

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



**Die Bedeutung des Thioredoxins Asp3 für Wachstum und
Virulenz des opportunistisch humanpathogenen
Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus***

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

vorgelegt von
Victor Albert Brantl
aus
Frankfurt

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Wagener

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sven Krappmann
Prof. Dr. Christina T. Rieger
:
PD Dr. Sandra Frank

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Karl Dichtl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2023

„Nur ein Narr macht keine Experimente“

Charles Darwin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Abbildungsverzeichnis.....	3
3	Tabellenverzeichnis.....	4
4	Abkürzungen	5
5	Einleitung	7
5.1	Taxonomie	7
5.2	Lebenszyklus von <i>Aspergillus fumigatus</i>	8
5.3	Medizinische Relevanz.....	8
5.4	Durch <i>Aspergillus fumigatus</i> ausgelöste Krankheiten	9
5.5	Interaktion von <i>Aspergillus fumigatus</i> mit dem Immunsystem.....	11
5.5.1	Lungenepithelzellen	11
5.5.2	Makrophagen	12
5.5.3	Neutrophile Granulozyten.....	13
5.5.4	Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Abwehr von <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
5.5.5	Das Peroxiredoxin Asp3.....	15
5.6	Lactoferrin	17
5.6.1	Entdeckung und Vorkommen	17
5.6.2	Struktur	17
5.6.3	Antimikrobielle Wirkung.....	18
5.7	Eisenaufnahme bei <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
5.8	Übersicht über Messmethoden, um fungizide Eigenschaften von Immunzellen zu messen.....	21
6	Zielsetzung.....	23
7	Material und Methoden.....	24
7.1	Chemikalien und Enzyme.....	24
7.2	Geräte.....	24
7.3	<i>Aspergillus</i> – Stämme	25
7.4	Humane polymorphe Neutrophile	25
7.5	Oligonukleotide und Vektoren	25
7.6	Kulturmedien für <i>Aspergillus fumigatus</i>	27
7.7	Mikrobiologische Methoden.....	30
7.7.1	Anzucht von <i>Aspergillus fumigatus</i>	30

7.7.2	Herstellung der Sporenexperimentallösungen.....	31
7.7.3	Tüpfeltest von <i>Aspergillus fumigatus</i>	31
7.7.4	H ₂ O ₂ -Hemmhoftest.....	31
7.7.5	Quantifizierung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin.....	31
7.7.6	Auf Mikroskopie basierende Untersuchung.....	33
7.8	Molekularbiologische Methoden.....	34
7.8.1	Gewinnung von DNA aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
7.8.2	Polymerase-Kettenreaktion von DNA.....	34
7.8.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
7.8.4	Konzentrationsbestimmung.....	35
7.8.5	Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion.....	35
7.8.6	Enzymatische Spaltung von DNA.....	36
7.8.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
7.9	Transformation von <i>E. coli</i>	36
7.9.1	Medien für <i>E. coli</i>	36
7.9.2	Herstellung von chemisch-Kompetenten Zellen.....	37
7.9.3	Transformation von <i>E. Coli</i>	37
7.10	Herstellung von genetisch veränderten <i>Aspergillus</i> -Stämmen.....	37
7.10.1	Konstruktion der <i>asp3_{tetOn} OllC</i> -Kassette.....	37
7.10.2	Konstruktion der Deletionskassetten für <i>af311</i> , <i>af312</i> und <i>sreA</i>	39
7.10.3	Transformation von <i>Aspergillus fumigatus</i>	42
7.10.4	Verifizierung der Klone.....	44
7.11	Zellbiologische Methoden.....	45
7.11.1	Isolierung humaner polymorpher neutrophiler Granulozyten (PMN).....	45
7.12	Mikroskopie.....	46
7.12.1	Lichtmikroskopie.....	46
7.12.2	Fixierung von Präparaten für die Lasermikroskopie.....	46
7.12.3	Konfokale Lasermikroskopie.....	46
7.12.4	Quantitative Bestimmung der Mitochondrienmorphologie.....	46
8	Ergebnisse.....	48
8.1	Sensitivität der konditionellen <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante gegenüber H ₂ O ₂ -Stress sowie humanen polymorphen neutrophilen Granulozyten (PMN).....	48
8.2	Untersuchungen des Wachstums-Phänotyps der <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante.....	52
8.3	Einfluss von Eisenmangel auf das Wachstum der konditionellen <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante	54
8.4	Untersuchung der Aspf3-Homologe Af311 und Af312.....	58

8.5	Auswirkungen der Deletion von <i>af3/1</i> und <i>af3/2</i> in der konditionellen <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante.....	61
8.6	Morphologie der Mitochondrien von <i>aspf3_{tetOn} Δaf3/1</i> -GFP.....	64
8.7	Die Deletion des Eisenaufnahmerepressors SreA kompensiert teilweise das Fehlen von Aspf3 und Af3/1	66
8.8	Die ROS-Sensitivität von <i>aspf3_{tetOn}</i> und <i>aspf3_{tetOn} Δaf3/1</i> ist unter Eisenmangel erhöht	69
8.9	Durch den Radikalfänger N-Acetyl-Cystein kann das Wachstum von <i>aspf3_{tetOn}</i> und <i>aspf3_{tetOn} Δaf3/1</i> unter Eisenmangel verbessert werden	69
8.10	Die Zugabe von Eisen unterstützt das Wachstum von <i>aspf3_{tetOn}</i> und <i>aspf3_{tetOn} Δaf3/1</i> in humanem Serum.....	70
9	Diskussion.....	72
9.1	Die erhöhte ROS-Sensibilität der <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante spielt keine signifikante Rolle bei der Konfrontation mit neutrophilen Granulozyten.....	72
9.2	Die <i>aspf3_{tetOn}</i> -Mutante hat einen Wachstumsdefekt unter Eisen-mangel, der durch Deletion des Homologs Af3/1 verstärkt wird	75
9.3	Aspf3 ist nicht an der Eisenaufnahme oder Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligt	76
9.4	Durch Zugabe von Eisen lässt sich die Virulenz der Aspf3-defizienten Mutante in einem Mausexperiment wiederherstellen	79
9.5	Mechanistische Erklärung	80
10	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	83
11	Literatur	84
12	Affidavit.....	100
13	Danksagung	101

1 Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist eine Schimmelpilzart, die beim Menschen verschiedene Formen der Aspergillose verursachen kann. Die schwerwiegendste Form ist die invasive Aspergillose, die häufig bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem auftritt, z.B. bei Personen, die sich einer Organ- oder Stammzelltransplantation unterzogen haben. Das Immunsystem reagiert mit verschiedenen Mechanismen auf eine Infektion mit *A. fumigatus*. Sehr wichtig sind Immunzellen wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, die *A. fumigatus* erkennen und bekämpfen. Asp3 ist ein Peroxiredoxin und Pilzallergen, das auf der Oberfläche der Sporen von *A. fumigatus* vorkommt. Es ist entscheidend an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt und wird als wichtiger Virulenzfaktor für den Pilz diskutiert. In einem Mausinfektions-experiment zeigte sich, dass eine Δ asp3-Mutante avirulent ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Mitochondrienmorphologie der Hyphen der konditionellen *asp3_{tetOn}*-Mutante unter repressiven Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp sehr sensibel auf geringe Mengen ROS reagiert. Die Untersuchung der Mitochondrienmorphologie lässt Rückschlüsse auf die Vitalität der Hyphen nach Interaktion mit einem Stressor zu und ist eine sehr sensible Methode zur Lebend-/Tot-Differenzierung. Entgegen der Erwartung induzierten neutrophile Granulozyten in der konditionellen *asp3_{tetOn}*-Mutante unter reprimierten Bedingungen und in Wildtyp eine vergleichbare Veränderung der mitochondrialen Morphologie.

Eine weitere wesentliche Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit ist, dass die konditionelle *asp3_{tetOn}*-Mutante unter repressiven und eisenarmen Bedingungen große Wachstumsprobleme hat. Auch die Δ asp3-Mutante aus dem Mausinfektionsmodell zeigt unter Eisenmangel denselben Wachstumsdefekt. Zusätzlich wird im Rahmen der Arbeit ein funktioneller Überlapp des Asp3-Homologs Af311 (Asp3-like) gezeigt. Das Fehlen von Af311 in der *asp3_{tetOn}*-Mutante verstärkt den Wachstumsdefekt unter Eisenmangel und führt zum Tod der Hyphen. Die intrazelluläre Eisenhomöostase oder der Siderophoren-Haushalt wird nicht durch Asp3 oder Af311 beeinflusst.

Es wurde ein Mausinfektionsexperiment durchgeführt, das zeigt, dass durch die Zugabe von Eisen die Virulenz von $\Delta aspf3$ wiederhergestellt werden kann. Die Avirulenz der ROS-sensiblen $\Delta aspf3$ -Mutante lässt sich durch den Wachstumsdefekt unter Eisenmangel erklären. Im Sputum liegen hohe Konzentrationen des eisenbindenden Proteins Lactoferrin vor. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass unter eisenarmen Bedingungen Aspf3 ein wichtiger Virulenzfaktor ist, der für den Beginn und die Aufrechterhaltung einer Infektion von entscheidender Bedeutung ist.

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5.1:.....	07
Abbildung 5.2:.....	10
Abbildung 5.3:.....	12
Abbildung 5.4:.....	14
Abbildung 5.5:.....	15
Abbildung 5.6:.....	16
Abbildung 5.7:.....	17
Abbildung 5.8:.....	19
Abbildung 5.9:.....	21
Abbildung 7.1:.....	39
Abbildung 7.2:.....	41
Abbildung 7.3:.....	45
Abbildung 7.4:.....	46
Abbildung 8.1:.....	49
Abbildung 8.2:.....	51
Abbildung 8.3:.....	52
Abbildung 8.4:.....	53
Abbildung 8.5:.....	55
Abbildung 8.6:.....	57
Abbildung 8.7:.....	58
Abbildung 8.8:.....	59
Abbildung 8.9:.....	60
Abbildung 8.10:.....	61
Abbildung 8.11:.....	63
Abbildung 8.12:.....	64
Abbildung 8.13:.....	65
Abbildung 8.14:.....	66
Abbildung 8.15:.....	68
Abbildung 8.16:.....	69
Abbildung 8.17:.....	70
Abbildung 8.18:.....	71
Abbildung 9.1:.....	77
Abbildung 9.2:.....	80

3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 7.1: ASPERGILLUS-STÄMME DIESER ARBEIT	25
TABELLE 7.2: ZELLISOLATE	25
TABELLE 7.3: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	25
TABELLE 7.4: VERWENDETE PLASMIDE.....	27
TABELLE 7.5: VERWENDETE PLASMIDKONSTRUKTE.....	27
TABELLE 7.6: <i>ASPERGILLUS</i> MINIMALMEDIUM AMM ¹³⁵	27
TABELLE 7.7: SALZLÖSUNG 20X	27
TABELLE 7.8: SPURENELEMENTE-LÖSUNG ¹³⁵	28
TABELLE 7.9: AMM-AGAR (2-FACH KONZENTRIERT)	28
TABELLE 7.10: 2 % PEPTON	29
TABELLE 7.11: SABOURAUD MEDIUM.....	29
TABELLE 7.12: 2 % AGAROSE	29
TABELLE 7.13: RPMI-1640 MEDIUM NACH EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) ¹³⁶	29
TABELLE 7.14: VERWENDETE AGENZIEN DER PCR-REAKTION.....	35
TABELLE 7.15: LB FLÜSSIG MEDIUM.....	36
TABELLE 7.16: CITRAT-PUFFER	42
TABELLE 7.17: ENZYMLÖSUNG	43
TABELLE 7.18: STC1700.....	43
TABELLE 7.19: PEG 4000 MIX	43
TABELLE 7.20: SORBITOL AGAR.....	43
TABELLE 7.21: SOFT AGAR	43
TABELLE 7.22: PCR-PRIMER INNERHALB DER DNA-VEKTOREN.....	44
TABELLE 7.23: PRIMERKOMBINATIONEN ZUR VERIFIKATION VON GEWONNENEN KLONEN.....	44

4 Abkürzungen

ABPA	allergisch-bronchopulmonale Aspergillose
Af311/2	Aspf3 like 1/2
AMM	Aspergillus Minimal medium
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bp	Basenpaare
BPS	<i>Bathophenanthrolinedisulfonic acid</i>
CAT	Katalase
CFU	<i>Colony forming unit</i> ; Kolonien bildende Einheiten
C-Terminus	Carboxy-terminaler Teil eines Proteins
CFW	Calcofluorweiß
dd	doppeltdestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
Doxy	Doxycyclin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
Fa.	Firma
FC	Ferricrocin
FsC	Fusarinine C
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HFC	Hydroxyferricrocin
IA	invasive Aspergillose
KG	Körpergewicht
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mio	Millionen
MPO	Myeloperoxidase
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
NETs	<i>neutrophil extracellular trap</i> , neutrophile extrazelluläre Fallen
N-Terminus	Amino-terminaler Teil eines Proteins

OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PMN	polymorphe neutrophile Granulozyten
PRRs	Pattern recognition receptors
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
ptrA	Pyriithiamin
RIA	<i>reductive iron assimilation</i> ; reduktive Eisenaufnahme
ROS	<i>Reaktive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Royal Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxid Dismutasen
SG	septische Granulomatose
spp.	<i>Species pluralis</i>
TAFC	Triacetylfusarinine C
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Mol pro Liter
m	Milli
min	Minute
μ	Mikro
s	Sekunde
U	Unit

5 Einleitung

5.1 Taxonomie

Pilze gehören neben Pflanzen und Tieren zu den eukaryotischen Lebewesen und nehmen in der Natur eine wichtige Rolle in der Verwertung von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen aus organischen Abfällen ein ¹. Die Anzahl der Pilzarten wird heute auf mehr als 3,8 Millionen geschätzt ². Eine davon ist der filamentöse Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*, der von seinem Entdecker, dem Priester und Botaniker Pier Antonio Micheli, aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einem Weihwasserwedel (Aspergill) *Aspergillus* benannt wurde ³. Auch der deutsche Arzt Georg Fresenius befasste sich um 1863 eingehend mit der Erforschung dieser Gattung. Er entdeckte dabei eine Art, die ihre grünen Sporen (Konidien) bei Luftstößen als Rauchwolke in die Umwelt entlässt. So benannte er diese Art nach dem lateinischen Wort für Rauch (fumus) *A. fumigatus* ⁴. Aufgrund der Form der Konidienträger wird er auch als Gießkannenschimmel bezeichnet (Abbildung 5.1). *A. fumigatus* wurde lange zu den *fungi imperfecti* (Deuteromycetes) gezählt, bei denen keine sexuelle Vermehrung stattfindet. Die Fortpflanzung erfolgt hierbei ausschließlich über asexuell gebildete Sporen, die über die Luft verteilt werden. Erst 2009 wurde die sexuelle Fortpflanzung bei *A. fumigatus* aufgeklärt und der Pilz neu der Klasse der Ascomyceten zugeordnet ⁵.

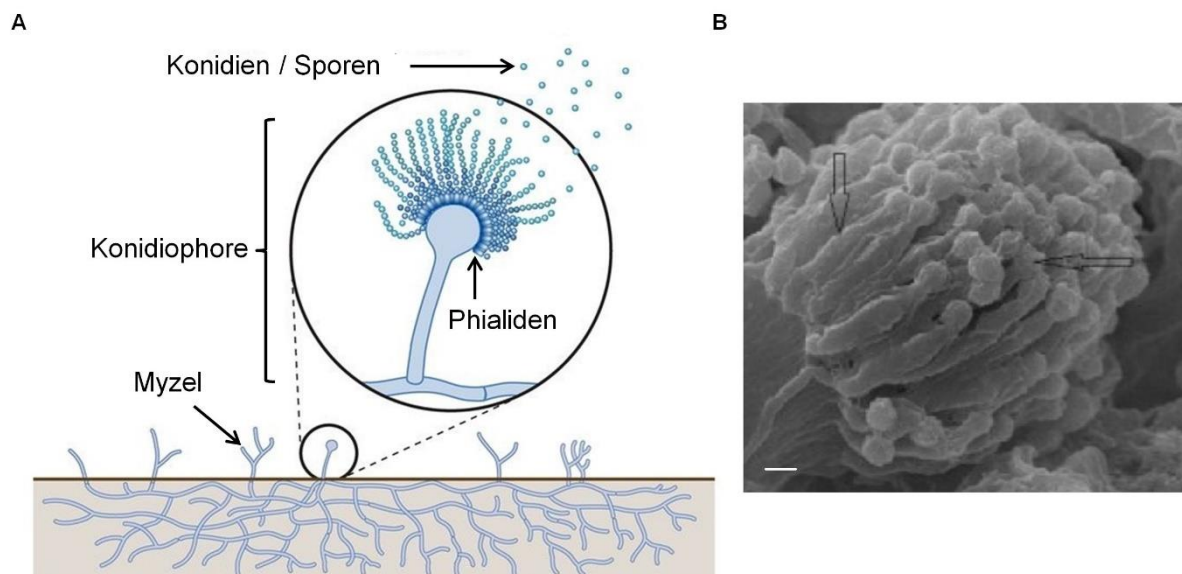


Abbildung 5.1 A: *A. fumigatus* Konidienträger und Myzel. Übertragung von Sporen über die Luft. B: Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines Konidienträgers mit Phialiden (linker Pfeil) und Sporen (rechter Pfeil). Der Maßstab repräsentiert 2 µm. Latge et al., Balhara et al., eigene Bearbeitung ^{6,7}.

5.2 Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*

Die Konidien von *A. fumigatus* werden durch die Luft verbreitet und erreichen in unserer Umwelt durchschnittlich Konzentrationen von 1-100 Konidien pro Kubikmeter Luft⁸. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C, wobei Wachstum auch zwischen 30 und 55°C erfolgt und auch bei 70°C ein Überleben nachgewiesen werden konnte⁹. Das Auskeimen ist abhängig von Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit sowie der Anwesenheit von anorganischen Salzen, Zuckern und Stickstoffquellen¹⁰. Ist all dies vorhanden, wird über verschiedene Signalwege das Wachstum der Konidien angeregt. Sie schwellen an und nach einiger Zeit bildet sich ein Keimschlauch (Keimhype) aus, der zunehmend an Länge gewinnt und sich verzweigt¹¹. Die Gesamtheit der sich verzweigenden Hyphen wird als Myzel bezeichnet. Die einzelnen Segmente werden durch Septen in unzählige Kompartimente unterteilt. Zwischen diesen findet ein reger Stoffaustausch statt, was durch Poren ermöglicht wird. Diese Poren können durch Woronin-Körper auch sehr schnell geschlossen werden, um bei Verletzung eines Kompartiments das übrige Myzel vor Verlust von intrazellulärer Flüssigkeit zu schützen¹². Unter geeigneten Wachstumsbedingungen kommt es schließlich zur Bildung von Konidiophoren. Diese stellen spezialisierte Hyphen dar, die an einem Ende vergrößert sind (Vesikel) und dort Phialiden ausbilden, von denen durch Abschnürung 2 - 3 µm große Sporen gebildet werden, die durch die Luft verteilt werden und den Zyklus von vorne beginnen lassen (Abbildung 5.1). Die Sporen tragen auf ihrer Oberfläche viele verschiedene hydrophobe Proteine (Hydrophobins) sowie das schwarze Pigment 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-Melanin. Dieses Pigment ist für die grüne Färbung verantwortlich und schützt die Sporen vor Umweltstressfaktoren wie UV-Strahlung und oxidativen Einflüssen¹³.

5.3 Medizinische Relevanz

Die menschliche Lunge wird täglich von 10.000 bis 15.000 Litern Luft durchströmt und so gelangen auch Sporen verschiedener Pilzarten in die Lunge⁹. Aufgrund ihrer Größe können sie kaum durch das Flimmerepithel abgehalten werden, sodass sie tief in die Lunge, bis in die Lungenalveolen, vordringen. Trotz dieser ständigen Exposition und der hohen Anzahl von Sporen entwickeln immunkompetente Menschen äußerst selten eine Erkrankung durch einen Schimmelpilz, da die Sporen stetig durch das Immunsystem eliminiert werden⁸. 40 der heute mehr als 250

bekanntesten *Aspergillus*-Arten sind humanpathogen ¹⁴. *A. fumigatus* zeigt sich dabei durch sein Temperaturoptimum, seine Sporengröße und seine hohe Stresstoleranz gegenüber Gattungen wie *Aspergillus flavus* oder *Aspergillus niger* im Vorteil. Durch den Anstieg von immunkompromittierten Patienten hat auch die Zahl der durch Schimmelpilze verursachten Erkrankungen zugenommen. Dies betrifft Krankheiten, die mit einer Immunschwäche vergesellschaftet sind (Septische Granulomatose, Leukämie, AIDS, COVID-19), aber auch jene, bei denen als Therapie das Immunsystem künstlich gehemmt wird ¹⁵. Hier ist der rheumatoide Formenkreis oder aber Patienten nach Organtransplantationen zu nennen. Patienten, die an einer Leukämie leiden und eine Chemotherapie in Kombination mit einer Knochenmarkstransplantation erhalten, sind besonders anfällig und es muss an mögliche durch Pilze verursachte Erkrankungen gedacht werden, die im weiteren Verlauf auftreten können ^{5,13,14}. Oberflächliche, gut behandelbare Infektionen sind dabei von den schwer verlaufenden, invasiven Pilzinfektionen zu unterscheiden, die eine Letalität von mehr als 50 % aufweisen können. Die humanpathogenen Pilzspezies der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* und *Aspergillus* sind alleine für mehr als 90 % dieser pilzassoziierten Todesfälle verantwortlich ^{17,18}.

5.4 Durch *Aspergillus fumigatus* ausgelöste Krankheiten

Während *A. fumigatus* zu verschiedenen Erkrankungen führen kann, ist als primäre Eintrittspforte für die aerogen verbreiteten Sporen vor allem der Respirationstrakt betroffen. Bei Immunkompetenten kann eine große Anzahl von Sporen, die über einen längeren Zeitraum eingeatmet werden, ein allergisches Bronchialasthma verursachen ^{19,20}. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Besiedelung des Wirts, sondern vielmehr zu einer fortwährenden Belastung des Immunsystems. Ist der Zustand des Menschen jedoch durch eine andere Erkrankung z. B. bei einer strukturellen Lungenerkrankung wie COPD geschwächt, kann trotzdem eine Besiedelung stattfinden, die in der Regel nicht invasiv verläuft. Bei einer Tuberkulose mit offenen Kavernen können sich *A. fumigatus*-Sporen anheften und ein Aspergillom ausbilden ²¹. Dabei wächst der Pilz in dem ihm zur Verfügung stehenden Hohlraum. Selten wächst er über diese Grenzen hinweg. Bei Infiltration der bronchialen Arterien kann er auch zu Hämoptysen führen ¹⁹. Patienten mit cystischer Fibrose können bei Befall eine allergisch-bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) ausbilden ²². Das weitaus größte Risiko für eine Besiedelung und eine zusätzliche invasive Erkrankung

haben jedoch stark immunsupprimierte Patienten. Sie sind höchst gefährdet, an der schwersten Form zu erkranken, der invasiven Aspergillose (IA) (Abbildung 5.2).

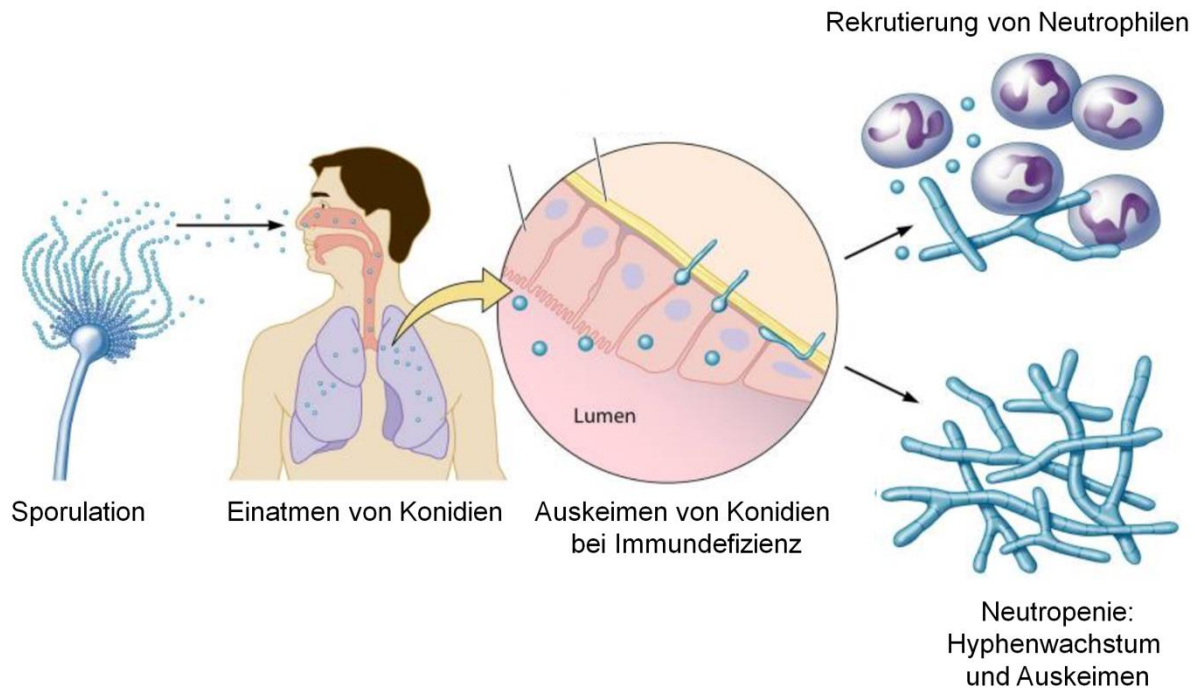


Abbildung 5.2 Entwicklung einer invasiven Aspergillose. Beim Immunkompetenten werden ausgekeimte Sporen durch das Immunsystem bekämpft (oben rechts). Im Falle einer Neutropenie kann das Myzel nicht suffizient bekämpft werden. Degenais et.al., eigene Bearbeitung ²³.

Die hohe Letalität von über 50 % ist abhängig von dem Zeitpunkt der Diagnose, der Art der Therapie und dem Ausmaß der Immunschwäche des Patienten ^{8,9,16}. Histologische Verfahren zum Nachweis einer Infektion sind zwar hoch spezifisch, aber aufgrund des hohen Aufwands und der Belastung des Patienten von untergeordneter Rolle. Bei der ABPA kann versucht werden, Antikörper gegen *A. fumigatus* nachzuweisen. Ist aber nur eine geringe Immunantwort vorhanden, ist der Nachweis von Antikörpern als Frühdiagnostik schwierig und das Resultat ist nur von mäßiger Aussagekraft, da ein negativer Nachweis eine Infektion nicht ausschließen kann ²¹. Bei immunsupprimierten Patienten ist die Immunantwort gehemmt, sodass auch bei ihnen ein Nachweis von Antikörpern schwierig ist ²¹. Deshalb haben die Histologie, Mikroskopie sowie das Anlegen von Kulturen weiterhin einen hohen Stellenwert ²⁴. Grundlage sind dabei Körperflüssigkeiten wie Sputum oder Bronchialsekret. Die Anzucht ist zeitintensiv und Kontaminationen sind häufig ²⁴. Der histologische Nachweis in Gewebeproben ist auch heute noch sehr wichtig. Mit speziellen Färbemethoden können Pilze spezifisch angefärbt und nachgewiesen werden. Um sie basierend auf ihrer Färbung einer bestimmten Gattung zuzuordnen, bedarf es viel Erfahrung ²⁴. Heutzutage ist daher entscheidend, Risikogruppen

frühzeitig prophylaktisch mit Antimykotika zu versorgen und eine engmaschige Diagnostik, auch mittels Computertomografie und bronchoalveolärer Lavage, durchzuführen^{8,25}. Ein häufig verwendetes Medikament war Amphotericin B, ein Polyen, das zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran im Pilz und so zum Zelltod führt. Seine Nebenwirkungen, besonders seine Nephrotoxizität, konnten durch eine liposomale Formulierung abgemildert werden. Durch die Einführung der Triazole wurde eine weitere Substanzklasse verfügbar, die durch die Hemmung von Ergosterol in Pilzen zu deren Zelltod führt²⁵. Zu Beginn wurde das Triazol Voriconazol (Handelsname VFEND) eingesetzt, das nach weiterer Forschung und Zulassung durch Posaconazol (Prophylaxe Medikation, auch gegen Zygomyceten) und zuletzt Isavuconazol ergänzt wurde^{26,27}. Aufgrund ihres reduzierten Nebenwirkungsprofils, ihrer hohen Bioverfügbarkeit und guten antifungiziden Wirkung zählen sie heute zu den wichtigsten Erstlinientherapeutika^{26,27}.

