

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Institut der Universität München
Leitung: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum



Funktionelle Charakterisierung der mitochondrialen Fissionsproteine in *Aspergillus fumigatus*

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

vorgelegt von

Zhaojun Zhu

aus

Xian

Jahr 2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Nikolaus Wagener

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Simon Rothenfusser
Prof. Dr. Thomas Hellmuth Klopstock
PD Dr. Kai Hell

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2023

Eidesstattliche Versicherung

Zhu, Zhaojun

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Funktionelle Charakterisierung der mitochondrialen Fissionsproteine in *Aspergillus fumigatus*

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

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

München, 17.07.2023

Ort, Datum

Zhaojun Zhu

Unterschrift der Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Der Pilz <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.1	Taxonomie und Morphologie des <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.2	Lebenszyklus und Wachstum	2
1.1.3	Medizinische Relevanz	3
1.1.4	Diagnostik und Therapie der invasiven Aspergillose	5
1.1.5	Azolresistenz und CYP51	7
1.2	Mitochondrien	7
1.2.1	Aufbau und Funktion von Mitochondrien	7
1.2.2	Mitochondriale Genetik	8
1.2.3	Mitochondriale Dynamik	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Verwendete Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	14
2.2	Molekularbiologische Grundlagen	17
2.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. fumigatus</i>	17
2.2.2	DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.2.4	Restriktionsverdau	19
2.2.5	Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	19
2.2.6	Ligation von DNA	19
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	20
2.2.8	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.2.9	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen	21
2.2.10	Transformation von <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
2.2.11	DNA-Sequenzierung	22
2.2.12	Klonierungsstrategien	23
2.3	Mikrobiologische Methoden	24
2.3.1	Kultur und Ernte von <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
2.3.2	Bestimmung der Sporenkonzentration	24
2.3.3	Wachstumsanalyse von <i>A. fumigatus</i>	25
2.3.4	<i>Galleria mellonella</i> - Infektionsmodell	26
2.3.5	Mikroskopie	26
2.4	Medien und Puffer	27

2.5	Chemikalien und Geräte	28
2.5.1	Chemikalien und Enzyme.....	28
2.5.2	Geräte.....	28
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Identifikation möglicher Komponenten der mitochondrialen Fissionsmaschinerie von <i>A. fumigatus</i>	30
3.1.1	Das Dnm1-Homolog	30
3.1.2	Das Fis1-Homolog.....	30
3.1.3	Das Mdv1/Caf4-Homolog	31
3.2	Herstellung und Verifizierung von <i>dnm1</i> -, <i>fis1</i> - und <i>mdv1</i> -Deletionsmutanten und -Komplementanten	31
3.2.1	<i>dnm1</i>	32
3.2.2	<i>fis1</i> und <i>mdv1</i>	32
3.3	Die Deletionsmutanten der mitochondrialen Fission zeigen ein verändertes Sporulations- und Wachstumsverhalten.....	34
3.3.1	Die verminderte Sporulation	34
3.3.2	Eingeschränktes radiales Wachstum	37
3.3.3	Erhöhte Hitzesensibilität.....	39
3.3.4	Keine Wachstumseinschränkungen bei unterschiedlicher Glukosekonzentration im Medium	40
3.4	Die Deletion von <i>dnm1</i> , <i>fis1</i> oder <i>mdv1</i> führt zur Veränderung der Morphologie der Mitochondrien	41
3.5	Die Sensitivität der <i>dnm1</i> -, <i>fis1</i> - und <i>mdv1</i> -Deletionsmutanten gegenüber Azol-Antimykotika ist erniedrigt.....	42
3.6	Voriconazol führt zum „Bonsai-Phänotyp“ der Hyphen und zur Fragmentierung der Mitochondrien	46
3.7	Die <i>dnm1</i> -, <i>fis1</i> - und <i>mdv1</i> -Deletionsmutanten können die direkt zytotoxische Wirkung von Azol-Antimykotika teilweise inhibieren.....	49
3.8	Die konditionelle Mutante <i>mgm1_{pkiAteton}</i> mit einem verbesserten Promotor-Konstrukt	51
3.9	Die Herstellung einer Doppelmutante Δ <i>dnm1 mgm1_{pkiAteton}</i>	52
3.9.1	Die reduzierte Expression von <i>mgm1</i> verbessert die Sporulation der <i>dnm1</i> -Deletionsmutante	53
3.9.2	Die Mitochondrienmorphologie der Doppelmutante Δ <i>dnm1 mgm1_{pkiAteton}</i>	54
3.9.3	Die Resistenz der Doppelmutante Δ <i>dnm1 mgm1_{pkiAteton}</i> gegenüber Azol-Antimykotika ist erhöht.....	55

3.10 Mgm1 beeinflusst die Virulenz von <i>A. fumigatus</i> im <i>Galleria mellonella</i> - Infektionsmodell.....	57
4. Diskussion.....	59
4.1 Störung der mitochondrialen Dynamik führt zur Beeinträchtigung des Wachstums und der Sporulation	59
4.2 Beeinträchtigte Stressadaptation durch Defekte in der mitochondrialen Fission.....	60
4.3 Mitochondriale Fissionsproteine nehmen Einfluss auf die Mitochondrien- Morphologie.....	61
4.4 Veränderungen in der mitochondrialen Dynamik führen zu einer erhöhten Azolresistenz	63
4.5 Die Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$	64
4.6 Dnm1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	65
4.7 Die mitochondriale Dynamik als Target für antifungale Therapie	66
5. Ausblick.....	67
6. Zusammenfassung	68
7. Publikationen	69
8. Literaturverzeichnis.....	69
9. Abkürzungsverzeichnis	78
10. Danksagung	80

1. Einleitung

Die Gattung *Aspergillus* umfasst mehr als 200 Arten von Schimmelpilzen, die ubiquitär vorkommen und sich in allen ökologischen Nischen von der Luft bis hin zur Erde finden ¹. Einige dieser *Aspergillus*-Spezies werden in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. So werden beispielsweise *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus sojae* für die Herstellung von Reiswein und Sojasauce verwendet, während *Aspergillus niger* eine tragende Rolle bei der Produktion von Citronensäure spielt ². Die Sekundärmetabolite von *Aspergillus niger* finden ihren Einsatz auch in der pharmazeutischen Industrie. Allerdings sind von den über 200 beschriebenen *Aspergillus*-Arten 40 auch als humanpathogene opportunistische Krankheitserreger bekannt ³. Gesunde Menschen sind kaum davon betroffen. Jedoch kann es bei Kontakt mit den Pilzsporen zu allergischen Reaktionen und insbesondere bei Asthmatikern zur allergischen bronchopulmonalen Aspergillose kommen ⁴. Patienten mit einer bekannten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sind ebenfalls anfälliger für eine Kolonisation oder Infektion mit *Aspergillus* ⁵. Bei immunsupprimierten Menschen kann *Aspergillus* eine lebensbedrohliche Aspergillose verursachen, die sogenannte invasive Aspergillose. Hierbei ist *Aspergillus fumigatus* der häufigste Erreger der invasiven Aspergillose im Menschen ⁶. Zur Pathogenität von *A. fumigatus* tragen mitunter das allgegenwärtige Vorkommen sowie die geringe Größe der Sporen bei, die über die Luft in die oberen Atemwege des Menschen gelangen und von dort weiter die Alveolen erreichen können ⁶. Aufgrund der hohen Letalitätsrate der invasiven Aspergillose von über 50% ist es wichtig den Erreger besser zu verstehen sowie mögliche Therapieansätze zu finden ⁷.

1.1 Der Pilz *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Taxonomie und Morphologie des *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein Schimmelpilz, der zur Klasse der *Ascomycetes* (echte Schlauchpilze) und zur Gattung *Aspergillus* (Gießkannenschimmel) gehört. *Fumigatus* stammt aus dem Lateinischen und bedeutet Rauch (lat. *fumus*). Dies ist vermutlich auf die rauchgrüne Farbe der Sporen zurückzuführen und auf die rauchähnlichen Konidienwolken, die bei Luftbewegungen freigesetzt werden. In der Vergangenheit wurde *A. fumigatus* zu den *fungi imperfecti* gezählt, da lange Zeit keine sexuelle Fortpflanzung nachgewiesen werden konnte. Über eine Genomsequenzierung von *A. fumigatus* konnten im Jahr 2005 Gene identifiziert werden, die mit sexueller Reproduktion assoziiert sind, so dass die Hypothese entstand, dass

A. fumigatus durchaus sexuell reproduzieren kann ⁸. Dies konnte im Jahr 2009 durch O’Gorman et al. bestätigt werden ⁹. Demnach durchläuft der Pilz einen pleomorphen Entwicklungszyklus mit einer sexuellen Form (Telemorphe) und einer asexuellen Form (Anamorphe). Die telemorphe Form wurde *Neosatorya fumigatus* genannt und *A. fumigatus* konnte endgültig in die Klasse der Ascomyceten aufgenommen werden ⁹.

A. fumigatus produziert asexuelle Sporen. Diese sind ca. 2-3 µm groß und werden auch Konidien genannt ¹⁰. Die Konidien sind kugelförmig und rauchgrün. Sie hängen als Konidienkette an den Konidienträgern, auch Konidiophoren genannt. Diese entstammen einer Hyphenzelle, die aus dem Nährmycel hervorgeht ¹⁰. Am Ende der Konidiophore bildet sich das Konidiophorenvesikel, von dem aus kegelförmige Auswüchse, auch Phialiden genannt, wachsen. Die Phialiden schnüren die Konidien in langen Sporenketten ab ¹¹. Von hier aus können die Konidien durch die Luft verbreitet werden.

1.1.2 Lebenszyklus und Wachstum

Zu Beginn des Lebenszyklus steht die Auskeimung der Sporen. Die Konidien beinhalten das Disaccharid Trehalose, welches vor allem bei erschwerten Lebensbedingungen in den Konidien erhöht ist und als Reservezucker fungiert ¹². In Anwesenheit von verschiedenen Nährstoffen und Wasser wird die Germination ausgelöst ¹³. Zunächst kommt es zum isotropen Wachstum der Konidie. Durch Umorganisation der Zellwand wird intrazellulär der osmolarische Druck erhöht, der zur Wassereinströmung nach intrazellulär führt. Die Konidie schwillt an. Danach folgt die Ausbildung von einem tubulären Keimschlauch, der nach und nach durch ein polarisiertes Wachstum zu einer Hyphe heranwächst ¹⁴. Durch Verzweigung der Hyphen entsteht ein Geflecht, welches Mycel genannt wird. Bei direktem Kontakt zur Luft kommt es zur Ausbildung von Konidiophoren, die wiederum Konidien abschnüren, so dass ein neuer Lebenszyklus beginnen kann. Als thermophiler Pilz wächst *A. fumigatus* optimal bei einer Temperatur von 37°C. Allerdings ist er auch bei Temperaturen von 12°C bis 65 °C sowie bei weit variierendem pH-Mileu zwischen 2,1 und 8,8 überlebensfähig ¹⁵.

1.1.3 Medizinische Relevanz

Täglich atmet jeder Mensch ca. mehrere hundert *Aspergillus*-Sporen ein. *A. fumigatus* zählt zu den humanpathogenen opportunistischen Erregern. Somit sind immunkompetente Menschen seltener betroffen, allerdings kann der Schimmelpilz bei immunkompromittierten Patienten gefährliche Erkrankungen auslösen. Da die Sporen von *A. fumigatus* mit einer Größe von ca. 2-3 µm alveolargängig sind, kommt es überwiegend zu pulmonalen Erkrankungen. Andere Pilze wie *A. flavus* oder *A. niger* sind weniger virulent, da ihre Sporen größer sind¹⁵. Zudem hat *A. fumigatus* durch seine Thermotoleranz einen erheblichen Vorteil. Die Körpertemperatur von 37 °C bietet ihm optimale Wachstumsbedingungen. Bei den durch *A. fumigatus* ausgelösten Erkrankungen kann zwischen allergischen und infektiösen Erkrankungen unterschieden werden¹⁰. Die Aspergillose ist eine Infektion durch Pilze der Schlauchpilz-Gattung *Aspergillus*. *A. fumigatus* ist dabei in bis zu 90% der Fälle der ursächliche Erreger invasiver Aspergillosen¹⁶.

1.1.3.1 Allergische bronchopulmonale Aspergillose

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) tritt gehäuft bei Patienten mit atopischem Asthma (1-2%) und zystischer Fibrose (7-35 %) auf¹⁰. Bei der ABPA besteht eine Hypersensitivität gegen Antigene von *A. fumigatus*, die meistens auf einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion beruht¹⁷. In selteneren Fällen kann es aber auch zu Typ III und Typ IV Reaktionen kommen¹⁸. Gelangen Konidien in die Alveolen, können sie dort auskeimen. Dabei wird eine überwiegend durch Typ 2 T-Helferzellen-vermittelte Immunreaktion ausgelöst. Die Pilze wachsen nur im Mukus und infiltrieren das Gewebe nicht. Histopathologisch kennzeichnend sind der Sekretverhalt in den Atemwegen, eosinophile Entzündungsreaktionen und die Infiltration der Alveolarsepten mit Plasma- und mononukleären Zellen¹⁹. Unbehandelt führen diese Mechanismen zu Bronchiektasen und Lungenfibrose. Die Diagnose der ABPA erfolgt durch Durchführung eines Haut-Pricktests, der Bestimmung von Gesamt-IgE und Bestimmung spezifischer IgE- oder IgG-Antikörper (Präzipitine) gegen *A. fumigatus*. Eine Therapie sollte so früh wie möglich nach Diagnosestellung eingeleitet werden. Dabei ist die Therapie der Wahl die Gabe von systemischen Steroiden. Eine antimykotische Therapie wird gemäß der Leitlinie bei fehlender signifikanter Evidenz nicht empfohlen¹⁹.

1.1.3.2 Chronische Aspergillose

Eine Form der chronischen Aspergillose ist das Aspergillom. Dies bezeichnet eine lokale Besiedlung von *Aspergillus*-Hyphen in präformierten Lungenhöhlen. Kavitätsbildende Erkrankungen der Lunge wie Tuberkulose, Sarkoidose oder zystische Fibrose können zur Bildung eines Aspergilloms führen. Auch in Nasennebenhöhlen kann es zu Pilzbesiedlung kommen¹⁰. Die nicht invasive Aspergillose ist häufig klinisch asymptomatisch, kann aber durch lebensbedrohliche Hämoptysen auffallen, die durch die Invasion der Hyphen in die bronchialen Gefäße entstehen können²⁰.

1.1.3.3 Invasive Aspergillose

Die invasive Aspergillose (IA) ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher Letalität, die vor allem immunkompromittierte Patienten betrifft. Die alveolären Makrophagen sind für die Abwehr der inhalierten *Aspergillus*-Konidien verantwortlich. Durch Erkennung von spezifischen Zellwandantigenen des Schimmelpilzes werden Zytokine ausgeschüttet und das Recruitment von Neutrophilen induziert²¹. Aus diesem Grund haben vor allem Patienten mit einer Neutropenie, zum Beispiel auf dem Boden einer hämatologischen Erkrankung oder nach allogener Stammzelltransplantation, ein deutlich höheres Risiko an der IA zu erkranken²². Ebenso zeigen Patienten mit einer Immunsuppression nach Organtransplantation oder mit einer Therapie mit hochdosierten Glukokortikoiden bei Autoimmunerkrankungen ein höheres Risiko. Auch Patienten mit HIV-Infektion, COPD und kritisch kranke Patienten auf Intensivstationen sind häufiger von der IA betroffen¹⁰. Bei der IA kommt es zum invasiven Wachstum des Schimmelpilzes mit Infiltration von Parenchym, Invasion von Blutgefäßen mit nachfolgender hämatogener Streuung. Vor allem bei neutropenen Patienten kommt es häufiger durch die niedrige Entzündungsreaktion zur Angioinvasion und Koagulationsnekrosen. Hingegen zeigt sich bei Patienten mit Immunsuppression durch eine andauernde Glukokortikoid-Therapie ein anderer Pathomechanismus. Glukokortikoide haben zwar eine anti-inflammatorische Wirkung und hemmen die Phagozytosefunktion der Neutrophilen, jedoch wird das Recruitment und die Einwanderung von Neutrophilen ins Lungengewebe nicht gehemmt²³. Es kommt zur Auslösung einer starken Entzündungsreaktion und Gewebedestruktion²⁴. Klinisch kann eine IA auffallen durch Fieber, purulentem Sputum und Hämoptysen. Bei hämatogener Streuung in andere Organe, wie zum Beispiel das Gehirn, kann es auch zu neurologischen Ausfällen kommen²¹. Daneben kann es auch zu kutaner Manifestation kommen oder Beteiligung der Augen und des Herzens¹⁶.

1.1.4 Diagnostik und Therapie der invasiven Aspergillose

Die eindeutige Diagnosestellung stellt weiterhin eine Herausforderung dar, da es kein universelles Nachweisverfahren gibt. Aus diesem Grund erfolgt die Diagnosestellung durch kombinierte Untersuchungen. Zudem ist die Interpretation der Untersuchungsergebnisse abhängig vom Immunstatus des Patienten. Zu Beginn sollte daher immer evaluiert werden, ob bei dem Patienten die im vorherigen Abschnitt genannten Risikofaktoren vorliegen. Prinzipiell basiert die Diagnosestellung der IA auf drei Säulen: klinische Untersuchung, Bildgebung und Erregernachweis²⁵. Als sogenannter Goldstandard gilt die histopathologische Sicherung des Schimmelpilzes in Gewebeproben. Allerdings ist es vielfach schwierig mikroskopisch morphologisch zwischen anderen Erregern wie *Fusarium* zu differenzieren²⁶. Zudem ist die Gewebeentnahme, z.B. thorakoskopisch oder offen-chirurgisch, unter dem schlechten Allgemeinzustand mit höheren Risiken verbunden. Die Kulturdiagnostik ist wichtig, da sie die genaue Spezies-Identifizierung und eine Resistenztestung erlaubt, so dass eine gezielte Therapie eingeleitet werden kann. Jedoch ist diese Methode zeitaufwendiger und zeigt eine geringe Sensitivität. Mittel der Wahl bei der Bildgebung ist die native Computertomographie des Thorax. Hier können sich typische radiologische Zeichen wie das Halo-Zeichen oder sichelförmige Luftsinschlüsse um den Aspergillenherd zeigen²⁶. Bei Verdacht auf ZNS-Beteiligung sollte ergänzend eine kraniale MRT-Untersuchung erfolgen. Mittlerweile haben sich Assays zur Detektion von Pilzantigenen, die Bestandteile der Pilzzellwand sind, etabliert. Hierzu gehören der Galactomannan-Assay sowie der 1-3- β -D-Glucan-Assay (BDG). Galactomannan ist spezifisch für *Aspergillus spp.* und wird vor allem in der Wachstumsphase und der invasiven Ausbreitungsphase des Pilzes freigesetzt. Neuere Studien zeigen jedoch, dass Galactomannan auch bei anderen Pilzgattungen wie *Penicillium* und *Fusarium* vorkommt²⁷. Es lässt sich über Serum, Bronchialalveolarlavage (BAL) und auch über Liquor bestimmen. In einigen Studien wird gezeigt, dass die Detektion von Galactomannan in der BAL sensitiver ist als im Serum²¹. Die Detektion von Galactomannan kann bereits Tage vor Eintreten von klinischen Zeichen einer IA oder radiologischen Befunden Hinweise auf eine IA geben. Somit eignet sich der Galactomannan-ELISA-Test sowohl als Screening als auch als Therapiemonitoring. Allerdings können die gleichzeitige Gabe von Galactomannan-kontaminierten Medikamenten zu falsch positiven Ergebnissen führen²¹. Die Sensitivität für das Serum ist ca. 45%, die Spezifität beträgt 99%²⁸. 1-3- β -D-Glucan ist ein Zellwandbestandteil vieler Spross- und Fadenpilze, jedoch gilt dies nicht für *Mucor* und *Cryptococcus*²⁶. Der 1-3- β -D-Glucan-Assay kann mit dem Galactomannan-Assay kombiniert werden, um die Sensitivität zu erhöhen. Der molekulare Nachweis mittels PCR stellt eine sehr sensitive Methode mit einer Sensitivität von ca. 67-100 % und einer Spezifität von 55-95% dar.

Problematisch sind allerdings falsch positive Ergebnisse und die Schwierigkeit zwischen einer einfachen Pilz-Besiedlung und einer invasiven Infektion zu differenzieren ²⁶.

Die Therapie der Wahl bei der IA ist eine Therapie mit Azol-Antimykotika, zum Beispiel mit Voriconazol oder Isavuconazol ²⁵. Zu den älteren Azolen gehören unter anderem Itraconazol und Fluconazol, während zu der neueren Generation von Azolen Voriconazol, Posaconazol und Isavuconazol zählen ²⁹. Voriconazol und Isavuconazol sind Triazole, welche durch Inhibition der 14 α -Sterol-Demethylase (CYP51) die Ergosterolbiosynthese aus Lanosterol in der Pilzzellmembran hemmt. Ergosterol ist ein wesentlicher Bestandteil der Pilzzellmembran (Plasmalemm), der bisher in anderen biologischen Membranen nicht gefunden wurde. Als Zellmembranlipid ist es für die Membranfluidität und -permeabilität verantwortlich ³⁰. Wir konnten zeigen, dass über die Hemmung der Ergosterolsynthese es zu einer Induktion der Produktion von Kohlenhydraten wie 1-3- β -Glucan und Chitin an bestimmten Stellen der Pilzzellwand kommt. Diese „Kohlenhydrat-Patches“ führen zur Einstülpung der Pilzzellmembran und damit zur Zerstörung der Zellwandintegrität und letztlich zum Zelltod ³¹. Bevor die Überlegenheit von Voriconazol in der Therapie der IA gezeigt wurde, war Amphotericin B lange Zeit das Antimykotikum der Wahl ³². Amphotericin B gehört zur Klasse der Polyene. Über viele Jahre wurde die fungistatische und fungizide Wirkung von Amphotericin B damit begründet, dass es an Ergosterol in der Zellmembran bindet und zur Formation von Ionenkanälen führt. Dies führt zum Verlust von Kationen, gefolgt vom Einstrom von Protonen in die Pilzzelle ³³. Neuere Studien stellten jedoch ein neues Modell für die fungizide Wirkung von Amphotericin B auf. Demzufolge bildet Amphotericin B extramembranöse Aggregate oder „Schwämme“, die der Pilzmembran Ergosterol entziehen ³⁴. Der Einsatz von Amphotericin B-Desoxycholat ist jedoch aufgrund seiner Nephrotoxizität limitiert, weshalb seit den 1990er Jahren liposomale Zubereitungen von Amphotericin B angeboten werden, die ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen, jedoch erheblich teurer sind ³⁵. Neben der IA kann das liposomale Amphotericin B ebenfalls gegen Mukormykose, Kryptokokken-Meningitis und invasiver Candidose eingesetzt werden ³⁶. Eine weitere Wirkstoffklasse, die bei der Therapie der IA als Kombinationstherapie eingesetzt werden kann, sind Echinocandin-Antimykotika, wie z.B. Caspofungin und Anidulafungin. Caspofungin hemmt das Enzym β -1,3-D-Glucan-Synthase, welches für die Synthese von β -1,3-D-Glucan verantwortlich ist. Somit ist es gegen *Aspergillus* und *Candida spp.*, nicht aber gegen *Cryptococcus neoformans* und *Fusarium spp.* einsetzbar ³⁶. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Glucansynthese in *Aspergillus fumigatus* nicht essenziell ist und Caspofungin daher nur fungistatisch wirkt ³⁷.

1.1.5 Azolresistenz und CYP51

In den letzten Jahren wurde eine zunehmende Resistenzentwicklung gegen Azole bei *A. fumigatus* beobachtet³⁶. Eine Azolresistenz kann sich bei langandauernder Therapie mit Triazolen entwickeln, kann aber auch durch Exposition mit Fungiziden, die Azole enthalten, herbeigeführt werden. So kommen azolhaltige Fungizide sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Landwirtschaft zum Einsatz³⁸. Die Azolresistenz ist in den meisten Fällen auf eine Mutation im *cyp51A*-Gen zurückzuführen³⁹. Dieses Gen kodiert eine von zwei Lanosterol-14 α -Demythylasen, an denen die Azole nicht kompetitiv binden und die Ergosterolbiosynthese unterbrechen. *A. fumigatus* besitzt zwei CYP51 Isoenzyme, CYP51A und CYP51B⁴⁰. Konditionelle Mutanten zeigten, dass bei Abwesenheit von sowohl CYP51A als auch CYP51B *A. fumigatus* nicht mehr lebensfähig war, jedoch bei Abwesenheit von nur eines der Isoenzyme Wachstum beobachtet werden konnte⁴¹. In den meisten Fällen der azolresistenten Isolate zeigten sich Punktmutationen im *cyp51A*-Gen⁴⁰. Allerdings sind ebenfalls auch sogenannte Tandem Repeats in der Promotorregion des *cyp51A*-Gens beschrieben³⁸. Tandem Repeats bezeichnet eine sich mehrfach wiederholende Nukleotidsequenz und weisen eine hohe Mutationsrate auf⁴².

1.2 Mitochondrien

1.2.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen. Die Endosymbiontentheorie besagt, dass Mitochondrien aus einer Symbiose von eukaryotischen Vorläuferzellen mit prokaryotischen α -Proteobakterien entstanden seien⁴³. Die Doppelmembran, die das Mitochondrium umgibt, sei demnach durch die initiale phagozytotische Aufnahme des Proteobakteriums in die eukaryotische Vorläuferzelle zu erklären. Durch die Doppelmembran der Mitochondrien entstehen zwei Subkompartimente. Die Außenmembran umschließt das gesamte Mitochondrium. Zusammen mit der Innenmembran bildet es den Intermembranraum. Die mitochondriale Außenmembran steht im Signalaustausch mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und übernimmt auch eine Rolle beim Lipidtransfer⁴⁴. Die Innenmembran bildet Einstülpungen, sogenannte Cristae, die zur Oberflächenvergrößerung führen. Je nach Organismus, Gewebetyp und Wachstumsbedingungen variiert die Morphologie der Cristae von tubulär, blasenartig oder lamellar⁴⁵. An der Innenmembran finden wichtige Stoffwechselprozesse, wie zum Beispiel die oxidative Phosphorylierung, statt. Die

Mitochondrien verändern kontinuierlich ihre Form und Verteilung durch koordinierte Teilungs- und Vereinigungsprozesse. Das Gleichgewicht zwischen der mitochondrialen Fission und Fusion wird auch mitochondriale Dynamik genannt ⁴⁶. Dadurch sind die Mitochondrien meist als tubuläre Netzwerke miteinander vernetzt. Als sogenannte „Kraftwerke“ der Zellen sind die Mitochondrien vor allem für die Energielieferung in Form von ATP über die Atmungskette verantwortlich ⁴⁷. Daneben finden wichtige Abbauege wie der Citratzyklus in den Mitochondrien statt ⁴⁸. In tierischen Zellen werden Fettsäuren in der Mitochondrienmatrix oxidativ abgebaut, während der Fettsäureabbau in *Saccharomyces cerevisiae* überwiegend über die Peroxisomen stattfindet ⁴⁹. Außerdem sind Mitochondrien an der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt. Eisen ist ein essenzieller Nährstoff und fungiert als Co-Enzym bei wichtigen zellulären Prozessen. Für *A. fumigatus* ist Eisen essenziell für Wachstum und Virulenz ⁵⁰. Die Mitochondrien erfüllen darüber hinaus eine wichtige Funktion beim programmierten Zelltod, der Apoptose, welche zur Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase benötigt wird ⁵¹. Bei Überwiegen vom proapoptotischen Bcl-2-Protein Bax kommt es zur Porenbildung in der mitochondrialen Außenmembran ⁵². So gelangt das proapoptotische Protein Cytochrom c aus dem Intermembranraum in das Zytosol und kann dort mit anderen Proteinen Komplexe bilden und damit spezielle Proteasen aktivieren, die zum Abbau der Zelle und zum Zelltod führen ⁵².

