A. terreus* **C:** PC von *A. fumigatus*. Die Sporensuspensionen wurden über Nacht ausgetrocknet und anschließend in Sabouraud-Medium für 14 Stunden weiter inkubiert. AC verblieben weiterhin im ruhenden Zustand. PC von *A. terreus* keimten größtenteils aus, doch in einigen Bereichen waren weiterhin ruhende PC zu erkennen (Pfeile). PC von *A. fumigatus* keimten gleichmäßig aus.

## 1.6. Phagozytoseversuche mit murinen J774-Makrophagen

### 1.6.1. Bestimmung der Phagozytoserate von Aleuriokonidien

Für PC von *A. terreus* wurde bereits gezeigt, dass sie effizient von Makrophagen phagozytiert werden (SLESIONA et al., 2012). Ob dies auch auf AC von *A. terreus* zutrifft, sollte in diesem Versuch überprüft werden. Hierfür wurden J774-Zellen mit FITC-markierten AC infiziert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer, drei und fünf Stunden wurden die Proben fixiert. Eine L10-1 Färbung diente der Identifizierung extrazellulärer AC. Es zeigte sich, dass auch die AC sehr effizient von J774-Zellen phagozytiert werden. Bereits nach einer Stunde lag der Anteil an phagozytierten AC bei 88 % aller AC. Die Anzahl der phagozytierten AC stieg innerhalb von fünf Stunden auf 95 % an.

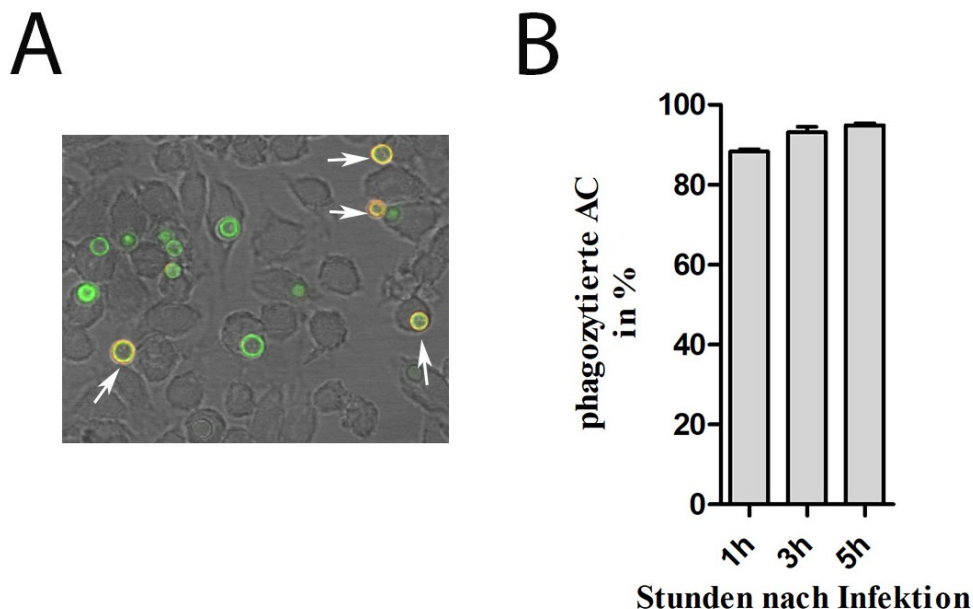


Abbildung 14: Phagozytose-Versuch mit AC von *A. terreus* At17-14 und J774-Zellen. **A:** L10-1 Färbung (rot) extrazellulärer AC (Pfeile). Intrazelluläre AC (grün) werden vom Antikörper nicht gefärbt. Die Gelbfärbung entsteht durch die Überlagerung des roten und grünen Fluoreszenzkanals. **B:** AC werden effizient von J774-Zellen phagozytiert. Nach einer Stunde sind bereits 88 % und nach fünf Stunden 95 % der AC phagozytiert. Es wurden vier Gruppen mit je 100 Ereignissen ausgezählt. Die Standardabweichung ist angegeben.

### 1.6.2. Einfluss von Laminarin und Mannan auf die Phagozytoserate

In der Arbeit von SLESIONA et al. (2012) wurde eine signifikant verminderte Phagozytose von angeschwollenen *A. terreus* PC nach Blockierung des Dectin-1 Rezeptors mit Laminarin und des Mannose Rezeptors mit Mannan beobachtet. Um

zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei der Phagozytose von AC zu beobachten ist, wurden J774-Zellen mit Laminarin und Mannan für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit FITC-markierten AC infiziert. Eine Kontrolle ohne den Zusatz von Laminarin beziehungsweise Mannan wurde ebenfalls angelegt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Proben fixiert. Anschließend wurden die Proben mit L10-1 nach Immunfluoreszenzprotokoll gefärbt, um extrazelluläre AC zu identifizieren. Nach Auszählung der intra- beziehungsweise extrazellulären AC zeigte sich, dass Laminarin keinen Effekt auf die Phagozytoserate der AC hat. Die Zugabe von Mannan ergab eine um 12 % geringere Phagozytoserate, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 15).

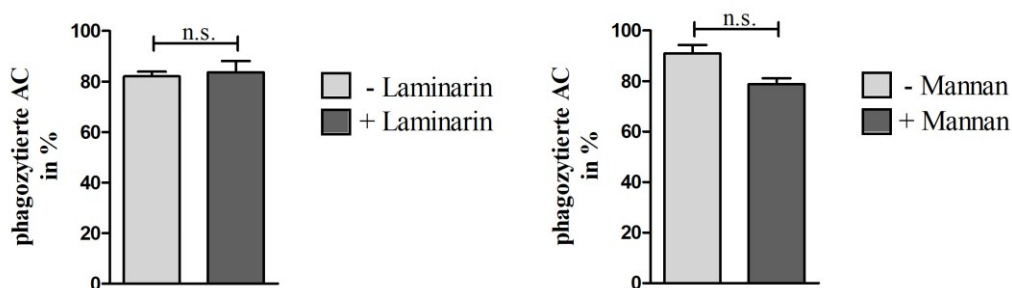


Abbildung 15: Phagozytose von AC unter Einfluss von Laminarin (100 µg/ml) und Mannan (300 µg/ml). Laminarin hat keinen Einfluss auf die Phagozytoserate der AC. Durch Zugabe von Mannan wird die Phagozytose um etwa 12 % gesenkt (n.s. = nicht signifikant).

### 1.7. Untersuchung von $\beta$ -Glukan und Galaktomannan während der Infektion

Um die Verteilung von  $\beta$ -Glukan und Galaktomannan auch während der Infektion zu untersuchen, wurden J774-Zellen mit AC infiziert und für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert und nach Permeabilisierung durch Triton-X100 mit den Antikörpern 2G8 beziehungsweise L10-1 gefärbt. Durch Phalloidin-FITC wurde das filamentöse Aktin der J774-Zellen gefärbt. Mit CFW wurde das Chitin der Hyphenzellwand angefärbt.

Nach sechsständiger Inkubation wurden viele intrazelluläre AC noch im ruhenden Zustand vorgefunden. In Bereichen, in denen wenige J774-Zellen lagen, waren extrazelluläre AC aber bereits ausgekeimt und formten kleine Hyphennetzwerke. Die Internalisierung durch die J774-Zellen verzögert somit die Auskeimung von AC. Phagozytierte AC wiesen weiterhin Galaktomannan auf ihrer Oberfläche auf



(Abbildung 16 A+B). Gleichzeitig konnten man im Zytosol und vereinzelt auch in benachbarten Zellen kleine, Galaktomannan-positive Strukturen erkennen. (Abbildung 16 A, Pfeile). Im konfokalen Mikroskop wurden verschiedene Schnitte eines infizierten Makrophagen aufgenommen (Abbildung 16 C-G), die zeigten, dass sich die Galaktomannan-positiven Strukturen im Zytoplasma der Zelle befanden und sich vor allem unter der zytoplasmatischen Membran ansammelten. Außerhalb dieser Bereiche war keine unspezifische Färbung durch L10-1 zu beobachten. Vergleicht man Abbildung 16 E+H kann man zudem erkennen, dass sich die Galaktomannan-positiven Strukturen außerhalb der Kernmembran befanden. Diese Beobachtungen zeigen, dass das Galaktomannan von der Oberfläche der AC nach Internalisierung durch J774-Zellen freigesetzt wird und sich in den Zellen und sogar in Nachbarzellen verteilt.

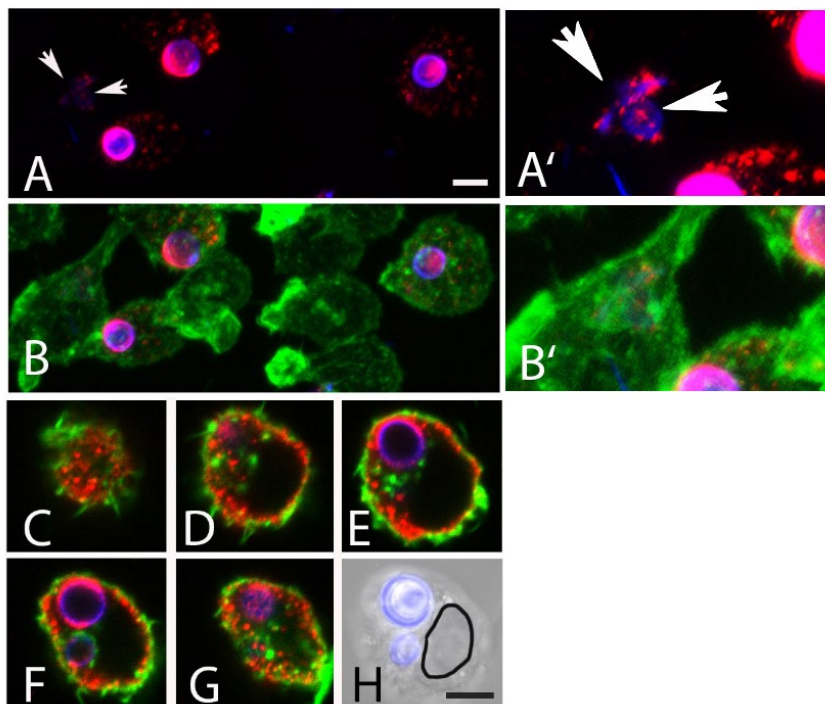


Abbildung 16: Freisetzung von Galaktomannan von internalisierten AC nach sechsständiger Inkubation. Die J774-Zellen sind mit Phalloidin-FITC gefärbt (grün). Die AC sind mit CFW (blau) und L10-1 (rot) gefärbt. **A** zeigt die Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals. **B** zeigt zusätzlich noch den grünen Fluoreszenzkanal. Freigesetzte, Galaktomannan-positive Strukturen findet man vor allem in infizierten Zellen, aber auch in nicht-infizierten Nachbarzellen (Pfeile). **A'+B'** zeigen vergrößerte Ausschnitte. Bei diesen Bildern wurde der Kontrast erhöht, um die Färbung zu verdeutlichen. Bilder **C-G** zeigen verschiedene Schnitte durch einen infizierten Makrophagen. **H** zeigt eine Überlagerung des Durchlicht- und blauen Fluoreszenzkanals. Die Umrandung der Kernmembran wurde eingezeichnet. Die Maßstäbe in **A** und **H** repräsentieren 5  $\mu$ m und sind für Bilder **A+B** sowie **C-H** gültig.

Nach sechsstündiger Infektion war  $\beta$ -Glukan auf einigen, aber nicht allen, internalisierten AC erkennbar. Insbesondere AC, die bereits Keimschläuche gebildet hatten, wiesen eine starke  $\beta$ -Glukan-Färbung auf. Eine Freisetzung von  $\beta$ -Glukan konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 17).

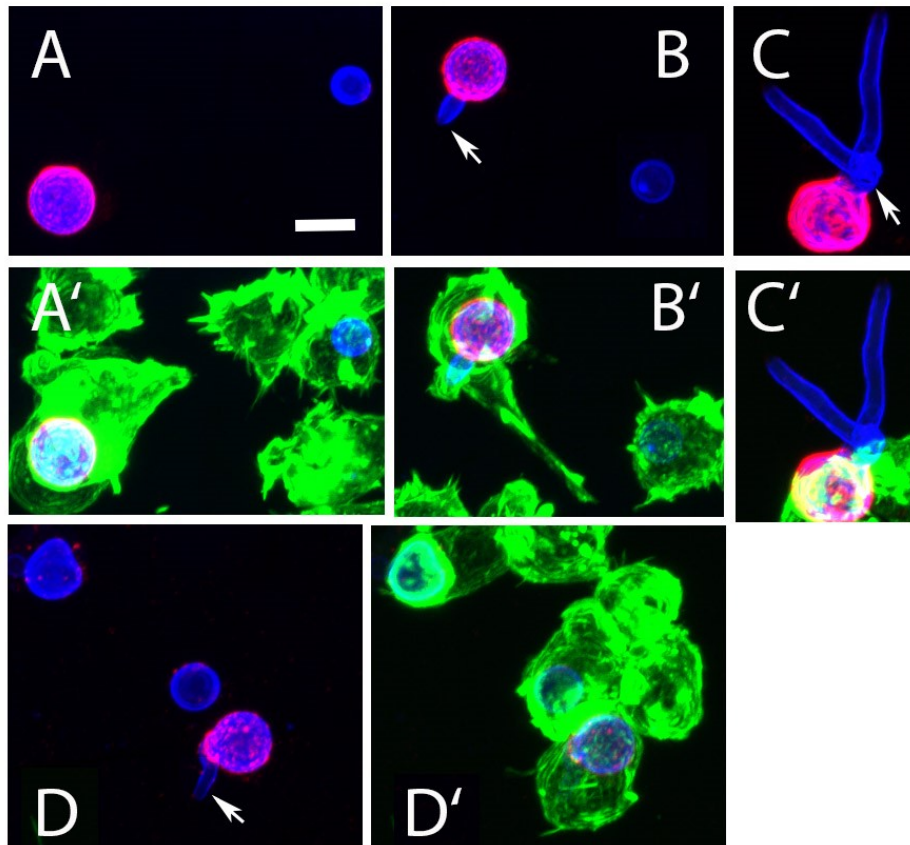


Abbildung 17: 2G8-Färbung von AC nach sechsstündiger Infektion. J774-Zellen wurden mit Phalloidin-FITC gefärbt (grün). AC wurden mit CFW (blau) und dem  $\beta$ -Glukan mAk 2G8 (rot) gefärbt. Bilder A'-D' zeigen Überlagerungen aller drei Fluoreszenzkanäle. Bilder A-D zeigen die Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals. Die Pfeile zeigen AC, die bereits Keimschläuche gebildet haben und stark  $\beta$ -Glukan-positiv sind. Der Maßstab in Bild A repräsentiert 5  $\mu$ m und ist für die ganze Abbildung gültig.

### 1.8. Nachweis von angesäuerten Phagolysosomen

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, was mit phagozytierten AC nach Aufnahme in den Makrophagen geschieht. Durch die Färbung mit dem *LysoTracker* DND-26 können angesäuerte Phagolysosomen angefärbt werden (Beispielbild siehe Abbildung 18). J774-Zellen wurden mit AC infiziert und für sechs Stunden inkubiert. Bei der Auswertung zeigte sich, dass sich etwa 75 % der AC, die mit Makrophagen assoziiert waren, in *LysoTracker*-positiven Vakuolen befanden

(Abbildung 19). Diese waren als grüner Ring um die AC sichtbar. Rund 20 % der AC zeigten keinen positiven Ring und bei circa 2 % war ein durch DND-26 komplett ausgefüllter Ring und somit eine Färbung der AC zu sehen, was auf eine Ansäuerung des Zytoplasmas der Sporen hindeutet.

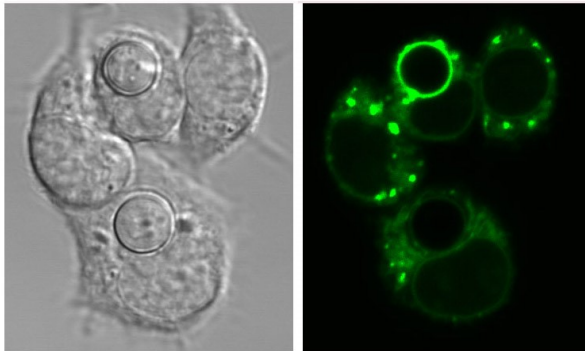


Abbildung 18: Beispielbild der *LysoTracker* DND-26 Färbung. Das rechte Bild zeigt die Färbung einer internalisierten AC in einer angesäuerten Vakuole mit *LysoTracker* DND-26 (grüner Ring). Das linke Bild zeigt die dazugehörige Durchlichtaufnahme.

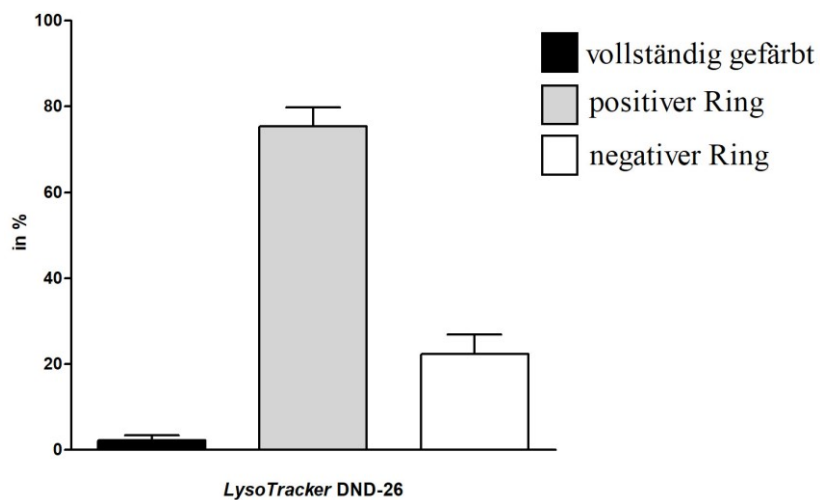


Abbildung 19: Auswertung der Färbung durch *LysoTracker* DND-26 von AC, die sechs Stunden mit J774-Zellen inkubiert wurden.

### 1.9. Auskeimung im sauren pH

In der Arbeit von KUEHNEL et al. (2001) wurde der pH-Wert von Phagolysomen von J774-Makrophagen bestimmt. Er lag ungefähr bei 5,0. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PC von *A. terreus* eine Ansäuerung des pH-Wertes gut tolerieren und auch bei einem pH von 5,0 auskeimen (SLESIONA et al., 2012). Um zu überprüfen, ob auch AC resistent gegenüber einem sauren pH sind, wurden AC und PC von *A.*

*terreus* At17-14 und PC von *A. fumigatus* Af293 in AMM, pH 6,8 und AMM, pH 5,0 angezogen. AC wurden für sieben Stunden inkubiert und PC für 14 Stunden. Es zeigte sich, dass sowohl die AC als auch die PC von *A. terreus* eine höhere Auskeimungsrate im sauren pH aufwies. *A. fumigatus* hingegen zeigte keinen Unterschied in der Auskeimungsrate bei den unterschiedlichen pH-Werten (Abbildung 20). Wie in vorherigen Versuchen war die Auskeimungsrate von *A. terreus* PC im Vergleich zu *A. fumigatus* PC geringer, dies gilt insbesondere für pH 6,8.

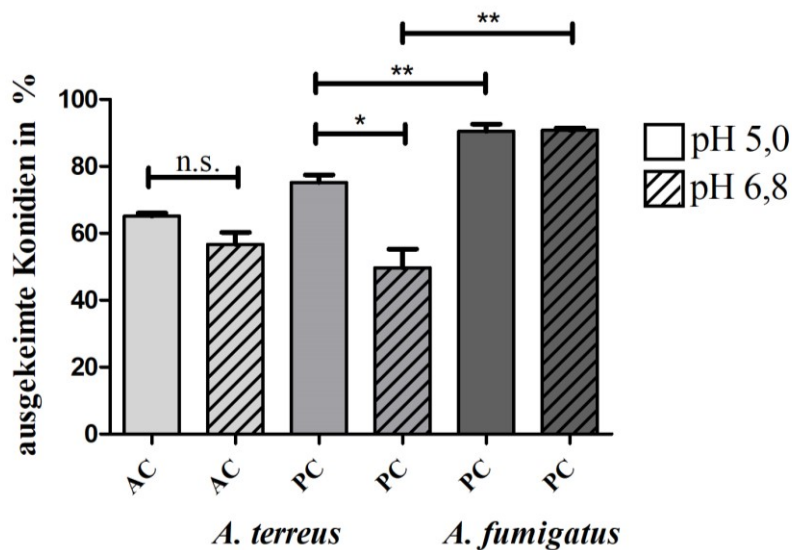


Abbildung 20: Auskeimung von AC und PC von *A. terreus* und PC von *A. fumigatus* in AMM, pH 6,8 und pH 5,0. AC und PC von *A. terreus* weisen eine höhere Auskeimungsrate im sauren pH auf. Die Auskeimungsrate von *A. fumigatus* wird von dem sauren pH nicht beeinflusst. Es wurden drei Gruppen mit je 50 Ereignissen ausgezählt. Die Standardabweichung ist angegeben. \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,1$ , n.s. = nicht signifikant.

### 1.10. Überleben der Aleuriokonidien in Makrophagen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass PC von *A. fumigatus* nach der Phagozytose auskeimen und die Membran der Zellen durchstoßen können (SLESIONA et al., 2012a). PC von *A. terreus* hingegen persistieren nach der Phagozytose und durchdringen die Membran der Zellen nicht (HSIEH et al., 2017). AC werden von Makrophagen schnell und effizient phagozytiert. Ob sie wie PC von *A. terreus* in den Zellen persistieren und überleben, sollte in diesem Versuch untersucht werden. Hierfür wurden J774-Zellen mit FITC-markierten AC infiziert und nach einstündiger Inkubation Itraconazol beigesezt, um das Auskeimen extrazellulärer AC zu unterdrücken. Die Proben wurden nun für 24 Stunden inkubiert. Vorherige

Versuche hatten gezeigt, dass AC im Zellkulturmedium RPMI 1640 nach sechs Stunden bereits viele Hyphen gebildet hatten (siehe 1.4.1). Daher wurde nach sechs Stunden eine Probe fixiert, um den Status der Auskeimung zu überprüfen. Hierbei war zu erkennen, dass die J774-Makrophagen in engem Kontakt mit den AC standen und sich die AC noch im ruhenden Zustand befanden. Nach 24 Stunden wurden die Proben fixiert und zusätzlich mit CFW gefärbt. Es zeigte sich, dass etwa 50 % der AC Keimschläuche gebildet hatten (Abbildung 21). Das zeigt, dass AC innerhalb der Makrophagen überleben und die antimikrobiellen Mechanismen der Makrophagen überwinden können.

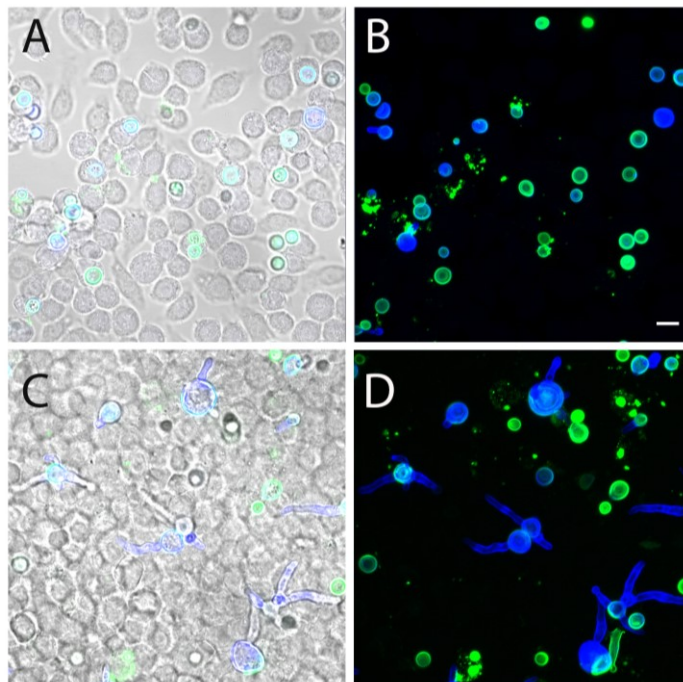


Abbildung 21: Infektion von J774-Zellen mit AC. AC sind mit Phalloidin-FITC markiert (grün) und mit CFW (blau) gefärbt. **A+C** zeigen die Überlagerungen des Durchlichts mit dem grünen und blauen Fluoreszenzkanal. **B+D** zeigen die Überlagerung des grünen und blauen Fluoreszenzkanals. **A/B**: AC nach sechsstündiger Inkubation mit J774-Zellen. **C/D**: AC nach 24-stündiger Inkubation mit J774-Zellen. Der Maßstab in B repräsentiert 5  $\mu$ m und ist für alle Bilder gültig.

### 1.11. TNF $\alpha$ -Messung

Der ELISA zur TNF $\alpha$ -Messung wurde freundlicherweise von Lea Strobl im Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. DEAK et al. (2011) zeigten bereits, dass Alveolarmakrophagen mit einer starken Zytokinproduktion auf die Infektion durch AC reagieren. Daher sollte die TNF $\alpha$ -Produktion von J774-Zellen, die für sechs Stunden mit AC infiziert wurden (MOI: Zwei Sporen pro Makrophagen), untersucht werden. Als direkten

Vergleich wurden zudem J774-Zellen mit PC des gleichen Stammes infiziert. Es zeigte sich, dass AC im Vergleich zu PC sowie der nicht infizierten Kontrolle eine starke Freisetzung von TNF $\alpha$  auslösten (Abbildung 22).

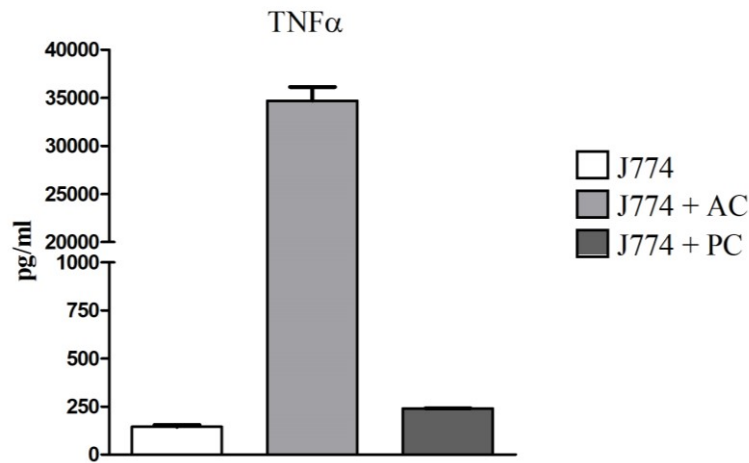


Abbildung 22: TNF $\alpha$ -Messung des Mediums nach sechsständiger Inkubation von J774-Makrophagen mit AC und PC von *A. terreus* At17-14. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angelegt. Standardabweichungen sind angegeben.

DEAK et al. (2011) vermutete, dass  $\beta$ -Glukan eine wichtige Rolle bei dieser Entzündungsreaktion spielt. Um dies zu untersuchen, wurden J774-Zellen in der Anwesenheit von Laminarin (100  $\mu$ g/ml) mit AC infiziert. Es konnte festgestellt werden, dass Laminarin sowohl in infizierten als auch nicht infizierten Zellen keinen Effekt auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung hatte (Abbildung 23).

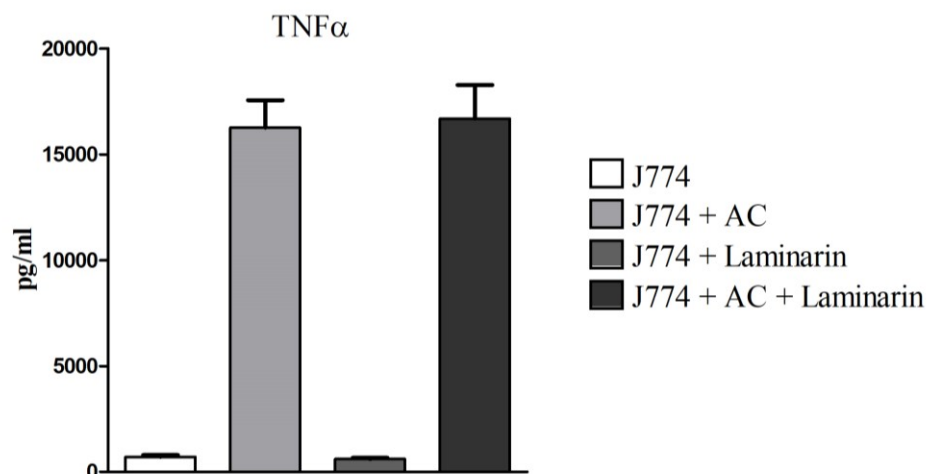


Abbildung 23: TNF $\alpha$ -Messung von Kulturüberstand infizierter J774-Makrophagen. Die AC induzieren eine starke TNF $\alpha$ -Produktion. Laminarin hat keinen Einfluss auf die TNF $\alpha$ -Produktion. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angelegt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

## 2. Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Hyphen-Oberflächenantigenen

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es, drei mAk, die bereits vor dieser Arbeit generiert worden waren, näher zu charakterisieren. Die entsprechenden Hybridome wurden nach Immunisierung mit abgetöteten Hyphenfragmenten von *A. fumigatus* (AB90-E8, AD105-30-2) beziehungsweise von *L. corymbifera* (AE183-3) isoliert. Die Antikörper AB90-E8 und AE183-3 gehören beide der IgG<sub>1</sub>-Subklasse an und zeigten positive Färbungen in der Immunfluoreszenz mit den jeweiligen Pilzhyphen. AD105-30-2 gehört der IgM-Subklasse an und fiel auf, weil er in Immunfluoreszenzfärbungen *F. oxysporum* Hyphen anfärbte. Die Antikörper AB90-E8 und AE183-3 sollten für die geplanten Versuche aufkonzentriert und gereinigt werden. Insbesondere die biologische Aktivität von AB90-E8 war von großem Interesse, da die Bindungstasche von AB90-E8 bereits erfolgreich in *A. fumigatus*-spezifischen *chimeric antigen receptors* (CAR) eingesetzt wurde. Daher sollte sein potenzieller protektiver Effekt in Inhibitions- und Infektionsversuchen näher untersucht werden. AE183-3 diente zum einen als Kontrollantikörper für die Versuche mit AB90-E8, zum anderen waren aber auch entsprechende Versuche mit dem Antikörper AE183-3 geplant, die aber aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

### 2.1. Aufkonzentrierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper AB90-E8 und AE183-3

#### 2.1.1. Aufkonzentrierung des AB90-E8-Hybridomüberstandes

Mit der Hybridom-Zelllinie AB90-E8 wurde zunächst über mehrere Wochen zellfreier, antikörperhaltiger Kulturüberstand produziert. Die Zunahme der Zellkonzentration wurde mikroskopisch kontrolliert. Zusätzlich wurde die Farbe des Mediums betrachtet, die als pH-Indikator diente. War die Zellzahl bereits sehr hoch und zeigte das Medium durch einen Farbumschlag von rosa nach gelb eine Ansäuerung an, wurde der Kulturüberstand geerntet und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Der zellfreie Kulturüberstand wurde zunächst bei 4°C gelagert. Insgesamt konnten etwa 800 ml Kulturüberstand geerntet und dieser anschließend ungefähr 20-fach aufkonzentriert werden. Der Antikörper-Überstand und das Antikörper-Konzentrat wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Hybridomüberstand wurde hierfür unverdünnt und 1:10 und 1:20 verdünnt mit

0,5 M TRIS, pH 6,8 aufgetragen. Auch das Antikörper-Konzentrat wurde 1:10 und 1:20 mit 0,5 M TRIS, pH 6,8 verdünnt. Die Proben wurden 3+1 mit 4x Probenpuffer versetzt und jeweils 13  $\mu$ l der Proben und 7  $\mu$ l des Molekulargewichts-Markers in die Geltaschen pipettiert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Das Gel zeigte Banden auf Höhe von 60-70 kDa (Abbildung 24). Hierbei entsprach die Größe der Bande des unverdünnten Antikörper-Überstands (Spur A) in etwa der Bande des 1:20 verdünnten Antikörper-Konzentrats (Spur E), das heißt, der geschätzte Konzentrationsfaktor nach Aufkonzentrierung liegt bei 20x.

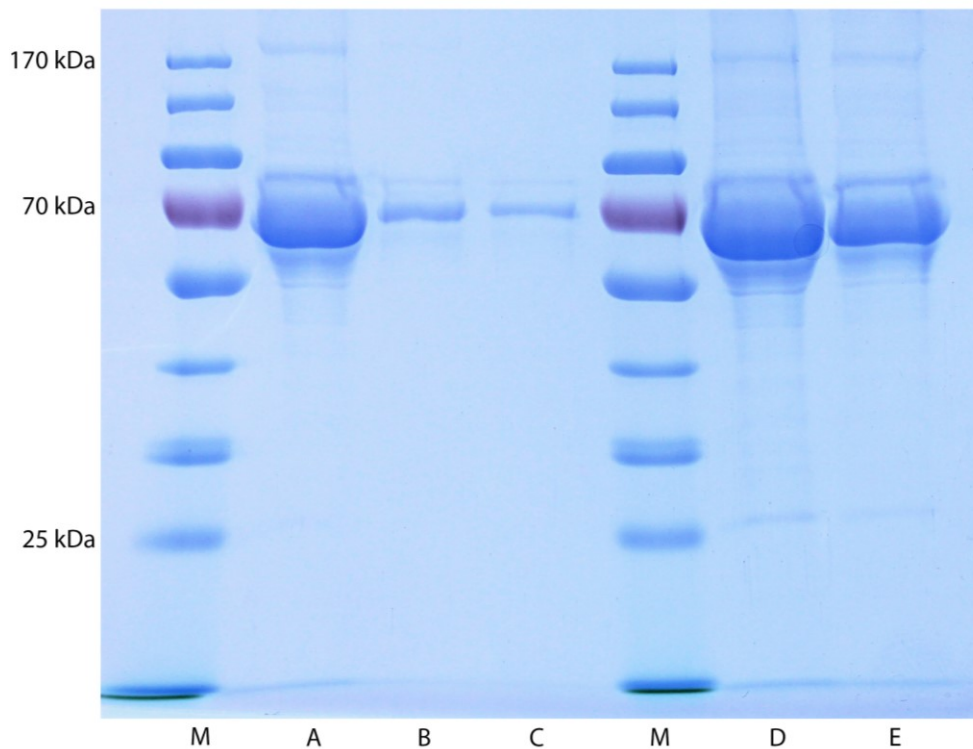


Abbildung 24: Aufkonzentrierung des Hybridomüberstandes AB90-E8. **M:** Marker, für ausgewählte Banden sind die Molekulargewichte angegeben. **A:** Antikörper-Überstand unverdünnt **B:** Antikörper-Überstand 1:10 **C:** Antikörper-Überstand 1:20 **D:** Antikörper-Konzentrat 1:10 **E:** Antikörper-Konzentrat 1:20.

### 2.1.2. Reinigung des AB90-E8-Hybridomüberstandes

Nach erfolgter Aufkonzentrierung wurde der Antikörperüberstand mittels Protein G Affinitätschromatographie gereinigt. Um die gewonnenen Fraktionen auf ihre Reinheit zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Antikörper-Fractionen wurden hierfür 1:5 und der Durchlauf 1:10 mit 0,5 M TRIS, pH 6,8 verdünnt und anschließend 3+1 mit 4x



Probenpuffer versetzt. Nun wurden je 13  $\mu\text{l}$  der Proben und 7  $\mu\text{l}$  des Molekulargewichts-Markers in die Geltaschen pipettiert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass bei den Antikörper-Fractionen Banden auf der Höhe der 25 kDa- sowie 55 kDa-Markierungen sichtbar wurden. Diese Banden entsprechen den leichten und schweren Ketten der Antikörper. Auch sind schwache Banden auf der Höhe von 170 kDa zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um vom Probenpuffer nicht reduzierte Antikörper. Die Spur des Durchlaufes zeigte eine Bande auf Höhe der 70 kDa, die der Größe von Albumin entspricht. Dieses stammt aus dem verwendeten Opti-MEM-Medium, das mit FCS versetzt war.