5.5 Interaktion von *Aspergillus fumigatus* mit dem Immunsystem

5.5.1 Lungenepithelzellen

Die erste Interaktion zwischen Sporen und dem menschlichen Körper findet für gewöhnlich auf dem Flimmerepithel der Atemwege statt. Dort wird kontinuierlich Fremdmaterial durch den Wimpernschlag der Zilien aus der Lunge befördert. Ohne diese Reinigung kommt es zum Verbleib von *A. fumigatus*-Sporen²⁸. Patienten mit cystischer Fibrose haben durch die hohe Viskosität des Schleims und der damit geringeren Clearance ein hohes Risiko für Pilzinfektionen²². In den Alveolen tragen Typ-II-Zellen durch die Bildung von Komplementfaktoren, Surfactant sowie Zytokinen zur Bekämpfung von *Aspergillus*-Sporen bei. Diese Stoffe erleichtern es den alveolaren Makrophagen, die Sporen aufzuspüren und abzutöten²⁹. Ein Bestandteil der Zellwand von Sporen ist das Exopolysaccharid Galactosaminogalactan. Es ist dafür verantwortlich, dass Sporen an Epithelzellen anhaften können³⁰. Die Sporen können so durch einen der Phagozytose ähnlichen Prozess in die Zellen eindringen. Das sich bildende Endosom reift weiter zu einem Phagolysosom, das dann die Sporen verdaut. Manche Sporen können sich diesem Mechanismus entziehen. Sie können auskeimen und so die Lungenbarriere überwinden (Abbildung 5.3)³¹.

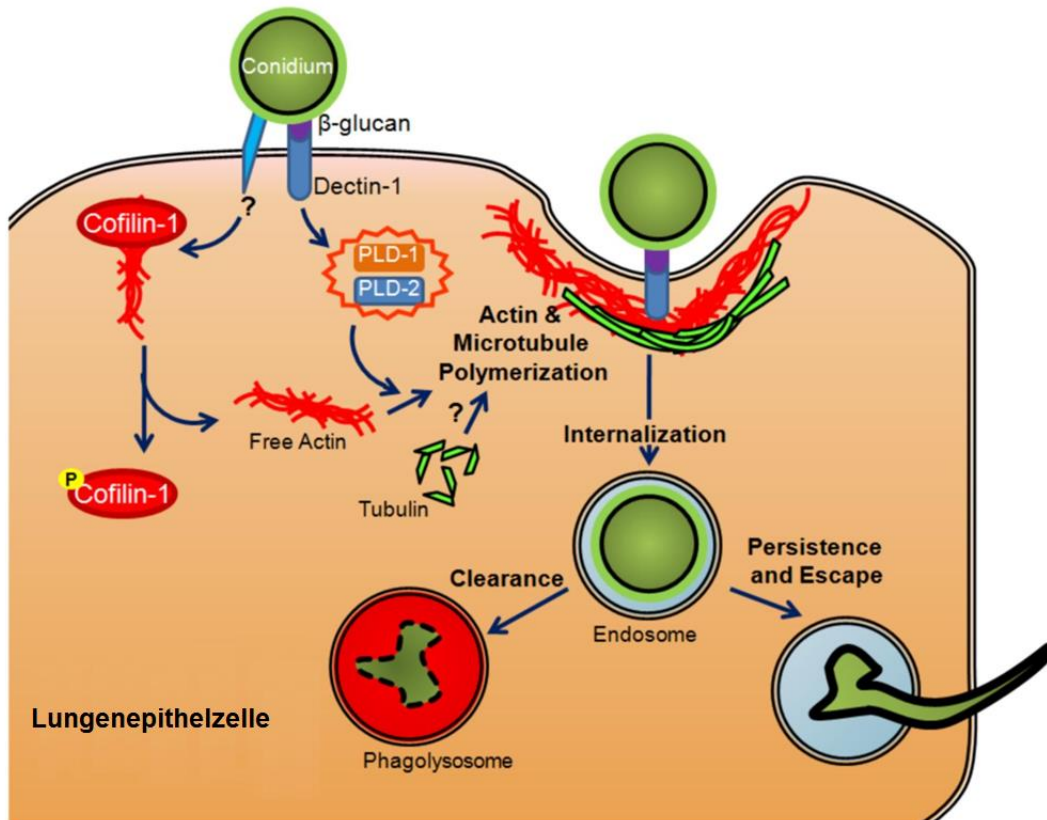


Abbildung 5.3 Phagozytose von Konidien durch eine Lungenepithelzelle. Wenn Sporen anschwellen, wird das β -Glucan in der Zellwand der Sporen durch Dectin-1 erkannt. Dann werden Phospholipasen (PLD-1 und PLD-2) aktiviert und die Aktinpolymerisation gefördert. Ein noch nicht charakterisiertes Signal führt zur Phosphorylierung von Cofilin-1, wodurch Aktin freigesetzt wird. Die Sporen werden dann durch Aktin- und Mikrotubuli-Polymerisation und Phagozytose internalisiert. Dann werden sie durch das endosomale System transportiert, wo sie abgebaut und vom Wirt entfernt werden. Sie können auch in geringer Zahl überleben, auskeimen und entkommen. Croft et al., eigene Bearbeitung ³².

5.5.2 Makrophagen

Sporen, die in die Alveolen der Lunge vorgedrungen sind, entziehen sich durch ihre angepasste Zellwandoberfläche dem Immunsystem. Dafür werden in die Zellwand die beiden hydrophoben Proteine RodA und RodB eingebaut, die eine polymere Stäbchenstruktur bilden ³³. Diese Struktur verhindert die Erkennung der Sporen durch Makrophagen. Interessanterweise werden sie im späteren Myzel nicht mehr exprimiert ^{33,34}. Wenn die ruhenden Sporen mit ihrem Anschwellen beginnen, kommt es zu einer weiteren strukturellen Veränderung ihrer Zellwandoberfläche¹¹. Die Polysaccharide α -Glucan, β -1,3-Glucan, β -1,4-Glucan, Chitin, Galactomannan und Polygalactosamin sind dann an der Oberfläche zu finden ³⁵. Durch Rezeptoren für die Mustererkennung („Pattern recognition receptors“, PRRs) der Makrophagen können diese Oberflächenmoleküle als pathogenassoziierte molekulare Muster („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) identifiziert und der Pilz durch

die Zellen bekämpft werden ^{11,36}. Die beiden Toll-like-Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 sowie der Dectin-1 beta-Glucan Rezeptor spielen dabei eine wichtige Rolle ^{37,38}. Ein Teil der ruhenden Sporen kann so identifiziert, phagozytiert und durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abgetötet werden ³⁹. ROS fallen als Nebenprodukte an, beispielsweise der Atmungskette, oder sie werden aktiv für die Signaltransduktion oder als Abwehrmechanismus gebildet ⁴⁰. Bei niedrigen Konzentrationen wirken sie als Redox-Messenger, antimikrobiell oder als Signal für den Zelltod ^{41,42}. Makrophagen nutzen das Enzym NADPH-Oxidase, um ROS-Spezies zu bilden und so dem Pilz zu schaden ⁴³. Bei der Interaktion kommt es auch zur Ausschüttung von Chemokinen und Cytokinen, durch die eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. So werden weitere Leukozyten wie neutrophile Granulozyten angelockt ^{44,45}. Ihre Fähigkeit zur Abtötung von Pilzhyphen und Sporen unterscheidet sich deutlich von der der Makrophagen: Während neutrophile Granulozyten innerhalb von 2 h 50 % der Sporen bekämpfen, benötigen Makrophagen für 90 % der Sporen 30 h ^{39,46}.

5.5.3 Neutrophile Granulozyten

Durch die von Sporen und Alveolarmakrophagen induzierte Entzündungsreaktion werden neutrophile Granulozyten durch chemotaktische Signale angelockt ⁴⁷. Auch durch Kontakt mit den in Serum enthaltenen IgG-Antikörpern können Hyphen opsoniert und durch den Fcγ-Rezeptor von neutrophilen Granulozyten erkannt werden ⁴⁷. Erste Arbeiten konnten dabei zeigen, dass neutrophile Granulozyten Hyphen und geschwollene Sporen, nicht aber ruhende Sporen angreifen ⁴⁸. In späteren Arbeiten zeigte sich aber, dass neutrophile Granulozyten auch zu Beginn einer Infektion einen entscheidenden Beitrag leisten können und auch auf ruhende Sporen reagieren ⁴⁹. Im Rahmen des „oxidative burst“ werden instabile Superoxidanionen (O_2^-) gebildet, die über eine SOD in H_2O_2 überführt werden können ⁵⁰. Mit Iod und Brom kann das Anion mittels Myeloperoxidase (MPO) in extrem starkes Hypochlorit oder Hypobromit oxidiert werden ⁵⁰. Mit Hilfe dieser reaktiven oxidativen Spezies sollen sich durch Schädigung von Lipiden, Proteinen oder der DNA Mikroorganismen gezielt abwehren lassen ⁵¹. Neutrophile Granulozyten verfügen zusätzlich auch über zahlreiche Granula, die im Rahmen der Immunantwort exozytiert werden und viele verschiedene antimikrobielle Substanzen und Proteine beinhalten ⁵². Das Protein Lactoferrin z. B. bindet Eisen-Ionen und kann so bereits die Auskeimung von Konidien unterbinden (Kapitel 5.6) ^{48,53}. Neutrophile

Granulozyten sind so zum einen in der Lage, Sporen am Auskeimen zu hindern und so Makrophagen einen Zeitgewinn zu verschaffen. Ausgekeimte Hyphen sollen dann durch ROS geschädigt werden⁵³. Ein weiterer Mechanismus ist das Sezernieren von neutrophilen extrazellulären Fallen („*neutrophil extracellular traps*“, NETs). Dabei setzen neutrophile Granulozyten ein Netzwerk aus extrazellulären Fasern und DNA frei, das sich wie ein Netz um die Erreger legt. Eingebettet in diese Matrix sind verschiedenste Proteine und antimikrobielle Stoffe. Dazu gehören unter anderem Calprotectin, das Zink-Ionen bindet, und Lactoferrin, das Eisen-Ionen bindet⁵².

5.5.4 Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Abwehr von *Aspergillus fumigatus*

Die Rolle von ROS bei der Abwehr von *Aspergillus*-Infektionen wird im Rahmen des Krankheitsbildes der septischen Granulomatose (SG) deutlich. Bei diesem genetischen Defekt ist der NADPH-Oxidase-Komplex der Neutrophilen betroffen^{54,55}. Sie können intrinsisch keine ROS-Spezies bilden, was in einer erhöhten Anfälligkeit für eine IA resultiert (Abbildung 5.4)^{56–58}. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde dem Mechanismus des „*oxidative burst*“ eine große Bedeutung bei der Abwehr der invasiven Aspergillose durch *A. fumigatus* zugesprochen⁵⁹.

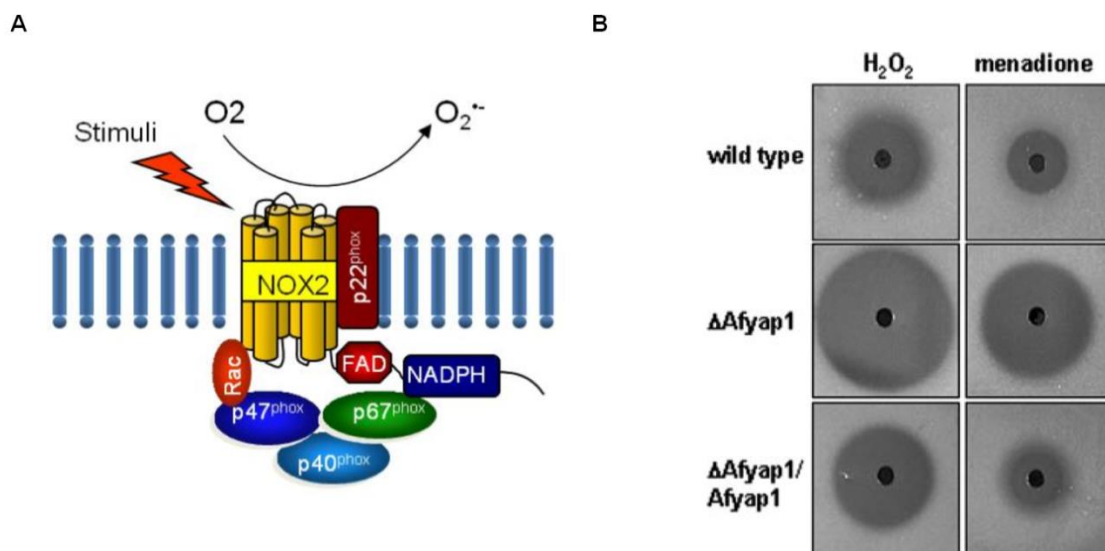


Abbildung 5.4 A: NADPH-Oxidase-Komplex zur Bildung von Superoxid-Ionen⁶⁰. B: Gendeletion von *Yap1* in *A. fumigatus* führt zu einer gesteigerten Sensibilität gegenüber ROS, was sich durch deutlich vergrößerte Hemmhöfe zeigt⁶¹. Paik und Lesson et al.⁶⁰, eigene Bearbeitung.

Neuere Untersuchungen lieferten weitere Erkenntnisse zur Gewichtung dieses Mechanismus. Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt,

um gezielt ROS zu neutralisieren⁶². Superoxid-Dismutasen (SODs) und Katalasen (CATs) sind Proteine, die intrazellulär den physiologisch gebildeten ROS entgegenwirken^{63,64}. Die Annahme, sie wären wichtige Virulenzfaktoren, konnte in Mausinfektionsmodellen nicht bestätigt werden. Allerdings zeigt sich eine Deletionsmutante dreier SODs deutlich sensibler gegenüber Makrophagen als der Wildtyp⁶⁵^{66–68}. In weiteren Untersuchungen konnte das Stress-Gen *Yap1* in *Saccharomyces cerevisiae* und später dessen homologes Protein des *Yap1* in *A. fumigatus* gefunden werden. Besonders bei ROS-induziertem Stress wird *Yap1* verstärkt exprimiert. Die Deletion dieses Gens in *A. fumigatus* zeigt einen hochsensiblen ROS-Phänotyp (Abbildung 5.4 B). Interessanterweise ist diese Mutante im Mausinfektionsmodell nicht avirulent^{61,69,70}. Im Rahmen von Untersuchungen mit *Aspergillus nidulans* stellten Henriët et al. erstaunlicherweise fest, dass der Pilz durch eine ROS-unabhängige Weise durch Leukozyten abgetötet werden kann⁷¹. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die Rolle von ROS womöglich weniger gewichtig ist als angenommen.

5.5.5 Das Peroxiredoxin Asp3

Asp3 ist eine Thioredoxin-Peroxidase (Peroxiredoxin), die 1998 als Oberflächenprotein in Sporen von *A. fumigatus* zunächst als potentes Allergen identifiziert wurde^{72,73}. Auf der Suche nach Impfstoffen gegen *Aspergillus* zeigte sich bei mit Asp3 vakzinieren Mäusen ein signifikant verbessertes Überleben⁷⁴. Asp3 findet sich nicht nur auf der Sporenoberfläche, sondern auch in der Membran von Peroxisomen. Außerdem wird Asp3 unter Stressbedingungen (H_2O_2 , Hitze-Schock) verstärkt exprimiert^{73,75,76}. Asp3 katalysiert verschiedene Redox-Reaktionen, wobei eine reaktive –SH-Gruppe eines zentralen Cysteins (Cys) den Reaktionsort definiert⁷⁷.

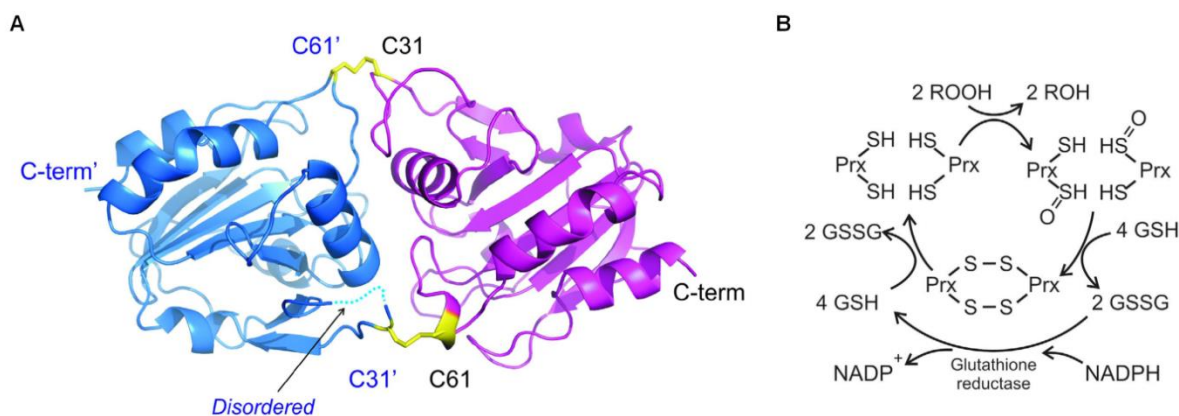


Abbildung 5.5 A: Asp3 bildet ein Homodimer, dessen zwei Untereinheiten (Magenta und Blau) sich an C31 und C61 entgegengesetzt gegenüberstehen. In der oxidierten Form sind beide Untereinheiten an dieser Stelle durch

eine Disulfidbrücke verbunden (gelb). **B:** Reaktionszyklus eines Peroxiredoxins. Nach Oxidation wird es durch Glutathion (GSH) in seinen Ursprungszustand zurückreduziert, während Glutathion zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Glutathiondisulfid wird durch die Glutathionreduktase seinerseits reduziert unter dem Verbrauch von NADPH. Aus Hillmann et al., eigene Bearbeitung ⁷⁷.

Peroxiredoxine können in 2-Cys- oder 1-Cys-Unterfamilien untergliedert werden ^{78–80}. Aspf3 gehört zu den 2-Cys-dimerischen Peroxiredoxinen der Thiol-basierenden Familie, die dem humanen Prx5 sehr ähnlich sind ⁸¹. In oxidiertem Zustand verbinden zwei intermolekulare Disulfidbrücken die beiden Protomere an C31S und C61S (Abbildung 5.5 A). Die Familie ist in Mitochondrien, Peroxisomen und im Cytosol für die Reduktion von ROS wie H₂O₂ oder Alkylhydroperoxiden zuständig. Thiol-tragende Spendermoleküle wie Thioredoxine oder Glutathion stellen dabei die Oxidationsäquivalente zur Verfügung und werden ihrerseits wieder reduziert (Abbildung 5.5 B) ^{77,81}.

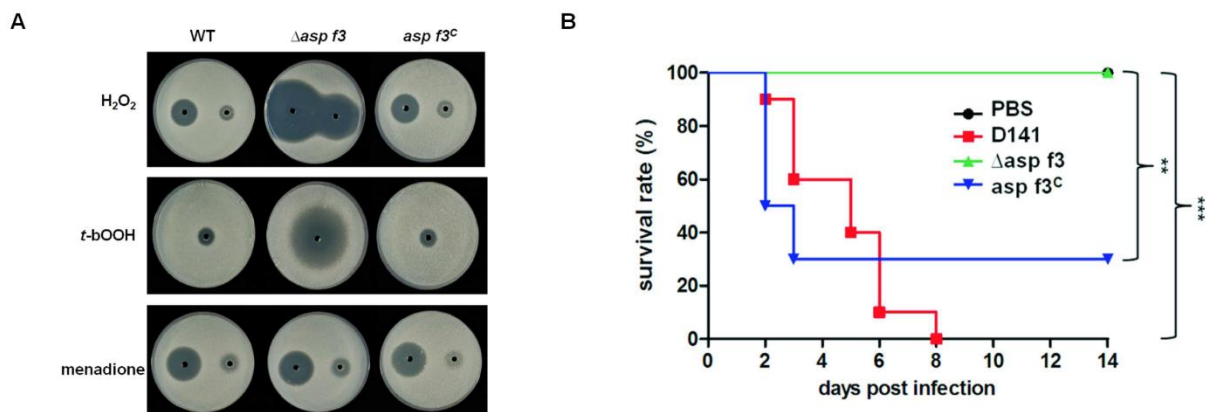


Abbildung 5.6 Phänotyp der Deletion von Asp3 in *A. fumigatus*: **A:** *A. fumigatus* (WT), die Deletionsmutante $\Delta asp3$ sowie deren Komplementante $asp3^c$ wurden den ROS-Substanzen H₂O₂ und t-bOOH sowie Menadione ausgesetzt. Die Deletionsmutante zeigt sich besonders sensitiv gegenüber H₂O₂ und t-bOOH. **B:** In einem Mausinfektionsexperiment zeigt sich die Avirulenz von $\Delta asp3$ (grün). Für jeden Stamm wurden 10 Mäuse mit Kortisonacetat immunsupprimiert und intranasal mit Sporen des WT-Stamms, der $\Delta asp3$ -Deletionsmutante und des komplementierten Stamms $asp3^c$ infiziert. Die Kontrollgruppe wurde als Negativkontrolle mit PBS behandelt. Das Diagramm zeigt den Prozentsatz der Überlebenden an jedem Tag nach der Infektion. Modifiziert aus Hillmann et al., eigene Bearbeitung ⁷⁷.

Eine Asp3-defiziente Mutante zeigt eine hohe Sensibilität gegenüber ROS-Substanzen wie H₂O₂, tert-Butylhydroperoxid und Menadion (Abbildung 5.6 A). In einem Mausinfektionsexperiment zeigte sich darüber hinaus eine komplette Avirulenz einer $\Delta asp3$ -Mutante, die durch Komplementation wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 5.6 B).

5.6 Lactoferrin

5.6.1 Entdeckung und Vorkommen

Das Protein Lactoferrin wurde erstmalig 1940 durch Sorensen und Sorensen beschrieben⁸². Später konnten Groves und Johansson das Protein als wichtigen Milchbestandteil aus boviner und humaner Milch isolieren und seine Eigenschaft als Eisenchelator nachweisen^{83,84}. Lactoferrin gehört zur Proteinfamilie der Transferrine und kann wie Serumtransferrin reversibel zwei Atome Eisen binden, wobei sich beide Proteine in ihrer Bindungsstärke deutlich unterscheiden^{85,86}. Masson et al. fanden heraus, dass Lactoferrin in neutrophilen Granulozyten zu finden ist⁸⁷. 1963 konnten Gernez-Rieux et al. das Protein im menschlichen Sputum von Bronchitis-Patienten nachweisen⁸⁸. Im Verlauf konnte Lactoferrin außerdem in vielen weiteren Körperflüssigkeiten wie Speichel, Tränenflüssigkeit, Pulmonalsekret sowie in menschlichem Nierengewebe nachgewiesen werden⁸⁹.

5.6.2 Struktur

1982 erfolgte die Aufklärung der Primärstruktur des humanen Lactoferrins durch Spik et al., gefolgt von der dreidimensionalen Darstellung durch Anderson 1987 und 1989 mittels radiologischer Kristallographie⁹⁰⁻⁹². Humanes Lactoferrin besteht aus 692 Aminosäuren, die zwei homologe Lappen mit einer Sequenzhomologie von 40 % bildet^{90,93}.

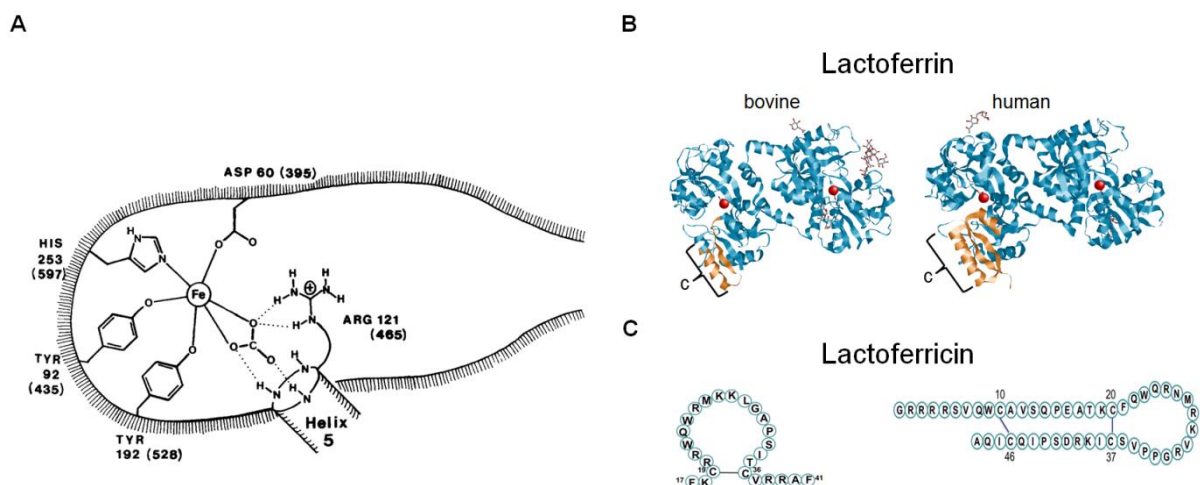


Abbildung 5.7 Struktur von Lactoferrin. **A:** Bindestelle für Eisenionen. **B:** Humanes und bovines Lactoferrin im Strukturvergleich. **C:** Vergleich der Aminosäuresequenz der N-Terminalen Region des bovinen (links) und humanen (rechts) Lactoferrins. Modifiziert nach Baker sowie Vega-Bautista et al., eigene Bearbeitung^{94,95}.

Der N-Lappen, bestehend aus den ersten 333 Aminosäuren, ist mit einer kurzen α -Helix am C-Lappen, bestehend aus den Aminosäuren 345-692, verbunden. In beiden Lappen sind jeweils zwei Bereiche, N1 und N2 bzw. C1 und C2 vorhanden. Ein Aspartat, Histidin und zwei Tyrosinreste (Tyr92 und 192, Asp60 His253 im N-Lappen sowie Tyr435 und 528, Asp395 und His597 im C-Lappen) bilden zwischen beiden Bereichen eine reversible Bindestelle für Metallionen. Hierfür ist zudem ein Carbonat- oder Bicarbonat-Anion nötig, das durch den N-Terminus von Helix 5 sowie einem Arginin (Arg121) im N-Lappen und einem Arginin (Arg465) im C-Lappen fixiert wird (Abbildung 5.7 A). Lactoferrin kann bei der Bindung von Eisen zunächst eine ungebundene, mit einem Eisenatom eine monoferrische oder mit zwei Eisenatomen eine diferrische Form annehmen. In der ungebundenen Apo-Form ist die Bindungstasche des N-Lappens geöffnet. Nach Koordination eines Eisenions an den Tyrosinresten sowie Carbonat-Anion kommt es zu einer Rotation des N2-Bereichs um 54° um den N1-Bereich. Hierdurch wird die Bindung zum Eisenion durch Asp60 und His253 vervollständigt. Durch die Konformationsänderung kommt es auch zu einer Signalübertragung auf den C-Lappen und dessen Interaktion mit dem Eisenion^{94,96,97}. Im Vergleich zu Serum-Transferrin besteht eine Sequenzhomologie von 60 %, wobei die Eisenaffinität von Lactoferrin 300-mal höher ist. Dies gilt auch bei einem sauren pH-Wert von bis zu 3,5⁹⁸. Innerhalb der Klasse der Säugetiere besteht bei Lactoferrin ein Unterschied von 30 % in der Aminosäuresequenz, wobei das bovine Lactoferrin dem humanen sehr ähnlich ist (Abbildung 5.7 B)^{96,99}.