1.2.2 Mitochondriale Genetik

Für Mitochondrien ist es charakteristisch, und ebenfalls durch die Endosymbiontentheorie erklärt, dass sie ihre eigene DNA besitzen. Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist doppelsträngig, kann zirkulär oder linear angeordnet sein und befindet sich in der Matrix der Mitochondrien ⁴⁸. Anderson et al. gelang 1981 erstmals die vollständige Sequenzierung des menschlichen mitochondrialen Genoms. Insgesamt besteht die menschliche mtDNA aus 16.569 Basenpaaren und kodiert 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei ribosomale RNAs. Die 13 Proteine bilden allesamt Untereinheiten eines Komplexes der oxidativen Phosphorylierung ^{53,54}. In *A. fumigatus* besteht die mtDNA aus 31.765 Basenpaaren, die 16 Gene und 27 tRNAs beinhalten ⁵⁵.

1.2.3 Mitochondriale Dynamik

Während es bereits sehr gute Modelle zur mitochondrialen Dynamik in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt, sind die verschiedenen mitochondrialen Proteine, die an der mitochondrialen Dynamik in *A. fumigatus* beteiligt sind, weitgehend unerforscht. Die mitochondriale Fusion und Fission sollten sich in einem Gleichgewicht befinden und spielen eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle, der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials und der Erhaltung der mtDNA^{51,56,57}. Da Mitochondrien nicht de novo entstehen können, erfolgt die Proliferation über Teilungsprozesse. Die mitochondriale Fusion spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung und Weitervererbung von mtDNA. In *S. cerevisiae* und in Säugetierzellen kommt es bei fusionsdefizienten Mutanten zur Fragmentation der Mitochondrien und zum Verlust von mtDNA^{58,59}. Viele der Mitochondrienfragmente beinhalten keine mtDNA, so dass die entstandenen Tochterzellen keine mitochondrialen Genome enthielten⁶⁰. Dies führte wiederum zu Funktionsdefiziten in der Zellatmung^{61,62}. Miteinander vernetzte Mitochondrien fungieren als ein vereintes Netzwerk, welches das von der Atmungskette generierte Membranpotential fortleitet⁶³. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass Zellen, die einen erhöhten Energiebedarf haben, eine lang vernetzte Mitochondrienmorphologie aufweisen⁶⁴. So kann an sauerstoffreichen Orten der Zelle über die Atmungskette Energie gewonnen und über das mitochondriale Membranpotential gespeichert werden. Besonders in großen Zellen kann so die Energie an Orte in der Zelle mit hohem Energiebedarf fortgeleitet werden⁶⁵. Eine weitere wichtige Funktion der mitochondrialen Dynamik besteht in der mitochondrialen Qualitätssicherung und der Alterung⁶⁶. Als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung entstehen reaktive Sauerstoffradikale (ROS). Als ROS bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Sauerstoffverbindungen, die durch eine partielle Reduktion von elementarem Sauerstoff gebildet werden und eine hohe chemische Reaktionsfähigkeit zeigen. Zu ROS gehören unter anderem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Superoxid-Anion O₂⁻. Diese können zu oxidativer Schädigung und zu Mutationen der DNA führen⁶⁷. Fast 90% der ROS-Produktion fällt in den Mitochondrien an. Damit ist die mtDNA anfällig für ROS-induzierte Mutationen, was schließlich zum Funktionsverlust der Atmungskette führen kann^{68,69}. In hohen Dosen induziert ROS die mitochondriale Fission und die Apoptose in Zellen⁷⁰. Neuere Studien zeigen, dass ROS in niedriger Dosis als Signalmoleküle für verschiedene Signalwege fungieren⁷¹. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts des ROS-Haushaltes ist ebenso eine wichtige Funktion der mitochondrialen Dynamik. Eine weitere Aufgabe ist die Fusion der nicht funktionsfähigen Mitochondrien mit intakten Organellen und die Elimination der beschädigten Mitochondrien durch Fission. Die Mitophagie ist die Autophagie von beschädigten Mitochondrien. Hierbei kommt es zur Abschnürung der defekten Organellen vom mitochondrialen Netzwerk, so dass

diese durch Autophagosomen sequestriert und durch Fusion mit Lysosomen und Vakuolen hydrolytisch abgebaut werden können⁶³.

1.2.3.1 Mitochondriale Fission

Die mitochondriale Fissionsmaschinerie besteht unter anderem aus Dynamin-Proteinen. Diese sind GTPasen, welche sich zu Oligomeren an der Zellmembran gruppieren, Spiralen bilden und durch GTP-Hydrolyse die Membran abschnüren können⁶³. In Säugetierzellen ist das Protein Drp1 hauptverantwortlich für die mitochondriale Fission. Drp1 besitzt am N-terminalen Ende eine GTPase und am C-terminalen Ende eine GTPase Effektor-Domäne zur Rekrutierung von weiteren Fissionsproteinen⁷². Drp1 befindet sich teils im Zytosol in Form von Tetrameren und teils an vordefinierten Stellen als „Tüpfel“ an der mitochondrialen Außenmembran⁷³. Über die vier integralen mitochondrialen Außenmembranproteine Mff (mitochondrial fission factor), Fis1, MIEF1 und MIEF2 (mitochondrial elongation factor, auch mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51kDa, MID49/51) wird Drp1 aus dem Zytosol rekrutiert⁷⁴. In Säugetieren ist Fis1 nicht essenziell für die mitochondriale Fission und für die Rekrutierung von Drp1⁷⁵. Nach Rekrutierung von Drp1 an die mitochondriale Außenmembran bildet Drp1 spiralförmige Oligomere von ca. 100 Drp1-Monomeren und löst über eine GTP-Hydrolyse die Durchtrennung der mitochondrialen Außenmembran aus⁷³. Untersuchungen zeigten, dass der Durchmesser der Drp1-Ringe mit ca. 30 nm weit unter dem Mitochondriendurchmesser (ca. 1 µm) liegt⁷⁶. Daraus folgte die Schlussfolgerung, dass die mitochondriale Fission in mehreren Schritten ablaufen müsse. Interessanterweise wurde die mitochondriale Fission an bestimmten Kontaktstellen von Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) beobachtet. Hier war der Mitochondriendurchmesser auch deutlich geringer (ca. 140 nm)⁷⁷. So wurde ein Modell aufgestellt, demzufolge es im Bereich der Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER zu Polymerisation von Aktinfilamenten und damit zur Einschnürung und Verringerung des Mitochondriendurchmessers käme und nachfolgend erst zur Drp1-Rekrutierung an der mitochondrialen Außenmembran⁷⁸. Ein weiteres Protein, Dynamin 2 (Dnm2), wird für den finalen Schritt der mitochondrialen Fission benötigt⁷⁹. In neueren Studien wird jedoch gezeigt, dass Dnm2 zwar eine Rolle in der mitochondrialen Fission spielt, jedoch nicht essenziell dafür ist⁸⁰. In *S. cerevisiae* wurde kein orthologes Gen für *dnm2* gefunden. Das homologe Protein von Drp1 in *S. cerevisiae* ist Dnm1. Dnm1 befindet sich hier ebenfalls im Zytosol. Während der Fission kommt es zur Rekrutierung von Dnm1 durch das Adapterprotein Mdv1. Mdv1 besitzt am C-terminalen Ende eine Domäne, welche vorzugsweise mit der GTP-gebundenen Form von Dnm1 interagiert. Durch die Aktivierung von Mdv1 gruppiert sich Dnm1 zu einer spiralförmigen Formation an der

mitochondrialen Außenmembran⁸¹. Am N-terminalen Ende bindet Mdv1 an Fis1. Fis1 ist in der mitochondrialen Außenmembran verankert und rekrutiert Mdv1 aus dem Zytosol⁸². Der Proteinkomplex aus Fis1, Mdv1 und Dnm1 bildet somit die Fissionsmaschinerie⁸³. In *S. cerevisiae* ist Caf4 als paraloges Protein von Mdv1 vorhanden. Caf4 kann ebenfalls an Fis1 binden und ein Fis1-Caf4-Dnm1-Komplex bilden, jedoch ist es in Anwesenheit von Mdv1 entbehrlich für die mitochondriale Fission⁸⁴. Auch in der Bäckerhefe wurde die Beobachtung beschrieben, dass das ER durch spezifische Kontaktstellen mit den Mitochondrien ebenfalls an der mitochondrialen Fission beteiligt ist⁸⁵. In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Hochregulierung der mitochondrialen Fission und Tumorgenese und neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben⁷⁴.

1.2.3.2 Mitochondriale Fusion

Die Fusion von zwei Mitochondrien verläuft ebenfalls in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt die Fusion der mitochondrialen Außenmembran und nachfolgend die Fusion der mitochondrialen Innenmembran⁸⁶. In Säugetieren gehören die maßgeblich an der mitochondrialen Fusion beteiligten Proteine ebenfalls der Familie der Dynamin-Proteinsuperfamilie an. Dazu zählen unter anderem Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusin 2 (Mfn2) und Optische Atrophie 1 (OPA1). Für die Fusion der mitochondrialen Außenmembran in Säugetieren sind die Proteine Mfn1 und Mfn2 zuständig. Über GTP-Hydrolyse können die Mitofusin-Proteine ihre Form verändern und mit Mitofusin-Proteinen an der mitochondrialen Außenmembran eines anderen Mitochondriums andocken⁸⁷. Dabei spielt Mfn1 eine größere Rolle. Mfn2 besitzt eine schwächere GTP-Hydrolyse-Aktivität⁸⁸. Mfn2 ist jedoch an verschiedenen anderen Funktionen beteiligt, unter anderem an der Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem ER und an der Mitophagie^{89,90}. Mutationen von *mfn2* führen zur neurodegenerativen Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung⁹¹. Die genauen Prozesse der Fusion der inneren mitochondrialen Membran sind bisher noch nicht geklärt. Die Rolle von OPA1 ist jedoch entscheidend⁶¹. OPA1 kann in zwei verschiedenen Isoformen vorliegen. Hierbei ist die lange Isoform, l-OPA1, von der kurzen Form s-OPA1 zu unterscheiden. Die lange Isoform ist mit ihrem N-terminalen Ende an der mitochondrialen Innenmembran verankert und kann durch die Metallopeptidasen OMA1 oder YME1L proteolytisch in die kurze Isoform s-OPA1 gespalten werden⁹². Ohne den transmembranen Anker befindet sich s-OPA1 im Intermembranraum. Für die mitochondriale Fusion scheinen beide Isoformen l-OPA1 und s-OPA1 von Bedeutung zu sein. Es gibt jedoch auch Studien, die berichten, dass das alleinige Vorliegen von l-OPA1 bereits suffizient für die mitochondriale Fusion sei⁹³. In *S. cerevisiae* ist das Ortholog von Mfn1 und Mfn2 das Protein Fzo1. Es gehört zu den Mitofusinen und ist als transmembranes Protein

mit zwei transmembranen Domänen in der mitochondrialen Außenmembran verankert ⁹⁴. Dabei ragt der längere Anteil ins Zytosol, während sich der kürzere Anteil im Intermembranraum befindet. Mgm1 ist das orthologe Protein von OPA1 und eine Dynamin-ähnliche GTPase, welche durch das N-terminale Ende in der inneren mitochondrialen Membran verankert und ein entscheidender Bestandteil der Fusion der inneren Mitochondrienmembran ist ⁹⁵. Ugo1 ist ein essenzielles Fusionsprotein in *S. cerevisiae*. Es ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und fungiert als Adapterprotein, welches Fzo1 mit Mgm1 verbindet und somit die Fusion von äußerer und innerer Mitochondrienmembran miteinander verbindet ⁶³. In *S. cerevisiae* gibt es ebenfalls zwei Isoformen von Mgm1, die längere Form (l-Mgm1) und die kürzere Form (s-Mgm1), die beide aus dem gleichen Vorläuferprotein hervorgehen. Dieser Mechanismus wird als sogenannte alternative Topogenese bezeichnet ⁹⁶. Die l-Mgm1-Isoform entsteht nach Prozessierung des Vorläuferproteins durch das Protein mitochondrial processing peptidase (MPP). Die s-Mgm1-Isoform entsteht nach Prozessierung durch die rhomboid-ähnliche Membranprotease Pcp1 ⁹⁶. Die s-Mgm1-Isoform besitzt die transmembrane Region nicht und liegt in löslicher Form im Intermembranraum vor ⁹⁷. Während l-Mgm1 für das Andocken der zu fusionierenden inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist, führt s-Mgm1 über die GTPase-Aktivität zur Fusion der inneren Mitochondrienmembran ⁹⁸. Der Anteil der beiden Isoformen ist abhängig vom Energiestatus der Mitochondrien ⁹⁹. Die Fusion der mitochondrialen Innenmembran in der Bäckerhefe erfordert beide Isoformen von Mgm1 ¹⁰⁰.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Aspergillus fumigatus ist der wichtigste Erreger, der zur gefürchteten invasiven Aspergillose führen kann. Da die Erkrankung eine hohe Letalität aufweist, ist eine spezifische Therapie essenziell. In diesem Hinblick ist es von großer Bedeutung, die grundlegenden zellulären Mechanismen in dem Pilz zu verstehen. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Proteine des Zellwandintegritätswegs in *A. fumigatus* untersucht, die an der zellulären Stressantwort des Pilzes beteiligt sind. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* spielt die mitochondriale Dynamik eine wichtige Rolle in der Erhaltung der mitochondrialen DNA und der Vitalität des Pilzes. Zur mitochondrialen Dynamik und zur mitochondrialen Fission in *A. fumigatus* ist bisher noch wenig bekannt. Interessanterweise ist für das mitochondriale Fissionsprotein mdv1 *S. cerevisiae* kein homologes Protein in Säugetieren bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die mitochondriale Fission in *A. fumigatus* besser zu verstehen und damit mögliche neue Zielproteine für die Therapie zu identifizieren. Hierzu wurden mitochondriale Fissionsdeletionsmutanten hergestellt, um den Einfluss der mitochondrialen Fission auf die Mitochondrienmorphologie, Fitness und Stressresistenz von *A. fumigatus* zu untersuchen. In der Therapie von *A. fumigatus* stellt eine steigende Azolresistenz eine besondere Herausforderung dar. Es wurde daher untersucht, inwiefern sich bei eingeschränkter mitochondrialer Fission die Sensibilität gegenüber Azolen verändert.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 1: Verwendete *A. fumigatus*-Stämme

Stamm	Genotyp und Plasmide	Hintergrund	Referenz
AfS35	<i>akuA::loxP</i>	D141	Krappmann et al., 2006
$\Delta dnm1$	$\Delta dnm1::loxP$ -hygro ^R /tk	AfS35	diese Arbeit
$\Delta fis1$	$\Delta fis1::loxP$ -hygro ^R /tk	AfS35	diese Arbeit
$\Delta mdv1$	$\Delta mdv1::loxP$ -hygro ^R /tk	AfS35	diese Arbeit
$\Delta dnm1$ + <i>dnm1</i>	pCH004	$\Delta dnm1$	diese Arbeit
$\Delta fis1$ + <i>fis1</i>	pYZ008	$\Delta fis1$	diese Arbeit
$\Delta mdv1$ + <i>mdv1</i>	pYZ007	$\Delta mdv1$	diese Arbeit
<i>mgm1</i> _{<i>pkiA</i>tet^{on}}	^P <i>mgm1::ptrA</i> - ^P <i>pkiA</i> -tet ^{on}	AfS35	diese Arbeit
$\Delta dnm1$ <i>mgm1</i> _{<i>pkiA</i>tet^{on}}	^P <i>mgm1::ptrA</i> - ^P <i>pkiA</i> -tet ^{on}	$\Delta dnm1$	diese Arbeit
AfS35 + mtGFP	pCH005	AfS35	diese Arbeit
$\Delta dnm1$ + mtGFP	pCH005	$\Delta dnm1$	diese Arbeit
$\Delta fis1$ + mtGFP	pCH005	$\Delta fis1$	diese Arbeit
$\Delta mdv1$ + mtGFP	pCH005	$\Delta mdv1$	diese Arbeit
<i>mgm1</i> _{<i>gpdA</i>-tet^{on}} +mtGFP	pRS54-phleo	<i>mgm1</i> _{<i>gpdA</i>-tet^{on}}	diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'
dnm1-8g02840-5-fwd	TTGCGGCCGCGAGGCTGCGGAGGACAATG
dnm1-8g02840-5-rev	T GGCCTGAGTGGCC AAGAGATGTCCTCGCGGTGG
dnm1-8g02840-3-fwd	T GGCCATCTAGGCC GCTTTGTTAGAGAGCCTTACC
dnm1-8g02840-3-rev	TT GCGGCCGC GGTATACACGGCGTTCTTCG
dnm1-8g02840-5-cast	GACAACCAGAAGCACCTCG
dnm1-8g02840-3-cast	CGTCTCGCTGTCATGTGG
dnm1-8g02840-fwd	CATGGCATCCCTTAGTGAAG
dnm1-8g02840-rev	GATCACAGCACTTCACCTAC
fis1-2G13320-5fwd	TT GCGGCCGC CTGAAGTTGCCGGCCTCG
fis1-2G13320-5rev	CG GGCCATCTAGGCC GCGTCCGCAGCATCTAAGG
fis1-2G13320-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC TTGAGCGCGCAGGACCAC
fis1-2G13320-3rev	TT GCGGCCGC CCATGGATCGGCCCATGTG
fis1-2G13320-5cast	GCGCCGCATCGTCATATCC
fis1-2G13320-3cast	TAGGTGTCGGCCAACCCG
fis1-2G13320-profwd	GG CTGCAG GCCGATGGTGTGGTGGATG
fis1-2G13320-rev	TCATCGTCTCTTTGCGGCAC

mdv1-5G13140-5fwd	TT GCGGCCGC GACCTCATCGCCTGGGATC
mdv1-5G13140-5rev	CGGGCCATCTAGGCC CATA CGGCTTATTCGGGCAC
mdv1-5G13140-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC CGGCTAGCATTGTCGTCC
mdv1-5G13140-3rev	TT GCGGCCGC CGATGATGAAGTGTAGAGCTG
mdv1-5G13140-fwd3(b)	GTGGCCTGAGTGGCCATGGGACCGATCACAGATTCAA GCAATGG
mdv1-5G13140-rev2(b)	TTGCGGCCGCTCAACAAGTCCAGGCCGCCACGG
mdv1-5G13140-5cast	TCGAGCACCTCAGGGAAG
mdv1-5G13140-3cast	GCGCTTAGGCGGCATCTG
mgm1-1g11970-5-fwd	TTGCGGCCGCGCAGTAGTGCCTGTCCA
mgm1-1g11970-5-rev	CGGGCCATCTAGGCCACAGATCAGCCGGAAGGG
Pmgm1-1g11970-3-fwd	GTGGCCTGAGTGGCC ATGAGCGGGAGAATACTCTCG
Pmgm1-1g11970-3-rev	TT GCGGCCGCCGCGTGACCATGTTG
Prho1-6g06900-5-fwd	GTTGCGGCCGCTGGTTACGACAGAGGATACC
Prho1-6g06900-5c-rev	CGGGCCATCTAGGCCGGAATACTTCGTACAGT
Prho1-6g06900-3x-fwd	GTGGCCTGAGTGGCCATGGCTGAAATCCGCCGCAAG
Prho1-6g06900-3-rev	GTTGCGGCCGCGGTTATGAAGACAACGCCTCC
ptrA-5-rev	CGTTACCAATGGGATCCCG

ptrA-3-fwd	GTCCCGTATGTAACGGTGG
seq-his2A(t)-rev	CAGATGCCCACTAAGCTTGG

2.2 Molekularbiologische Grundlagen

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus *A. fumigatus*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *A. fumigatus* wurde das MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biothechnologies) verwendet. *A. fumigatus* Sporen wurden in 200 µl flüssiges AMM bei 37°C auf einem Schüttler bei 180 rpm über Nacht inkubiert. Nach 16-24 h wurde das gewachsene Myzel mithilfe sterilen Filterpapiers abgeerntet und anschließend ca. 200 mg von dem Myzel in ein 2 ml Lysing Matrix A Tube (MP Biomedicals) hinzugefügt, welches zuvor mit Quarzsand und einer Keramikugel befüllt wurde. Nach Zugabe von 225 µl Yeast Cell Lysis Solution (Epicentre Biothechnologies) wurde das Lysing Matrix A Tube im Homogenisator FastPrep 24 (MP Biomedicals) für 40 sec bei 6 m/s geschüttelt. Daraufhin folgten eine 30-minütige Inkubation bei 65°C und anschließend eine Inkubation auf Eis für 5 min. Nun wurde 112,5 µl MCP Protein Precipitation Reagent zugegeben und das Reaktionsgefäß bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Ausfällen der DNA wurde 375 µl Isopropanol hinzugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 g für 15 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß bei 13000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Um Ethanol-Rückstände zu beseitigen, wurde das Reaktionsgefäß mit offenem Deckel bei 55°C inkubiert. Schließlich wurde die getrocknete DNA in 30 µl sterilem Wasser mit RNase (1 ml H₂O + 2 µl RNase) gelöst.

2.2.2 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Für die Klonierungs-PCRs wurde die Pfu DNA-Polymerase (Fermentas) verwendet, da diese im Vergleich zur DreamTaq DNA-Polymerase (Fermentas) eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt,

mit der sie eine „proofreading“-Funktion erfüllt und somit die Fehlerrate bei der DNA-Amplifikation senkt. Die DreamTaq DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität und Geschwindigkeit aus und wurde bei analytischen PCRs eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz betrug 50 µl, im Fall einer analytischen PCR 25 µl. In einem Reaktionsansatz von 50 µl waren 5 µl vom Hersteller mitgelieferten Puffer, supplementiert mit MgSO₄ und in zehnfacher Konzentrierung, 200 µM von jedem der vier Desoxynukleosidtriphosphate, 0,1 -1,0 µM von jeweils beiden Oligonukleotiden, 50-500 ng von der Matrizen-DNA und 1-3 U der thermostabilen DNA-Polymerase enthalten. Eine Standard-PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen und schloss mit einer Inkubation für 10 min bei 72°C zur Vervollständigung inkomplett synthetisierter DNA-Stränge und einer anschließenden Kühlung auf 4 °C ab. Jeder Zyklus umfasste die Denaturierung der Matrizenstränge für 30 sec bei 95°C, die Anlagerung der Oligonukleotide für 30 sec bei einer Temperatur ca. 5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und die DNA-Synthese für 1-6 min (abhängig von der Länge des Matrizenstrangs und der eingesetzten DNA-Polymerase) bei 72°C. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch das Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Kit (Promega) nach Protokoll des Herstellers.

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

2.2.3.1 Minipreps

Kleine Mengen an Plasmid-DNA wurden entweder durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) oder mit Hilfe des PureYield Plasmid Miniprep System Kits (Promega) gewonnen. Bei der alkalischen Lyse wurden *E. coli*-Zellen über Nacht in 2ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C in einem Schüttler bei 180 rpm angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen und für 1 min bei 15000 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, folgte die Resuspendierung der *E. coli* in 100 µl Lösung 1 (Lysozym-Lösung: 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl pH 8,0). Anschließend wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Lösung 2 (alkalische SDS-Lösung: 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) wurden die *E. coli*-Zellen lysiert. Es wurde wieder für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (Salzlösung: 3 M Natriumacetat; pH 4,8) und kurzem Schütteln wurde das Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis inkubiert, um die Ausfällung der Proteine, der RNA und der chromosomalen DNA abzuwarten. Für 20 min wurde bei 13000 g und bei 4°C zentrifugiert. Nun befand sich die Plasmid-DNA im klaren Überstand, welches in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl gekühltem, 100%

Ethanol (v/v) gewaschen wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 g und bei 4°C für 15 min wurde der Überstand verworfen und mögliche Ethanol-Rückstände durch Inkubation bei 60°C beseitigt. Schließlich wurde die getrocknete DNA in 50 µl sterilem Wasser mit RNase (1 ml H₂O + 2 µl RNase) gelöst (vgl. 2.1.2).

2.2.3.2 Midipreps

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das PureYield Plasmid Midiprep System Kit (Promega) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.4 Restriktionsverdau

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von Fermentas verwendet. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Es wurde über Nacht verdaut.

2.2.5 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von Vektoren erfolgte mithilfe von FastAP (Fermentas), einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase. Dazu wurden Ansätze mit ca. 0,1-1 µg vom Vektor, den vom Hersteller mitgelieferten FastAP Puffer in zehnfacher Verdünnung und 1-3 U der alkalischen Phosphatase hergestellt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Enzym für 5 min bei 75°C irreversibel inaktiviert. Die Phosphorylierung der 5' Enden von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung der T4 Polynukleotid-Kinase (Fermentas). Ein Reaktionsansatz enthielt neben 1-100 ng des PCR-Produkts, den T4 DNA-Ligase Puffer in zehnfacher Verdünnung, 20 pmol ATP und 10-20 U von der T4 Polynukleotid-Kinase. Inkubiert wurde für 45 min bei 37°C und hitzeinaktiviert für 10 min bei 75°C.

2.2.6 Ligation von DNA

Nach der Dephosphorylierung des linearisierten Vektors und der Phosphorylierung der aufgereinigten und ebenfalls verdauten PCR-Fragmente folgte die Ligation beider Komponenten. Dies wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Das Verhältnis von PCR-Fragmenten zum eingesetzten Vektor betrug im Idealfall 1:1 bis 5:1. Zudem war T4 DNA-

Ligase Puffer in zehnfacher Verdünnung und 1 Weiss U der T4 DNA-Ligase im Reaktionsansatz enthalten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgeteilt. Dazu wurden 1% (w/v), in TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7,5; 20mM Essigsäure; 1 mM EDTA) aufgekochte Agarosegele verwendet. Vor dem Auftragen der DNA-Proben in die vorgefertigten Taschen, wurden die Proben mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6x Loading Dye) versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden stets 4-6 µl eines Größenstandard (GenRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei 100-120 V für 40-90 min mit TAE als Laufpuffer durchgeführt. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend für 10-15 min in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gelegt. Mit einem UV-Transilluminator konnten die DNA-Banden bei einer Wellenlänge von 254 nm dargestellt werden. Für analytische Zwecke wurden die Gele gescannt, bei Restriktionsverdaus von Vektoren und Ligationen wurden die benötigten Banden aus den Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Kits (Promega) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

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

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt¹⁰¹. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 1,2 ml einer Vorkultur von *E. coli* DH5α-Zellen angeimpft und unter Schütteln bei 180 rpm und 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,7 inkubiert. Danach wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellsediment in 150 µl Tfb I (10 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8 mit HCl) resuspendiert. Wieder erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min und die Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C. Diesmal wurde nach Abnahme des Überstandes das Zellsediment in 20 ml Tfb II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerin; pH 6,5 mit Essigsäure) resuspendiert. Davon wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 60 µl befüllt und diese umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Es wurden stets frisch hergestellte Tfb I- und Tfb II-Lösungen verwendet.

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

Bei der Transformation von *E. coli* wurde freie DNA in kompetente Bakterienzellen übertragen. Dazu wurden die zuvor bei -80°C gelagerten, chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut. 50 μl *E. coli*-Suspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden mit 10 μl des DNA-Fragments oder 1 μl Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C , um die Effizienz der Transformation zu steigern. Nach einer kurzen Inkubation für 2 min auf Eis wurde 1 ml LB-Flüssigmedium zur Suspension hinzugegeben und diese für 1 h bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurde für 2 min bei 13000 g zentrifugiert. Es wurde so viel Überstand abgenommen und verworfen, bis ca. noch 100 μl im Reaktionsgefäß verblieben, um das *E. coli*-Zellsediment darin resuspendieren zu können. Zuletzt wurden 100 μl Suspension gleichmäßig auf eine LB-Platte mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ausplattiert und die Platten für ca. 16 h bei 37°C inkubiert, bis einzelne *E. coli*-Kolonien erkennbar waren.