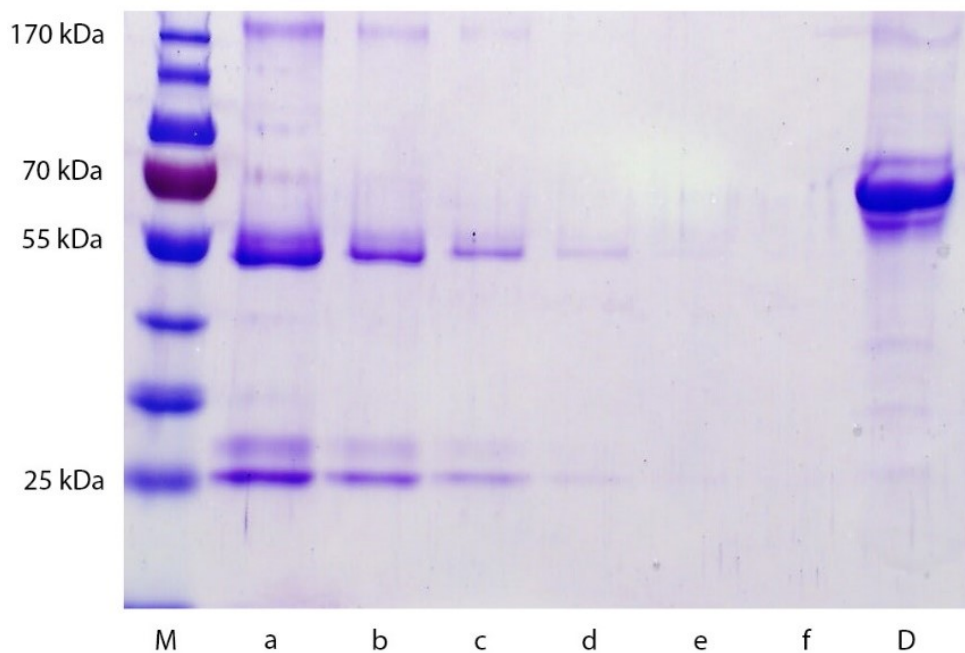


Abbildung 25: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels des aufgereinigten Antikörpers AB90-E8. **M:** Marker, für ausgewählte Banden sind die Molekulargewichte angegeben. **D:** Durchlauf (1:10 verdünnt) **a-f:** AB90-E8-Fractionen 1-6 (1:5 verdünnt). Die Banden auf Höhe der 25 kDa-Markierung entsprechen den leichten Ketten der Antikörper. Die Banden auf Höhe der 55 kDa-Markierung entsprechen der schweren Kette der Antikörper. Die Bande auf Höhe von 70 kDa entspricht der Größe von Albumin.

### 2.1.3. Bestimmung der Proteinkonzentration von AB90-E8

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fractionen sowie des Durchlaufes wurde ein *Bradford Protein Assay* durchgeführt. Der Tabelle 44 sind die dabei gemessenen Konzentrationen für die Antikörper-Fractionen und den Durchlauf zu entnehmen.

Tabelle 44: Proteinkonzentrationen der Fraktionen des aufgereinigten Antikörpers AB90-E8.

Fraktion 1	875 µg/ml
Fraktion 2	594 µg/ml
Fraktion 3	252 µg/ml
Fraktion 4	61,5 µg/ml
Fraktion 5	21,5 µg/ml
Fraktion 6	8 µg/ml
Durchlauf	1245 µg/ml

#### 2.1.4. Aufkonzentrierung des AE183-3-Hybridomüberstandes

Mit der Hybridom-Zelllinie AE183-3 wurde wie bei AB90-E8 über mehrere Wochen zellfreier, antikörperhaltiger Kulturüberstand hergestellt und anschließend aufkonzentriert. Insgesamt wurden etwa 900 ml Überstand geerntet und circa 20-fach aufkonzentriert.

#### 2.1.5. Reinigung des AE183-3-Hybridomüberstandes

Der aufkonzentrierte Hybridomüberstand konnte nun mittels Protein G Affinitätschromatographie gereinigt werden. Vor Elution der Antikörper-Proben wurde ein Vorlauf aufgefangen. Zur Überprüfung auf ihre Reinheit wurden die gereinigten Antikörper-Fractionen auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Antikörper-Fractionen und der Vorlauf wurden dafür zunächst 1:5 und der Durchlauf 1:10 mit 0,5 M TRIS, pH 6,8 verdünnt. Anschließend wurden alle Proben 3+1 mit 4x Probenpuffer versetzt und je 13 µl der Proben und 7 µl des Molekulargewichts-Markers in die Geltaschen pipettiert. Nach Färbung in Coomassie-Färbelösung wurden bei den Antikörper-Fractionen Banden auf Höhe der 25 kDa- sowie 55 kDa-Markierung sichtbar. Diese Banden entsprechen der leichten (25 kDa) und schweren (55 kDa) Ketten der Antikörper. Auch waren schwache Banden auf Höhe der 170 kDa-Markierung zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um vom Probenpuffer nicht reduzierte Antikörper. Die Spur des Durchlaufes zeigte eine Bande auf Höhe der 70 kDa, die der Größe von Albumin entspricht, das aus dem verwendeten Opti-MEM-Medium stammt (siehe Abbildung 26).

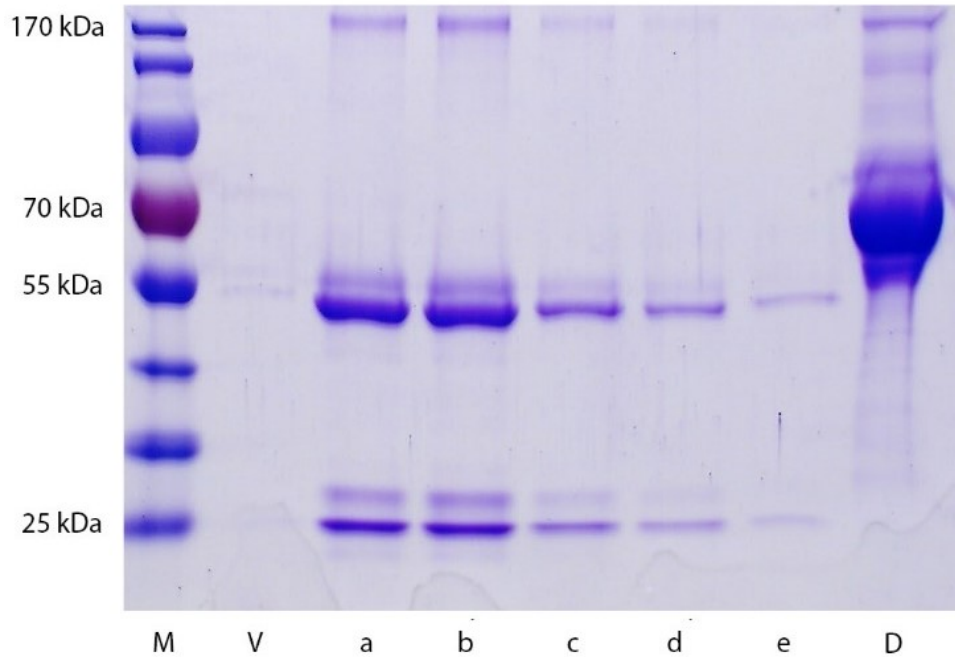


Abbildung 26: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels des aufgereinigten Antikörpers AE183-3. **V:** Vorlauf, **a-e** 1:5 Verdünnung der AE183-3-Fractionen 1-5, **D:** Durchlauf (1:10 verdünnt). **M:** Marker, für ausgewählte Banden sind die Molekulargewichte angegeben. Die Banden auf Höhe der 25 kDa-Markierung entsprechen den leichten Ketten der Antikörper. Die Banden auf Höhe der 55 kDa-Markierung entsprechen der schweren Kette der Antikörper. Die Bande auf Höhe von 70 kDa entspricht der Größe von Albumin.

### 2.1.6. Bestimmung der Proteinkonzentration von AE183-3

Die Proteinkonzentrationen, die mittels *Bradford Protein Assay* für die Antikörper-Fractionen, den Vorlauf und den Durchlauf von AE183-3 bestimmt wurden, sind Tabelle 45 zu entnehmen.

Tabelle 45: Proteinkonzentrationen von AE183-3-Fractionen, Vorlauf und Durchlauf.

Vorlauf	14,8 µg/ml
Fraktion 1	597,5 µg/ml
Fraktion 2	634,8 µg/ml
Fraktion 3	338,1 µg/ml
Fraktion 4	165,4 µg/ml
Fraktion 5	101,0 µg/ml
Durchlauf	979 µg/ml

## 2.2. Charakterisierung des Antikörpers AB80-E8

### 2.2.1. Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörper-Verdünnungen

Der aufkonzentrierte und gereinigte Antikörper AB90-E8 wurde in verschiedenen Verdünnungen in der Immunfluoreszenzfärbung getestet, um die optimale Konzentration für eine Opsonisierung von Hyphen zu ermitteln. Der Antikörper wurde mit PBS auf die unten genannten Konzentrationen eingestellt. *A. fumigatus* D141 Hyphen wurden über Nacht in RPMI 1640 (H) angezogen und fixiert. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte festgestellt werden, dass sich die Antikörper-Konzentration von 200 ng/ml als zu gering erwies und die Hyphen nur schwach vom Antikörper angefärbt wurden. Mit den Antikörper-Konzentrationen von 500 ng/ml wurden die Hyphen größtenteils gleichmäßig gefärbt. Nur vereinzelte Hyphen wiesen eine weniger homogene Färbung auf. Mit der Antikörper-Konzentration 1 µg/ml konnte die gleichmäßigste Färbung entlang der Hyphen erreicht werden. Hierbei wiesen die Hyphen eine starke Färbung auf (Abbildung 27). Für weitere Versuche wurde daher die Konzentration von 1 µg/ml gewählt, um stets eine optimale Opsonisierung der Hyphen zu gewährleisten.

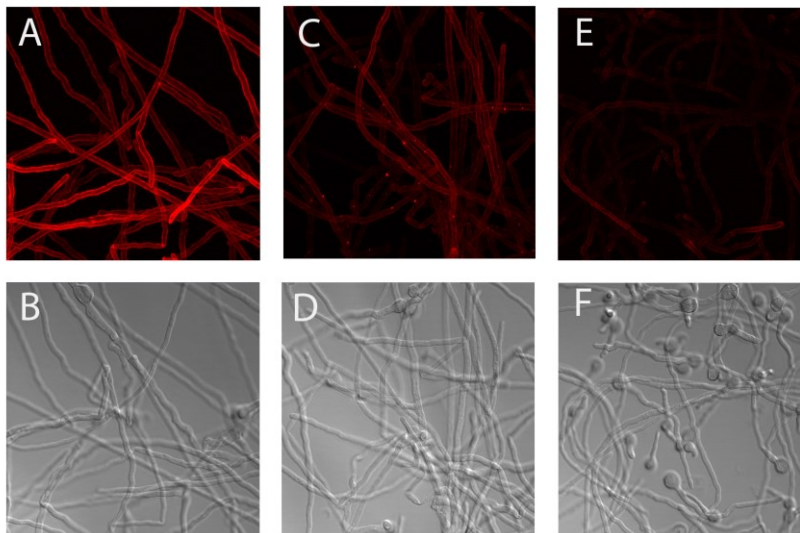


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung *A. fumigatus* D141 Hyphen, die in RPMI 1640 (H) gewachsen waren, mit verschiedenen AB90-E8-Konzentrationen (rot). Das obere Bild zeigt den roten Fluoreszenzkanal, das untere Bild die dazugehörige Durchlichtaufnahme. **A:** AB90-E8 1 µg/ml, **C:** AB90-E8 500 ng/ml, **E:** AB90-E8 200 ng/ml.

Veränderungen der Kulturbedingungen von *A. fumigatus* können zur Umstrukturierung der Hyphenzellwand führen (LATGÉ und BEAUVAIS, 2014). Da sich in vorherigen Versuchen die Verteilung oder Zugänglichkeit der Antigene

von mAk auf der Hyphenzellwand teils als stark Medium-abhängig erwiesen hatte, wurde auch das AB90-E8-Antigen auf Hyphen untersucht, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert worden waren. Das Minimal-Medium AMM sowie SD-Medium und BSA-Medium stellen definierte Medien dar, da die genaue Zusammensetzung bekannt ist (siehe III.2.1.) Auch das Zellkulturmedium RPMI 1640 ist ein definiertes Medium. Wird RPMI 1640 noch FCS hinzugefügt, handelt es sich wie bei Sabouraud-Medium um ein Komplexmedium.

Die *A. fumigatus* D141 Hyphen wurden in den sechs Medien über Nacht angezogen, fixiert und nach Protokoll gefärbt. Hierbei zeigten alle Hyphen eine homogene Färbung entlang der Zellwand (Abbildung 28). Somit ist davon auszugehen, dass das AB90-E8-Antigen auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gleichmäßig gebildet wird und auf der Zellwand für den Antikörper zugänglich ist.

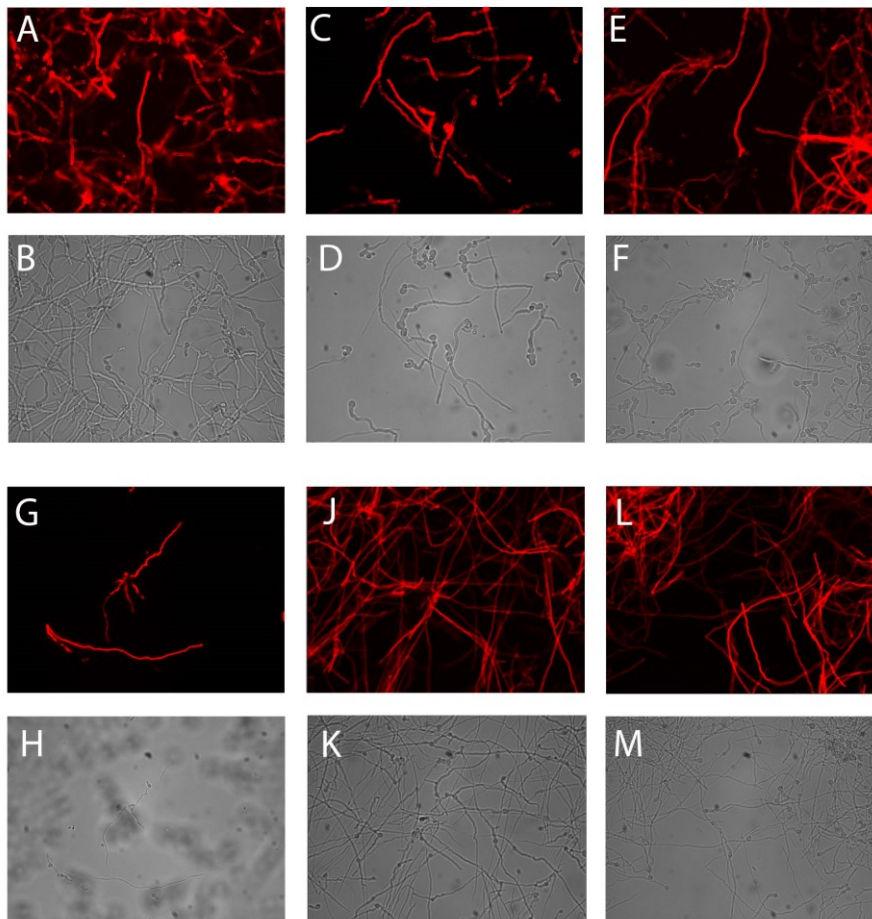


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von *A. fumigatus* D141 in verschiedenen Medien mit AB90-E8 (rot). **A/B:** AMM **C/D:** Sabouraud-Medium **E/F:** SD-Medium **G/H:** BSA-Medium **I/J:** RPMI 1640 + 5 % FCS (**H**) **K/L:** RPMI 1640 (**H**). Das jeweils obere Bild zeigt den roten Fluoreszenzkanal, das untere Bild die dazugehörige Durchlichtaufnahme.

### 2.2.2. Immunfluoreszenzfärbung *A. fumigatus* Wildtypen

Um zu untersuchen, ob das AB90-E8-Antigen bei verschiedenen *A. fumigatus* Stämmen gleichermaßen exprimiert wird, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den *A. fumigatus* Wildtypen D141, Af293 und ATCC46645 sowie den drei klinischen *A. fumigatus*-Patientenisolaten 1014, 1016 und 1018 nach Protokoll durchgeführt. Die Hyphen wurden hierfür in Sabouraud-Medium über Nacht angezogen und fixiert. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass bei allen *A. fumigatus* Wildtypen und klinischen Patientenisolaten der Großteil der Hyphen homogen vom Antikörper dekoriert wurde. An manchen Hyphen ist zudem eine intensivere Färbung an der Spitze zu erkennen. Nur vereinzelte Hyphen wiesen eine schwache Färbung auf. Konidienkörper wurden vom Antikörper nicht angefärbt. Der Versuch zeigte, dass das Antigen von AB90-E8 bei verschiedenen Vertretern der Spezies *A. fumigatus* in gleichen Maßen auf der Hyphen-Zellwand für den Antikörper zugänglich ist.

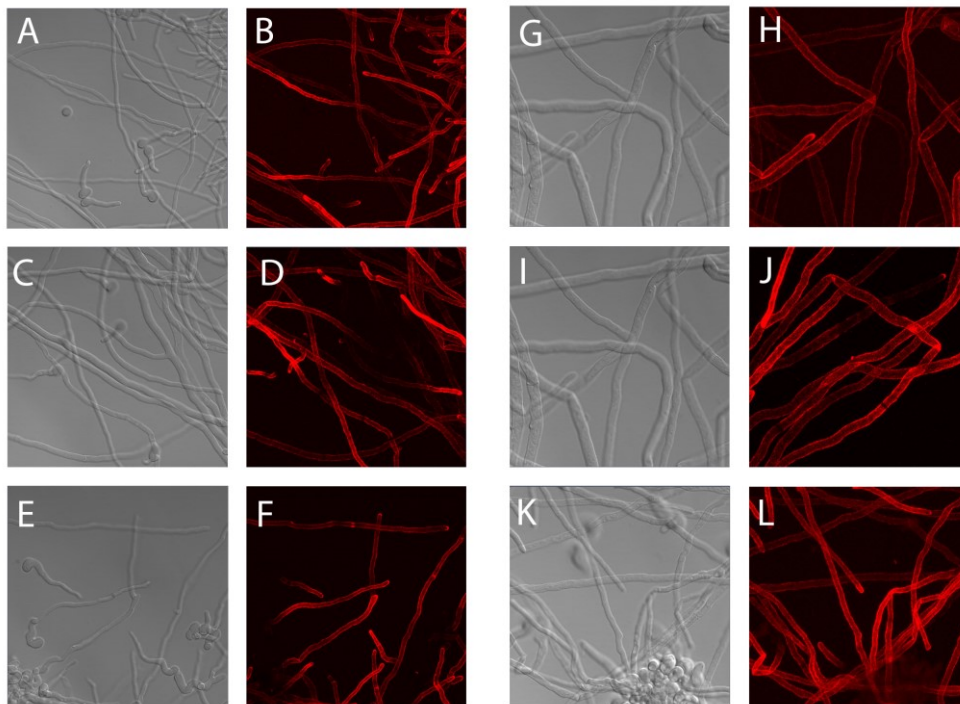


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung mit AB90-E8 von in Sabouraud-Medium gewachsenen Hyphen von *A. fumigatus* Wildtypstämmen und drei klinischen *A. fumigatus* Isolaten. Das jeweils linke Bild zeigt die Durchlichtaufnahme und das rechte Bild die Färbung des Antikörpers AB90-E8 im roten Fluoreszenzkanal. **A/B:** Af293 **C/D:** ATCC46645 **E/F:** D141 **G/H:** Patientenisolat 1014 **I/J:** Patientenisolat 1016 **K/L:** Patientenisolat 1018.

### 2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung verschiedener *Aspergillus* Spezies

Um zu überprüfen, ob sich das AB90-E8-Antigen auch auf der Oberfläche anderer *Aspergillus* Spezies befindet, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit *A. fischeri* DSM 3700, *A. terreus* NIH 2624, *A. niger* DSM 373, *A. nidulans* FGSC A26, *A. giganteus* DSM 1146 und *A. oryzae* DSM 1863 nach Protokoll durchgeführt. Die Hyphen wurden hierfür über Nacht in Sabouraud-Medium angezogen. Von den sechs getesteten *Aspergillus* Spezies wurde nur *A. fischeri*, welcher nah mit *A. fumigatus* verwandt ist (SAMSON et al., 2014), teilweise von AB90-E8 erkannt. Hierbei war die Färbung nicht homogen, sondern nur teilweise entlang den Hyphen zu erkennen. Vor allem die Hyphenspitzen wiesen eine deutliche Färbung auf. Die Hyphen von *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. giganteus* und *A. oryzae* zeigten keine Färbung und wurden somit nicht von AB90-E8 erkannt (Abbildung 30).

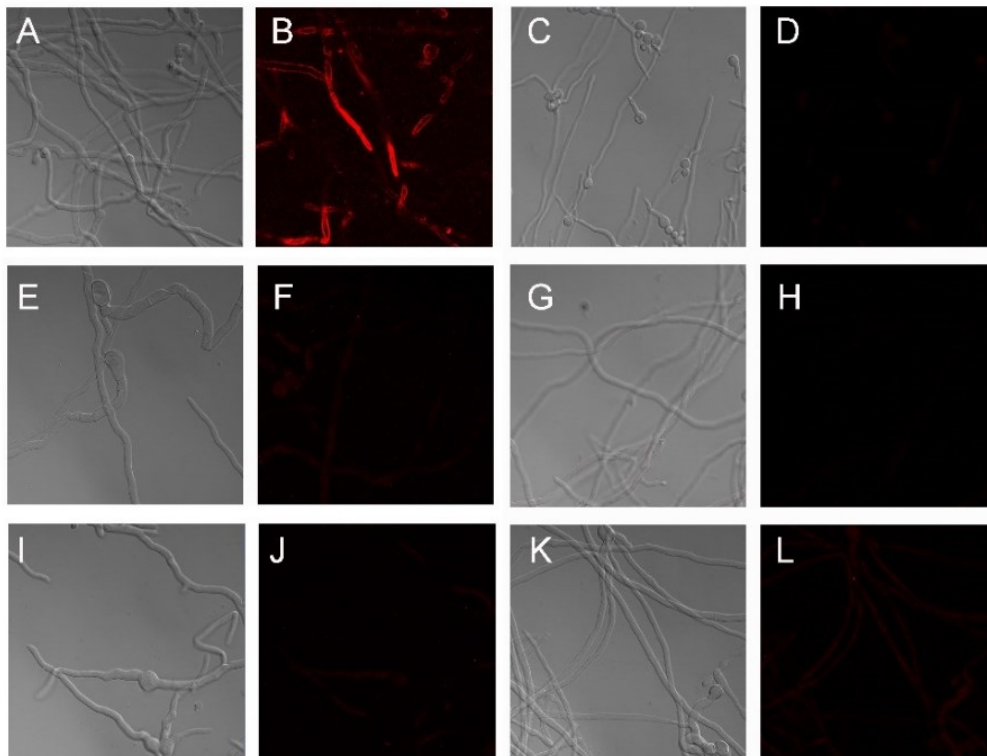


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung mit AB90-E8 von in Sabouraud-Medium gewachsenen Hyphen verschiedener *Aspergillus* Spezies. Nur *A. fischeri* wird teilweise von AB90-E8 (rot) erkannt. Die restlichen *Aspergillus* Spezies sind negativ. Das linke Bild zeigt jeweils die Durchlichtaufnahme, das rechte Bild den roten Fluoreszenzkanal: **A/B:** *A. fischeri* DSM 3700 **C/D:** *A. terreus* NIH 2624 **E/F:** *A. niger* DSM 373 **G/H:** *A. nidulans* A26 **I/J:** *A. giganteus* DSM 1146 **K/L:** *A. oryzae* DSM 1863.

Um weitere Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen auszuschließen, wurden zudem Immunfluoreszenzfärbungen mit *Candida albicans*, *F. solani*, *Mucor circinelloides*, *E. coli*, *Malazesszia*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Staphylokokkus aureus* mit AB90-E8 durchgeführt. Alle Färbungen waren negativ (Daten nicht gezeigt, persönliche Mitteilung Christoph Kleinemeier).

#### **2.2.4. Untersuchung der Expression des AB90-E8-Antigens während der Germination**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das AB90-E8-Antigen auf der Oberfläche von *A. fumigatus* Hyphen vorkommt. Es ist bekannt, dass sich die Oberflächenstrukturen von *A. fumigatus* Konidien und Hyphen deutlich unterscheiden (ROHDE et al., 2002), daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, in welchem Stadium der Auskeimung das AB90-E8-Antigen auf der Oberfläche für den Antikörper zugänglich wird. Zu diesem Zweck wurden *A. fumigatus* Konidien in RPMI 1640 (H, ohne Zusatz von Serum) für fünf Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend fixiert und nach Protokoll gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt findet man vor allem angeschwollene Konidien sowie kurze Keimlinge. Neben AB90-E8 wurde auch der Galaktomannan Antikörper L10-1 verwendet. Durch seine Zugehörigkeit zur IgM-Subklasse, war eine Doppelfärbung möglich. Der Abbildung 31 ist zu entnehmen, dass bereits bei angeschwollenen Konidien sowohl mit AB90-E8 als auch mit L10-1 schwache Färbungen der Konidienkörper zu erkennen sind (Pfeile, B+C). Diese Färbung konzentriert sich vor allem auf den Pol der Konidie, aus dem kurze Zeit später der Keimschlauch entsteht (D+E). Bereits auskeimende Konidien weisen mit beiden Antikörpern eine deutliche Färbung an der Spitze der Keimschläuche auf (B+C). Somit kann festgestellt werden, dass das AB90-E8-Antigen ebenso wie Galaktomannan bereits in einem sehr frühen Stadium der Germination auf der Oberfläche von *A. fumigatus* für den Antikörper zugänglich ist, aber auf den Konidienkörpern weitgehend fehlt.



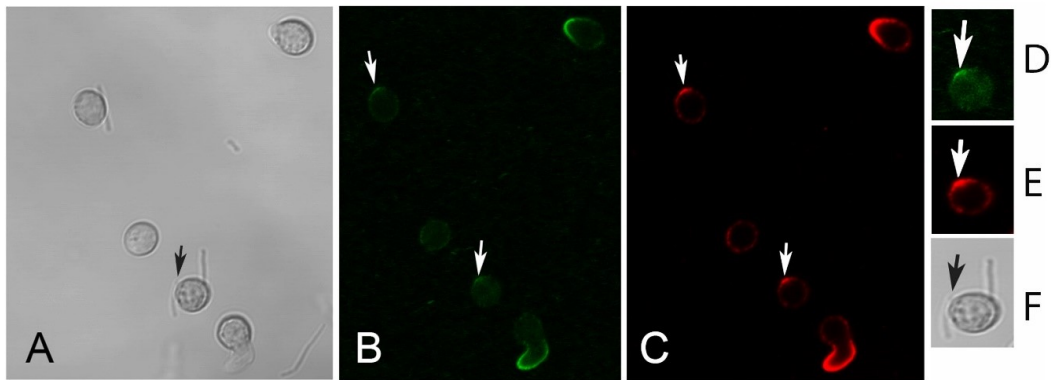


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung von *A. fumigatus* im frühen Stadium der Auskeimung. Die Inkubation der *A. fumigatus* Hyphen erfolgte für fünf Stunden bei 37°C in RPMI 1640 (H). **A+F**: Durchlicht, **B+D**: AB90-E8 (grün), **C+E**: L10-1 (rot), Die Pfeile zeigen die Bereiche der Konidien, die von den Antikörpern noch vor Beginn der Auskeimung angefärbt werden. **D-F**: Vergrößerung eines angeschwollenen Konidienkörpers. Bei den Abbildungen **D+E** wurde die Intensität der Fluoreszenzsignale erhöht, um die Färbung der Antikörper zu verdeutlichen.

### 2.2.5. Immunfluoreszenzfärbung nach Proteinase K-Verdau

Die Zellwand von *A. fumigatus* ist ein komplexes Gebilde, das aus Polysacchariden, Lipiden und Proteinen gebildet wird. Auch viele Antigene, die während des Wachstums von *A. fumigatus* sekretiert werden, sind in der Zellwand lokalisiert (LATGÉ et al., 1993). Die Zugehörigkeit des Antikörpers AB90-E8 zur IgG<sub>1</sub> Subklasse lässt bereits vermuten, dass dieser Antikörper vermutlich ein Proteinantigen erkennt. Auch die Tatsache, dass der Antikörper sehr spezifisch *A. fumigatus* Hyphen erkennt und nur mit dem nahen verwandten *A. fischeri* kreuzreagiert, lässt darauf schließen.

Handelt es sich bei Oberflächenantigenen um zellwandständige Proteine, sollten diese auf einen Proteinase K-Verdau sensibel reagieren. Sollte dies auch auf das AB90-E8-Antigen zutreffen, werden Hyphen nach einem Proteinase K-Verdau in der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung nicht mehr angefärbt. Für den Versuch wurden *A. fumigatus* D141 Hyphen in Sabouraud-Medium anzogen, fixiert und zwei Stunden mit Proteinase K in 50°C inkubiert. Zusätzlich wurden Hyphen als Kontrolle lediglich in Puffer ohne Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Hyphen nach Protokoll durchgeführt (Abbildung 32). Durch die Färbung mit CFW wurde zusätzlich das Chitin der Hyphenzellwand sichtbar gemacht. Es konnte festgestellt werden, dass das AB90-E8-Antigen bei den mit Proteinase K behandelten Hyphen verschwindet. Die

Kontroll-Hyphen, die lediglich in Puffer inkubiert wurden, wiesen weiterhin eine starke Färbung mit AB90-E8 auf. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich beim AB90-E8-Antigen um eine zellwandassoziierte Proteinstruktur handelt, da eine Glykostruktur Protease-stabil und somit von Proteinase K nicht angegriffen worden wäre. So hat Proteinase K auch keinen Effekt auf das Chitin der Zellwand und die CFW Färbung bleibt konstant. In einem vorherigen Versuch konnte zudem gezeigt werden, dass das Antigen von AB90-E8 nach einer Perjodat-Oxidation stabil bleibt (Daten nicht gezeigt, Christoph Kleinemeier, persönliche Mitteilung), was die Vermutung, dass es sich um ein Proteinantigen handelt, unterstützt.

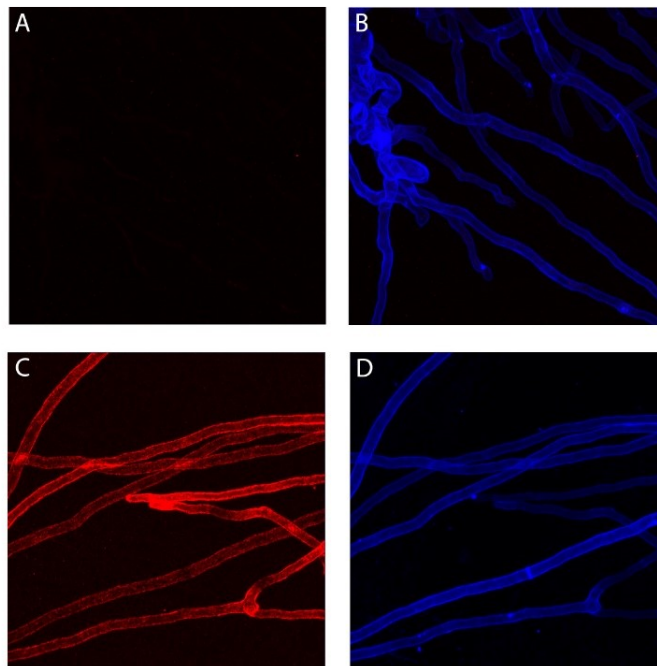


Abbildung 32: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AB90-E8-Antigen durch Proteinase K-Verdau zerstört wird. Nach Proteinase K-Verdau verschwindet die Färbung mit AB90-E8 (A). Die Hyphen, die lediglich in Puffer inkubiert wurden, wiesen eine deutliche Färbung mit AB90-E8 (rot) auf (C). B zeigt die CFW Färbung der Hyphen (blau) nach Proteinase K-Verdau. D zeigt die CFW Färbung der Hyphen, die nur in Puffer inkubiert wurden.

#### 2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung der D141 $\Delta$ glfA-Mutante

In Versuch 2.2.4 konnte festgestellt werden, dass das Antigen von AB90-E8 eine ähnliche Verteilung wie Galaktomannan auf der Oberfläche von Konidien aufweist. In einer Immunfluoreszenzfärbung der Deletionsmutante D141 $\Delta$ glfA sollte nun die Verteilung von AB90-E8 auf der Zelloberfläche untersucht werden. Das Enzym UDP-Galaktopyranose-Mutase (GlfA) ist essenziell für die Bildung von Galaktofuranose (Galf) (BAKKER et al., 2005), das ein wichtiger Bestandteil des

Polysaccharids Galaktomannan ist. In der D141 $\Delta$ *glfA*-Mutante wurde das Gen, das für die UDP-Galaktopyranose-Mutase GlfA kodiert, entfernt (SCHMALHORST et al., 2008). Hyphen der Mutante und des Wildtypstammes D141 wurden über Nacht in Sabouraud-Medium angezogen und fixiert. In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass sich die Färbungen von AB90-E8 im Wildtypstamm D141 und der  $\Delta$ *glfA*-Mutante unterscheiden. Während im Wildtypstamm der Großteil der Hyphen homogen entlang der Zellwand gefärbt ist, ist in der Deletionsmutante eine abgeschwächte und nur stellenweise Färbung der Hyphen zu erkennen. Im Wildtypstamm werden Hyphenspitzen besonders angefärbt. Dies ist auch teilweise in der  $\Delta$ *glfA*-Mutante zu erkennen. Das Fehlen der GlfA und damit auch Galaktomannan und daraus resultierenden Umstrukturierung der Zellwand scheint somit auch einen Effekt auf das AB90-E8-Antigen zu haben.

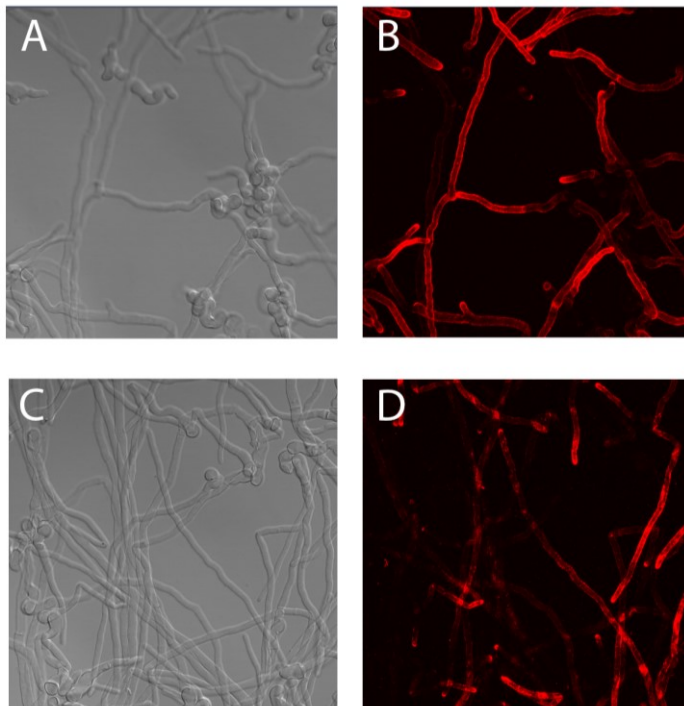


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen D141 und D141 $\Delta$ *glfA* Hyphen mit AB90-E8 (rot). **A+B**: D141 **C+D**: D141 $\Delta$ *glfA* **A+C** zeigen Durchlichtaufnahmen. **B+D** zeigen die Färbungen mit AB90-E8.

### 2.2.7. Hyphenwachstum-Inhibitionsversuch

In der Arbeit von TOROSANTUCCI et al. (2005) wurde ein mAk beschrieben, der in der *in vitro* Kultur einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum auf *A. fumigatus* und *Candida albicans* Hyphen hat. Um den Antikörper AB90-E8 auf diesen Effekt hin zu überprüfen, wurde ein Inhibitionsversuch mit *A. fumigatus*

D141 Hyphen durchgeführt. Hierbei wurde ein weiterer mAk (AE183) der IgG<sub>1</sub> Subklasse (IV.2.3), der nicht an *A. fumigatus* bindet, als Negativkontrolle verwendet. Dies wurde zunächst mit einer Immunfluoreszenzfärbung überprüft (Abbildung 34).

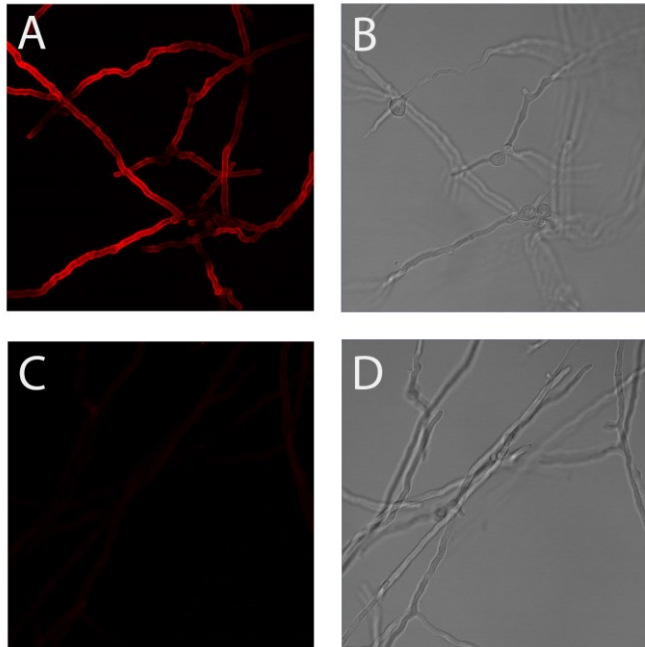


Abbildung 34: Kontrollfärbung von *A. fumigatus* D141 mit AB90-E8 (rot) und AE183-3. Die Bilder A+C zeigen den roten Fluoreszenzkanal und die Bilder B+D das Durchlicht. A: AB90-E8 zeigt eine homogene Färbung entlang der Hyphen. C: AE183-3 bindet nicht an *A. fumigatus* und ist negativ.