5.6.3 Antimikrobielle Wirkung

Die biochemischen Eigenschaften sowie das Vorkommen in Entzündungszellen und vielen Körperflüssigkeiten ließen den Schluss zu, dass Lactoferrin antimikrobielle Eigenschaften hat. Pathogene wie Bakterien oder Pilze benötigen Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor und verfügen über verschiedene Mechanismen, Eisen zu lösen, zu mobilisieren und anschließend aufzunehmen (siehe Abschnitt 5.7)^{98,100,101}. In entzündlichem Gewebe kommt es zu einem pH-Wert-Abfall aufgrund der Akkumulation von organischen Säuren⁹⁸. Im Gegensatz zu Transferrin verliert Lactoferrin erst bei sehr niedrigen pH-Werten seine Affinität zu Eisen, weshalb es Mikroorganismen an der Aufnahme von Eisen hindert⁹⁸. Diesen Mechanismus unterstützen Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten mit ihrer aktiven Freisetzung von Lactoferrin. Zarembek et al. zeigten, dass das Zelllysate aus

neutrophilen Granulozyten reich an Lactoferrin ist. Das Zelllysate ist in der Lage, Sporen von *A. fumigatus* am Auskeimen zu hindern und so eine Infektion zu verhindern (Abbildung 5.8) ¹⁰². Dies konnte auch bei Myeloperoxid-defizienten Granulozyten von SG-Patienten gezeigt werden. SG-Patienten können so trotzdem bis zu einem bestimmten Maß vor *A. fumigatus*-Infektionen geschützt werden ⁵³. Eisen spielt dabei eine fundamentale Rolle für die Virulenz von *A. fumigatus* ¹⁰³. Nicht nur das Wachstum, sondern auch die Morphologie kann durch Lactoferrin beeinflusst werden. Ellett et al. konnten zeigen, dass Lactoferrin und neutrophile Granulozyten nicht nur auf Sporen wirken, sondern auch das Wachstum von Hyphen morphologisch beeinflussen ¹⁰⁴. So lassen sich bei den Hyphen vermehrte Aufzweigungen beobachten, bei gleichzeitig reduzierter Wachstumsgeschwindigkeit. Die einzelnen Abgänge sind dünner und das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis nimmt bei gleichbleibender Masse zu ¹⁰⁴. Interessanterweise sind Mutanten, die diesen Wachstums-Phänotyp aufweisen, auch durch eine erhöhte ROS-Sensibilität gekennzeichnet ^{104,105}.

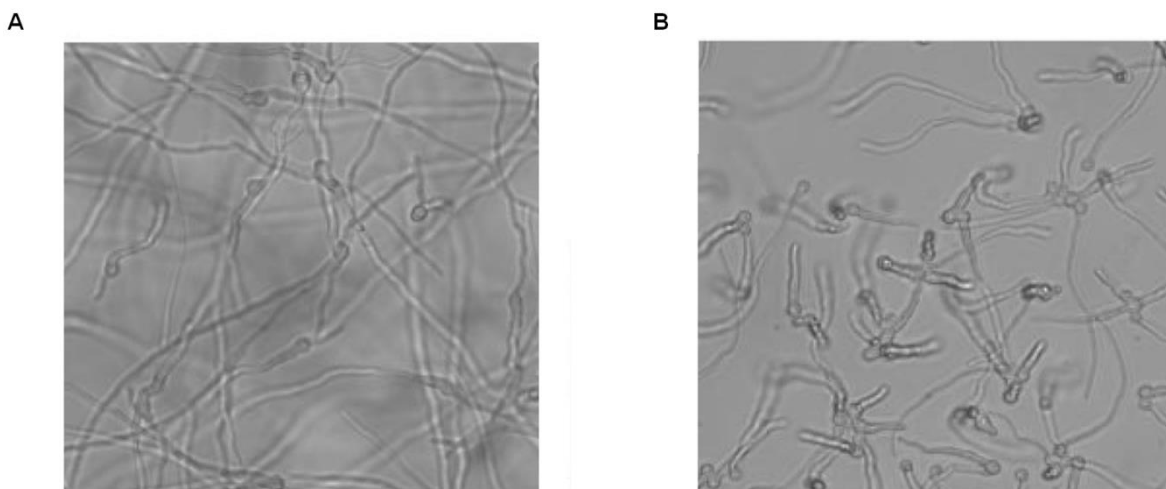


Abbildung 5.8 Wachstumsinhibition durch ein Zelllysate aus humanen Neutrophilen Granulozyten. Durch 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) wurden humane Neutrophile Granulozyten in RPMI 1640 Medium stimuliert und entließen einen Wachstumsinhibierenden Stoff. Sporen von *A. fumigatus* wurden ohne (A) oder mit (B) dem so gewonnenen Zelllysate inkubiert. Später wurde der wachstumsinhibierende Stoff als Lactoferrin identifiziert. Modifiziert nach Zarembek et al., eigene Bearbeitung ⁵³.

In der Struktur des Lactoferrins ist am N-terminus eine weitere Aminosäuresequenz enthalten, das Lactoferricin, welches antimikrobielle Eigenschaften hat ¹⁰⁶. Sie besteht aus einer basischen Sequenz zwischen 25 (bovin) und 47 (human) Aminosäuren (Abbildung 5.7 B und C). In neueren Studien wurde ein weiteres Peptid, das Lactoferrampin, entdeckt. Es befindet sich auch am N-terminus und besitzt auch antimikrobielle Eigenschaften ^{107,108}. Wenn Lactoferricin und

Lactoferrampin durch saure Proteasen vom Holoprotein abgetrennt werden, kann eine intensivere antimikrobielle Wirkung gemessen werden, als gebunden an das Gesamtprotein^{95,106,109}. Die Peptide penetrieren die Zellmembran gramnegativer Bakterien und führen so auch zu einer Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS), die das Immunsystem aktivieren^{108,110,111}. Auch Pilzspezies wie *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* und viele weitere zeigen teils hohe Empfindlichkeiten gegenüber diesen Peptiden¹¹².

5.7 Eisenaufnahme bei *Aspergillus fumigatus*

Die Eisenaufnahme ist für pathogene Mikroorganismen wie *A. fumigatus* essenziell¹¹³. Insbesondere bei einer Infektion ist die Verfügbarkeit von Eisen sehr gering und eine direkte Aufnahme aus Wirtsquellen (Häm, Transferrin) erschwert^{113,114}. Die Eisenaufnahme in Pilzen wird durch ein niedrigaffines und ein hochaffines System, nämlich die reduktive Eisenaufnahme (RIA) und die Synthese von Siderophoren, gewährleistet¹¹³. Bei der RIA wird Eisen zunächst durch eine plasmamembranseitige Eisenreduktase (Fre) reduziert, um nach Reoxidation durch einen Proteinkomplex (FetC/FtrA) aufgenommen zu werden¹¹⁵. Das niedrigaffine Aufnahmesystem wurde bisher nur in *S. cerevisiae* gefunden¹¹⁶. *A. fumigatus* scheidet Siderophore in seine Umgebung aus. Dies sind niedermolekulare hochaffine Eisenchelatoren, die Eisen aus der Umgebung binden können¹¹⁴. Fusarinine C (FsC) und Triacetylfusarinine C (TAFC) sind zwei Siderophore, die nach Eisenbindung wieder durch einen Eisentransporter (SIT) aufgenommen werden können. Im Zellinneren wird das Eisen anschließend freigesetzt und steht dort für zelluläre Reaktionen zur Verfügung¹¹⁷. Durch die zwei internen Siderophore Hyphen-Ferricrocin (FC) und Sporen-Hydroxyferricrocin (HFC) kann Eisen zusätzlich in Vacuolen gespeichert und je nach Wachstumsphase genutzt werden (Abbildung 5.9)^{118,119}. Die Siderophoren-Biosynthese ist essentiell für die Virulenz von *A. fumigatus*¹¹³.

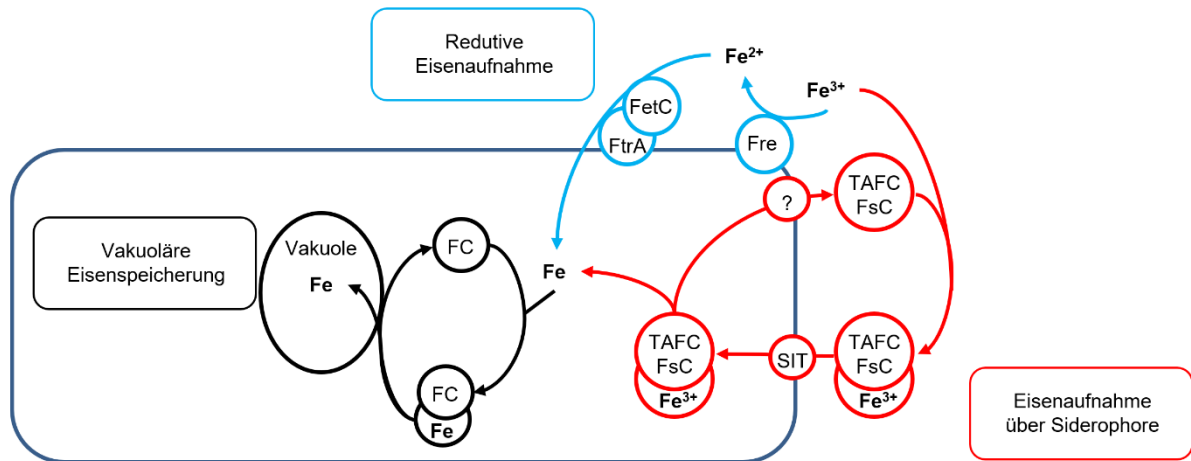


Abbildung 5.9 Übersicht über die Mechanismen der Eisenaufnahme in *A. fumigatus*. Die reduktive Eisenaufnahme (blau) beginnt mit der Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch die in der Plasmamembran lokalisierte Eisenreduktase (FRE). Anschließend wird das Eisen durch einen Proteinkomplex aus der Ferroxidase (FetC) und Eisenpermease (FtrA) importiert. Bei der Aufnahme durch Siderophore (rot), wird Eisen durch diese niedermolekularen, eisenspezifischen Chelatbildner gebunden und zusammen über den siderophorenspezifischen Importer (SIT) in das Zellinnere aufgenommen. Durch die zwei internen Siderophore Hyphen-Ferricrocin (FC) und Sporen-Hydroxyferricrocin, kann Eisen in den Vakuolen gespeichert werden. Modifiziert nach Schrettl et al., eigene Bearbeitung ¹¹⁷.

Die Regulation der Siderophorensynthese wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren SreA und HapX gesteuert. Da große Mengen an intrazellulärem Eisen toxisch sein können, wird bei ausreichender Konzentration durch SreA die Siderophorensynthese gehemmt ¹²⁰. Umgekehrt wirkt bei Eisenmangel HapX durch die Hemmung von eisenverbrauchenden Stoffwechselwegen und einer Aktivierung der Eisenaufnahme durch die Aktivierung der Siderophorensynthese ¹²¹. Dadurch ist es *A. fumigatus* möglich, sich schnell in verschiedenen Medien schnell zu adaptieren.

5.8 Übersicht über Messmethoden, um fungizide Eigenschaften von Immunzellen zu messen

Es ist wichtig, die Vorgänge bei einer Infektion mit *A. fumigatus* zu verstehen und die dabei ablaufenden Abwehrmechanismen von Immunzellen zu analysieren und zu bewerten. Neutrophile Granulozyten haben unterschiedliche antimikrobielle Mechanismen wie die Erzeugung von ROS, das Freisetzen von Granula gefüllt mit Lactoferrin, Calprotectin und Proteasen oder aber die Generierung von NETs ^{47,122–124}. Diese einzelnen Mechanismen näher zu untersuchen und deren Bedeutung zu vergleichen, ist für die Bewertung der einzelnen Mechanismen wichtig. Auch ist interessant, wie sie auf den Pilz einwirken. Gazendam et al. konnten zeigen, dass

neutrophile Granulozyten auch in der Lage sind, Sporen am Auskeimen zu hemmen⁴⁷. In der Literatur beschriebene Methoden zum Testen der Interaktion von Immunzellen mit *A. fumigatus* beruhen meistens auf der Messung der verbliebenen kolonienbildenden Einheiten („colony-forming units“, CFU)¹²³. Für Bakterien, Hefen oder Sporen kann dies eine geeignete Methode sein, aber für einen multizellulären filamentösen Organismus wie *A. fumigatus* ist diese Methode höchst kompliziert. Zählbare CFU korrelieren nicht unbedingt mit der Anzahl von vitalen Kompartimenten von *A. fumigatus*¹²⁵. Während auf Quantifizierung der metabolischen Aktivität basierende Vitalitätsassays unter Umständen Abhilfe schaffen könnten, wird dabei allerdings nur die Gesamtvitalität über die Zeit gemessen. So kann nicht im Detail zwischen vitalem oder abgetöteten Pilz und/oder einer Wachstumsinhibition unterschieden werden^{126,127}. Neuere Arbeiten nutzten zur Messung der Vitalität ein in *A. fumigatus* durch Gentechnik eingebrachtes cytosolisches Fluoreszenzprotein^{128–131}. Allerdings ist dabei die fortwährende Expressionsrate des Proteins sowie die Halbwertszeit des Fluorophors zu bedenken¹³². Es zeigt sich daher der große Bedarf nach einer neuen Methode, fungizide Eigenschaften von Agenzien auf zellulärer Ebene zu erkennen und zu quantifizieren.

6 Zielsetzung

Das Peroxiredoxin Asp3 ist als Allergen und Impfstoffkandidat sowie als wichtiger Virulenzfaktor von *A. fumigatus* bekannt. Seit zwei Jahrzehnten wird es auf seine zellulären Funktionen untersucht. Frühere Ergebnisse haben gezeigt, dass Asp3 sehr wichtig für den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies ist und eine *asp3*-Deletionsmutante sehr sensibel gegenüber ROS-Stress reagiert. In einem Mausinfektionsmodell zeigte sich, dass die *asp3*-Deletionsmutante avirulent ist. Es wurde angenommen, dass die hohe Empfindlichkeit gegenüber ROS-Spezies, die durch Immunzellen erzeugt werden können, die Ursache für die Avirulenz ist.

Die Hypothese, dass die Avirulenz von Δ *asp3* auf ihre hohe ROS-Empfindlichkeit zurückzuführen ist, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Hierzu sollte eine Mutante erzeugt werden, deren *asp3*-Promotor durch einen durch Doxycyclin induzierbaren Promotor ersetzt wird. Durch das Fehlen von Doxycyclin im Medium sollte ein Phänotyp, ähnlich dem einer Deletionsmutante, beobachtet werden. Für die Untersuchung der Mutante auf ihre Sensibilität gegenüber ROS-Stress und humanen neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Wildtyp sollte eine in der Arbeitsgruppe neu etablierte Methode angewandt werden.

Dabei lässt die Visualisierung der Mitochondrienmorphologie durch ein Grün fluoreszierendes Protein (GFP) Rückschlüsse auf die Vitalität der Hyphen zu und ermöglicht eine Lebend-/Tot-Differenzierung. Die hierbei gewonnen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Funktion von Asp3 während einer Infektion besser zu verstehen.

7 Material und Methoden

7.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien, die zur Anfertigung dieser Arbeit dienten, wurden von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg). Wenn möglich wurde stets der höchste Reinheitsgrad „pro analysis“ (p.a.) bezogen. Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Madison, USA), Quiagen (Hilden), Sigma Aldrich (Steinheim). Lactoferrin wurden von der Firma Ingredia (Ingredia SA, Arras Cedex, Frankreich) bezogen.

7.2 Geräte

CO ₂ -Inkubator	UniTec, Revo Ultima
Digitalkamera	Canon,
Gelkammer	BioRad, Power Pac 1000
Magnetrührer	Heidolph, MR3001K
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus, Function Line
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM LB, SP5
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25
PCR Gerät	Biometra, T Gradient
pH-Meßgerät	Toledo 320
Photometer	Amersham Biosciences, Ultrospec 10
Schüttelinkubator	Brunswick Scientific, Series 25
Sterilbank	Heraeus, Hera Safe
Thermomixer	Eppendorf
Vortexer	Scientific Instruments
Zentrifuge	Sigma Laboratory, 6K15
Zentrifuge	Eppendorf, 5417R

7.3 *Aspergillus* – Stämme

Tabelle 7.1: *Aspergillus*-Stämme dieser Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
AfS35	Wildtyp, non homologous end joining defizient	Krappmann et al. ¹³³
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i>	Wildtyp	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 $\Delta af3/1$	Wildtyp	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 $\Delta af3/2$	Wildtyp	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 $\Delta af3/1 \Delta af12$	AfS35 $\Delta af3/1$	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/1$	AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i>	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/2$	AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i>	Brantl et al. ¹³⁴
$\Delta af3/1 \Delta af3/2$ AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i>	AfS35 $\Delta af3/1 \Delta af12$	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 $\Delta sreA$	Wildtyp	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta sreA$	AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i>	Brantl et al. ¹³⁴
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/1 \Delta sreA$	AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/1$	Brantl et al. ¹³⁴
D141		Hillmann et al. ⁷⁷
D141 $\Delta aspf3$		Hillmann et al. ⁷⁷
AfS35 Mito GFP	Wildtyp	Ruf et al. ¹²⁵
AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/1$ Mito GFP	AfS35 <i>aspf3</i> _{tetOn} <i>OliC</i> $\Delta af3/1$	Brantl et al. ¹³⁴

7.4 Humane polymorphe Neutrophile

Tabelle 7.2: Zellisolate

Stamm	Bezugsquelle
humane polymorphe Neutrophile	jeweils frische Isolierung

7.5 Oligonukleotide und Vektoren

Tabelle 7.3: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Interne Nummer
<i>aspf3</i> -Afu6g02280-5fwd	CACGACTTGACGCCACCAG	1307
<i>aspf3</i> -Afu6g02280-5rev mit Sfil Schnittstelle	CGGGCCATCTAGGCC GCCGGCAAATGATGTGCC	1308
<i>aspf3</i> -Afu6g02280-3fwd mit Sfil Schnittstelle	GTGGCCTGAGTGGCC ATGTCTGGACTCAAGGCCGG	1309
<i>aspf3</i> -Afu6g02280-3rev	CAAGCACCAATAGCAGCCTGG	1310

aspf3-Afu6g02280-5cast	GGTGGTACGCGTACATCTCATC	1311
aspf3-Afu6g02280-3cast	GGTTGGTAGCTCAGGTGCAGC	1312
af3l1-5g01440-5-fwd	GAAGCGGGTCGTCGAGTTC	1336
af3l1-5g01440-5-rev mit Sfil Schnittstelle	CGGGCCATCTAGGCC GACTGCATAACTGGCTGAGTC	1337
af3l1-5g01440-3-fwd mit Sfil Schnittstelle	GTGGCCTGAGTGGCC GACGATCGAGCTGTGTAGTTC	1338
af3l1-5g01440-3-rev	GGGTGTAGATCTACATACCAGG	1339
af3l1-5g01440-5-cast	TCATCG AAG CCA CCG CCGT	1344
af3l1-5g01440-3-cast	TCG GGC TGT GTG TGT CAG TC	1345
af3l2-6g12500-5-fwd	GTCCCAAGTCCTAACGCTC	1340
af3l2-6g12500-5-rev mit Sfil Schnittstelle	CGGGCCATCTAGGCC TTGCAGTGCATCTGCTGCC	1341
af3l2-6g12500-3-fwd mit Sfil Schnittstelle	GTGGCCTGAGTGGCC TTGTTGGTACAGTGGCAGCTC	1342
af3l2-6g12500-3-rev	GATAGCTTGCGCCACGATG	1343
af3l2-6g12500-5-cast	TGA TGG TGG AGG GGA AGT CT	1346
af3l2-6g12500-3-cast	ACC AAG GTA CAC CCC AAG CG	1347
sreA-5g11260-5fwd	CAGGCAGCAGCTGCAATAGC	1348
sreA-5g11260-5rev mit Sfil Schnittstelle	CGGGCCATCTAGGCC CGCCACTATCAACCCTCACC	1349
sreA-5g11260-3fwd mit Sfil Schnittstelle	GTGGCCTGAGTGGCC GCGCAGTCCCTTCACTATC	1350
sreA-5g11260-3rev	CTAATCGACTACTCGGCGC	1351
sreA-5g11260-5cast	CGATCTGGGGGGAGGAAAAG	1352
sreA-5g11260-3cast	CGTACAGCGTGCACGTCTAC	1353

Tabelle 7.4: verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Bezugsquelle
pSK528	Hygromycinresistenz	Sven Krappmann, Würzburg
pSK379 GFP	Phleomycinresistenz, Mito-GFP	Sven Krappmann, Würzburg, modifiziert durch Johannes Wagener, München
pJW128	Pyrithiaminresistenz	Sven Krappmann, Würzburg

Tabelle 7.5: verwendete Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	Insert	Ausgangsvektor
<i>aspf3_{tetOn} OllC</i>	Doxycyclinpromotor	pJW128
<i>del_af3l1</i>	Deletionskassette	pSK528
<i>del_af3l2</i>	Deletionskassette	pSK528
<i>del_sreA</i>	Deletionskassette	pSK528
Mito-GFP	GFP	pCH005 GFP

7.6 Kulturmedien für *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus Minimalmedium:

Tabelle 7.6: *Aspergillus* Minimalmedium AMM ¹³⁵

Substanz	Menge
Salzlösung 20X (Tabelle 7.7)	50 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5 ml (0,4 M)
Spurenelemente (Tabelle 7.8)	1 ml
Glukose	10 g
H ₂ O _{dd}	ad 500 ml für 2x, autoklavieren ad 1000 ml für 1x, autoklavieren

eine pH-Wert Einstellung ist nicht nötig.

Für AMM ohne Glucose wurde diese Komponente durch H₂O_{dd} ersetzt.

Tabelle 7.7: Salzlösung 20x

Substanz	Menge
NaNO ₃	120,0 g
KCl	10,4 g
KH ₂ PO ₄	16,3 g
K ₂ HPO ₄	20,9 g
H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml, autoklavieren

Tabelle 7.8: Spurenelemente-Lösung ¹³⁵

Substanzen	Menge
Lösung I	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
Na ₃ EDTA x 4 H ₂ O	10,0 g
H ₂ O _{dd}	80 ml
Substanzen	Menge
Lösung II	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	4,40 g
H ₃ BO ₃	2,20 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,00 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,32 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,32 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x4H ₂ O	0,22 g
H ₂ O _{dd}	ad 80 ml

Die Herstellung erfolgte nach der Vorschrift von Hill et al.: Zunächst wurde Lösung I hergestellt und mit KOH-Pellets ein pH-Wert von 5,5 eingestellt. Zu der resultierenden gelben Lösung wurde Lösung II langsam zugegeben. Nach Einstellung des finalen pH-Wertes von 6,5 mit KOH wurde auf 200 ml aufgefüllt, steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert ¹³⁵.

2x AMM-Agar

Tabelle 7.9: AMM-Agar (2-fach konzentriert)

Substanz	Menge
Bacto Agar	20 g
Glucose	10 g
H ₂ O _{dd}	ad 500 ml für 2x, autoklavieren

Der flüssige 2x AMM-Agar wurde mit 2x AMM-Medium, das ohne Glucose hergestellt wurde, 1:1 vermischt und in sterile Zellkulturflaschen oder Petrischalen gegossen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C

2 % Pepton

Tabelle 7.10: 2 % Pepton

Substanz	
Pepton (Oxoid)	20 g
H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit NaOH oder HCl exakt eingestellt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 7.11: Sabouraud Medium

Substanz	Menge
Pepton	20 g
Glucose	40 g
H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml, autoklavieren

2 % Agarose

Tabelle 7.12: 2 % Agarose

Substanz	
Agarose	2 g
H ₂ O _{dd}	ad 100ml

RPMI-1640-Medium

Tabelle 7.13: RPMI-1640-Medium nach European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast) ¹³⁶

Substanz	
RPMI-1640 (Sigma, Gibco)	20,8 g
Glucose	36,0 g
MOPS	69,06 g
H ₂ O _{dd} Thermo Fisher	ad 1000 ml für 2x; ad 2000 ml für 1X

Bezugsquellen in diesem Fall: RPMI-1640: Thermo Fisher Scientific Inc. (#51800; Gibco); Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA (#R6504; Sigma), Glucose (#X997.2; Carl Roth, Germany), 4-Morpholin-propansulfonsäure (MOPS) (#6979.2; Carl Roth, Germany), H₂O_{dd} Thermo Fisher (#10977; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Nach dem Lösen in ca. 900 ml H₂O_{dd} wurde der pH-Wert mittels 1 M NaOH auf pH = 7,0 eingestellt, anschließend auf das gewünschte Volumen verdünnt und steril filtriert.

Für alle anderen wurde fertiges RPMI-1640 (Fa. Gibco) ohne Chlorphenolrot und ohne MOPS in einfacher Konzentration genutzt.

7.7 Mikrobiologische Methoden

7.7.1 Anzucht von *Aspergillus fumigatus*

Die Gewinnung von Sporen erfolgte entweder aus bereits vorhandenen Sporenstocks oder aus einem Klon als Ergebnis einer Pilztransformation. Aus vorhandenen Sporenstocks (~5-0 x 10⁷ Sporen/ml) wurden 20-50 µl der Lösung in 200 µl H₂O_{dd} verdünnt und anschließend in Zellkulturflaschen gefüllt mit AMM-Agar überführt. Die Verteilung der Suspension erfolgte mittels steriler Glaskugeln innerhalb des Gefäßes. Bei Anzucht eines Einzelklons wurden Sporen mittels steriler Impföse aufgenommen und ebenfalls in 200 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Dann wurde diese Lösung ebenfalls in Zellkulturflaschen mit AMM-Agar gegeben, verteilt und für 2 - 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Der entstandene Sporenrasen wurde mit 15 ml sterilem H₂O_{dd} benetzt und die Zellkulturflaschen für 3 Minuten geschüttelt. Die so gewonnene Sporensuspension wurde über steriles Miracloth filtriert, um Hyphenfragmente, Agar und Konidiophoren von den Sporen zu trennen. Die Lagerung dieser Stammlösungen erfolgte bei 4°C. Für Experimente wurden Sporen verwendet, die nicht älter als zwei Monate waren. Für Langzeitaufbewahrung wurden 300 µl der Stammlösung mit 200 µl Glycerin [50 % (v/v)] vermischt und bei -80°C gelagert.

Für die Anzucht von Pilzmyzel zur Gewinnung von DNA wurden Sporen der verschiedenen Stämme in 50 ml AMM Flüssigmedium gegeben. Dann erfolgte über Nacht die Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 80 - 180 rpm. Das Myzel wurde über steriles Miracloth filtriert und für weitere Experimente benutzt (Transformation, DNA-Gewinnung etc.).

7.7.2 Herstellung der Sporenexperimentallösungen

Die Einstellung der Sporenzahl erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Sporenzahl / ml ergab sich aus der Formel: Sporen / ml = End-OD x $2,24 \times 10^7$. Für die Zielkonzentration von 5×10^7 Sporen pro ml wurde daher auf eine Ziel-OD von 2,2 verdünnt und eingestellt. Anschließend konnten durch weitere 1:10 Verdünnungsschritte verschiedene Sporenlösungen für die weiteren Experimente gewonnen werden.