2.2.10 Transformation von *Aspergillus fumigatus*

Zur Transformation von *A. fumigatus* mussten zuerst Protoplasten (Pilzzellen ohne Zellwand) gewonnen werden. Zunächst wurden 200 ml flüssiges AMM mit ca. 10^8 Sporen beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Vor der Aberntung des Myzels wurden Enzymlösungen für je einen zu transformierenden *Aspergillus*-Stamms hergestellt. Für einen Enzymlösungsansatz wurden 2 g von 66 mg/ml VinoTastePro (Novozymes Maturation: 6-10 g/hl, hochaktives beta-glucanase in 30 ml Citratpuffer, pH 5,5; 150 mM KCl; 580 mM NaCl; 50 mM Natriumcitrat) gelöst und die Enzymlösung anschließend steril filtriert und in ein Erlenmeyerkolben gefüllt. Zur Ernte wurde nach 16-24 h die Flüssigkultur mit dem angewachsenen Myzel durch sterile, mit Microcloth (Calbiochem) ausgekleideten Trichtern geschüttet. Das im Trichter angesammelte Myzel wurde dreimal mit 30 ml Citratpuffer gewaschen. Mit einem sterilen Spatel wurde das Myzel vorsichtig zu einem großen Myzelball geformt und in die frisch vorbereitete Enzymlösung gegeben. Nun wurde die Enzymlösung für 45 min bei 30°C auf dem Schüttler bei 80 rpm inkubiert, um so die enzymatische Zersetzung der Pilzzellwand herbeizuführen. Dabei wurde darauf geachtet nicht zu lange zu verdauen, da so die Protoplasten beschädigt werden könnten. Um die Protoplasten vollständig von den Hyphenrückständen zu trennen, wurde der Erlenmeyerkolben mit der Protoplastensuspension ein paar Mal kurz geschwenkt. Danach wurde die Suspension wieder mit Hilfe eines sterilen, mit Microcloth ausgekleideten Trichters, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) filtriert. Da die Protoplasten ohne Zellwand äußerst instabil sind, erfolgte die Filtration auf Eis. Zudem wurde nach Filtration das Falcon-Röhrchen nach einer Inkubationszeit von 5-10 min auf Eis

mit bei 4°C gekühlter STC 1700-Lösung (1,2 M Sorbitol; 10 mM Tris pH 5,5; 50 mM CaCl₂; 35 mM NaCl) auf 50 ml aufgefüllt, um die Protoplasten osmotisch zu stabilisieren. Im Anschluss wurde das Falcon-Röhrchen bei 1700 g und 4°C für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Falcon-Röhrchen mit frischer, gekühlter STC 1700-Lösung befüllt und erneut bei 1700 g und 4°C für 12 min zentrifugiert. Diesmal wurde so viel Überstand abgenommen, bis ca. 500 µl Restvolumen im Falcon-Röhrchen übrig blieben. Die nun aufgereinigten Protoplasten wurden im Restvolumen resuspendiert und mikroskopisch kontrolliert. Nun folgte die eigentliche Transformation. Je 100-200 µl der gewonnenen Protoplastensuspension wurden in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 30 µl DNA-Lösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Vorsichtig wurde schrittweise und unter leichtem Schwenken erst zweimal 250 µl und anschließend 550 µl PEG 4000 (50 mM CaCl₂; 10 mM Tris pH 7,5; 60% (w/v) Polyethylenglykol 4000) hinzugegeben. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 20 min über Eis wurde das Röhrchen mit gekühlter STC 1700-Lösung auf 15 ml aufgefüllt und bei 1700 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 500 µl abgegossen und verworfen. Das Sediment wurde im Restvolumen resuspendiert und mit 5 ml flüssigem, auf 50 °C vorgewärmtem AMM-Sorbitol-Weichagar (AMM; 0,7% (w/v) Agar; 1,2 M Sorbitol) vermengt. Nach leichtem Schütteln wurde der Weichagar auf frische AMM-Sorbitol-Platten (AMM; 2,0% (w/v) Agar; 1,2 M Sorbitol), supplementiert mit dem zur Selektion erforderlichen Antibiotikum (z.B. Hygromycin B, Pyriithiamin oder Phleomycin), ausplattiert und schließlich bei für 48-96 h bei 37 °C inkubiert, bis heranwachsende Klone von den Platten isoliert und auf frischen AMM-Platten+ Antibiotikum ausgestrichen werden können.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

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

2.2.12 Klonierungsstrategien

2.2.12.1 Deletionsmutanten

Zur Herstellung der mitochondrialen Fissionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ wurde das zu deletierende Gen durch eine Hygromycin-Resistenz-Kassette ausgetauscht. Dazu wurde die 3,5 kb große Hygromycin-Resistenz-Kassette mit Hilfe des Restriktionsenzym *SfiI* (Fermentas) aus dem Vektor $\Delta och1$ (pSK346) geschnitten. Mittels PCR wurden die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche des zu deletierenden Gens amplifiziert und anschließend mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette ligiert. Das Konstrukt wurde zur Transformation von Protoplasten des *A. fumigatus*-Stammes AfS35 (Wildtypstamm) verwendet. Durch homologe Rekombination wurde das Gen durch die Deletionskassette ausgetauscht.

2.2.12.2 Komplementanten

Zur Herstellung der Komplementante der mitochondrialen Fissionsmutante $\Delta fis1$ wurde zunächst das Plasmid pZY008 kloniert. Mittels PCR wurde *fis1* amplifiziert, mit *PstI* geschnitten und anschließend phosphoryliert. Der Vektor psk379 wurde mit den Enzymen *PstI* und *PmeI* verdaut. Nach Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors erfolgte die Ligation des amplifizierten *fis1*-Fragments mit dem Vektor. Das so entstandene Konstrukt (pYZ008) wurde in den *Aspergillus*-Stamm $\Delta fis1$ transformiert. Ähnlich gelang die Herstellung von der Komplementante *mdv1+* $\Delta mdv1$. Hier wurde psk379 nur mit *PmeI* geschnitten. Das fertige Plasmid (pYZ007) wurde in den *Aspergillus*-Stamm $\Delta mdv1$ transformiert. Für die Herstellung der Komplementante *dnm1+* $\Delta dnm1$ wurde das vom Vorgänger Christoph Helmschrott klonierte Plasmid mit dem integrierten *dnm1*-Gen in den $\Delta dnm1$ -Stamm kloniert.

2.2.12.3 Mitochondriale GFP (mtGFP)-Mutanten

Zur Visualisierung der Mitochondrien wurde ein Vektor, der eine mitochondriale Zielsequenz und eine GFP-Sequenz enthält, in die zu untersuchenden Stämme transformiert. Dieser Vektor (pCH005) ist ein Derivat von pSK379-phleo, in dem die mtGFP-Sequenz aus dem Vektor pRS54-phleo integriert wurde¹⁰².

2.2.12.4 **Konditionelle Mutanten $\rho h o 1_{pkiAteton}$ und $mgm1_{pkiAteton}$**

Zunächst wurde das Plasmid pYZ002 mit einem *pkiA*-Promotor kloniert, welches ein Derivat von pJW123 ist. Hierbei wurde der *gpdA*-Promotor aus pJW123 mit dem *pkiA*-Promotor aus *Aspergillus niger* ausgetauscht. Im nächsten Schritt wurde zuerst *rho1* mittels PCR amplifiziert, das Produkt mit Sfi I geschnitten und anschließend mit dem geschnittenen Vektor pYZ002 ligiert. Die Herstellung der $mgm1_{pkiAteton}$ erfolgte analog. Die entstandenen Konstrukte wurden zur Transformation von Protoplasten des *A. fumigatus*-Stammes AfS35 verwendet.

2.3 **Mikrobiologische Methoden**

2.3.1 **Kultur und Ernte von *Aspergillus fumigatus***

Zur Anzucht von *A. fumigatus* wurden 50 ml steriles AMM-Agar in eine Zellkulturflasche mit einem maximalen Füllvolumen von 250 ml (Roth) gegossen und abgekühlt. Anschließend wurde die Flasche mit ca. 10 sterilen Glaskugeln befüllt und mit jeweils $5-10 \times 10^5$ Sporen angeimpft. Zum gleichmäßigen Verteilen der Sporen auf der Agaroberfläche wurde die Flasche vorsichtig geschwenkt. Nun wurde die Zellkulturflasche für 2-4 Tage bei 37°C inkubiert, bis der Agar mit dichtem, grün sporulierenden Myzel bewachsen war.

Zur Ernte der Sporen wurden 10 ml steriles H₂O in die Zellkulturflasche gegossen. Durch Schütteln und Schwenken konnten sich die Sporen von den Konidiophoren lösen. Diese nun entstandene Sporen-Suspension wurde durch einen sterilen, mit Microcloth (Calbiochem) ausgekleideten Trichter geschüttet und das Filtrat mit Hilfe eines 15 ml Falcon-Röhrchens aufgefangen.

2.3.2 **Bestimmung der Sporenkonzentration**

Nach der Ernte wurde die Sporenkonzentration ermittelt. Hierzu wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung des Sporen-Stocks hergestellt und die optische Dichte dieser Verdünnung mit Hilfe eines Densitometers bestimmt. Über die durch Johannes Wagener aufgestellte Formel konnte über die optische Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) die Sporenkonzentration errechnet werden.

Formel: Konidienanzahl pro ml = gemessene OD₆₀₀ x Verdünnung x $2,24 \times 10^7$

Die optische Dichte von 0,22 entspricht in etwa einer Sporenkonzentration von 5×10^7 Sporen/ml. Beginnend mit dieser Sporenkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe mit aufeinanderfolgenden zehnfachen Verdünnungs-Schritten bis zu einer Sporenkonzentration von 5×10^3 Sporen/ml hergestellt.

2.3.3 Wachstumsanalyse von *A. fumigatus*

2.3.3.1 Radialer Wachstumstest

Zur Bestimmung des radialen Wachstums von *A. fumigatus* wurden 3 μ l einer Sporensuspension (1×10^6 Sporen/ml) mittig auf eine Agarplatte getüpfelt. Der Durchmesser der Kolonie wurde nach 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.3.3.2 Tüpfeltest (Drop dilution assay)

Zur Untersuchung des Wachstumsphänotyps verschiedener *A. fumigatus*-Stämme auf unterschiedlichen Medien und bei unterschiedlichen Bedingungen wurden je 3 μ l jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die entsprechende Agarplatte getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten Platten wurden je nach Fragestellung bei 37 °C oder 50 °C inkubiert und nach 36 h bzw. 48 h auf ihr Wachstum analysiert.

2.3.3.3 E-Test

E-Teststreifen (bioMérieux) wurden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Antimykotikums verwendet. Ein E-Teststreifen besteht aus einem Kunststoffträgermaterial, das mit einem stabilen Antimykotika-Gradienten beschichtet ist. Zuerst wurden 1×10^6 Sporen gleichmäßig mit einem sterilen Glasspatel auf einer Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurde der E-Teststreifen vorsichtig in der Mitte der Platte platziert. Dabei war besonders darauf zu achten den Gradientenstreifen nicht mehr zu verrücken, sobald dieser auf das Agar gelegt wurde. Luftblasen zwischen dem Agar und dem Teststreifen wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette durch sanften Druck beseitigt. Nach einer Inkubationszeit von 36h – 48h bei 37°C konnte die minimale Hemmkonzentration auf der Platte abgelesen werden.

2.3.3.4 Hemmhoftest

Hemmhoftests dienen zur Untersuchung der Sensitivität von *A. fumigatus*-Stämmen auf Reagenzien wie H₂O₂, Menadion, Amphotericin B, etc. Wieder wurden 1 x 10⁶ Sporen auf eine Agarplatte ausplattiert und gleichmäßig verteilt. Ein steriles Filterplättchen wurde auf die Mitte der Platte platziert und 15 µl einer 30-prozentigen H₂O₂-Lösung wurden auf dieses Filterplättchen gegeben. Nach 24h – 36h Inkubation bei 37°C konnte der Hemmhoftdurchmesser abgemessen werden.

2.3.4 *Galleria mellonella*- Infektionsmodell

Zur Untersuchung der Virulenz der Mutanten der mitochondrialen Fission und Fusion wurde ein Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) von Michael Neubauer durchgeführt. Hierzu wurden *G. mellonella*-Larven vom Angel- und Ködermarkt (München, Deutschland) mit Konidien der jeweiligen *Aspergillus*-Stämme injiziert. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Larven mit 5 x 10⁵ Konidien, die in je 10 µl destilliertes Wasser (ddH₂O) resuspendiert wurden, injiziert. Die Larven wogen zum Zeitpunkt der Inokulation zwischen 0,3-0,5 g. Als Negativkontrolle wurde nur ddH₂O injiziert sowie eine Vergleichsgruppe ohne jegliche Behandlung mitgeführt. Die Larven wurden nach der Injektion bei 37°C inkubiert und alle 8 Stunden untersucht.

2.3.5 Mikroskopie

2.3.5.1 Lichtmikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung von Hyphenmorphologie und –wachstum wurde mit Hilfe des inversen Hellfeld- und Phasenkontrast-Mikroskops Zeiss Axiovert 25 durchgeführt. Die Sporen wurden in Mikrotiterplatten in flüssigem AMM angezogen. Je nach Fragestellung wurden Mikrotiterplatten mit 24 oder 96 Vertiefungen verwendet. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon EOS 600D) gemacht.

2.3.5.2 „Live Cell“-Mikroskopie

Für die Darstellung der mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markierten Mitochondrien in *A. fumigatus* wurde das „UltraView spinning disc confocal imaging system“ (Perkin Elmer) verwendet, welches mit einem Nikon Eclipse TE300 Mikroskop und einer ORCA ER Kamera (Hamamatsu) ausgestattet ist. In einer speziellen 8-Kammer Mikroskopierplatte (µ-Slides 8

well; Ibidi) wurden die Sporen für ca. 10 h bei 37°C inkubiert. Jede Kammer wurde mit 200 µl Medium und 500-1000 Sporen befüllt. Durch die am Mikroskop installierte Inkubationskammer konnten die Präparate während des Mikroskopierens bei 37° C gehalten werden. Das GFP-Signal wurde durch Anregung eines Argon-Lasers bei einer Wellenlänge von 488 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines Photomultiplier konnten die Präparate bildlich festgehalten werden.

2.4 Medien und Puffer

LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid auf 1000 ml; für LB _{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben
LB-Platten:	LB-Medium; 2,0 % (w/v) Agar; für LB _{Amp} -Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben
AMM:	2 mM MgSO ₄ • 7 H ₂ O; 50 ml 20x Salzlösung; 1 ml Spurenelementlösung; 10 g D-Glukose auf 1000 ml
AMM-Platten:	AMM; 2,0 % (w/v) Agar
Sabouraud-Medium	1% (w/v) Pepton (LP0034; Oxoid); 4% (w/v) D-Glukose als Endkonzentration; pH 7
Sabouraud-Platten	Sabouraud-Medium; 2% (w/v) Agar
RPMI-Platten	RPMI-1640-Medium (#R6504-1L; Sigma-Aldrich); 2% (w/v) D-Glukose als Endkonzentration; 0,165 mol/l MOPS; pH 7,0

2.5 Chemikalien und Geräte

2.5.1 Chemikalien und Enzyme

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England), AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson (New Jersey, USA) Biomol (Hamburg), Boeringer Ingelheim Bioproducts (Heidelberg), Calbiochem (Merck, Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Difco (Becton Dickinson, New Jersey, USA), Fluka (Sigma Aldrich, Steinheim), Invitrogen (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Invitrogen, Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Ipswich, UK), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim), usb Affimetrix (Santa Clara, USA) und Qiagen (Hilden) bezogen.

2.5.2 Geräte

Agarose-Gelkammern	EASY-CAST
Brutschränke	Heraeus
Digitalkamera	Canon EOS 600D
Feinwaagen	Mettler AE 50
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001 K
Mikroskop:	
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM LB
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica SP-5 und Leica TCS-NT
Live Cell Mikroskop	Nikon Eclipse TE300
Mikrowelle	Sharp
pH-Messgerät	Kettler Toledo
Photometer	Amersham Bioscience Ultraspec 10
Schüttellinkubatur	B. Braun
Spannungsquelle	BioRad, Power pac 1000
Sterilbank	Heraeus, <i>Hera Safe</i>
Spritzenaufsatzfilter	0,2-0,8 µm Millex GD
Thermomixer	Eppendorf
Thermocycler	Biometra <i>T Gradient</i>
Biometra	<i>Personal Cyclor</i>

UV-Transilluminator

Video-Geldokumentationssystem

Vortex

Zellaufschlussgerät

Zentrifugen

BioRad

BioRad

Scientific Instruments

MP *Fastprep 24*

Sigma 1-13, 1K15, 6K15

Heraeus, Megafuge 1.0R

Roth Micro Centrifuge

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation möglicher Komponenten der mitochondrialen Fissionsmaschinerie von *A. fumigatus*

Zu Beginn dieser Arbeit mussten zuerst die mitochondrialen Fissionsproteine in *A. fumigatus* identifiziert werden. In *S. cerevisiae* wurde bereits ein Modell der mitochondrialen Fissionsmaschinerie aufgestellt. Hierbei spielen unter anderem die Proteine Dnm1, Fis1 und Mdv1 eine wichtige Rolle. Um die entsprechenden homologen Proteine in *A. fumigatus* zu finden, erfolgte die Verwendung des Programmes BLASTP des National Center for Biotechnology Information ¹⁰³. Eine Übersicht der entsprechenden Homologe ist aus Tabelle 3 zu entnehmen.

3.1.1 Das Dnm1-Homolog

Die Aminosäuresequenz von Dnm1 (YLL001W) wurde im FASTA-Format als „Query Sequence“ in die „Non-redundant protein sequences“-Datenbank von *A. fumigatus* Af293 (taxid: 330879) eingetragen. Als Ergebnis zeigte sich die größte Übereinstimmung bei dem als Dynamamin-ähnliche GTPase annotiertes Dnm1-Protein (AFUA_8G02840) mit einer maximalen Identität von 56%. Nachfolgend zeigten die Dynamamin-ähnliche GTPase Vps1 (vacuolar protein sorting) und die Dynamamin-GTPase Msp1 (mitochondrial sorting of proteins) beide eine Übereinstimmung von 40%. Da das Dnm1-Protein in *A. fumigatus* nicht nur denselben Namen trägt, sondern auch die höchste Identität und den höchsten Bit-Score (875) aufwies, identifizierten wir es als das homologe Protein von Dnm1 in *S. cerevisiae*. Das in *A. fumigatus* für Dnm1 kodierende Gen *dnm1* ist auf Chromosom 8 lokalisiert (768813-771371 bp), das Transkript umfasst 2403 bp und kodiert 800 Aminosäuren ⁵⁵.

3.1.2 Das Fis1-Homolog

Durch das Alignment von Fis1 (YIL065C) auf gleiche Weise konnte das Homolog Fis1 (AFUA_2G13320) mit einer Übereinstimmung von 51% identifiziert werden. Weitere Kandidaten mit hoher Übereinstimmung wurden nicht gefunden. Das dafür kodierende Gen liegt auf Chromosom 2 (3439763-3440265 bp), das Transkript umfasst 1063 bp und kodiert 151 Aminosäuren ⁵⁵.

3.1.3 Das Mdv1/Caf4-Homolog

Sowohl beim Alignment der Aminosäuresequenz von Mdv1 (YJL112W) als auch von seinem Paralog Caf4 (YKR036C) ergab sich das annotierte Mdv1 (AFUA_5G13140) in *Aspergillus fumigatus* mit einer Identität von 34%/32%. Weitere Proteine mit hoher Übereinstimmung jedoch niedrigerem Bit-Score waren zwei WD repeating Proteine. Als WD repeating Proteine werden solche Proteine bezeichnet, die aus wiederkehrenden Repeats von einer Sequenz von 40 oder mehr Aminosäuren bestehen und mit einem Tryptophan (W)-, Aspartat (D)-Rest enden. Diese gehören einer großen Proteinfamilie an, die an Signaltransduktionen und Zusammenbau von Proteinkomplexen beteiligt sind¹⁰⁴. Bei gleichnamigem Protein und höchstem Bit-Score wurde erneut der erste Kandidat Mdv1 gewählt. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 5 (34448553-3446848 bp) lokalisiert, das Transkript umfasst 2894 bp und kodiert 544 Aminosäuren⁵⁵.

Tabelle 3: Homologe Proteine des mitochondrialen Fissionsapparates in *Aspergillus fumigatus*, Stamm Af293. Die Proteinidentität wurde mittels BLASTP bestimmt.

Mammalia	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. fumigatus</i> 293	Proteinidentität
Drp1	Dnm1 (YLL001W)	AFUA_8G02840	56%
Fis1	Fis1 (YIL065C)	AFUA_2G13320	51%
-	Mdv1 (YJL112W)	AFUA_5G13140	34%
-	Caf4 (YKR036C)	AFUA_5G13140	32%

3.2 Herstellung und Verifizierung von *dnm1*-, *fis1*- und *mdv1*-Deletionsmutanten und -Komplementanten

Nach Identifikation der homologen Fissionsproteine in *A. fumigatus* wurden die Fissionsdeletionsmutanten nach der Klonierungsstrategie in Kapitel 2.2.12.1 hergestellt. Anschließend wurden die zugehörigen Komplementanten hergestellt (siehe Kapitel 2.2.12.2). Zur Verifizierung der mitochondrialen Fissionsdeletions- und Komplementationsmutanten wurden die in der Tabelle 4 aufgelisteten Primer verwendet. Für jedes Gen wurden vier Kontroll-PCRs durchgeführt. Die Abbildungen 1A-F zeigen die Anlagerungsstellen der

Primerpaare sowie die Fragmentlänge der zu erwartenden Amplifikate. Der Wildtypstamm von *A. fumigatus* wird in den folgenden Kapiteln als AfS35 oder Wildtyp (wt) bezeichnet. Aus den Stämmen AfS35 (wt), $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und der jeweiligen Komplementanten $\Delta dnm1+dnm1$, $\Delta fis1+fis1$, $\Delta mdv1+mdv1$ wurde die Genom-DNA isoliert und als Template bei den Kontroll-PCRs verwendet.

3.2.1 *dnm1*

Für die Verifizierung der Deletions- und Komplementationsmutante von *dnm1* wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primer verwendet. Abbildung 1A zeigt die zu erwartenden Fragmentlängen der PCR-Produkte. Der obere Genomabschnitt stellt den Genlocus von *dnm1* im wt dar, der mittlere den *dnm1::hph/tk*-Lokus nach Deletion von *dnm1* im Wildtyp-Genom und Ersetzung der kodierenden Region mit einer Hygromycin-Resistenz-Kassette und einem *gpdA*-Promoter aus dem Vektor $\Delta och1$ (pSK346). Der untere Genomabschnitt zeigt die Integration des open reading frame (ORF), der kodierenden DNA-Sequenz zwischen dem Start- und Stopcodon von *dnm1*, mit einem *gpdA*-Promoter am *his2A*-Lokus in der Deletionsmutante. Folglich sollte die PCR 1 nur ein PCR-Produkt der Länge 3,9 kb beim wt ergeben, da diese den Wildtyploкус von *dnm1* amplifiziert. Die Primerpaare von PCR 2 und 3 lagern sich an der Deletionskassette mit dem Hygromycin-Resistenzgen an und amplifizieren den Genabschnitt 5'-wärts und 3'-wärts mit den zu erwartenden Fragmentlängen von 1,9 kb und 1,4 kb, die nur bei der Amplifikation von der Deletionsmutante zu erwarten wären. PCR 4 umfasst den ORF von *dnm1* und einen Teil des *his2A*-Lokus, weshalb sich nur bei der Komplementante ein PCR-Produkt von 2,6 kb ergeben sollte. Abbildung 1 B zeigt die jeweiligen PCR-Produkte nach Auftrennung durch Gel-Elektrophorese.

3.2.2 *fis1* und *mdv1*

Die Kontroll-PCRs für die Deletionsmutanten und Komplementanten von *fis1* und *mdv1* basieren auf dem gleichen Prinzip. Abb. 1 C zeigt die zu erwartenden Fragmentlängen für *fis1*, Abb. 1 E die für *mdv1*. Abb. 1 D zeigt die PCR-Produkte für *fis1* und Abb. 1 F für *mdv1* nach Auftrennung durch Gel-Elektrophorese

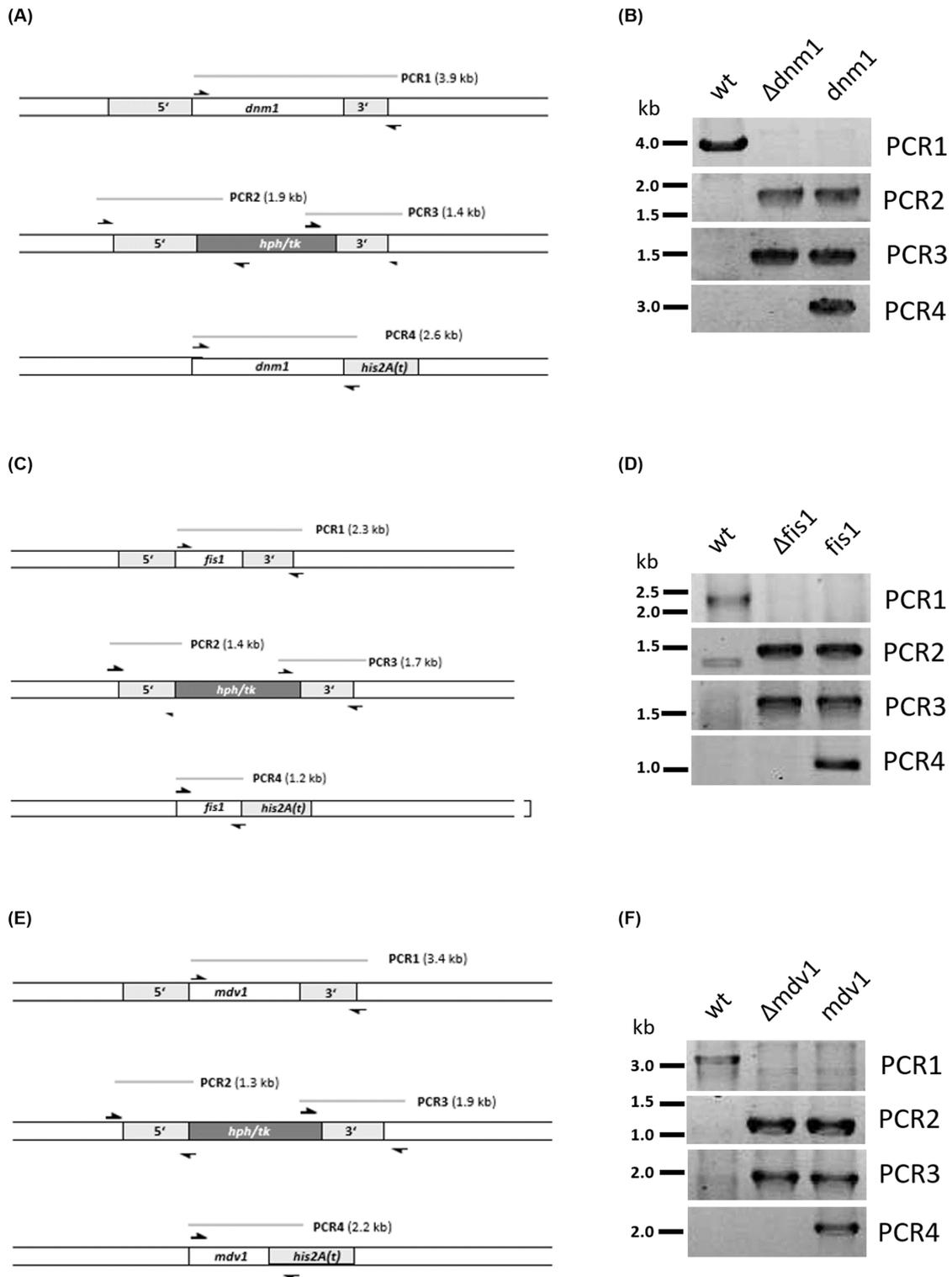


Abb. 1: Verifizierung-PCRs für der Deletion und Komplementation von *dnm1*, *fis1* und *mdv1*. (A), (C) und (E) zeigen die zu erwartenden PCR-Fragmentlängen für PCR1-4 für *dnm1*, *fis1* und *mdv1*. (B), (D) und (F) zeigen die die PCR-Produkte auf dem Agarose-Gel nach Gel-Elektrophorese für jeweils *dnm1*, *fis1* und *mdv1*. (5'/3': Primerbindungsstellen, *his2A(t)*: *his2A*-Lokus zur möglichen homologen Rekombination, *hph/tk*: Hygromycin-Resistenzkassete, , kb: kilobasen, wt: Wildtypstamm).