Für den Inhibitionsversuch wurden *A. fumigatus* D141 Sporen in RPMI 1640 (H) für circa sechs Stunden in 37°C in *Life Cell Imaging* Kammern inkubiert, bis kurze Hyphen gewachsen waren. Um die Ausgangslänge der Hyphen zum Startzeitpunkt ( $t=0$ ) zu ermitteln, wurden Aufnahmen im konfokalen Mikroskop gemacht. Anschließend wurden die Antikörper in der Endkonzentration 1  $\mu\text{g/ml}$  hinzugegeben und die Hyphen bei 37°C weiter inkubiert. Beide Antikörper wurden jeweils im Doppelansatz getestet. Nach zweistündiger Inkubation ( $t=2$ ) wurden die Hyphen fixiert und erneut im konfokalen Mikroskop fotografiert. Nach der Ausmessung der Hyphenlängen von 75 Hyphen je Probe wurden die Ergebnisse mittels Student's *t*-test statistisch ausgewertet. Die Auswertung des Versuches zeigte, dass die Hyphen, die mit AB90-E8 inkubiert wurden, ein signifikant vermindertes Wachstum im Vergleich zu der mit AE183-3 inkubierten Kontrolle aufwiesen (siehe Abbildung 35). Das Hyphenwachstum war um 17,4 % geringer als beim Kontrollantikörper AE183-3. Eine vorausgegangene Opsonisierung der

Hyphen mit dem Antikörper AB90-E8 hat somit einen inhibitorischen Effekt auf das Hyphenwachstum von *A. fumigatus*.

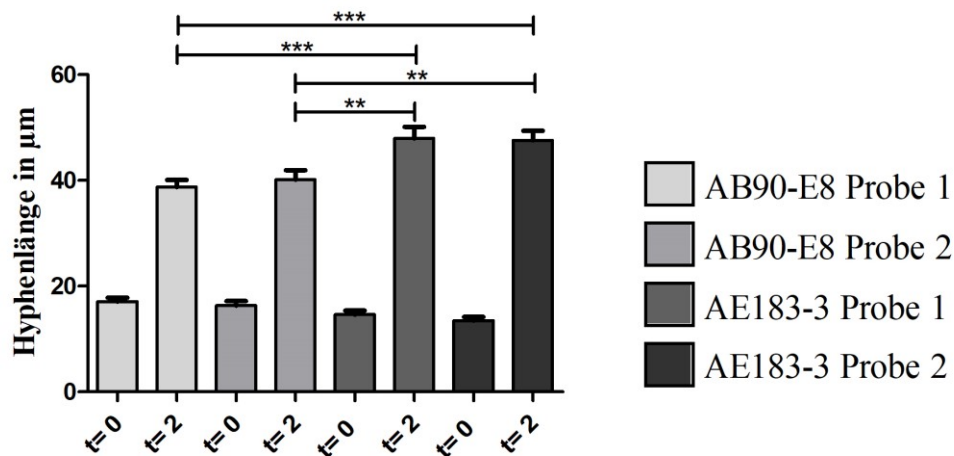


Abbildung 35: Hyphenwachstum-Inhibitionsversuch mit AB90-E8 und AE183-3. t=0 zeigt die Hyphenlänge zum Startzeitpunkt nach sechsständiger Inkubation in RPMI 1640 (H) bei 37°C. t=2 zeigt die Hyphenlänge nach zweistündiger Inkubation mit den Antikörpern AB90-E8 bzw. AE183-3. Die Antikörper wurden zu beiden Zeitpunkten jeweils im Doppelansatz getestet. Die Standardabweichungen sind angegeben. Die Ausmessung der Hyphen wurde mithilfe der ZEN Software von Zeiss durchgeführt und je Probe 75 Hyphen ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's *t*-test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 2.2.8. Infektionsversuch mit *A. fumigatus* und neutrophilen Granulozyten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Interaktion zwischen murinen PMN und *A. fumigatus* Hyphen genauer untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere festgestellt werden, ob die Opsonisierung der Hyphen mit dem Antikörper AB90-E8 einen positiven Effekt auf das Angriffsverhalten der PMN gegenüber den *A. fumigatus* Hyphen hat. In diesem Versuch wurde der *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Stamm verwendet. Für die Konstruktion eines Mito GFP-Stammes war zunächst das GFP mit 76 Aminosäuren des N-terminalen Endes der Citrat-Synthase (aus *A. niger*), die die Signalsequenz für den mitochondrialen Import enthalten, fusioniert und in den Klonierungsvektor pCR2.1 subkloniert worden (SUELMANN und FISCHER, 2000). Für die Herstellung des D141 Mito GFP-Stammes war dann noch eine Phleomycinresistenz in das Konstrukt eingefügt worden (MCCORMICK et al., 2010). Der D141 Mito GFP-Stamm wurde gewählt, da Stress, Zellschaden und Zelltod mit Änderungen der mitochondrialen Morphologie einhergehen, welche durch das mitochondriale GFP sichtbar gemacht werden können (RUF, 2021). Für den Infektionsversuch wurden Sporen des *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Stammes

in einer 24-Well Platte in RPMI 1640 (H) ausgesät und circa sechs Stunden inkubiert bis kurze Hyphen gewachsen waren. Währenddessen wurden PMN aus den Knochenmarkszellen von C57-B1 Mäusen isoliert. Anschließend wurden die Hyphen mit dem Antikörper AB90-E8 für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne AB90-E8 mit der entsprechenden Menge RPMI 1640 Medium aufgefüllt und inkubiert. Je nach Ansatz wurde zudem 10 % Kulturüberstand von *A. fumigatus* infizierten Makrophagen (kurz: Makrophagen-Überstand) hinzugeben. Allen Proben wurde 5 % Mausserum, als Quelle von Komplementproteinen, zugesetzt. Die PMN wurden mit *Cell Tracker* markiert, um sie für den Versuch in der blauen Fluoreszenz sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Zellen mit den D141 Mito GFP-Hyphen für fünf Stunden bei 37°C kultiviert. Bei der Auswertung der Aufnahmen zeigte sich, dass einige PMN die Hyphen erkannten und sich auch an diese annäherten. In den Durchlichtaufnahmen ist zu erkennen, dass in hyphenfreien Bereichen nur noch vereinzelt PMN zu finden waren. Der Hauptteil der Zellen lag jedoch im Bereich der Hyphen. Eine deutliche, enge Anlagerung oder Umschließung der Hyphen durch die Zellen war jedoch in keiner Probe zu erkennen (Abbildung 36). Eine vorausgegangene Opsonisierung der Hyphen mit AB90-E8 scheint somit keinen positiven Einfluss auf die Anlockung und Anlagerung der PMN zu haben. Auch in Videoaufnahmen dieser Versuche zeigten sich keine Hinweise auf einen positiven Effekt des Antikörpers (Daten nicht gezeigt).

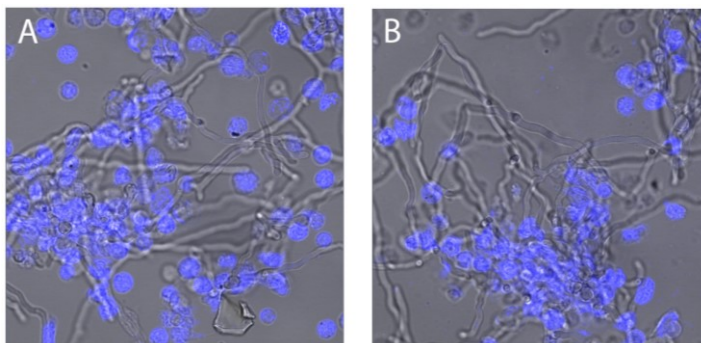


Abbildung 36: *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Hyphen mit PMN nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C (blau). Die Bilder zeigen eine Überlagerung des blauen Fluoreszenzkanals und dem Durchlicht. **A:** ohne AB90-E8 **B:** mit AB90-E8. Die Bilder zeigen die Überlagerung des Durchlichts mit dem blauen Fluoreszenzkanal.

Auffällig im Versuch war, dass die rote Fluoreszenz des Antikörpers AB90-E8 in der Probe mit PMN und Makrophagen-Überstand deutlich abgeschwächt wurde. Die Färbung war nur noch stellenhaft zu erkennen. Die Kontrollfärbung der Hyphen

mit AB90-E8 und Makrophagen-Überstand ohne PMN zeigte eine gleichmäßige Färbung entlang der Hyphen (Abbildung 37).

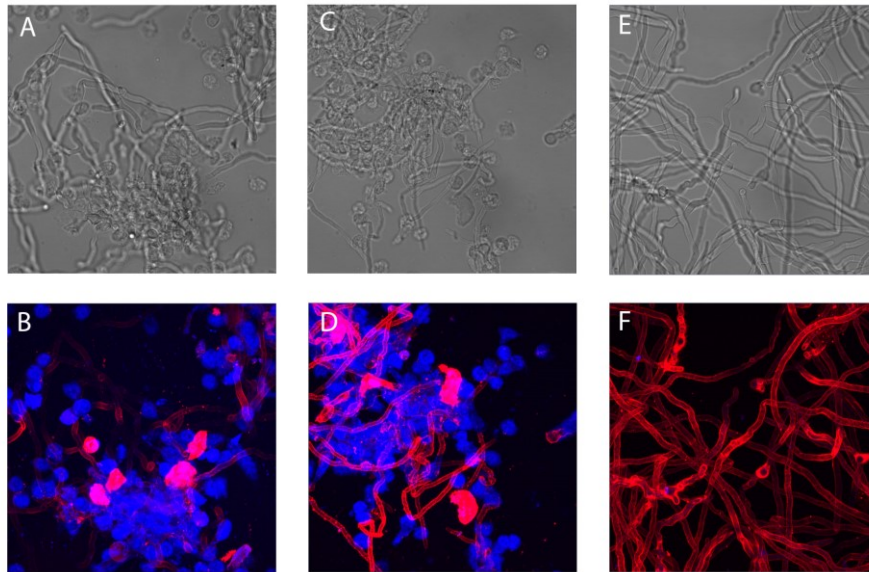


Abbildung 37: Konfrontationsversuch von *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Hyphen und PMN (blau) nach vorangegangener Opsonisierung mit AB90-E8 (rot) nach fünf Stunden. Die Bilder **A**, **C**, **E** zeigen Durchlichtaufnahmen. **B**, **D**, **F** zeigen Überlagerungen des blauen und roten Fluoreszenzkanals. **A/B**: AB90-E8 Opsonisierung + Serum + Makrophagen-Überstand + PMN **C/D**: AB90-E8 Opsonisierung + Serum + PMN **E/F**: AB90-E8 Opsonisierung + Serum + Makrophagen-Überstand ohne PMN.

In Abbildung 38 ist zu erkennen, dass in der Probe mit AB90-E8-Opsonierung, PMN und ohne Makrophagen-Überstand die Oberfläche der Zellwand in den Bereichen, in denen die Zellen mit den Hyphen Kontakt aufnahmen, eine veränderte Struktur aufwies. Die Zellwand wirkte an vielen Stellen aufgeraut. Die Kontrollfärbung mit AB90-E8 mit Makrophagen-Überstand und ohne PMN wies eine glatte, homogene Zellwandstruktur auf.

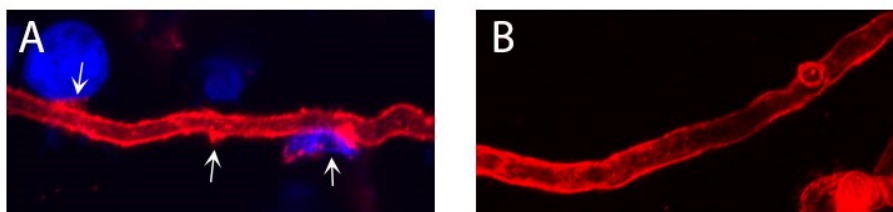


Abbildung 38: Ausschnitt der *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Hyphenzellwand nach fünfständiger Inkubation bei 37°C. Die Bilder zeigen eine Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals. **A**: AB90-E8 (rot) und PMN (blau), ohne Makrophagen-Überstand **B**: AB90-E8 (rot) ohne PMN, mit Makrophagen-Überstand.

Durch die grüne Fluoreszenz der Mitochondrien des *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Stammes sollte es möglich sein, Hyphen-Lyse und Zellschädigungen sichtbar zu machen. Werden die Hyphen geschädigt, kommt es zu einer mitochondrialen Fragmentierung bis hin zum Erlöschen der grünen Fluoreszenz, wie in Abbildung 39 dargestellt (RUF, 2021).

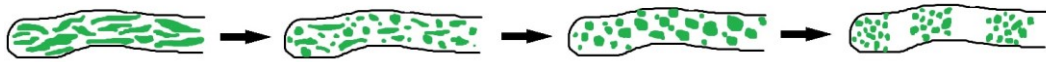


Abbildung 39: Schematische Zeichnung der mitochondrialen Fragmentierung modifiziert nach RUF (2021). Mit zunehmender Zellschädigung kommt es zu einer vermehrten mitochondrialen Fragmentierung bis hin zum Erlöschen der Fluoreszenz.

Die PMN näherten sich zwar wie oben beschrieben an die Hyphen an und interagierten auch mit der Hyphenzellwand. Allerdings zeigte sich in keinem der Ansätze eine aussagekräftige Evidenz für eine Lyse der Hyphen. Auch nach Opsonisierung mit AB90-E8 wiesen die Hyphen keine vermehrte Zellschädigung auf (Abbildung 40). Von einem protektiven Effekt des Antikörpers AB90-E8 kann somit vom jetzigen Zeitpunkt nicht ausgegangen werden.

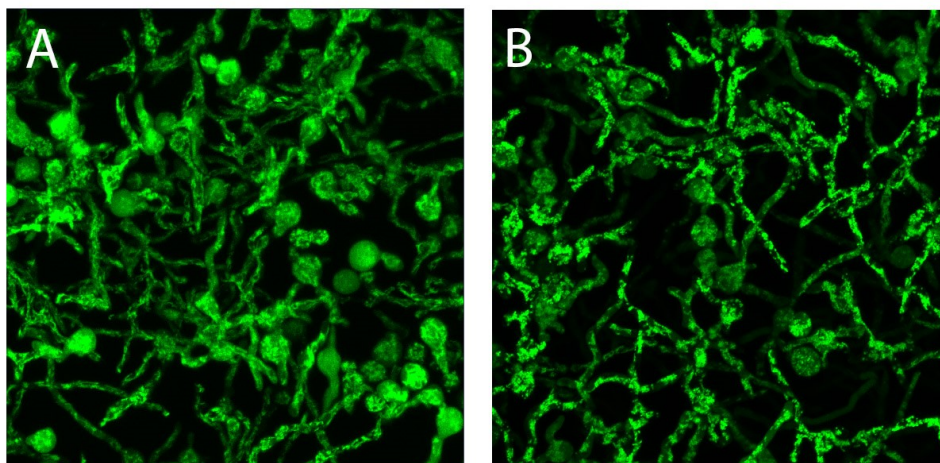


Abbildung 40: *A. fumigatus* D141 Mito GFP-Hyphen, grüner Fluoreszenzkanal. **A:** ohne AB90-E8 **B:** mit AB90-E8.



### 2.3. Charakterisierung des Antikörpers AE183-3

#### 2.3.1. Immunfluoreszenzfärbung mit AE183-3 Verdünnungen

Um die optimale Konzentration des gereinigten Antikörpers für spätere Opsonisierungsversuche mit Hyphen zu ermitteln, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Verdünnungen des Antikörpers angefertigt (Abbildung 41). Der Antikörper wurde hierbei mit PBS auf die Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\text{ng/ml}$ , 200  $\text{ng/ml}$  und 100  $\text{ng/ml}$  eingestellt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden *L. corymbifera* CBS 429.75 Hyphen über Nacht in Sabouraud-Medium angezogen. Die Hyphen wurden fixiert und nach Protokoll gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  die Hyphen vom Antikörper gleichmäßig dekoriert wurden. Bei einer Konzentration von 500  $\text{ng/ml}$  wurde das Signal deutlich schwächer. Ab einer Konzentration von 100  $\text{ng/ml}$  war keine Färbung der Hyphen mehr zu erkennen. Somit kann für zukünftige Versuche die Konzentration 1  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt werden, um eine optimale Opsonisierung der Hyphen zu gewährleisten.

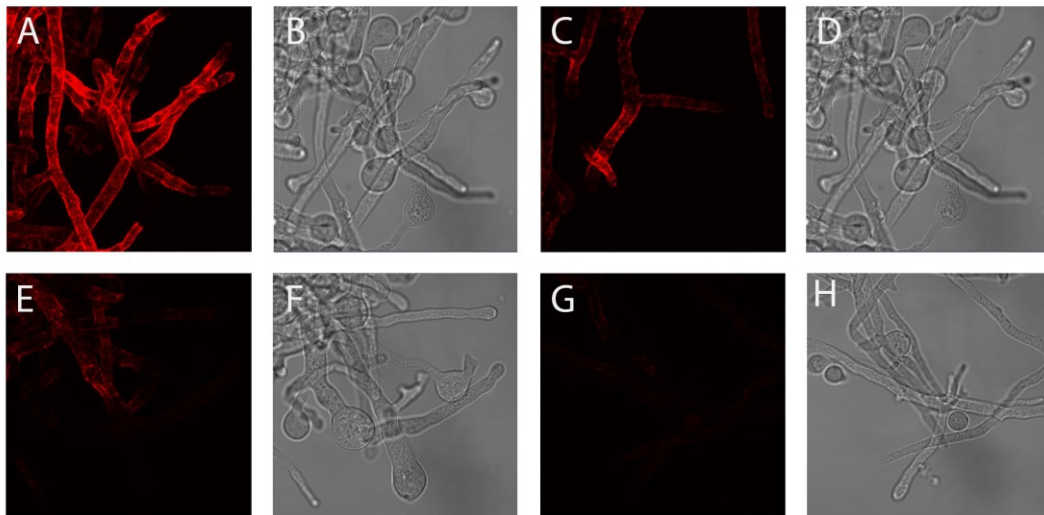


Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen *L. corymbifera* Hyphen mit verschiedenen AE183-3-Konzentrationen. Die Bilder A, C, E und D zeigen die AE183-3-Färbung im roten Fluoreszenzkanal. Die Bilder B, D, F und H zeigen die jeweiligen Durchlichtaufnahmen. A: AE183-3, 1  $\mu\text{g/ml}$ , C: AE183-3, 500  $\text{ng/ml}$ , E: AE183-3, 200  $\text{ng/ml}$ , G: AE183-3, 100  $\text{ng/ml}$ .

### 2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung mit Pilzen der Ordnung Mucorales

Um zu testen, welche Pilze von AE183-3 erkannt werden, wurde eine Immunfluoreszenzfärbungen mit Vertretern der Ordnung Mucorales durchgeführt (Abbildung 42 und Abbildung 43). Von klinisch besonders relevanter Bedeutung sind *Rhizopus (R.) oryzae*, *Mucor (M.)* spp. und *Lichtheimia* spp., wobei *R. oryzae* den Großteil der Mukormykosen auslöst (RIBES et al., 2000). Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Hyphen über Nacht in Sabouraud-Medium bei 30°C angezogen. Am nächsten Tag wurden sie fixiert und nach Protokoll gefärbt. Zusätzlich wurde eine CFW Färbung durchgeführt, um das Chitin der Hyphenzellwand zu färben. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass *L. corymbifera* CBS 429.75, *L. ramosa* B12-11.08.0095 sowie *Cunninghamella (C.) bertholletiae* CBS 187.84 von AE183-3 erkannt wurden. Die Hyphen wurden hierbei gleichmäßig vom Antikörper dekoriert, während die Konidienkörper nicht angefärbt wurden. *R. oryzae* VA69749 und *M. circinelloides* CBS 394.68 wiesen keine Färbung auf und wurden somit nicht von AE183-3 erkannt.

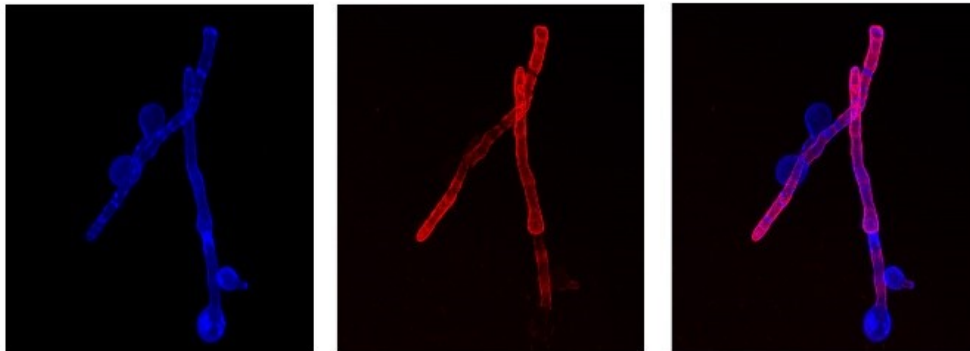


Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung von *L. corymbifera* CBS 429.75 mit AE183-3 und CFW. AE183-3 (rot) färbte die Hyphen homogen, spart die Konidien jedoch aus. CFW (blau) dient der Färbung des Chitins der Zellwand. Das rechte Bild zeigt eine Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals.

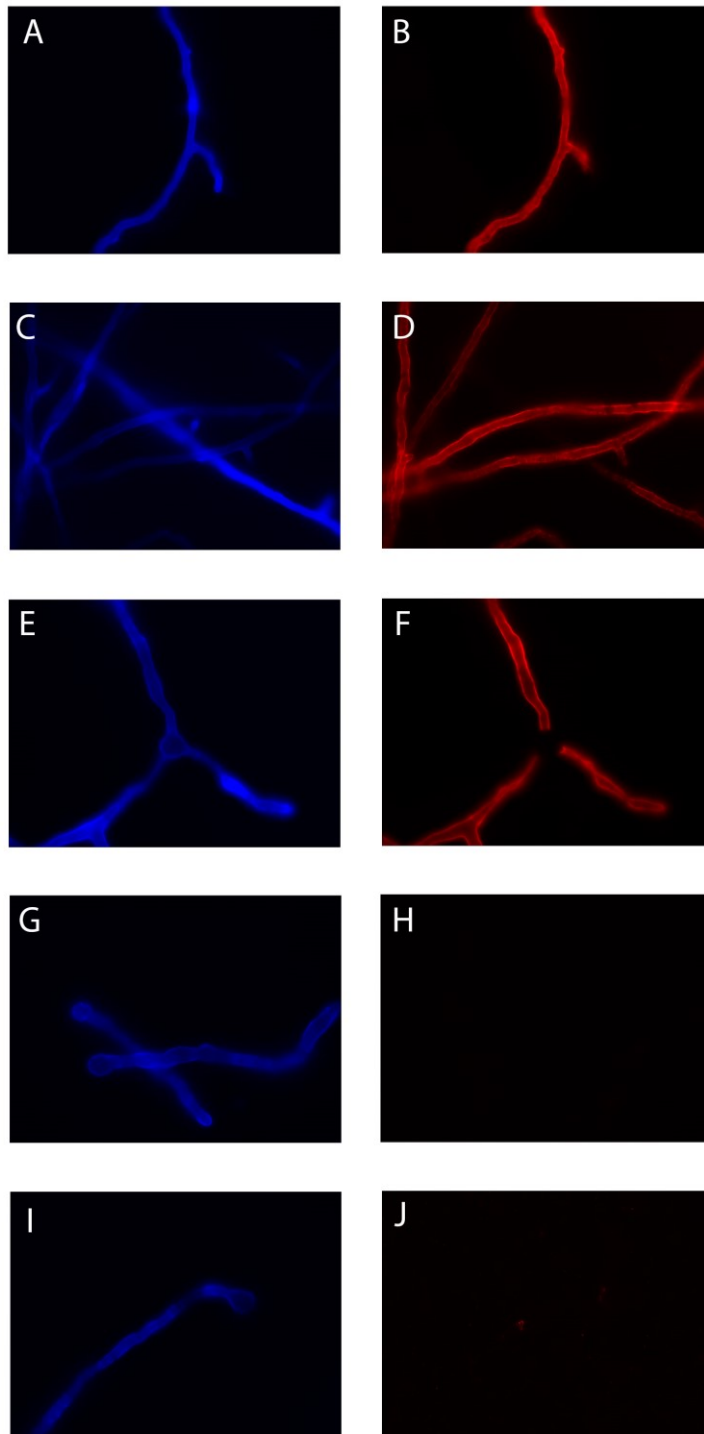


Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Pilze der Ordnung Mucorales mit AE183-3. Linkes Bild: CFW-Färbung (blau), rechtes Bild: AE183-3 (rot) **A/B:** *L. corymbifera* CBS 429.75, **C/D:** *L. ramosa* B12-11.08.0095, **E/F:** *C. bertholletiae* CBS 187.84, **G/H:** *R. oryzae* VA69749 **I/J:** *M. circinelloides* CBS 394.68.

### 2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung nach Proteinase K-Verdau

Um zu untersuchen, ob es sich beim Antigen von AE183-3 wie bei AB90-E8 um eine zellwandständige Proteinstruktur handelt, wurde ebenfalls ein Proteinase K-Verdau mit *L. corymbifera* Hyphen durchgeführt. Die Hyphen wurden über Nacht in RPMI 1640 (H) bei 30°C angezogen, am folgenden Tag fixiert und anschließend mit Proteinase K inkubiert. Zusätzlich wurden Hyphen in Puffer ohne Proteinase K inkubiert. Nach der Inkubation mit Proteinase K wurden die Hyphen mit PBS gewaschen und anschließend nach Protokoll gefärbt. Durch die Färbung mit CFW wurde zusätzlich das Chitin der Hyphenzellwand sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass die Färbung der Hyphen mit AE183-3 auch nach zweistündiger Inkubation mit Proteinase K stabil blieb (Abbildung 44). Die Färbung war weiterhin gleichmäßig entlang der Hyphen erkennbar. Auch das Chitin der Zellwand wurde durch die Proteinase K nicht angegriffen. Somit ist davon auszugehen, dass es sich beim Antigen von AE183-3 nicht um eine Proteinstruktur handelt.

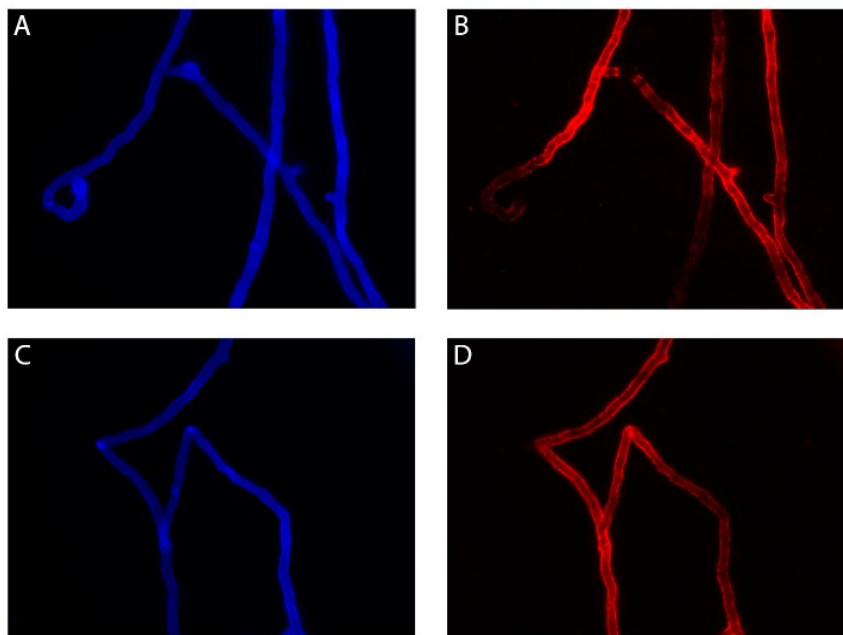


Abbildung 44: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AE183-3-Antigen durch Proteinase K-Verdau zerstört wird. Die *L. corymbifera* Hyphen wurden hierfür in Sabouraud-Medium angezogen. **A:** CFW Färbung der Hyphen nach Proteinase K-Verdau. **B:** AE183-3-Färbung der Hyphen nach Proteinase K-Verdau. **D:** AE183-3-Färbung der Hyphen, die lediglich in Puffer inkubiert wurde. **C:** CFW Färbung der Hyphen, die im Puffer inkubiert wurden.

## 2.4. Charakterisierung des Antikörpers AD105-30-2

### 2.4.1. Immunfluoreszenzfärbung von *F. oxysporum*

Da über AD105-30-2 bisher nur bekannt war, dass er *F. oxysporum* Hyphen erkennen sollte, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen mit *F. oxysporum* durchgeführt, um dies zu verifizieren. Da Hyphen von *F. oxysporum* nur schwer auf Deckgläsern adhären und durch den normalen Wasch- und Färbeporgang leicht abgespült werden, wurden für die Immunfluoreszenzfärbung Sporen von *F. oxysporum* in Sabouraud-Medium in einer *Life Cell Imaging*-Kammer, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet wurde, ausgesät und über Nacht in 26°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Hyphen fixiert und nach Protokoll gefärbt. Hierbei war darauf zu achten, die Überstände vorsichtig mit einer Spritze mit aufgesteckter Kanüle abzunehmen, damit die Hyphen sich nicht vom Boden der Kammer lösten. Der Antikörper AB135-8 diente bei dieser Immunfluoreszenzfärbung als Positivkontrolle, da bereits bekannt war, dass er ein *Fusarium*-spezifisches Antigen erkennt (WIEDEMANN et al., 2016). Eine CFW Färbung diente dazu, das Chitin der Hyphenzellwand anzufärben. Es zeigte sich, dass beide Antikörper *F. oxysporum* erkannten. Die Färbung war bei beiden Antikörpern homogen entlang der Hyphen zu erkennen (Abbildung 45).

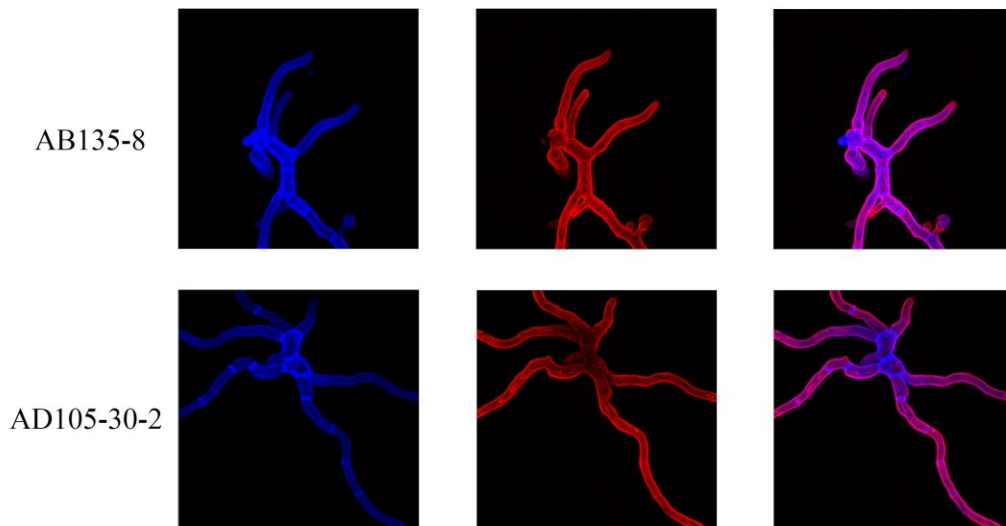


Abbildung 45: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen *F. oxysporum* Hyphen mit AB135-8 und AD105-30-2. Beide Antikörper (rot) färben die Hyphen homogen. Das Chitin der Hyphenzellwand ist durch CFW (blau) gefärbt. Das rechte Bild zeigt die Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals.

#### 2.4.2. Immunfluoreszenzfärbungen von *A. fumigatus*

Um zu untersuchen, ob AD105-30-2 auch bei *A. fumigatus* ein Signal zeigt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit *A. fumigatus* Af293 durchgeführt. Hyphen wurden hierfür in AMM über Nacht angezogen und fixiert. AD105-30-2 erkannte *A. fumigatus* und färbte die Hyphen an (Abbildung 46). Die Färbung war nicht homogen entlang der Hyphen zu erkennen und zeigte teils stärker und teils schwächer gefärbte Bereiche. Konidien wurden weitestgehend nur punkthaft gefärbt.

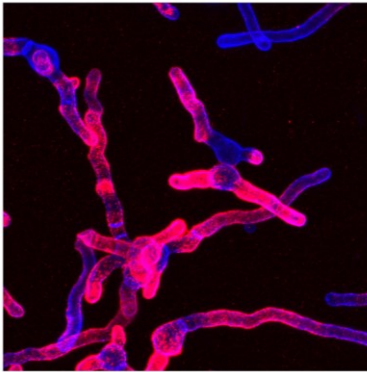


Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung von in AMM gewachsenen *A. fumigatus* Hyphen mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau). Das Bild zeigt die Überlagerung des roten und blauen Fluoreszenzkanals.

Abhängig vom Nährstoffangebot, kann sich die Expression von Antigenen auf der Zellwandoberfläche unterscheiden. Um zu untersuchen, ob das Antigen von AD105-30-2 auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen für den Antikörper auf der Hyphenzellwand zugänglich ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Hyphen, die in verschiedenen Medien gewachsen waren, durchgeführt. Hierzu wurden Sporen von *A. fumigatus* Af293 in verschiedenen Medien (RPMI 1640 (H), Sabouraud-Medium, AMM, SD-Medium) über Nacht angezogen. Gleichzeitig wurden auch Sporen von *A. nidulans* in den verschiedenen Medien ausgesät. Die Hyphen wurden fixiert und nach Protokoll gefärbt. Es zeigt sich, dass die Zugänglichkeit des Antigens von AD105-30-2 stark Medium-abhängig ist. In AMM wurde vor allem der Beginn der Hyphen gefärbt. In Sabouraud-Medium wurden nur vereinzelt Hyphen weitgehend homogen angefärbt. Oft war nur eine schwache, punkthafte Färbung entlang der Hyphen zu erkennen. Die Färbung in SD-Medium ähnelt der Färbung in AMM. Auch hier werden Hyphen nur teilweise gefärbt. Die Konidienkörper wiesen mitunter eine ringförmige Färbung auf. In

RPMI 1640 (H) wird ein Großteil der Hyphen gleichmäßig angefärbt. Vereinzelt Hyphen sind jedoch auch hier negativ (Abbildung 47).

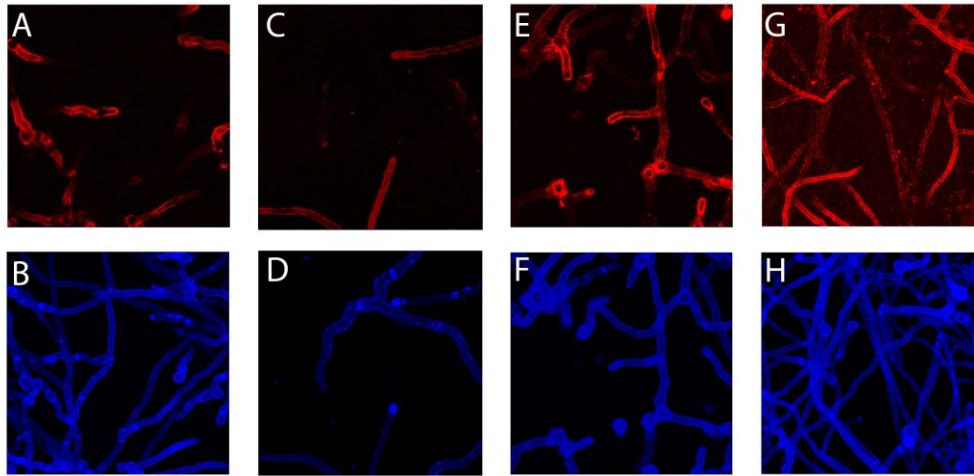


Abbildung 47: Immunfluoreszenzfärbung von *A. fumigatus* Af293 in verschiedenen Medien mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau). A+B AMM, C+D Sabouraud-Medium, E+F SD-Medium, G+H RPMI 1640 (H).

Im Vergleich zu *A. fumigatus* zeigte *A. nidulans* in Sabouraud- und SD-Medium eine gleichmäßigere Verteilung des Antigens (Abbildung 48). Hier war eine Färbung entlang den Hyphen zu erkennen, wobei Hyphen in SD-Medium auch vereinzelt stärker gefärbte Bereiche aufwiesen. In RPMI1640 (H) wurden viele Hyphen homogen angefärbt, wobei auch hier einzelne Bereiche stärker gefärbt waren. Einige Hyphen waren auch hier negativ. In AMM wurden nur Teile der Hyphen gefärbt.

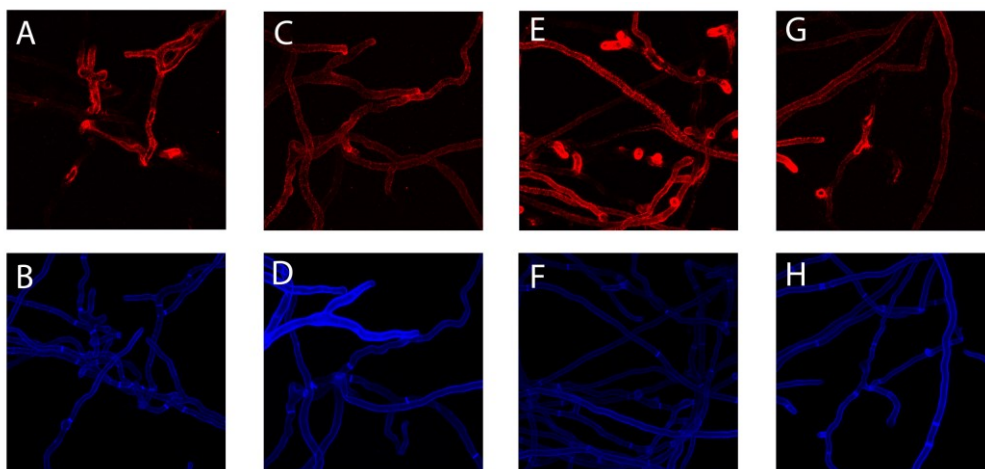


Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbung von *A. nidulans* A26 mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau). A/B AMM C/D Sabouraud-Medium E/F SD-Medium G/H RPMI 1640 (H).