7.7.3 Tüpfeltest von *Aspergillus fumigatus*

Für die Untersuchung der Wirkung verschiedener Agenzien auf das Wachstum von *A. fumigatus* und verschiedener gentechnisch veränderter Mutanten wurden Nähragarplatten mit dem jeweils zu untersuchenden Agens gegossen. Hierfür wurde das Agens der flüssigen Komponente (2x AMM oder 2x Pepton-Medium) zugegeben und anschließend mit der flüssigen Komponente (2x AMM-Agar oder 2 % Agarose) versetzt und ausgegossen. Anschließend wurden die Nähragarplatten bei 4°C steril gelagert.

Die Sporensuspensionen wurden dann in den Konzentrationen 5×10^7 ; 5×10^6 ; 5×10^5 ; 5×10^4 ; 5×10^3 hergestellt und jeweils 3 µl dieser Lösungen auf die Agarplatten aufgebracht. Für die Aktivierung des tetOn-Promoters wurde Doxycyclin mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml zugegeben.

7.7.4 H₂O₂-Hemmhofstest

Auf einer AMM-Agarplatte wurden 400.000 Sporen ausplattiert und verteilt. In zwei ausgestanzte Löcher mit 2 cm Abstand wurden jeweils 50 µl einer 300 mM oder 100 mM H₂O₂-Lösung in H₂O_{dd} gegeben. Anschließend wurde für ca. 30 h inkubiert. Der entstandene Hemmhof wurde anschließend fotodokumentiert. Für die Aktivierung des tetOn-Promoters wurde Doxycyclin mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml zugegeben.

7.7.5 Quantifizierung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin

Für die Untersuchung der metabolischen Aktivität wurden entweder Sporen oder Hyphen gegenüber Hemmstoffen wie H₂O₂, Granulozyten oder Lactoferrin mit

Resazurin in einer Endkonzentration von 0,002 % (w/v) und ein Reaktionsvolumen von 200 µl in einer 96-well-Platte verwendet¹³⁷. Als Medium wurde, wenn nicht anders angegeben, RPMI-1640 von Sigma verwendet und mit technischen Triplikaten gearbeitet.

PMN und H₂O₂

15.000 Sporen pro Well wurden in 100 µl RPMI-1640 in einer 96-well-Platte vorgelegt und für 10 h bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden 1.5 x10⁶ PMN oder H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen, in 100 µl vorgewärmten RPMI-1640 zugegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl eiskaltem H₂O_{dd} für 30 min abgetötet. Den Kontrollen wurden 100 µl H₂O_{dd} mit bereits abgetöteten PMN zugegeben. Anschließend wurden 100 µl 2x AMM versetzt mit 0,004 % Resazurin (w/v) zugegeben. Bei Versuchen mit H₂O₂ wurde das anfangs zugegebene Medium vollständig entfernt und durch 200 µl frisches, vorgewärmtes RPMI-1640 versetzt mit 0,002 % Resazurin (w/v) und mit der entsprechenden H₂O₂-Konzentration ersetzt. Bei Experimenten mit Sporen wurde auf eine 10 h Vorinkubation verzichtet. Wenn angegeben, wurde 10 % autologes Serum oder 200 ng/ml LPS zugegeben.

Lactoferrin

15.000 Sporen pro Well wurden in 100 µl RPMI-1640 in einer 96-well-Platte mit 100 ng/ml FeSO₄ vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl RPMI-1640 mit 0,004 % Resazurin (w/v) und verschiedenen Konzentrationen von Lactoferrin zugegeben und ebenfalls die Umsetzung von Resazurin zu Resofurin über die Zeit bestimmt. Für den Versuch mit Hyphen wurde zunächst für 10 h inkubiert, bevor Lactoferrin gelöst in RPMI-1640 mit 0,004 % Resazurin (w/v) zugegeben wurde. Für die Aktivierung des tetOn-Promoters wurde Doxycyclin mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml zugegeben.

Spurenelemente

Für die Untersuchung mit Spurenelementen wurden Lösungen analog zu Tabelle 7.1 hergestellt. 15.000 Sporen pro Well einer 96-well-Platte wurden in 100 µl RPMI-1640

vorgelegt. Dann wurden 100 µl des Mediums versetzt mit der jeweilig angegebenen Spurenelementelösung und 0,004 % Resazurin zugegeben.

Wachstumskurven:

Die 96-well-Platten mit der Endkonzentration von 0,002 % Resazurin wurden zuletzt mit einer Breathe-Easy Membran (#Z380059, Sigma Aldrich) verschlossen. Die Membran gewährt einen konstanten Gasaustausch bei fortwährender Inkubation sowie Analyse von oben. Die Umsetzung von Resazurin zu Resofurin konnte so über die Zeit in einem CLARIOstar oder FLUOstar Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 37 °C und 5 % CO₂ gemessen werden. Hierfür wurden folgende Werte eingestellt: Exzitation: 550 - 15 nm, dichroitisch: 568,8 Emmission: 590-20 nm, Exzitation und Detektion von oben.

7.7.6 Auf Mikroskopie basierende Untersuchung

Für die mikroskopische Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden zwischen 1.000 und 10.000 Sporen in einer 96-well-Platte oder 3.000 Sporen in einem 8-Kammern-Plastikmikroskopiergefäß (µ-Slide 8 Well, Ibidi) in RPMI-1640 vorgelegt. Dann wurden entweder direkt oder nach einer Inkubation von 10 h bei 37 °C und 5 % CO₂ die weiteren Agenzien zugegeben. Für Untersuchungen der mitochondrialen Morphologie wurden in die zu untersuchenden *A. fumigatus*-Stämme ein Plasmid transformiert (pCH005), das zur Expression eines GFP-Proteins mit einer mitochondrialen Zielsequenz führt. So konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 7.12.3 und 7.12.4) der GFP-Proteine die Mitochondrien und deren Morphologie dargestellt und ausgewertet werden.

PMN, H₂O₂, Lactoferrin, N-Acetyl-Cystein

3.000 Sporen wurden zunächst für 10 h in 300 µL RPMI-1640 bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden entweder 1,5 x 10⁶ frische PMN in 100 µl vorgewärmtem RPMI-1640 oder nur 100 µl vorgewärmtem RPMI-1640 zugegeben. Bei Versuchen mit H₂O₂ wurde das Medium entfernt und durch frisches, vorgewärmtes RPMI-1640 mit den verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen ersetzt. Wenn angegeben, wurde 10 % (v/v) autologes Serum oder 200 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) zugegeben. Anschließend wurde für 2 h inkubiert. Nach Beendigung des Experimentes wurde für die mikroskopische Untersuchung fixiert

(siehe Abschnitt 7.12.2) oder direkt mikroskopiert. Bei Untersuchungen mit Lactoferrin wurde dieses von Anfang an auf 1.000 Sporen gegeben. Dann wurde inkubiert und zu den angegebenen Zeiten fotodokumentiert. Bei Untersuchungen mit dem Reagenz N-Acetyl-Cystein wurde 1 mM oder 10 mM zu den entsprechenden Wells zugegeben.

Untersuchungen mit Spurenelementen

10.000 Sporen pro Well einer 96-well-Platte wurden in 100 µl RPMI-1640 mit 0,004 % Resazurin (w/v) vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl Medium mit verschiedenen Spurenelementkombinationen in den Konzentrationen nach Hunter (Tabelle 7.8) zugegeben. Es wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Versuch wurde auf die Pufferung mittels CO₂ verzichtet, um den Phänotyp der Mutante zu verstärken.

7.8 Molekularbiologische Methoden

7.8.1 Gewinnung von DNA aus *Aspergillus fumigatus*

Für die Gewinnung von DNA wurden eine modifizierte Methode sowie Reagenzien des „Masterpure Yeast DNA Purification Kit“ (Epicentre Biotechnologie) verwendet. Hierzu wurde Pilzmyzel (Abschnitt 7.7.1) zusammen mit Quarzsand, einer Metallkugel und 225 µl Zellysepuffer für 40 Sek. und 40.000 rpm mit einem Vortexmischer aufgeschlossen. Nach Inkubation für 30 Min bei 65°C wurde für 5 Min auf Eis gekühlt und der Proteinfällungspuffer zugegeben. Anschließend wurde für 15 Min. bei 16.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 365 µl Isopropanol überschichtet und die enthaltene DNA ausgefällt. Die so gewonnene DNA wurde mit eiskaltem EtOH gewaschen, für 5 Min. verbliebenes EtOH bei 55°C abgedampft und das DNA-Pellet in DNase freiem, mit RNase versetzten H₂O_{dd} aufgenommen.

7.8.2 Polymerase-Kettenreaktion von DNA

Die Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde je nach Fragestellung mit einer Taq- oder Pfu-Polymerase durchgeführt. Hierzu wurden ein Volumen von 50 µl gewählt, die Puffersysteme entsprechend angepasst und die Reaktion mit 28 Zyklen in einem Minicycler mit beheizbarer Deckplatte durchgeführt.

Die Temperatureinstellungen der Reaktion sowie der Primeranlagerung wurde entsprechend der Herstellerangaben gewählt. Der Standardzyklus umfasst nach initialer Erhitzung auf 94°C stets folgende Schritte:

Initiale Erhitzung	30 Sek. bei 94 °C
Anlagerung der Primer	30 Sek. bei der errechneten T der jeweiligen Primer
Polymerisation	für 1 Min. für 1 kB bei 72 °C
Endzyklus	doppelte Polymerisationszeit bei 72 °C, dann 4 °C

Danach wurden die Produkte mittels Agarose-Elektrophorese überprüft und weiterverarbeitet.

Tabelle 7.14: Verwendete Agenzien der PCR-Reaktion

Reagenz	Hersteller
Oligonukleotide	Metabion, München
<i>Pfu</i> Polymerase + Puffer	Thermofisher, USA
<i>Taq</i> Polymerase + Puffer	Thermofisher, USA

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

Für die Isolation von DNA aus *E. Coli* wurde mit einem „Plasmid Miniprep“ oder „Midiprep“ Kit (PureYield, #A2492 oder A1223, Promega) extrahiert.

7.8.4 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte an einem Nano-Drop Spectrophotometer der Fa. Thermo Fisher.

7.8.5 Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde ein Agarosegel genutzt. Hierzu wurde Agarose (Roth) 1 % (w/v) in TAE-Puffer (20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA und 40 mM Tris) gelöst und horizontal in einem Gelschlitten zusammen mit einem Gelkamm zum Erkalten gebracht. Der Gelschlitten wurde in die Reaktionskammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben mit Ladepuffer (Promega) versetzt, in die Geltaschen eingebracht und für ca. 30 Min. bei 100 V aufgetrennt. Stets wurde ein Generuler 1 kB Marker mitgeführt.

Anschließend wurde mittels Ethidiumbromid (1 µg/ml in TAE) für ca. 10 Min. gefärbt und die DNA-Fragmente nach Waschen unter UV-Licht (254 nm) ausgelesen und fotodokumentiert. DNA wurde mithilfe eines „Prep-Easy Kits“ (Quiagen) aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und für weitere Reaktionen verwendet.

7.8.6 Enzymatische Spaltung von DNA

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonucleasen wie z. B. SfiI der Fa. MBI Fermentas verwendet und die Puffer-, Konzentrations- sowie Temperaturangaben des Herstellers berücksichtigt.

7.8.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um verschiedene DNA-Fragmente zu verbinden wurde eine T4-DNA Ligase (MBI Fermentas) verwendet. Puffer und Konzentration der Ligase wurden entsprechend der Herstellerangaben angewandt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der so gewonnen DNA-Produkte mittels „Prep-Easy Kit“ (Quiagen) und die Überprüfung mittels Agarose-Gelelektrophorese.

7.9 Transformation von *E. coli*

7.9.1 Medien für *E. coli*

Tabelle 7.15: LB flüssig Medium

Substanz	Menge
Bacto-Trypton	10 g (1 % (w/v) Endkonzentration
Hefeextrakt	5 g (0,5 % (w/v) Endkonzentration
NaCl	10 g (1 % (w/v) Endkonzentration
H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml, autoklavieren

Für die Herstellung von LB-Platten wurde dem flüssigen LB-Medium Bacto-Agar (2 % (w/v)) zugefügt und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Sofern gewollt, wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml den Medien zugegeben.

7.9.2 Herstellung von chemisch-Kompetenten Zellen

Mittels einer modifizierten Rubidiumchloridmethode wurden chemisch kompetente Bakterienzellen erzeugt^{138,139}. Dafür wurden *E. Coli* DH5 α zunächst in 200 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 U/Min. inkubiert. Anschließend wurde für 10 Min. auf Eis gekühlt und die Kultur bei 4000 x g für 15 Min. bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 ml TFB 1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM K-Acetat pH 5,8 und 15 % (v/v) Glycerin) aufgenommen, für 15 Min. bei 4 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml TFB II (10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH 7,10 und 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, zu 200 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert und für die Transformation genutzt.

7.9.3 Transformation von *E. Coli*

Mit der Methode nach Hanahan erfolgte die Transformation der wie in Abschnitt 7.9.2 beschrieben gewonnenen kompetenten Zellen¹⁴⁰. Hierfür wurden diese auf Eis aufgetaut, 20 μ l einer Plasmid-DNA zugegeben und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Dann wurde für 90 Sek. auf 42 °C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde erneut zentrifugiert und das Pellet erneut in 1 ml LB-Medium gelöst und die Suspension zu 200 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Selektionsmarker (Ampicillin 100 μ g/ml) überführt. Nach Vervielfältigung des Plasmids über Nacht wurde die DNA mittels Mini oder Midiprep (Kapitel 3.8.3) aus den Zellen extrahiert und bei -80°C gelagert.

7.10 Herstellung von genetisch veränderten *Aspergillus*-Stämmen

7.10.1 Konstruktion der *asp3_{tetOn} OllC*-Kassette

Um Mutationen in *A. fumigatus* zu erleichtern, wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Wildtypstamm AfS35 genutzt, der auf einen ursprünglichen WT D141 Stamm stammt. AfS35 fehlt das Gen *akuA*. *AkuA* und *AkuB* bilden ein Heterodimer, das für die DNA-Reparatur mittels non-homologous end-joining gebraucht wird. AfS35 kann nur über den Mechanismus der homologen Rekombination Fremd-DNA in sein Genom integrieren.

Die Herstellung von *aspf3_{tetOn} OllC* erfolgte in Zusammenarbeit mit Helena Schrattenecker und Dr. Karl Dichtl (Transformation siehe 7.10.3). Als Grundkonstrukt diente der Vektor pJW128, der neben Resistenzmarkern einen Doxycyclin-abhängigen Promoter trägt (Abbildung 7.1). Eine SfiI-Schnittstelle erlaubt es, den Vektor zu öffnen und zu modifizieren. Dafür wurde ein ca. 1 kp großes, direkt vor dem Gen liegendes DNA-Fragment sowie ein mit dem Gen beginnendes Fragment hergestellt (Abbildung 7.1). Dazu wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit WT DNA und den Primern 1307 und 1308 sowie in einer zweiten Reaktion mit Primern 1309 und 1310 durchgeführt. Die Fragmente wurden anschließend aufgereinigt und die in Primer 1308 und 1309 liegenden SfiI Schnittstellen mittels SfiI über Nacht gespalten. Zeitgleich wurde die in pJW128 liegende SfiI-Schnittstelle gespalten (Abbildung 7.1 A und B). Nach Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente sowie das Plasmid mittels Ligase fusioniert (Abbildung 7.1 C) und die so entstandene DNA-Kassette nach Aufreinigung in 30 µl H₂O_{dd} gelöst. Dieses Konstrukt wurde anschließend in Protoplasten von *A. fumigatus* transformiert. Bei korrekter Integration sollte es vor *aspf3* integriert haben. Als Selektionsmarker wurde die in pJW128 liegende Pyrithiamin Resistenz genutzt. Zuletzt wurden die einzelnen Klone mehrfach unter Selektionsdruck vereinzelt und deren DNA extrahiert. Die korrekte Integration wurde mit einer finalen PCR wie in Abschnitt 7.10.4 verifiziert. Der vorgeschaltete doxycyclinabhängige Promoter wurde durch die Zugabe von 7,5 µg/ml Doxycyclin aktiviert. Ohne Doxycyclin wurde eine Repression erreicht.

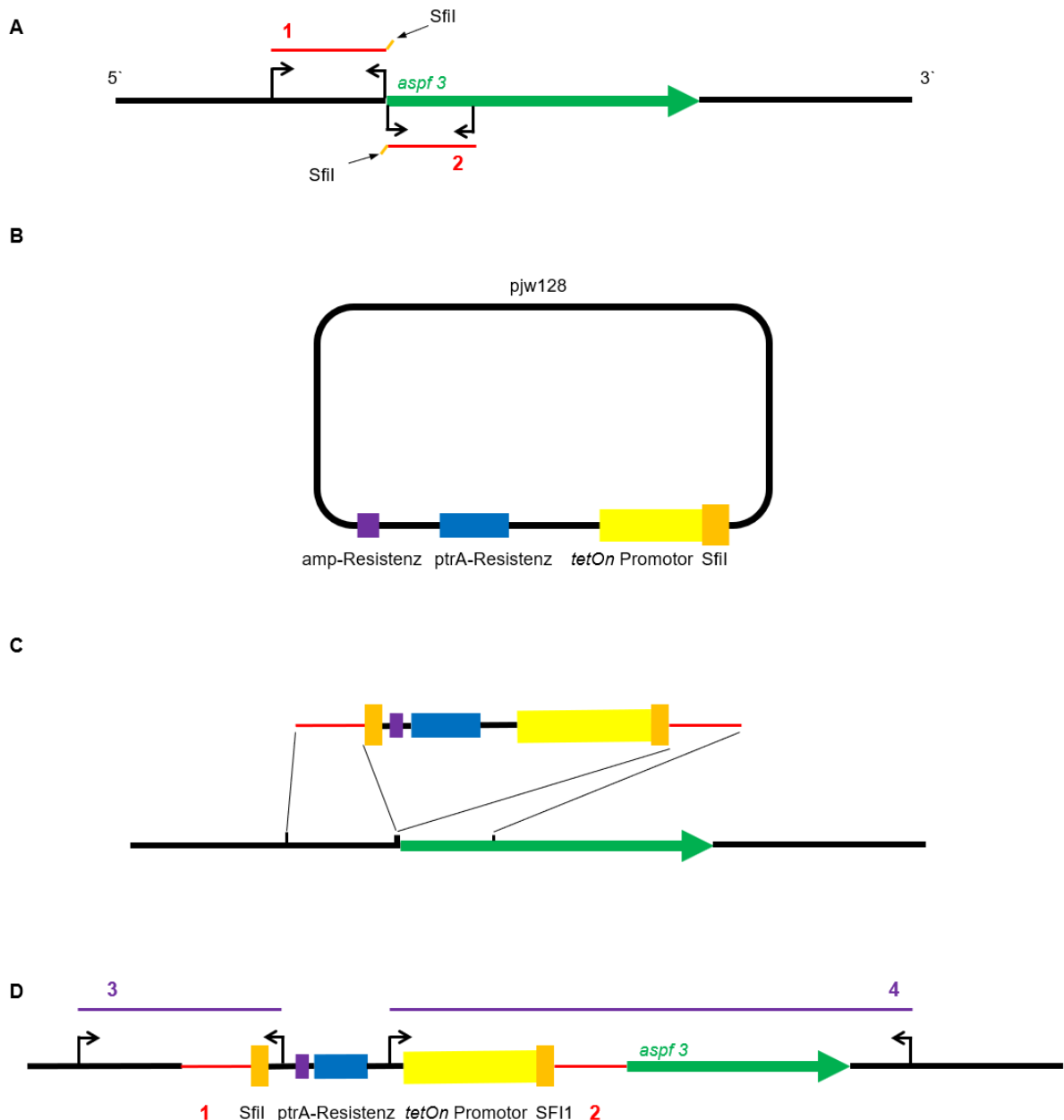


Abbildung 7.1: Herstellung von *aspf3_{tetOn}* **A:** Generierung der flankierenden Regionen mit den Fragmenten 1 und 2. **B:** pJW128 mit SfiI-Schnittstelle vor dem tetOn-Promoter sowie Selektionsmarker mit Pyrimethamin und Ampicillin-Resistenz. **C:** Aus **A** und **B** fusionierte tetOn-Kassette mit Alignment im Genom. **D:** Integration im Genom von *A. fumigatus*. Die Pfeile zeigen die für die Verifikations-PCR genutzten Bereiche mit den Produkten 3 und 4. Der tetOn-Promoter liegt nun direkt vor *aspf3*.

7.10.2 Konstruktion der Deletionskassetten für *af3I1*, *af3I2* und *sreA*

Für weitere experimentelle Untersuchungen wurden die Deletionskonstrukte für die Gene *af3I1*, *af3I2* und *sreA* hergestellt. Dazu wurden Deletionskassetten mit Hygromycin Resistenz genutzt. Der entsprechende Vektor pSK528 wurde dazu mit den entsprechenden ca. 1 kb großen flankierenden Regionen der Gene analog zu Abschnitt 7.10.1 fusioniert (Abbildung 7.2). Anschließend wurde das Konstrukt in die Protoplasten von AfS35 transformiert. Nach Selektion mittels Hygromycin wurden

Klone vereinzelt und wie in Abschnitt 7.10.4 aufgeführt überprüft. Für die Generierung von $\Delta af3/1 \Delta af3/2$ wurde die zuerst hergestellte $\Delta af3/1$ -Mutante auf Xylose kultiviert. Durch Xylose wird die in pSK528 enthaltene β -Rekombinase aktiviert, die zum Verlust der Hygromycin-Resistenz führt. So konnte anschließend erneut eine Deletionskassette mit Hygromycin-Resistenz für die Deletion von *af3/2* in $\Delta af3/1$ genutzt werden.

Weiterhin wurde die Deletionskassette *sreA* sowohl in WT, *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} $\Delta af3/1$* transformiert.

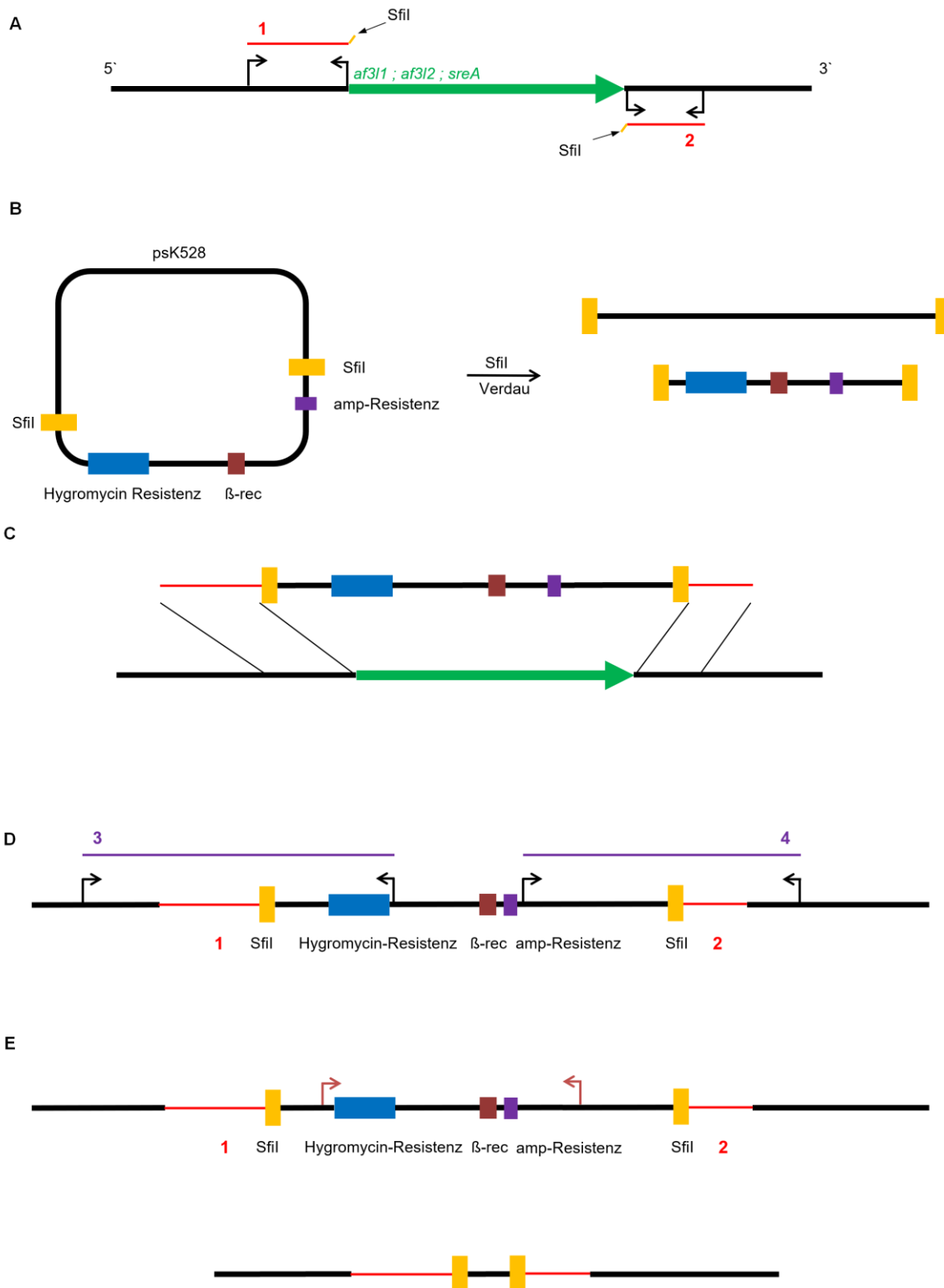


Abbildung 7.2: Herstellung einer Deletionskassette auf Grundlage des Plasmides pSK528. **A:** Generierung der flankierenden Regionen um das Gen mit den Fragmenten 1 und 2. **B:** pSK528 mit zwei SfiI-Schnittstellen, die das Plasmid in zwei unterschiedlich große Fragmente teilen sowie dem Selektionsmarker Hygromycin und einer β -Rekombinase. **C:** Aus **A** und dem kleineren Fragment aus **B** fusionierte Deletionskassette mit Alignment im Genom eines beliebigen Genes (grün) **D:** Integration im Genom von *A. fumigatus*. Die Pfeile zeigen die für die Verifikations-PCR genutzten Bereiche mit den Produkten 3 und 4. **E:** Für die Expression der in pSK528 enthaltenen Rekombinase wurde eine Deletionsmutante auf Xylose ausgestrichen. Xylose aktiviert die enthaltene β -Rekombinase, die dann den mit Pfeilen markierten Bereich ausschneidet. Anschließend wurde durch Vereinzlung und Test auf den Verlust der Hygromycin-Kassette getestet.

7.10.3 Transformation von *Aspergillus fumigatus*

Die Transformation von *A. fumigatus*-Protoplasten erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Helmschrott et al. ¹⁴¹. Der für die Transformation verwendete Stamm AfS35 (WT) ist defizient für die nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ), wodurch sich die Ausbeute von Mutanten erhöht. Der Stamm unterscheidet sich bei ROS-Stress phänotypisch nicht vom Ursprungsstamm D141 ¹²⁵.

Zunächst wurden die unten angeführten Medien und Puffer steril hergestellt. Dann wurden *A. fumigatus*-Sporen in 200 ml AMM-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 U/Min. geschüttelt. Das Myzel wurde mit sterilen Miracloth belegten Filtern vom Medium abgetrennt, dreimal mit Citrat-Puffer gewaschen und anschließend für 45 Min. bei 30°C mit 20 ml Enzymlösung inkubiert. Die so gewonnenen Protoplasten wurden erneut über Miracloth in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und der Filter mit 30 ml kaltem STC1700 nachgespült. Die Protoplasten wurden bei 2500 rpm und 4°C für 12 Min. sedimentiert, erneut mit kaltem STC1700 gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das so gewonnene Protoplastenpellet wurde vorsichtig resuspendiert und zu 30 µl DNA-Lösung mit der entsprechenden Deletionskassette (Abschnitt 7.10.1 und 7.10.2) zugegeben. Nach Inkubation für 30 Min. auf Eis wurde zunächst zweimal 250 µl PEG-4000 zugegeben und vorsichtig digeriert. Anschließend wurde nochmals 850 µl PEG-4000 zugegeben, digeriert und für 20 Min. über Eis inkubiert. Nach Zugabe von 12,5 ml STC1700 wurde erneut mit 2500 rpm bei 4°C für 15 Min. sedimentiert. Das Pellet wurde in ca. 200 µl verbliebenem Puffer vorsichtig resuspendiert und mit 50°C warmen AMM-Softagar versetzt. Diese Suspension wurde auf selektive AMM-Sorbitol Agarplatten aufgebracht. Nach Inkubation mit Selektionsmarker für 48 bis 72 h wurden erste Transformanden sichtbar. Diese wurden vereinzelt und zweifach unter Selektionsdruck passagiert. Zuletzt wurde die DNA einzelner Kolonien extrahiert (Abschnitt 7.8.1) und mittels PCR (Abschnitt 7.8.2) auf die korrekte Integration überprüft.