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Verifizierung der Deletions- und Komplementationsmutanten

<i>dnm1</i>	
PCR 1	dnm1-8g02840-fwd; dnm1-8g02840-3-cast
PCR 2	dnm1-8g02840-5-cast; gpdA(p)-3-rev
PCR 3	trpCt-fwd; dnm1-8g02840-3-cast
PCR 4	dnm1-8g02840-fwd; seq-his2A(t)-rev
<i>fis1</i>	
PCR 1	fis1-2G13320-profwd; fis1-2G13320-3cast
PCR 2	fis1-2G13320-5cast; gpdA(p)-3-rev
PCR 3	trpCt-fwd; fis1-2G13320-3cast
PCR 4	fis1-2G13320-profwd; seq-his2A(t)-rev
<i>mdv1</i>	
PCR 1	mdv1-5G13140-fwd3; mdv1-5G13140-3cast
PCR 2	mdv1-5G13140-5cast; gpdA(p)-3-rev
PCR 3	trpCt-fwd; mdv1-5G13140-3cast
PCR 4	mdv1-5G13140-fwd3; seq-his2A(t)-rev

3.3 Die Deletionsmutanten der mitochondrialen Fission zeigen ein verändertes Sporulations- und Wachstumsverhalten

3.3.1 Die verminderte Sporulation

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten auf AMM-Platten näher untersucht. Mit sogenannten „Tüpfeltests“ (Drop dilution assay, siehe Kapitel 2.3.1.2) konnten pro Reihe die Sporen des zu untersuchenden Stammes in unterschiedlichen Sporenkonzentrationen pipettiert und auf dem Medium inkubiert werden. Für jeden hergestellten Deletionsstamm wurden je drei Klone isoliert, um eine signifikante Aussage über

die beobachteten Versuchsergebnisse machen zu können. Dabei zeigte sich, dass die Fissionsdeletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp langsamer und weniger sporulierten. Dies war erkennbar an der geringeren Grünfärbung der Kolonien der Deletionsmutanten. Neben einer verminderten Sporulation wurde eine erhöhte Myzelproduktion beobachtet. Der weiße Myzelsaum der Kolonien war ausgeprägter als beim Wildtyp. Durch Reintegration des deletierten Gens in die Deletionsmutanten konnte dieser Wachstumsphänotyp wieder vollständig kompensiert werden (vgl. Abb. 2).

Das veränderte Sporulationsverhalten könnte auf eine veränderte mitochondriale Funktion durch die Beeinträchtigung der mitochondrialen Fission zurückzuführen sein. Um zu untersuchen, ob die Dysfunktion der mitochondrialen Fission zu einer Funktionsstörung in der Atmungskette führt, wurde durch Dr. Nikola Wagener die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase, einem wichtigen Enzym in der mitochondrialen Atmungskette, in den Deletionsmutanten untersucht. Hier zeigte sich, dass die Mitochondrien der Fissionsdeletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase aufwiesen (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt).

In *S. cerevisiae* führte die Dysfunktion der mitochondrialen Fission zu einer Verteilungsstörung der Mitochondrien bei der Sporulation. Während der Meiose in *S. cerevisiae* bilden sich aus einer diploiden Zelle vier haploide Sporen, die in einer Einheit, der sogenannten Tetrade, verbleiben. Gorsich und Shaw zeigten, dass bei mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten in *S. cerevisiae* 15-20% der Mutanten Tetraden bildeten, bei denen ein oder mehrere Sporen einer Tetrade keine Mitochondrien enthielten¹⁰⁵. Wir untersuchten deshalb, ob dies auch der Fall in *A. fumigatus* ist. Die mitochondrialen Fissionsmutanten wurden mit einem Expressionsvektor transformiert, der ein grünfluoreszierendes Protein mit mitochondrialem Sortierungssignal (mtGFP) enthält (pCH005), um die Mitochondrien sichtbar zu machen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden pro Stamm je 300 Sporen gezählt und ausgewertet, wie viele der ausgezählten Sporen Mitochondrien enthielten, um anschließend den Prozentsatz der mtGFP-positiven Sporen zu bestimmen. In Tabelle 5 sind die ausgewerteten Ergebnisse zusammengefasst. Es zeigte sich, dass sich die Anzahl der mtGFP-positiven Sporen in $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ nicht von der Anzahl der mtGFP-positiven Sporen im Wildtyp unterschieden (vgl. Abb. 3).

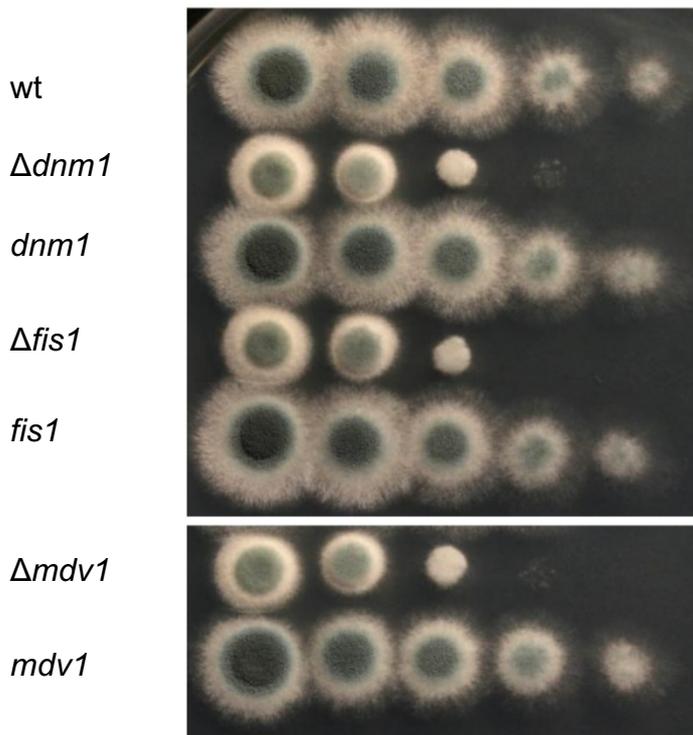


Abb. 2: Verminderte Sporulation der Deletionsmutanten. Für die Tüpfeltests wurden je 3 μ l jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die AMM-Platte getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 36 h fotografiert.

Tabelle 5: Anzahl der mtGFP-positiven Sporen im Wildtyp und in den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten

Stamm	Anzahl der Sporen	Anzahl der mtGFP-positiven Sporen (%)
wt	300	297 (99,0%)
$\Delta dnm1$	300	298 (99,3%)
$\Delta fis1$	300	299 (99,7 %)
$\Delta mdv1$	300	289 (96,3%)

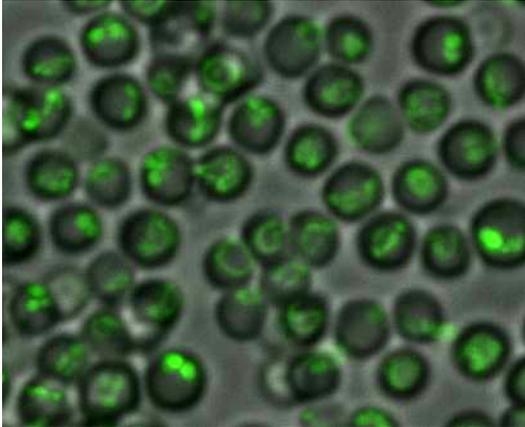


Abb. 3: Beeinträchtigung der mitochondrialen Fission hat keinen Einfluss auf die Vererbung der Mitochondrien in die neu gebildeten Sporen. Die Abbildung zeigt eine Überlagerung der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopiebilder. Zur Visualisierung der Mitochondrien wurde ein mtGFP-Vektor (pCH005) in den $\Delta fis1$ -Stamm transformiert.

3.3.2 Eingeschränktes radiales Wachstum

Neben der verminderten Sporulation wurde auch ein verlangsamtes und eingeschränktes radiales Wachstum in allen mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten beobachtet. Zur systematischen Auswertung dieses Wachstumsphänotyps wurden radiale Wachstumstests durchgeführt. Es wurden von jedem Stamm 3 μ l aus der Sporensuspension mit der Sporenkonzentration von 5×10^6 Sporen/ml auf je eine AMM-Platte und eine Sabouraud (SAB)-Platte getüpfelt und die Platten bei 37°C inkubiert. Der radiale Durchmesser der gewachsenen Kolonien wurde nach 24 h, 48h und 72 h gemessen. Für jeden Stamm wurden drei Versuchsansätze geführt. Abbildung 4 A zeigt den Mittelwert der gemessenen Durchmesser zu der angegebenen Zeit pro Stamm für AMM, Abbildung 4 B für SAB. Die Standardabweichungen waren so gering, dass sie im Diagramm nicht zur Darstellung kommen. Die Wachstumsbeeinträchtigung ließ sich ebenfalls in den Tüpfeltests beobachten. Die Kolonien der Deletionsmutanten waren vom radialen Durchmesser geringer als der Wildtyp (vgl. Abb. 2). Interessanterweise zeigte sich in Abbildung 4 B, dass auf SAB-Medium beim Wildtyp die radialen Durchmesser der Kolonien deutlich größer waren als auf AMM, jedoch unterschieden sich bei den Deletionsmutanten die radialen Durchmesser auf AMM und SAB nicht wesentlich voneinander.

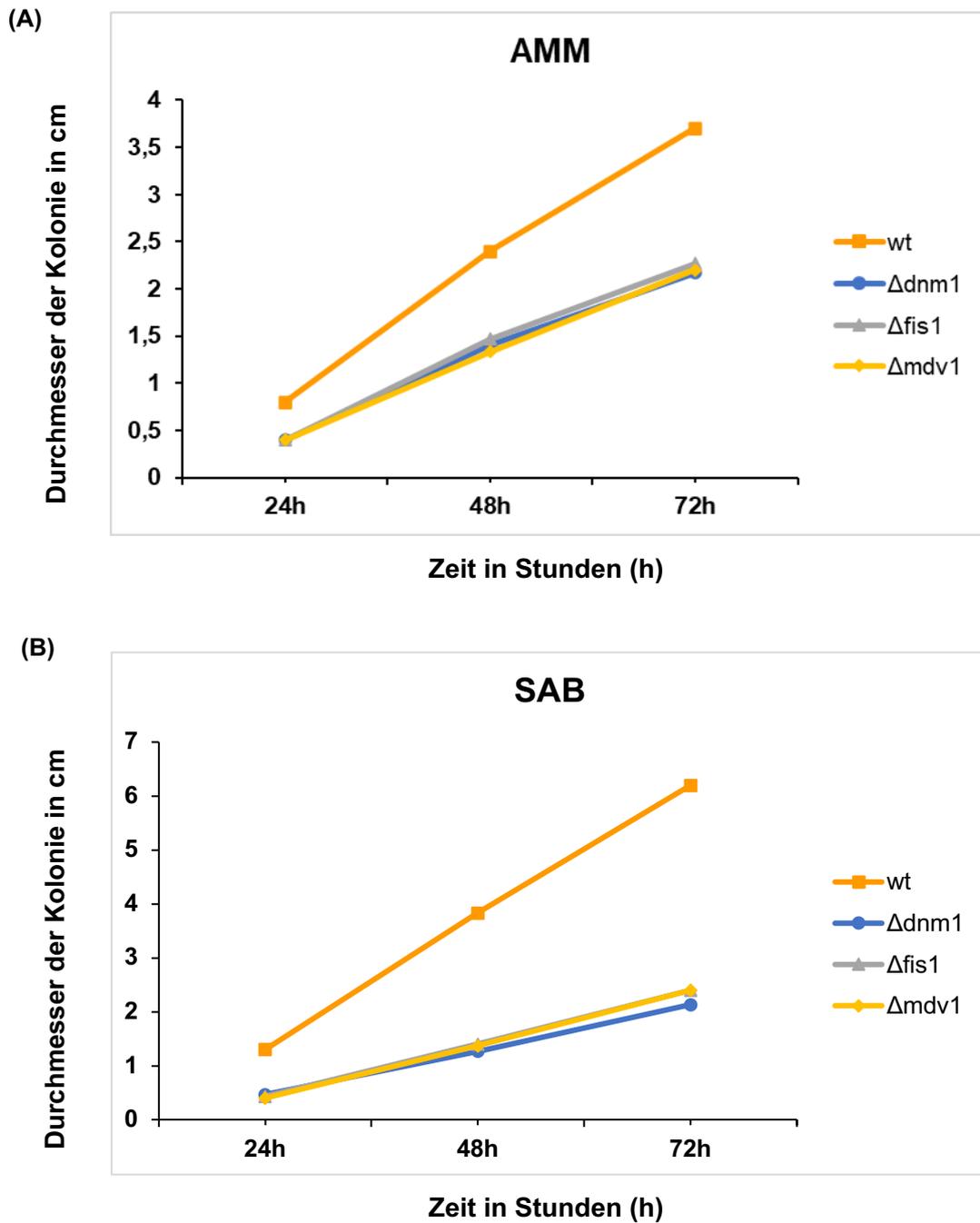


Abb. 4: Die Deletionsmutanten zeigen ein langsames und eingeschränktes Wachstum im radialen Wachstumstest. Zur Bestimmung des radialen Wachstums der angegebenen Stämme wurden 3 μ l einer Sporensuspension (1×10^6 Sporen/ml) mittig auf eine AMM-/SAB-Agarplatte getüpfelt. Der Durchmesser der Kolonie wurde nach 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Für jeden Stamm wurden drei Versuchsansätze mitgeführt. Die Mittelwerte der Messungen wurden in das Liniendiagramm aufgetragen. Die Standardabweichungen waren so gering, dass sie nicht zur Darstellung kommen. (A) zeigt die Ergebnisse auf AMM, (B) auf SAB.

3.3.3 Erhöhte Hitzesensibilität

Zur weiteren Wachstumsanalyse wurden Tüpfelplatten mit AMM und SAB bei 50 °C inkubiert. Im Vergleich zur Inkubationsbedingung bei 37°C zeigten die Deletionsmutanten bei 50°C eine signifikante Wachstumseinschränkung bzw. einen Auskeimungsstopp. Während bei 37°C die Sporen der Deletionsmutanten auf AMM-Agarplatten noch bis zur 4. Verdünnungsfraction (5×10^4 Sporen/ml) auskeimten, konnte bei einer Temperatur von 50°C bereits ab der ersten Verdünnungsfraction (5×10^7 Sporen/ml) ein Auskeimungsstopp beobachtet werden.

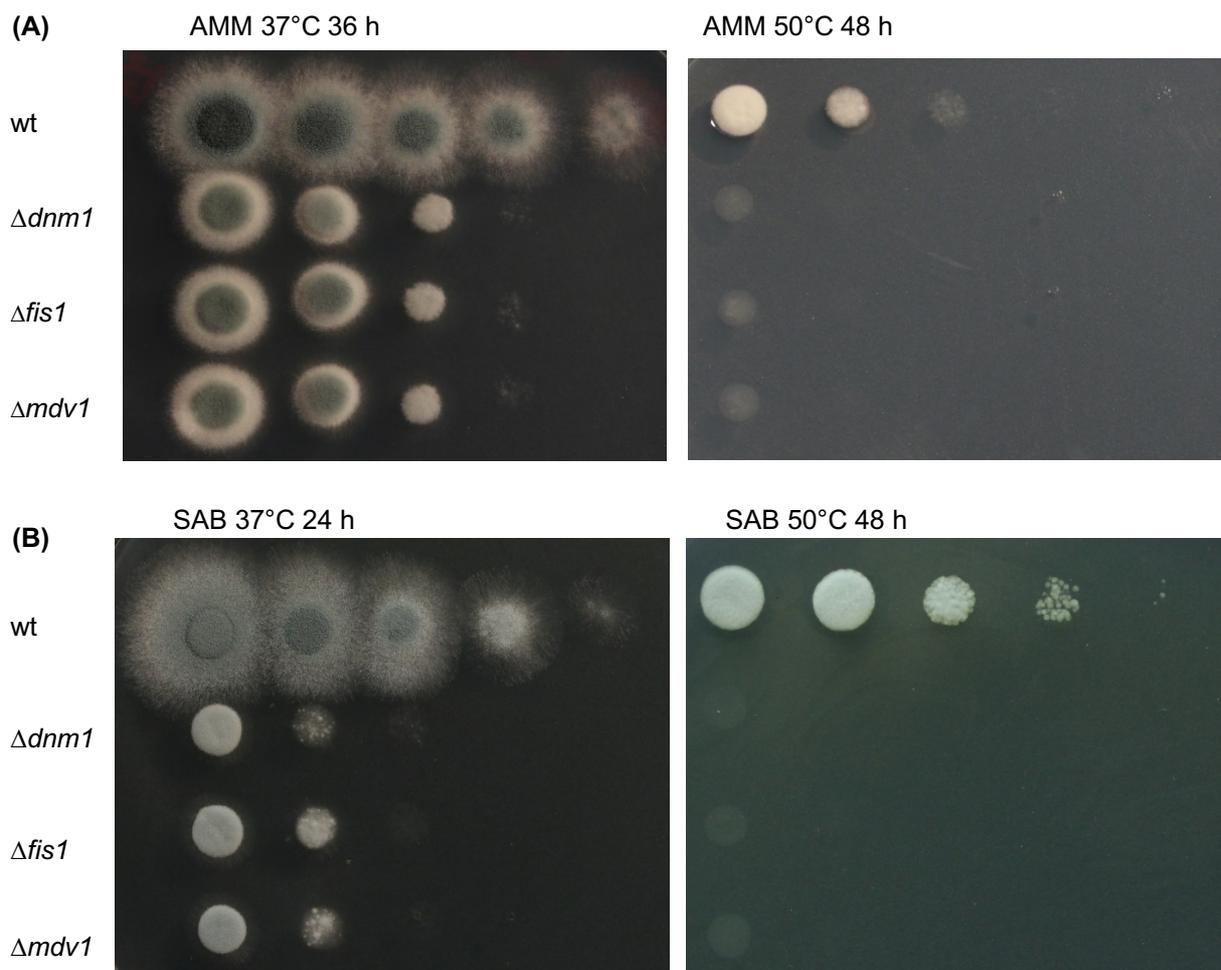


Abb. 5: Erhöhte Hitzesensibilität der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten bei Temperatur 50°C. Für die Tüpfeltests wurden je 3 μ l jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die AMM-Platte/SAB-Platte getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten AMM-Platten wurden bei 37 °C bzw. 50°C inkubiert und nach 36 h bzw. 48 h fotografiert. Die betüpfelten SAB-Platten wurden aufgrund des schnellen Wachstums vom wt nach 24 h bzw. 48 h fotografiert. (A) zeigt die Tüpfeltests auf AMM für die Stämme wt, $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ bei 37 °C/ 50°C, (B) zeigt die Ergebnisse auf SAB-Medium. Aber selbst die ausgekeimte erste Verdünnungsfraction zeigte ein enorm beeinträchtigt Wachstum und ebenso wie der Wildtyp eine stark verminderte Sporulation (vgl. Abb. 5A). Auf

SAB-Medium keimte der Wildtyp bei 50 °C noch eine Verdünnungsfraction (5×10^4 Sporen/ml) weiter aus als auf AMM, während die mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten bereits auf SAB-Medium bei 37 °C schlechter auskeimten als auf AMM und bei 50 °C auf SAB-Medium gar keine Auskeimung zu beobachten war (vgl. Abb. 5B).

3.3.4 Keine Wachstumseinschränkungen bei unterschiedlicher Glukosekonzentration im Medium

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Wachstumsphänotypen der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten ließen sich deutlicher auf Komplexmedien wie SAB-Medium und Blut-Medium darstellen. Da nach dem verwendeten Herstellungsprotokoll SAB-Medium im Vergleich zu AMM neben einer komplexeren Zusammensetzung (z.B. Pepton) auch einen höheren Glukosegehalt besitzt, sollte untersucht werden, ob die Wachstumsbeeinträchtigung eventuell durch einen höheren Glukosegehalt im Medium (in AMM-Medium 1%, in SAB-Medium 4%) bedingt wäre. Hierzu erfolgten Tüpfeltest auf AMM- und SAB-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose im Medium. Wie Abb. 6 zeigt, hatte die unterschiedliche Glukosekonzentration (1% (w/v) Glukose vs. 4% (w/v) Glukose) keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten sowohl vom Wildtyp als auch von den drei Deletionsmutanten.

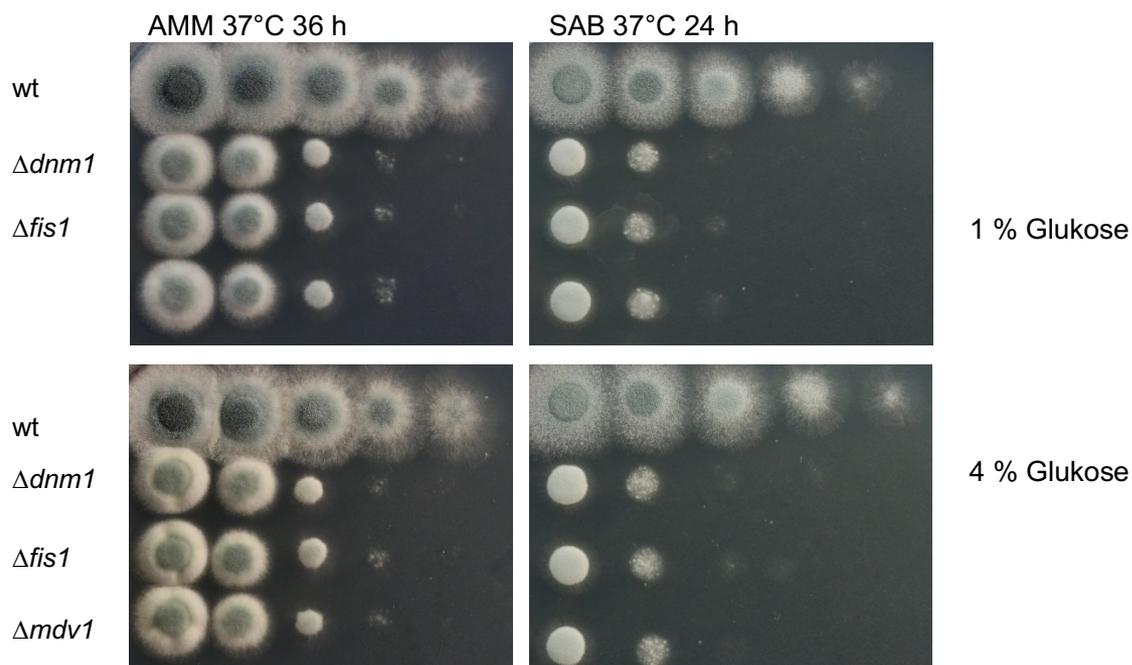


Abb. 6: Die Glukosekonzentration hat keinen direkten Einfluss auf das schlechte Wachstum der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten. Für die Tüpfeltests wurden je 3 μ l jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die AMM-/SAB-Platte mit 1%/ 4% Glukosekonzentration getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 24 h (SAB) bzw. 36 h (AMM) fotografiert.

3.4 Die Deletion von *dnm1*, *fis1* oder *mdv1* führt zur Veränderung der Morphologie der Mitochondrien

Da durch Deletion einzelner Gene, die für wichtige Proteine des mitochondrialen Fissionsapparates kodieren, von einer Funktionseinschränkung der mitochondrialen Fission auszugehen ist, sollte diese Auswirkung auch mikroskopisch untersucht werden. Um die Mitochondrien zu visualisieren, wurde der Expressionsvektor (pCH005) mit einem mtGFP-Konstrukt in die jeweiligen zu untersuchenden *Aspergillus*-Stämme wt, $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ transformiert und so mtGFP-Stämme hergestellt (siehe Kapitel 2.2.12.3).

Für *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass sich die Mitochondrien in einem ständigen Teilungs- und Fusionierungsprozess befinden. Die Mitochondrien unter dem Live-Cell-Mikroskop hatten ein tubuläres, netzartiges Erscheinungsbild⁶³. Diese Beobachtungen ließen sich auch für *A. fumigatus* bestätigen. Wie Abb. 7 zeigt, bildeten die Mitochondrien vom wt lange, tubuläre Vernetzungen, während bei den Deletionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$

die mitochondriale Morphologie ein sehr heterogenes Bild aufwies. Hier waren die Mitochondrien nicht nur zu tubulären Strukturen angeordnet, sondern lagerten sich zu unterschiedlich großen kugeligen Gefügen zusammen. Interessanterweise konnten diese ballonartigen Strukturen vor allem in SAB-Medium vermehrt beobachtet werden. Auch im wt war die Hyphen- Morphologie im SAB-Medium im Vergleich zum AMM-Medium verändert. Die Hyphen waren deutlich verbreitert und die Mitochondrienanzahl innerhalb der Hyphen war gestiegen, jedoch unter Beibehaltung der tubulären Vernetzung.

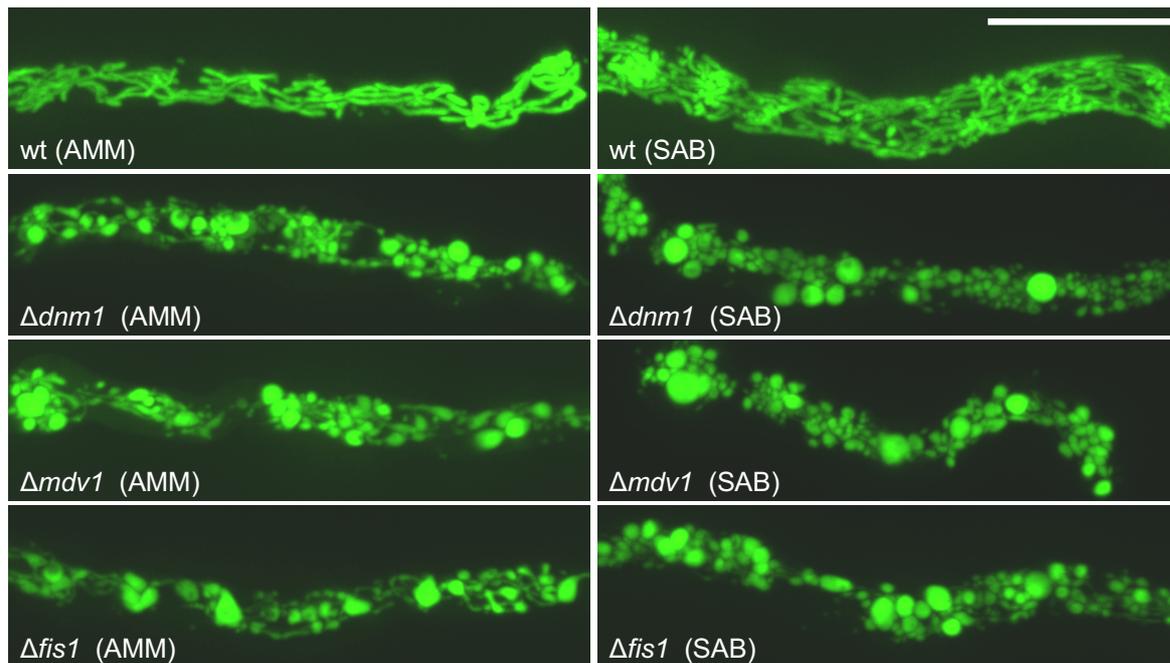


Abb. 7: Darstellung der Mitochondrien-Morphologie mittels mtGFP. Die Sporen der mtGFP-Stämme wurden in einer 8-Well-ibidi-Kammer angesetzt. Pro Kammer wurden 1000 Sporen in 300 μ l AMM-/SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 13 h inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie und einem Live-Cell-Imaging Systems analysiert. Der Messstabbalken repräsentiert 8 μ m.