### 2.4.3. Immunfluoreszenzfärbungen nach Proteinase K-Verdau

Um zu untersuchen, ob es sich beim AD105-30-2-Antigen um ein Proteinantigen handelt, wurden *A. fumigatus* Hyphen einer Proteinase K Behandlung unterzogen. In Kapitel 2.2.5 konnte bereits gezeigt, dass das Antigen des AB90-E8 Antikörpers Proteinase-sensibel ist. Daher konnte dieser Antikörper als Positiv-Kontrolle des Proteinase K-Verdaus mitgeführt werden. Der Galaktomannan Antikörper L10-1 wurde ebenfalls mitgeführt, da er ein Glykoantigen erkennt, das von der Proteinase K nicht angegriffen werden sollte. Der Versuch zeigte, dass das Antigen AD105-30-2 wie Galaktomannan Proteinase K stabil ist. Die Färbungen der beiden Antikörper bleiben auch nach Proteinase K-Verdau erhalten. Die Kontrolle mit AB90-E8 zeigt, dass der Proteinase K-Verdau funktioniert hat. Die Färbung ist bei den mit Proteinase K behandelten Hyphen verschwunden, wohingegen die Hyphen, die im Kontrollansatz ohne Proteinase K inkubiert wurden, weiterhin stark gefärbt sind. Auch das Chitin der Zellwand wird weiterhin durch CFW angefärbt. Somit ist davon auszugehen, dass es sich beim Antigen von AD105-30-2 vermutlich um eine kohlenhydrathaltige Struktur handelt.

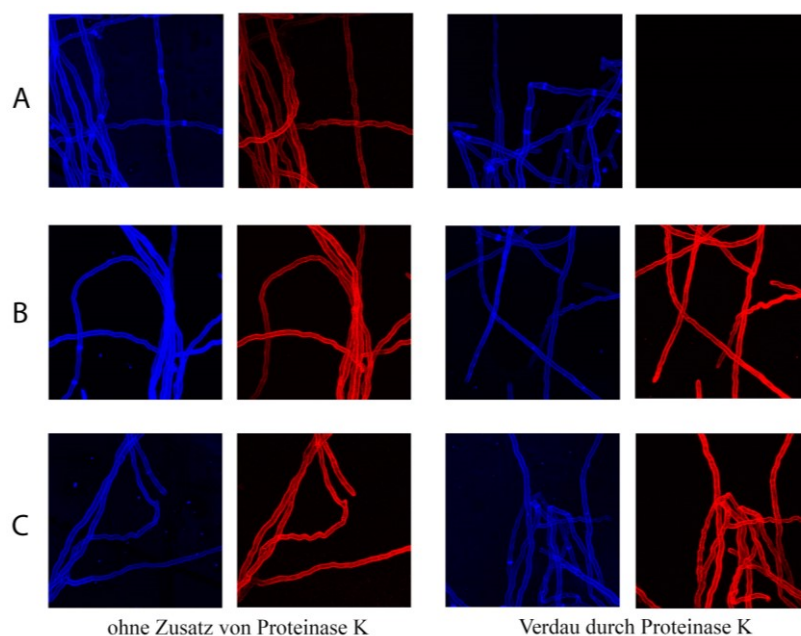


Abbildung 49: Immunfluoreszenz-Untersuchung, ob das AD105-30-2-Antigen durch Proteinase K zerstört wird. Antikörper = rot, CFW = blau. Das Kontroll-Antigen des AB90-E8-Antikörpers (**A**) verschwindet nach Proteinase K-Verdau. Die Hyphen, die ohne den Zusatz von Proteinase K lediglich in Puffer inkubiert wurden, wiesen dagegen eine deutliche Färbung mit AB90-E8 auf. Die Färbung der Antikörper AD105-30-2 (**B**) und L10-1 (**C**) wiesen sowohl in der Kontrolle ohne Zusatz von Proteinase K als auch nach Proteinase K-Verdau eine starke Färbung entlang der Hyphen auf.



#### 2.4.4. Untersuchung der Zellwandmutanten $\Delta glfA$ und $\Delta ags1-3$

Die Zellwand von *Aspergillus* spp. besteht aus vielen vernetzten Glykostrukturen. Durch die gezielte Deletion von Genen können bestimmte Glykostrukturen nicht mehr gebildet werden. Dies kann zur Umstrukturierung der Zellwand führen und ebenfalls Effekte auf andere Glykostrukturen und somit auch Glykoantigene haben. Auch die Virulenz kann durch Modellierung der Zellwand verändert werden (GASTEBOIS et al., 2009). Um zu untersuchen, ob es sich beim Antigen von AD105-30-2 eventuell um eine Glykostruktur handelt, die durch die Deletion der Gene *glfA* oder *ags1-3* beeinflusst wird, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit diesen Zellwandmutanten des *A. fumigatus* Stammes D141 beziehungsweise AfS35 durchgeführt. Die *A. fumigatus*  $\Delta glfA$ -Mutante ist nicht mehr in der Lage *Galf* zu bilden, welche wiederum ein elementarer Baustein des Polysaccharids Galaktomannan darstellt. Für die Biosynthese von  $\alpha$ -Glukanen sind die *A. fumigatus*  $\alpha$ -Glukan-Synthasen, die durch die drei Gene *ags1*, *ags2* und *ags3* kodiert werden, essenziell (BEAUVAIS et al., 2005; MAUBON et al., 2006). In der Deletionsmutante  $\Delta ags1-3$  wurden alle drei Gene entfernt. Das Fehlen der  $\alpha$ -Glukan-Synthasen führt dazu, dass keine  $\alpha$ -Glukane gebildet werden können. Für die Färbung wurden Hyphen in RPMI 1640 (H) beziehungsweise Sabouraud-Medium angezogen, fixiert und nach Protokoll gefärbt. Hierbei unterschied sich die Färbung der  $\Delta glfA$ -Mutante stark vom *A. fumigatus* Wildtypstamm D141. Während in RPMI 1640 (H) entlang der Hyphen des Wildtypstammes größtenteils eine starke Färbung zu erkennen war, wies die  $\Delta glfA$ -Mutante nur ganz vereinzelte, punkthafte Färbungen auf (Abbildung 50).

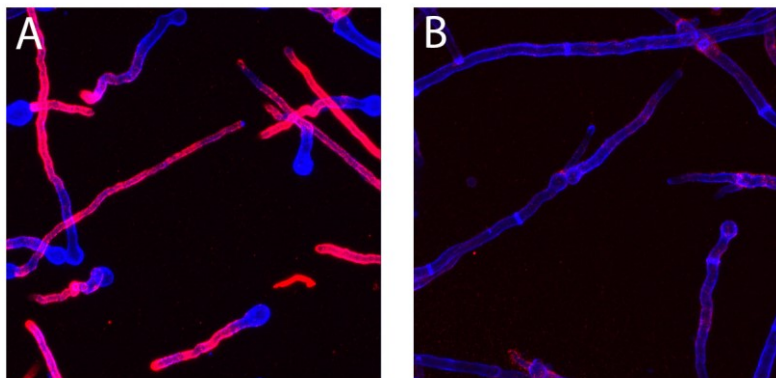


Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbung von in RPMI 1640 (H) gewachsenen Hyphen des *A. fumigatus* Wildtypstammes D141 und D141 $\Delta glfA$  mit AD105-30-2 (rot) und CFW (blau). **A:** D141 **B:** D141 $\Delta glfA$ . Die Bilder zeigen Überlagerungen des roten und blauen Fluoreszenzkanals.

Das gleiche Bild zeigte sich bei Färbung der Mutante in Sabouraud-Medium (Abbildung 51). Die Färbung der Mutante war bis auf eine schwache, punkthafte Färbung in einem Bereich, in dem viele Konidienkörper nebeneinander lagen, negativ. Hyphen wurden nicht angefärbt. Die Komplementante D141 $\Delta$ *glfA* + *glfA* wies ebenso wie der Wildtypstamm D141 eine Färbung entlang einzelner Hyphen auf. Die Färbung war hierbei nicht gleichmäßig verteilt und im Vergleich zu RPMI 1640 (H) deutlich schwächer. Einige Hyphen waren hierbei auch komplett negativ. Dies deckt sich jedoch mit dem Ergebnis des Versuchs, mit dem die Verteilung des Antigens in verschiedenen Medien überprüft wurde. Die Deletion des *glfA*-Gens und das daraus resultierende Fehlen der UDP-Galaktopyranose-Mutase GlfA scheint somit einen Einfluss auf die Expression oder Zugänglichkeit des AD105-30-2-Antigens zu haben.

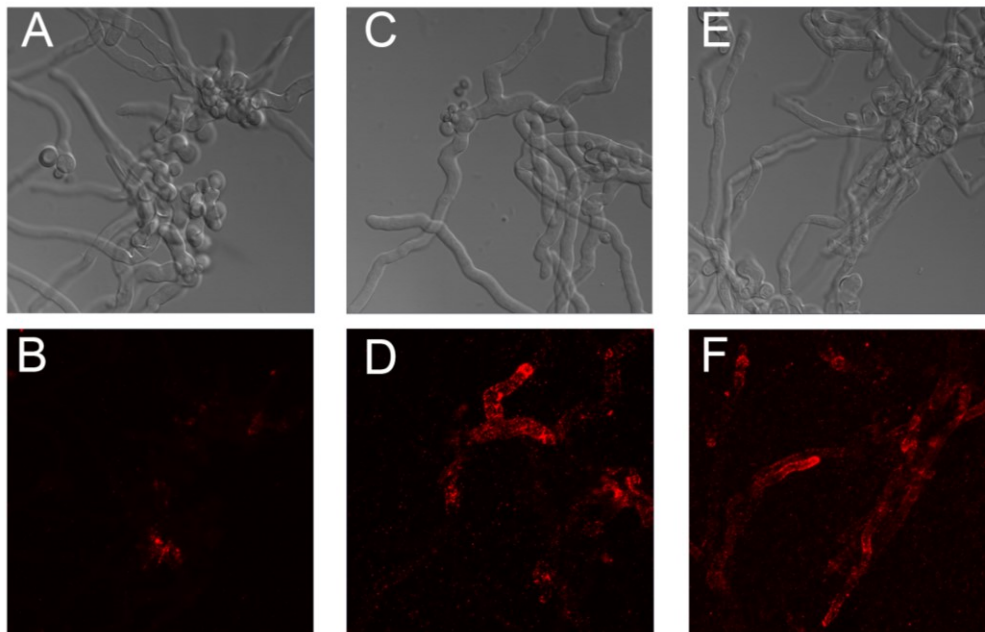


Abbildung 51: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen *A. fumigatus* D141  $\Delta$ *glfA*, Komplementante und Wildtypstamm Hyphen mit AD105-30-2 (rot). A/B: D141 $\Delta$ *glfA* C/D: D141 $\Delta$ *glfA* + *glfA*, E/F: D141 Wildtypstamm. Die obere Bildreihe zeigt die dazugehörigen Durchlichtaufnahmen.

Das Färbemuster der  $\Delta ags1-3$ -Mutante unterschied sich nach Wachstum in Sabouraud-Medium ebenfalls von der Färbung des Wildtypstammes und zeigte eine punkthafte Färbung entlang der Hyphen (Abbildung 52). Während in den vorherigen Versuchen die Färbung des Wildtypstammes durch AD105-30-2 in Sabouraud-Medium schwach und unregelmäßig ausfiel, wurden die Hyphen der  $\Delta ags1-3$ -Mutante deutlich gleichmäßiger angefärbt. Einzelne Bereiche der Hyphen waren jedoch auch hier negativ. Durch das Fehlen von  $\alpha$ -Glukan scheint somit das Antigen von AD105-30-2 für den Antikörper zugänglicher zu werden.

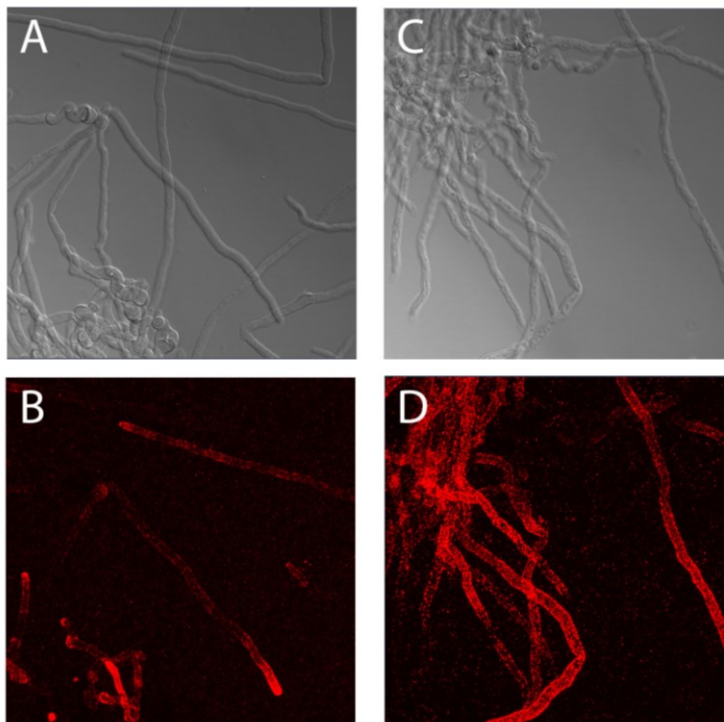


Abbildung 52: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen  $\Delta ags1-3$  Hyphen mit AD105-30-2 (rot). Die oberen Bilder zeigen die Durchlichtaufnahmen, die unteren Bilder die Aufnahmen des roten Fluoreszenzkanals. **A+B:** D141 Wildtypstamm **C+D:** AfS35 $\Delta ags1-3$ .

#### 2.4.5. SDS-PAGE und Western Blot von konzentriertem Kulturüberstand

Während des Wachstums in Flüssigkultur werden Proteine und Polysaccharide von Pilzen in den Kulturüberstand abgegeben. Um herauszufinden, ob auch das AD105-30-2-Antigen im Kulturüberstand zu finden ist, sollte eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt werden.

Der durch TCA-Fällung aufkonzentrierte Kulturüberstand von *A. fumigatus* D141 wurde auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und der andere Teil in eine Nassblotapparatur eingesetzt. Der Western Blot wurde nach Protokoll gefärbt. Der Antikörper L10-1 wurde dabei als Kontrolle eingesetzt, da bereits gezeigt werden konnte, dass er in Western Blots einen Schmier, wie man ihn typischerweise für Glykostrukturen findet, anfärbt. In Abbildung 53 ist die Coomassie-Färbung des Gels zu sehen. Die Färbung zeigt verschiedene Banden zwischen 10 kDa und 110 kDa. Die Färbung der Banden fällt unterschiedlich stark aus. Abbildung 54 zeigt die Färbung des Western Blots. Wie zu erwarten, färbt L10-1 bei dem Kulturüberstand einen Schmier an. Auch bei AD105-30-2 zeigt sich ein Schmier, was darauf hinweist, dass AD105-30-2 ebenfalls eine Glykostruktur erkennt.

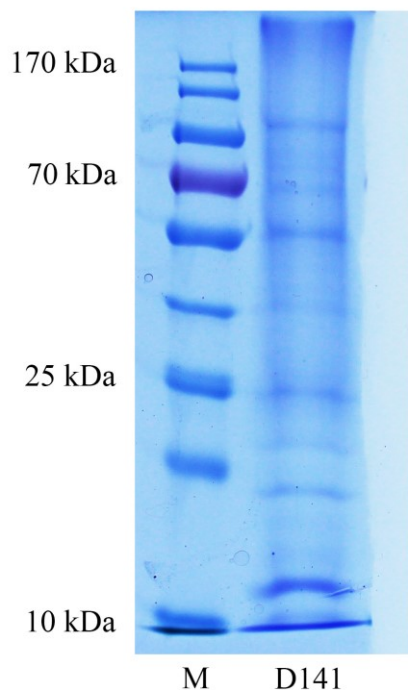


Abbildung 53: SDS-Gel des konzentrierten Kulturüberstands nach Coomassiefärbung. **M**: Marker, für ausgewählte Banden sind die Molekulargewichte angegeben.

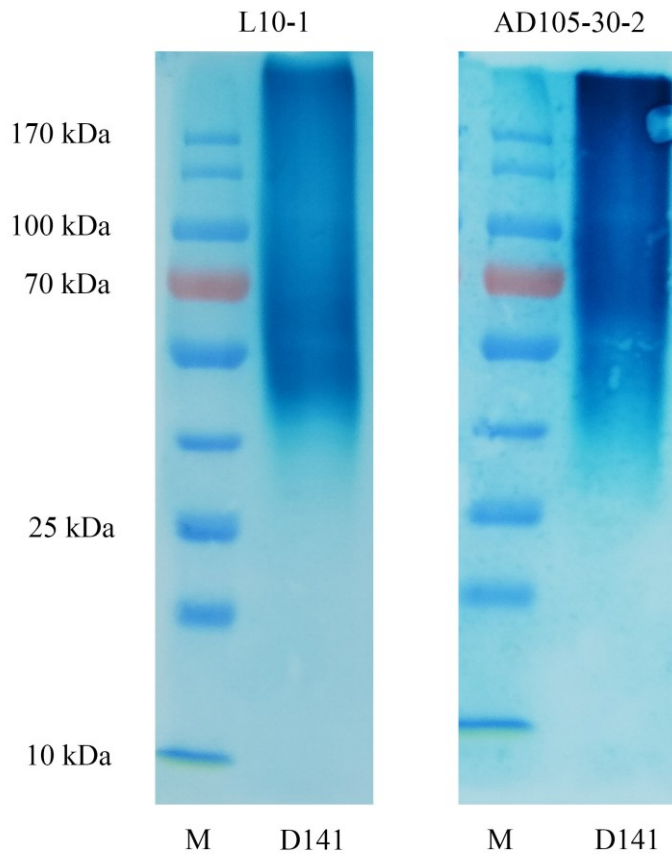


Abbildung 54: Western Blot-Färbung des konzentrierten Kulturüberstands mit L10-1 und AD105-30-2. **M**: Marker, für ausgewählte Banden sind die Molekulargewichte angegeben.

#### 2.4.6. ELISA von *Aspergillus* Zellwandbestandteilen

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Zugehörigkeit des Antikörpers AD105-30-2 zur IgM-Subklasse und die Ergebnisse des Western Blots gaben Anlass zur Vermutung, dass es sich bei diesem Antigen um eine Glykostruktur handelt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen zeigte, dass AD105-30-2 neben *F. oxysporum* ebenfalls Strukturen auf der Zellwand von *A. fumigatus* erkannte. Durch die freundliche Unterstützung von Dr. Vishukumar Aimanianda (Institut Pasteur, Paris) wurde in seinem Labor ein ELISA mit gereinigten Zellwandbestandteilen von *A. fumigatus* durchgeführt. Die Zellwand von *A. fumigatus* besteht hauptsächlich aus den Polysacchariden  $\beta$ -Glukan, Chitin und Galaktomannan (FONTAINE et al., 2000), ein weiterer Bestandteil der Hyphen- und Konidienzellwand ist  $\alpha$ -Glukan (MAUBON et al., 2006), das zusammen mit Galaktomannan und dem Heteropolysaccharid Galaktosaminogalaktan (GAG) eine extrazelluläre Matrix bildet (LOUSSERT et al., 2010). RodA

ist ein Hydrophobin, ein Protein, welches man auf der Oberfläche von Konidien findet. Das durch RodA gebildete Rodlet Layer dient den Konidien als Schutzschicht vor äußeren Einflüssen (PARIS et al., 2003). Ebenfalls einen Schutz vor enzymatischem Abbau oder reaktiven Sauerstoffspezies bietet das Melanin, das auf den Konidien zu finden ist (LANGFELDER et al., 2003). Der Abbildung 55A ist zu entnehmen, dass AD105-30-2 im ELISA der Zellwandbestandteile vorwiegend mit der GAG Fraktion interagiert. Das Heteropolysaccharid GAG besteht aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und Galaktosamin. Während der Biosynthese von GAG spielt die Deacetylierung von N-Acetylgalaktosamin eine bedeutende Rolle, durch sie wird GAG positiv geladen und kann dadurch auf negativ-geladenen Oberflächen adhären (LEE et al., 2016). Deshalb wurde ein zweiter ELISA mit Fraktionen von acetylierten und deacetylierten GAG durchgeführt (Abbildung 55B). Hierbei zeigte sich, dass AD105-30-2 insbesondere mit der acetylierten GAG Fraktion interagiert.

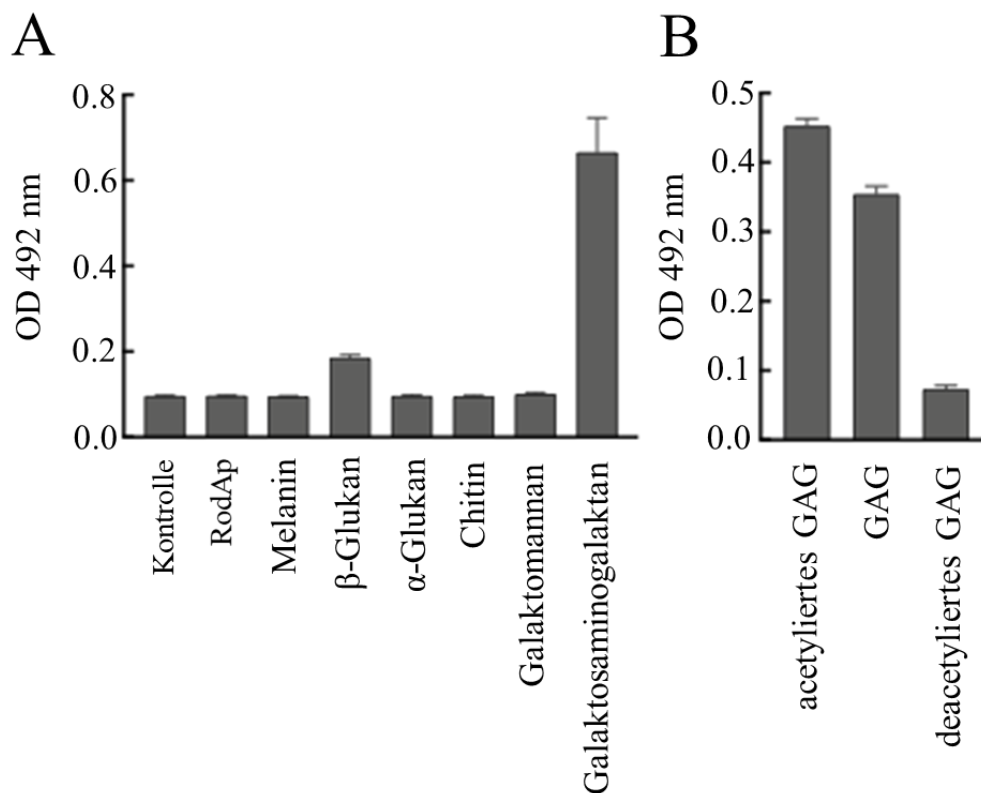


Abbildung 55: ELISA der Zellwandbestandteile (A) und GAG-Fraktionen (B). Im ELISA (A) zeigte sich, dass AD105-30-2 mit der GAG Fraktion reagiert. Ein weiterer ELISA (B) zeigte, dass AD105-30-2 vor allem mit der acetylierten Form von GAG interagiert.

#### 2.4.7. ELISA von *F. oxysporum* Kulturüberstand

Im Kulturüberstand können Antigene, wie sekretierte Proteine und Polysaccharide, von mAk enthalten sein. Dies kann mithilfe eines ELISA nachgewiesen werden. In den vorherigen Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass AD105-30-2 genauso wie AB135-8 *F. oxysporum* Hyphen erkennt und färbt. Um zu überprüfen, ob und in welchen Maßen die Antigene der Antikörper AB135-8 und AD105-30-2 auch beim Wachstum von *F. oxysporum* in Sabouraud-Medium in die Umgebung abgegeben werden, wurde ein ELISA mit Kulturüberstand von *F. oxysporum* durchgeführt. Zusätzlich wurde der Galaktomannan-spezifische Antikörper L10-1 eingesetzt. Für den ELISA wurden drei Teile des unverdünnten beziehungsweise 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> verdünnten Kulturüberstands mit einem Teil Bicarbonatpuffer, pH 9,6, versetzt. Es zeigte sich, dass AD105-30-2 ein starkes Signal im ELISA des *F. oxysporum* Kulturüberstandes aufwies. Das lässt darauf schließen, dass die Antigene während des Wachstums in großen Mengen in die Umgebung abgegeben werden. Auch der *Fusarium*-spezifische Antikörper AB135-8 wies ein positives Signal auf, welches jedoch im Vergleich zu AD105-30-2 geringfügig schwächer ausfiel. Der Antikörper L10-1 zeigte kein Signal im ELISA (Abbildung 56). Demnach wird keine detektierbare Menge an Galaktomannan von *F. oxysporum* in die Umgebung abgegeben.

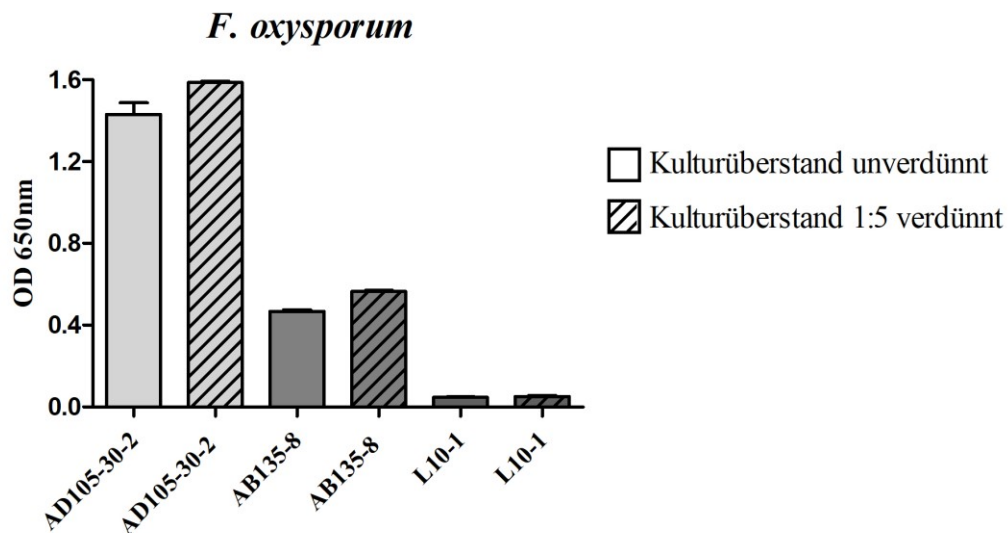


Abbildung 56: ELISA mit *F. oxysporum* Kulturüberstand. Der Antikörper AD105-30-2 zeigt ebenso wie AB135-8 ein deutliches Signal im ELISA. Der Galaktomannan Antikörper L10-1 ist negativ. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angesetzt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 2.4.8. ELISA von *A. fumigatus* Kulturüberstand

Für einen ELISA von Kulturüberstand von *A. fumigatus* wurde SD-Medium mit Sporen des *A. fumigatus* Stammes AfS35 beimpft. Nach Ernten des Kulturüberstandes (SD-Asp) konnte ein ELISA nach Protokoll durchgeführt werden. Da aufgrund der Ergebnisse des ELISA der Zellwandbestandteile GAG als mögliches Antigen für AD105-30-2 in Betracht gezogen werden konnte, wurde für diesen ELISA neben AD105-30-2 auch ein anti-GAG-Antikörper (Pasteur Institut, Paris) verwendet. Da die vorherigen Versuche zeigten, dass AD105-30-2 und AB135-8 Gemeinsamkeiten im Färbeverhalten von *F. oxysporum* und *A. fumigatus* aufwiesen, wurde auch dieser Antikörper im ELISA getestet. Ebenso wurde der Galaktomannan-spezifische Antikörper L10-1 eingesetzt, da von einer Abgabe von Galaktomannan in den Kulturüberstand auszugehen war und der Antikörper somit als Positivkontrolle diente. Der Abbildung 57 ist zu entnehmen, dass alle Antikörper im ELISA ein Signal aufwiesen. Am stärksten fiel das Signal für den Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1 aus. Galaktomannan wird demnach in großen Mengen in den Überstand abgegeben. Aber auch die Antigene, der Antikörper AD105-30-2, anti-GAG und AB135-8 konnten im Überstand nachgewiesen werden. Auch AD105-30-2 wies hierbei ein starkes Signal auf.

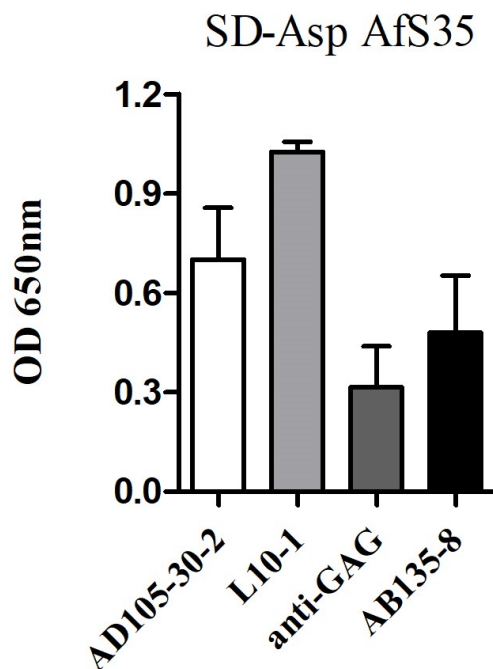


Abbildung 57: ELISA von SD-Asp Kulturüberstand. Alle Antikörper wiesen ein Signal im ELISA mit SD-Asp auf. Das Signal mit L10-1 fiel am stärksten aus. Auffällig ist das starke Signal für AD105-30-2. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angesetzt. Die Standardabweichungen sind angegeben.



#### 2.4.9. ELISA von D141 $\Delta$ *glfA* Kulturüberstand

Nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen sollte nun auch Kulturüberstand der D141 $\Delta$ *glfA*-Mutante untersucht werden, die keine *Galf* mehr bilden kann. Neben AD105-30-2 wurden auch die Antikörper L10-1 und AB135-8 getestet. Der ELISA zeigte, dass alle drei Antikörper im Kulturüberstand des Wildtyps ein Signal aufwiesen. Hierbei war das Signal von L10-1 am stärksten. Doch auch das Antigen von AD105-30-2 wird in großen Mengen in den Überstand abgegeben. Im Kulturüberstand der  $\Delta$ *glfA*-Mutante hingegen waren alle Antikörper negativ. Die Antigene der getesteten Antikörper enthalten demnach *Galf* oder aber werden nur zusammen mit Galaktomannan freigesetzt.

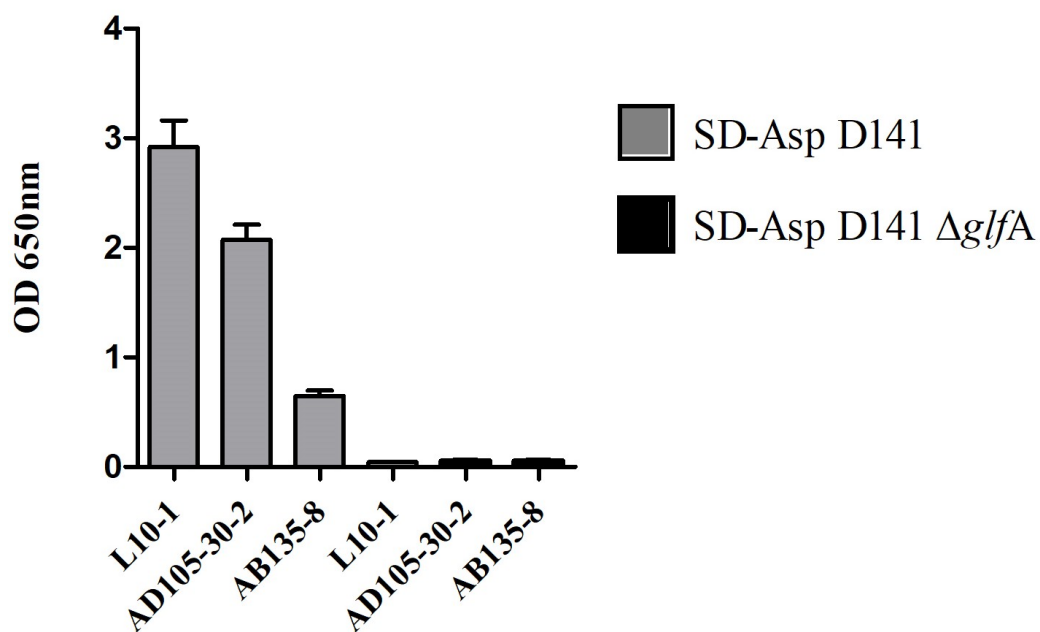


Abbildung 58: ELISA von *A. fumigatus* D141 und D141 $\Delta$ *glfA* Kulturüberstand mit den Antikörpern L10-1, AD105-30-2 und AB135-8. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angesetzt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 2.4.10. Immunfluoreszenzfärbung von *F. oxysporum* mit anti-GAG, L10-1 und AD105-30-2

Um zu überprüfen, ob auch *F. oxysporum* GAG oder Galaktomannan auf der Zellwandoberfläche trägt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von *F. oxysporum* Hyphen, die in Sabouraud-Medium über Nacht angezogen und fixiert wurden, mit AD105-30-2, L10-1 und anti-GAG durchgeführt. Eine Färbung mit CFW diente zum Anfärben des Chitins der Zellwand. Es konnte festgestellt werden, dass AD105-30-2, wie in vorherigen Versuchen, die Hyphen von *F. oxysporum* anfärbte und die Makrokonidien aussparte. Die Antikörper L10-1 und anti-GAG hingegen waren beide negativ. Das Ergebnis der L10-1 Färbung von *F. oxysporum* deckt sich mit den Ergebnissen von WIEDEMANN et al. (2016).

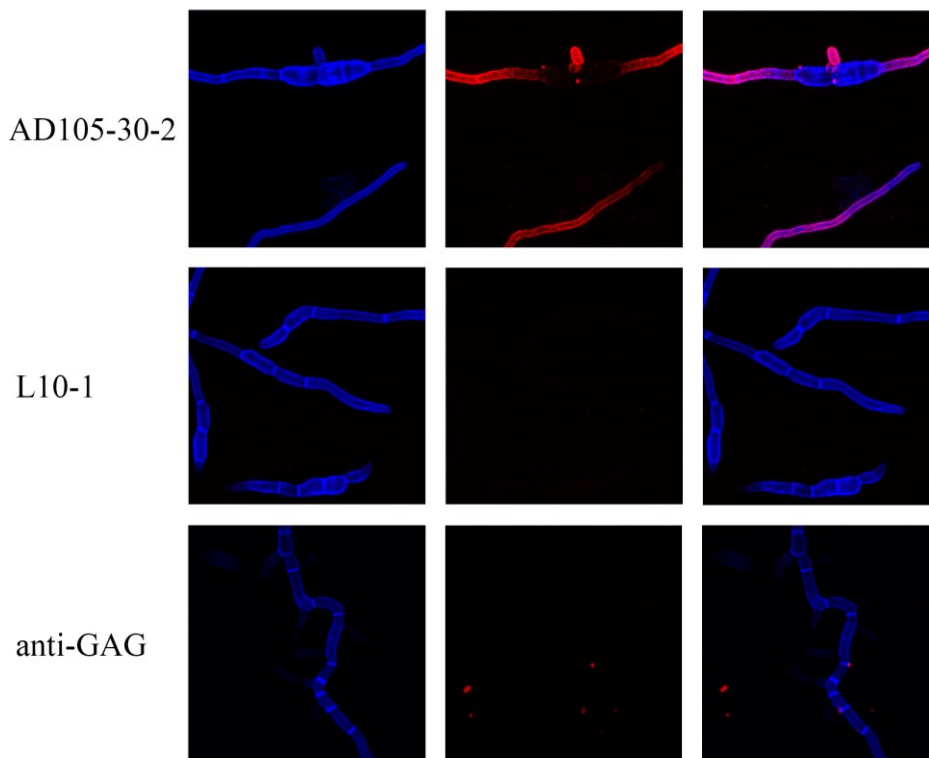


Abbildung 59: Immunfluoreszenzfärbung von in Sabouraud-Medium gewachsenen *F. oxysporum* Hyphen mit den Antikörpern (rot) AD105-30-2, L10-1, anti-GAG und CFW (blau). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerungen des roten und blauen Fluoreszenzkanals.