Tabelle 7.16: Citrat-Puffer

Substanz	Menge/
580 mM NaCl	67,8 g
150 mM KCl	22,4 g

50 mM Na-Citrat	29,4 g
pH 5,5	Mittels Citratsäure
H ₂ O _{dd}	ad 2000 ml, autoklavieren

Tabelle 7.17: Enzymlösung

Substanz	Menge
Vinoflow	1,3 g
Citrat-Puffer	20 ml

Tabelle 7.18: STC1700

Substanz	Menge
1,2 M Sorbitol	218,0 g
35 mM NaCl	2,0 g
50 mM CaCl ₂	7,3 g
10 mM TRIS (pH 5,5)	10 ml aus 1 M TRIS (pH 5,5)
H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml
	Autoklavieren, Lagerung bei 4°C

Tabelle 7.19: PEG 4000 Mix

Substanz	Menge
50 mM CaCl ₂	0,73 g
10 mM TRIS pH 7,5	1 ml aus 1M TRIS (pH 7,5)
60 % (w/v) Polyethylenglycol 4000	60 g
	autoklavieren

Tabelle 7.20: Sorbitol Agar

Substanz	Menge
Bacto Agar	20 g
Glucose	10 g
Sorbitol	118 g
H ₂ O _{dd}	ad 500 ml für 2x, autoklavieren

Tabelle 7.21: Soft Agar

Substanz	Menge
Bacto Agar	7 g

Glucose	10 g
Sorbitol	118 g
H ₂ O _{dd}	ad 500 ml für 2x, autoklavieren

2x AMM wurde mit dem jeweiligen Selektionsmarker versetzt und anschließend mit Sorbitol-Agar 1 zu 1 kombiniert. Bei Softagar erfolgte keine Zugabe eines Selektionsmarkers.

7.10.4 Verifizierung der Klone

Für die Identifizierung einer korrekten Integration der jeweiligen Deletionskassetten im Genom von *A. fumigatus* wurden spezielle Primer genutzt, die nur in der Plasmid-DNA binden (Tabelle 7.22).

Tabelle 7.22: PCR-Primer innerhalb der DNA-Vektoren

Zugehöriges Plasmid	Sequenz 5' – 3'	Interne Nummer
pSK528 5' Bereich	TGTCTGCTCAAGCGGGGTAG	330
pSK528 3' Bereich	AAA C GTTGGTTCTTCGAGTCGATGAATG	321
pJW128 5' Bereich	CGTTACCAATGGGATCCCG	328
pJW128 3' Bereich	GTCCCGTATGTAACGGTGG	329

Diese Primer wurden mit den entsprechenden weiter upstream oder downstream liegenden Primern im 5'- oder 3'- Bereich kombiniert. So kann die korrekte Position sowie Ausrichtung der integrierten Kassette überprüft werden. In Tabelle 7.23 sind die entsprechenden Primer-Kombinationen mit den jeweiligen Produkten aufgeführt. In Abbildung 7.3 ist die Verifikations-PCR für *aspf3_{tetOn}* exemplarisch dargestellt.

Tabelle 7.23: Primerkombinationen zur Verifikation von gewonnenen Klonen

Bezeichnung	Vektor	5'- Bereich	Produkt (Bp)	3'- Bereich	Produkt (Bp)
<i>aspf3_{tetOn} OliC</i>	pJW128	1311 + 328	1138	329 + 1312	3360
<i>del_af3/1</i>	pSK528	1344 + 330	1688	1345 + 321	2798
<i>del_af3/2</i>	pSK528	1346 + 330	1553	1347 + 321	2779
<i>del_sreA</i>	pSK528	1352 + 330	1967	1353 + 321	2890

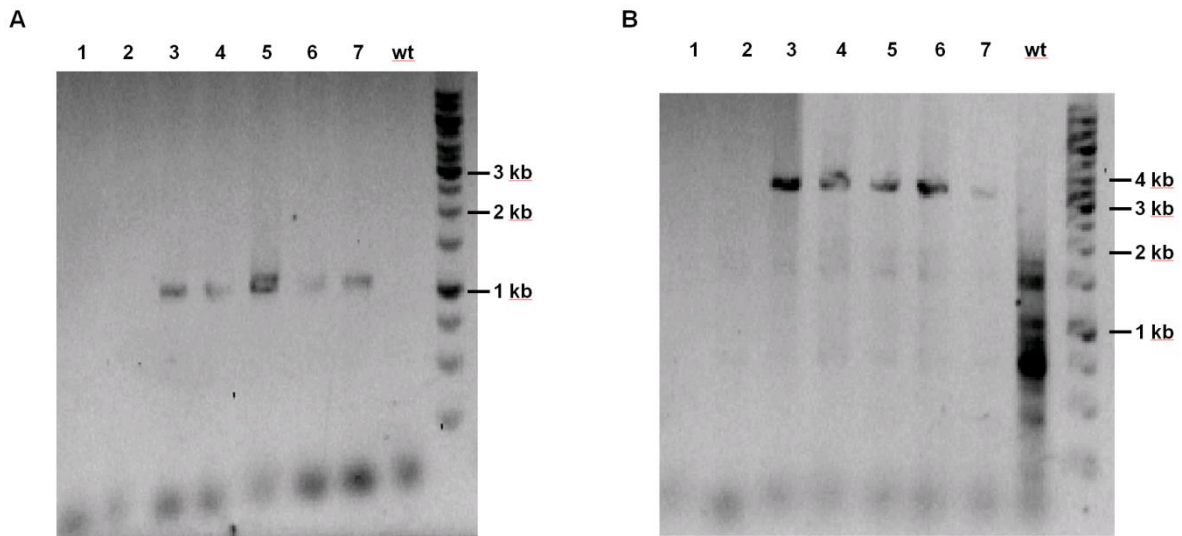


Abbildung 7.3: Verifikations-PCR der *aspf3_{tetOnr}*-Mutante nach **Tabelle 7.23:** **A:** 5'- Bereich mit dem Produkt 1138 Bp **B:** 3'- Bereich mit dem Produkt 3360 Bp. **A und B:** Es zeigt sich, dass für die Klone 3 bis 7 das Produkt 1138 Bp sowie 3360 Bp vorhanden ist.

7.11 Zellbiologische Methoden

7.11.1 Isolierung humaner polymorpher neutrophiler Granulozyten (PMN)

Die Isolierung von PMN erfolgte nach der Methode von Ruf et al.¹²⁵. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU lag vor (Aktenzeichen 519-95). Zur Isolierung wurde 50 ml Spenderblut gewonnen, heparinisiert und auf fünf Falcontubes aufgeteilt. Mit einem Falcontube wurde autologes Plasma gewonnen und ca. 1 ml auf die übrigen 4 Falcontubes überschichtet. Dann wurde für 90 Min. bei RT inkubiert, um rote von weißen Blutkörperchen zu trennen. Der so gewonnene Überstand wurde dann mittels Percollgradienten getrennt (4 ml 55 % (v/v) in PBS und 3 ml 74 % (v/v) in PBS). Nach Zentrifugation für 22 Min. bei 600 g konnten die PMN aus der Phase zwischen den zwei Percollschichten entnommen und mit PBS gewaschen werden. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 Min. bei 300 g wurden die Zellen in frischem, vorgewärmten RPMI-1640 aufgenommen, mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und ihre Vitalität mittels Trypanblau bestimmt (Experimente wenn >97 %). Anschließend wurden sie direkt für Experimente genutzt. Für Experimente mit Serum wurden die Zellen mit 10 % (v/v) autologem Serum zugegeben. Bei Experimenten mit Lipopolysacchariden (LPS) wurde mit einer Endkonzentration von 200 ng/ml gearbeitet.

7.12 Mikroskopie

7.12.1 Lichtmikroskopie

Für die mikroskopische Analyse von Sporen, Myzel oder Zellen wurde ein Zeiss Axiovert 25 genutzt.

7.12.2 Fixierung von Präparaten für die Lasermikroskopie

Für die Untersuchung von Experimenten aus Abschnitt 7.7.6 wurden die Hyphen für 10 Min. mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd und 1 mg/ml Calcofluorwhite in H₂O_{dd} behandelt. Anschließend wurde mit PBS zweimal gewaschen und die konfokale Lasermikroskopie in PBS durchgeführt.

7.12.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurden ein Leica TCS Nt- und Leica SP-5- Gerät genutzt. Hier konnten sowohl in Hellfeld als auch Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der *A. fumigatus*-Hyphen durchgeführt werden, nachdem sie mit humanen PMN-Zellen zur Interaktion gebracht wurden.

7.12.4 Quantitative Bestimmung der Mitochondrienmorphologie

Für die quantitative Analyse der Mitochondrienmorphologie wurden die Experimente aus Abschnitt 7.7.6 doppelt verblindet, sowie in Triplikaten durchgeführt. Nach Färbung wurden jeweils 60 Hyphen einer Gruppe anhand ihrer Morphologien eingeteilt und ausgezählt (Abbildung 7.4).

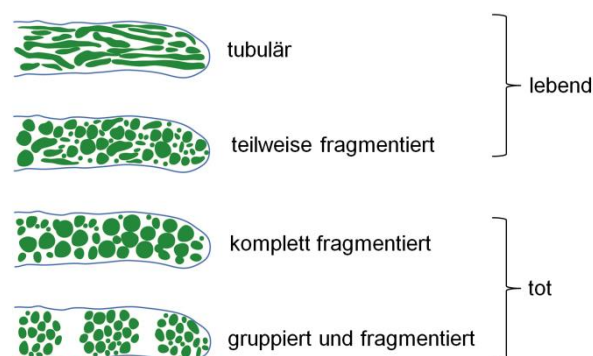


Abbildung 7.4: Einteilung der mitochondrialen Morphologie nach Ruf et al., eigene Bearbeitung¹²⁵

Als vitale Hyphen wurden dabei all jene definiert, deren Mitochondrien tubulär oder teilweise tubulär waren und mehr als 40 % des Kompartiments ausfüllen. Hyphen, die komplett fragmentiert oder fragmentiert und geclustert waren, und Hyphen, die keine Fluoreszenz oder eine Abnahme der Fluoreszenz aufwiesen, wurden als tot gewertet. Die Killing-Aktivität jedes Experiments wurde vor der vollständigen Untersuchung des randomisierten Experiments mit einer unverblindeten Probe bewertet. Experimente mit einer extrem hohen oder extrem niedrigen Killing-Aktivität (ohne Serum und LPS: < 30 % oder > 90 %) wurden nicht bewertet und nicht in die Statistik miteinbezogen. Die statistische Auswertung erfolgte nach Ruf et al. ¹²⁵.

8 Ergebnisse

8.1 Sensitivität der konditionellen *asf3_{tetOn}*-Mutante gegenüber H₂O₂-Stress sowie humanen polymorphen neutrophilen Granulozyten (PMN)

Das Wachstum von *A. fumigatus* und seine Reaktion auf verschiedene extrinsische Noxen werden bisher mit unterschiedlichen Methoden erforscht, die auf mikroskopischen Untersuchungen, metabolisch-kolorimetrischen Messungen oder auf cytosolischen Färbungen mit anschließender mikroskopischer Untersuchung beruhen ^{47,122–124}. Dabei ist die Bestimmung der Überlebensrate eine große Herausforderung, da manche Methoden keine genau Differenzierung zwischen Wachstumsinhibition und Zelltod erlauben. Jede Methode hat ihre individuellen Limitierungen (siehe auch 5.8) ^{126,127}. In Zusammenarbeit mit Dominik Ruf konnte in unserer Arbeitsgruppe eine neuartige Methode etabliert werden, die nach Inkubation von Pilzhyphen mit einem Stressor anschließend eine Lebend-/Totdifferenzierung erlaubt ¹²⁵. Dies erfolgt anhand der Visualisierung des mitochondrialen Netzwerkes, das mit Hilfe eines GFP mit mitochondrialem Zielsignal, sichtbar gemacht wird. Mitochondrien von *A. fumigatus* weisen unter Normalbedingungen eine tubuläre Mitochondrienmorphologie auf ¹²⁵. Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress und Immunzellen eine charakteristische und unumkehrbare Veränderung der Mitochondrienmorphologie verursachen. Zunächst fragmentieren die Mitochondrien ¹²⁵. Nach einiger Zeit kommt es zusätzlich zur einer Clusterung dieser fragmentierten Mitochondrien. Schließlich verlieren die Mitochondrien langsam ihre Fluoreszenz bis diese nicht mehr gefunden werden kann ¹²⁵. Hyphen, deren Mitochondrien zu mehr als 60 % einen fragmentierten und/oder geclusterten Phänotyp aufwiesen, werden als tot gewertet ¹²⁵.

Diese neue Methode zur Analyse des Effekts verschiedener Stressoren auf die Viabilität von *A. fumigatus* sollte nun an einer Mutante erprobt werden, die besonders sensibel gegen oxidativen Stress ist, da sie *asf3* nicht exprimieren kann. Hierzu wurde anstelle einer Deletionsmutante (Hillmann et. al. ⁷⁷) in enger Zusammenarbeit mit Dr. Karl Dichtl eine konditionelle *Asf3*-Mutante *asf3_{tetOn}* hergestellt. Der *asf3*-Promoter in *Afs35* (WT) wurde durch einen konditionellen Promoter (*pJW128*) ersetzt.

Durch Zugabe von Doxycyclin kann dieser Promotor induziert werden und es findet eine Expression statt die abhängig vom Promoter-System und Gen eine mit dem nativen Promoter des WT vergleichbare Expression erreichen kann. Unter reprimierten Bedingungen (keine Zugabe von Doxycyclin) zeigen die hergestellten Mutanten einen Phänotyp ähnlich dem einer Deletionsmutante ¹⁴².

Für die Untersuchung der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante wurden Sporen auf AMM-Agarplatten verteilt. Anschließend wurden 50 µl einer 300 mM sowie einer 100 mM H₂O₂-Lösung (in H₂O_{dd}) in dafür ausgestanzte Öffnungen im Agar gegeben und für 30 h bei 37 °C inkubiert. Die konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante zeigt unter reprimierten Bedingungen einen deutlich größeren Hemmhof als der WT. Durch die Zugabe von 7,5 µg/ml Doxycyclin konnte die Expression von *aspf3* induziert werden. Es zeigt sich im Vergleich zum WT nur noch eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ (Abbildung 8.1 A).

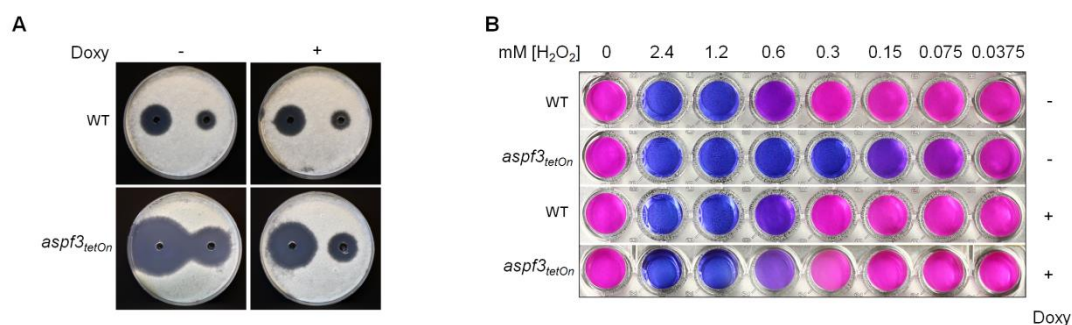


Abbildung 8.1: *Aspf3_{tetOn}* ist sensibel gegenüber Wasserstoffperoxid. **A:** 4×10^5 Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden auf AMM-Agarplatten verteilt. Anschließend wurden 50 µl zweier H₂O₂-Lösungen (300 mM links, 100 mM rechts) in zwei Vertiefungen gegeben und für 30 h bei 37 °C inkubiert. **B:** $1,5 \times 10^4$ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in 100 µl RPMI-1640 vorgelegt und für 10 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 100 µl RPMI-1640 mit Resazurin, Endkonzentration 0,002 % (w/v) sowie H₂O₂ mit den entsprechend angegebenen Endkonzentrationen zugegeben. Nach Inkubation für 34 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Platte fotografisch dokumentiert. Die Umsetzung von Resazurin (blau) in Resofurin (rosa) durch Stoffwechselaktivität ist ein Zeichen für Vitalität. Für die Induktion des Doxycyclin abhängigen Promotors wurde 7,5 µg/ml Doxycyclin (+Doxy) zugegeben. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Um die Sensitivität exakter zu bestimmen, wurden Sporen beider Stämme in RPMI-1640 für 10 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde frisches Medium, versetzt mit Resazurin, Endkonzentration 0,002 % (w/v), sowie H₂O₂ mit den entsprechenden Endkonzentrationen zugeben. Sofern angegeben wurde Doxycyclin mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C, für 34 h wurde der Farbumschlag als Zeichen des Umsatzes von Resazurin zu Resofurin fotodokumentiert (Abbildung 8.1 B). Geringe Mengen von 0,15 mM H₂O₂ hemmen den Resazurin-Umsatz der nicht-induzierten konditionellen *aspf3_{tetOn}*-

Mutante deutlich. Bei Zugabe von Doxycyclin zeigte sich ein vergleichbarer Umsatz wie beim WT (Abbildung 8.1 B). Dieses Ergebnis macht deutlich, wie sensitiv die *aspf3_{tetOn}*-Mutante auf H₂O₂-Stress reagiert. Dann wurde eine Mutante hergestellt, die die Visualisierung der mitochondrialen Morphologie der *aspf3_{tetOn}*-Mutante erlaubt. Dazu wurde die *aspf3_{tetOn}*-Mutante mit dem Vektor pCH005 transformiert, der ein GFP mit N-terminaler mitochondrialer Translokationssequenz enthält. Sporen dieser Mutante sowie einer mit pCH005 transformierten WTs wurden für 10 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und neues Medium mit den angegebenen Mengen an H₂O₂ zugegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation wurden die Kulturen durch Zugabe von 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach der Färbung mit Calcofluorweiß (Chitin Färbung zur Visualisierung von Pilzzellwänden) wurde die mitochondriale Morphologie der Hyphen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und dokumentiert. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,15 mM H₂O₂ bereits ausreichend ist, um ein Fragmentieren und Clustern der Mitochondrien zu beobachten (Abbildung 8.2 A). Bei niedrigeren Konzentrationen wurden dieser Phänotyp nicht beobachtet.

In Zusammenarbeit mit Dominik Ruf wurden in einer früheren Arbeit die Auswirkungen von neutrophilen Granulozyten auf die mitochondriale Morphologie von *A. fumigatus* untersucht. In der Publikation, die aus dieser Zusammenarbeit hervorging, konnte gezeigt werden, dass die Konfrontation mit neutrophilen Granulozyten, ähnlich wie oxidativer Stress, das mitochondriale Netzwerk als Zeichen für Zelltod unumkehrbar verändert ¹²⁵.

Angesichts der hohen Sensitivität gegenüber ROS-Stress von *aspf3_{tetOn}* wurde von uns auch eine hohe Sensitivität gegenüber neutrophilen Granulozyten erwartet, zumal sich die Deletionsmutante Δ *aspf3* im Mausinfektionsmodell als avirulent zeigte. Als Grund der Avirulenz wurde in Hillmann et al. die hohe Sensitivität gegenüber H₂O₂ diskutiert ⁷⁷. Um die Sensitivität gegenüber neutrophilen Granulozyten zu testen, wurde das Experiment analog zu der in Ruf et al. publizierten Methode durchgeführt ¹²⁵. Sporen von WT + mtGFP und der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante + mtGFP wurden für 10 h bei 37 °C zum Auskeimen gebracht. Dann wurden frisch gewonnene neutrophile Granulozyten zugegeben und die Hyphen für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Kulturen mit

Paraformaldehyd fixiert, mit CFW gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet wurde.

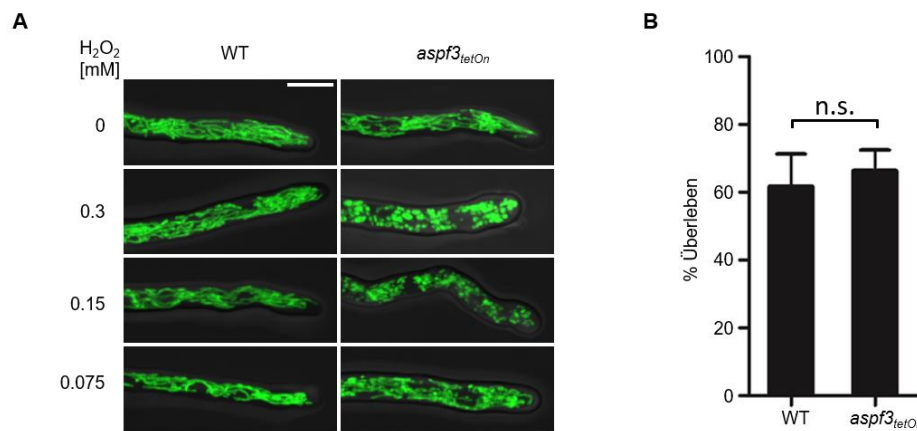


Abbildung 8.2: Einfluss von H₂O₂ und humanen neutrophilen Granulozyten auf die mitochondriale Morphologie von WT und *aspf3_{tetOn}*. **A** und **B**: Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}*, die mtGFP exprimieren, wurden für 10 h in RPMI-1640 bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. **A**: Dann wurde neues RPMI-1640 mit den angegebenen finalen Mengen an H₂O₂ zugegeben. Nach 2 h Inkubation wurde fixiert und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie die Mitochondrienmorphologie analysiert. Der weiße Balken repräsentiert 5 µm und ist für alle Abbildungen anwendbar. **B**: Frisch isolierte neutrophile Granulozyten in RPMI-1640 wurden auf die Hyphen gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Proben mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert und dann mit Calcofluor White für 10 min gefärbt. Der Anteil an vitalen Hyphen, definiert als Hyphen mit mehr als 40 % tubulären Mitochondrien, wurde bestimmt. Die dargestellten Werte zeigen die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei verblindeten technischen Replikaten. Die statistische Signifikanz (n.s., nicht signifikant, p > 0,05) wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten (Annahme ungleicher Varianzen) Student's t-Test berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Interessanterweise zeigt sich keine erhöhte Sensitivität von *aspf3_{tetOn}-mtGFP* gegenüber neutrophilen Granulozyten unter reprimierten Bedingungen. Aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber H₂O₂ und der nicht erhöhten Sensitivität gegenüber neutrophilen Granulozyten sollten diese Ergebnisse zusätzlich mit einer auf Resazurin-Umsatz basierenden Methode bestätigt werden ¹²⁵. Hierzu wurden ebenfalls Sporen von WT und der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante in RPMI-1640 vorgelegt. Anschließend sollten die Kulturen für 10 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Allerdings wurde in diesem Fall die 96-well-Platte nicht mit 5 % CO₂, sondern unter Raumatmosphäre bei 37 °C inkubiert. Mikroskopisch zeigte sich, dass die *aspf3_{tetOn}*-Mutante im Vergleich zum WT verzögert auskeimt und wächst. Bei Wiederholung des Experiments unter ähnlichen Bedingungen wurden die Sporen der beiden Stämme in RPMI-1640, nach Zugabe von Resazurin 0,002 % (w/v), unter Raumatmosphäre bei 37 °C für 10 h inkubiert, wobei sich erneut ein verzögertes Auskeimen und Wachstum von *aspf3_{tetOn}* zeigte (Abbildung 8.3).

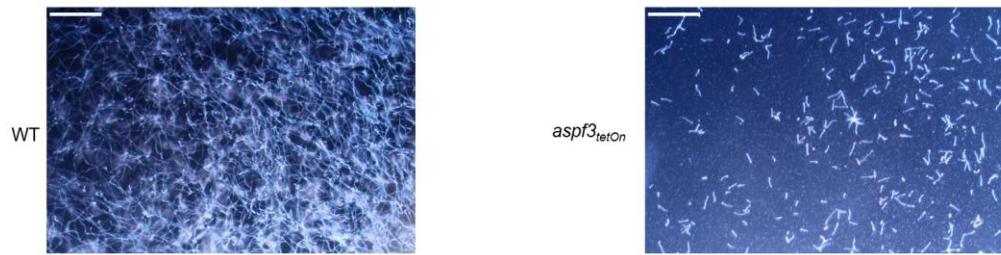


Abbildung 8.3: Wuchstumsphänotyp von *aspf3_{tetOn}*. $1,5 \times 10^4$ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden über Nacht in RPMI-1640 mit 0,002 % (w/v) Resazurin bei 37 °C und atmosphärischer CO₂-Konzentration inkubiert. Repräsentative Dunkelfeldbilder wurden nach Inkubation für 10h aufgenommen. Der weiße Balken repräsentiert 5 µm. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

8.2 Untersuchungen des Wachstums-Phänotyps der *aspf3_{tetOn}*-Mutante

In einem weiteren Experiment wurde RPMI-1640 ohne Zugabe von Sporen einmal bei 5 % CO₂ und einmal normaler Raumatmosphäre jeweils bei 37 °C inkubiert, um das Medium selbst zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund des nicht funktionierenden Bicarbonat-Puffers, aufgrund des zu geringen CO₂-Gehalts in der Raumatmosphäre, nach 24 h der pH-Wert bei 8,4 lag. Es konnte auch ein feines Präzipitat beobachtet werden (Abbildung 8.4 A). Es wurde vermutet, dass die Alkalisierung zu einer Verschiebung des Löslichkeitsproduktes von Bestandteilen des Mediums führt, die sich dann als Präzipitat niederschlagen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses Präzipitat von Spurenelementen stammt, die wichtig für Pilzwachstum sind und das WT diese Bedingungen besser kompensieren kann als die *aspf3_{tetOn}*-Mutante. Um die Hypothese zu prüfen und zu klären, um welches Spurenelement es sich handelt, wurden Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* erneut in RPMI-1640 vorgelegt und wie angegeben jeweils mit Fe²⁺, Cu²⁺ oder Zn²⁺ für 24 h bei Raumatmosphäre, 37 °C ohne Doxycyclin inkubiert. Die Konzentrationen der einzelnen Sulfate wurden entsprechend den Konzentrationen für AMM nach Hutner gewählt (Tabelle 7.8).