3.5 Die Sensitivität der *dnm1*-, *fis1*- und *mdv1*-Deletionsmutanten gegenüber Azol-Antimykotika ist erniedrigt

Nachdem die mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten ein beeinträchtigtes Wachstumsverhalten sowie eine erhöhte Hitzesensibilität gezeigt hatten, sollte untersucht werden, ob sie im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine höhere Sensibilität gegenüber Antimykotika aufzeigen. Da bei einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* Triazole wie Voriconazol und Posaconazol Therapie der Wahl sind, wurden zunächst Epsilon-Tests

(E-Tests) durchgeführt, um die minimale Hemmkonzentration (engl.: minimal inhibitory concentration, MIC) von Voriconazol und Posaconazol bei Wildtyp und Deletionsmutanten zu vergleichen. Dazu wurde die gleiche Sporenmenge auf AMM-, RPMI-1640- und SAB-Platten gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde ein Epsilon-Teststreifen, der mit einem stabilen Antimykotika-Gradienten beschichtet ist, vorsichtig in der Mitte der Platte platziert. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und nach 48 Stunden abgelesen. Für jeden Stamm wurden drei Versuchsplatten angesetzt. Gemäß Abb. 8 betrug die MIC für die Deletionsmutante $\Delta fis1$ bei Voriconazol auf SAB-Platten 1,0 µg/ml, auf RPMI-1640-Platten 0,5-0,75 µg/ml, während der Wildtyp signifikant geringere MICs aufwies. Um einen signifikanten Unterschied handelte es sich in diesem Fall, wenn sich die MICs um zwei oder mehr Konzentrationsstufen unterschieden. Auf SAB-Platten betrug die MIC vom wt nur 0,25 µg/ml, auf RPMI-1640-Platten lag sie ein wenig höher bei 0,38 µg/ml. Repräsentativ wurde hier $\Delta fis1$ gezeigt, jedoch ließen sich die Ergebnisse für die Mutanten $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ in den unterschiedlichen Ansätzen stets reproduzieren. Auffällig war insbesondere, dass die Azolresistenz der Deletionsmutanten auf SAB-Medium noch stärker zum Vorschein kam, obwohl ihr Wachstum auf Komplexmedium im Vergleich zum Wildtyp stärker beeinträchtigt war. Diese interessante Beobachtung sollte weiter untersucht werden. Mittels Tüpfeltests sollte eine Konzentration von Voriconazol gefunden werden, bei der die Deletionsmutanten noch weiterwachsen, der Wildtyp allerdings nicht mehr weiter auskeimt. Wie Abb. 9 zeigt, gelang dies analog zu den E-Tests auf SAB-Platten supplementiert mit 0,75 µg/ml Voriconazol. Ebenfalls deuteten Tüpfeltest auf SAB-Platten mit Posaconazol auf eine erhöhte Resistenz der Deletionsmutanten gegenüber Azolen hin.

Da das Ablesen der MIC bei E-Tests manchmal durch das asymmetrische Wachstum auf der Platte erschwert war, sollte eine andere Methode zur Bestätigung verwendet werden. Es wurde ein Well-Test-Versuch etabliert, um die MICs für Voriconazol in verschiedenen Medien (SAB und RPMI) mikroskopisch auszuwerten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Ähnlich zu den E-Tests waren die MICs für Voriconazol bei den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten deutlich höher als beim Wildtyp, sowohl im SAB-Medium als auch im RPMI-Medium. Im SAB-Medium war die MIC für Voriconazol bei den Deletionsmutanten auch im Well-Test-Versuch höher als im RPMI-Medium.

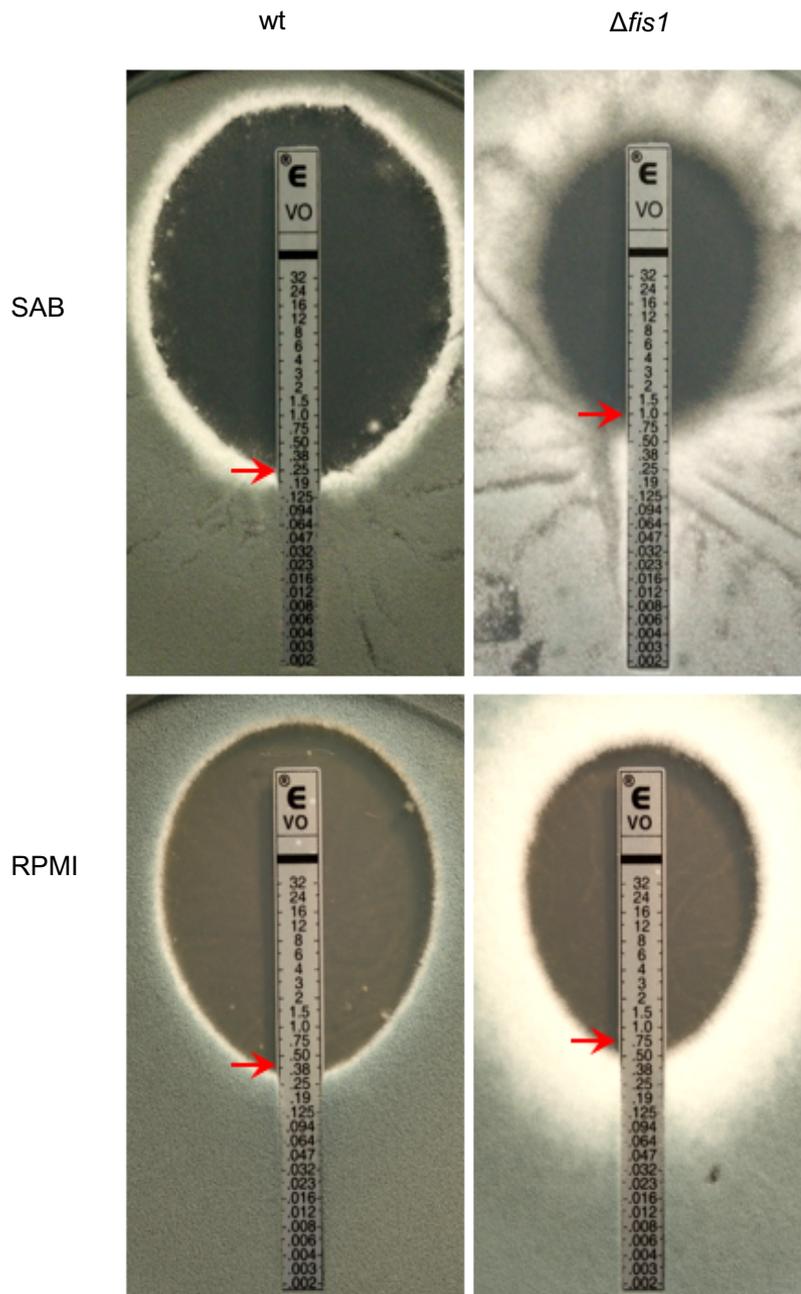


Abb. 8: Epsilometer-Tests von Voriconazol auf SAB- und RPMI-Platten zeigen eine erhöhte Azolresistenz der Deletionsmutanten. Pro Stamm wurden 1×10^6 Sporen gleichmäßig auf eine SAB-/RPMI-Platte ausgestrichen. Der entlang eines Konzentrationsgradienten mit Voriconazol beschichtete E-Teststreifen wurde vorsichtig in der Mitte der Platte platziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C wurde die minimale Hemmkonzentration auf der Platte abgelesen (rote Pfeilmarkierungen).

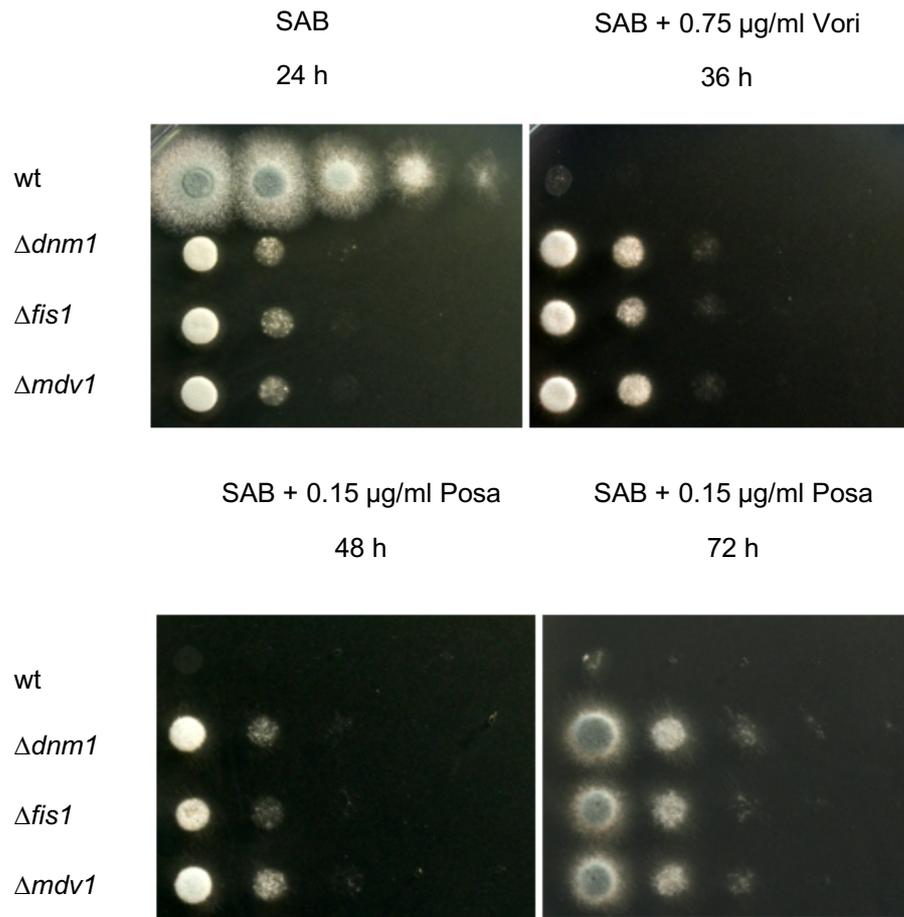


Abb. 9: Erhöhte Resistenz der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten gegenüber Voriconazol und Posaconazol zeigt sich auch auf Tüpfeltests. Für die Tüpfeltests wurden je 3 µl jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die SAB-Platte, supplementiert mit der jeweiligen Azolkonzentration (Voriconazol (Vori): 0,75 µg/ml; Posaconazol (Posa): 0,15 µg/ml) getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten Platten wurden bei 37 °C inkubiert und bei den SAB-Platten der Voriconazol-Versuchsreihe nach 24 h bzw. 36 h, bei den SAB-Platten der Posaconazol-Reihe bei 48 h bzw. 72 h fotografiert.

Tabelle 6: Durchschnitt der MICs von Voriconazol auf SAB- und RPMI-Medium. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden pro Well 1×10^4 Sporen in je 100 μ l Flüssigmedium (SAB und RPMI), supplementiert mit einer Verdünnungsreihe von Voriconazol bei 37°C für 48 h inkubiert und anschließend ausgewertet. Für jeden verwendeten Stamm wurden pro Experiment dreifache Versuchsansätze mitgeführt. Die Durchschnittswerte wurden aus sechs unabhängigen Versuchen berechnet.

Stamm	MIC in SAB-Medium, μg/ml (Konzentrations-Intervall)	MIC in RPMI-Medium, μg/ml (Konzentrations-Intervall)
wt	0,38 (0,30-0,53)	0,36 (0,30-0,53)
$\Delta dnm1$	1,00 (0,95-1,27)	0,75 (0,71-1,27)
$\Delta fis1$	1,00 (0,95-1,27)	0,75 (0,71-1,27)
$\Delta mdv1$	1,00 (0,95-1,27)	0,75 (0,71-1,27)

3.6 Voriconazol führt zum „Bonsai-Phänotyp“ der Hyphen und zur Fragmentierung der Mitochondrien

Nachdem der Konzentrationsbereich der MICs durch wiederholt reproduzierte Versuchsergebnisse für Voriconazol bestimmt werden konnte, sollte die Auswirkung von Voriconazol mikroskopisch untersucht werden. Hierzu wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte pro Well 500 Sporen vom wt und von den drei mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten in je 100 μ l SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 8 h inkubiert. Anschließend wurden Voriconazol-Konzentrationen entsprechend einer Verdünnungsreihe (angefangen bei 2 μ g/ml) hinzugegeben und die Platte bei 37°C für weitere 16 h inkubiert.

Danach wurde der Versuch mikroskopisch mit Hilfe eines inversen Mikroskops ausgewertet. In Abb. 10 sind die Wachstumsverhalten vom wt und $\Delta dnm1$ bei verschiedenen Voriconazol-Konzentrationen gegenübergestellt. Während bei der Negativkontrolle (kein Voriconazol) der wt lange Hyphen bildete, zeigte er bereits bei einer Voriconazol-Konzentration von 0,2 μ g/ml einen „bonsaiähnlichen“ Wachstumsphänotyp. Bei diesem Wachstumsphänotyp waren die Hyphen deutlich kürzer und an ihren Enden verdickt, ähnlich einem Bonsai-Baum. Diese „knollenartigen“ Verdickungen an den Enden entstanden durch nicht weiter ausgekeimte Hyphen. Um dies zu quantifizieren, erfolgte eine Einteilung nach dem Prozentanteil der Hyphen mit „Bonsai-Wachstum“. 90-100% der Hyphen vom Wildtyp zeigten bereits ab der Konzentration von 0,2 μ g/ml dieses veränderte Wachstum. Ab der Konzentration von 0,48

$\mu\text{g/ml}$ waren die Sporen des Wildtyp-Stammes nach der Auskeimung nicht weitergewachsen. Ebenso verhielt sich auch die Komplementante von $\Delta dnm1$. Der „Bonsai-Phänotyp“ ließ sich bei $\Delta dnm1$ erst ab der Konzentrationsstufe 0,36 $\mu\text{g/ml}$ beobachten. Zudem waren auch nur 1-10 % der Hyphen betroffen. Bei einer Konzentration von 0,48 $\mu\text{g/ml}$ zeigten schon 30-50% der Hyphen den gesuchten Phänotyp. Erst bei einer Voriconazol-Konzentration von 0,84 $\mu\text{g/ml}$ wurde ein Auskeimungsstopp der Sporen von $\Delta dnm1$ beobachtet.

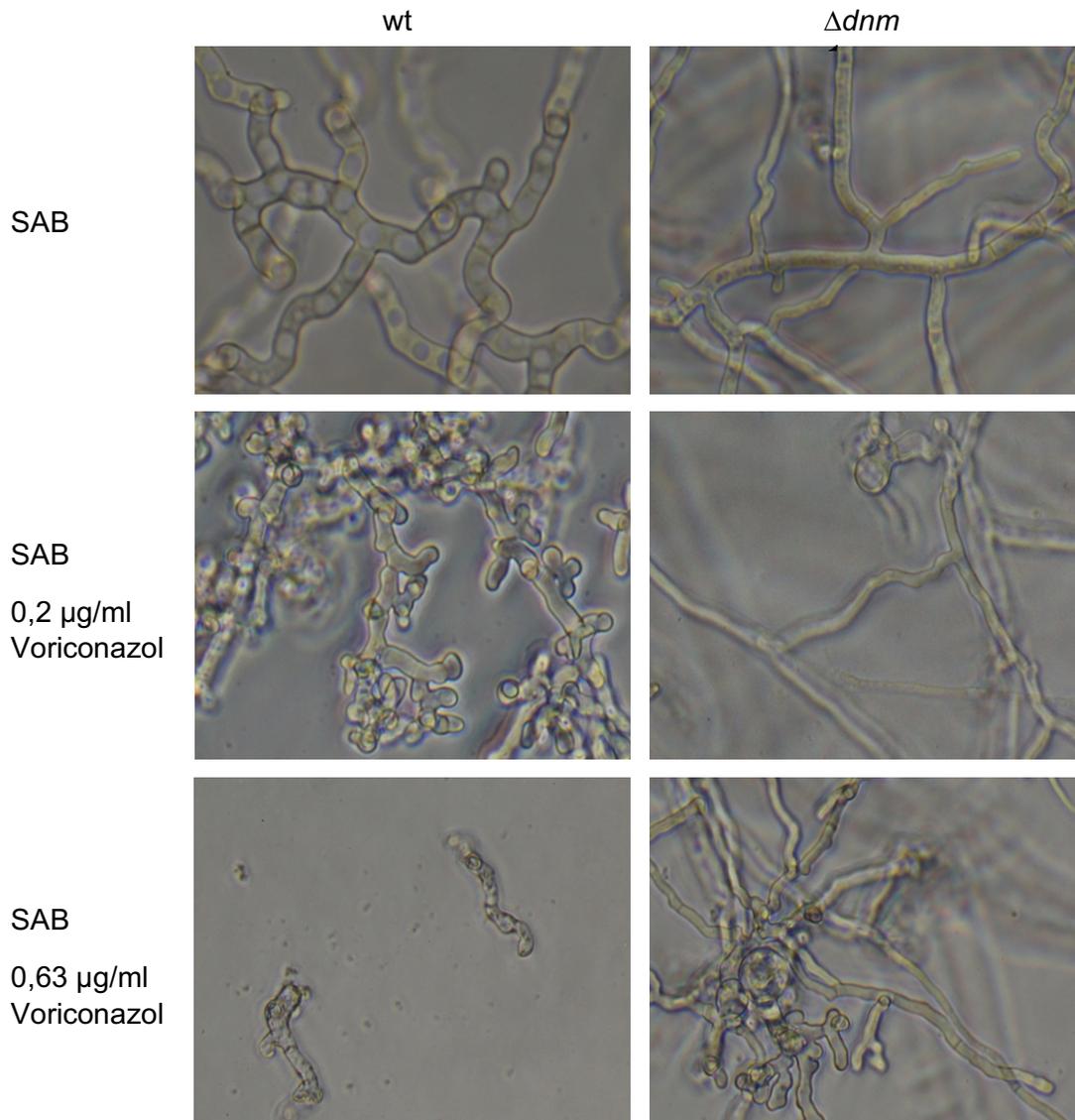


Abb. 10: Der Wildtyp zeigt bei geringeren Voriconazol-Konzentrationen einen „Bonsai-Wachstumsphänotyp“ im Vergleich zu $\Delta dnm1$. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden pro Well 500 Sporen in je 100 μl SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 8 h inkubiert. Nach 8 h wurde Voriconazol entsprechend einer 9-stufigen Verdünnungsreihe (in 3:4-Verdünnungen, beginnend mit 2 $\mu\text{g/ml}$) hinzugegeben und bei 37°C für weitere 16h inkubiert. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h wurde der Test ausgewertet und der „Bonsai-Wachstumstyp“ analysiert. Für jeden verwendeten Stamm wurden pro Experiment dreifache Versuchsansätze mitgeführt. Repräsentativ für die mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten wird hier $\Delta dnm1$ gezeigt.

Im Folgenden sollte der Einfluss von Voriconazol auf die mitochondriale Morphologie genauer untersucht werden. Die mtGFP-Stämme vom wt und der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten wurden in SAB-Flüssigmedium bei 37°C in Ibidi-Kammern für 10 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von Voriconazol hinzugegeben und wieder für weitere 10 Stunden inkubiert. Es wurde mittels Live-Cell-Mikroskopie auf Veränderungen des mitochondrialen Erscheinungsbildes untersucht. Da die MIC von Voriconazol beim Wildtyp laut der zuvor durchgeführten Mikrotiter-Tests bei 0,53 µg/ml lag, wurden Voriconazol-Konzentrationen unterhalb der MIC gewählt. Dabei fiel auf, dass beim Wildtyp bei einer Voriconazol-Konzentration von 0,3 µg/ml die lange, tubuläre Mitochondrienanordnung sich zu zahlreichen, fragmentierten Mitochondrienstrukturen umwandeln. Bei der noch höheren Voriconazol-Konzentration von 0,4 µg/ml bildeten die Mitochondrien kleine runde Strukturen. Bei einzelnen Hyphen konnte beobachtet werden, dass die Hyphen nach Bildung der kleinen Mitochondrienfragmente rupturierten und die mit mtGFP-markierten Mitochondrien in das extrazelluläre Medium gelangten (vgl. Abb. 11).

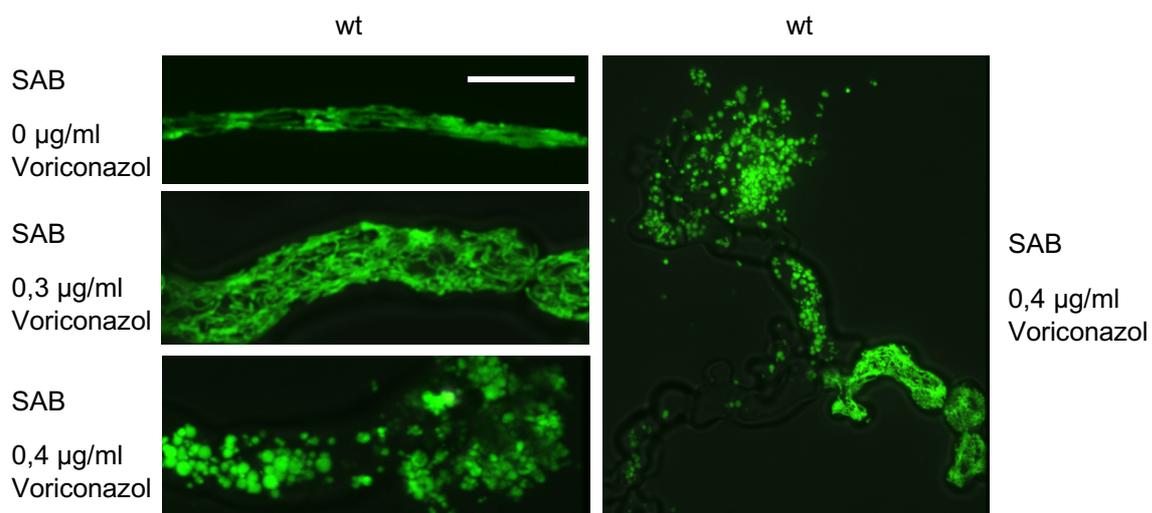


Abb. 11: Voriconazol führt zur Mitochondrienfragmentierung im Wildtyp. Die Sporen des mtGFP-exprimierenden Wildtyp-Stammes wurden in einer 8-Well-Ibidi-Kammer angesetzt. Pro Kammer wurden 1000 Sporen in 300 µl SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 11 h inkubiert. Es wurde dann Voriconazol hinzugegeben, so dass Endkonzentrationen von 0,3; 0,4 und 1,69 µg/ml erreicht wurden. Daraufhin erfolgte eine weitere Inkubationsphase bei 37°C für weitere 11 h. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie und einem Live-Cell-Imaging Systems analysiert. Der Messstabbalken repräsentiert 8 µm. Die Konzentration 1,69 µg/ml wird hier nicht gezeigt, da die Mitochondrienfragmentierung im Wildtyp bereits bei niedrigeren Konzentrationen einsetzt.

In einigen Hyphen verschwand das GFP-Signal nach der Fragmentation der Mitochondrien, was durch einen intrazellulären Abbau der Mitochondrien zu erklären wäre. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, blieb die Morphologie der Mitochondrien von $\Delta dnm1$ bei einer Voriconazol-Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ unverändert. Jedoch konnte man bei einer Konzentration von 1,69 $\mu\text{g/ml}$ Voriconazol ähnlich wie beim Wildtyp eine Fragmentierung des Mitochondriennetzes erkennen. Neben den großen runden Sphären, die charakteristisch in den Deletionsmutanten zu beobachten waren, lagen viele kleine Mitochondrienfraktionen vor.

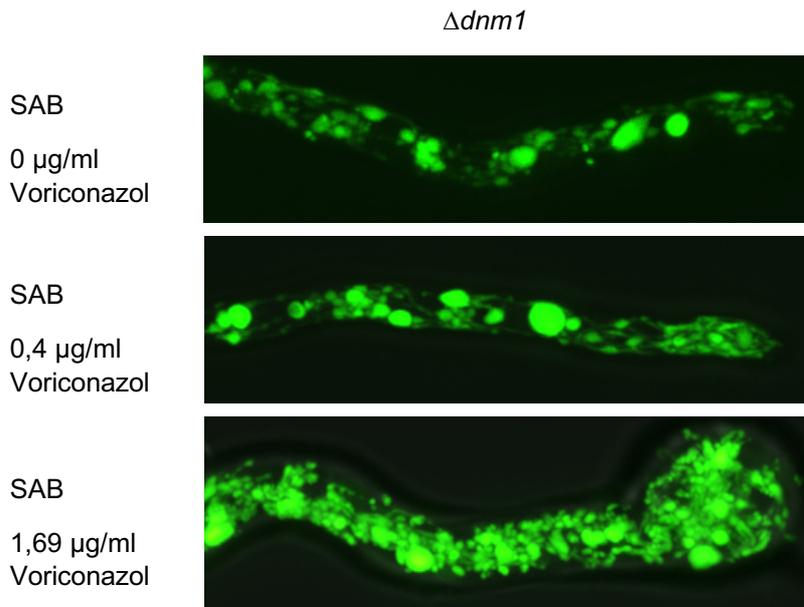


Abb. 12: Voriconazol führt erst bei höheren Konzentrationen zur Mitochondrienfragmentierung in $\Delta dnm1$. Die Sporen des mtGFP-exprimierenden $\Delta dnm1$ -Stammes wurden in einer 8-Well-ibidi-Kammer angesetzt. Pro Kammer wurden 1000 Sporen in 300 μl SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 11 h inkubiert. Es wurde dann Voriconazol hinzugegeben, so dass Endkonzentrationen von 0,3; 0,4 und 1,69 $\mu\text{g/ml}$ erreicht wurden. Daraufhin erfolgte eine weitere Inkubationsphase bei 37°C für weitere 11 h. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie und einem Live-Cell-Imaging Systems analysiert. Der Messstabbalken repräsentiert 8 μm .

3.7 Die *dnm1*-, *fis1*- und *mdv1*-Deletionsmutanten können die direkt zytotoxische Wirkung von Azol-Antimykotika teilweise inhibieren

Ein Angriffspunkt der Azole ist die Ergosterol-Biosynthese in *A. fumigatus*. Dies wird durch Hemmung des Cyp51-Proteins, der Lanosterol-14 α -Demethylase, erreicht. Hierunter kommt es zu einer Verminderung des Ergosterolgehalts mit Kumulierung der Vorprodukte, so dass es zu Veränderungen in Struktur und Funktion der Zellmembran kommt¹⁰⁶. Unsere Beobachtungen, dass die mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten eine höhere

Azolresistenz aufwiesen, führten uns zu der Annahme, dass Azole neben der Inhibition der Ergosterol-Biosynthese noch eine direkte zytotoxische Wirkung besitzen, die zu Desintegration der Mitochondrien führt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Mutanten *cyp51A_{tet^{on}}* und *cyp51A_{tet^{on}}* Δ *dnm1* genauer untersucht, die freundlicherweise von Mirjam Penka, B. Sc.-Studentin und Mitglied unserer Arbeitsgruppe, zur Verfügung gestellt wurden. Mit diesen Mutanten ließ sich die Expression von *cyp51A* durch Zugabe von Doxycyclin regulieren. Es wurden E-Tests mit Voriconazol auf SAB-Platten mit und ohne Supplementation von Doxycyclin durchgeführt. Abb. 13 zeigt, dass bei reprimierten Bedingungen (SAB-Medium ohne Doxycyclin-Zusatz) die MIC von Voriconazol bei *cyp51A_{tet^{on}}* deutlich vermindert war und bei 0,125 μ g/ml lag. Auf SAB-Medium mit 30 μ g/ml supplementiertem Doxycyclin erhöhte sich die MIC um zwei Konzentrationsstufen auf 0,25 μ g/ml. Betrachtete man die MIC von *cyp51A_{tet^{on}}* Δ *dnm1* unter reprimierten Bedingungen, so konnte die MIC durch gleichzeitige Deletion von *dnm1* wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben werden. Gemäß Abb. 13 betrug die MIC von *cyp51A_{tet^{on}}* Δ *dnm1* auf SAB demnach 0,50 μ g/ml. Anschließend wurde ebenfalls versucht die MIC von Voriconazol mit Hilfe des Mikrotiter-Tests zu bestimmen. Hierbei wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet wie bei den E-Tests (vgl. Tabelle 7).