### 2.4.11. Galaktosaminogalaktan-Mutante $\Delta gtb3$

Im ELISA der *A. fumigatus* Zellwandbestandteile (siehe 2.4.6) zeigte sich, dass AD105-30-2 vor allem mit der GAG Fraktion interagiert. Dieses Polysaccharid besteht aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und Galaktosamin. Der Syntheseweg des GAG ist in Abbildung 60 dargestellt. Die Uge3 Glukose-4 Epimerase verwandelt UDP-Glukose und UDP-N-Acetylglukosamin in UDP-Galaktose und UDP-N-Acetylgalaktosamin. Die Zuckermoleküle werden daraufhin durch die Glykosyltransferase Gtb3 verbunden und über die Membran in den extrazellulären Raum transportiert. Das N-Acetylgalaktosamin des Polymers wird letztlich von der Deacetylase Agd3 deacetyliert (SPETH et al., 2019).

Um zu untersuchen, ob die Deletion des Gens *gtb3*, das für die Glykosyltransferase Gtb3 kodiert, einen Effekt auf das Antigen von AD105-30-2 hat, wurde eine entsprechende Deletionsmutante erstellt. Durch die Deletion des *gtb3*-Gens können die Bausteine des GAG nicht mehr verbunden und in den extrazellulären Raum transportiert werden. Somit kann eine  $\Delta gtb3$ -Mutante kein funktionsfähiges GAG mehr bilden (MIYAZAWA et al., 2022).

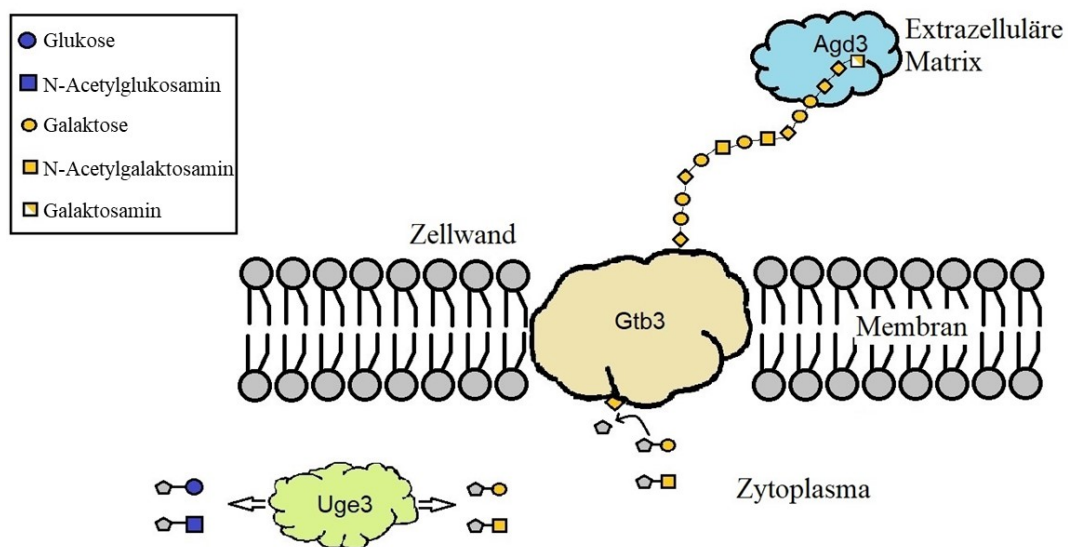


Abbildung 60: GAG Syntheseweg modifiziert nach SPETH et al. (2019).

### 2.4.11.1. Herstellung der $\Delta gtb3$ -Mutante

Zur Herstellung einer  $\Delta gtb3$ -Mutante wurde ein Deletionskonstrukt mittels Fusions-PCR hergestellt. Hierbei wurde der Upstream- und der Downstream-Bereich des *gtb3*-Gens sowie eine Hygromycin B-Resistenzkassette mittels PCR amplifiziert und dann über weitere PCR-Reaktionen fusioniert (Abbildung 61).

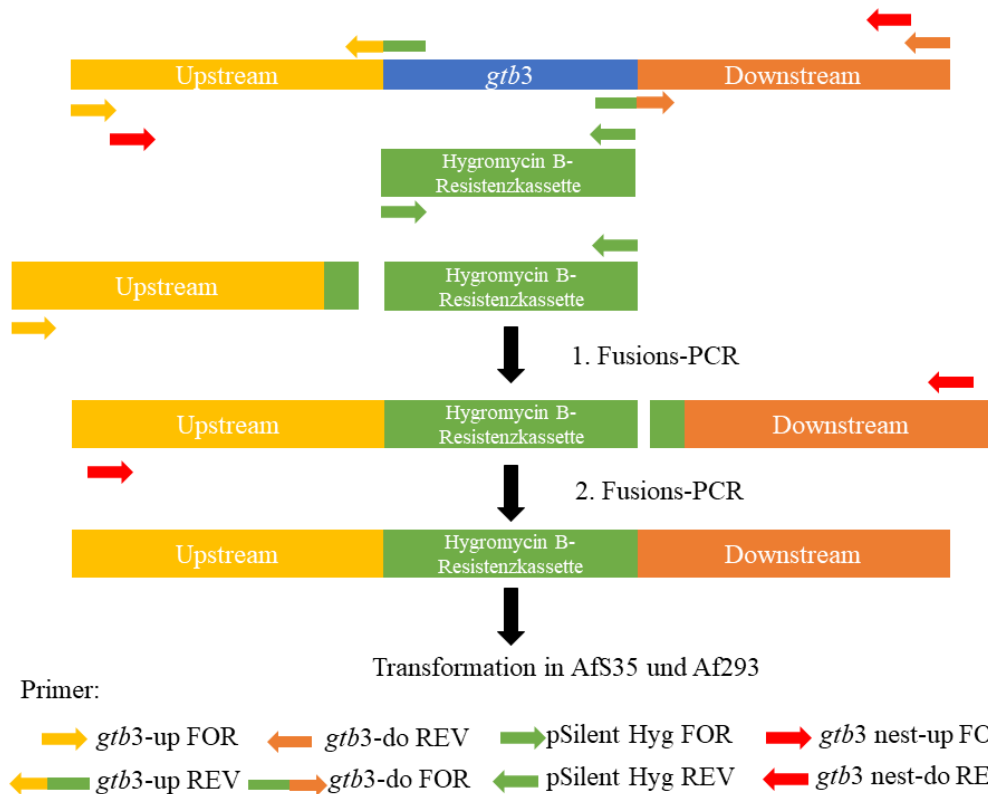


Abbildung 61: Schematische Darstellung des Prinzips der Fusions-PCR. Die grünen Bereiche der Amplifikate der Randbereiche überlappen mit der Sequenz der Hygromycin-Resistenzkassette.

Das dabei entstandene Konstrukt wurde anschließend in die *A. fumigatus* Stämme AfS35 und Af293 transformiert (Abbildung 62) und die Klone genetisch mittels PCR überprüft (Abbildung 63). Es wurden insgesamt drei verschiedene PCR durchgeführt, um zu kontrollieren, ob das Gen in den Klonen deletiert und die Hygromycin-Resistenzkassette aufgenommen wurde. Der Wildtypstamm AfS35 diente als Kontrolle. Zunächst wurden ein *Forward*-Primer, der im *Upstream*-Bereich des *gtb3*-Gens lag und ein *Reverse*-Primer der Hygromycin B-Resistenzkassette genutzt. Bei dieser PCR wurden bei den  $\Delta gtb3$ -Klonen zwei Banden sichtbar. Die obere Bande entsprach der zu erwartenden Größe von circa 1500 bp. Da die untere Bande ebenso beim Wildtypstamm AfS35 auftauchte ist hier von einer unspezifischen Bindung der Primer auszugehen. Weiterhin wurden zwei

PCR-Reaktionen mit Primern, die innerhalb des *gtb3*-Gens lagen, durchgeführt. Hierbei zeigten sich Banden mit den zu erwartenden Größen von 1000 bp und 1500 bp beim Wildtypstamm, jedoch nicht bei den  $\Delta$ *gtb3*-Klonen. Durch diese drei PCR-Reaktionen bestätigte sich, dass die ausgewählten Klone die Hygromycin B-Resistenzkassette integriert hatten und das *gtb3*-Gen nicht mehr nachzuweisen war.

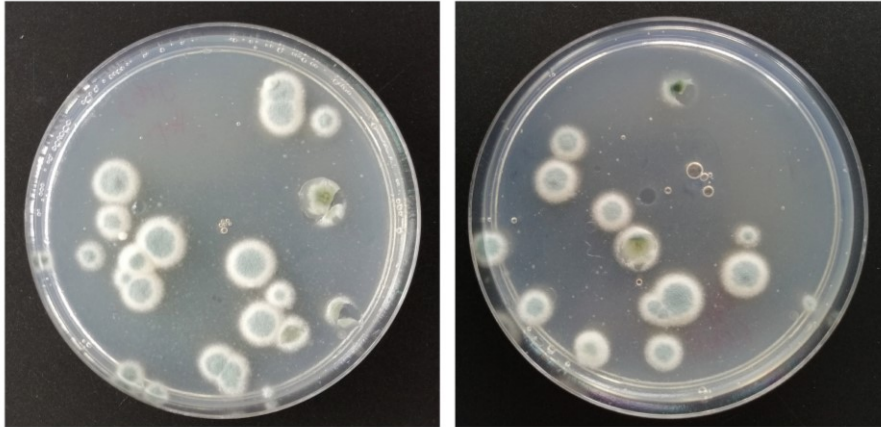


Abbildung 62: Transformation in AfS35. Nach erfolgreicher Transformation sind auf beiden Platten, die Hygromycin B als Selektionsmarker enthalten, Klone gewachsen. Die ausgewählten Klone wurden genetisch durch mehrere PCR getestet.

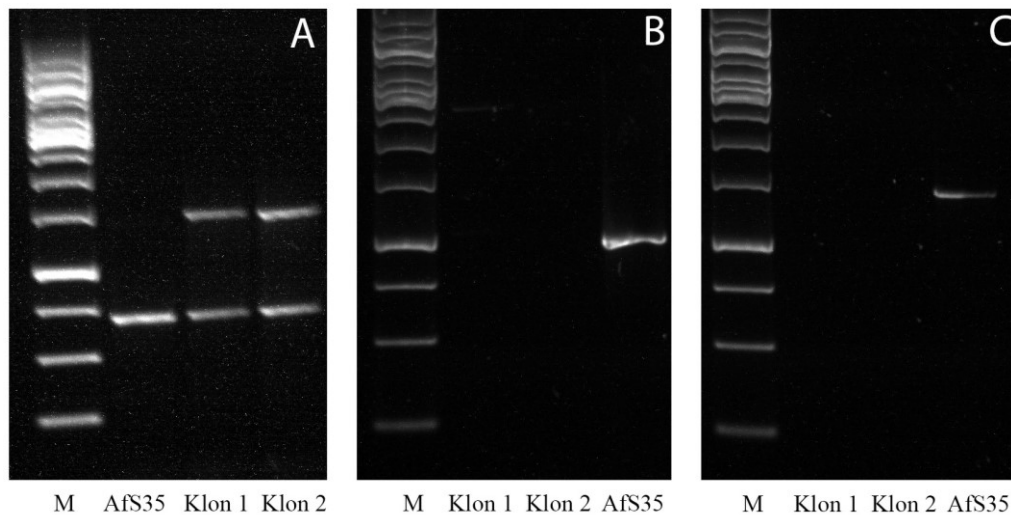


Abbildung 63: Agarose-Gel der PCR-Produkte. Nachweis der Hygromycin-Resistenzkassette (A) und der Deletion des Gens *gtb3* (B, C). Verwendete Primer: **A:** *gtb3*-up FOR / Hygromycin REV. Die obere Bande entspricht der zu erwartenden Größe von circa 1400 bp. Die untere Bande tritt sowohl beim Wildtypstamm als auch bei den Klonen auf. Hierbei ist von einer unspezifischen Bindung der Primer auszugehen. **B:** *gtb3* FOR / *gtb3*-intern REV. Bei AfS35 wurde die Bande mit den zu erwartenden 1000 bp sichtbar. **C:** *gtb3*-intern FOR / *gtb3* REV. Bei AfS35 wurde die Bande mit den zu erwartenden 1500 bp sichtbar.

#### 2.4.11.2. Immunfluoreszenzfärbung der $\Delta gtb3$ -Mutante

Da Hyphen der  $\Delta gtb3$ -Mutante durch das Fehlen von GAG nur noch schwer auf Oberflächen adhären und sich beim Waschen leicht ablösen, wurde die Färbungen der Mutanten in einer *Life Cell Imaging*-Kammer durchgeführt, die zuvor mit dem IgG<sub>1</sub>-Antikörper AB90-E8 beschichtet wurde, um die Hyphen so besser binden zu können. Zunächst wurden die Hyphen der Afs35 $\Delta gtb3$ -Mutante mit dem Galaktomannan-Antikörper L10-1 gefärbt. Die Mutante zeigte eine gleichmäßige, L10-1 typische Färbung entlang der Hyphen (Abbildung 64). Die Sporen wiesen keine Färbung auf. Galaktomannan wird somit auch in der Afs35 $\Delta gtb3$ -Mutante gleichmäßig gebildet. L10-1 kann demnach in weiteren Versuchen als Positivkontrolle eingesetzt werden.

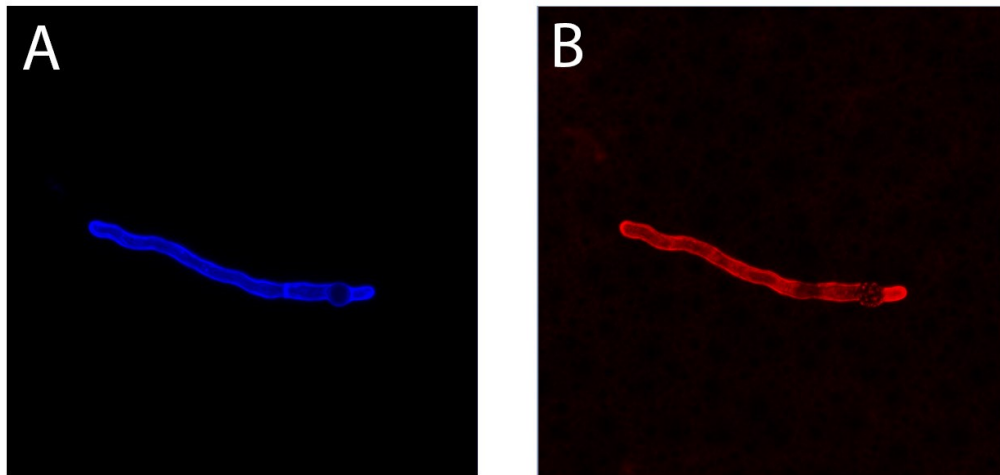


Abbildung 64: Immunfluoreszenzfärbung der Afs35 $\Delta gtb3$ -Mutante mit L10-1 (rot) und CFW (blau).

Um zu überprüfen, ob es sich beim Antigen von AD105-30-2 um GAG handelt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Af293 $\Delta gtb3$ -Mutante mit AD105-30-2 durchgeführt. Als Kontrollfärbung wurde L10-1 verwendet, da durch den vorherigen Versuch davon auszugehen war, dass auch die Af293 $\Delta gtb3$ -Mutante Galaktomannan auf ihrer Zellwand trägt. Auch der anti-GAG Antikörper (Institut Pasteur, Paris) wurde eingesetzt, um zu bestätigen, dass die Mutante kein GAG mehr bildet. Die Färbung mit AD105-30-2 war in der  $\Delta gtb3$ -Mutante deutlich schwächer als im Wildtyp Af293 und nur noch entlang vereinzelter Hyphen zu erkennen. Der anti-GAG-Antikörper wies keine Färbung der  $\Delta gtb3$ -Mutante auf, was bestätigte, dass die Mutante nicht mehr in der Lage ist, funktionsfähiges GAG

zu bilden. Der L10-1 Antikörper färbte die Mutante homogen entlang der Hyphen. Ähnliche Färbungen mit AD105-30-2 wurden ebenfalls für die AfS35 $\Delta$ *gtb3*-Mutante beobachtet (Daten nicht gezeigt).

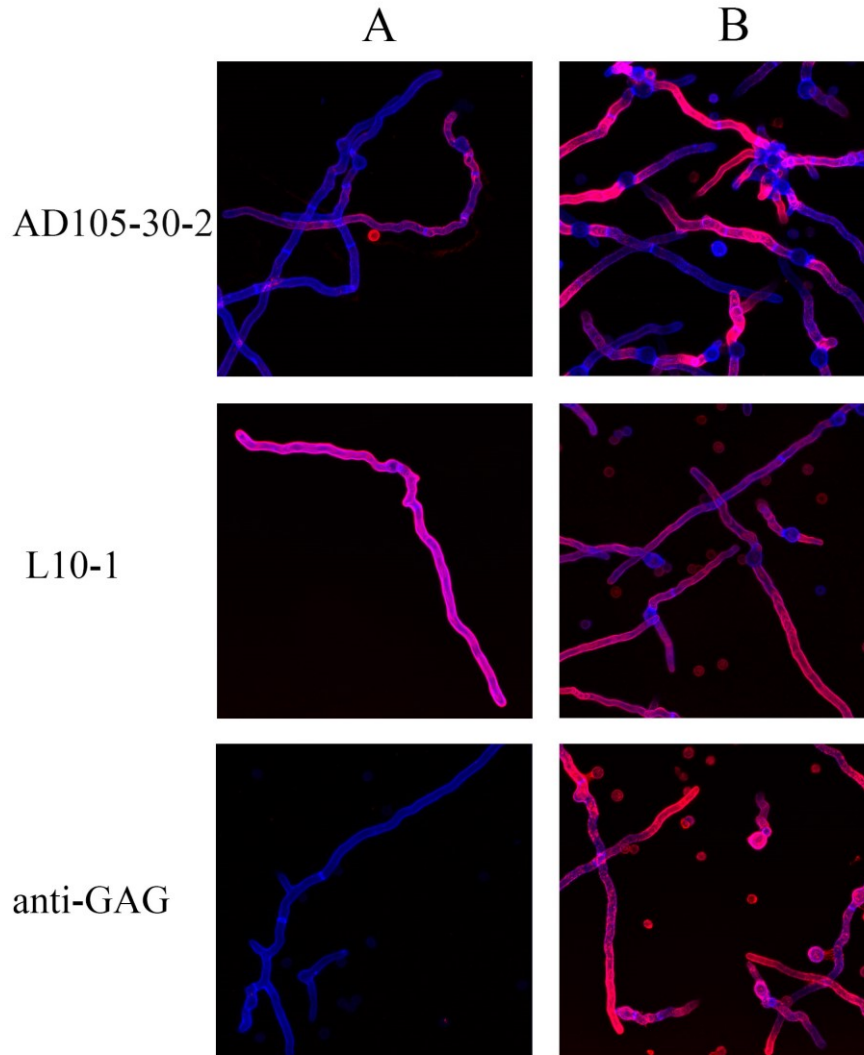


Abbildung 65: Immunfluoreszenzfärbung der  $\Delta$ *gtb3*-Mutante und des entsprechenden Wildtypstamms Af293 mit AD105-30-2, L10-1 und anti-GAG. **A:** Af293 $\Delta$ *gtb3* **B:** Af293 Wildtypstamm. Die Bilder zeigen Überlagerungen des roten und blauen Fluoreszenzkanals. Antikörper = rot, CFW = blau.

### 2.4.11.3. ELISA der $\Delta gtb3$ -Mutante

Auch von der  $\Delta gtb3$ -Mutante und dem entsprechenden Wildtypstamm AfS35 wurde Kulturüberstand in SD-Medium (SD-Asp) hergestellt und ein ELISA durchgeführt. Da der Antikörper L10-1 in der Immunfluoreszenzfärbung positiv war, wurde er ebenfalls im ELISA getestet. In Abbildung 66 sind die Ergebnisse für den Stamm AfS35 und die entsprechende Mutante dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass Galaktomannan nicht nur auf der Zellwand der  $\Delta gtb3$ -Mutante zu finden ist, sondern auch wie beim Wildtyp während des Wachstums in den Überstand abgegeben wird. Der Antikörper AD105-30-2 hingegen wies ein deutliches reduziertes Signal im  $\Delta gtb3$ -Kulturüberstand auf. Demnach wird das Antigen von AD105-30-2 in der Mutante, der das essenzielle Gen zur GAG-Biosynthese fehlt, nur in geringem Maße in den Überstand abgegeben oder gebildet.

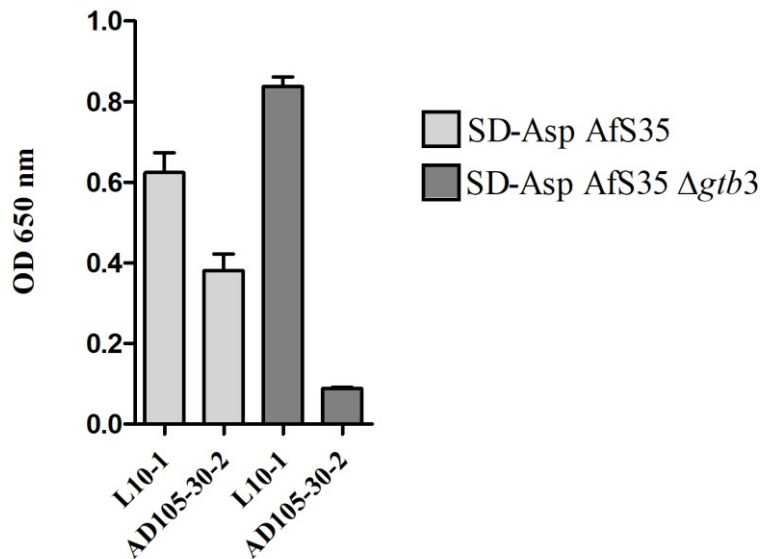


Abbildung 66: ELISA von AfS35 und AfS35 $\Delta gtb3$  SD-Asp mit den Antikörpern L10-1 und AD105-30-2. Alle Proben wurden im Dreifachansatz angesetzt. Die Standardabweichungen sind angegeben.



## V. DISKUSSION

Trotz des stetigen Fortschritts der Medizin schreitet die Therapie- und Impfstoffentwicklung in Bezug auf Pilzinfektionen nur langsam voran. Gleichzeitig steigt jedoch die Inzidenz von invasiven Mykosen. Dies liegt unter anderem an der steigenden Anzahl an immunsupprimierten oder vorerkrankten Patienten, die sehr anfällig gegenüber invasiver Mykosen sind (BROWN et al., 2012). Auch die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber gängigen Wirkstoffen führt zudem zu invasiveren Verläufen. Neben den Hauptauslösern *A. fumigatus* und *Candida albicans* sind inzwischen auch andere Schimmelpilze wie *A. terreus*, *Fusarium* spp. oder Vertreter der Mucorales auf dem Vormarsch und nehmen immer mehr an Bedeutung zu (LARCHER et al., 2021). Daher ist es unabdingbar die Mechanismen, die zur Pathogenität eines Erregers führen, besser zu verstehen und so eventuelle Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wurden spezielle Konidien, die fast ausschließlich bei *A. terreus* auftreten, näher charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden drei verschiedene mAk, die mit *A. fumigatus*, *Lichtheimia* spp. und *F. oxysporum* interagieren, charakterisiert, auch mit dem Ziel ihre jeweiligen Antigene zu identifizieren.

### 1. Charakterisierung der Aleuriokonidien (AC) von *Aspergillus terreus*

Ausgangspunkt für diesen Teil der Arbeit war die Isolierung des Stammes At17-14 aus der Niere eines Hundes, der an einer disseminierten Mykose verstarb. Das Isolat wurde als *A. terreus* identifiziert und zeigte eine besonders effektive Bildung von AC.

Innerhalb der Gattung *Aspergillus* besitzen nur einige wenige Spezies, insbesondere *A. terreus* und Vertreter des *A. terreus* Spezieskomplexes, die Fähigkeit AC zu bilden (LACKNER et al., 2019). Im Vergleich zu PC sind AC wesentlich größer. Sie werden im Gegensatz zu PC in Flüssigkultur (DEAK et al., 2009) und in infiziertem Gewebe gebildet (SELIGSOHN et al., 1977; WALSH et al., 2003) und können so die Ausbreitung des Pilzes über den Blutkreislauf fördern. Durch diese Eigenschaften und ihrer Fähigkeit eine starke Entzündungsreaktion auszulösen,

wurden AC als ein wichtiges Virulenzmerkmal von *A. terreus* diskutiert (DEAK et al., 2011; LASS-FLÖRL et al., 2021). Bei einer Infektion steht die Oberfläche der AC im direkten Kontakt mit Immunzellen. Die starke Immunantwort auf AC deutet somit darauf hin, dass zellwandgebundene PAMP von den entsprechenden PRR der Immunzellen erkannt werden. Kohlenhydratantigene sind wichtige pilzpathogene PAMP.  $\beta$ -Glukan und Galaktomannan sind hierfür gute Beispiele, da bereits gezeigt werden konnte, dass beide starke entzündungsfördernde Immunreaktionen hervorrufen (VASSALLO et al., 2000; CHIODO et al., 2014). In diesem Teil der Arbeit wurden zwei verschiedene mAk verwendet, um die Verteilung dieser beiden Antigene auf AC zu untersuchen: Der mAk 2G8 erkennt  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukane (TOROSANTUCCI et al., 2009) und L10-1 erkennt  $\beta$ -1,5-Gal-f-Seitenketten von Galaktomannan (HEESEMAN et al., 2011). Mit 2G8 waren die Hyphenoberflächen von At17-14 entweder negativ oder es waren lediglich kleine, punkthafte Färbungen zu erkennen. Auf AC erkannte 2G8 jedoch deutliche Strukturen, ähnlich denen, die zuvor auf AC mit einer löslichen Form des  $\beta$ -Glukanrezeptors Dectin-1 gefärbt worden waren (WILLMENT et al., 2001; DEAK et al., 2011). Die  $\beta$ -Glukan-positiven Strukturen waren oft ringförmig und ähnelten den Sprossungsnarben, die man auf Hefezellen findet. AC, die noch an der Hyphe befestigt waren, wurden von den  $\beta$ -Glukan-spezifischen Antikörpern nicht erkannt, was darauf hindeutet, dass die Loslösung der AC von der Hyphenoberfläche zu einer Freilegung der  $\beta$ -Glukan-Antigene führt. Daraus lässt sich schließen, dass  $\beta$ -Glukan bereits im Inneren der AC-Zellwand, aber nicht auf ihrer Oberfläche vorhanden war. Für *A. fumigatus* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass zuvor verdecktes  $\beta$ -Glukan erst auf der Oberfläche von angeschwollenen Konidien und Keimschläuchen sichtbar wird (HOHL et al., 2005). Im Verlauf des Hyphenwachstums wird das  $\beta$ -Glukan jedoch wieder zunehmend unzugänglicher und die Erkennung durch Dectin-1 nimmt im Vergleich zu angeschwollenen Konidien und Keimschläuchen deutlich ab (STEELE et al., 2005). GRAVELAT et al. (2013) zeigten, dass  $\beta$ -Glukan sowie weitere PAMP, die sich auf der Hyphenzellwand befinden, durch das Polysaccharid GAG verdeckt und somit für das Immunsystem unkenntlich gemacht werden.

Nach der Auskeimung konnten zwei Umverteilungsmuster für  $\beta$ -Glukan auf AC unter in vitro Bedingungen und in infizierten Makrophagen beobachtet werden. Die Antigene waren entweder über die gesamte Oberfläche der Konidienkörper verteilt

oder besonders an den Stellen angereichert, an denen Keimschläuche entstanden. Die Umverteilung der  $\beta$ -Glukan-positiven Strukturen während der Auskeimung resultieren höchstwahrscheinlich aus Umstrukturierungen der Zellwand. Es ist bekannt, dass die Zellwand und die Oberfläche der Konidien von *A. fumigatus* erheblichen Veränderungen unterworfen sind, die mit einer starken Schwellung des Konidienkörpers einhergehen (ROHDE et al., 2002; DAGUE et al., 2008). Im Gegensatz zu PC nimmt der Durchmesser von AC während der Auskeimung nur geringfügig zu. Ob dieses moderate isotrope Wachstum die beobachteten Reorganisationen der  $\beta$ -Glukan-positiven Strukturen auslösen kann, kann zurzeit nicht beantwortet werden.

Die Zellwand von *A. fumigatus* besteht hauptsächlich aus  $\beta$ -1,3- und 1,6-Glukan,  $\alpha$ -1,3-Glukan, Chitin und Galaktomannan (FONTAINE et al., 2000; LATGÉ et al., 2005; BEAUVAIS et al., 2013). Galaktomannan setzt sich aus  $\alpha$ -1,2/1,6-Mannan und kurzen  $\beta$ -1,5-GalF-Seitenketten zusammen (LATGÉ et al., 1994). Auf der Oberfläche von ruhenden Konidien ist es nicht vorhanden. Erst während der Auskeimung bei der Entstehung des Keimschlauches wird es freigelegt, wobei Konidienkörper auch dann nur eine geringe Menge auf ihrer Oberfläche tragen (HEESEMAN et al., 2011). In dieser Arbeit wurde Galaktomannan als ein Hauptantigen der Oberfläche von AC identifiziert. Im Gegensatz zu  $\beta$ -Glukan ist Galaktomannan homogen über die gesamte Oberfläche der AC verteilt. Wie bei *A. fumigatus* ist auch auf der Oberfläche von *A. terreus* PC Galaktomannan weitestgehend abwesend, aber auf der Zellwand der Hyphen zu finden. Die Färbung der Hyphen fiel im Vergleich zu den AC jedoch schwächer und unregelmäßiger aus. Auffallend war, dass AC schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium als stark Galaktomannan-positive Strukturen nachweisbar waren, obwohl die entstehenden Sporen lichtmikroskopisch kaum sichtbar waren. Das heißt, die Bereiche, in denen sich die AC bilden, unterscheiden sich deutlich von der restlichen Hyphenzellwand. Die Auskeimung von AC hatte keinen offensichtlichen Einfluss auf das Vorhandensein und die Verteilung von oberflächenverfügbarem Galaktomannan. Dies und das Fehlen narbenartiger Strukturen deuten darauf hin, dass Galaktomannan homogen in der Zellwand der AC verteilt ist.

Auf den mikroskopischen Bildern auskeimender AC konnte man beobachten, dass die Konidien in der Lage sind, gleichzeitig mehrere Keimschläuche auszubilden. Dies könnte mit dem zuvor beobachteten, aber nicht genau beschriebenen,

Hyperpolarisations-Phänotyp von AC übereinstimmen (DEAK et al., 2011). Das Wachstum an mehreren Stellen unterscheidet AC eindeutig von PC und ermöglicht es AC schnell kleine Hyphengeflechte zu bilden, die während der Infektion eine Phagozytose verhindern können.

Bei weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die AC des Stammes At17-14 sichtlich schneller auskeimten als die entsprechenden PC. Ein Vergleich von *A. fumigatus* und PC eines weiteren *A. terreus* Stammes zeigte, dass die AC sogar etwas schneller als PC von *A. fumigatus* und deutlich schneller als PC von *A. terreus* auskeimten. Ein deutlicher Unterschied der Auskeimungsgeschwindigkeit von *A. terreus* und *A. fumigatus* PC wurde bereits von SLESIONA et al. (2012a) berichtet. Das Ergebnis des Auskeimungsversuchs dieser Arbeit steht im Einklang mit den Beobachtungen von DEAK et al. (2009), die AC von zwei *A. terreus* Stämmen untersuchten. Eine größere Studie mit AC und PC von 15 Stämmen des *A. terreus* Komplexes ergab jedoch, dass die Auskeimung von AC oft langsamer ist als die der entsprechenden PC (LACKNER et al., 2019). Dies lässt vermuten, dass Kultivierungsbedingungen und stammspezifische Unterschiede die Geschwindigkeit des Auskeimungsprozesses beeinflussen können. AC könnten aufgrund ihrer Größe zudem mehr Speicherstoffe besitzen, wodurch sie sich in einer besseren Ausgangslage befinden als PC. Die Tatsache, dass ihnen die schützende Proteinhülle, die die Germination von PC erschwert, fehlt und AC zudem eine höhere metabolische Aktivität aufweisen (DEAK et al., 2009), spricht ebenfalls dafür, dass AC in der Lage sind schneller auszukeimen. Die widersprüchlichen Daten, die bisher veröffentlicht wurden, sollten daher nochmals überprüft werden.

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, wie AC und PC auf eine Austrocknung reagieren. PC werden an der Luft gebildet und dienen dem Pilz als Überdauerungsform unter ungünstigen Umweltbedingungen. Sie besitzen eine hydrophobe Schutzschicht und Melanin, wodurch sie gegen äußere Einflüsse geschützt werden (LANGFELDER et al., 2003; PARIS et al., 2003). Der Versuch zeigte, dass AC im Vergleich zu PC wesentlich sensitiver gegenüber einer Austrocknung waren. Da den AC die beiden oben genannten, wichtigen Komponenten fehlen (DEAK et al., 2009), können sie vermutlich eine Austrocknung nur sehr schlecht tolerieren. Auch gegenüber anderen, mit aerogener Übertragung assoziierten, Stressfaktoren wie UV-Licht oder oxidativem Stress sind

sie so höchstwahrscheinlich weitaus sensitiver. AC könnten somit eine spezielle Überdauerungsform in Flüssigkeit und in Abwesenheit von Luft darstellen, denn unter diesen Bedingungen können keine PC gebildet werden. AC kommen zudem wahrscheinlich im Vergleich zu Hyphen mit weniger Nährstoffen aus, was ebenfalls einen Vorteil im Überleben in Flüssigkeit darstellen kann. Um herauszufinden, ob AC durch die Austrocknung vollständig abgetötet werden und sich somit nicht mehr regenerieren können, müssen weitere Versuche durchgeführt werden. In diesem Versuch konnte nach 14 Stunden keine Auskeimung beobachtet werden. Jedoch kann zurzeit nicht ausgeschlossen werden, dass AC eine längere Regenerationszeit benötigen als PC.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Interaktionen von AC mit Zellen der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 untersucht. AC wurden schnell aufgenommen und blieben nach der Internalisierung zunächst für mehrere Stunden in einem Ruhezustand, während extrazelluläre AC, die der Phagozytose zum Beispiel in Gebieten ohne Makrophagen entkamen, bereits kleine Netzwerke aus verzweigten Hyphen bildeten. Die Phagozytose verzögerte somit eindeutig die Auskeimung der AC oder verhinderte sie sogar ganz. Nach sechsstündiger Infektion befanden sich mehr als 70 % der AC in Vakuolen, die mit dem Farbstoff *LysoTracker* DND26 angefärbt waren, was auf eine Ansäuerung und Reifung der Vesikel zu Phagolysosomen hinweist. In AMM, das auf pH 5 eingestellt war, einem Wert, der zuvor für Phagolysosomen von J774-Zellen beschrieben wurde (KUEHNEL et al., 2001), zeigten AC eine normale Auskeimung. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete verzögerte Auskeimung nicht auf die angesäuerten Bedingungen zurückzuführen ist. Eine Erklärung hierfür wäre, dass sich in Phagolysosomen kaum Nährstoffe befinden und die Sporen sich dort außerdem mit antimikrobiellen Effektormechanismen auseinandersetzen müssen.

AC, die während einer Infektion Keimschläuche gebildet hatten, wiesen auf ihrer gesamten Oberfläche  $\beta$ -Glukan-Antigene auf. Dies war in Versuchen von Hyphen, die in normaler Kultur gewachsenen waren, ebenfalls bereits vereinzelt zu beobachten. Während der Infektion mit J774-Zellen könnte es demzufolge zu einer Umstrukturierung der Zellwand kommen, wodurch das  $\beta$ -Glukan freigelegt und für den Antikörper zugänglicher wird. Zudem konnte man eine Freisetzung von Galaktomannan-Antigen von der Oberfläche internalisierter AC beobachten. Solche Galaktomannan-positiven Strukturen waren im Zytoplasma und unter der

zytoplasmatischen Membran infizierter Makrophagen nachweisbar. Das Zellwandmaterial wird demnach von der AC-Oberfläche freigesetzt und wandert vom Phagolysosom in das Zytoplasma. Ob diese Antigene in irgendeiner Weise verarbeitet werden und eine Reaktion der Wirtszelle auslösen können, ist noch nicht geklärt. Verschiedene Studien haben bereits mehrere Rezeptoren beschrieben, die an der Erkennung von Galaktomannan beteiligt sein sollen (GARLANDA et al., 2002; SERRANO-GÓMEZ et al., 2004; CHIODO et al., 2014; STEGER et al., 2019), aber es wird weitere Untersuchungen erfordern, um die immunologische Relevanz des Galaktomannan-Antigens auf *A. terreus* AC zu definieren.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass PC von *A. terreus* nach der Phagozytose in Makrophagen persistieren, wohingegen PC von *A. fumigatus* in der Lage sind die Phagozytose und Ansäuerung der Phagolysosomen zu umgehen und auszukeimen (SLESIONA et al., 2012a). In einem Infektionsversuch dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass viele AC nach 24-stündiger Inkubation mit J774-Makrophagen begannen auszukeimen, was zeigt, dass diese Sporen noch lebensfähig waren und die Abwehrmechanismen der Phagozytose überwinden konnten. Das Persistieren der PC wurde bisher als Mechanismus von *A. terreus* diskutiert, um in weiter entfernte Organe zu gelangen. In Verbindung mit AC, die den Makrophagen entkommen und in der Lage sind schnell ein Hyphennetzwerk bilden zu können, könnte dies unter anderem eine Erklärung für die häufig invasiveren Verläufe von *A. terreus* sein.