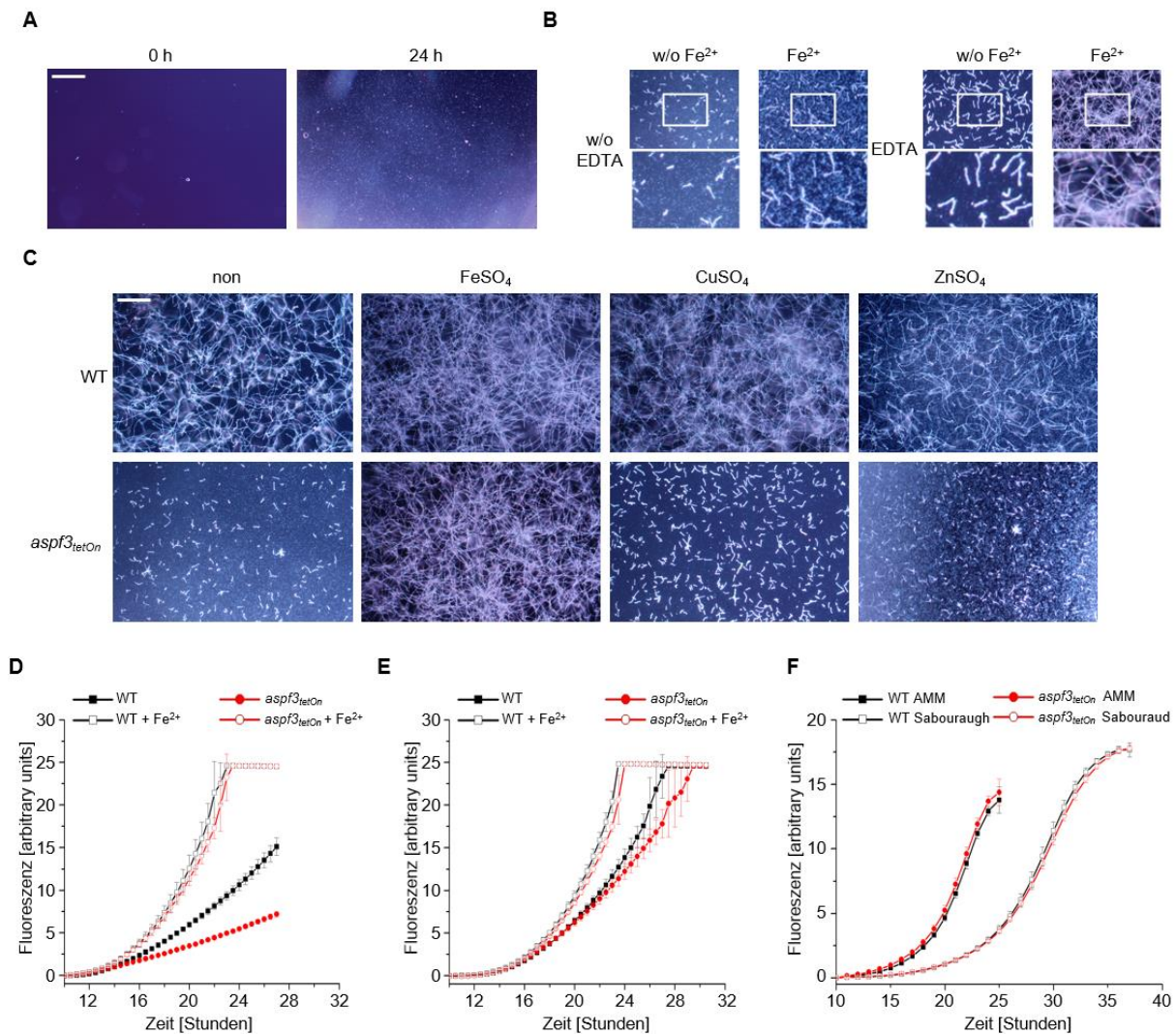


Abbildung 8.4: Auswirkungen verschiedener Spurenelemente auf das Wachstum von WT und *aspf3_{tetOn}*. **A:** Durchlichtmikroskopisches Bild von RPMI-1640 zusammen mit 0,002 % (w/v) Resazurin nach Inkubation bei 37 °C bei atmosphärischer CO₂ Konzentration, nach 0 und 24 h. **B** und **C:** 1,5 × 10⁴ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in 200 µl RPMI-1640 mit 0,002 % (w/v) Resazurin sowie wenn angegeben mit 5 µg/ml FeSO₄, 50 µg/ml EDTA, 1,6 µg CuSO₄ oder 22 µg ZnSO₄ inkubiert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und atmosphärischer CO₂-Konzentration inkubiert. Repräsentative Dunkelfeldbilder wurden nach 24 h erstellt. **D** und **E:** 1,5 × 10⁴ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in zwei verschiedenen kommerziell erhältlichen RPMI-1640 Medien (**D:** Gibco, **E:** Sigma) zusammen mit 0,002 % (w/v) Resazurin mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml FeSO₄ (+Fe) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Umsetzung von Resazurin zu Resofurin wurde über die Zeit in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. **F:** 1,5 × 10⁴ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden mit 0,002 % (w/v) Resazurin entweder in 200 µl AMM oder 200 µl Sabouraud Medium bei 37 °C über die Zeit inkubiert und der Umsatz von Resazurin zu Resofurin durch Messung der Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. **D-F:** Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von 3 technischen Replikaten. Die weißen Balken entsprechen 250 µm. Die Graphen **A**, **B**, **C** und **D** wurden in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Abbildung 8.4 zeigt, dass *aspf3_{tetOn}* durch die Zugabe von Eisen ein mit WT vergleichbares Wachstumsverhalten erreicht. CuSO₄ und ZnSO₄ hatten keinen Einfluss auf den Wachstumsphänotyp von *aspf3_{tetOn}*.

Das RPMI-1640 Medium sollte normalerweise frei von Spurenelementen sein. Durch die Experimente konnten gezeigt werden, dass es erst durch die Ausfällung von

Eisen bei pH 8,4 tatsächlich eisenfrei wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die kommerziell erhältlichen RPMI-1640-Medien unterschiedliche Eisen-Verunreinigungen aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurden zwei RPMI-1640 Medien von zwei verschiedenen Herstellern verglichen (Gibco und Sigma). Die Herstellung der beiden RPMI-1640-Medien erfolgte mit Reinstwasser, um Verunreinigungen durch die Wasserzugabe auszuschließen. Im jeweiligen Medium wurde dann dieselbe Anzahl an Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* mit Resazurin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Vergleich wurden AMM- und Sabouraud-Medium verwendet, die Spurenelemente beinhalten. Die Abbildungen 8.4 D (Gibco) und E (Sigma) zeigen, dass in zwei verschiedenen RPMI-1640-Medien bereits deutliche Wachstumsunterschiede von WT gemessen werden können. Der Unterschied zwischen *aspf3_{tetOn}* und WT ist in RPMI von Gibco stärker ausgeprägt als in RPMI-1640 von Sigma, was auf einen unterschiedlichen Eisengehalt hindeutet. In AMM und Sabouraud Medium war kein Unterschied zwischen *aspf3_{tetOn}* und WT zu messen (Abbildung 8.4 F). In den nächsten Experimenten wurde untersucht, wie viel Eisenzugabe notwendig ist, um ein Angleichen der Wachstumskurven beider Stämme in den beiden RPMI-1640-Medien zu erreichen. Eine geringe Menge von 100 ng/ml FeSO₄ ist bereits ausreichend, um die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit von *aspf3_{tetOn}* im Vergleich zu WT zu messen (Abbildung 8.4 D + E). Dies entspricht 2 % der Konzentration, die im etablierten AMM Medium enthalten ist ¹³⁵. Um bei den weiteren Untersuchungen grundsätzlich die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit zu erzielen, werden im Folgenden, sofern nicht anders angegeben, RPMI-1640-Medien mit 100 ng/ml FeSO₄ verwendet.

8.3 Einfluss von Eisenmangel auf das Wachstum der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante

Den bisherigen Beobachtungen zufolge weisen WT und *aspf3_{tetOn}* unter Eisenmangel eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit auf. Für *aspf3_{tetOn}* sollte aufgrund der bisherigen Beobachtungen die biologische Relevanz eingehender untersucht werden. Der Mensch besitzt unterschiedliche Abwehrmechanismen, um Mikroorganismen im Wachstum zu hemmen. Eine hiervon ist die Exkretion des eisenbindenden Proteins Lactoferrin, das sich sowohl im Sputum als auch in anderen Körperflüssigkeiten sowie den Granula neutrophiler Granulozyten befindet ⁸⁸. Für die Untersuchung des Einfluss von Lactoferrin, dessen antimikrobieller Effekt auf der

Bindung von Eisen beruht, wurde zunächst nach einem geeigneten Medium gesucht. AMM und Sabouraud erwiesen sich als ungeeignet, da Grundbestandteile wie „Bacto-Agar“ bereits hohe Eisenkonzentrationen enthalten. Die Zugabe von Lactoferrin konnte in diesen Medien keine Unterschiede im Wachstum zwischen WT und *aspf3_{tetOn}* hervorrufen. Es konnte dann eine Zusammensetzung gefunden werden, deren Grundbestandteile keine Verunreinigungen mit Eisen aufweisen. Hierfür wurde Lactoferrin in 2 % Pepton (w/v, Oxoid) pH 7,0 gelöst und mit ca. 50°C warmer 2 % Agarose (w/v) 1 zu 1 gemischt und zum Erkalten gebracht. Eine höhere Temperatur muss vermieden werden, um ein Denaturieren von Lactoferrin zu verhindern. Anschließend wurden Tüpfeltests mit verschiedenen Verdünnungen der verschiedenen Stämme durchgeführt. Dabei wurde die im Zuge dieser Arbeit erstellte *aspf3_{tetOn}*-Mutante zusammen mit der Δ *aspf3*-Deletionsmutante der Arbeitsgruppe Hillmann, sowie deren jeweiliger WT (D141 bei Δ *aspf3*) auf das Medium aufgebracht und verglichen ⁷⁷.

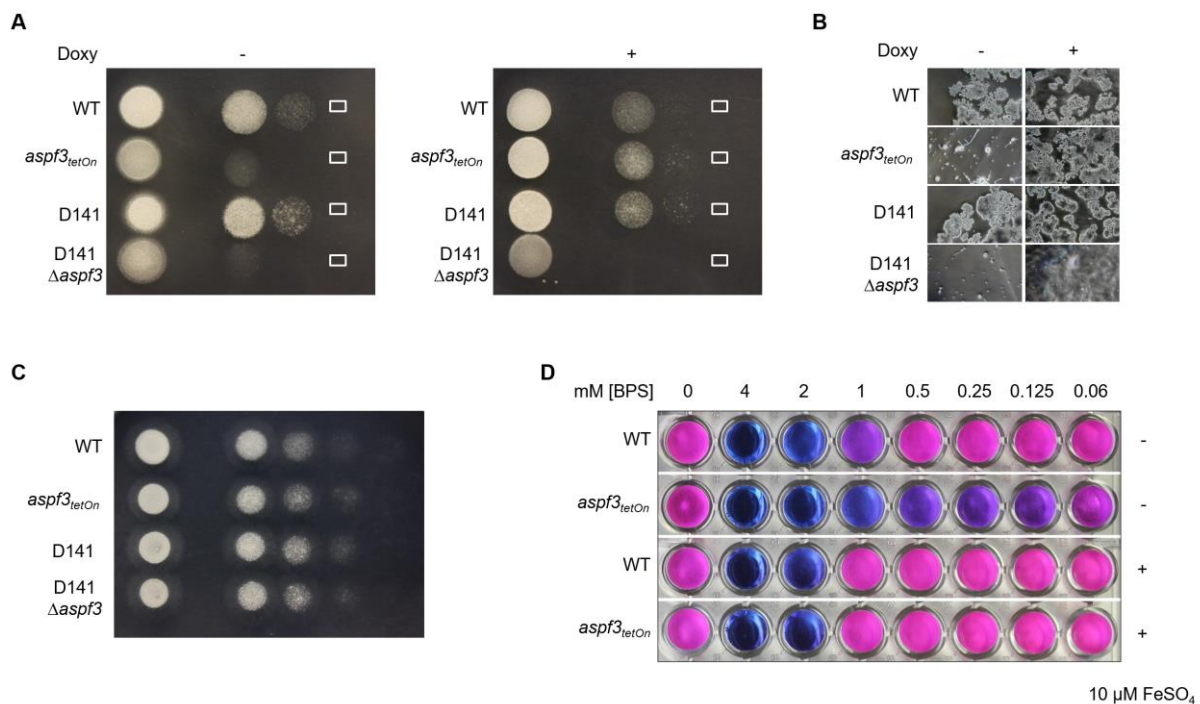


Abbildung 8.5: Aspf3 ist wichtig für das Wachstum unter eisenarmen Bedingungen. **A:** 3 μ l Aliquots aus Verdünnungsreihen (Verhältnis 1:10) der verschiedenen Stämme, startend mit einer Konzentration von 4×10^7 Sporen/ml wurden auf einer Pepton-Agaroseplatte [(1 % (w/v) Agarose, 1 % (w/v)] Pepton, pH 7,0), versetzt mit 2,5 mg/ml Lactoferrin, aufgetragen. Für die Induktion des Promoters wurden 7,5 μ g/ml Doxycyclin (Doxy) zugegeben. **B:** Vergrößerung der in **A** markierten Bereiche. **C:** Supplementierung der Pepton-Agarose-Lactoferrin Platte mit 5 ng/ml FeSO_4 . **D:** $1,5 \times 10^4$ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in 200 μ l AMM-Medium ohne Spurenelemente mit den angegebenen finalen Konzentrationen von Bathophenanthroldisulfonsäure (BPS) sowie 0,002 % (w/v) Resazurin für 66 h bei 37 °C inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden 10 μ M FeSO_4 zugegeben. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Auf der Agaroseplatte mit 2,5 mg/ml Lactoferrin konnte bei *aspf3_{tetOn}* und Δ *aspf3* ein verzögertes Auskeimen beobachtet werden (Abbildung 8.5 A). Die Tüpfel mit 3×10^7 Sporen zeigten bereits ein deutliches „Abblassen“. Bei Zugabe von Doxycyclin ist das Wachstumsverhalten von *aspf3_{tetOn}* mit dem von WT vergleichbar. Die Deletionsmutante Δ *aspf3* zeigte weiterhin das verzögerte Auskeimen. Mikroskopisch zeigten sowohl WT als auch D141 ein stark verzweigtes Wachstum. Dieses Wachstum konnte bei beiden Mutanten *aspf3_{tetOn}* und Δ *aspf3* nicht erkannt werden (Abbildung 8.5 B). Durch die Zugabe von 7,5 μ g/ml Doxycyclin konnte bei *aspf3_{tetOn}* ein verzweigtes Wachstum induziert werden, das mit dem von WT und D141 vergleichbar ist. Durch die Zugabe von 10 μ M FeSO₄ ließ sich der wachstumshemmende Effekt von Lactoferrin auf *aspf3_{tetOn}* und Δ *aspf3* ausgleichen (Abbildung 8.5 C).

In einem zweiten Experiment wurde der Eisenchelator Bathophenanthrolinedisulfonic acid (BPS) genutzt, um eine mögliche Wachstumshemmung durch Lactoferrin, den N-terminalen Anteil von Lactoferrin auszuschließen. Für dieses Experiment wurden Sporen beider Stämme in RPMI-1640 in einer 96-well-Platte vorgelegt, Resazurin (0,002 % (w/v)) und verschiedene Konzentrationen von BPS zugegeben. Dann wurde die Platte bei 37 °C für 66 h inkubiert und anschließend fotodokumentiert (Abbildung 8.5 D). Wie bei Zugabe von Lactoferrin zeigte sich auch hier unter reprimierten Bedingungen ein eisenabhängiger Wachstums-Phänotyp. Nach Zugabe von 10 μ M FeSO₄ wurde ein Wachstumsverhalten von *aspf3_{tetOn}* vergleichbar mit WT beobachtet. Eine Wachstumshemmung durch Lactoferrin, den N-terminalen Anteil von Lactoferrin, scheint unwahrscheinlich. Die Inhibition des Wachstums von *aspf3_{tetOn}* ist durch die eisenbindenden Eigenschaften von Lactoferrin allein zu erklären.

In den Lactoferrin-Agaroseplatten wurden sehr hohe Konzentrationen von Lactoferrin verwendet. Die Auswirkung unterschiedlicher Mengen dieses Proteins sollten daher in RPMI-1640 getestet werden. Zum Angleich des Wachstumsverhaltens von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden dem Medium fortan 100 ng/ml FeSO₄ zugefügt (Abbildung 8.4 D + E). Abbildung 8.6 zeigt die Wirkung von 800 und 100 μ g/ml Lactoferrin auf die Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}*.

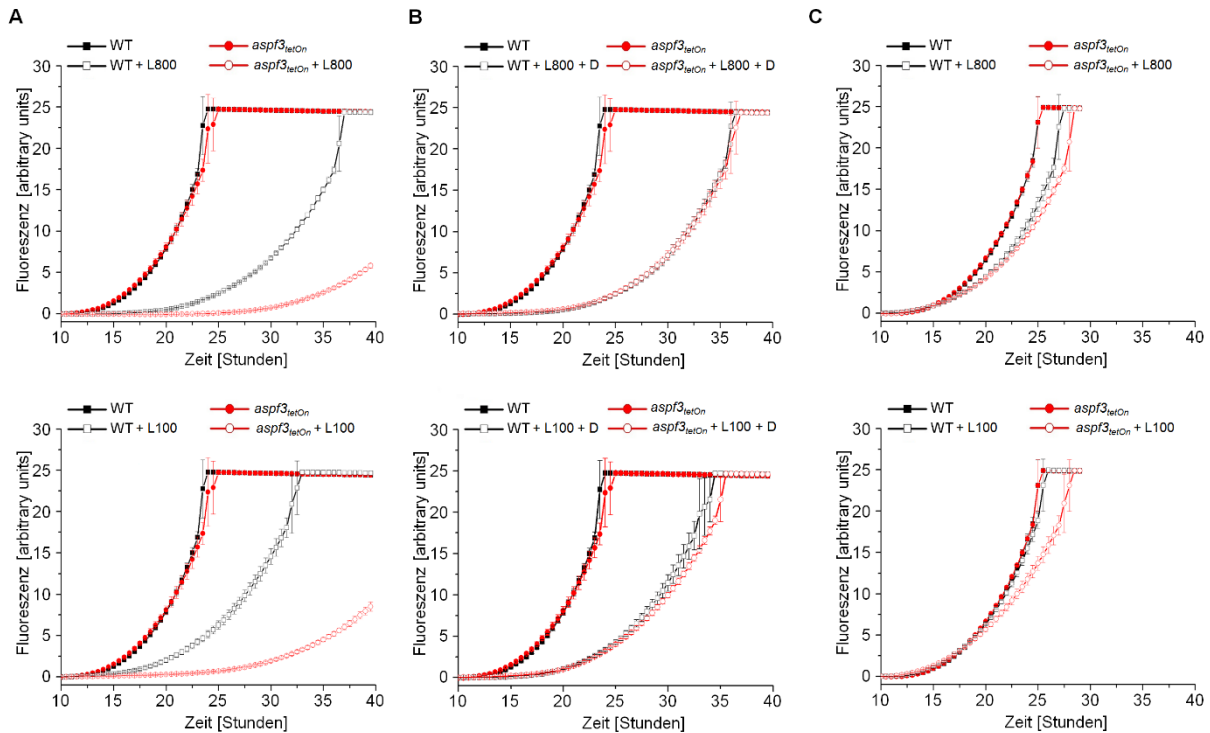


Abbildung 8.6: Wachstumsverhalten von WT und *aspf3_{tetOn}*-Sporen (A und C) sowie Hyphen (B) abhängig von verschiedenen Konzentrationen von Lactoferrin. A–C: $1,5 \times 10^4$ Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in 100 µl RPMI-1640 mit 100 ng/ml FeSO₄ sowie 0,004 % (w/v) Resazurin vorgelegt. Dann wurden 100 µl Lactoferrin (+L100 = 100 µg/ml, +L800 = 800 µg/ml) sofort (A und B) oder nach 10 h Inkubation (C) zugegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenz von Resorufin bei 37 °C sowie 5 % CO₂ in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät über die Zeit gemessen. B: Für die Promoterinduktion wurden 7,5 µg/ml Doxycyclin (+D) zugegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate.

Lactoferrin zeigt erneut eine deutlich ausgeprägtere Wirkung auf das Wachstumsverhalten von *aspf3_{tetOn}* als auf das von WT. Der Wachstumsunterschied bei Zugabe von 100 µg/ml gegenüber der Zugabe von 800 µg/ml ist bei WT deutlicher zu erkennen als bei *aspf3_{tetOn}*. Bei Hyphen (Abbildung 4.11 C) hingegen ließ sich bei beiden Stämmen eine deutlich geringere Wirkung von Lactoferrin beobachten. WT zeigt bei 100 µg/ml keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Der wachstumshemmende Effekt von Lactoferrin zeigt seinen größten Einfluss also bei Sporen, nicht bei Hyphen (Abbildung 8.6 A und C). Durch die Zugabe von 7,5 µg/ml Doxycyclin wurde die *aspf3*-Expression induziert, sodass sowohl bei der Zugabe von 800 als auch von 100 µg/ml Lactoferrin dieselbe Wachstumsgeschwindigkeit wie bei WT gemessen werden konnte (Abbildung 8.6 B und Abbildung 8.7 A).

In menschlichem Sputum können Konzentrationen von 100–200 µg/ml Lactoferrin gefunden werden⁸⁷. Für die weiteren Experimente wurde daher eine Konzentration von 100 µg/ml gewählt (Abbildung 8.7 A). Die konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante wurde erneut mit der Deletionsmutante Δ *aspf3* verglichen (Abbildung 8.7 B).

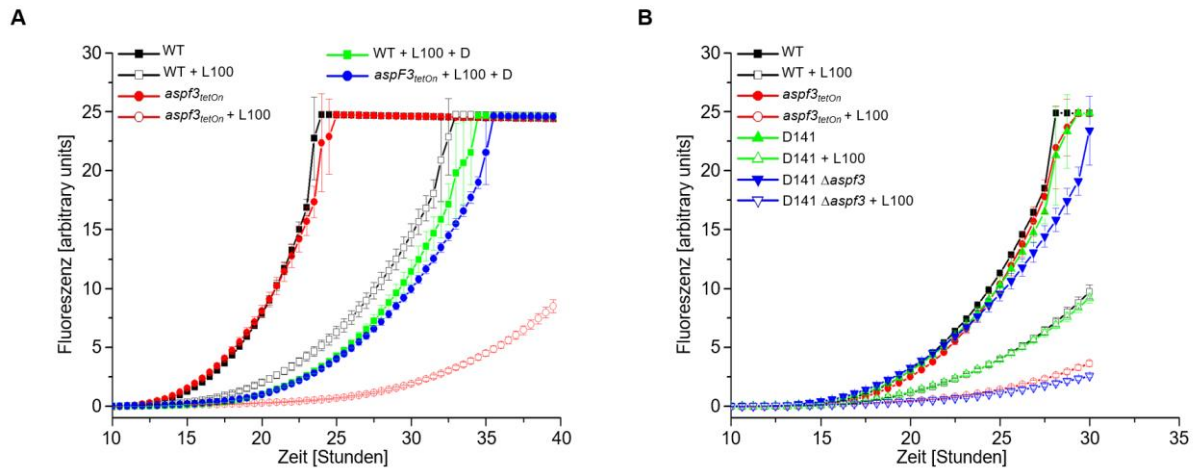


Abbildung 8.7: Vergleich von *aspf3_{tetOn}* und Δ *aspf3* mit AfS35 (WT) und D141. **A + B:** $1,5 \times 10^4$ Sporen der angegebenen Stämme wurden in 200 μ l RPMI-1640, supplementiert mit 100 ng/ml FeSO₄ und 0,002 % (w/v) Resazurin sowie mit oder ohne 100 μ g/ml Lactoferrin (+L100) mit oder ohne 7,5 μ g/ml Doxycyclin (+D), bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz von Resorufin in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

WT und D141 sowie *aspf3_{tetOn}* und Δ *aspf3* zeigen jeweils ein ähnlich gehemmtetes Wachstumsverhalten bei Zugabe von 100 μ g/ml Lactoferrin unter reprimierten Bedingungen. Der eisenabhängige Wachstumsphänotyp von Δ *aspf3* und *aspf3_{tetOn}* ist vergleichbar.

8.4 Untersuchung der Aspf3-Homologe Af311 und Af312

Es stellte sich die Frage, ob es für Aspf3 in *A. fumigatus* weitere Homologe gibt. Dazu wurde die DNA-Sequenz, die für die Aminosäuresequenz von Aspf3 codiert, genutzt, um das Genom von *A. fumigatus* auf mögliche homologe Übereinstimmungen zu untersuchen. Mithilfe eines „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) konnten in der frei verfügbaren Datenbank *aspergillusgenome.org* zwei weitere Proteine identifiziert werden, deren DNA-Sequenzen eine hohe Übereinstimmung aufweisen (Abbildung 8.8). Die beiden Proteine wurden als Aspf3 like 1 (Af311; *Afu5g01440*) und Aspf3 like 2 (Af312; *Afu6g12500*) benannt, wobei Af311 eine höhere Übereinstimmung mit Aspf3 aufweist als Af312.

Es wurden die Deletionsmutanten Δ *af311* und Δ *af312* hergestellt, die jeweils das Protein Af311 oder Af312 nicht mehr exprimieren können. Zusätzlich wurde eine Doppel-Deletionsmutante Δ *af311* Δ *af312* hergestellt, in dem in Δ *af311* zusätzlich das Gen *af312* deletiert wurde (Abschnitt 7.10.2).