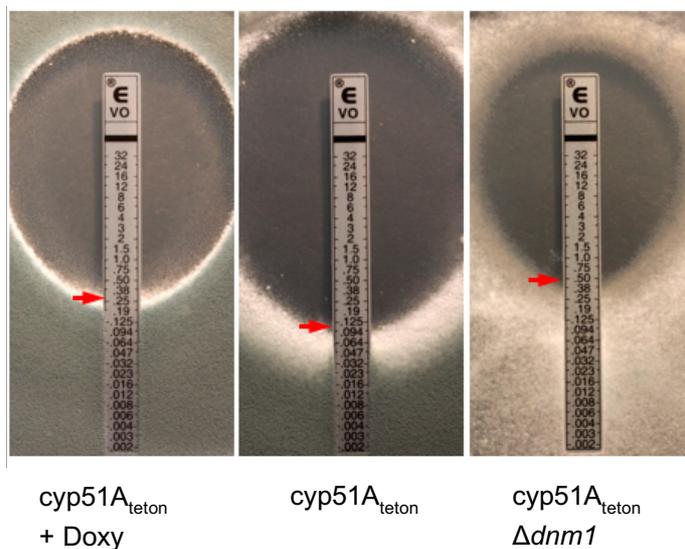


Abb. 13: Durch Deletion von *dnm1* kann die MIC von Voriconazol der konditionalen *cyp51A_{tet^{on}}*-Mutante unter reprimierten Bedingungen wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben werden. Pro Stamm wurden 1×10^6 Sporen gleichmäßig auf eine SAB-Platte ausgestrichen. Wenn angegeben, wurde das Medium mit 30 μ g/ml Doxycyclin supplementiert. Der entlang eines Konzentrationsgradienten mit Voriconazol beschichtete E-Teststreifen wurde vorsichtig in der Mitte der Platte platziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C wurde die minimale Hemmkonzentration auf der Platte abgelesen (rote Pfeilmarkierungen).

Tabelle 7: Durchschnittswerte der MICs von Voriconazol auf SAB-Medium mit und ohne Supplementation von Doxycyclin. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden pro Well 1×10^4 Sporen in je 100 μ l SAB-Flüssigmedium (mit und ohne Doxycyclin), supplementiert mit einer Verdünnungsreihe von Voriconazol, bei 37°C für 48 h inkubiert und anschließend ausgewertet. Für jeden verwendeten Stamm wurden pro Experiment dreifache Versuchsansätze mitgeführt. Die Durchschnittswerte wurden aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Stamm	MIC in SAB-Medium ohne Doxy, μg/ml (Konzentrations-Intervall)	MIC in SAB-Medium + 30μg Doxy, μg/ml (Konzentrations-Intervall)
wt	0,40 (0,40)	0,49 (0,40-0,53)
$\Delta dnm1$	1,06 (0,95-1,27)	1,16 (0,95-1,27)
<i>cyp51A_{tet on}</i>	0,17 (0,17)	0,40 (0,40)
<i>cyp51A_{tet on} $\Delta dnm1$</i>	0,25 (0,23-0,30)	0,53 (0,53)

3.8 Die konditionelle Mutante *mgm1_{pkiAtet on}* mit einem verbesserten Promotor-Konstrukt

Zur Herstellung der konditionellen Mutante *mgm1_{pkiAtet on}* wurde zunächst der Expressionsvektor pYZ002 hergestellt. Dieser ist ein Derivat von pJW123, der aus dem Austausch des *gpdA*-Promotors mit dem *pkiA*-Promotors aus *Aspergillus niger* resultierte. Beim zuvor häufig verwendeten *gpdA*-Promotor wurde festgestellt, dass der Promotor aufgrund einer repetitiven Sequenz im Downstream-Bereich des TetOn-Promotors mittels homologer Rekombination direkt vor das Gen integrieren konnte, so dass es nach Transformation in den *Aspergillus*-Stamm zum Auftreten von Revertanten kommen konnte, die sich durch eine konstitutive Expression des Gens auszeichneten¹⁰⁷. Aus diesem Grund sollte der neue *pkiA*-Promotor evaluiert werden. Hierzu wurde erst die konditionelle Mutante *rho1_{pkiAtet on}* kloniert, da bereits eine *rho1_{gpdAtet on}*-Mutante vorlag, und diese beiden miteinander verglichen. Rho1 ist eine essentielle Rho-GTPase, die Bestandteil des Zellwandintegritätssignalweges ist¹⁰⁸.

Diese Signalkaskade wird durch verschiedene Stressoren, wie erhöhte Temperaturen oder Zellwandstressoren wie Kalkofluorweiß und Kongorot in Gang gesetzt. Rho1 vermittelt hierbei die Aktivierung von MpkA (mitogen activated protein kinase), einer MAP-Kinase, die für weitere Regulation und Modulation der Zellwand zuständig ist¹⁰⁹. Um mit der für den *pkiA*-Promotor

günstigsten Doxycyclin-Konzentration arbeiten zu können, musste zunächst untersucht werden, bei welcher Konzentration das Wachstumsverhalten der konditionellen Mutante wildtypähnlich war. Dazu wurde eine 24-Well-Platte mit AMM-Agar mit einem aufsteigenden Doxycyclin-Gradienten begossen. Abb. 14 zeigt das Wachstum der konditionellen *rho1*-Mutanten mit dem *pkiA*-Promotor und dem *gpdA*-Promotor. Die *rho1_{pkiAteton}*-Mutante zeigte bereits bei einer Doxycyclin-Konzentration von 0,25 µg/ml Wachstum und bei einer Doxycyclin-Konzentration von 0,5 µg/ml glich das Wachstum bereits dem des Wildtyps. Die *rho1_{gpdAteton}*-Mutante zeigte erst eine Konzentrationsstufe später Wachstum und erreichte erst ab einer Doxycyclin-Konzentration von 1,5 µg/ml dem Wildtyp-Wachstum.

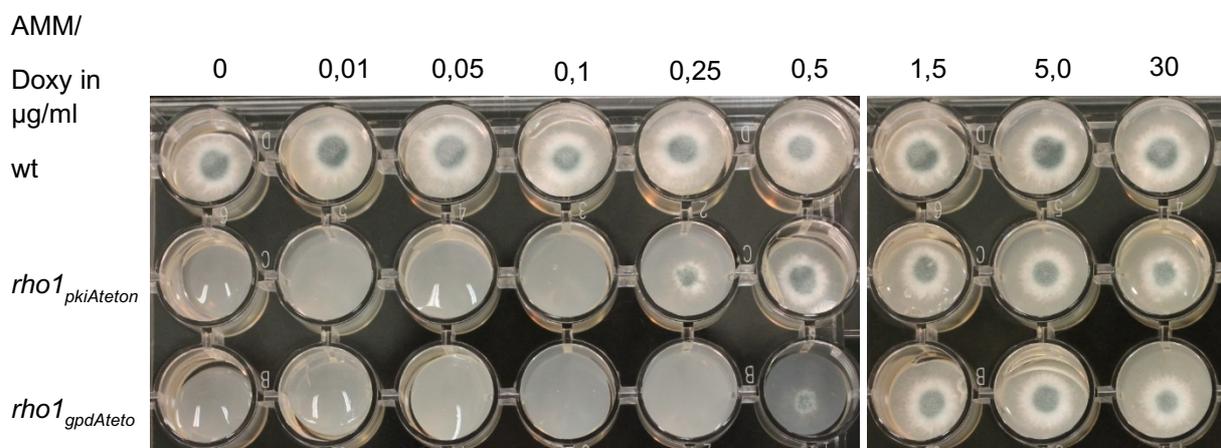


Abb. 14: Vergleich der Doxycyclinkonzentrationen für die konditionellen *rho1*-Mutanten mit dem *pkiA*-Promotor und *gpdA*-Promotor. In 24-Well-Platten wurden pro Well 5×10^3 Sporen in je 1 ml AMM-Agar mit aufsteigender Doxycyclin-Konzentration (0-30 µl/ml) bei 37°C für 24h inkubiert.

3.9 Die Herstellung einer Doppelmutante $\Delta dnm1$ *mgm1_{pkiAteton}*

Mgm1 ist ein Protein, welches an der mitochondrialen Fusion beteiligt und für *A. fumigatus* essenziell ist. Aus diesem Grund wurde zunächst eine konditionelle *mgm1*-Mutante hergestellt. Durch Transformation des *mgm1_{pkiAteton}*-Konstruktes in die $\Delta dnm1$ -Mutante entstand eine Doppelmutante, die in Abwesenheit von Doxycyclin sowohl einen Defekt in der mitochondrialen Fission als auch in der Fusion besitzt. In Anwesenheit von Doxycyclin wird *mgm1* exprimiert und die Doppelmutante sollte sich wie die Deletionsmutante $\Delta dnm1$ verhalten.

3.9.1 Die reduzierte Expression von *mgm1* verbessert die Sporulation der *dnm1*- Deletionsmutante

Interessanterweise konnte in Tüpfeltests beobachtet werden, dass bei gleichzeitigem Defekt in mitochondrialer Fission und Fusion es wieder zu einer besseren Sporulation und einem besseren Wachstum der Doppelmutante kam. Die Vorversuche hierzu wurden bereits von Michael Neubauer durchgeführt. In unseren Versuchen zeigte sich, dass das Wachstum der Doppelmutante auf SAB-Medium eingeschränkter war als auf AMM und nicht Wildtyp-Niveau erreichte. Jedoch war das Wachstum und die Sporulation auf AMM und SAB nicht so stark beeinträchtigt wie bei den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten (vgl. Abb. 15).

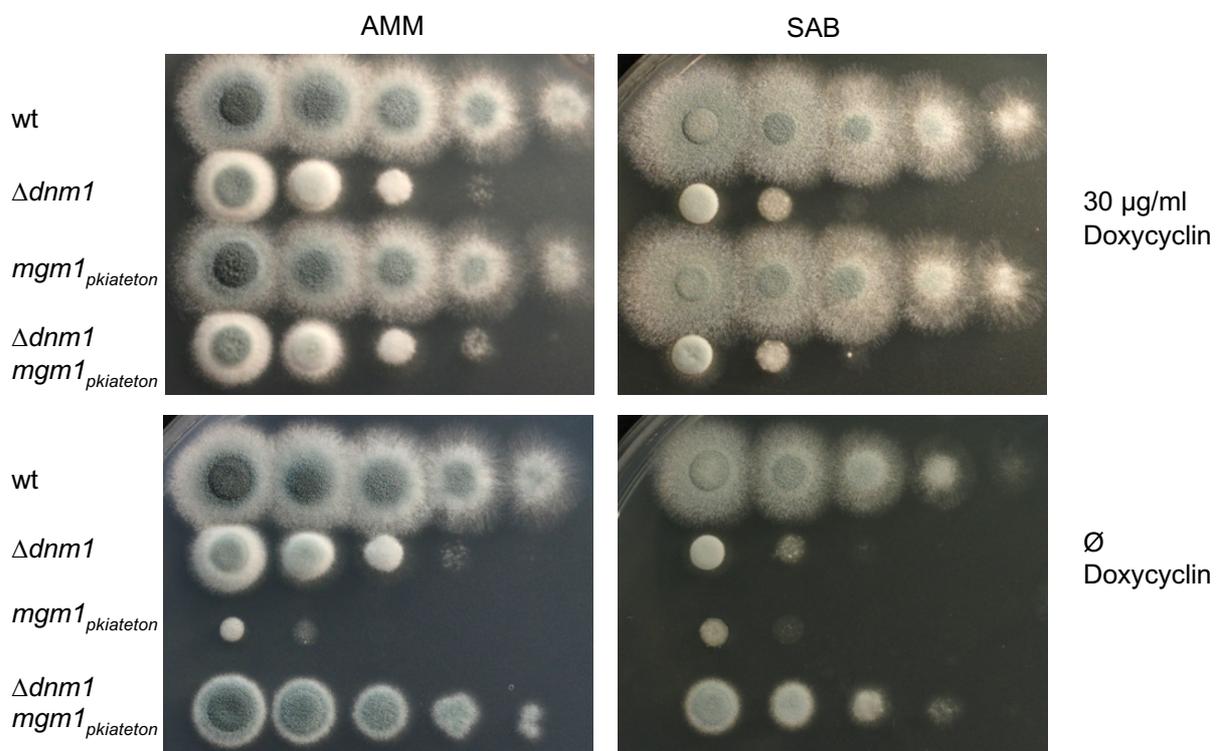


Abb. 15: Die Sporulation der Doppelmutante $\Delta dnm1$ *mgm1*_{pkAtet} ist abhängig von der Expression von *mgm1*. Für die Tüpfeltests wurden je 3 μ l jeder Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe auf die AMM-/SAB-Platte getüpfelt. Eine Verdünnungsreihe bestand aus den Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Sporen/ml. Die betüpfelten Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 36 h fotografiert.

3.9.2 Die Mitochondrienmorphologie der Doppelmutante $\Delta dnm1$

mgm1_{pkiAteton}

Es sollte untersucht werden, ob durch das gleichzeitige Ausschalten der mitochondrialen Fissions- und Fusionsmaschinerie wieder ein Gleichgewicht zwischen den mitochondrialen Teilungs- und Fusionierungsprozessen hergestellt wurde. Dies führte zu der Annahme, dass die mitochondriale Morphologie wildtypähnlich aussehen müsste. Um dies zu bestätigen, wurde ein mtGFP-Stamm der Doppelmutante $\Delta dnm1$ *mgm1_{pkiAteton}* hergestellt, um unter Verwendung konfokaler Live-Cell-Mikroskopie die Mitochondrienstruktur in den Hyphen zu beobachten. Hierbei stellte sich heraus, dass die Morphologie der Mitochondrien nicht dem Wildtyp glichen, sondern aus einem Mischbild zwischen der $\Delta dnm1$ -Mutante und *mgm1_{pkiAteton}* bestand. Wie Abb. 16 zeigt, konnte in der Doppelmutante nicht das für den Wildtyp charakteristische tubuläre Netzwerk wiederhergestellt werden. Stattdessen befanden sich die Mitochondrien in einem heterogenen Bild mit teils klein fragmentierten Bündeln und teils langen, tubulären Vernetzungen. Auch die für die mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten typischen großen runden Sphären waren hier zu finden, wenn auch in deutlich reduzierter Form.

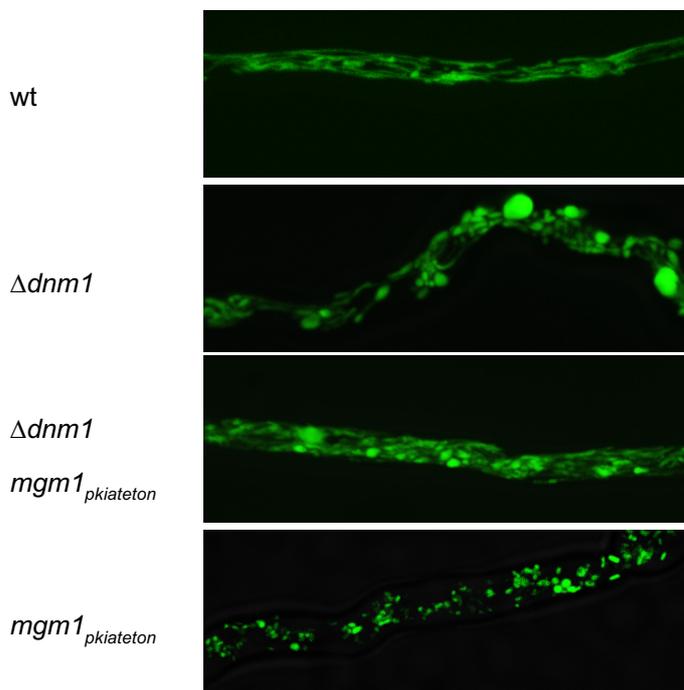
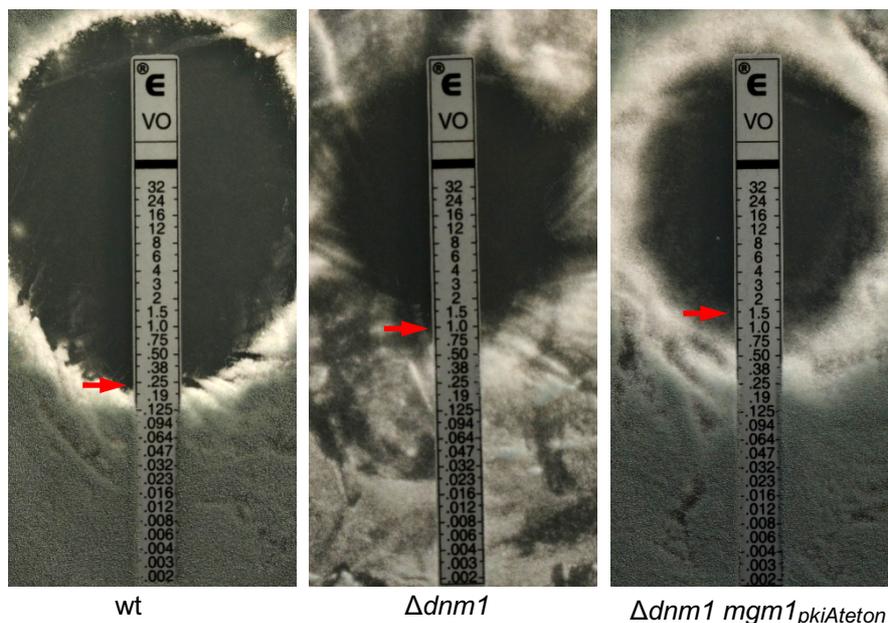


Abb. 16: Darstellung der Mitochondrien-Morphologie der Doppelmutante $\Delta dnm1$ *mgm1_{pkiAteton}* mittels mtGFP. Die Sporen der mtGFP-Stämme wurden in einer 8-Well-ibidi-Kammer angesetzt. Pro Kammer wurden 1000 Sporen in 300 μ l AMM-Flüssigmedium bei 37°C für 13 h inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie und einem Live-Cell-Imaging Systems analysiert. Der Messstabbalken repräsentiert 8 μ m.

3.9.3 Die Resistenz der Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$ gegenüber Azol-Antimykotika ist erhöht

Bei der erhöhten Azolresistenz der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten blieb es ungeklärt, ob diese eventuell durch das langsamere Wachstum der mitochondrialen Fissionsmutanten bedingt ist. Mithilfe der Doppelmutante konnte dies nun untersucht werden, da bei ihr die Wachstumsbeeinträchtigung wesentlich geringer war. Gemäß Abb. 17 betrug die MIC von Voriconazol im E-Test bei der Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$ auf SAB-Medium ohne Doxycyclin 1,5 $\mu\text{g/ml}$ und lag damit noch höher als bei $\Delta dnm1$ (1,0 $\mu\text{g/ml}$). Mithilfe der Mikrodilutionsmethode sollte die MIC für Voriconazol in SAB- und RPMI-Medium noch genauer untersucht werden. Hier zeigte die Doppelmutante ebenfalls eine höhere Azolresistenz im Vergleich zum Wildtyp und zu der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutante $\Delta dnm1$ (vgl. Tabelle 8). Damit konnte gezeigt werden, dass die Azolresistenz nicht durch das langsame Wachstum der Deletionsmutanten bedingt war, sondern tatsächlich auf eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Dynamik zurückzuführen ist.

Abb. 17: Erhöhte Azolresistenz der Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$.



Pro Stamm wurden 1×10^6 Sporen gleichmäßig auf eine SAB-Platte ohne Doxycyclin ausgestrichen. Der entlang eines Konzentrationsgradienten mit Voriconazol beschichtete E-Teststreifen wurde vorsichtig in der Mitte der Platte platziert. Nach einer Inkubationszeit von 48h bei 37°C wurde die minimale Hemmkonzentration auf der Platte abgelesen werden (rote Pfeilmarkierungen).

Tabelle 8: Durchschnitt der MICs von Voriconazol auf SAB- und RPMI-Medium. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden pro Well 1×10^4 Sporen/ml in je 100 μl Flüssigmedium (SAB und RPMI),

supplementiert mit einer Verdünnungsreihe von Voriconazol, bei 37°C für 48 h inkubiert und anschließend ausgewertet. Für jeden verwendeten Stamm wurden pro Experiment dreifache Versuchsansätze mitgeführt. Die Durchschnittswerte wurden aus sechs unabhängigen Versuchen berechnet.

Stamm	MIC in SAB-Medium, µg/ml (Konzentrations-Intervall)	MIC in RPMI-Medium, µg/ml (Konzentrations-Intervall)
wt	0,38 (0,30-0,53)	0,36 (0,30-0,53)
$\Delta dnm1$	1,00 (0,95-1,27)	0,75 (0,71-1,27)
$\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$	2,50 (2,25-3,0)	1,55 (1,27-1,69)

Um diesen Phänotyp genauer mikroskopisch zu analysieren, wurde wieder das Live-Cell-Imaging System zu Hilfe genommen. In Abb. 18 werden die Mitochondrien-Morphologien des Wildtyps, der $\Delta dnm1$ -Mutante und der Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$ gegenübergestellt. Während die Mitochondrien des Wildtyps bei einer Voriconazol-Konzentration von 0,53 µg/ml in SAB-Medium alle fragmentierten, behielten die Deletionsmutante und die Doppelmutante ihre Mitochondrienstruktur weiter bei. Es zeigten sich die im Kapitel 3.4 beschriebenen kugeligen Mitochondrienkonglomerate neben dem tubulären Mitochondriennetzwerk in der $\Delta dnm1$ -Mutante und der Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$.

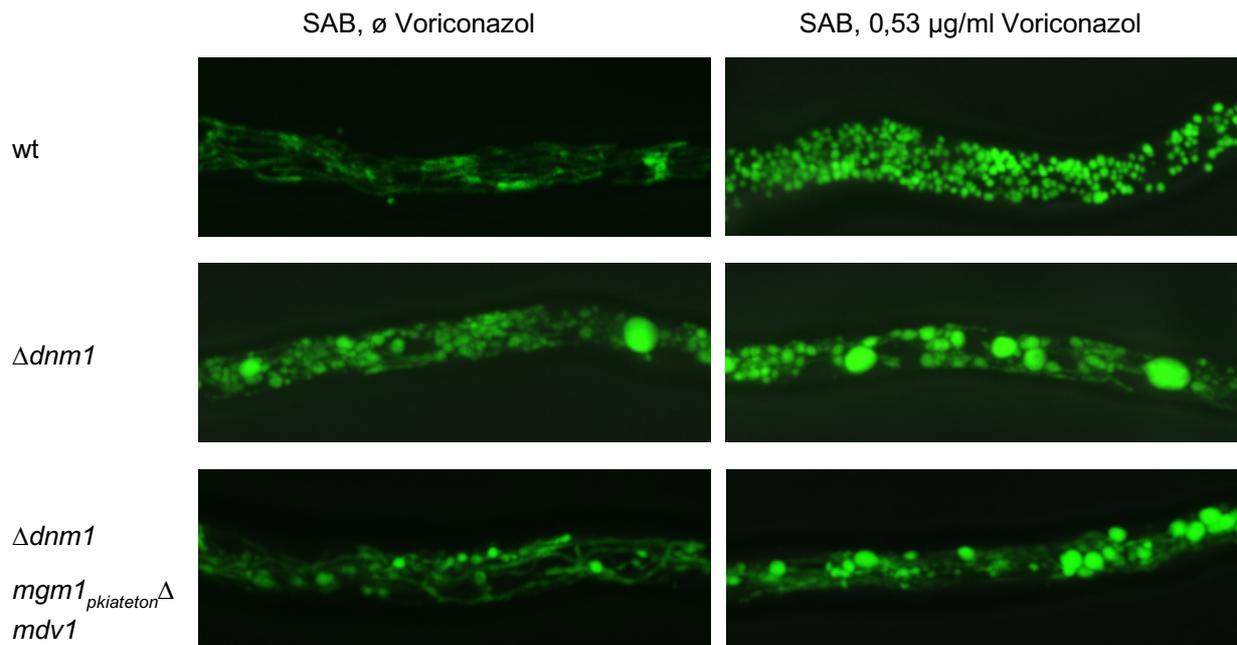


Abb. 18: Voriconazol führt erst bei höheren Konzentrationen zur Mitochondrienfragmentierung in $\Delta dnm1$ und $\Delta dnm1 mgm1_{pkiAteton}$. Die Sporen wurden in einer 8-Well-Ibidi-Kammer angesetzt. Pro Kammer wurden 1000 Sporen in 300 μl SAB-Flüssigmedium bei 37°C für 11 h inkubiert. Es wurde dann Voriconazol hinzugegeben, so dass Endkonzentrationen von 0,53 $\mu\text{g/ml}$ erreicht wurden. Daraufhin erfolgte eine weitere Inkubationsphase bei 37°C für weitere 11 h. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie und einem Live-Cell-Imaging Systems analysiert. Der Messstabbalken repräsentiert 8 μm .

3.10 Mgm1 beeinflusst die Virulenz von *A. fumigatus* im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Der Einfluss der mitochondrialen Dynamik auf die Virulenz des Pilzes wurde in Zusammenarbeit mit Michael Neubauer, einem weiteren Doktoranden unserer Arbeitsgruppe, untersucht. Dabei wurden die Infektionsexperimente mit *Galleria mellonella* von Michael Neubauer durchgeführt. Hierbei wurden *G. mellonella* mit verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen injiziert. In Abb. 19 wird die kumulative Überlebensrate der *G. mellonella*-Larven nach Inokulation mit dem jeweiligem *Aspergillus*-Stamm abgebildet. Als Negativkontrollen wurden eine Gruppe, die nicht behandelt wurden und eine, die mit ddH₂O inokuliert wurden, mitgeführt. Hier zeigte sich, dass die Larven, die mit dem $mgm1_{pkiAteton}$ -Stamm unter supprimierten Bedingungen injiziert wurden, eine gute Überlebensrate zeigten, vergleichbar mit den Negativkontrollen. Bei fehlender Expression von *mgm1* ist *A. fumigatus* avirulent. Die höchste Virulenz im Infektionsmodell zeigte der Wildtyp-Stamm. Die Larven, die mit dem

Wildtyp (wt) injiziert wurden, zeigten die niedrigste Überlebensrate. Auch Larven, die mit dem $\Delta dnm1$ -Stamm injiziert wurden, zeigten eine schlechte Überlebensrate im Vergleich zur Negativkontrolle. Wurden das kumulative Überleben der $\Delta dnm1$ -Larven mit dem der Wildtyp-Larven verglichen, so zeigte sich eine signifikant bessere Überlebensrate für die $\Delta dnm1$ -Larven ($p=0,0062$). Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gesamtüberleben von $\Delta dnm1$ -Larven im Vergleich zu $dnm1$ -Larven ($p=0,42$). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Larven und $dnm1$ -Larven ($p=0,071$), so dass anhand der vorliegenden Ergebnisse keine sichere Aussage möglich ist, ob die Deletion von $dnm1$ zu einer signifikanten Verringerung der Virulenz von *A. fumigatus* führt. Interessant ist die Beobachtung, dass sowohl $\Delta dnm1$ - als auch $dnm1$ -Mutanten trotz reduzierten radialen Wachstums und geringerer Sporulation in vitro (vgl. Abb. 2) nur eine leicht geringere Virulenz aufzeigen als der Wildtyp.

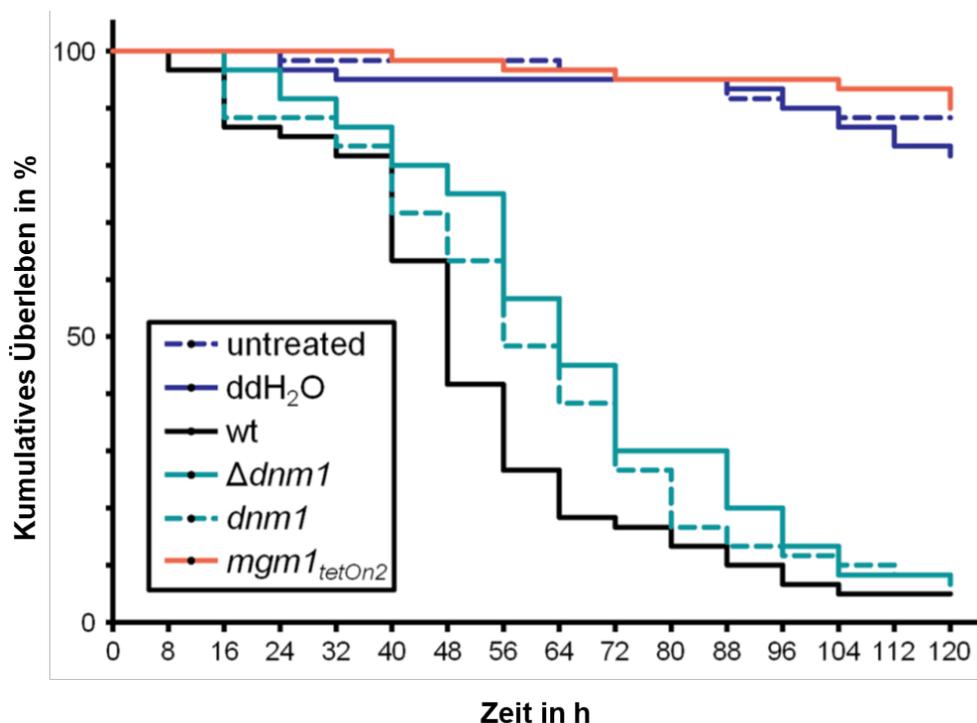


Abb. 19: Die mitochondriale Fusion beeinflusst die Virulenz von *A. fumigatus*.