DEAK et al. (2011) konnten bereits zeigen, dass AC im Vergleich zu PC eine starke Zytokinproduktion in AM auslösen und vermuteten, dass das auf der AC-Oberfläche vorhandene  $\beta$ -Glukan Grund für diese Immunantwort ist. Auch in dieser Arbeit konnte in Versuchen mit murinen J774-Zellen gezeigt werden, dass die Produktion von TNF $\alpha$  durch AC deutlich stärker induziert wird als durch PC. Eine vorherige Inkubation der J774-Zellen mit dem löslichen  $\beta$ -Glukan Laminarin zur Sättigung des Dectin-1-Rezeptors hatte sowohl in infizierten als auch uninfizierten Zellen keinen Einfluss auf die Produktion von TNF $\alpha$ . Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Immunantwort nicht allein durch die Anwesenheit von  $\beta$ -Glukan ausgelöst wird. Das Ergebnis deckt sich mit dem des Phagozytoseversuchs, bei dem Laminarin ebenfalls keinen Einfluss auf die Phagozytoserate von AC hatte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AC von *A. terreus* durch ihre starke und

homogene Galaktomannan-Färbung eindeutig von PC unterschieden werden können. Das Vorhandensein von Galaktomannan auf der Oberfläche von AC lässt sich auf die Entstehung aus vegetativen Hyphen zurückführen, die ebenfalls Galaktomannan auf ihrer Oberfläche aufweisen. Bei PC findet man kein Galaktomannan auf der Oberfläche ruhender Konidien, was mit der Schutzhülle der PC zusammenhängen kann. Es wird erst im Laufe des Auskeimungsprozesses freigelegt, der Konidienkörper an sich bleibt jedoch trotzdem weitestgehend Galaktomannan-negativ. Die schnelle Auskeimung von AC unter nährstoffreichen Bedingungen deutet darauf hin, dass AC im Vergleich zu PC eine höhere Stoffwechselaktivität besitzen. Dies könnte eine weitere Erklärung für die Empfindlichkeit der AC gegenüber Austrocknung sein. Aufgrund der beobachteten Produktion von AC in infiziertem Gewebe, könnten AC möglicherweise zur Verbreitung von *A. terreus* an sekundäre Infektionsherde beitragen, was insbesondere bei der durch *A. terreus* ausgelösten invasiven Aspergillose eine schwere Komplikation darstellt, die bei dieser Spezies sehr häufig beobachtet wird.

Durch die Versuche dieser Arbeit sollten AC näher charakterisiert werden, um ihre Funktion in *A. terreus* besser zu verstehen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass große Mengen an Galaktomannan auf der Oberfläche von AC zu finden sind. Um die Relevanz dieses Antigens näher zu beleuchten, könnte in weiteren Versuchen eine  $\Delta glfA$ -Mutante hergestellt werden. Hierdurch kann keine *Galf* mehr produziert werden, welche jedoch essenziell für die Bildung von Galaktomannan ist. Die Auswirkung des Verlusts dieses präsenten Oberflächenantigens auf Überleben, Auskeimung sowie Verhalten in Infektionsversuchen von AC könnte so näher untersucht werden. Zudem könnten Versuche mit anderen Immunzellen wie PMN durchgeführt werden, um weiteren Aufschluss über die Interaktion von AC mit Zellen des Immunsystems zu erlangen.

## 2. Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) und ihren Antigenen

In diesem Teil der Arbeit sollten zunächst die zwei mAk AB90-E8 und AE183-3 gereinigt und näher charakterisiert werden. Weiterhin sollte die biologische Aktivität von AB90-E8 im Zusammenhang mit PMN untersucht werden, um seinen potenziellen protektiven Effekt zu evaluieren. Zusätzlich sollte das Antigen des mAk AD105-30-2 näher untersucht werden. Alle drei mAk binden an Oberflächenstrukturen von Hyphen bestimmter pathogener Pilze. Während AB90-E8 sehr spezifisch *A. fumigatus* erkennt, ist der mAk AE183-3 in der Lage bestimmte Vertreter der Ordnung Mucorales zu erkennen. Der mAk AD105-30-2 fiel auf, da er sowohl *A. fumigatus* als auch *F. oxysporum* erkannte.

### 2.1. Der monoklonale Antikörper AB90-E8 und sein Antigen

Der mAk AB90-E8 entstand in der eigenen Arbeitsgruppe durch Immunisierung von Mäusen mit Hyphenmaterial von *A. fumigatus* und gehört der IgG<sub>1</sub>-Subklasse an. Die meisten mAk, die durch Immunisierung mit Hyphenmaterial generiert werden, erkennen Glykoantigene. Neben verschiedenen Polysacchariden finden sich auf der Zellwand von *A. fumigatus* auch membranassoziierte Proteine, von denen viele über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellwand verbunden sind (SAMALOVA et al., 2020). Den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Folge, erkennt der mAk AB90-E8 höchstwahrscheinlich ein Protein auf der Hyphenzellwand von *A. fumigatus*. Bereits die IgG<sub>1</sub>-Subklasse des Antikörpers gibt Anlass zu dieser Vermutung, da diese Subklasse vornehmlich Protein- und Polypeptidantigene bindet. Proteinantigene lösen eine weitaus stärkere T-Zellantwort im Körper aus als Polysaccharidantigene. Durch die in diesem Prozess freigesetzten Zytokine kommt es zur einem Klassenwechsel von IgM zu IgG-Antikörpern (MURPHY und WEAVER, 2017b). Eine wichtige Bedeutung erhält das AB90-E8-Antigen, da die Bindungstasche dieses mAk kürzlich zur Herstellung von *Aspergillus*-spezifischen CAR eingesetzt wurde. Mit diesem Rezeptor ausgestattete T-Zellen waren in der Lage *A. fumigatus* Hyphen spezifisch zu erkennen und vermittelten in infizierten Mäusen einen Schutz vor einer invasiven Aspergillose (SEIF et al., im Druck). Die Identifizierung des Antigens von AB90-E8 ist daher von großem Interesse, um zu erfahren, was die CAR erkennen.



Zu Beginn der Arbeit wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener *Aspergillus* Spezies mit AB90-E8 durchgeführt. Der Antikörper erkannte alle *A. fumigatus* Wildtypstämme sowie klinische Isolate und färbte diese entlang der Hyphen an. Andere getestete *Aspergillus* Spezies waren bis auf *A. fischeri* negativ. Um weitere Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von anderen Mikroorganismen durchgeführt, die ebenfalls alle negativ waren. Die Tatsache, dass AB90-E8 lediglich *A. fumigatus* erkannte und nur mit dem nahe verwandten *A. fischeri* (SAMSON et al., 2014) kreuzreagierte, weist auf ein Proteinantigen hin, da Proteine sehr spezifisch für einzelne Spezies sein können, während andere Antigene, zum Beispiel Glykostrukturen, in der Regel deutlich besser konserviert sind. Diese Vermutung wird untermauert, da das Antigen sensitiv gegenüber einer Proteinase K-Verdauung war. Gleichzeitig blieb das Antigen nach einer Perjodat-Behandlung, die Glykoantigene zerstört, stabil. Das Antigen von AB90-E8 verteilte sich bei allen Wildtypstämmen von *A. fumigatus* homogen entlang der Hyphenzellwand und wurde in verschiedenen Nährmedien in gleichen Maßen gebildet. Ruhende Konidienkörper wurden von AB90-E8 nicht angefärbt. Erst beim Anschwellen der Konidien wurden Bereiche, aus denen daraufhin der Keimschlauch entstand, angefärbt. Das heißt, das Antigen wird sehr wahrscheinlich erst im filamentösen Stadium gebildet. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zu einer Umstrukturierung in der Zellwand. Die anschwellenden Konidien verlieren durch ihr isotropes Wachstum ihr schützendes *Rodlet Layer* und die darunter liegende Zellwand kommt zum Vorschein (ROHDE et al., 2002). Die beobachtete Verteilung des AB90-E8-Antigens ähnelte der für Galaktomannan beschriebenen Verteilung (HEESEMANN et al., 2011), welche in dieser Arbeit bestätigt wurde. Der Versuch zeigte, dass das AB90-E8-Antigen und Galaktomannan bereits in einem sehr frühen Stadium der Germination für die Antikörper zugänglich werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen zu Galaktomannan (HEESEMANN et al., 2011). Diese bereits sehr frühe Zugänglichkeit des AB90-E8-Antigens kann bei einem potenziellen Einsatz von therapeutischen Antikörpern oder dem Einsatz von CAR von Nutzen sein.

Die Immunfluoreszenzfärbung der  $\Delta glfA$ -Mutante mit AB90-E8 zeigte, dass die Deletion des UDP-Galaktopyranose-Mutase-Gens *glfA* und der damit einhergehende Verlust von Galf einen Einfluss auf die Verteilung des AB90-E8-Antigens hat. Die Hyphen wurden unregelmäßiger angefärbt als der entsprechende

Wildtypstamm. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass *Galf* ein Bestandteil des AB90-E8 Antigens ist, es sich hier demzufolge möglicherweise um ein Glykoprotein handelt. Es ist bekannt, dass *Galf* nicht nur Bestandteil von Galaktomannan ist, sondern auch N-Glykan vieler Glykoproteine terminiert (LATGE, 2009). Die Deletion des *glfA*-Gens könnte aber auch zu einer Umstrukturierung der Zellwand führen, durch die wiederum das AB90-E8-Antigen für den Antikörper unzugänglicher wird oder schlechter in der Zellwand verankert ist. Bislang konnte das Antigen von AB90-E8 in Western Blot-Färbungen von Überstandsproteinen nicht nachgewiesen werden (Frank Ebel, persönliche Mitteilung). Dies kann darauf hindeuten, dass es sich um ein Protein handelt, das stark mit der Zellwand assoziiert und verankert ist. Um festzustellen, ob es sich beim AB90-E8-Antigen möglicherweise um ein GPI-verankertes Protein handelt, wurde in Zusammenarbeit mit Sebastian Schrüfer damit begonnen eine tet-on-Mutante zu erstellen. Nach Deletion des *pigA*-Gens ist die entsprechende Mutante nicht mehr in der Lage Proteine über einen GPI-Anker in der Zellwand zu befestigen (LI et al., 2007). Versuche mit der tet-on-*pigA*-Mutante waren zum Ende dieser Arbeit jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen. In weiteren Versuchen konnte aber gezeigt werden, dass die tet-on-*pigA*-Mutante tatsächlich erfolgreich etabliert werden konnte. Die Menge des AB90-E8-Antigens auf ihrer Oberfläche ist sehr stark reduziert und das verbliebene AB90-E8-Antigen kann durch SDS-Extraktion quantitativ entfernt werden (Frank Ebel, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse deuten demnach stark daraufhin, dass es sich beim AB90-E8-Antigen um ein GPI-verankertes Protein handelt. Durch weitere Versuche mit der tet-on-*pigA*-Mutante kann nun versucht werden das Antigen zu identifizieren.

Gegen Hyphen-Oberflächenantigene gerichtete mAk sind mögliche Werkzeuge für neue therapeutische Ansätze. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob der mAk AB90-E8 einen protektiven Effekt in vitro aufweist. Die Arbeitsgruppe um TOROSANTUCCI et al. (2005) konnte zeigen, dass ein Antikörper der IgG-Subklasse, der gegen  $\beta$ -Glukan gerichtet ist, das Hyphenwachstum von *Candida albicans* und *A. fumigatus* in vitro verringern konnte. Antikörper können je nach Antigen und Subklasse unterschiedlich wirken. Sie können beispielweise als Opsonine dienen und Pathogene markieren, woraufhin Immunzellen diese eliminieren. Antikörper können aber auch mikrobielle Oberflächenproteine, wie Adhäsine oder Enzyme, inhibieren. Weiterhin können

gebundene IgG und IgM Komplementproteine rekrutieren und so das angeborene Immunsystem aktivieren (ULRICH und EBEL, 2020). Zudem können Antikörper eine katalytische Aktivität aufweisen. BOWEN et al. (2017) beispielweise zeigten, dass ein Antikörper gegen das Glucoronoxylomannan, einem elementaren Polysaccharidbestandteil der Kapsel von *Cryptococcus neoformans*, eine proteolytische Aktivität besitzt und sogar in der Lage war das Glucoronoxylomannan zu spalten. In einem vorherigen Versuch konnte festgestellt werden, dass AB90-E8 bei einer Konzentration von 1 µg/ml eine gute Opsonisierung der Hyphen gewährleistet. Um zu überprüfen, ob eine Opsonisierung von *A. fumigatus* mit AB90-E8 bereits zu einer Inhibition des Hyphenwachstums führt, wurden *A. fumigatus* Hyphen in Medium, das mit gereinigtem Antikörper versetzt worden war, für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. In diesem Versuch zeigte sich, dass AB90-E8 das Hyphenwachstum von *A. fumigatus* im Vergleich zum Kontrollantikörper AE183-3, der *A. fumigatus* Hyphen nicht erkennt und ebenfalls zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse gehört, signifikant verringern konnte. Somit scheint die Opsonisierung der Zellwand durch AB90-E8 ohne weitere Effektorzellen bereits Auswirkungen auf das Hyphenwachstum zu haben. Viele GPI-verankerten Proteine besitzen eine enzymatische Aktivität und spielen daher in der Zellwandsynthese und Morphogenese eine wichtige Rolle (BRUNEAU et al., 2001). Eine Opsonisierung durch einen mAk könnte durch Anlagerung an diese Proteine eventuell die enzymatische Aktivität verringern, was sich auf das Hyphenwachstum auswirken kann. In den Immunfluoreszenzfärbungen mit AB90-E8 konnte zuvor vereinzelt eine deutlich stärkere Färbung der Hyphenspitzen beobachtet werden. Das Antigen von AB90-E8 scheint somit sehr präsent beim apikalen Wachstum der Hyphe zu sein. Eine Anlagerung des Antikörpers in diesem Bereich könnte somit das Wachstum inhibieren.

Auch die Interaktion zwischen PMN und *A. fumigatus* Hyphen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wobei vor allem die Frage geklärt werden sollte, ob der AB90-E8 Antikörper vermehrt PMN anlockt. PMN erkennen das β-Glukan auf der Hyphenzellwand von *A. fumigatus* beispielsweise durch ihren Dectin-1-Rezeptor (WERNER et al., 2009). Zudem können PMN mit ihrem Fc γ Rezeptor die Fc-Domäne von IgG-Molekülen binden (WANG und JONSSON, 2019). GAZENDAM et al. (2016) zeigten in ihrer Studie, dass für das effektive Abtöten von *A. fumigatus* Hyphen durch PMN eine vorangegangene Opsonisierung und

Aktivierung des Fc  $\gamma$  Rezeptors durch IgG-Antikörper von Nöten ist (GAZENDAM et al., 2016). Die in dieser Arbeit verwendeten PMN wurden aus dem Knochenmark von C57-B1-Mäusen isoliert. Da es sich um einen murine mAk handelte, sollte für eine optimale Interaktion auch murine PMN verwendet werden. Durch die Verwendung des D141 Mito GFP-Stammes sollten die mitochondrialen Veränderungen in den Pilzhypen sichtbar gemacht und die Lyse beobachtet werden.

Nach fünfstündiger Inkubation der PMN mit D141 Mito GFP-Hyphen, die zuvor mit AB90-E8 inkubiert wurden, konnte keine vermehrte Aktivität der PMN festgestellt werden. Die PMN befanden sich zwar in unmittelbarer Nähe zu den Hyphen, doch eine Adhäsion an die Hyphenzellwand war nicht zu erkennen. Eine Erklärung für die schlechte Adhäsion der PMN könnte die unzureichende Aktivierung der Zellen sein. Es wurde bereits beschrieben, dass lediglich aus Gefäßen ausgewanderte PMN zur vollständigen Degranulation ihrer Vesikel und Aktivierung des NADPH-Oxidasesystems fähig sind (GUTHRIE et al., 1984; SUMMERS et al., 2010; KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Somit könnte die Methode der PMN-Isolierung aus Knochenmarkszellen nicht die optimale Grundlage für diesen Versuch darstellen.

Auffällig in den Proben mit PMN und Makrophagen-Überstand war jedoch, dass die Färbung des Antikörpers teilweise verschwunden war. Daraus lässt sich schließen, dass die PMN durch freigesetzte Proteasen entweder die Hyphenzellwand und somit auch das AB90-E8-Antigen oder aber den Antikörper an sich angegriffen und zersetzt haben. Die Tatsache, dass diese Beobachtung insbesondere in den Proben mit Makrophagen-Überstand zu sehen war, lässt vermuten, dass durch die im Makrophagen-Überstand vorkommenden Zytokine die Aktivität der PMN in einem gewissen Maße gesteigert wurde. Dies geht mit den Ergebnissen von KOZEL et al. (1998) einher, die zeigen konnten, dass TNF $\alpha$  nicht nur die Phagozytose-Aktivität von PMN sondern auch die PMN-induzierte Schädigung der Hyphen durch die Produktion von ROS steigert. In Bereichen in denen PMN Kontakt zu den Hyphen aufnahmen, konnte zudem eine Aufräumung der Zellwandoberfläche festgestellt werden. In Proben ohne PMN wiesen Hyphen dagegen eine glatte, unveränderte Färbung der Zellwand auf. Ein ähnliche Beobachtung konnten CHRISTIN et al. (1998) machen, bei deren Infektionsversuch mit Thrombozyten durch Anlagerung der Zellen an die

Hyphenzellwand von *A. fumigatus* es sowohl zu Unregelmäßigeren auf der Oberfläche der Hyphenzellwand kam als auch zur Auflösung der Fluoreszenz von Zellwandbestandteilen. Die Blutplättchen induzierten hierbei zudem auch die Freisetzung von Oberflächenproteinen aus der Hyphenzellwand. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch eine Erklärung für die oben genannten Beobachtungen im Infektionsversuch mit PMN sein.

Auch die Subklasse des Antikörpers AB90-E8 kann einen Einfluss auf den Verlauf des Versuchs gehabt haben. Die Phagozytose von IgG<sub>1</sub>-opsonisierten Partikel wird hauptsächlich über den Fc  $\gamma$  Rezeptor III gesteuert (HAZENBOS et al., 1998). Diesen aktivierenden Rezeptor findet man auf PMN und weiteren myeloiden Zellen (RAVETCH und KINET, 1991). Er bindet seine Liganden IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub> mit einer geringen Affinität. Ebenfalls auf PMN zu finden, ist der aktivierende Fc  $\gamma$  Rezeptor IV, der eine hohe Affinität zu Antikörpern der IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub>-Subklasse besitzt und keine IgG<sub>1</sub>-Antikörper bindet (NIMMERJAHN et al., 2005; MANCARDI et al., 2008). Ein opsonisierender mAk, der zur IgG<sub>2a</sub>- oder IgG<sub>2b</sub>-Subklasse gehört, könnte demnach PMN eventuell besser aktivieren als ein Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Subklasse, da diese Subklassen von beiden aktivierenden Fc  $\gamma$  Rezeptoren gebunden werden. Weiterhin unterscheiden sich humane und murine Fc  $\gamma$  Rezeptoren in ihrer Bindungsfähigkeit und Expressionsmuster voneinander (BRUHNS, 2012). So binden beispielweise alle humanen aktivierenden Fc  $\gamma$  Rezeptoren die IgG<sub>1</sub>-Subklasse (BRUHNS et al., 2009). Ein humanisierter Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Subklasse könnte demnach besser mit humanen PMN interagieren.

In diesem Infektionsversuch sollte untersucht werden, ob der mAk AB90-E8 die Interaktion zwischen PMN und Hyphen beeinflusst. Eine Voraussetzung für eine Degranulation der PMN ist der direkte Kontakt zur Hyphe. Diese enge Assoziation war in diesem Versuch nicht zu beobachten, wodurch eine antifungale Wirkung unwahrscheinlich ist. Die grüne Fluoreszenz des Mito GFP-Stammes bestätigte, dass keine Lyse der Hyphen auftrat. Die Frage bleibt offen, warum die PMN so schlecht mit den Hyphen interagierten. Festzuhalten ist, dass in Versuchen anderer Arbeitsgruppen in der Regel humane PMN verwendet wurden. Die Humanisierung eines murinen Antikörpers der IgG<sub>1</sub>Subklasse in Verbindung mit der Isolation humaner PMN aus dem Blut könnte somit eine geeignetere Grundlage für weitere *in vitro* Infektionsversuche darstellen. Durch die Ergebnisse dieses

Infektionsversuchs kann zum jetzigen Zeitpunkt von keinem protektiven Effekt des mAk AB90-E8 ausgegangen werden. Ein vielversprechendes Antigen bleibt es jedoch, da sich die *Aspergillus*-spezifischen CAR-T-Zellen, die die Bindungstasche von AB90-E8 enthalten, im Mausmodell als protektiv erwiesen haben (SEIF et al., im Druck). Eine Möglichkeit, das Antigen doch noch zu identifizieren, stellt die tet-on-*pigA*-Mutante dar. Sollte das Antigen in dieser Mutante nicht mehr fest an der Zellwand verankert sein, könnte man möglicherweise das Antigen aus der Zellwand herauslösen und es hierüber identifizieren.

## 2.2. Der monoklonale Antikörper AE183-3

In den letzten Jahren treten immer häufiger invasive Mykosen auf, die durch Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilze ausgelöst werden, welche zudem oft resistent gegenüber antimykotischer Therapie sind (NUCCI, 2003). Hierzu zählen unter anderem Vertreter der Ordnung Mucorales, insbesondere *R. oryzae*. Jedoch können auch *Lichtheimia* spp. schwerwiegende Mukormykosen auslösen (RIBES et al., 2000). Neben immungeschwächten Patienten sind insbesondere Diabetes mellitus Patienten gefährdet an einer Mukormykose zu erkranken (CHAKRABARTI et al., 2006). Gegenüber der Wirkstoffgruppe der Azole sind Mucorales nur teilweise sensitiv. Amphotericin B ist daher das Mittel der Wahl bei Mukormykosen (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2009). Neue Therapiemethoden sind jedoch aufgrund der oft schnellen und fatalen Verläufe notwendig. Auch hier stellt die Zellwand einen Angriffspunkt für neue Therapieoptionen dar.

Die Zellwand von Pilzen der Ordnung Mucorales ist im Vergleich zu der von *Aspergillus* spp. oder *Canidia* spp. nur wenig erforscht. Bislang wurden die meisten Studien zu *M. mucedo* und *M. circinelloides* durchgeführt (LECOINTE et al., 2019). Der mAk AE183-3 wurde in der eigenen Arbeitsgruppe durch Immunisierung von Mäusen mit Hyphenbestandteilen von *L. corymbifera* generiert. Neben *Lichtheimia* spp. erkennt der Antikörper in Immunfluoreszenzfärbungen auch Hyphen von *C. bertholletiae*, einem weiteren pathogenen Vertreter der Mucorales. Im Gegensatz zu AB90-E8 war das Antigen von AE183-3 gegenüber einer Proteinase K-Verdauung resistent. Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein Protein, sondern wahrscheinlich um eine Glykostruktur auf der Zellwand von *Lichtheimia* spp. und *C. bertholletiae* handelt. Bestimmte Glykostrukturen können auf der Zellwand vieler verschiedener Organismen vorkommen. Das Antigen von AE183-3 scheint jedoch spezifisch für bestimmte Vertreter der Ordnung Mucorales

zu sein, wobei der Antikörper bestimmte Gattungen, wie *Rhizopus* spp., nicht erkennt. Bemerkenswerterweise gehört AE183-3 ebenfalls zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse, welche normalerweise bevorzugt Protein- und Polypeptidantigene erkennt. Polysaccharidantigene lösen eine unzureichende T-Zellantwort aus, wodurch es nur zu einem begrenzten Klassenwechsel von IgM zu IgG-Antikörpern kommt und keine B-Gedächtniszellen gebildet werden (MURPHY und WEAVER, 2017b).

Die Arbeitsgruppe um GEBREMARIAM et al. (2019) konnte bereits einen mAk der IgG<sub>1</sub>-Subklasse gegen das CotH3-Protein von *R. delemar*, einem weiteren Vertreter der Ordnung Mucorales, erfolgreich im Mausversuch einsetzen. In Kombination mit den antimykotischen Wirkstoffen Posaconazol oder Amphotericin B konnte der protektive Effekt verstärkt werden und alle Mäuse überlebten die Infektion (GEBREMARIAM et al., 2019). Weitere Versuche mit AE183-3 konnten in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden. Um den Antikörper weiter zu untersuchen, könnten jedoch ähnliche Versuche wie für AB90-E8 durchgeführt werden. Die Tatsache, dass AE183-3 die weitaus seltener Mukormykosen-auslösenden Nicht-*Rhizopus* Spezies *Lichtheimia* spp. und *C. bertholletiae* erkennt, könnte sich in der Diagnostik zur Differenzierung von Mukormykosen zu Nutze gemacht werden. Zudem kann die Antikörper-Subklasse IgG<sub>1</sub> einen weiteren Vorteil darstellen, da IgG-Antikörper besser mit PMN interagieren können und auch als potenzielle passive Impfstoffe in Frage kommen. Durch in vitro Infektionsversuchen könnte zunächst überprüft werden, ob sich AE183-3 als protektiv erweist.

### 2.3. Der monoklonale Antikörper AD105-30-2

Der zur IgM-Subklasse gehörende mAk AD105-30-2 wurde in der eigenen Arbeitsgruppe nach Immunisierung von Mäusen mit *Aspergillus* Hyphenmaterial isoliert. Bisher bekannt war, dass er interessanterweise in Immunfluoreszenzfärbungen *F. oxysporum* erkennt. Die IgM-Subklasse, welche vorzugsweise Glykoantigene erkennt, liefert den ersten Hinweis darauf, dass es sich bei AD105-30-2 möglicherweise um ein kohlenhydrathaltiges Antigen handelt. Das Antigen war zudem Proteinase K stabil, was bedeutet, dass es sich vermutlich nicht um ein Proteinantigen handelt. Eine Western Blot Färbung von aufkonzentriertem und TCA-gefälltem Kulturüberstand zeigte einen Schmier. Eine ähnliche Anfärbung war zuvor schon in Versuchen mit dem Galaktomannan-spezifischen Antikörper L10-1 beobachtet worden. Dieses Muster ergibt sich durch das Auftreten von

Glykofragmenten unterschiedlicher Größe im Kulturüberstand, die im SDS-PAGE Gel nicht sauber aufgetrennt werden. Das heißt diese Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass AD105-30-2 eine Glykostruktur erkennt. Somit ist ein Protein als Antigen eher unwahrscheinlich, da in diesem Falle distinkte Banden in der Färbung erwartet würden.

Der mAk AD105-30-2 wurde zunächst in verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen mit *F. oxysporum* und *Aspergillus* Spezies getestet. Hyphen von *F. oxysporum* wurden durch AD105-30-2 homogen angefärbt. Die Färbung von *A. fumigatus* Hyphen war jedoch stark Medium-abhängig und oft unregelmäßig, allerdings konnte in HEPES-gepufferten RPMI 1640 Medium auch eine gleichmäßigere Färbung mit AD105-30-2 erreicht werden. *A. nidulans* hingegen war auch in anderen Medien teilweise deutlicher und gleichmäßiger entlang der Hyphen gefärbt. Um zu überprüfen, ob sich die Verteilung des Antigens durch Veränderungen in der Zellwand zum *A. fumigatus* Wildtypstamm unterscheidet, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von zwei Zellwandmutanten durchgeführt. In der Immunfluoreszenzfärbung der  $\Delta$ ags1-3-Mutante zeigte sich im Vergleich zum Wildtypstamm eine gleichmäßigere Verteilung des Antigens entlang der Hyphen. Durch die Deletion der  $\alpha$ -(1,3)-Glukan Synthase-Gene und daraus resultierender Umstrukturierung der Zellwand, könnte das Antigen von AD105-30-2 für den Antikörper zugänglicher werden. Das heißt, das in der Hyphenzellwand einlagerte  $\alpha$ -(1,3)-Glukan könnte das AD105-Antigen abdecken. Ein ähnlicher Effekt wurden bereits für  $\beta$ -Glukan beschrieben (HOHL et al., 2005). Durch die Färbung der  $\Delta$ ags1-3-Mutante konnte zudem  $\alpha$ -Glukan als Antigen ausgeschlossen werden. In ELISA von Kulturüberständen von *A. fumigatus* und *F. oxysporum* war das AD105-Antigen in großen Mengen detektierbar. Somit muss es sich um eine kohlenhydratreiche Struktur handeln, die in der Zellwand beider Pilze zu finden ist und beim Wachstum in die Umgebung abgegeben wird.

### **2.3.1. Galaktofuranose als potenzieller Bestandteil des AD105-30-2-Antigens**

In *Aspergillus* findet man Galf als Bestandteil des Galaktomannans. Dieses besteht aus  $\alpha$ -1,2/1,6-Mannan und kurzen  $\beta$ -1,5-Galf-Seitenketten (LATGÉ et al., 1994). In der Zellwand von *F. oxysporum* findet sich ein Kohlenhydratpolymer aus Chitin,  $\beta$ -1,3-Glukan und  $\alpha$ -1,3-Glukan. Die Seitenketten der Glykoproteine enthalten neben einem hohen Anteil an Uronsäuren auch Galaktose, Mannose und Glukose.



Zudem macht (N-Aceyl)-Glukosamin etwa 8-11 % der Zellwandtrockenmasse aus (SCHOFFELMEER et al., 1999). Auch in *F. oxysporum* wurde bereits Galf, beispielsweise als Bestandteil eines Peptidogalaktomannans (DE OLIVEIRA et al., 2019) und eines extrazellulären Polysaccharids (CHEN et al., 2015), nachgewiesen. In *Fusarium* spp. handelt es sich jedoch meist um 1,6- oder 1,2,6-verbundene Galf-Reste (MIYAZAKI und NAOI, 1975; AHRAZEM et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2019). Der Unterschied in der Verbindung des Galf erklärt, dass *F. oxysporum* durch den Antikörper L10-1, von dem bekannt ist, dass er  $\beta$ -1,5-verbundene Galf-Ketten erkennt (HEESEMAN et al., 2011), nicht angefärbt wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von WIEDEMANN et al. (2016). Immunfluoreszenzfärbungen sowie ein ELISA des Kulturüberstandes der Deletionsmutante  $\Delta glfA$  zeigten, dass der Verlust der Galf einen Effekt auf das AD105-30-2-Antigen hat und die Signale deutlich reduziert sind. Somit scheint Galf ein elementarer Bestandteil des Antigens von AD105-30-2 zu sein. AD105-30-2 verhält sich sehr ähnlich zu dem von WIEDEMANN et al. (2016) generierten mAk AB135-8. Dieser Antikörper erkannte sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch im ELISA *A. fumigatus* und *F. oxysporum*. Hierbei war die Färbung von *A. fumigatus* in den getesteten Medien auf bestimmten Bereichen um die Konidien und Keimschläuche und nicht homogen entlang der Hyphen zu finden. *Fusarium* spp. wurde hingegen von AB135-8 gleichmäßig gefärbt (WIEDEMANN et al., 2016). Für AB135-8 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass er ein Galf-spezifisches Antigen erkennt. In der gleichen Arbeit konnte zudem bestätigt werden, dass *F. oxysporum* die nötigen Gene für Synthese und Transport von Galf besitzt (WIEDEMANN et al., 2016). Die Antigene der Antikörper AD105-30-2 und AB135-8 scheinen sich somit sehr ähnlich zu sein. *A. fumigatus* Hyphen, die in HEPES-gepufferten RPMI 1640 gewachsen waren, wiesen jedoch eine deutliche und nahezu homogene Färbung in der Immunfluoreszenzfärbung mit AD105-30-2 auf, was sich zu bisherigen Ergebnissen von Immunfluoreszenzfärbungen mit AB135-8 unterscheidet. In dem in dieser Arbeit durchgeführten ELISA zeigte AD105-30-2 sowohl bei *A. fumigatus* als auch beim *F. oxysporum* Kulturüberstand zudem ein stärkeres Signal als AB135-8. Somit wird das Antigen von AD105-30-2 von beiden Pilzen vermutlich in größeren Mengen in die Umgebung abgegeben, was sich in der Diagnostik zu Nutzen gemacht werden könnte.

### 2.3.2. Galaktosaminogalaktan als potenzielles Antigen von AD105-30-2

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass das Antigen von AD105-30-2 in der Zellwand von *A. fumigatus* und *F. oxysporum* zu finden ist. Die Zellwand von *A. fumigatus* ist im Vergleich zu der von *F. oxysporum* bereits sehr gut untersucht. Im Pasteur Institut, Paris standen gereinigte und gut charakterisierte Fraktionen von Zellwandbestandteilen von *A. fumigatus* zur Verfügung, mit denen ELISA-Versuche mit AD105-30-2 durchgeführt wurden. Hierbei interagierte AD105-30-2 vor allem mit der acetylierten Form des GAG. Dieses Ergebnis war überraschend, da *Fusarium* spp. nach jetzigem Erkenntnisstand kein GAG bilden. GAG wurde bisher nur in *Aspergillus* spp. genauer beschrieben. MEI et al. (2021) veröffentlichten erstmals Daten, die zeigen, dass GAG auch in Nicht-*Aspergillus* Pilzen vorkommt. In diesem Fall wurde *Metarhizium robertsii* untersucht, der ebenfalls GAG auf seiner Zellwand trägt. Eine Immunfluoreszenzfärbung von *F. oxysporum* mit dem anti-GAG Antikörper, der die acetylierte und deacetylierte Form erkennen soll (KAZAKOVA et al., 2020), war negativ und bestätigte damit, dass diese Formen des GAG auf der Zellwand von *F. oxysporum* nicht vorkommen.

GAG ist Teil der ECM und spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Biofilmformation (GRAVELAT et al., 2013). Die Bestandteile von GAG sind N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Galaktosamin und Glukose. Bisher wurde vermutet, dass die Produktion von GAG mit der Virulenz einhergeht. Spezies wie *A. fumigatus*, die viel GAG produzieren sind deutlich virulenter als Stämme wie *A. nidulans*, die weniger zellwandassoziiertes GAG mit einem geringeren GalNAc-Anteil auf ihrer Oberfläche tragen (LEE et al., 2015). Beobachtungen in den Immunfluoreszenzfärbungen hingegen zeigten, dass das Antigen von AD105-30-2 auf der Hyphenoberfläche von *A. nidulans* teilweise gleichmäßiger verteilt war als bei *A. fumigatus*. Dies spricht gegen die Vermutung, dass AD105-30-2 allein acetyliertes GAG erkennt. Auch decken sich die Immunfluoreszenzfärbungen durch AD105-30-2 nicht mit denen des anti-GAG Antikörpers.

Da davon auszugehen ist, dass die im ELISA der Zellwandbestandteile von *A. fumigatus* eingesetzten Antigene vermutlich nicht 100%ig aufgereinigt und somit frei von anderen Molekülen sind, sollte unabhängig davon geprüft werden, ob GAG als Antigen von AD105-30-2 in Frage kommt. Daher sollte eine Mutante hergestellt werden, die kein funktionsfähiges GAG mehr produzieren konnte.

Für die GAG-Biosynthese konnten insgesamt fünf Gene (*uge3*, *gtb3*, *agd3*, *ega3*, *sph3*), die für verschiedene Enzyme kodieren, identifiziert werden (LEE et al., 2016). Das Gen *uge3* kodiert für eine Glukose-4 Epimerase, die UDP-Glukose und UDP-N-Acetylglukosamin in UDP-Galaktose und UDP-N-Acetylgalaktosamin verwandelt. Das Gen *gtb3* kodiert für eine Glykosyltransferase, die die Zuckermoleküle verbindet und über die Membran in den extrazellulären Raum transportiert (LEE et al., 2016). Nach Ausschaltung eines dieser beiden Gene, kann kein funktionsfähiges GAG synthetisiert werden. Die Wahl fiel auf das *gtb3*-Gen, da durch die Deletion davon auszugehen war, dass keine Bausteine des GAG mehr transportiert werden konnten und somit sowohl acetyliertes als auch deacetyliertes GAG nicht mehr gebildet werden können. Mit dieser neuen Mutante wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen mit AD105-30-2, L10-1 und anti-GAG durchgeführt. Durch die Färbung mit dem anti-GAG-Antikörper konnte bestätigt werden, dass die  $\Delta$ *gtb3*-Mutante kein GAG mehr bildet. Weiterhin trägt die Mutante Galaktomannan auf der Zellwandoberfläche, was mit der L10-1-Färbung gezeigt werden konnte. Bei der Färbung mit AD105-30-2 zeigte sich nur auf manchen Hyphen eine Färbung. Der Verlust des GAG scheint somit einen deutlichen Einfluss auf das Vorkommen des AD105-30-2-Antigens zu haben. Da aber weiterhin eine geringe Färbung auch bei den Hyphen dieser Mutante auftrat, waren immer noch geringe Mengen des AD105-30-2-Antigens vorhanden. Anschließend wurde ein ELISA mit Kulturüberstand der  $\Delta$ *gtb3*-Mutante mit den Antikörpern L10-1 und AD105-30-2 durchgeführt. Hierbei bestätigte sich, dass Galaktomannan, wie in der Immunfluoreszenzfärbung, von der Mutante gebildet wird und ebenso in den Kulturüberstand abgegeben wird. Das Signal von AD105-30-2 war jedoch im Vergleich zum Wildtypstamm deutlich reduziert.