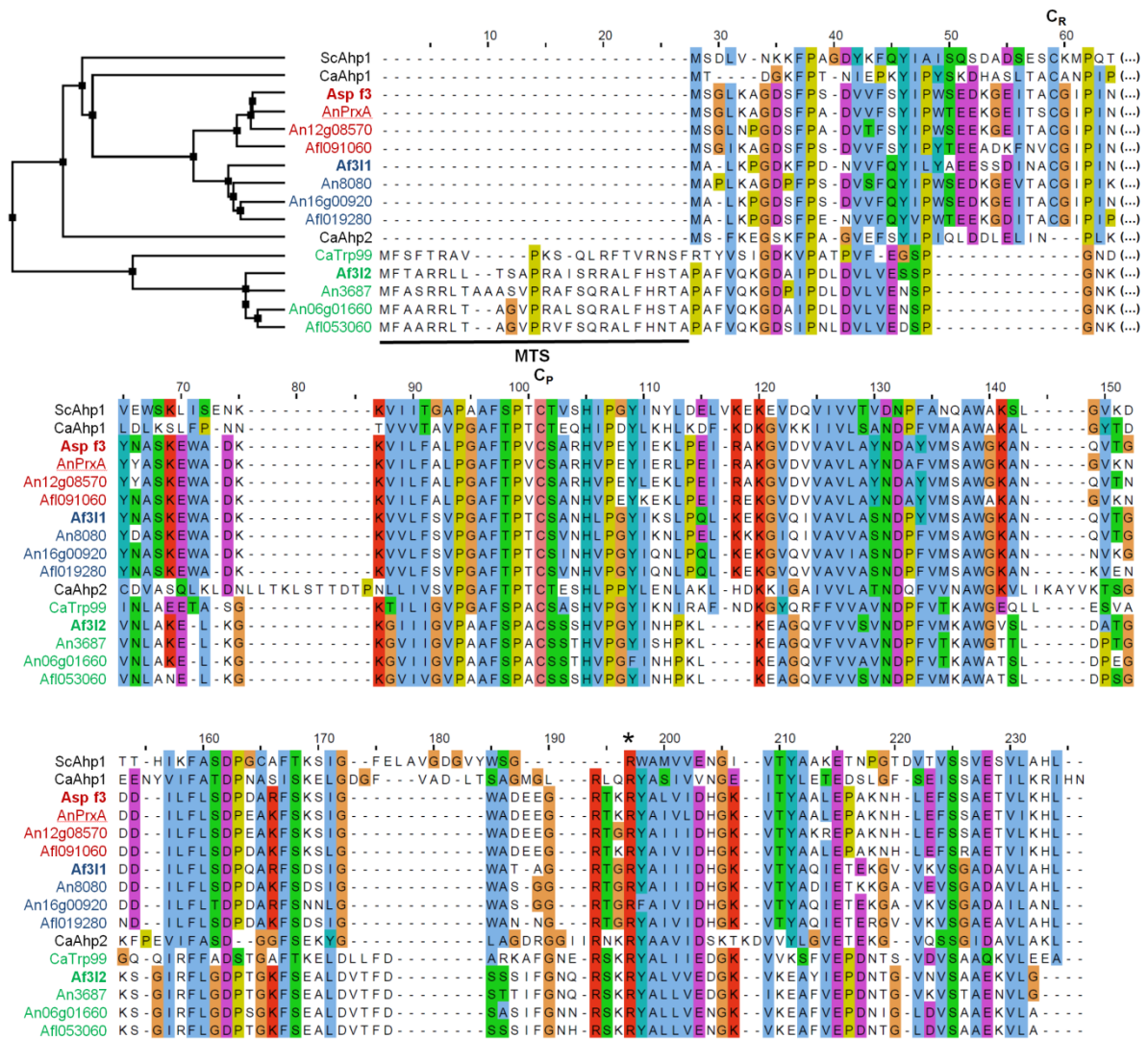


Abbildung 8.8: Identifizierung der Asp3-Homologe Af311 und Af312. Abstammungsbaum und Vergleich der N-terminalen Sequenzen von Asp3 und seiner Homologe und mutmaßlichen Analoga in *A. fumigatus* (Af311 und Af312), *A. nidulans* (AnPrxA, An8080, und An3687), *A. flavus* (Afi091060, Afi019280, und Afi053060), *A. niger* (An12g08570, An16g00920, und An06g01660), *S. cerevisiae* (ScAhp1) und *C. albicans* (CaAhp1, CaAhp2, und CaTrp99). Der schwarze Balken zeigt ein mutmaßliches mitochondriales Zielsignal an. Ein konserviert vorkommendes Cystein (CR) ist markiert. Die Sequenzen von Af311, Af312, Afi019280 und Afi053060 wurden unter Berücksichtigung der wahrscheinlich falsch annotierten Startcodons oder Spleißstellen für die jeweiligen Sequenzen in den Genomdatenbanken korrigiert. Das Alignment (mehrfacher Sequenzabgleich, Clustal-Farbschema) basiert auf den gesamten Proteinsequenzen. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Die Deletionsmutanten wurden dann auf ihr Wachstumsverhalten im Vergleich zum WT untersucht. Auf normalem AMM-Agar, ohne Zugabe von Stressoren, zeigte sich kein Wachstumsunterschied (Abbildung 8.9 A). Auch die Sensitivität gegenüber H₂O₂-Stress wurde auf AMM-Agar untersucht (Abbildung 8.9 B). Dabei zeigten weder die Deletionsmutanten $\Delta af311$ und $\Delta af312$ noch die Doppel-Deletionsmutante $\Delta af311 \Delta af312$ eine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂-Stress. Anschließend wurde

untersucht, ob wie bei der *aspf3_{tetOn}*-Mutante eine Wachstumsinhibierung durch Lactoferrin vermittelte Eisendepletion auftritt. In den Wachstumskurven in der Abbildung 8.9 (C und D) ist zu sehen, dass alle Deletionsmutanten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der WT zeigen. Die konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante zeigt unter reprimierten Bedingungen einen deutlich versetzten Anstieg der Fluoreszenz und damit ein verzögertes Wachstum.

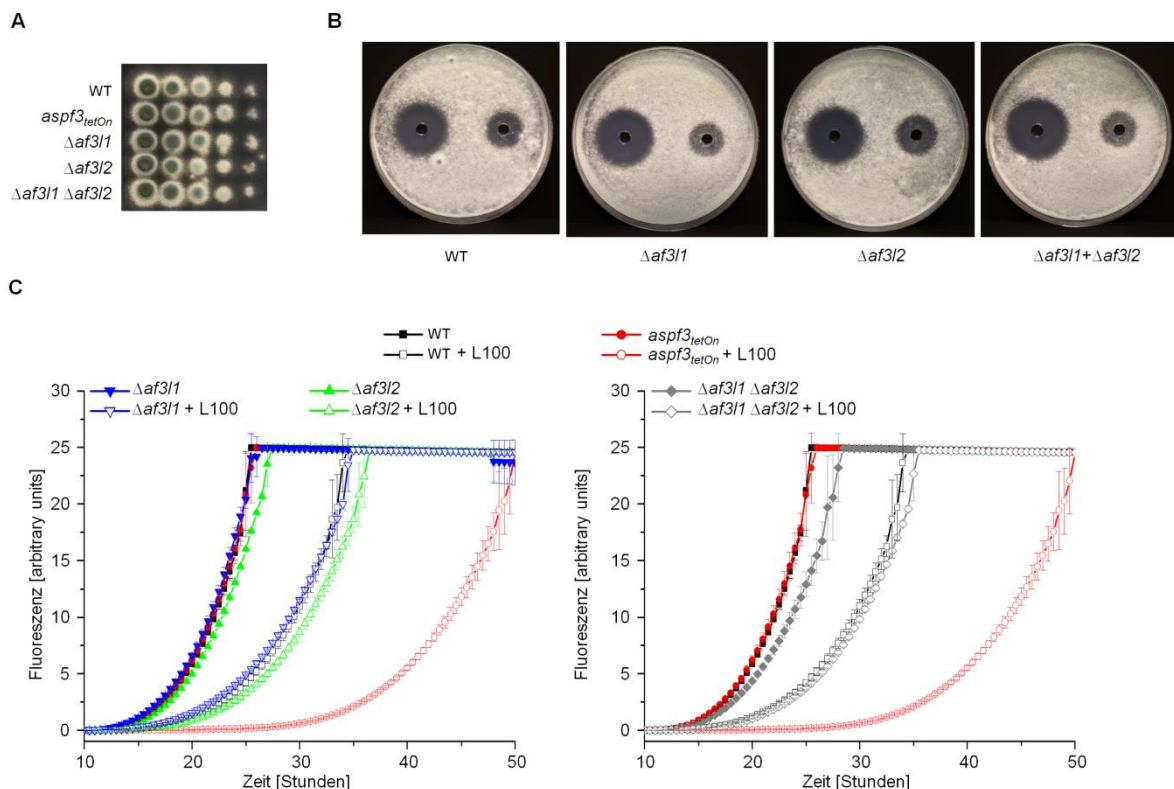


Abbildung 8.9: Untersuchungen der Aspf3-Homologe Af311 und Af312. **A:** 3 μ l Aliquots von Verdünnungsreihen (Verhältnis 1:10) der verschiedenen Stämme, startend mit einer Konzentration von 4×10^7 Sporen ml^{-1} wurden auf eine AMM-Agarplatte aufgetragen und für 30 h bei 37 °C inkubiert. **B:** 4×10^5 Sporen der verschiedenen Stämme wurden auf AMM-Agarplatten verteilt. In zwei Vertiefungen wurden 50 μ l einer 300 mM (links) und 100 mM (rechts) H₂O₂-Lösung gegeben. Dann wurde für 30 h bei 37 °C inkubiert. **C:** $1,5 \times 10^4$ Sporen der verschiedenen Stämme wurden in RPMI-1640 mit 100 ng/ml FeSO₄, 100 μ g/ml Lactoferrin sowie 0,002 % (w/v) Resazurin in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz von Resofurin wurde über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *aspf3_{tetOn}*, nicht jedoch die Deletionsmutanten $\Delta af311$ und $\Delta af312$ sowie $\Delta af311 \Delta af312$, eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress oder Eisenmangel haben.

8.5 Auswirkungen der Deletion von *af31* und *af32* in der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante

Es stellt sich die Frage, ob zwischen *Aspf3* und den beiden Homologen *Af31* und *Af32* eine funktionelle Redundanz besteht. Deshalb wurde in der konditionellen *aspf3_{tetOn}*-Mutante zusätzlich das Gen des Homologs *Af31* oder *Af32* deletiert. Die Deletionskassetten wurden wie in Abschnitt 7.10.2 beschrieben generiert und mittels Protoplastentransformation in die konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante eingebracht. Zusätzlich wurde in der Doppelmutante $\Delta af31 \Delta af32$ der Promotor von *aspf3* durch einen konditionellen TetOn-Promotor ersetzt. Die so erstellten Mutanten *aspf3_{tetOn} \Delta af31*, *aspf3_{tetOn} \Delta af32* und $\Delta af31 \Delta af32 aspf3_{tetOn}$ wurden anschließend ebenfalls auf ihre Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und Eisenentzug mittels Lactoferrin unter reprimierten oder induzierten Bedingungen untersucht.

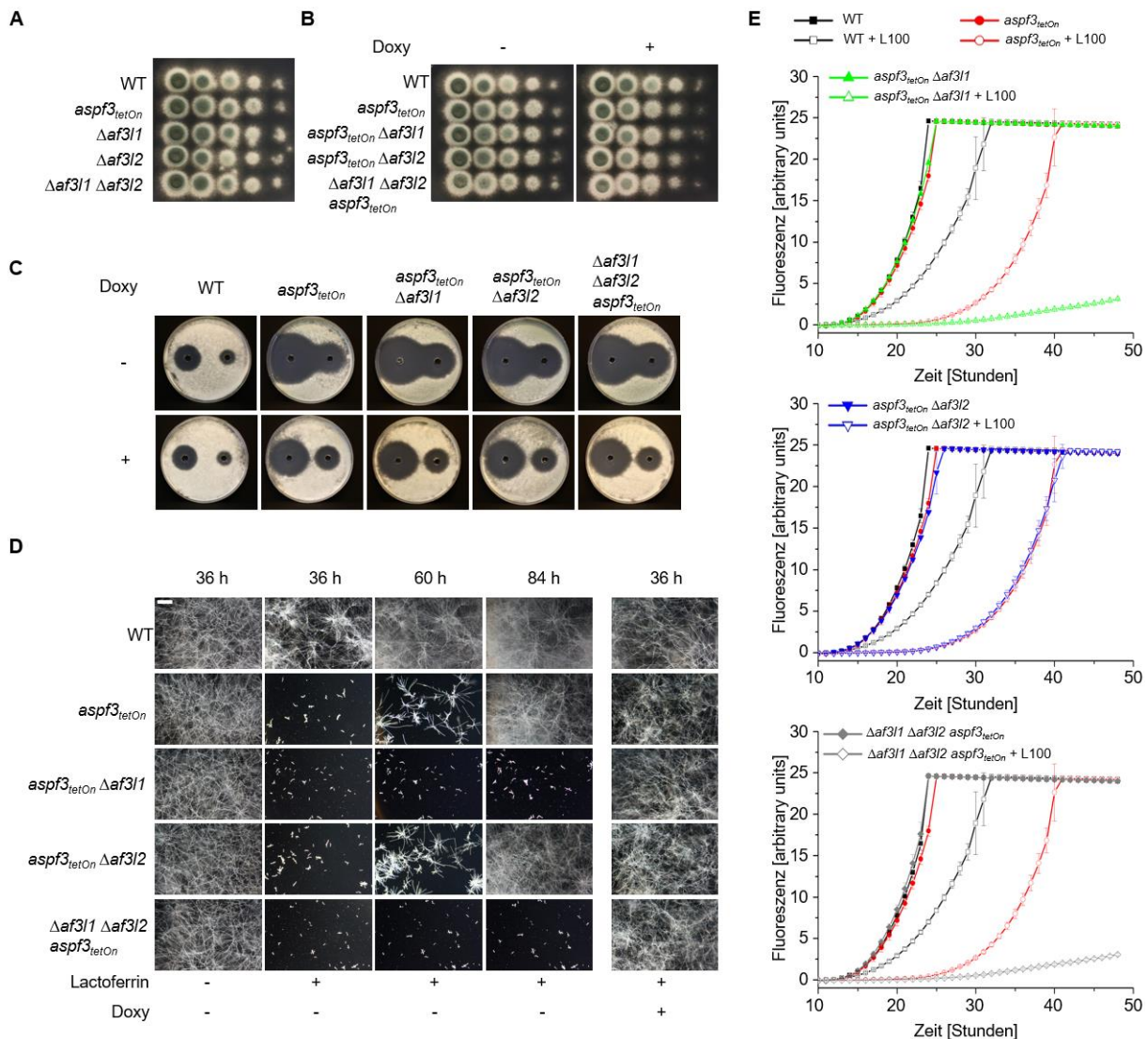


Abbildung 8.10: Untersuchungen von *Aspf3*, *Af31* und *Af32*. **A** und **B**: 3 μ l Aliquots von Verdünnungsreihen (Verhältnis 1:10) der verschiedenen Stämme, startend mit einer Konzentration von 4×10^7 Sporen/ml wurden auf eine AMM-Agarplatte aufgetragen und für 30 h bei 37 °C inkubiert. Für die Promoterinduktion wurden 7,5 μ g/ml

Doxycyclin (+Doxy) zugegeben. **C:** 4×10^5 Sporen der verschiedenen Stämme und WT wurden auf AMM-Agarplatten aufgetragen. In zwei Vertiefungen wurden 50 μ l einer 300 mM (links) und 100 mM (rechts) H_2O_2 -Lösung zugegeben. Dann wurde für 30 h bei 37 °C inkubiert und anschließend fotodokumentiert. **D:** $1,5 \times 10^3$ Sporen und **E:** $1,5 \times 10^4$ Sporen der Stämme wurden in RPMI-1640 mit 100 ng/ml $FeSO_4$ und Lactoferrin (**D:** 200 μ g/ml; **E:** 100 μ g/ml, +L100) gegeben. **D:** Es wurde für 84 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und zu den angegebenen Zeiten wurden dieselben Ausschnitte der 96-well-Platte fotodokumentiert. **E:** Es wurde die Fluoreszenz von Resorufin bei 37 °C sowie 5 % CO_2 in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. Der weiße Balken repräsentiert 250 μ m. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Abbildung 8.10 A zeigt, dass die verschiedenen Mutanten nach 30 h auf AMM-Agarplatten das gleiche Wachstum wie WT aufweisen. Die Sensitivität gegenüber H_2O_2 wird durch die zusätzliche Deletion der Gene der beiden Homologe nicht verstärkt. Die Hemmhöfe von *aspf3_{tetOn} Δ af3l1*, *aspf3_{tetOn} Δ af3l2* und *Δ af3l1 Δ af3l2 aspf3_{tetOn}* zeigen keinen signifikanten Unterschied zu *aspf3_{tetOn}* (Abbildung 8.10 C). Dann wurde untersucht, ob bei Eisenentzug durch Lactoferrin ein eingeschränktes Wachstum zu finden ist. Sporen der einzelnen Stämme wurden erneut mit Lactoferrin inkubiert und der Umsatz von Resazurin zu Resofurin über die Zeit gemessen. Abbildung 8.10 E zeigt, dass bei den Mutanten *aspf3_{tetOn} Δ af3l1* und *Δ af3l1 Δ af3l2 aspf3_{tetOn}* nach 45 h fast kein Umsatz von Resazurin gemessen werden konnte. Die konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante wies dieselbe Wachstumsgeschwindigkeit auf wie *aspf3_{tetOn} Δ af3l2*.

Um die starke Wachstumshemmung von *aspf3_{tetOn} Δ af3l1* und *Δ af3l1 Δ af3l2 aspf3_{tetOn}* besser darzustellen, wurde ein Wachstumstest mit 1500 Sporen und einer Konzentration von 200 μ g/ml Lactoferrin durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Mikroskopie und Fotodokumentation (Abbildung 8.10 D). *Aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δ af3l2* zeigten nach 36 h ein gehemmtes Auskeimen mit einer Zunahme des Wachstums nach 60h. Die *aspf3_{tetOn} Δ af3l1*-Mutante und *Δ af3l1 Δ af3l2 aspf3_{tetOn}* zeigten nach 36 h auch ein gehemmtes Auskeimen, aber ohne Zunahme des Wachstums nach 60 und 84 h. Beide Mutanten zeigten einen starken Wachstumsarrest (Abbildung 8.10 D).

Durch die Zugabe von Doxycyclin konnte bei allen Mutanten ein mit dem WT vergleichbares Wachstumsverhalten beobachtet oder gemessen werden (Abbildung 8.10 D und Abbildung 8.11).

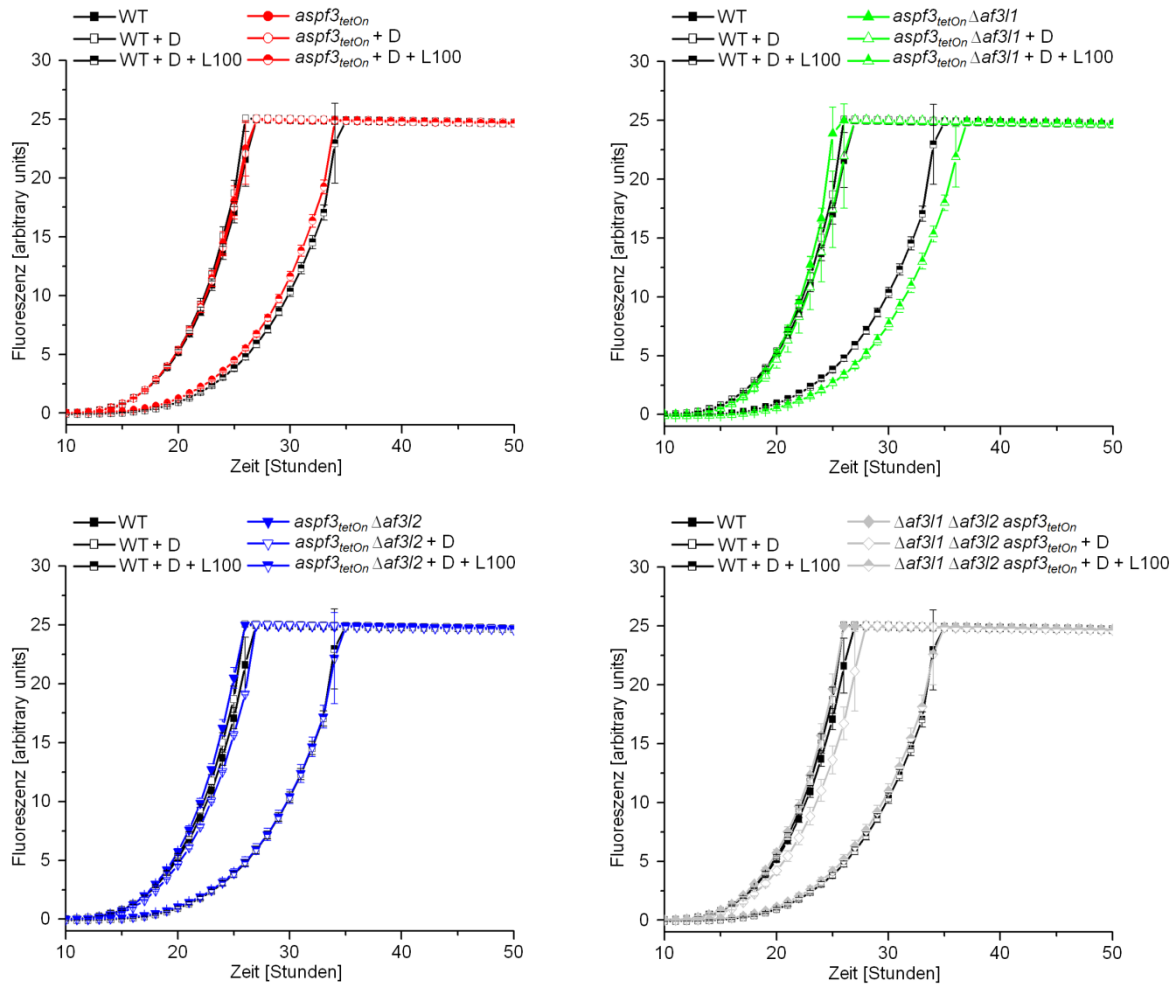


Abbildung 8.11: Deletion der Aspf3-Homologe in *aspf3_{tetOn}*. $1,5 \times 10^4$ Sporen der jeweiligen Stämme wurden in RPMI-1640 mit 100 ng/ml FeSO_4 und 100 $\mu\text{g/ml}$ Lactoferrin (+L100) gegeben. Für die Promoterinduktion wurden 7,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin zugegeben und der Umsatz von Resazurin zu Resofurin in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät durch Messung der Fluoreszenz bei 37 °C und 5 % CO_2 über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Durch diese Experimente konnte zusätzlich festgestellt werden, dass möglicherweise nicht nur die Lactoferrin-, sondern auch die Sporenkonzentration einen wichtigen Einfluss auf das Wachstumsverhalten zu haben scheint. Die *aspf3_{tetOn} Δaf3/1*-Mutante zeigte bei Zugabe von 200 $\mu\text{g/ml}$ Lactoferrin bei 1.000 Sporen pro Well ein Auskeimen und anschließend einen Wachstumsarrest der Hyphen (Abbildung 8.10 D). Wenn allerdings die Sporenkonzentration erhöht wurde, so zeigte sich nach 24 h, dass bei 10.000 Sporen je Well das Auskeimen und die Hyphenbildung deutlich weiter fortgeschritten waren als bei einer Konzentration von 1.000 Sporen (Abbildung 8.12 A).

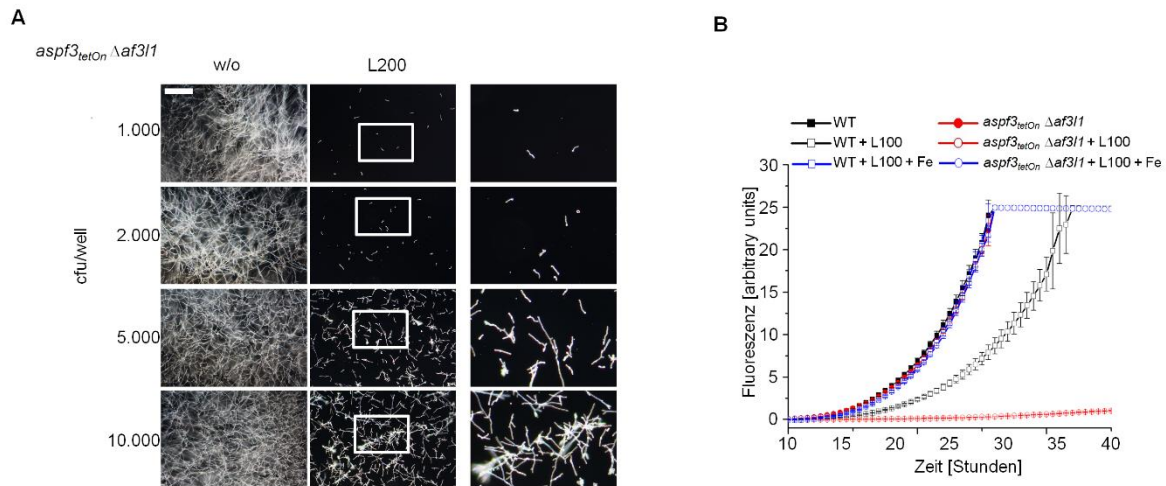


Abbildung 8.12: **A:** Einfluss der Sporenkonzentration auf das Wachstumsverhalten von *aspf3_{tetOn} Δaf311*. Sporen unterschiedlicher Konzentration wurden mit 200 µg/ml Lactoferrin in RPMI-1640 bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde fotodokumentiert. Die rechte Seite zeigt die Vergrößerung der abgebildeten weißen umrandeten Bereiche. **B:** 1,5 x 10⁴ Sporen von *aspf3_{tetOn} Δaf311* sowie WT wurden in RPMI-1640 mit 100 ng/ml FeSO₄, mit oder ohne 100 µg/ml Lactoferrin sowie mit 0,002 % (w/v) Resazurin gegeben. Wenn angegeben (+Fe) wurden zusätzlich 50 µM FeSO₄ zugegeben. Dann wurde die Umsetzung von Resazurin zu Resofurin durch Messung der Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 37 °C und 5 % CO₂ über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. Der weiße Balken repräsentiert 250 µm.

Durch die Deletion von *af311* in *aspf3_{tetOn}* zeigte die *aspf3_{tetOn} Δaf311*-Mutante einen ausgeprägten Wachstumsdefekt unter dem durch Lactoferrin erzeugten Eisenmangel.

Um zu überprüfen, ob dies tatsächlich dem Eisenmangel geschuldet ist und nicht etwa einer fungiziden Eigenschaft des Lactoferrins, wurden erneut Sporen in RPMI-1640 mit Lactoferrin und Resazurin inkubiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich 50 µM FeSO₄ zugegeben. Es zeigte sich, dass damit der Eisenmangelphänotyp nicht mehr dargestellt werden konnte. Ein fungizider Effekt von Lactoferrin ist in diesem Zusammenhang somit ausgeschlossen. (Abbildung 8.12 B). In weiteren Experimenten sollte nun die Eisenhomöostase in *aspf3_{tetOn} Δaf311* weiter untersucht werden.

8.6 Morphologie der Mitochondrien von *aspf3_{tetOn} Δaf311*-GFP

Unklar war, ob die ausgekeimten Hyphen absterben oder nur in einem Wachstumsarrest verharren. Um dies zu klären, wurde in einem weiteren Experiment die Morphologie der Mitochondrien in der *aspf3_{tetOn} Δaf311*-Mutante untersucht. Hierfür wurden Protoplasten von *aspf3_{tetOn} Δaf311* mit dem Vektor pCH005 transformiert. 1.000 Sporen der *aspf3_{tetOn} Δaf311*-GFP-Mutante wurden in Ibidi-Kammern mit 200 µg/ml Lactoferrin versetzt. Die Morphologie der Mitochondrien

wurde mit dem Konfokalmikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt und dokumentiert.

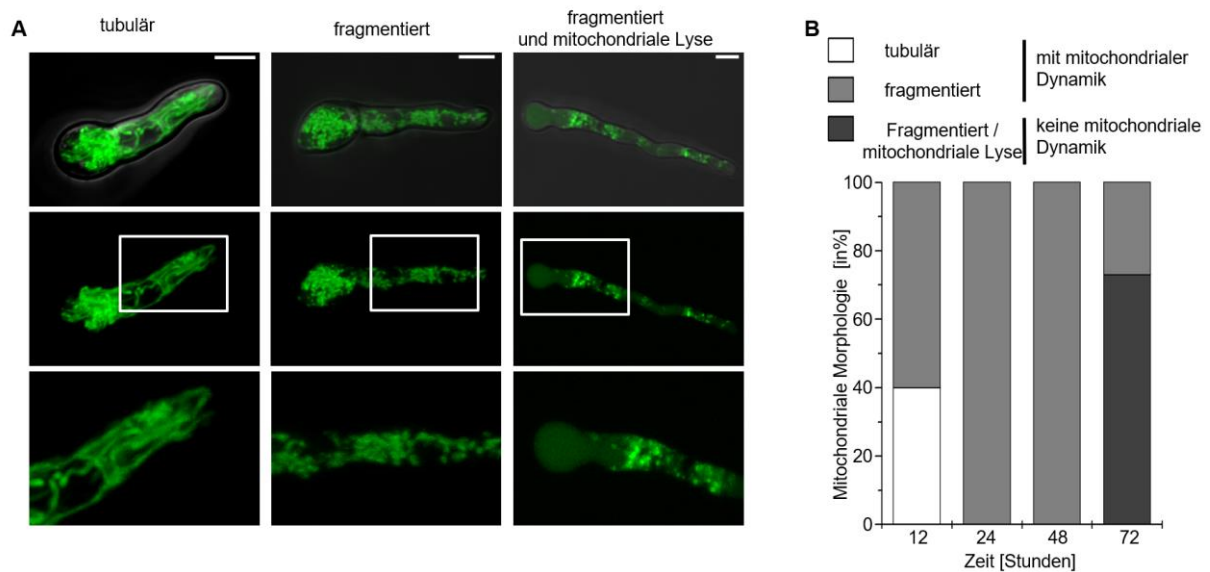


Abbildung 8.13: *Aspf3* und *Af311* sind wichtig für das Überleben bei Eisenmangel. Sporen der *aspf3_{tetOn} Δaf311*-Mutante, die mitochondriales GFP exprimiert, wurden in RPMI-1640 mit 200 µg/ml Lactoferrin und 100 ng/ml bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die mitochondriale Morphologie wurde mit einem Konfokalmikroskop analysiert. **A:** Repräsentative Bilder von Hyphen mit tubulärer Mitochondrienmorphologie (links, 12 h), fragmentierter Mitochondrienmorphologie (mittig, 24 h) und fragmentierter Mitochondrienmorphologie mit zytosolischer Fluoreszenz (Mitolyse, rechts, 72 h). Die dargestellten Bilder zeigen die Übereinanderlegung verschiedener Schnitte einer ganzen Hyphe. In der obersten Reihe sind Hellfeld und GFP-Fluoreszenzbilder übereinandergelegt. Die mittlere Reihe zeigt die alleinige GFP-Fluoreszenz. Die unterste Reihe zeigt die Vergrößerung der weiß umrandeten Areale. **B:** 100 Hyphen wurden in unabhängigen Proben pro Zeitpunkt auf ihre mitochondriale Dynamik und Morphologie analysiert. Hyphen, die eine tubuläre oder fragmentierte Morphologie mit Dynamik zeigten, wurden als lebendig betrachtet. Hyphen mit einer fragmentierten mitochondrialen Morphologie ohne Dynamik oder Hyphen mit einer zytosolischen Fluoreszenz wurden als tot betrachtet. Der weiße Balken repräsentiert 250 µm. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Es wurde eine quantitative Analyse der Morphologie der Mitochondrien durchgeführt. Dazu wurden bei 100 Hyphen zu verschiedenen Zeitpunkten die Morphologie und Dynamik der Mitochondrien mittels 2-minütiger Videosequenzen analysiert. Nach 12 h ließen sich bei 40 % der Hyphen tubuläre Mitochondrien beobachten (Abbildung 8.13 B). Nach 24 h waren in allen Hyphen fragmentierte Mitochondrien zu sehen. Nach 48 h waren die fragmentierten Mitochondrien noch dynamisch, bevor nach 72 h keine Dynamik der Mitochondrienmorphologie mehr beobachtet wurde. In manchen Hyphen konnten nach 72 h auch gar keine Mitochondrien mehr abgegrenzt werden. Sie zeigten eine zytosolische Fluoreszenz, die wahrscheinlich durch die Lyse der Mitochondrien verursacht wurde. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Sporen von *aspf3_{tetOn} Δaf311* unter reprimierten Bedingungen und Eisenmangel auskeimen, aber nach etwa 24 h in einem Wachstumsarrest verharren. Während dieses Arrests können sie noch über einen längeren Zeitraum am Leben

bleiben. Schließlich führt der Eisenmangel dann zum Absterben der Mehrzahl der Hyphen.