Das kumulative Überleben in Prozent der *G. mellonella*-Larven (je 60 Larven pro Kondition) wurde über die Inkubationszeit bis zu 120 h aufgetragen. Die Larven wurden mit Konidien der jeweiligen *Aspergillus*-Stämme injiziert. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Larven mit 5×10^5 Konidien, die in je 10 μ l destilliertes Wasser (ddH₂O) resuspendiert wurden, injiziert. Als Negativkontrolle wurde nur ddH₂O injiziert sowie eine Vergleichsgruppe ohne jegliche Behandlung mitgeführt. Der $mgm1_{tetOn2}$ -Stamm ($mgm1_{pkiAteton}$) wurde unter reprimierten Bedingungen inokuliert. Die Larven wurden nach der Injektion bei 37°C inkubiert und alle 8 Stunden untersucht. Das gezeigte Infektionsexperiment wurde von Michael Neubauer durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 Störung der mitochondrialen Dynamik führt zur Beeinträchtigung des Wachstums und der Sporulation

Nach erfolgreicher Herstellung der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten in *A. fumigatus* wurde ihr Wachstumsverhalten untersucht. In der Literatur ist beschrieben, dass in *S. cerevisiae* kein veränderter Wachstumsphänotyp von $\Delta dnm1$ festgestellt werden konnte¹¹⁰. In dieser Forschungsarbeit wurde aber gezeigt, dass bei allen drei Deletionsmutanten der mitochondrialen Fissionsmaschinerie eine deutliche Wachstumseinschränkung und verminderte Sporulation zu beobachten war. Dieser Phänotyp könnte auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen sein. Eine wichtige Funktion der Mitochondrien stellt unter anderem die ATP-Synthese über die Atmungskette dar¹¹¹. Im Schimmelpilz *N. crassa* wurde festgestellt, dass die Sporulation vom Cytochrom *c*-vermittelten Elektronentransport abhängig ist. Durch Zugabe von Cyanid, einem Cytochrom-*c*-Oxidase-Inhibitor, in das Medium kam es zu einem kompletten Auskeimungsstopp der Wildtypsporen von *N. crassa*¹¹². Zur Untersuchung der Funktion der Atmungskette in *A. fumigatus* wurde die Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) im Wildtyp und in den Deletionsmutanten gemessen (die Daten wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt)¹¹³. Im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementation mutante *dnm1* zeigten $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ eine niedrigere Aktivität von Komplex IV¹¹³. Dies lässt vermuten, dass durch die Störung des Gleichgewichts der mitochondrialen Dynamik es ebenfalls zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien kommt, die phänotypisch durch ein verringertes Wachstum auffällig wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in humanen HeLa-Zellen beobachtet, die durch siRNA eine reduzierte Expression von Drp1 zeigten¹¹⁴. Für die Bäckerhefe wurde beschrieben, dass zwar die mitochondriale Fission nicht essenziell für die Sporulation sei, es aber dennoch die Lebensfähigkeit der neu gebildeten Sporen beeinflussen würde¹⁰⁵. Durch eine ungleiche Weitervererbung der Mitochondrien würden 10-20% der Fissionsmutanten Tetraden bilden, die teilweise gar keine Mitochondrien beinhalten würden¹⁰⁵. Dies konnte in dieser Arbeit für *A. fumigatus* allerdings nicht gezeigt werden. Im Auszählversuch (vgl. Abb. 3) unterschieden sich die Anzahl der mtGFP-positiven Sporen zwischen wt und mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten nicht signifikant voneinander. Beim wt waren 99,0% der Sporen mtGFP-positiv, während bei $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ sogar 99,3% bzw. 99,7% der Sporen mtGFP-Signale aufzeigten. Bei $\Delta mdv1$ wurden 96,3% der Sporen mit mtGFP gezählt. Dieser gering abweichende Wert ist vermutlich auf das gewählte Zählfeld zurückzuführen, da beim Nachkontrollversuch wieder angleichende Werte gezählt wurden (nicht gezeigt). Aus den

Ergebnissen lässt sich schließen, dass die mitochondriale Fission anders als bei *S. cerevisiae* keine Auswirkung auf die ordnungsgemäße Vererbung der Mitochondrien hat.

4.2 Beeinträchtigte Stressadaption durch Defekte in der mitochondrialen Fission

Aus den Versuchsergebnissen lässt sich die These formulieren, dass durch die Beeinträchtigung der mitochondrialen Fission die betroffenen Deletionsstämme bereits unter optimalen Bedingungen schlechter wachsen. Auf Stressfaktoren, wie Hitzestress und erhöhter Metabolismus durch Wachstum auf Komplexmedium, weisen die Deletionsmutanten der mitochondrialen Fission in *A. fumigatus* eine höhere Beeinträchtigung auf als der Wildtyp. In der Literatur sind Uneinigigkeiten über die Rolle der mitochondrialen Dynamik in der Stressadaption von *S. cerevisiae* zu finden. Einige Gruppen berichten, dass sich die mitochondriale Dynamik unter Stressbedingungen zur mitochondrialen Fission verlagert, da die Mitochondrien in der fragmentierten Form resistenter gegenüber Stresseinflüsse seien. So könnten sich einzelne Mitochondrien-Kompartimente durch Abtrennung zum mitochondrialen Netzwerk besser vor einem möglichen Schaden schützen¹¹⁵. Andere wiederum argumentieren damit, dass die Verschiebung des Gleichgewichts zur mitochondrialen Fusion hin bei hohem Energiebedarf unter Stressbedingungen vorteilhaft sei. Die Zunahme der Mitochondrienvernetzung durch die Fusion der Kompartimente führe zur Stabilisierung des Membranpotentials und zur Maximierung der ATP-Synthese. So komme es durch äußere Stresseinwirkung zu „hyperfusionierten“ Mitochondrien⁶⁴. Die mitochondriale Fusion erlaube nicht nur die Erhaltung gesunder Mitochondrien durch Komplementation der mutierten Gene, sondern ermögliche gleichzeitig auch den Austausch von Lipiden und Proteinen. Dadurch sei eine größtmögliche oxidative Kapazität der Mitochondrien gewährleistet⁵¹. Für die mitochondriale Dynamik in Säugetieren wurde beschrieben, dass diese eine wichtige Funktion in der Anpassung der bioenergetischen Effizienz übernehme und Energiebedarf und Nahrungsangebot über Anpassung der ATP-Synthese regelt¹¹⁶.

Bei unseren Wachstumsversuchen zeigten die Fissionsdeletionsmutanten in *A. fumigatus* eine noch deutlichere Wachstumseinschränkung auf Komplexmedien wie SAB-Medium oder Blut-Medium. Diese Komplexmedien beinhalten beide Peptone, welche aus enzymatischen Verdauungsprodukten von Casein und tierischem Gewebe bestehen und als Quelle von Aminosäuren und Stickstoff das Wachstum fördern sollen. Außerdem beträgt die Glukose-Konzentration im SAB-Medium 4% (w/v) und ist damit höher als das 1-prozentige (w/v) Minimalmedium. Anhand der Tüpfelversuche mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen

ließ sich allerdings kein Einfluss höherer Glukose-Konzentrationen auf das Wachstum der mitochondrialen Deletionsmutanten oder des Wildtyps beobachten. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass Mitochondrien von Säugetierzellen in Anwesenheit von hohen Glukose-Konzentrationen fragmentieren und vermehrt ROS produzieren würden ¹¹⁷. Das Überangebot von Nährstoffen führe zu einer Zunahme der Mitochondriendurchmesser und einem vermehrten Anfall toxischer Metabolite. Als Schutzmechanismus käme es zur Fragmentation der Mitochondrien ¹¹⁶. Mittels Live-Cell-Mikroskopie ließen sich tatsächlich eine Zunahme der ballonartigen Mitochondrien in Hyphen finden, die in SAB-Medium kultiviert wurden. Das schlechte Wachstum der Deletionsmutanten vor allem auf Komplexmedien lässt sich wahrscheinlich damit erklären, dass sich, ähnlich wie in der Literatur beschrieben, je nach Nahrungsangebot und Metabolismus die Zellen durch Veränderung der mitochondrialen Dynamik den bioenergetischen Anforderungen anpassen. Unabhängig davon, ob nun lang vernetzte oder in viele Kompartimente geteilte Mitochondrien resistenter gegenüber Stressfaktoren sind, lässt sich zumindest sagen, dass die mitochondriale Dynamik an sich eine wichtige Rolle in der Stressadaption spielt. Durch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Fission ist das Gleichgewicht der mitochondrialen Dynamik gestört und somit kommt es nicht zum gewünschten Anpassungsverhalten.

4.3 Mitochondriale Fissionsproteine nehmen Einfluss auf die Mitochondrien-Morphologie

Die Mitochondrien befinden sich im ständigen Fluss der Teilung und Verschmelzung, die sogenannte mitochondriale Dynamik ⁶³. Diese spielt eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung der mitochondrialen Morphologie. Um diese genauer untersuchen zu können, wurde die Live-Cell-Mikroskopie angewandt. Dazu wurden die Mitochondrien mit GFP markiert und durch Anregung mit einem Laser sichtbar gemacht. Diese Methode wurde auch schon bei *S. cerevisiae* angewendet. Für die Bäckerhefe wurde bereits beschrieben, dass die Mitochondrien des Wildtyps ein tubuläres Netzwerk mit vielen Verzweigungen bilden ¹¹⁸. Betrachtete man die mitochondriale Fusionsdeletionsmutante $\Delta fzo1$, bei der durch einen Defekt in der mitochondrialen Fusion die mitochondriale Dynamik in Richtung Fission verlagert ist, fanden sich zahlreiche fragmentierte Mitochondrien-Kompartimente ¹¹⁹. Andersherum verhielt es sich bei $\Delta dnm1$. Hier überwogen lange, vernetzte Mitochondrien, die wenige Verzweigungen aufwiesen. Außerdem kollabierten die Mitochondrien in der Fissionsdeletionsmutante $\Delta dnm1$ in *S. cerevisiae* zur Seite und formten Mitochondrienetze

¹²⁰.

Ähnliche Erscheinungsbilder der Mitochondrien konnten wir auch in *A. fumigatus* beobachten. Während die Mitochondrien im Wildtyp-Stamm tubulär und teilweise miteinander vernetzt waren, zeigten die Mitochondrien in den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten neben langen Mitochondrientubuli auch unterschiedlich große sphärische Mitochondrien-Konglomerate.

In unserer Arbeitsgruppe wurde der Protein-Komplex ERMES (ER-mitochondria encounter structure) von *A. fumigatus* untersucht, welcher eine Verbindung zwischen dem endoplasmatischen Reticulum und den Mitochondrien herstellt¹²¹. Der Komplex besteht aus den Proteinen Mmm1 (maintenance of mitochondrial morphology), Mdm10, Mdm12 und Mdm34 (mitochondrial distribution and morphology). In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass durch den Kontakt zwischen Mitochondrien und dem ER verschiedene zelluläre Mechanismen reguliert werden. Hierunter gehört unter anderem der Phospholipidaustausch¹²². Mmm1 ist ein Protein in der mitochondrialen Außenmembran, welches maßgeblich zur Morphologie der Mitochondrien beiträgt¹²³. Mit einem transmembranen Segment reicht es mit dem C-Terminus bis zum Zytoplasma, während der N-Terminus Kontakt zur mitochondrialen Matrix erhält¹²⁴. Die Mdm-Proteine fassen eine Gruppe von Proteinen zusammen, die für den Erhalt der mitochondrialen Morphologie sowie für die Verteilung der Mitochondrien verantwortlich sind¹²⁵. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die konditionellen Mutanten von *mmm1*, *mdm10*, *mdm12* und *mdm34* unter reprimierten Bedingungen eine veränderte Mitochondrienmorphologie zeigten. Die Mitochondrien formierten sich zu großen, amorphen Konglomeraten, die teilweise nicht miteinander verbunden waren, ähnliche wie bei unseren mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten¹²¹.

In *S. cerevisiae* wurde nach essenziellen Genen gesucht, die an dem Erhalt der Mitochondrienmorphologie beteiligt sind. Die identifizierten Gene ließen sich insgesamt in fünf funktionelle Untergruppen unterteilen. Zusammenfassend kodierten die Gene für Proteine, die an der Ergosterol-Biosynthese, dem mitochondrialen Proteinimport, dem vesikulären Transport sowie der vesikulären Sekretion beteiligt sind oder Proteine, die mit dem Aktinzytoskelett oder dem Ubiquitin/ 26S Proteasom-abhängigen Proteinabbau assoziiert sind¹²⁶. Durch Störung des Lipidtransportes ändert sich die Zusammensetzung der mitochondrialen Membran. Dies könnte die Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie bei Deletion der betroffenen Gene der Mdm-Proteine erklären. In Säugetierzellen zeigte sich, dass das mitochondriale Fissionsprotein Drp1 auch an der Regulation des Lipidhaushaltes beteiligt ist¹²⁷. Es ist möglich, dass bei den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten aufgrund eines Ungleichgewichts der mitochondrialen Dynamik eine Störung des Lipidaustausches besteht und es daher ebenso zu einer veränderten Mitochondrienmorphologie kommt. Eine weitere Funktion des ERMES-Komplexes ist die

Kennzeichnung der Fissionsstellen für Dnm1. Zudem lagern sich ER-Tubuli an den Kontaktstellen um die Mitochondrien rum und verringern so durch Abschnüren den mitochondrialen Durchmesser vor der eigentlichen mitochondrialen Fissionsaktivität. Da die Durchmesser der Dnm1-Helices geringer sind als die der Mitochondrien, wird dadurch eine Fission der Mitochondrien deutlich erleichtert ⁷⁷. Bei Fehlen der Fissionsproteine entsteht eine Beeinträchtigung in der Interaktion zwischen ERMES und Dnm1. Durch Fehlen des Fissionsapparates kommt es nicht zur Teilung der Mitochondrien an den vormarkierten Stellen. Dies könnte auch die unregelmäßige Verteilung der Mitochondrien erklären. In den Fissionsdeletionsmutanten fand sich ein inhomogenes Bild mit lang vernetzten Mitochondrien, fragmentierten Mitochondrien sowie großen Mitochondrien-Konglomeraten.

4.4 Veränderungen in der mitochondrialen Dynamik führen zu einer erhöhten Azolresistenz

Zur Erstlinientherapie der invasiven Aspergillose gehören Triazole wie Voriconazol und Isavuconazol ^{128,129}, welche als Inhibitoren des Enzyms Lanosterin-Demethylase (14 α -Lanosterol-Demethylase) die Ergosterol-Biosynthese hemmen ¹³⁰. Das Enzym Lanosterin-Demethylase gehört zur Gruppe der Cytochrom P450-Proteine. Es katalysiert die Demethylierung von Lanosterin an der C 14-Position ¹⁰⁶. Die zunehmende Azolresistenz stellt eine große klinische Herausforderung dar und ist mit einer höheren Mortalität bei Patienten mit einer invasiven Aspergillose assoziiert ¹³¹⁻¹³³. Studien zeigen, dass die Azolresistenz in *A. fumigatus* nicht nur durch die klinische Verwendung von Triazolen, sondern auch durch den Einsatz von azolhaltigen Fungiziden in der Umwelt hervorgerufen wird ¹³⁴. In *A. fumigatus* wurden zwei homologe Gene gefunden, die für die Lanosterin-Demethylase kodieren: *cyp51A* und *cyp51B* ¹³⁵. Zwar zeigten sich Unterschiede in der Lipidzusammensetzung bei Deletion des jeweiligen Gens für Cyp51A oder Cyp51B, aber die Gene sind jeder für sich nicht essenziell für *A. fumigatus* ²⁹. Für den Mechanismus der Azolresistenz scheinen aber Mutationen in *cyp51A* maßgeblich beteiligt zu sein ^{136,137}. Mithilfe der konditionellen Doppelmutante *cyp51A_{tetOn} Δdnm1* konnten wir zeigen, dass sich die Voriconazolresistenz unter reprimierten Bedingungen von *cyp51A* durch eine gleichzeitige Deletion von *dnm1* wieder auf Wildtypniveau reduzieren ließ. Damit ließ sich ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Fission und der Ergosterol-Biosynthese bei der Entstehung der Azolresistenz vermuten. In der mitochondrialen Doppelmutante *Δdnm1 mgm1_{pkiAtetOn}* konnte in *A. fumigatus* eine Überexpression von *cyp51A* nachgewiesen werden. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Azolresistenz der Doppelmutante darstellen ¹³⁸. Jedoch zeigten auch Studien, dass ca. 50 % der azolresistenten *Aspergillus*-Stämme nicht auf eine Mutation im *cyp51A*-Gen

zurückzuführen sind¹³³. In *Candida albicans* wurde gezeigt, dass die Azolresistenz in Zusammenhang mit einer Überexpression von Efflux-Pumpen steht, die zu einer vermehrten Ausschwemmung des Azols aus der Pilzzelle führt¹³⁹. Zu dieser Gruppe von Efflux-Pumpen zählen die sogenannten ABC-Transporter (ATP binding cassette) und die Major-Faciliator-Superfamilie -Transporter (MFS)¹⁴⁰. Unsere Arbeitsgruppe konnte für *A. fumigatus* zeigen, dass die Expression von vielen ABC- und MFS-Transportern in Stämmen mit gestörter mitochondrialer Dynamik gesteigert ist¹³⁸. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die erhöhte Azolresistenz von den in dieser Arbeit untersuchten mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten sein. Um diese Theorie zu verifizieren, müssten jedoch weitere Untersuchungen dazu erfolgen.

4.5 Die Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$

Zur Untersuchung der Funktion der mitochondrialen Fusion wurde eine konditionelle *mgm1*-Mutante hergestellt. Unter reprimierten Bedingungen kam es zu keiner Auskeimung des Pilzes. Dies zeigt, dass *mgm1* ein essenzielles Gen in *A. fumigatus* ist. Von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die mitochondriale Fusion eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der mitochondrialen DNA spielt. Durch Störung der mitochondrialen Fusion kommt es zu einem Verlust von mitochondrialer DNA und damit zur Unterbrechung der Atmungskette, da wichtige Gene hierfür nicht mehr transkribiert werden können.¹¹³ Bei Supplementation von Doxycyclin kommt es zur Expression des *mgm1*-Genes und zum wildtypähnlichen Wachstum. Durch simultane Deletion von *dnm1* in der konditionellen *mgm1*-Mutante konnten wir eine Doppelmutante herstellen, die unter reprimierten Bedingungen eine Einschränkung sowohl der mitochondrialen Fission als auch der mitochondrialen Fusion aufwies und unter Supplementation von Doxycyclin der *dnm1*-Deletionsmutante gleichen sollte. Zunächst konnte gezeigt werden, dass unter reprimierten Bedingungen $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$ anders als *mgm1_{pkiAteton}* lebensfähig war und ein wildtypähnliches Wachstumsverhalten zeigte. Die simultane Deletion der mitochondrialen Fission scheint dem Verlust der mitochondrialen DNA also entgegenzuwirken. Ebenso führte die gleichzeitige Beeinträchtigung der mitochondrialen Fusion in $\Delta dnm1\ mgm1_{pkiAteton}$ zu einer verbesserten Sporulation gegenüber der $\Delta dnm1$ -Mutante. Jedoch zeigte sich anders als erwartet keine wildtypähnliche Mitochondrienmorphologie, sondern ein Mischbild zwischen langen tubulären Mitochondriennetzwerken mit großen sphärischen Mitochondrien-Konglomeraten wie bei der $\Delta dnm1$ -Mutante und kleinen, fragmentierten Mitochondrien wie bei der *mgm1_{pkiAteton}*-Mutante unter reprimierten Bedingungen. Dies könnte auch erklären, weshalb das Wachstumsverhalten der Doppelmutante zwar wildtypähnlich ist, jedoch vor allem auf SAB-

Komplexmedium weiterhin ein eingeschränktes Wachstum zeigt. Die gleichzeitige Einschränkung in mitochondrialer Fusion und Fission verbessert nur das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung, kann jedoch die mitochondriale Dynamik nicht komplett wiederherstellen. In der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass eine vergleichbare Doppelmutante eine geringere Lebensspanne aufwies. Dies sei unter anderem auf eine erhöhte Sensitivität auf oxidativen Stress und der instabilen mitochondrialen DNA zurückzuführen¹⁴¹. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Doppelmutante gegenüber Azolen eine erhöhte Resistenz zeigte im Vergleich zum Wildtyp. Die Azolresistenz zeigte sich sogar noch ausgeprägter im Vergleich zu den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten. Dies steht erstaunlicherweise im Widerspruch zu den Beobachtungen von Bernhardt et al., wonach die mitochondriale Doppelmutante in *S. cerevisiae* aufgrund einer reduzierten Mitophagie eine geringere Stressresistenz aufweisen soll¹⁴¹. Bereits frühere Studien berichteten jedoch auch über erhöhte Azolresistenzen in anderen nicht pathologischen Pilzen, die eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Dynamik zeigten^{142,143}. Die Azolresistenz soll unter anderem auf eine erhöhte Überexpression von Efflux-Pumpen zurückzuführen sein¹⁴². Neuere Erkenntnisse deuten ebenfalls daraufhin, dass die mitochondriale Doppelmutante in *A. fumigatus* ebenfalls eine Überexpression von ABC-Transportern aus der Gruppe der Efflux-Pumpen zeigt¹³⁸.

4.6 Dnm1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus*

In unserer Wachstumsanalyse zeigte sich, dass *mgm1* essenziell für das Überleben von *A. fumigatus* ist (vgl. Abb. 2). In unserem Infektionsmodell mit *G. mellonella* wurde beobachtet, dass das mitochondriale Fusionsprotein Mgm1 einen entscheidenden Einfluss in der Vitalität und damit auch in der Virulenz des Pilzes zeigt. In *C. albicans* wurde beschrieben, dass die mitochondriale Fusionsdeletionsmutante $\Delta mgm1$ lebensfähig war¹⁴⁴. Sie zeigte jedoch ein eingeschränktes Hyphenwachstum. In einem Mausmodell mit *C. albicans* zeigte sich ebenso eine verringerte Virulenz der $\Delta mgm1$ -Mutante. In *Cryptococcus neoformans* zeigte die mitochondriale Fusionsdeletionsmutante $\Delta fzo1$ eine verringerte Virulenz im Mausmodell mit reduzierter pulmonaler Pilzlast¹⁴⁵. Damit scheint Mgm1 nicht für alle Pilze essenziell zu sein. Jedoch scheint Mgm1 eine wichtige Rolle bei der Virulenz der Pilze zu spielen.

Die mitochondriale Fissionsdeletionsmutante $\Delta dnm1$ in *A. fumigatus* zeigte in unseren Versuchen trotz eingeschränktem Wachstum eine erhöhte Azolresistenz gegenüber dem Wildtyp. Interessanterweise zeigte sich im Infektionsmodell mit *G. mellonella* kein signifikanter

Unterschied zwischen der Gesamtüberlebensrate bei Inokulation der Larven mit der Deletionsmutante $\Delta dnm1$ oder der Komplementante $dnm1$. Im Pilz *Metarhizium robertsii*, der hauptsächlich Insekten befällt, wurde beschrieben, dass im Infektionsmodell mit *G. mellonella*, die mit $\Delta dnm1$ injizierten Larven ein signifikant besseres Überleben zeigten als solche, die mit dem Wildtyp von *Metarhizium robertsii* injiziert wurden ¹⁴⁶. Im entomopathogenen Pilz *Beauveria bassiana*, der ebenso Insekten befällt, zeigten die Fissionsdeletionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ im Infektionsmodell mit *G. mellonella* ebenfalls eine verringerte Virulenz. Dabei zeigten die mit $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ injizierten Larven eine deutlich längere Überlebenszeit als die $\Delta dnm1$ -Larven ¹⁴⁷. Erstaunlicherweise konnten wir in *A. fumigatus* trotz der ausgeprägten Wachstumseinschränkung der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutante $\Delta dnm1$, anders als für insektenpathogene Pilze beschrieben, keine verringerte Virulenz von $\Delta dnm1$ beobachten. In zukünftigen Versuchen sollten $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ im *G. mellonella*-Infektionsmodell untersucht werden. Gegebenenfalls bedarf es jedoch ein anderes Infektionsmodell, z.B. ein Mausinfektionsmodell, um die Virulenz der Mutanten im Säugetiermodell zu überprüfen.

4.7 Die mitochondriale Dynamik als Target für antifungale Therapie

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, mögliche Zielproteine für neue antifungale Therapieansätze zu identifizieren. Anforderungen an ein geeignetes antifungales Medikament sollten unter anderem die Spezifität für den Pilz und die fehlende Toxizität für den Menschen sein. Hierbei erwies sich das mitochondriale Fusionsprotein Mgm1 als sehr vielversprechend, da bei Fehlen von Mgm1 in *A. fumigatus* der Pilz nicht lebensfähig und avirulent war. Im Menschen ist das orthologe Protein von Mgm1 OPA1. OPA1 liegt im Menschen in acht Isoformen vor ¹⁴⁸. Mutationen im OPA1-Gen führen zur Optikusatrophie, weshalb im Falle einer Inhibition bei antifungaler Therapie eine selektive Inhibition von Mgm1 ohne Affektion der OPA1-Funktion erstrebenswert ist ¹⁴⁹. Bisher haben noch keine in vivo-Versuche im Menschen mit mitochondrialen Fusionsinhibitoren stattgefunden, während ein mitochondrialer Fissionsinhibitor bereits in verschiedenen Organismen untersucht wurde. Erstmals wurde der mitochondriale Fissionsinhibitor mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor 1) 2008 von Cassidy-Stone et al. beschrieben ¹⁵⁰. Dieser hemmt die Rekrutierung von Dnm1 im Zytosol in *S. cerevisiae* ¹⁵⁰. Für Säugetierzellen wurde jedoch keine direkte Hemmwirkung von mdivi-1 auf Drp1 beobachtet ¹⁵¹. In *Candida albicans* wurde gezeigt, dass mdivi-1 das Hyphenwachstum hemmt. Diese Wirkung scheint aber nicht durch eine direkte Hemmung von Dnm1 hervorgerufen zu sein ¹⁵². In *Magnaporthe oryzae*, auch bekannt als Reisbrand-Pilz, wurde gezeigt, dass die Anwendung von mdivi-1 zu einer verringerten Virulenz und geringerem

invasivem Wachstum von *Magnaporthe oryzae* in Reiszellen führte¹⁵³. Interessanterweise hatte in unseren Versuchen die Deletion von *dnm1* keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus* im *G. mellonella*-Infektionsmodell. Allerdings sollten diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Um nicht zu vorschnell eine Aussage zur Virulenz der mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten basierend auf einem Infektionsmodell mit *G. mellonella* zu treffen, sollte die Virulenz in einem weiteren Infektionsmodell untersucht werden.