Das Ergebnis aus dem ELISA der Zellwandbestandteile ließ vermuten, dass es sich beim AD105-30-2-Antigen um GAG handelt. Durch den deutlichen Abfall der Signale der GAG-defizienten  $\Delta$ *gtb3*-Mutante in Immunfluoreszenzfärbung und ELISA zeigte sich, dass AD105-30-2 GAG erkennt. Doch scheint GAG nicht der alleinige Bestandteil des Antigens von AD105-30-2 zu sein, da Hyphen immer noch vom Antikörper angefärbt wurden. Gleichzeitig scheint der Verlust von *Galf* einen Einfluss auf das Antigen zu haben. *Galf* ist zwar kein Bestandteil des GAG, doch könnte in der  $\Delta$ *glfA*-Mutante, durch die veränderte Zellwand, GAG eventuell schlechter in der Zellwand verankert sein. Es könnte zudem sein, dass der

Antikörper AD105-30-2 kreuzreagiert und verwandte Glykostrukturen erkennt, die in der  $\Delta gtb3$ -Mutante noch vorhanden sind. Es werden jedoch weitere Untersuchungen von Nöten sein, um das Antigen eindeutig zu identifizieren. Die Ausschaltung der Gene *gtb3* und *glfA* in einer Doppelmutante könnte den nötigen Aufschluss darüber bringen, ob AD105-30-2 hier komplett negativ ist. Um das Potenzial des Antikörpers AD105-30-2 als diagnostisches Mittel weiter zu untersuchen, könnte zunächst überprüft werden, ob das Antigen in Patientenseren zu finden ist.

#### **2.4. Monoklonale Antikörper als potenzielle Impfstoffe oder Mittel der Diagnostik**

Wie in der Krebstherapie könnten mAk auch in der Behandlung invasiver Mykosen eingesetzt werden. Bereits 1987 konnten DROMER et al. (1987) einen monoklonalen IgG-Antikörper generieren, der einen protektiven Effekt bei Mäusen, die mit *Cryptococcus neoformans* infiziert waren, aufwies und Hoffnung auf einen potenziellen prophylaktischen Einsatz gegen Pilzinfektionen erweckte.

Bei Impfungen wird generell zwischen aktiver und passiver Immunisierung unterschieden (BAXTER, 2007). Bei der aktiven Immunisierung wird durch Präsentation eines Antigens eine Immunantwort ausgelöst. Diese Immunantwort entwickelt sich nach einigen Tagen bis zu Wochen nach der Impfung und hält über einen längeren Zeitraum an. Eine passive Immunisierung wird über die Gabe von Antikörpern induziert. Hierdurch kommt es zu einer sofortigen Wirkung gegen den Erreger, jedoch hält diese Wirkung nur Wochen bis Monate an (BAXTER, 2007). Um einen mAk als Impfstoff nutzen zu können, ist es wichtig das entsprechende Antigen zu charakterisieren und zu identifizieren.

Der Antikörper AB90-E8 erkennt den Untersuchungen dieser Arbeit nach ein Proteinantigen. Es konnte gezeigt werden, dass AB90-E8 in der Lage ist das Hyphenwachstum von *A. fumigatus* in vitro zu inhibieren. Durch seine Zugehörigkeit zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse ließ sich vermuten, dass die Bindung an den Fc  $\gamma$  Rezeptor von PMN zu einer besseren Aktivierung und Abtötung der *A. fumigatus* Hyphen führt. Dies konnte durch die Versuche dieser Arbeit bislang nicht bestätigt werden. Somit ist AB90-E8 in dieser Form für eine passive Immunisierung vermutlich eher ungeeignet. Eine Humanisierung des Antikörpers, bei der gleichzeitig die Subklasse verändert werden kann, könnte ein Ansatz sein,

den Antikörper weiter zu nutzen und zu testen. Proteinantigene lösen im Vergleich zu Glykoantigenen eine starke T-Zellantwort aus und eignen sich daher gut für eine aktive Immunisierung. Hierfür müsste das Antigen allerdings identifiziert und aufgereinigt werden, was sich bisher als sehr schwierig erwiesen hat. Die neu erhobenen Daten der *tet-on-pigA*-Mutante zeigen, dass das AB90-E8-Antigen höchstwahrscheinlich über einen GPI-Anker mit der Zellwand verbunden ist. Weiterhin soll nun versucht werden das Antigen aus Kulturüberstand der Mutante zu isolieren und zu identifizieren.

AE183-3 erkennt vermutlich ein Polysaccharid und gehört zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse, was den Antikörper interessant für den Einsatz als passive Immunisierung macht. Hierfür müssen allerdings zuvor weitere Versuche durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich der Antikörper als protektiv erweist.

Der Antikörper AD105-30-2 gehört zur IgM-Subklasse, die in der Lage ist den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren (BAXTER, 2007). IgM-Antikörper können jedoch nicht mit dem Fc  $\gamma$  Rezeptor interagieren, dessen Bindung PMN aktiviert und essenziell für das Abtöten von *Aspergillus* Hyphen ist (GAZENDAM et al., 2016). In Versuchen von TOROSANTUCCI et al. (2009) beispielsweise wurde die Wirkung von einem IgG und IgM-mAk, die in ihren Bindungstaschen identisch waren, untersucht und nur der IgG-Antikörper wirkte protektiv gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* und *Candida albicans* und verringerte das Hyphenwachstum. Auch für den zur IgM-Subklasse gehörenden mAk L10-1 konnte kein protektiver Effekt nachgewiesen werden (HEESEMANN et al., 2011). Der mAk AD105-30-2 erkennt zum einen ein Oberflächenantigen auf der Zellwand von *Aspergillus* spp. und *F. oxysporum* und zum anderen ein sekretiertes Antigen im Kulturüberstand beider Pilze. Sollte dies auch während einer Infektion der Fall sein und in Patientenserum nachgewiesen werden können, wäre dies ein guter Angriffspunkt für eine Anwendung als therapeutischer Antikörper, da die Antigene in großen Mengen vorliegen und für Antikörper gut zugänglich sind. Aufgrund der Zugehörigkeit zur IgM-Subklasse ist allerdings fraglich, ob der Antikörper einen protektiven Effekt aufweisen kann. Dies muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Für eine aktive Impfung müsste das Antigen identifiziert und aufgereinigt werden. Da es sich jedoch höchstwahrscheinlich um ein Polysaccharidantigen handelt, ist allerdings von einem unzureichenden Schutz nach Immunisierung auszugehen, da diese nur eine

kurzzeitige Immunantwort auslösen und kein immunologisches Gedächtnis induzieren (KÄYHTY et al., 1984; GOLDBLATT, 2000). Ein Weg auch Polysaccharidantigene für eine Immunisierung nutzbar zu machen, ist die Herstellung sogenannter Glykokonjugate. Bereits 1929 zeigten AVERY und GOEBEL (1929), dass die geringe Immunogenität von gereinigtem Polysaccharid in Kaninchen durch die Konjugation des Polysaccharids mit einem Proteinträger verbessert werden kann (AVERY und GOEBEL, 1929). Diese Beobachtung legte den Grundstein für die Entwicklung von Glykokonjugat-Impfstoffen. Solche Glykokonjugat-Impfstoffe werden beispielsweise in der Immunisierung gegen *Streptococcus pneumoniae* eingesetzt (DANIELS et al., 2016). Der Antikörper AD105-30-2 könnte aber auch in der Diagnostik eingesetzt werden. Hierfür eignen sich Polysaccharidantigene besser als Proteinantigene, da sie über einen längeren Zeitraum stabil bleiben und auch toleranter gegenüber höheren Temperaturen sind (HEESEMANN, 2010). Um Mykosen erfolgreich zu behandeln, ist eine frühzeitige Therapie mit einem geeigneten Medikament essenziell. Durch Kreuzreaktionen im bereits etablierten *Aspergillus*-spezifischen ELISA (Plaetelia-EIA, BioRad) und *Aspergillus antigen latex agglutination* Test, die beide auf dem gleichen Galaktomannan-spezifischen Antikörper basieren, kann es jedoch zu falschen Ergebnissen mit Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen kommen (KAPPE und SCHULZE-BERGE, 1993; TORTORANO et al., 2012). Die richtige Diagnose ist aber unabdingbar, um ein wirksames Medikament einzusetzen. Da sich mit dem Galaktomannan-spezifischen mAk L10-1 weder in der Immunfluoreszenzfärbung noch im ELISA des *F. oxysporum* Kulturüberstands ein Signal zeigt, könnte eine Kombination aus L10-1 und AD105-30-2 in der Diagnostik genutzt werden, um eine Aspergillose von einer Fusariose zu differenzieren. Zum einen könnten beide Antikörper parallel in der Färbung von histopathologischen Schnitten eingesetzt werden, zum anderen könnten sie als serologisches Assay in einem ELISA mit Patientenserum eingesetzt werden, um so schnell zwischen einer Aspergillose und einer Fusariose zu unterscheiden. Hierfür müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden, um festzustellen, ob das Antigen von AD105-30-2 während einer Infektion überhaupt in Patientenseren zu finden ist.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit verschiedene Oberflächenantigenen der Hyphen pathogener Pilze. Im ersten Teil konnte Galaktomannan als wichtiges Oberflächenantigen auf AC von *A. terreus* identifiziert werden, welches als Marker

für AC dienen kann. Im zweiten Teil wurden drei mAk und ihre Antigene näher charakterisiert. Hierbei war vor allem die Identifizierung des AB90-E8-Antigens von großer Relevanz, da die Bindungstasche des mAk bereits erfolgreich in CAR eingesetzt wurde. AE183-3 und AD105-30-2 erkennen beide Oberflächen-Glykoantigene auf Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen, was diese Antikörper ebenfalls interessant macht. Die Identifizierung der Antigene dieser drei mAk steht weiterhin aus. Die neu erhobenen Daten zeigen jedoch bereits, dass diese Antikörper und ihre untersuchten Oberflächenantigene eine potenzielle Relevanz für Therapie und Diagnostik von Schimmelpilzinfektionen besitzen. Gleichzeitig stellen sie auch Werkzeuge dar, die Zellwand dieser pathogenen Schimmelpilze besser zu untersuchen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten kann eine zunehmende Inzidenz von invasiven Mykosen beobachtet werden. Patienten nach Organ- und Stammzelltransplantationen sowie andere immunsupprimierte Patienten, wie beispielweise Krebspatienten während einer Chemotherapie oder AIDS-Patienten, sind besonders gefährdet. Hauptauslöser für invasive Mykosen ist *A. fumigatus*. Doch auch andere *Aspergillus* Spezies wie *A. terreus* sowie andere Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilze wie *Fusarium* spp. oder Mucorales sind ebenfalls in der Lage schwerwiegende Erkrankungen bei Menschen und Tieren auszulösen und gewinnen zunehmend an Bedeutung. Aufgrund einer oft späten Diagnose und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten bei gleichzeitig zunehmenden Resistenzen gegenüber den verfügbaren Wirkstoffen, ist die Erforschung der pathogenen Pilze unabdingbar, um so neue Wege in der Therapie und Diagnostik von invasiven Mykosen zu finden. Während sich bei Mikroorganismen wie Viren und Bakterien Impfstoffe schon lange etabliert haben, ist dies bei Schimmelpilzen noch nicht der Fall. Um dies zu erreichen, ist es wichtig neue Antigene und somit Angriffspunkte für potenzielle Impfstoffe zu finden und zu identifizieren.

Neben *A. fumigatus* kann auch *A. terreus* schwerwiegende Mykosen auslösen. Hierbei treten immer häufiger invasivere Verläufe auf. Viele Vertreter des *A. terreus* Spezieskomplexes sind in der Lage neben phialidischen Konidien auch Aleuriokonidien beziehungsweise *accessory conidia* zu bilden. Die Funktion dieser Aleuriokonidien ist bislang nicht geklärt. Sie werden nicht wie phialidische Konidien bei Luftkontakt, sondern in Flüssigkeit gebildet und entstehen direkt an den vegetativen Hyphen. In dieser Arbeit konnte Galaktomannan als Antigen auf der Oberfläche von Aleuriokonidien identifiziert werden. Auch  $\beta$ -Glukan konnte auf der Oberfläche von Aleuriokonidien gefunden werden, welches jedoch deutlich unregelmäßiger auf der Oberfläche verteilt war. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Aleuriokonidien im Vergleich zu phialidischen Konidien in Flüssigkultur deutlich schneller auskeimen, aber weitaus sensitiver gegenüber Austrocknung sind. Weiterhin wurden die Interaktionen der Aleuriokonidien mit murinen Makrophagen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Aleuriokonidien innerhalb kürzester Zeit phagozytiert wurden und danach in den Makrophagen persistierten. Blockierungen des Dectin-1-Rezeptors mit Laminarin, einem



löslichen  $\beta$ -Glukan, beziehungsweise des Mannan-Rezeptors mit Mannan beeinflussten die Phagozytose nicht. Die Makrophagen verhinderten in den ersten Stunden das Auskeimen der Aleuriokonidien. Nach längerer Inkubation jedoch konnten einige Aleuriokonidien die antimikrobiellen Mechanismen überwinden und auskeimen. Makrophagen setzen bei Kontakt zu Pathogenen verschiedene Zytokine frei. In dieser Arbeit wurde die TNF $\alpha$ -Produktion von J774-Zellen nach Infektion mit Aleuriokonidien und phialidischen Konidien untersucht. Auch wurde überprüft, ob  $\beta$ -Glukan in Form von Laminarin einen Einfluss auf die TNF $\alpha$  Produktion hat. Die Ergebnisse zeigten, dass Aleuriokonidien im Vergleich zu phialidischen Konidien eine starke TNF $\alpha$ -Produktion auslösen. Laminarin hatte hierbei keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion.

In der Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen bieten mAk eine große Chance. In der Krebstherapie sind sie beispielweise bereits gut etabliert. Auch im Einsatz gegen invasive Mykosen könnten sie ein geeignetes Mittel darstellen. Um mAk einzusetzen, ist es essenziell das Antigen und somit die Angriffsstruktur zu identifizieren und deren Funktion im Pilz zu kennen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene mAk gegen Hyphenantigene charakterisiert. Zunächst wurden zwei Antikörper (AB90-E8, AE183-3) gereinigt und anschließend in verschiedenen Versuchen näher untersucht. Auch wurden Versuche mit dem Hybridomüberstand eines weiteren Antikörpers (AD105-30-2) durchgeführt.

Der mAk AB90-E8 gehört zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse und erkennt spezifisch *A. fumigatus* Hyphen. Den Ergebnissen dieser Arbeit zur Folge erkennt er mit ziemlicher Sicherheit ein zellwandständiges, sehr wahrscheinlich GPI-verankertes Protein. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass das AB90-E8-Antigen bereits in einem frühen Stadium der Auskeimung für den Antikörper zugänglich wird und es durch Opsonisierung mit AB90-E8 zur Inhibition des Hyphenwachstums von *A. fumigatus* um etwa 20 % kommt. In Infektionsversuchen mit PMN und AB90-E8-opsonisierten Hyphen konnte jedoch kein protektiver Effekt festgestellt werden. Die Bindungstasche von AB90-E8 wurde zudem bereits erfolgreich für die Herstellung *A. fumigatus*-spezifischer *Chimeric Antigen Receptors* eingesetzt, was die Identifizierung des Antigens umso bedeutender macht.

Der mAk AE183-3 gehört ebenfalls zur IgG<sub>1</sub>-Subklasse und erkennt in der Immunfluoreszenzfärbung *Lichtheimia* spp. sowie *C. bertholthae*. Andere Vertreter der Ordnung Mucorales sowie *Aspergillus* werden vom Antikörper nicht

erkannt. Bei dem Antigen von AE183-3 handelt es sich vermutlich um eine Glykostruktur. Der Antikörper wurde als Kontrollantikörper für Versuche mit AB90-E8 eingesetzt. Weitere Versuche das Potenzial dieses Antikörpers zu untersuchen, stehen noch aus.

Der mAk AD105-30-2 gehört zur IgM-Subklasse und erkennt *F. oxysporum* sowie *Aspergillus* spp. in der Immunfluoreszenzfärbung und weist im ELISA mit Kulturüberstand beider Pilze ein deutliches Signal auf. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Polysaccharid, das auf der Zellwand beider Pilze zu finden ist. Weitere Versuche zeigten, dass das Antigen zum Teil Galaktofuranose-abhängig ist und Signale in der Immunfluoreszenzfärbung als auch im ELISA von der *A. fumigatus*  $\Delta$ glfA-Mutante deutlich reduziert sind. Ein ELISA von gereinigten Zellwandbestandteilen von *A. fumigatus* zeigte, dass insbesondere die Zellwandfraktion von acetyliertem Galaktosaminogalaktan mit dem Antikörper interagiert. Durch die Herstellung einer Deletionsmutante konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei Galaktosaminogalaktan um ein wichtiges, aber nicht das alleinige Antigen von AD105-30-2 handelt, da Immunfluoreszenzfärbungen weiterhin teilweise positiv waren.

In dieser Arbeit wurden neue Daten bezüglich der Antigene dieser drei mAk erhoben. Um sie für Therapie oder Diagnostik nutzbar zu machen, müssen die Antigene jedoch noch weiter charakterisiert und identifiziert werden. In jedem Fall stellen die Antikörper wertvolle Werkzeuge dar, um die pilzliche Zellwand besser zu erforschen.

## VII. SUMMARY

In recent decades, increasing incidences of invasive mycoses can be observed. Patients after organ and stem cell transplantation as well as other immunosuppressed patients, such as cancer patients during chemotherapy or AIDS patients, are particularly at risk. The main cause of invasive mycoses is *A. fumigatus*. However, other *Aspergillus* species such as *A. terreus* as well as other non-*Aspergillus* molds such as *Fusarium* spp. or Mucorales are also capable of causing serious diseases in humans and animals and are becoming increasingly important. Due to often late diagnosis and limited therapeutic options combined with increasing resistance to available drugs, research into pathogenic fungi is essential in order to find new ways of treating and diagnosing invasive mycoses. While vaccines have long been established for microorganisms such as viruses and bacteria, this is not yet the case for molds. To achieve this, it is important to find and identify new antigens and thus targets for potential vaccines.

Besides *A. fumigatus*, *A. terreus* can also cause serious mycoses. Here, more invasive courses are occurring with increasing frequency. Many representatives of the *A. terreus* species complex are able to form aleurio conidia or accessory conidia in addition to phialidic conidia. The function of these aleurioconidia has not yet been clarified. In contrast to phialidic conidia, they are not formed in contact with air, but in liquid and emerge directly on the vegetative hyphae. In this work, galactomannan was identified as an antigen on the surface of aleurioconidia. Also,  $\beta$ -glucan could be found on the surface of aleurioconidia, but it was distributed much more irregularly. In further experiments, it was shown that aleurioconidia germinate much faster in liquid culture compared to phialidic conidia, but are much more sensitive to desiccation. Furthermore, the interactions of aleurioconidia with murine macrophages were investigated. This showed that aleurioconidia were phagocytosed within a very short time and subsequently persisted in the macrophages. Blocking of the dectin-1 receptor with laminarin, a soluble  $\beta$ -glucan, or the mannan receptor with mannan, respectively, did not affect phagocytosis. Macrophages prevented germination of aleurioconidia during the first hours. However, after prolonged incubation, some aleurioconidia were able to overcome the antimicrobial mechanisms and germinate. Macrophages release various cytokines upon contact with pathogens. In this work, TNF $\alpha$  production by J774

cells after infection with aleurioconidia and phialidic conidia was examined. Also, it was checked whether  $\beta$ -glucan in the form of laminarin has an effect on TNF $\alpha$  production. The results showed that aleurioconidia elicited stronger TNF $\alpha$  production compared with phialidic conidia. Laminarin had no effect on cytokine production in this regard.

Monoclonal antibodies offer a great opportunity in the therapy and prophylaxis of diseases. They are for example already well established in cancer therapy. They could also be suitable to treat invasive mycoses. In order to use monoclonal antibodies, it is essential to identify the antigen and thus the target structure and to know their function in the fungus. In the second part of this work, three different monoclonal antibodies against hyphal antigens were characterized. First, two antibodies (AB90-E8, AE183-3) were purified and then examined in more detail in various experiments. Experiments were also performed with the hybridoma supernatant of another antibody (AD105-30-2).

The monoclonal antibody AB90-E8 belongs to the IgG<sub>1</sub> subclass and specifically recognizes *A. fumigatus* hyphae. According to the results of this work, it most likely recognizes a cell wall-bound, most likely GPI-anchored protein. The AB90-E8 antigen becomes accessible to the antibody at an early stage of germination. Opsonization with AB90-E8 results in an inhibition of *A. fumigatus* hyphal growth by approximately 20%. However, no protective effect was observed in infection experiments with PMN and AB90-E8 opsonized hyphae. Moreover, the binding pocket of AB90-E8 has already been successfully used for the production of *A. fumigatus*-specific chimeric antigen receptors, which makes the identification of the antigen all the more important.

The monoclonal antibody AE183-3 also belongs to the IgG<sub>1</sub> subclass and recognizes *Lichtheimia* spp. as well as *C. bertholizae* in immunofluorescence staining. Other representatives of the order Mucorales as well as *Aspergillus* spp. are not recognized by the antibody. The antigen of AE183-3 is probably a glycostructure. The antibody was used as a control antibody for experiments with AB90-E8. Further attempts to investigate the potential of this antibody are still pending.

The monoclonal antibody AD105-30-2 belongs to the IgM subclass and recognizes *F. oxysporum* as well as *Aspergillus* spp. in immunofluorescence staining and

shows a clear signal in ELISA with culture supernatant of both fungi. Presumably, the antigen is a polysaccharide found on the cell wall of both fungi. Further experiments showed that the antigen is to a large extent galactofuranose-dependent and signals in immunofluorescence staining as well as in ELISA from the *A. fumigatus*  $\Delta glfA$ -mutant are significantly reduced. ELISA of purified cell wall components of *A. fumigatus* showed that in particular the cell wall fraction of acetylated galactosaminogalactan interacted with the antibody. However, preparation of the galactosaminogalactan-deficient  $\Delta gtb3$ -mutant demonstrated that galactosaminogalactan is an important but not the sole antigen of AD105-30-2, as immunofluorescence staining remained partially positive.

In this work, new data was collected regarding the antigens of these three monoclonal antibodies. In order to make them useful for therapy or diagnostics, further research regarding the characterization and identification of the antigens is necessary. In any case, the antibodies represent valuable tools to further explore the fungal cell wall.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adamama-Moraitou KK, Pardali D, Day MJ, Denning DW, Papazoglou L, Papastefanou A, Rallis TS. *Aspergillus fumigatus* Bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2011; 47: e13-e8.

Ahrazem O, Gómez-Miranda B, Prieto A, Barasoain I, Bernabé M, Leal JA. An acidic water-soluble cell wall polysaccharide: a chemotaxonomic marker for *Fusarium* and *Gibberella*. *Mycological Research* 2000; 104: 603-10.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé JP. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009; 460: 1117-21.

Akan M, Haziroğlu R, İlhan Z, Sareyyüpoğlu B, Tunca R. A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Diseases* 2002; 46: 497-501.

Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Zaragoza O, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. In vitro activity of antifungals against Zygomycetes. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15: 71-6.

Alves RC, Ferreira JS, Alves AS, Maia LA, Dutra V, Souza AP, Galiza GJN, Dantas AFM. Systemic and Gastrohepatic Mucormycosis in Dogs. *Journal of Comparative Pathology* 2020; 175: 90-4.

Amin S, Thywissen A, Heinekamp T, Saluz HP, Brakhage AA. Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* 2014; 304: 626-36.

Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and*

Immunity 1995; 63: 3266-71.

Andresen D, Donaldson A, Choo L, Knox A, Klaassen M, Ursic C, Vonthethoff L, Krilis S, Konecny P. Multifocal cutaneous mucormycosis complicating polymicrobial wound infections in a tsunami survivor from Sri Lanka. *The Lancet* 2005; 365: 876-8.

Andrew SE, Brooks DE, Smith PJ, Gelatt KN, Chmielewski NT, Whittaker CJ. Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). *Equine Veterinary Journal* 1998; 30: 109-16.

Andus T, Geiger T, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the mRNA induction of acute-phase proteins. *European Journal of Immunology* 1988; 18: 739-46.

Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vandenbroucke V, Li S, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Croubels S. The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins* 2014; 6: 430-52.

Apter A, Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy & Asthma Proceedings* 1990; 11: 157.

Arastehfar A, Lass-Flörl C, Garcia-Rubio R, Daneshnia F, Ilkit M, Boekhout T, Gabaldon T, Perlin DS. The Quiet and Underappreciated Rise of Drug-Resistant Invasive Fungal Pathogens. *Journal of Fungi* 2020; 6: 138.

Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *International Journal of Microbiology* 2011; 2011: 746356.

Avery OT, Goebel WF. Chemo-immunological studies on conjugated

carbohydrate-proteins: II. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *Journal of Experimental Medicine* 1929; 50: 533-50.

Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2012; 73: 293-300.

Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiya H, Yoshie O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 14893-8.

Bakker H, Kleczka B, Gerardy-Schahn R, Routier FH. Identification and partial characterization of two eukaryotic UDP-galactopyranose mutases. *Biological Chemistry* 2005; 386: 657-61.

Baltussen TJH, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2020; 84: e00049-19.

Barachetti L, Mortellaro CM, Di Giancamillo M, Giudice C, Martino P, Travetti O, Miller PE. Bilateral orbital and nasal aspergillosis in a cat. *Veterinary Ophthalmology* 2009; 12: 176-82.

Barrs VR, Halliday C, Martin P, Wilson B, Krockenberger M, Gunew M, Bennett S, Koehlmeyer E, Thompson A, Fliegner R, Hocking A, Sleiman S, O'Brien C, Beatty JA. Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. *The Veterinary Journal* 2012; 191: 58-64.

Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLoS One* 2013; 8: e64871.



Barrs VR, Talbot JJ. Feline aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2014; 44: 51-73.

Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine* 2007; 57: 552-6.

Beauvais A, Maubon D, Park S, Morelle W, Tanguy M, Huerre M, Perlin DS, Latgé JP. Two  $\alpha(1-3)$  glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 1531-8.

Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prévost MC, Latgé JP. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* 2007; 9: 1588-600.

Beauvais A, Bozza S, Kniemeyer O, Formosa C, Balloy V, Henry C, Roberson RW, Dague E, Chignard M, Brakhage AA, Romani L, Latgé JP. Deletion of the  $\alpha$ -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 2013; 9: e1003716.

Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology* 2010; 39: 325-31.

Behnsen J, Narang P, Hasenberg M, Gunzer F, Bilitewski U, Klippel N, Rohde M, Brock M, Brakhage AA, Gunzer M. Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 2007; 3: e13.

Berkova N, Lair-Fullerger S, Féménia F, Huet D, Wagner MC, Gorna K, Tournier F, Ibrahim-Granet O, Guillot J, Chermette R, Boireau P, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *International Immunology* 2006; 18: 139-50.

Bhattacharya A, Osterman MT. Biologic Therapy for Ulcerative Colitis.

Gastroenterology Clinics of North America 2020; 49: 717-29.

Bigot J, Guillot L, Guitard J, Ruffin M, Corvol H, Balloy V, Hennequin C. Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 1041.

Billen F, Clerex C, Le Garèrès A, Massart L, Mignon B, Peeters D. Effect of sampling method and incubation temperature on fungal culture in canine sinonasal aspergillosis. *Journal of Small Animal Practice* 2009; 50: 67-72.

Bloemendal S, Kück U. Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften* 2013; 100: 3-19.

Blomme E, Piero FD, Perle KL, Wilkins PA. Aspergillosis in Horses: A Review. *Equine Veterinary Education* 1998; 10: 86-93.

Boelaert JR, de Locht M, Van Cutsem J, Kerrels V, Cantinieaux B, Verdonck A, Van Landuyt HW, Schneider YJ. Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. In vitro and in vivo animal studies. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 1979-86.

Bowen A, Wear MP, Cordero RJ, Oscarson S, Casadevall A. A Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Manifests Hydrolytic Activity for Both Peptides and Polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 2017; 292: 417-34.

Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *Journal of Immunology* 2002; 168: 1362-71.

Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latgé JP, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schild H, Hebart H. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate

immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *British Journal of Haematology* 2004; 125: 392-9.

Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* 2010; 13: 409-15.

Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *The Lancet* 1989; 2: 244-7.

Briard B, Fontaine T, Samir P, Place DE, Muszkieta L, Malireddi RKS, Karki R, Christgen S, Bomme P, Vogel P, Beau R, Mellado E, Ibrahim-Granet O, Henrissat B, Kalathur RC, Robinson C, Latgé JP, Kanneganti TD. Galactosaminogalactan activates the inflammasome to provide host protection. *Nature* 2020; 588: 688-92.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.

Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 577-82.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001; 413: 36-7.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine* 2012; 4: 165rv13.

Brown RE, Brain JD, Wang N. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environmental Health Perspectives* 1997; 105: 188-200.

Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009; 113: 3716-25.

Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012; 119: 5640-9.

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latgé JP. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 2001; 22: 2812-23.

Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latgé JP, Brakhage AA, Gunzer M. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathogens* 2010; 6: e1000873.

Campbell JH, Winter JH, Richardson MD, Shankland GS, Banham SW. Treatment of pulmonary aspergilloma with itraconazole. *Thorax* 1991; 46: 839-41.

Carrasco L, Mendez A, Jensen HE. Chronic bronchopulmonary aspergillosis in a horse with Cushing's syndrome. *Mycoses* 1996; 39: 443-7.

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 4285-9.

Carvalho A, De Luca A, Bozza S, Cunha C, D'Angelo C, Moretti S, Perruccio K, Iannitti RG, Fallarino F, Pierini A, Latgé JP, Velardi A, Aversa F, Romani L. TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood* 2012; 119: 967-77.

Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein & Peptide Letters* 2002; 9: 211-23.

Cenci E, Mencacci A, C FdO, Del Sero G, Mosci P, Montagnoli C, Bacci A, Romani L. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases* 1998; 178: 1750-60.

Cenci E, Mencacci A, Spreca A, Montagnoli C, Bacci A, Perruccio K, Velardi A, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Romani L. Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infection and Immunity* 2002; 70: 2375-82.

Ceran C, Cokol M, Cingoz S, Tasan I, Ozturk M, Yagci T. Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *BMC Cancer* 2012; 12: 450.

Chakrabarti A, Das A, Mandal J, Shivaprakash MR, George VK, Tarai B, Rao P, Panda N, Verma SC, Sakhuja V. The rising trend of invasive zygomycosis in patients with uncontrolled diabetes mellitus. *Medical Mycology* 2006; 44: 335-42.

Chaturvedi AK, Kavishwar A, Shiva Keshava GB, Shukla PK. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2005; 12: 1063-8.

Chen YL, Mao WJ, Tao HW, Zhu WM, Yan MX, Liu X, Guo TT, Guo T. Preparation and characterization of a novel extracellular polysaccharide with antioxidant activity, from the mangrove-associated fungus *Fusarium oxysporum*. *Marine Biotechnology* 2015; 17: 219-28.

Chiodo F, Marradi M, Park J, Ram AF, Penadés S, van Die I, Tefsen B. Galactofuranose-coated gold nanoparticles elicit a pro-inflammatory response in

human monocyte-derived dendritic cells and are recognized by DC-SIGN. *ACS Chemical Biology* 2014; 9: 383-9.

Chong WH, Neu KP. Incidence, diagnosis and outcomes of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA): a systematic review. *Journal of Hospital Infection* 2021; 113: 115-29.

Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, McElvaney NG. Aspergillus-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *BioMed Research International* 2013; 2013: 723129.

Christin L, Wysong DR, Meshulam T, Hastey R, Simons ER, Diamond RD. Human Platelets Damage *Aspergillus fumigatus* Hyphae and May Supplement Killing by Neutrophils. *Infection and Immunity* 1998; 66: 1181-9.

Cole RJ, Kirksey JW, Dorner JW, Wilson DM, Johnson JC, Jr., Johnson AN, Bedell DM, Springer JP, Chexal KK, Clardy JC, Cox RH. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1977; 25: 826-30.

Cook WR. Observations on the aetiology of epistaxis and cranial nerve paralysis in the horse. *Veterinary Record* 1966; 78: 396-406.

Cortés JCG, Curto M, Carvalho VSD, Pérez P, Ribas JC. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology Advances* 2019; 37: 107352.

Cottone M, Sapienza C, Macaluso FS, Cannizzaro M. Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2019; 37: 451-7.

Coyner K. Otomycosis due to *Aspergillus* spp. in a dog: case report and literature review. *Veterinary Dermatology* 2010; 21: 613-8.

Cutler JE, Deepe GS, Jr., Klein BS. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *National Reviews Microbiology* 2007; 5: 13-28.

d'Enfert C. Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 1997; 21: 163-72.

da Rosa PD, Aquino V, Fuentefria AM, Goldani LZ. Diversity of *Fusarium* species causing invasive and disseminated infections. *Journal of Medical Mycology* 2021; 31: 101137.

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 2009; 22: 447-65.

Dague E, Alsteens D, Latgé JP, Dufrêne YF. High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophysical Journal* 2008; 94: 656-60.

Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics* 2016; 21: 27-35.

Day MJ, Holt PE. Unilateral fungal pyelonephritis in a dog. *Veterinary Pathology* 1994; 31: 250-2.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili, Baarn & Reus.

de Oliveira NF, Santos GRC, Xisto M, Pires Dos Santos GM, Nucci M, Haido RMT, Barreto-Bergter E.  $\beta$ -1,6-linked Galactofuranose- rich peptidogalactomannan of *Fusarium oxysporum* is important in the activation of macrophage mechanisms and as a potential diagnostic antigen. *Medical Mycology*

2019; 57: 234-45.

Deak E, Wilson SD, White E, Carr JH, Balajee SA. *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. PLoS One 2009; 4: e7673.

Deak E, Nelson M, Hernández-Rodríguez Y, Gade L, Baddley J, Momany M, Steele C, Balajee SA. *Aspergillus terreus* accessory conidia are multinucleated, hyperpolarizing structures that display differential dectin staining and can induce heightened inflammatory responses in a pulmonary model of aspergillosis. Virulence 2011; 2: 200-7.

Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 1997; 12: 177-86.

Denning DW. Invasive aspergillosis. Clinical Infectious Diseases 1998; 26: 781-803; quiz 4-5.

Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. Medical Mycology 2013; 51: 361-70.

Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, Ullmann AJ, Dimopoulos G, Lange C. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. European Respiratory Journal 2016; 47: 45-68.

Derkx B, Taminiou J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. The Lancet 1993; 342: 173-4.



Desjardins AE. *Gibberella* from *A(aenaceae)* to *Z(eae)*. Annual Review of Phytopathology 2003; 41: 177-98.

Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. International Journal of Food Microbiology 2007; 119: 47-50.

Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, Jr., O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. Journal of Experimental Medicine 1986; 163: 1433-50.

Dobesova O, Schwarz B, Velde K, Jahn P, Zert Z, Bezdekova B. Guttural pouch mycosis in horses: a retrospective study of 28 cases. Veterinary Record 2012; 171: 561.

Dóczy I, Gyetvai T, Kredics L, Nagy E. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. Clinical Microbiology and Infection 2004; 10: 773-6.

Dromer F, Charreire J, Contrepolis A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. Infection and Immunity 1987; 55: 749-52.

Dyar PM, Fletcher OJ, Page RK. Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. Avian Diseases 1984; 28: 250-5.

Elad D. Disseminated canine mold infections. The Veterinary Journal 2019; 243: 82-90.

Evans J, Levesque D, de Lahunta A, Jensen HE. Intracranial Fusariosis: A Novel Cause of Fungal Meningoencephalitis in a Dog. Veterinary Pathology 2004; 41: 510-4.

Faherty CS, Maurelli AT. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during

infection. *Trends in Microbiology* 2008; 16: 173-80.

Fallon JP, Reeves EP, Kavanagh K. Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin. *Journal of Medical Microbiology* 2010; 59: 625-33.

Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johans J, Gao LL, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, de Villiers WJ, Colombel JF, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P, Lee SD, Loftus EV, Jr., Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine* 2016; 375: 1946-60.

Fedde MR. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science* 1998; 77: 1130-8.

Feldmann M, Maini RN. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Medicine* 2003; 9: 1245-50.

Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M, Latgé JP. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 27594-607.

Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, Bozza S, Moretti S, Schwarz F, Trichot C, Aebi M, Delepierre M, Elbim C, Romani L, Latgé JP. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 2011; 7: e1002372.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* 2007; 176: 231-41.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197: 1107-17.

Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Gantier J-C, Grenouillet F, Dromer F, Dannaoui E. Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 3862-70.

Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology* 2020; 10

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002; 420: 182-6.

Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galán JE, Mellman I. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 2000; 102: 325-34.

Gastebois A, Clavaud C, Aïmanianda V, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiology* 2009; 4: 583-95.

Gaur S, Rajgopal A, Ashbee R. A successfully treated case of peritonitis due to *Fusarium dimerum*. *Journal of Infection* 2010; 61: 86-8.

Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, Hoogenboezem M, van den Berg JM, Prins JM, Vitkov L, van de Veerdonk FL, van den Berg TK, Roos D, Kuijpers TW. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *The Journal of*

Immunology 2016; 196: 1272-83.

Gebremariam T, Alkhazraji S, Soliman SSM, Gu Y, Jeon HH, Zhang L, French SW, Stevens DA, Edwards JE, Jr., Filler SG, Uppuluri P, Ibrahim AS. Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Science Advances* 2019; 5: eaaw1327.

Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium*: a pictorial atlas. Kommissionsverlag P. Parey, Berlin

Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *Journal of Immunology* 2006; 176: 3717-24.

Gilbert J, Fernando WGD. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2004; 26: 464-72.

Goldblatt D. Conjugate vaccines. *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 119: 1-3.

Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, Xu W, Kravtsov I, Hoareau CM, Vanier G, Urb M, Campoli P, Al Abdallah Q, Lehoux M, Chabot JC, Ouimet MC, Baptista SD, Fritz JH, Nierman WC, Latgé JP, Mitchell AP, Filler SG, Fontaine T, Sheppard DC. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal  $\beta$ -glucan from the immune system. *PLoS Pathogens* 2013; 9: e1003575.

Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, David NE, Sasai H, Garza D, Brenner DG, Hales JF, McGuinness RP, Capon DJ, Klapholz S, Jakobovits A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics* 1994; 7: 13-21.

Gresnigt MS, Netea MG, van de Veerdonk FL. Pattern recognition receptors and their role in invasive aspergillosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012; 1273: 60-7.

Gresnigt MS, Bozza S, Becker KL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van der Berg WB, Dinarello CA, Netea MG, Fontaine T, De Luca A, Moretti S, Romani L, Latge JP, van de Veerdonk FL. A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathogens* 2014; 10: e1003936.

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

Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *International Journal of Dermatology* 2007; 46: 822-6.

Guillot J, Sarfati J, de Barros M, Cadoré JL, Jensen HE, Chermette R. Comparative study of serological tests for the diagnosis of equine aspergillosis. *Veterinary Record* 1999; 145: 348-9.

Guillot J, Collobert C, Jensen HE, Huerre M, Chermette R. Two cases of equine mucormycosis caused by *Absidia corymbifera*. *Equine Veterinary Journal* 2000; 32: 453-6.

Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB, Jr. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *Journal of Experimental Medicine* 1984; 160: 1656-71.

Hamet N, Seigle-Murandi F, Steiman R. Contribution to the prophylaxis of chicks aspergillosis: study of the contamination of a hatchery by *Aspergillus fumigatus*. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 1991; 38: 529-37.

Hamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Pulmonary mucormycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2011; 32: 693-702.

Hamilton HL, Whitley RD, McLaughlin SA. Exophthalmos secondary to aspergillosis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2000; 36: 343-7.

Hammerman KJ, Sarosi GA, Tosh FE. Amphotericin B in the treatment of saprophytic forms of pulmonary aspergillosis. *The American Review of Respiratory Disease* 1974; 109: 57-62.

Hattel AL, Drake TR, Anderholm BJ, McAllister ES. Pulmonary aspergillosis associated with acute enteritis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; 199: 589-90.

Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum* 2017; 5

Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, Hofhuis FM, Renardel de Lavalette CR, Schmidt RE, Capel PJ, van de Winkel JG, Gessner JE, van den Berg TK, Verbeek JS. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *Journal of Immunology* 1998; 161: 3026-32.

Heesemann L, Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Moleküle des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, 2010, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Heesemann L, Kotz A, Echtenacher B, Broniszewska M, Routier F, Hoffmann P, Ebel F. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology* 2011; 301: 523-30.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-

type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal* 1998; 334 ( Pt 2): 297-314.

Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 2004; 104: 4038-45.

Hill MW, Whiteman CE, Benjamin MM, Ball L. Pathogenesis of experimental bovine mycotic placentitis produced by *Aspergillus fumigatus*. *Veterinary Pathology* 1971; 8: 175-92.

Hoffmann K, Discher S, Voigt K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladaceae* fam. nov. *Mycological Research* 2007; 111: 1169-83.

Hoffmann K, Walther G, Voigt K. *Mycocladus* vs. *Lichtheimia*: a correction (*Lichtheimiaceae* fam. nov., Mucorales, Mucoromycotina). *Mycological Research* 2009; 113: 277-8.

Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM, Voigt K. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* 2013; 30: 57-76.

Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, Morgan LA, Chen PL, Feldmesser M, Pamer EG. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathogens* 2005; 1: e30.

Hong SB, Kim DH, Lee M, Baek SY, Kwon SW, Houbraeken J, Samson RA. Zygomycota associated with traditional meju, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste. *Journal of Microbiology* 2012; 50: 386-93.

Houbraeken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically

important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology* 2014; 86: 199-249.

Hours S, Nunes H, Kambouchner M, Uzunhan Y, Brauner MW, Valeyre D, Brillet PY. Pulmonary cavitary sarcoidosis: clinico-radiologic characteristics and natural history of a rare form of sarcoidosis. *Medicine (Baltimore)* 2008; 87: 142-51.

Hsieh SH, Kurzai O, Brock M. Persistence within dendritic cells marks an antifungal evasion and dissemination strategy of *Aspergillus terreus*. *Scientific Reports* 2017; 7: 10590.

Hudziak RM, Lewis GD, Shalaby MR, Eessalu TE, Aggarwal BB, Ullrich A, Shepard HM. Amplified expression of the HER2/ERBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor alpha in NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 5102-6.

Huffnagle GB, Deepe GS. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 344-50.

Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latgé JP. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infection and Immunity* 2003; 71: 891-903.

Imhof A, Balajee SA, Fredricks DN, Englund JA, Marr KA. Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 743-6.

Iwanaga M, Kamikawa A, Imai N, Shimada K, Degawa Y, Hanafusa Y, Shibahara T. Striatal necrosis caused by *Lichtheimia ramosa* in a neonatal calf. *Journal of Veterinary Medical Science* 2021; 83: 1943-7.

Jacobson ER, Cheatwood JL, Maxwell LK. Mycotic Diseases of Reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2000; 9: 94-101.



Jakle C, Leek JC, Olson DA, Robbins DL. Septic arthritis due to *Fusarium solani*. The Journal of Rheumatology 1983; 10: 151-3.

Jensen HE, Olsen SN, Aalbaek B. Gastrointestinal aspergillosis and zygomycosis of cattle. Veterinary Pathology 1994; 31: 28-36.

Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Kong DCM, Chen SCA. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. Clinical Microbiology and Infection 2019; 25: 26-34.

Jewkes J, Kay PH, Paneth M, Citron KM. Pulmonary aspergilloma: analysis of prognosis in relation to haemoptysis and survey of treatment. Thorax 1983; 38: 572-8.

Johnson PJ, Moore LA, Mrad DR, Turk JR, Wilson DA. Sudden death of two horses associated with pulmonary aspergillosis. Veterinary Record 1999; 145: 16-20.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature 1986; 321: 522-5.

Kang S, Tanaka T, Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. International Immunology 2015; 27: 21-9.

Kano R, Itamoto K, Okuda M, Inokuma H, Hasegawa A, Balajee SA. Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. Mycoses 2008; 51: 360-1.

Kano R, Maruyama H, Kubota M, Hasegawa A, Kamata H. Chronic ulcerative dermatitis caused by *Fusarium sporotrichioides*. Medical Mycology 2011; 49: 303-5.

Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 2489-90.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 2010; 11: 373-84.

Käyhty H, Karanko V, Peltola H, Mäkelä PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* 1984; 74: 857-65.

Kazakova ED, Yashunsky DV, Krylov VB, Bouchara JP, Cornet M, Valsecchi I, Fontaine T, Latgé JP, Nifantiev NE. Biotinylated Oligo- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-d-galactosamines and Their N-Acetylated Derivatives:  $\alpha$ -Stereoselective Synthesis and Immunology Application. *Journal of the American Chemical Society* 2020; 142: 1175-9.

Kendall A, Bröjer J, Karlstam E, Pringle J. Enilconazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22: 1239-42.

Kievit W, Fransen J, Adang EM, den Broeder AA, Bernelot Moens HJ, Visser H, van de Laar MA, van Riel PL. Long-term effectiveness and safety of TNF-blocking agents in daily clinical practice: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring register. *Rheumatology (Oxford)* 2011; 50: 196-203.

Knudtson WU, Kirkbride CA. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1992; 4: 181-5.

Knutsen AP, Chauhan B, Slavin RG. Cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary Aspergillosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1998; 18: 575-99.

Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal of Immunology* 1976; 6: 511-9.

Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 159-75.

Kotimaa MH, Oksanen L, Koskela P. Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 1991; 17: 117-22.

Kozel TR, Roilides E, Dimitriadou-Georgiadou A, Sein T, Kadiltsoglou I, Walsh TJ. Tumor Necrosis Factor Alpha Enhances Antifungal Activities of Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 1998; 66: 5999-6003.

Kuehnel MP, Goethe R, Habermann A, Mueller E, Rohde M, Griffiths G, Valentin-Weigand P. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cellular Microbiology* 2001; 3: 551-66.

Kurien M, Anandi V, Raman R, Brahmadathan KN. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. *The Journal of Laryngology & Otology* 1992; 106: 733-6.

Labelle AL, Hamor RE, Barger AM, Maddox CW, Breaux CB. *Aspergillus flavus* keratomycosis in a cat treated with topical 1% voriconazole solution. *Veterinary Ophthalmology* 2009; 12: 48-52.

Lackner M, Obermair J, Naschberger V, Raschbichler LM, Kandelbauer C, Pallua J, Metzläff J, Furxer S, Lass-Flörl C, Binder U. Cryptic species of *Aspergillus* section *Terrei* display essential physiological features to cause infection and are similar in their virulence potential in *Galleria mellonella*. *Virulence* 2019; 10: 542-54.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2003; 38: 143-58.

Larcher R, Platon L, Amalric M, Brunot V, Besnard N, Benomar R, Daubin D, Ceballos P, Rispaïl P, Lachaud L, Bourgeois N, Klouche K. Emerging Invasive Fungal Infections in Critically Ill Patients: Incidence, Outcomes and Prognosis Factors, a Case-Control Study. *Journal of Fungi* 2021; 7: 330.

Las Heras A, Domínguez L, López I, Payá MJ, Peña L, Mazzucchelli F, García LA, Fernández-Garayzábal JF. Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy. *Veterinary Record* 2000; 147: 578-80.

Lass-Flörl C, Dietl AM, Kontoyiannis DP, Brock M. *Aspergillus terreus* Species Complex. *Clinical microbiology reviews* 2021; 34: e0031120.

Latgé J-P. Galactofuranose containing molecules in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 2009; 47: S104-S9.

Latgé J-P, Calderone R. The fungal cell wall. In: *Growth, Differentiation and Sexuality*: Springer 2006: 73-104.

Latgé JP, Debeaupuis JP, Sarfati J, Diaquin M, Paris S. Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Medical Research* 1993; 24: 269-74.

Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, Parra E, Bouchara JP, Fournet B. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 1994; 62: 5424-33.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 1999; 12: 310-50.

Latgé JP, Mouyna I, Tekaia F, Beauvais A, Debeauvais JP, Nierman W. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 2005; 43 Suppl 1: S15-22.

Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* 2010; 12: 863-72.

Latgé JP, Beauvais A. Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology* 2014; 20: 111-7.

Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annual Review of Microbiology* 2017; 71: 99-116.

Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical microbiology reviews* 2019; 33

Lavigne LM, Albina JE, Reichner JS. Beta-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions. *Journal of Immunology* 2006; 177: 8667-75.

Lecointe K, Cornu M, Leroy J, Coulon P, Sendid B. Polysaccharides Cell Wall Architecture of Mucorales. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10

Lee FY, Mossad SB, Adal KA. Pulmonary mucormycosis: the last 30 years. *Archives of Internal Medicine* 1999; 159: 1301-9.

Lee MJ, Gravelat FN, Cerone RP, Baptista SD, Campoli PV, Choe SI, Kravtsov I, Vinogradov E, Creuzenet C, Liu H, Berghuis AM, Latgé JP, Filler SG, Fontaine T, Sheppard DC. Overlapping and distinct roles of *Aspergillus fumigatus* UDP-glucose 4-epimerases in galactose metabolism and the synthesis of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 1243-56.

Lee MJ, Liu H, Barker BM, Snarr BD, Gravelat FN, Al Abdallah Q, Gavino C, Baistrocchi SR, Ostapska H, Xiao T, Ralph B, Solis NV, Lehoux M, Baptista SD, Thammahong A, Cerone RP, Kaminskyj SG, Guiot MC, Latgé JP, Fontaine T, Vinh DC, Filler SG, Sheppard DC. The Fungal Exopolysaccharide Galactosaminogalactan Mediates Virulence by Enhancing Resistance to Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathogens* 2015; 11: e1005187.

Lee MJ, Geller AM, Bamford NC, Liu H, Gravelat FN, Snarr BD, Le Mauff F, Chabot J, Ralph B, Ostapska H, Lehoux M, Cerone RP, Baptista SD, Vinogradov E, Stajich JE, Filler SG, Howell PL, Sheppard DC. Deacetylation of Fungal Exopolysaccharide Mediates Adhesion and Biofilm Formation. *mBio* 2016; 7: e00252-16.

Lee SH, Barnes WG, Schaetzel WP. Pulmonary aspergillosis and the importance of oxalate crystal recognition in cytology specimens. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1986; 110: 1176-9.

Leiding JW, Holland SM. Chronic Granulomatous Disease. In: GeneReviews. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, eds. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993:

Levitz SM, Farrell TP. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Leukocyte Biology* 1990; 47: 170-5.

Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1993; 37: 255-63.

Li H, Zhou H, Luo Y, Ouyang H, Hu H, Jin C. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Molecular Microbiology* 2007; 64: 1014-27.

Lima SL, Colombo AL, de Almeida Junior JN. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10

Link HF. Observationes in ordines plantarum naturales: Dissertatio Ima complectens anandrarum ordines epiphytas, mucedines gastromycos et fungos. In: Magazin für die neusten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde Berlin: Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin 1809:

Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994; 368: 856-9.

Loretti AP, Colodel EM, Driemeier D, Corrêa AM, Bangel JJ, Jr., Ferreiro L. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003; 15: 123-32.

Loussert C, Schmitt C, Prevost MC, Balloy V, Fadel E, Philippe B, Kauffmann-Lacroix C, Latgé JP, Beauvais A. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* 2010; 12: 405-10.

Ludwig A, Gatineau S, Reynaud MC, Cadoré JL, Bourdoiseau G. Fungal isolation and identification in 21 cases of guttural pouch mycosis in horses (1998-2002). *The Veterinary Journal* 2005; 169: 457-61.

Maina JN. Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2006; 81: 545-79.

Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daëron M, Bruhns P. FcγR4 is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεR1 in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118: 3738-50.

Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from

*Fusarium moniliforme*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 1988; 55: 197-203.

Martin MP, Bouck KP, Helm J, Dykstra MJ, Wages DP, Barnes HJ. Disseminated *Aspergillus flavus* infection in broiler breeder pullets. Avian Diseases 2007; 51: 626-31.

Mattingly JK, Ramakrishnan VR. Rhinocerebral Mucormycosis of the Optic Nerve. Otolaryngology – Head and Neck Surgery 2016; 155: 888-9.

Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. Clinical and Experimental Allergy 2015; 45: 1765-78.

Maubon D, Park S, Tanguy M, Huerre M, Schmitt C, Prévost MC, Perlin DS, Latgé JP, Beauvais A. AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. Fungal Genetics and Biology 2006; 43: 366-75.

McCarthy DS, Pepys J. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis. Clinical Allergy 1971; 1: 261-86.

McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Microbes and Infection 2010; 12: 928-36.

Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. Journal of Immunology 1999; 162: 1633-40.

Mei L, Wang X, Yin Y, Tang G, Wang C. Conservative production of galactosaminogalactan in *Metarhizium* is responsible for appressorium mucilage production and topical infection of insect hosts. PLoS Pathogens 2021; 17:



e1009656.

Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cellular Microbiology* 2003; 5: 561-70.

Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat M-R, Wienker TF, Ljungman P, Hebart H, Dornbusch HJ, Einsele H, Loeffler J. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2008; 111: 534-6.

Miyazaki T, Naoi Y. Chemical Structures of Main Extracellular Polysaccharides of *Alternaria solani* and *Fusarium solani*. *Studies on Fungal Polysaccharides. XVIII. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 1975; 23: 1752-8.

Miyazawa K, Umeyama T, Hoshino Y, Abe K, Miyazaki Y. Quantitative Monitoring of Mycelial Growth of *Aspergillus fumigatus* in Liquid Culture by Optical Density. *Microbiology Spectrum* 2022; 10: e00063-21.

Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke* 2009; 2009: 7-13.

Morgavi DP, Boudra H, Jouany JP, Michalet-Doreau B. Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation. *Food Additives & Contaminants* 2004; 21: 871-8.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81: 6851-5.

Munk PL, Vellet AD, Rankin RN, Müller NL, Ahmad D. Intracavitary

aspergilloma: transthoracic percutaneous injection of amphotericin gelatin solution. *Radiology* 1993; 188: 821-3.

Muntz FH. Oxalate-producing pulmonary aspergillosis in an alpaca. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 631-2.

Murphy KM, Weaver C. Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren. In: Janeway Immunologie. 9 edn: Springer Spektrum, Berlin 2017a: 177-20.

Murphy KM, Weaver C. Die humorale Immunantwort. In: Janeway Immunologie. 9 edn: Springer Spektrum, Berlin 2017b: 517-80.

Murphy KM, Weaver C. Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität. In: Janeway Immunologie. 9 edn: Springer Spektrum, Berlin 2017c: 95-76.

Murray CK, Beckius ML, McAllister K. *Fusarium proliferatum* superficial suppurative thrombophlebitis. *Military Medicine* 2003; 168: 426-7.

Namitome K, Kano R, Sekiguchi M, Iwasaki T, Kaneshima T, Nishifuji K. Isolation of *Fusarium* sp. from a claw of a dog with onychomycosis. *The Journal of veterinary medical science* 2011; 73: 965-9.

Neblett Fanfair R, Benedict K, Bos J, Bennett SD, Lo Y-C, Adebajo T, Etienne K, Deak E, Derado G, Shieh W-J, Drew C, Zaki S, Sugerman D, Gade L, Thompson EH, Sutton DA, Engelthaler DM, Schupp JM, Brandt ME, Harris JR, Lockhart SR, Turabelidze G, Park BJ. Necrotizing Cutaneous Mucormycosis after a Tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 2214-25.

Nelson PE, T.A. T, W.F.O M (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.

Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical microbiology reviews* 1994; 7: 479-504.

Ni M, Yu JH. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. PLoS One 2007; 2: e970.

Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. Immunity 2005; 23: 41-51.

Nucci F, Nouér SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. Fusariosis. Semin Respir Crit Care Med 2015; 36: 706-14.

Nucci M. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and Zygomycetes in transplant recipients. Current Opinion in Infectious Diseases 2003; 16: 607-12.

Nucci M, Anaissie E. Emerging fungi. Infectious Disease Clinics of North America 2006; 20: 563-79.

Nucci M, Anaissie E. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid-organ transplantation--focus on aspergillosis. Clinics in Chest Medicine 2009; 30: 295-306, vii.

O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 2009; 457: 471-4.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends in Microbiology 2003; 11: 272-9.

Osherov N, Yarden O. The cell wall of filamentous fungi. In: Cellular and molecular biology of filamentous fungi Washington, D.C, USA: ASM Press 2010: 224-37.

Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. Nature Reviews Drug Discovery 2010; 9: 719-27.

Pace LW, Wirth NR, Foss RR, Fales WH. Endocarditis and pulmonary aspergillosis in a horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1994; 6: 504-6.

Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, Houcine O, Taramelli D, Lombardi L, Latgé JP. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity* 1997; 65: 1510-4.

Paris S, Debeaupuis JP, Cramer R, Carey M, Charlès F, Prévost MC, Schmitt C, Philippe B, Latgé JP. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69: 1581-8.

Park BJ, Pappas PG, Wannemuehler KA, Alexander BD, Anaissie EJ, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt L, Ito JI, Kauffman CA, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wingard JR, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Invasive non-*Aspergillus* mold infections in transplant recipients, United States, 2001-2006. *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17: 1855-64.

Paterson RRM, Lima N (2015) *Molecular biology of food and water borne mycotoxigenic and mycotic fungi*. CRC Press, Boca Raton, USA.

Peeters D, Clercx C. Update on canine sinonasal aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2007; 37: 901-16.

Pérez V, Corpa JM, García Marín JF, Adúriz JJ, Jensen HE. Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. *Veterinary Pathology* 1998; 35: 235-40.

Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 4419-31.

Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidallo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar

macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and Immunity* 2003; 71: 3034-42.

Plow EF, Zhang L. A MAC-1 attack: integrin functions directly challenged in knockout mice. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 1145-6.

Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, Riva G, Forghieri F, Beauvais A, Beau R, Candoni A, Maertens J, Rossi G, Morselli M, Zanetti E, Quadrelli C, Codeluppi M, Guaraldi G, Pagano L, Caira M, Giovane CD, Maccaferri M, Stefani A, Morandi U, Tazzioli G, Girardis M, Delia M, Specchia G, Longo G, Marasca R, Narni F, Merli F, Imovilli A, Apolone G, Carvalho A, Comoli P, Romani L, Latgè JP, Luppi M. Characterization of Specific Immune Responses to Different *Aspergillus* Antigens during the Course of Invasive Aspergillosis in Hematologic Patients. *PLoS One* 2013; 8: e74326.

Prakash H, Ghosh AK, Rudramurthy SM, Singh P, Xess I, Savio J, Pamidimukkala U, Jillwin J, Varma S, Das A, Panda NK, Singh S, Bal A, Chakrabarti A. A prospective multicenter study on mucormycosis in India: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 2019; 57: 395-402.

Puntenney SB, Wang Y, Forsberg NE (2003) Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome. In: Southwest Nutrition & Management Conference, Phoenix, Tucson: University of Arizona, Department of Animal Science. 49–63

Ramadori G, Van Damme J, Rieder H, Meyer zum Büschenfelde KH. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Immunology* 1988; 18: 1259-64.

Raper KB, Fennell DI (1965) The genus *Aspergillus*. Williams & Willkins, Baltimore.

Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annual Review of Immunology* 1991; 9: 457-

92.

Rayens E, Rabacal W, Kang SE, Celia BN, Momany M, Norris KA. Vaccine-Induced Protection in Two Murine Models of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 670578.

Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2006; 13: 267-73.

Reed C, Ibrahim A, Edwards JE, Jr., Walot I, Spellberg B. Deferasirox, an iron-chelating agent, as salvage therapy for rhinocerebral mucormycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 3968-9.

Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435-45.

Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews* 2000; 13: 236-301.

Richard JL, Dvorak TJ, Ross PF. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* 1996; 134: 167-70.

Richardson M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15 Suppl 5: 2-9.

Ricketti AJ, Greenberger PA, Glassroth J. Spontaneous pneumothorax in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Archives of Internal Medicine* 1984; 144: 151-2.

Riet-Correa F, Rivero R, Odriozola E, Adrien Mde L, Medeiros RM, Schild AL. Mycotoxicoses of ruminants and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic*

Investigation 2013; 25: 692-708.

Risslegger B, Zoran T, Lackner M, Aigner M, Sánchez-Reus F, Rezusta A, Chowdhary A, Taj-Aldeen SJ, Arendrup MC, Oliveri S, Kontoyiannis DP, Alastruey-Izquierdo A, Lagrou K, Lo Cascio G, Meis JF, Buzina W, Farina C, Drogari-Apiranthitou M, Grancini A, Tortorano AM, Willinger B, Hamprecht A, Johnson E, Klingspor L, Arsic-Arsenijevic V, Cornely OA, Meletiadis J, Prammer W, Tullio V, Vehreschild JJ, Trovato L, Lewis RE, Segal E, Rath PM, Hamal P, Rodriguez-Iglesias M, Roilides E, Arikani-Akdagli S, Chakrabarti A, Colombo AL, Fernández MS, Martin-Gomez MT, Badali H, Petrikos G, Klimko N, Heimann SM, Houbraken J, Uzun O, Edlinger M, Fuente S, Lass-Flörl C. A prospective international *Aspergillus terreus* survey: an EFISG, ISHAM and ECMM joint study. *Clinical Microbiology and Infection* 2017; 23: 776.e1-e5.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 634-53.

Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005; 22: 507-17.

Rohde M, Schwienbacher M, Nikolaus T, Heesemann J, Ebel F. Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 206: 99-105.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 1-23.

Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Annals of Internal Medicine* 1977; 86: 405-14.

Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host & Microbe* 2007; 2: 55-67.

Ruf D, Rolle des Zellwandintegritätswegs in *Aspergillus fumigatus* für Sensibilität und Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten - Analyse mittels mitochondrialer Morphologie als Stressmarker, 2021, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Samalova M, Carr P, Bromley M, Blatzer M, Moya-Nilges M, Latgé JP, Mouyna I. GPI Anchored Proteins in *Aspergillus fumigatus* and Cell Wall Morphogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2020; 425: 167-86.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 2014; 78: 141-73.

Sander A, Beyer U, Amberg R. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Mycoses* 1998; 41: 109-11.

Sansom J, Featherstone H, Barnett KC. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. *Veterinary Record* 2005; 156: 13-7.

Sarfati J, Jensen HE, Latgé JP. Route of infections in bovine aspergillosis. *Journal of Medical Veterinary Mycology* 1996; 34: 379-83.

Schauwvlieghe A, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Van Tienen C, Lagrou K, Verweij PE, Van de Veerdonk FL, Gommers D, Spronk P, Bergmans D, Hoedemaekers A, Andrinopoulou ER, van den Berg C, Juffermans NP, Hodiament CJ, Vonk AG, Depuydt P, Boelens J, Wauters J. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2018; 6: 782-92.



Schlam D, Canton J, Carreño M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, Fairn GD. Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. *mBio* 2016; 7: e02242.

Schmalhorst PS, Krappmann S, Vervecken W, Rohde M, Müller M, Braus GH, Contreras R, Braun A, Bakker H, Routier FH. Contribution of Galactofuranose to the Virulence of the Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 2008; 7: 1268-77.

Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 1998; 41: 89-91.

Schoffemeer EAM, Klis FM, Sietsma JH, Cornelissen BJC. The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 1999; 27: 275-82.

Schultz RM, Johnson EG, Wisner ER, Brown NA, Byrne BA, Sykes JE. Clinicopathologic and diagnostic imaging characteristics of systemic aspergillosis in 30 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22: 851-9.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 2005; 23: 197-223.

Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 170-200.

Seif M, Kakoschke TK, Ebel F, Bellet MM, Trinks N, Renga G, Pariano M, Romani L, Tappe B, Espie D, Donnadiou E, Hünninger K, Häder A, Sauer M, Damotte D, Alifano M, White PL, Backx M, Nerreter T, Machwirth M, Kurzai O, Pommersberger S, Einsele H, Hudecek M, Löffler J. CAR T-cells targeting *Aspergillus fumigatus* for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis. *Science Translational Medicine* im Druck;

Seligsohn R, Rippon JW, Lerner SA. *Aspergillus terreus* osteomyelitis. Archives of Internal Medicine 1977; 137: 918-20.

Seong KY, Zhao X, Xu JR, Güldener U, Kistler HC. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology 2008; 45: 389-99.

Serrano-Gómez D, Domínguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbí AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. Journal of Immunology 2004; 173: 5635-43.

Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. Medical Mycology 2015; 53: 765-97.

Seyedmousavi S, Bosco, S. D. M. G., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Jacobsen, I. D., Jensen, H. E., Martel, A., Mignon, B., Pasmans, F., Piecková, E., Rodrigues, A. M., Singh, K., Vicente, V. A., Wibbelt, G., Wiederhold, N. P., & Guillot, J. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. Medical Mycology 2018; 56: 165-87.

Shapiro MJ, Albelda SM, Mayock RL, McLean GK. Severe hemoptysis associated with pulmonary aspergilloma. Percutaneous intracavitary treatment. Chest 1988; 94: 1225-31.

Shirani D, Selk Ghaffari M, Khosravi AR, Vajhi AR, Khorami N, Zahraei Salehi T, Shokri H, Abarkar M. An unusual case of nasal mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae* in a German shepherd dog. Iranian Journal of Veterinary Research 2008; 9: 378-80.

Shneerson JM, Emerson PA, Phillips RH. Radiotherapy for massive haemoptysis from an aspergilloma. Thorax 1980; 35: 953-4.

Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology* 2005; 129: 569-82.

Sierra-Hoffman M, Paltiyevich-Gibson S, Carpenter JL, Hurley DL. *Fusarium* osteomyelitis: case report and review of the literature. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; 37: 237-40.

Siwek GT, Dodgson KJ, de Magalhaes-Silverman M, Bartelt LA, Kilborn SB, Hoth PL, Diekema DJ, Pfaller MA. Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 584-7.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.

Slesiona S, Gressler M, Mihlan M, Zaehle C, Schaller M, Barz D, Hube B, Jacobsen ID, Brock M. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* 2012; 7: e31223.

Slesiona S, Gressler M, Mihlan M, Zaehle C, Schaller M, Barz D, Hube B, Jacobsen ID, Brock M. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* 2012a; 7: e31223.

Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *European Respiratory Journal* 2011; 37: 865-72.

Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, Howell PL, Sheppard DC. Galactosaminogalactan (GAG) and its multiple roles in *Aspergillus* pathogenesis. *Virulence* 2019; 10: 976-83.

Spikes S, Xu R, Nguyen CK, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Jacobson RH, Ejzykiewicz DE, Chiang LY, Filler SG, May GS. Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Contributes to Host-Specific Differences in Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197: 479-86.

Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, Gordon S, Shellito JE, Kolls JK. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198: 1677-88.

Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 2005; 1: e42.

Steger M, Bermejo-Jambrina M, Yordanov T, Wagener J, Brakhage AA, Pittl V, Huber LA, Haas H, Lass-Flörl C, Posch W, Wilflingseder D.  $\beta$ -1,3-glucan-lacking *Aspergillus fumigatus* mediates an efficient antifungal immune response by activating complement and dendritic cells. *Virulence* 2019; 10: 957-69.

Steinbach WJ, Benjamin DK, Jr., Kontoyiannis DP, Perfect JR, Lutsar I, Marr KA, Lionakis MS, Torres HA, Jafri H, Walsh TJ. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 192-8.

Steinbrink JM, Miceli MH. Mucormycosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 2021; 35: 435-52.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137: 1142-62.

Suelmann R, Fischer R. Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2000; 45: 42-50.

Sugahara G, Kiuchi A, Usui R, Usui R, Mineshige T, Kamiie J, Shirota K. Granulomatous pododermatitis in the digits caused by *Fusarium proliferatum* in a cat. *The Journal of veterinary medical science* 2014; 76: 435-8.

Sugui JA, Kim HS, Zarembek KA, Chang YC, Gallin JI, Nierman WC, Kwon-Chung KJ. Genes Differentially Expressed in Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon Exposure to Human Neutrophils. *PLoS One* 2008; 3: e2655.

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 2010; 31: 318-24.

Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2343-5.

Sweeney CR, Habecker PL. Pulmonary aspergillosis in horses: 29 cases (1974-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; 214: 808-11.

Talbot JJ, Johnson LR, Martin P, Beatty JA, Sutton DA, Billen F, Halliday CL, Gibson JS, Kidd S, Steiner JM, Ujvari B, Barrs VR. What causes canine sino-nasal aspergillosis? A molecular approach to species identification. *The Veterinary Journal* 2014; 200: 17-21.

Tanaka Y, Toyotome T, Inokuma H, Watanabe K-i, Kobayashi Y, Horiuchi N. Rhinocerebral Zygomycosis Due to a *Lichtheimia ramosa* Infection in a Calf: Neural Spread Through the Olfactory Nerves. *Mycopathologia* 2019; 184: 141-6.

Tasker S, Knottenbelt CM, Munro EA, Stonehewer J, Simpson JW, Mackin AJ. Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. *Journal of Small Animal Practice* 1999; 40: 473-8.

Thompson GR, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. *American Journal of*

Respiratory and Critical Care Medicine 2008; 29: 103-10.

Throne Steinlage SJ, Sander JE, Brown TP, Lobsinger CM, Thayer SG, Martinez A. Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets. Avian Diseases 2003; 47: 229-33.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. Journal of Experimental Medicine 2005; 202: 597-606.

Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. PLoS One 2009; 4: e5392.

Tortorano AM, Esposito MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C, Cascio GL. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology 2012; 50: 1051-3.

Tsai SS, Park JH, Hirai K, Itakura C. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. Avian Pathology 1992; 21: 699-709.

Tsikitis VL, Albina JE, Reichner JS. Beta-glucan affects leukocyte navigation in a complex chemotactic gradient. Surgery 2004; 136: 384-9.

Tsoni SV, Brown GD. beta-Glucans and dectin-1. Annals of the New York Academy of Sciences 2008; 1143: 45-60.

Ulrich S, Ebel F. Monoclonal Antibodies as Tools to Combat Fungal Infections. Journal of Fungi 2020; 6

Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 2005; 106: 2543-50.

Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 2009; 5: e1000639.

van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 2008; 11: 305-12.

Vascellari M, Carminato A, Danesi P, Carniel M, Granato A, Stocco N, Mutinelli F. Pathology in practice. Severe, chronic, pyogranulomatous rhinosinusitis with necrosis and fungal septate hyphae consistent with *Fusarium* spp infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2011; 238: 449-51.

Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory responses. *Journal of Immunology* 2000; 164: 3755-63.

Vaughan LM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clinical Pharmacy* 1993; 12: 24-33.

Vendruscolo CP, Frias NC, de Carvalho CB, de Sá LRM, Belli CB, Baccarin RYA. Leukoencephalomalacia Outbreak in Horses due to Consumption of Contaminated Hay. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30: 1879-81.

Wada S, Hobo S, Ode H, Niwa H, Moriyama H. Equine keratomycosis in Japan. *Veterinary Ophthalmology* 2013; 16: 1-9.

Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, Sein

T, Schaufele R, Peter J, Bacher J, Casler H, Armstrong D, Espinel-Ingroff A, Rinaldi MG, Lyman CA. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 188: 305-19.

Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jørgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infection and Immunity* 2001; 69: 2402-6.

Wang Y, Jonsson F. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors. *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 1958.

Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 154: 1868-902.

Wardlaw A, Geddes DM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1992; 85: 747-51.

Warkentien T, Rodriguez C, Lloyd B, Wells J, Weintrob A, Dunne JR, Ganesan A, Li P, Bradley W, Gaskins LJ, Seillier-Moisewitsch F, Murray CK, Millar EV, Keenan B, Paolino K, Fleming M, Hospenthal DR, Wortmann GW, Landrum ML, Kortepeter MG, Tribble DR, Group ftIDCRPTIDOS. Invasive Mold Infections Following Combat-related Injuries. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55: 1441-9.

Wasylnka JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 1579-87.

Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, Faro-Trindade I, Brown GD, Steele C. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 4938-46.



Wharton RE, Stefanov EK, King RG, Kearney JF. Antibodies Generated against *Streptococci* Protect in a Mouse Model of Disseminated Aspergillosis. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 4387-96.

Wiedemann A, Kakoschke TK, Speth C, Rambach G, Ensinger C, Jensen HE, Ebel F. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *International Journal of Medical Microbiology* 2016; 306: 381-90.

Williams IR. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1072: 52-61.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 80: 1106-22.

Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 43818-23.

Wollenweber HW, Reinking OA. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Berlin: Paul Parey 1935: 355.

Wright SD, Silverstein SC. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1982; 156: 1149-64.

Xia Y, Vetvicka V, Yan J, Hanikýrová M, Mayadas T, Ross GD. The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *Journal of Immunology* 1999; 162: 2281-90.

Yamauchi H, Takai Y, Yamasaki H, Fukuda R. Thoracic mass in a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology* 2011; 48: E1-5.

Zarembek KA, Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *Journal of Immunology* 2007; 178: 6367-73.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-7.

Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Quarterly Journal of Medicine* 2007; 100: 317-34.

## IX. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel meinen herzlichsten Dank aussprechen. Es war mir eine große Ehre ein Teil deiner Arbeitsgruppe gewesen zu sein und an deinem Wissen teilhaben zu dürfen. Danke für die großartige Betreuung, deine Geduld und dein offenes Ohr.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Straubinger für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl.

Christoph möchte ich danken, dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Danke, dass du bei jedem noch so kleinen Anliegen immer zur Stelle warst und ich mich stets auf dich verlassen konnte.

Besonderen Dank möchte ich auch meinen Mitdotorandinnen Katharina L., Katharina T. und Lia aussprechen. Katharina L., danke, dass du seit dem ersten Semester an meiner Seite gestanden und alle Höhen und Tiefen des Studiums und der Doktorarbeit miterlebt hast. Danke, dass du immer für mich da bist. Katharina T., mit dir als Kollegin wurde der Arbeitsalltag, aber auch die Freizeit, niemals langweilig. Danke für deine stetige Unterstützung und konstruktiven Ratschläge. Lia, ich danke dir für den Austausch über alle Sorgen und Nöte eines Doktoranden während unserer Kaffeepausen. Ich werde Euch und unsere gemeinsamen Spaziergänge im Englischen Garten und Besuche in der Königin sehr vermissen. Auch Andrea danke ich herzlich für ihre motivierenden Worte und den stetigen Austausch.

Sebastian danke ich für die fachliche Hilfe im Laboralltag. Den Mitgliedern der AG Straubinger und AG *Stachybotrys* danke ich für die schöne Zeit am Lehrstuhl und die gemeinsamen Mittagessen.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie sowohl im Studium als auch während der Promotion stets mein Rückhalt war und mich immer unterstützt hat. Meinem Freund Scott gebührt ebenfalls ein großes Dankeschön, da er meine Launen und Frustration stets mit Ruhe und Gelassenheit aushielt und mich motivierte weiterzumachen, wenn ich an mir zweifelte.