5. Ausblick

Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Dynamik in *A. fumigatus* führte zu einer erhöhten Azolresistenz. Dabei sind die genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht geklärt. Daher bleiben noch viele ungelöste Fragen. Für zukünftige Untersuchungen könnten klinische Isolate azolresistenter *Aspergillus*-Stämme darauf untersucht werden, ob diese Mutationen in Genen aufweisen, die für die mitochondriale Dynamik kodieren. Damit lassen sich Rückschlüsse daraus ziehen, ob der in dieser Arbeit gefundene Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dynamik und Resistenz gegenüber Azol-Antimykotika klinisch auch eine Rolle spielt. Ferner gilt es zu erforschen, was der zugrundeliegende Mechanismus für die Resistenz ist. Welche Signalwege sind daran beteiligt und könnte das Ganze tatsächlich auf eine Aktivierung von Effluxpumpen, wie von Sturm et al. vorgeschlagen, zurückzuführen sein¹³⁸? Ein besseres Verständnis für die genauen Mechanismen könnte hilfreich sein, die zunehmende klinische Herausforderung der Azolresistenz von *A. fumigatus* zu bewältigen. Überraschenderweise wies die mitochondriale Fissionsdeletionsmutante $\Delta dnm1$ trotz der Wachstumseinschränkung keine verringerte Virulenz im *G. mellonella*-Infektionsmodell auf. Hierbei stellt sich die Frage, ob das Infektionsmodell zur Beurteilung der Virulenz möglicherweise ungeeignet ist. Um weiter zu klären, ob die mitochondriale Fission nicht doch die Virulenz von *A. fumigatus* beeinflusst und somit als mögliche Zielstruktur von Antimykotika geeignet wäre, sollten die Virulenzversuche in einem anderen Modell, beispielsweise einem Mausinfektionsmodell, durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden drei Proteine im Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* identifiziert, die an der mitochondrialen Fission beteiligt sind. In Anlehnung an die mitochondrialen Fissionsproteine in *Saccharomyces cerevisiae* benannten wir die von uns identifizierten homologen Proteine in *A. fumigatus* Dnm1, Fis1 und Mdv1. Die Deletion der entsprechenden kodierenden Gene *dnm1*, *fis1* und *mdv1* führt zu einer Beeinträchtigung des radialen Wachstums, der Sporulation und zu einer erhöhten Hitzesensibilität im Vergleich zum Wildtyp. Zudem beeinflussen die mitochondrialen Fissionsproteine die Mitochondrienmorphologie. Mikroskopisch zeigen sich neben den wildtypähnlichen tubulären Mitochondriennetzwerken unterschiedlich große sphärische Mitochondrien-Konglomerate. Diese sphärischen Mitochondrien sind im Komplexmedium häufiger aufzufinden. Dies korreliert mit ausgeprägteren Wachstumseinschränkung auf Komplexmedium. Anders als in *S. cerevisiae* zeigt sich in *A. fumigatus* trotz eingeschränkter mitochondrialer Fission eine normale Mitochondrienverteilung bei der Sporenbildung. Des Weiteren führt die Dysfunktion der mitochondrialen Fission zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Azol-Antimykotika. Die erhöhte Azolresistenz kann durch die gleichzeitige Verringerung der Aktivität der Lanosterin-Demethylase Cyp51A, einem wichtigen Enzym der Ergosterol-Biosynthese und Zielprotein von Azolen, wieder auf Wildtypniveau gesenkt werden. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale Fusionsprotein Mgm1 essenziell für die Lebensfähigkeit von *A. fumigatus* ist. Durch die Herstellung der Doppelmutante $\Delta dnm1$ *mgm1*_{pkiAteton} wurde in der vorliegenden Arbeit abhängig von der Expression von *mgm1* der Phänotyp von $\Delta dnm1$ oder der Doppelmutante untersucht. Die gleichzeitige Beeinträchtigung von mitochondrialer Fusion und Fission führt zu einer verbesserten Sporulation, einem besseren Wachstum sowie einer noch höheren Azolresistenz im Vergleich zu den mitochondrialen Fissionsdeletionsmutanten. Dies geht einher mit dem mikroskopisch heterogenen Bild von langen tubulären Mitochondriennetzwerken, gepaart mit unterschiedlich großen Mitochondrien-Konglomeraten. Im Gegensatz zu *mgm1*, bei dessen fehlender Expression *A. fumigatus* avirulent ist, zeigt *dnm1* keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus*. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die mitochondriale Dynamik Einfluss auf die Sensitivität von *A. fumigatus* gegenüber Azol-Antimykotika hat. Trotz des nachgewiesenen deutlichen Einflusses auf das Wachstum und die Sporulation scheint die mitochondriale Fission im Gegensatz zur mitochondrialen Fusion keine vielversprechende Zielstruktur für neuartige Antimykotika zu sein.

7. Publikationen

Einige der Ergebnisse aus dieser Dissertation wurden in insgesamt drei internationalen Fachjournals veröffentlicht, davon ging eine Publikation als geteilte Erstautorenschaft und zwei weitere als Co-Autorenschaft hervor. Bei diesen Publikationen handelt es sich um folgende:

1. Neubauer M*, **Zhu Z***, Penka M, Helmschrott C, Wagener N, Wagener J. Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Molecular microbiology*. 2015;98(5):930-45 (*geteilte Erstautorenschaft)
2. Dichtl K, Samantaray S, Amanianda V, **Zhu Z**, Prevost MC, Latge JP, et al. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall beta-1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Molecular microbiology*. 2015;95(3):458-71
3. Geissel B, Loiko V, Klugherz I, **Zhu Z**, Wagener N, Kurzai O, et al. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. *Nature communications*. 2018;9(1):3098

8. Literaturverzeichnis

1. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology* 2014;78:141-73. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
2. Tsang CC, Tang JYM, Lau SKP, Woo PCY. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present and future. *Computational and structural biotechnology journal* 2018;16:197-210. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.05.003.
3. Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical mycology* 2006;44(Supplement_1):S127-S131. DOI: 10.1080/13693780600796546.
4. Lewington-Gower E, Chan L, Shah A. Review of current and future therapeutics in ABPA. *Therapeutic advances in chronic disease* 2021;12:20406223211047003. DOI: 10.1177/20406223211047003.
5. Hammond EE, McDonald CS, Vestbo J, Denning DW. The global impact of *Aspergillus* infection on COPD. *BMC pulmonary medicine* 2020;20(1):241. DOI: 10.1186/s12890-020-01259-8.
6. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS pathogens* 2013;9(12):e1003743. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003743.
7. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;33(11):1824-33. DOI: 10.1086/323900.

8. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005;438(7071):1151-6. DOI: 10.1038/nature04332.
9. O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009;457(7228):471-4. DOI: 10.1038/nature07528.
10. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 1999;12(2):310-50.
11. Yu JH. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 2010;38(4):229-37. DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.4.229.
12. Al-Bader N, Vanier G, Liu H, et al. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infection and immunity* 2010;78(7):3007-18. DOI: 10.1128/IAI.00813-09.
13. Fortwendel JR, Panepinto JC, Seitz AE, Askew DS, Rhodes JC. *Aspergillus fumigatus* *rasA* and *rasB* regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal genetics and biology : FG & B* 2004;41(2):129-39. DOI: 10.1016/j.fgb.2003.10.004.
14. Rhodes JC. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Medical mycology* 2006;44 Suppl 1:S77-81. DOI: 10.1080/13693780600779419.
15. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2014;5(2):a019786. DOI: 10.1101/cshperspect.a019786.
16. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1998;26(4):781-803; quiz 804-5. DOI: 10.1086/513943.
17. Patel AR, Patel AR, Singh S, Singh S, Khawaja I. Treating Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Review. *Cureus* 2019;11(4):e4538. DOI: 10.7759/cureus.4538.
18. Shah A, Panjabi C. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy, asthma & immunology research* 2016;8(4):282-97. DOI: 10.4168/aaair.2016.8.4.282.
19. Asano K, Kamei K, Hebisawa A. Allergic bronchopulmonary mycosis - pathophysiology, histology, diagnosis, and treatment. *Asia Pacific allergy* 2018;8(3):e24. DOI: 10.5415/apallergy.2018.8.e24.
20. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, et al. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *BioMed research international* 2013;2013:723129. DOI: 10.1155/2013/723129.
21. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2011;20(121):156-74. DOI: 10.1183/09059180.00001011.
22. Muhlemann K, Wenger C, Zenhausern R, Tauber MG. Risk factors for invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic malignancies. *Leukemia* 2005;19(4):545-50. DOI: 10.1038/sj.leu.2403674.
23. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity* 2005;73(1):494-503. DOI: 10.1128/IAI.73.1.494-503.2005.
24. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 2009;22(3):447-65. DOI: 10.1128/CMR.00055-08.
25. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection. *Deutsches Arzteblatt international* 2019;116(16):271-278. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0271.
26. Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica* 2013;2013:459405. DOI: 10.1155/2013/459405.

27. Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, et al. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology* 2012;50(3):1051-3. DOI: 10.1128/JCM.05946-11.
28. Dobias R, Jaworska P, Tomaskova H, et al. Diagnostic value of serum galactomannan, (1,3)-beta-d-glucan, and *Aspergillus fumigatus*-specific IgA and IgG assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Mycoses* 2018;61(8):576-586. DOI: 10.1111/myc.12765.
29. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in microbiology* 2012;3:439. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00439.
30. Scorzoni L, de Paula ESAC, Marcos CM, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in microbiology* 2017;8:36. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00036.
31. Geissel B, Loiko V, Klugherz I, et al. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. *Nature communications* 2018;9(1):3098. DOI: 10.1038/s41467-018-05497-7.
32. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *The New England journal of medicine* 2002;347(6):408-15. DOI: 10.1056/NEJMoa020191.
33. Noor A, Preuss CV. Antifungal Membrane Function Inhibitors (Amphotericin B). *StatPearls*. Treasure Island (FL)2019.
34. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology* 2014;10(5):400-6. DOI: 10.1038/nchembio.1496.
35. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 2013;73(9):919-34. DOI: 10.1007/s40265-013-0069-4.
36. Jenks JD, Hoenigl M. Treatment of Aspergillosis. *Journal of fungi* 2018;4(3). DOI: 10.3390/jof4030098.
37. Dichtl K, Samantaray S, Amanianda V, et al. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall beta-1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Molecular microbiology* 2015;95(3):458-71. DOI: 10.1111/mmi.12877.
38. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of infectious diseases* 2017;216(suppl_3):S436-S444. DOI: 10.1093/infdis/jix210.
39. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2016;371(1709). DOI: 10.1098/rstb.2015.0460.
40. Parker JE, Warrilow AG, Price CL, Mullins JG, Kelly DE, Kelly SL. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of chemical biology* 2014;7(4):143-61. DOI: 10.1007/s12154-014-0121-1.
41. Hu W, Sillaots S, Lemieux S, et al. Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 2007;3(3):e24. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030024.
42. Hannan AJ. Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease. *Nature reviews Genetics* 2018;19(5):286-298. DOI: 10.1038/nrg.2017.115.
43. Carvalho DS, Andrade RF, Pinho ST, et al. What are the Evolutionary Origins of Mitochondria? A Complex Network Approach. *PloS one* 2015;10(9):e0134988. DOI: 10.1371/journal.pone.0134988.
44. Kornmann B, Currie E, Collins SR, et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 2009;325(5939):477-81. DOI: 10.1126/science.1175088.
45. Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et biophysica acta* 2002;1555(1-3):196-203. DOI: 10.1016/s0005-2728(02)00278-5.

46. Westermann B, Prokisch H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology* : FG & B 2002;36(2):91-7. DOI: 10.1016/S1087-1845(02)00019-1.
47. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014;505(7483):335-43. DOI: 10.1038/nature12985.
48. Rossmann MP, Dubois SM, Agarwal S, Zon LI. Mitochondrial function in development and disease. *Disease models & mechanisms* 2021;14(6). DOI: 10.1242/dmm.048912.
49. van Roermund CW, Waterham HR, Ijlst L, Wanders RJ. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 2003;60(9):1838-51. DOI: 10.1007/s00018-003-3076-x.
50. Long N, Xu X, Qian H, Zhang S, Lu L. A Putative Mitochondrial Iron Transporter MrsA in *Aspergillus fumigatus* Plays Important Roles in Azole-, Oxidative Stress Responses and Virulence. *Frontiers in microbiology* 2016;7:716. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00716.
51. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012;337(6098):1062-5. DOI: 10.1126/science.1219855.
52. Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 2012;148(5):988-1000. DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.038.
53. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65. DOI: 10.1038/290457a0.
54. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature reviews Genetics* 2005;6(11):815-25. DOI: 10.1038/nrg1708.
55. Mabey Gilsean J, Cooley J, Bowyer P. CADRE: the Central *Aspergillus* Data REpository 2012. *Nucleic acids research* 2012;40(Database issue):D660-6. DOI: 10.1093/nar/gkr971.
56. Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, Zablocki D, Ohishi M, Sadoshima J. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2015;78:116-22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.019.
57. Sabouny R, Shutt TE. The role of mitochondrial dynamics in mtDNA maintenance. *Journal of cell science* 2021;134(24). DOI: 10.1242/jcs.258944.
58. Silva Ramos E, Motori E, Bruser C, et al. Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. *PLoS genetics* 2019;15(6):e1008085. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008085.
59. Dong F, Zhu M, Zheng F, Fu C. Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast. *The FEBS journal* 2022;289(1):262-278. DOI: 10.1111/febs.16138.
60. Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Molecular biology of the cell* 2003;14(6):2342-56. DOI: 10.1091/mbc.e02-12-0788.
61. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(28):26185-92. DOI: 10.1074/jbc.M503062200.
62. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8(11):870-9. DOI: 10.1038/nrm2275.
63. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010;11(12):872-84. DOI: 10.1038/nrm3013.
64. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1817(10):1833-8. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.033.
65. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in biochemical sciences* 2001;26(1):23-9. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01735-7.
66. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology* 2015;4:6-13. DOI: 10.1016/j.redox.2014.11.006.

67. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS letters* 2018;592(5):728-742. DOI: 10.1002/1873-3468.12956.
68. Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Bennett B, Zielonka J. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox biology* 2018;15:347-362. DOI: 10.1016/j.redox.2017.12.012.
69. Luo H, Chiang HH, Louw M, Susanto A, Chen D. Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2017;28(6):449-460. DOI: 10.1016/j.tem.2017.02.008.
70. Hu J, Zhang Y, Jiang X, et al. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2019;38(1):225. DOI: 10.1186/s13046-019-1201-4.
71. Jezek J, Cooper KF, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants* 2018;7(1). DOI: 10.3390/antiox7010013.
72. Otera H, Mihara K. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases* 2011;2(3):167-172. DOI: 10.4161/sgtp.2.3.16486.
73. Michalska BM, Kwapiszewska K, Szczepanowska J, et al. Insight into the fission mechanism by quantitative characterization of Drp1 protein distribution in the living cell. *Scientific reports* 2018;8(1):8122. DOI: 10.1038/s41598-018-26578-z.
74. Serasinghe MN, Chipuk JE. Mitochondrial Fission in Human Diseases. *Handbook of experimental pharmacology* 2017;240:159-188. DOI: 10.1007/164_2016_38.
75. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell* 2013;24(5):659-67. DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0721.
76. Cho HM, Sun W. Molecular cross talk among the components of the regulatory machinery of mitochondrial structure and quality control. *Experimental & molecular medicine* 2020;52(5):730-737. DOI: 10.1038/s12276-020-0434-9.
77. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 2011;334(6054):358-62. DOI: 10.1126/science.1207385.
78. Pon LA. Mitochondrial fission: rings around the organelle. *Current biology : CB* 2013;23(7):R279-81. DOI: 10.1016/j.cub.2013.02.042.
79. Lee JE, Weststrate LM, Wu H, Page C, Voeltz GK. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 2016;540(7631):139-143. DOI: 10.1038/nature20555.
80. Fonseca TB, Sanchez-Guerrero A, Milosevic I, Raimundo N. Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins. *Nature* 2019;570(7761):E34-E42. DOI: 10.1038/s41586-019-1296-y.
81. Bhar D, Karren MA, Babst M, Shaw JM. Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(25):17312-17320. DOI: 10.1074/jbc.M513530200.
82. Zhang Y, Chan NC, Ngo HB, Gristick H, Chan DC. Crystal structure of mitochondrial fission complex reveals scaffolding function for mitochondrial division 1 (Mdv1) coiled coil. *The Journal of biological chemistry* 2012;287(13):9855-9861. DOI: 10.1074/jbc.M111.329359.
83. Karren MA, Coonrod EM, Anderson TK, Shaw JM. The role of Fis1p-Mdv1p interactions in mitochondrial fission complex assembly. *The Journal of cell biology* 2005;171(2):291-301. DOI: 10.1083/jcb.200506158.
84. Griffin EE, Graumann J, Chan DC. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *The Journal of cell biology* 2005;170(2):237-48. DOI: 10.1083/jcb.200503148.

85. Abrisch RG, Gumbin SC, Wisniewski BT, Lackner LL, Voeltz GK. Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *The Journal of cell biology* 2020;219(4). DOI: 10.1083/jcb.201911122.
86. Cho B, Cho HM, Jo Y, et al. Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nature communications* 2017;8:15754. DOI: 10.1038/ncomms15754.
87. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004;305(5685):858-62. DOI: 10.1126/science.1099793.
88. Li YJ, Cao YL, Feng JX, et al. Structural insights of human mitofusin-2 into mitochondrial fusion and CMT2A onset. *Nature communications* 2019;10(1):4914. DOI: 10.1038/s41467-019-12912-0.
89. Leal NS, Schreiner B, Pinho CM, et al. Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid beta-peptide production. *Journal of cellular and molecular medicine* 2016;20(9):1686-95. DOI: 10.1111/jcmm.12863.
90. Peng C, Rao W, Zhang L, et al. Mitofusin 2 Exerts a Protective Role in Ischemia Reperfusion Injury Through Increasing Autophagy. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2018;46(6):2311-2324. DOI: 10.1159/000489621.
91. Rocha AG, Franco A, Krezel AM, et al. MFN2 agonists reverse mitochondrial defects in preclinical models of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Science* 2018;360(6386):336-341. DOI: 10.1126/science.aao1785.
92. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell metabolism* 2014;19(4):630-41. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.011.
93. Anand R, Wai T, Baker MJ, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of cell biology* 2014;204(6):919-29. DOI: 10.1083/jcb.201308006.
94. De Vecchis D, Cavellini L, Baaden M, Henin J, Cohen MM, Taly A. A membrane-inserted structural model of the yeast mitofusin Fzo1. *Scientific reports* 2017;7(1):10217. DOI: 10.1038/s41598-017-10687-2.
95. Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 2004;305(5691):1747-52. DOI: 10.1126/science.1100612.
96. Herlan M, Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(30):27781-8. DOI: 10.1074/jbc.M211311200.
97. McQuibban GA, Saurya S, Freeman M. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 2003;423(6939):537-41. DOI: 10.1038/nature01633.
98. Zick M, Duvezin-Caubet S, Schafer A, Vogel F, Neupert W, Reichert AS. Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS letters* 2009;583(13):2237-43. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.05.053.
99. van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013;5(6). DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
100. Hoppins S, Nunnari J. The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1793(1):20-6. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.005.
101. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96(1):23-8. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
102. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2010;12(12-13):928-36. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.06.009.

103. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 1997;25(17):3389-402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
104. Levdansky E, Romano J, Shadkchan Y, et al. Coding tandem repeats generate diversity in *Aspergillus fumigatus* genes. *Eukaryotic cell* 2007;6(8):1380-91. DOI: 10.1128/EC.00229-06.
105. Gorsich SW, Shaw JM. Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Molecular biology of the cell* 2004;15(10):4369-81. DOI: 10.1091/mbc.E03-12-0875.
106. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews* 1999;12(4):501-17.
107. Helmschrott C, Sasse A, Samantaray S, Krappmann S, Wagener J. Upgrading fungal gene expression on demand: improved systems for doxycycline-dependent silencing in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* 2013;79(5):1751-4. DOI: 10.1128/AEM.03626-12.
108. Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular microbiology* 2012;83(3):506-19. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07946.x.
109. Dichtl K, Samantaray S, Wagener J. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol* 2016;18(9):1228-38. DOI: 10.1111/cmi.12612.
110. Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M. In vivo functions of Drp1: lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1842(8):1179-85. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.11.024.
111. Grahl N, Dinamarco TM, Willger SD, Goldman GH, Cramer RA. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology* 2012;84(2):383-99. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x.
112. Stade S, Brambl R. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. *Journal of bacteriology* 1981;147(3):757-67.
113. Neubauer M, Zhu Z, Penka M, Helmschrott C, Wagener N, Wagener J. Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Molecular microbiology* 2015;98(5):930-45. DOI: 10.1111/mmi.13167.
114. Benard G, Bellance N, James D, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* 2007;120(Pt 5):838-48. DOI: 10.1242/jcs.03381.
115. Knorre DA, Popadin KY, Sokolov SS, Severin FF. Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013;2013:139491. DOI: 10.1155/2013/139491.
116. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell metabolism* 2013;17(4):491-506. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.03.002.
117. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(8):2653-8. DOI: 10.1073/pnas.0511154103.
118. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, et al. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 2002;13(3):847-53. DOI: 10.1091/mbc.01-12-0588.
119. Hermann GJ, Shaw JM. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annual review of cell and developmental biology* 1998;14:265-303. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.265.
120. Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, et al. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology* 1999;1(5):298-304. DOI: 10.1038/13014.

121. Geissel B, Penka M, Neubauer M, Wagener J. The ER-mitochondria encounter structure contributes to hyphal growth, mitochondrial morphology and virulence of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 2017;307(1):37-43. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.005.
122. Osman C, Haag M, Potting C, et al. The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *The Journal of cell biology* 2009;184(4):583-96. DOI: 10.1083/jcb.200810189.
123. Burgess SM, Delannoy M, Jensen RE. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *The Journal of cell biology* 1994;126(6):1375-91.
124. Okamoto K, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual review of genetics* 2005;39:503-36. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093019.
125. Messerschmitt M, Jakobs S, Vogel F, et al. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *The Journal of cell biology* 2003;160(4):553-64. DOI: 10.1083/jcb.200211113.
126. Altmann K, Westermann B. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 2005;16(11):5410-7. DOI: 10.1091/mbc.E05-07-0678.
127. Song JE, Alves TC, Stutz B, et al. Mitochondrial Fission Governed by Drp1 Regulates Exogenous Fatty Acid Usage and Storage in Hela Cells. *Metabolites* 2021;11(5). DOI: 10.3390/metabo11050322.
128. Mousset S, Buchheidt D, Heinz W, et al. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients—updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Annals of hematology* 2014;93(1):13-32. DOI: 10.1007/s00277-013-1867-1.
129. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2016;63(4):e1-e60. DOI: 10.1093/cid/ciw326.
130. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008;46(3):327-60. DOI: 10.1086/525258.
131. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS medicine* 2008;5(11):e219. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050219.
132. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2016;62(3):362-8. DOI: 10.1093/cid/civ885.
133. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, et al. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51a*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013;68(7):1486-96. DOI: 10.1093/jac/dkt075.
134. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious diseases* 2009;9(12):789-95. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70265-8.
135. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of clinical microbiology* 2001;39(7):2431-8. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001.
136. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;51(6):1897-904. DOI: 10.1128/AAC.01092-06.

137. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious diseases* 2017;17(12):e383-e392. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.
138. Sturm L, Geissel B, Martin R, Wagener J. Differentially Regulated Transcription Factors and ABC Transporters in a Mitochondrial Dynamics Mutant Can Alter Azole Susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* 2020;11:1017. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01017.
139. Tsao S, Rahkhoodaee F, Raymond M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53(4):1344-52. DOI: 10.1128/AAC.00926-08.
140. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious diseases* 2002;2(2):73-85. DOI: 10.1016/s1473-3099(02)00181-0.
141. Bernhardt D, Muller M, Reichert AS, Osiewacz HD. Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusion reduces mitophagy and shortens replicative lifespan. *Scientific reports* 2015;5:7885. DOI: 10.1038/srep07885.
142. Shingu-Vazquez M, Traven A. Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic cell* 2011;10(11):1376-83. DOI: 10.1128/EC.05184-11.
143. Tsai HF, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006;50(4):1384-92. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006.
144. Liang C, Zhang B, Cui L, Li J, Yu Q, Li M. Mgm1 is required for maintenance of mitochondrial function and virulence in *Candida albicans*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 2018;120:42-52. DOI: 10.1016/j.fgb.2018.09.006.
145. Chang AL, Doering TL. Maintenance of Mitochondrial Morphology in *Cryptococcus neoformans* Is Critical for Stress Resistance and Virulence. *mBio* 2018;9(6). DOI: 10.1128/mBio.01375-18.
146. Xie X, Wang Y, Yu D, Xie R, Liu Z, Huang B. DNM1, a Dynamin-Related Protein That Contributes to Endocytosis and Peroxisome Fission, Is Required for the Vegetative Growth, Sporulation, and Virulence of *Metarhizium robertsii*. *Applied and environmental microbiology* 2020;86(17). DOI: 10.1128/AEM.01217-20.
147. Wang JJ, Peng YJ, Ding JL, Feng MG, Ying SH. Mitochondrial fission is necessary for mitophagy, development and virulence of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Appl Microbiol* 2020;129(2):411-421. DOI: 10.1111/jam.14619.
148. Alavi MV, Fuhrmann N. Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Mol Neurodegener* 2013;8:32. DOI: 10.1186/1750-1326-8-32.
149. Chao de la Barca JM, Prunier-Mirebeau D, Amati-Bonneau P, et al. OPA1-related disorders: Diversity of clinical expression, modes of inheritance and pathophysiology. *Neurobiol Dis* 2016;90:20-6. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.015.
150. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingerman E, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental cell* 2008;14(2):193-204. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.11.019.
151. Bordt EA, Clerc P, Roelofs BA, et al. The Putative Drp1 Inhibitor mdivi-1 Is a Reversible Mitochondrial Complex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. *Developmental cell* 2017;40(6):583-594 e6. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.02.020.
152. Koch B, Barugahare AA, Lo TL, et al. A Metabolic Checkpoint for the Yeast-to-Hyphae Developmental Switch Regulated by Endogenous Nitric Oxide Signaling. *Cell Rep* 2018;25(8):2244-2258 e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.080.
153. Kou Y, He Y, Qiu J, et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy are necessary for proper invasive growth in rice blast. *Mol Plant Pathol* 2019;20(8):1147-1162. DOI: 10.1111/mpp.12822.

9. Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
ABPA	allergische bronchpulmonale Aspergillose
<i>A. spp.</i>	<i>Aspergillus species</i>
AMM	Aspergillus minimal Medium
AP	Alkaline Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bax	Bcl-2-associated X protein
BDG	1-3-β-D-Glucan-Assay
BLAST	basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
Caf4	CCR4 associated factor 4
C-Terminus	Carboxyterminus
CYP51	Cytochrom P450 Enzym 14α-Sterol-Demethylase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnm1	Dynamamin 1
Drp1	Dynamamin related protein 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMES	Endoplasmic reticulum mitochondria encounter structure
E-Test	Epsilometer test
Fis1	Mitochondrial fission 1
Fzo1	Fuzzy onions protein 1
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
IA	Invasive Aspergillose
Ig	Immunglobulin
Kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
Mdm	Mitochondrial distribution and morphology protein
Mdv1	Mitochondrial division protein 1

Mfn1/2	Mitofusin ½
MFS	Major-Facilitator-Superfamilie
Mgm1	Mitochondrial genome maintenance protein 1
Mmm1	Maintenance of mitochondrial morphology protein 1
MIC	Minimal inhibitory concentration
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	mitochondriale GFP
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
N-Terminus	Aminoterminus
Och1	Outer chain protein 1
OD	Optische Dichte
OPA1	Optic atrophy 1
ORF	Open reading frame
Pcp1	Processing of Cytochrome c peroxidase 1
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAB	Sabouraud
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Heesemann für die Organisation und Betreuung des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ (FöFoLe) danken, durch dessen Unterstützung und in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Johannes Wagener für die Betreuung dieser Arbeit. Durch seine unerschöpfliche Begeisterung für die Wissenschaft, seiner charismatischen Persönlichkeit und seinem unendlichen Verständnis und seiner Geduld stand er mir stets mit Rat und Tat bei und unterstützte mich in der Abschließung dieser Arbeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gegenseitige Unterstützung, den intellektuellen Austausch und dem positiven Arbeitsklima danken, darunter besonders Dr. Julia Beck, Dr. Karl Dichtl, Dr. Bernadette Geißel, Michael Neubauer, Mirjam Penka, Dr. Sweta Samantaray, Dr. Annegret Vaggelas.

Und schließlich möchte ich den mir nahestehenden Menschen danken, durch deren bedingungsloser Unterstützung, Geduld und Liebe die Durchführung und Vollendung der vorliegenden Arbeit erst möglich war: meinen Eltern, meinen Geschwistern Mona und Delong und meinem Partner Krischan Braitsch.