8.7 Die Deletion des Eisenaufnahmepressors SreA kompensiert teilweise das Fehlen von Aspf3 und Af311

Die Mutanten *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn}Δaf311* zeigen einen ausgeprägten Wachstumsphänotyp unter Eisenmangel. Unter der Annahme, dass die Aufnahme von Eisen durch das Fehlen von Aspf3 und seinem Homolog Af311 gestört wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise die Produktion der Siderophore beeinflusst wird. Siderophore sind kleine Moleküle, die u. a. von *A. fumigatus* in das umliegende Medium abgegeben werden, um Eisen zu binden. Anschließend werden sie aktiv wieder aufgenommen und das so gewonnene Eisen wird akquiriert. Eine Deletion einzelner Siderophore führt zu einer deutlich reduzierten Virulenz und könnte eine bisher unbekante Verbindung zu den Peroxiredoxinen aufzeigen ^{114,117}. Eine Siderophoren-defiziente *sidC*-Mutante, zur Verfügung gestellt durch die Arbeitsgruppe Prof. Haas, wurde mit der *aspf3_{tetOn}*-Mutante verglichen. Sie zeigte ebenfalls ein gehemmtes Wachstum unter Eisenchelatierung durch Lactoferrin (Abbildung 8.14).

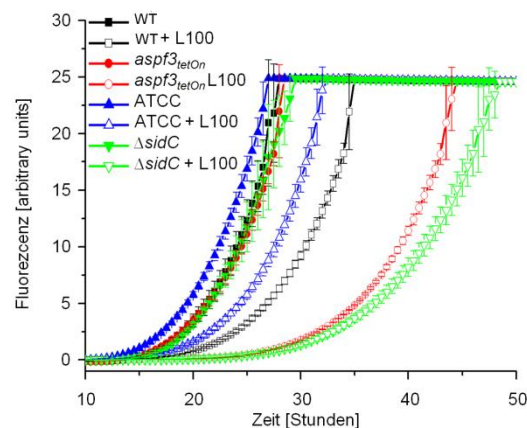


Abbildung 8.14: Vergleich der *aspf3_{tetOn}*-Mutante mit der *SidC*-Deletionsmutante. $1,5 \times 10^4$ Sporen wurden in RPMI-1640, 100 ng/ml $FeSO_4$ mit oder ohne 100 $\mu g/ml$ Lactoferrin sowie 0,002 % (w/v) Resazurin gegeben. Dann wurde die Umsetzung von Resazurin zu Resofurin durch Messung der Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 37 °C und 5 % CO_2 über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate.

Siderophore werden durch ein komplexes Netzwerk reguliert. Zwei der wichtigsten Regulatorproteine sind SreA und HapX ^{120,121}. Bei Eisenüberschuss hemmt SreA die

Aufnahme, während HapX die Eisendetoxifizierung steuert. Bei Eisenmangel hingegen aktiviert HapX eine Kaskade zur Hemmung der eisenverbrauchenden Stoffwechselwege und SreA aktiviert die Eisenaufnahme mittels Siderophore¹²⁰. Die Wachstumsschwäche von *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn}Δaf3I1* könnte somit durch eine Hemmung der Eisenaufnahme verursacht werden.

Daher wurde die Deletion von *SreA* in der Doppelmutante mit einer Deletionskassette und in Zusammenarbeit mit Evgeny Golubtsov durchgeführt (Abschnitt 7.10.2). Die Mutanten *ΔsreA*, *aspf3_{tetOn}ΔsreA* und *aspf3_{tetOn}Δaf3I1ΔsreA* wurden auf ihr Verhalten untersucht (Abbildung 8.15). Dabei zeigte sich, dass die *SreA*-Mutanten auf AMM-Agar eine leichte Wachstumsretardierung aufweisen. Bei Expression von *Aspf3* zeigten *aspf3_{tetOn}ΔsreA* und *aspf3_{tetOn}Δaf3I1ΔsreA* ein stärkeres Wachstum als die reine *ΔsreA*-Mutante. Es scheint, als ob die Überexpression von *aspf3* die physiologische Expression übertrifft und wachstumsfördernd wirkt.

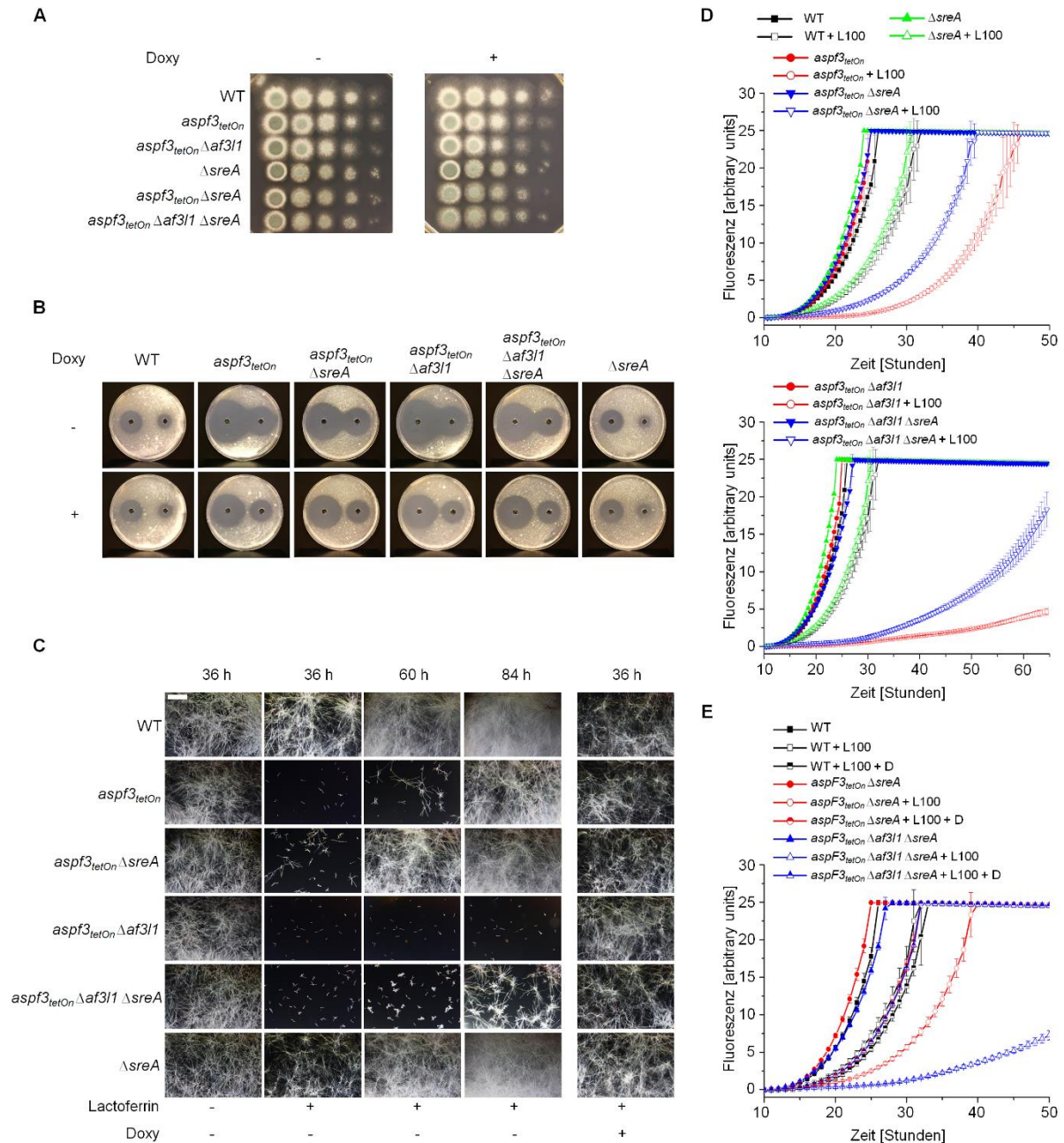


Abbildung 8.15 Untersuchungen der *SreA*-Deletionsmutanten in *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn}Δaf311* **A** 3 μ l Aliquots von Verdünnungsreihen (Verhältnis 1:10) der verschiedenen Stämme, startend mit einer Konzentration von 4×10^7 Sporen ml^{-1} wurden auf AMM-Agarplatten gegeben und für 30 h bei 37 °C inkubiert. **B**: 4×10^5 Sporen der verschiedenen Stämme und WT wurden auf AMM-Agarplatten aufgetragen. In zwei Vertiefungen wurden 50 μ l einer 300 mM (links) und 100 mM (rechts) H_2O_2 -Lösungen zugegeben. Dann wurde für 30 h bei 37 °C inkubiert und anschließend fotodokumentiert. **C**, **D** und **E**: $1,5 \times 10^4$ Sporen der Stämme wurden in RPMI-1640 mit 100 ng/ml FeSO_4 und Lactoferrin (**C**: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; **D**: und **E**: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, +L100) gegeben. **C**: Es wurde für 84 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und zu den angegebenen Zeiten wurden dieselben Ausschnitte der 96-well-Platte fotodokumentiert. **D** und **E**: Es wurde mit einer Endkonzentration von 0,002 % (w/v) Resazurin der Umsatz zu Resofurin in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 37 °C und 5 % CO_2 durch Messung der Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier technischer Replikate. **E**: Für die Promoterinduktion wurden 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin (+D) zugegeben. Der weiße Balken entspricht 250 μm . Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Die Mutante mit einer *sreA* Deletion ist in der Literatur auch als sensitiv gegenüber Menadion beschrieben ¹²⁰. Die Deletion von *sreA* verbesserte leicht die Wasserstoffperoxid-Toleranz des WT sowie der Mutanten *aspf3_{tetOn}* und

aspf3_{tetOn} Δaf311. Die durch Eisenmangel ausgelöste Wachstumsverzögerung bei WT verbesserte sich nicht durch die Deletion von *sreA*. In *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* konnte jedoch ein stärkeres Wachstum beobachtet werden, dessen Ausmaß aber nicht mit dem WT-Wachstum vergleichbar war. Diese Beobachtungen konnten auch mit Wachstumskurven durch Resazurin bestätigt werden (Abbildung 8.15).

8.8 Die ROS-Sensitivität von *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* ist unter Eisenmangel erhöht

Um zu untersuchen, ob *Aspf3* und sein Homolog *Af311* benötigt werden, um unter Eisenmangel oxidativem Stress entgegenzuwirken, wurden Sporen von WT und der Mutanten *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* erneut unter Eisenmangel auf Pepton-Agarose-Platten unter reprimierten Bedingungen gegeben. Dann wurde H₂O₂ zugegeben (Abbildung 8.16). Beim Vergleich der Testplatten unter Eisenzugabe konnte kein Unterschied zwischen *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* festgestellt werden. Bei Eisenmangel zeigen beide Mutanten im Gegensatz zu WT eine nochmals gesteigerte ROS-Sensitivität. *Aspf3_{tetOn} Δaf311* zeigte unter Eisenmangel im direkten Vergleich nochmal eine minimal stärkere Sensibilität als *aspf3_{tetOn}*.

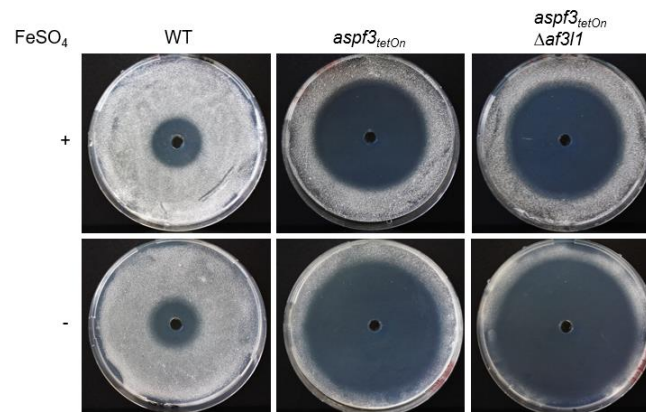


Abbildung 8.16 ROS-Sensibilität unter Eisenmangel: Sporen von WT, *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* wurden auf Pepton-Agaroseplatten (1 % [(w/v)] Agarose, 1 % [(w/v)] Peptone; pH 7.0) gleichmäßig ausgestrichen. Wenn angegeben wurde das Medium mit 5 µg/ml FeSO₄ versetzt. In die Vertiefung wurden 50 µl einer 100 mM H₂O₂-Lösung gegeben. Anschließend wurde für 48h bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung wurde in Brantl et al.¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

8.9 Durch den Radikalfänger N-Acetyl-Cystein kann das Wachstum von *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* unter Eisenmangel verbessert werden

N-Acetyl-Cystein (ACC) ist ein Radikalfänger, der möglicherweise intrinsisch generierten ROS-Stress abfangen kann¹⁴³. Um zu klären, ob dies tatsächlich der Fall

ist, wurden *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* unter reprimierten Bedingungen erneut in RPMI-1640 mit Lactoferrin oder Lactoferrin und ACC inkubiert.

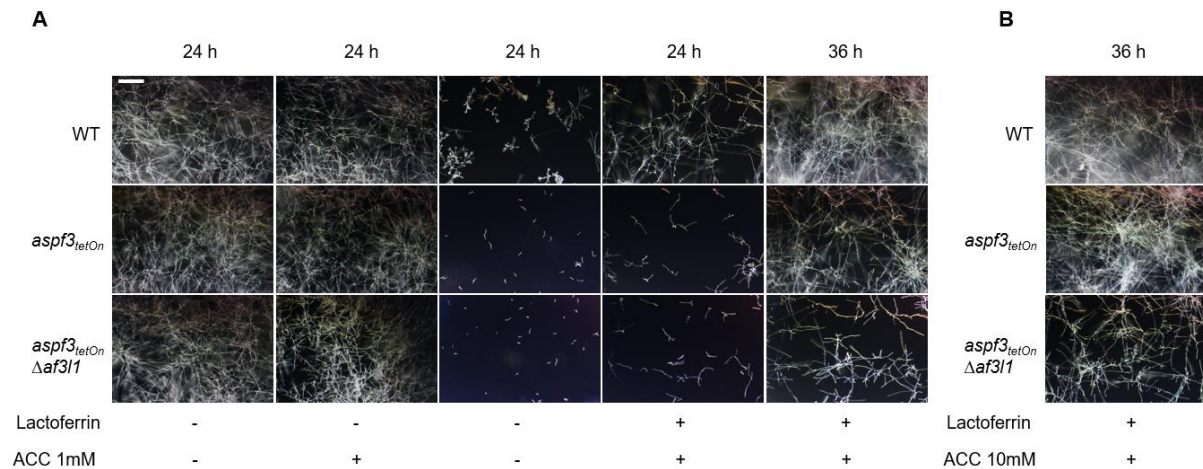


Abbildung 8.17 Untersuchungen mit dem Radikalfänger N-Acetyl-Cystein (AAC). **A** und **B**: 1.000 Sporen der verschiedenen Stämme wurden in RPMI-1640, 100 ng/ml FeSO₄ sowie wenn angegeben 200 µg/ml Lactoferrin gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. **A**: Wenn angegeben wurde zusätzlich 1mM ACC zugesetzt. **B**: 10mM ACC wurden zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde fotodokumentiert. Der weiße Balken entspricht 250 µm.

Es zeigte sich, dass sowohl der WT als auch beide Mutanten von diesem Radikalfänger profitieren. Dieser Effekt ist bei 1 mM gering, bei 10 mM deutlicher zu erkennen. Die *aspf3_{tetOn} Δaf311*-Mutante zeigt jedoch nicht dasselbe Wachstumsverhalten wie der WT.

8.10 Die Zugabe von Eisen unterstützt das Wachstum von *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* in humanem Serum

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* unter reprimierten Bedingungen und Eisenmangel schlecht auskeimen und wachsen. Um die Relevanz für die Infektion zu untersuchen, wurden beide Mutanten auf ihr Wachstumsverhalten in humanem Serum getestet. Eisen ist im Serum an Transferrin gebunden und weist dadurch eine ähnlich eisenarme Umgebung auf, wie es durch Eisenbindung durch Lactoferrin im Sputum erzeugt wird ^{144,145}.

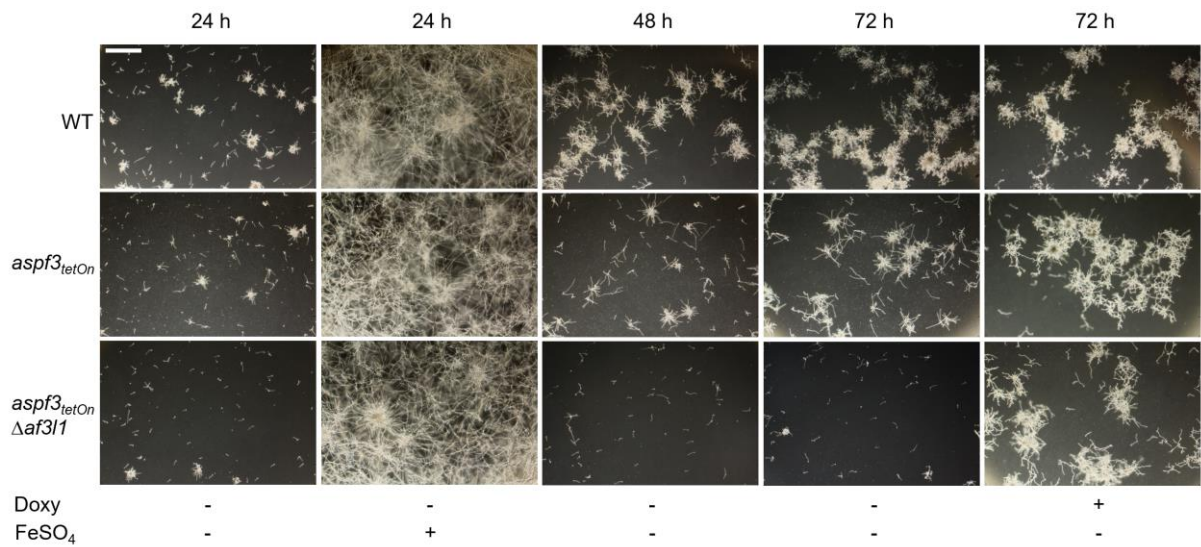


Abbildung 8.18 Wachstumsverhalten von WT, *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf3/1* in menschlichem Serum: $1,5 \times 10^3$ Sporen der angegebenen Stämme wurden in 60 % (vol/vol) Serum in H₂O_{dd} in einer 96-well-Platte bei 37 °C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Wenn angegeben wurden anfangs für die Promoterinduktion 7,5 µg/ml Doxycyclin oder 50 µg/ml FeSO₄ zugegeben. Der Größenbalken entspricht 250 µm. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Das Wachstum der *aspf3_{tetOn}*-Mutante und noch mehr das der *aspf3_{tetOn} Δaf3/1*-Mutante war in 60 % (vol/vol) Serum, verdünnt mit H₂O im Vergleich zu WT signifikant reduziert (Abbildung 8.18). Durch die Induktion des Promoters durch Doxycyclin konnte WT ähnliches Wachstum erreicht werden. Durch die Zugabe von Eisen konnte das Wachstum bei allen Stämmen drastisch verbessert werden.

9 Diskussion

9.1 Die erhöhte ROS-Sensibilität der *aspf3_{tetOr}*-Mutante spielt keine signifikante Rolle bei der Konfrontation mit neutrophilen Granulozyten

Die verzögerte Diagnosestellung einer Infektion mit dem filamentösen humanpathogenen Schimmelpilz *A. fumigatus* verbunden mit seinem schnellen destruktiven Wachstum, sind mitverantwortlich für die hohen Mortalitätsraten und schlechte Prognose^{18–21}. Zu Beginn einer Infektion sind neben Alveolar-makrophagen, die Sporen bereits frühzeitig in den Alveolen angreifen können, vor allem neutrophile Granulozyten an der Abwehr des Krankheitserregers beteiligt^{49,146}. Sie können sich an die Hyphen anhaften und durch die Bildung eines antimikrobiellen Milieus z.B. durch ROS oder NETs aktiv den Pilz bekämpfen^{49,146}. Dass von Immunzellen gebildete radikale Sauerstoffspezies bei der Abwehr sehr wichtig sind, wurde von Aratani et al. in einem Mausinfektionsmodell für die Pilzspezies *C. albicans* und *A. fumigatus* gezeigt¹⁴⁷. Sowohl in Mäusen mit einem Knockout der Myeloperoxidase (MPO) als auch bei Mäusen mit NADPH-Oxidase-Mangel (X-chromosomale chronische Granulomatose) fehlen jeweils wichtige Proteine, die es den Immunzellen erlauben, ROS zu bilden¹⁴⁷. Nach Infektion der Mäuse mit *C. albicans* oder *A. fumigatus* zeigte sich bei ihnen eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Maus-Kontrollgruppe, deren Immunzellen ausreichend ROS bilden können¹⁴⁷.

A. fumigatus weist verschiedene Mechanismen auf, um auf externe ROS zu reagieren, diese abzufangen und trotzdem eine Infektion aufzubauen^{61,77}. Lessing et al. untersuchten in *A. fumigatus*, welche Proteine bei der Detoxifizierung dieser ROS beteiligt sind⁶¹. Eine Proteomanalyse unter oxidativen Stressbedingungen von *A. fumigatus* zeigte, dass von den Proteinen mit antioxidativen Eigenschaften, Asp3 das am stärksten exprimierte Protein ist, gefolgt vom Peroxiredoxin-1 (Prx1), der Cytochrom C-Peroxidase, der Cu/Zn-Superoxiddismutase sowie der Katalase Cat1⁶¹. All diese Proteine stehen unter der gemeinsamen Kontrolle des Genregulators Yap1, dessen Homologe auch in *S. cerevisiae* und *C. albicans* zu finden sind⁶¹. Durch eine Deletion von *yap1* in *A. fumigatus*, konnte in einer weiteren Proteomanalyse unter oxidativen Stressbedingen keine Expression von Asp3, Prx1,

Cytochrom C-Peroxidase sowie Cat1 und Cat2 gefunden werden ⁶¹. Entsprechend zeigte die Deletionsmutante $\Delta yap1$ eine sehr hohe Sensibilität gegenüber ROS-Stress ⁶¹. Eine Beeinträchtigung der Virulenz konnte in einem Mausinfektionsmodell jedoch nicht festgestellt werden ⁶¹. Auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber neutrophilen Granulozyten zeigte $\Delta yap1$ im Vergleich zu WT nicht ⁶¹. Hillmann et al. konnten später zeigen, dass eine Deletion von *aspf3* auch zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ROS-Stress führt. In einem anschließend durchgeführten Mausinfektionsexperiment zeigte sich, dass $\Delta aspf3$ avirulent ist ⁷⁷. Die hohe ROS-Sensibilität wurde von den Autoren als Hauptursache für die Avirulenz von $\Delta aspf3$ diskutiert ⁷⁷. Aspf3, das auch auf der Sporenoberfläche zu finden ist, könnte gleich zu Beginn der Infektion die Entgiftung von externen ROS-Stress übernehmen und deshalb entscheidend dazu beitragen, dass eine Infektion etabliert und aufrechterhalten wird ¹⁴⁸.

Die für diese Arbeit erzeugte konditionelle *aspf3_{tetOn}*-Mutante zeigte unter reprimierten Bedingungen eine sehr hohe ROS-Sensibilität, die vergleichbar mit der reinen Deletionsmutante $\Delta aspf3$ ist. Die Untersuchung der Sensitivität gegenüber neutrophilen Granulozyten zeigte aber keinen Unterschied zwischen WT und *aspf3_{tetOn}* unter reprimierten Bedingungen ¹²⁵. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da die von neutrophilen Granulozyten durch die MPO und NADPH-Oxidase erzeugten ROS-Spezies als sehr wichtig für die Bekämpfung von Krankheitserregern beschrieben werden ^{147,40}. Es bleibt unklar, warum in unserer Arbeit mit neutrophilen Granulozyten kein Unterschied zwischen WT und *aspf3_{tetOn}* gemessen werden konnte, obwohl schon sehr geringe Mengen von H₂O₂ die Mitochondrienmorphologie von *aspf3_{tetOn}* massiv verändern und zu deren Absterben führen ¹⁴⁹.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die anderen antioxidativen Proteine, die bei oxidativen Stress exprimiert werden, den Verlust von Aspf3 nicht sofort kompensieren können, wenn das schnell wirksame H₂O₂ zugegeben wird ⁶¹. Neutrophile Granulozyten hingegen müssen die Hyphen erst mittels PAMPs erkennen, bevor die ROS-Produktion aktiviert wird ^{11,71}. Diese Verzögerung wiederum könnte es den Hyphen erlauben, die Genexpression für andere antioxidative Proteine zu induzieren und so den Verlust von Aspf3 zu kompensieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass die neutrophilen Granulozyten sehr punktuell

extrem hohe ROS-Konzentrationen erreichen. Wenn diese Konzentration genügt, um auch WT in gleicher Weise zu schädigen, ist ein Unterschied durch unsere Messmethode schwer zu detektieren.

Vielleicht ist die Bildung von ROS aber nicht entscheidend an der Abtötung von *A. fumigatus* beteiligt. Es ist einerseits beschrieben, dass neutrophile Granulozyten von SG-Patienten keine ROS bilden können und deshalb anfälliger für Krankheiten durch Bakterien und Pilze sind⁵⁵. Andererseits wurde durch Zarembek et al. gezeigt, dass zellfreie Überstände von degranulierten Neutrophilen von Gesunden und SG-Patienten gleichermaßen das Wachstum von *A. fumigatus*-Sporen hemmen können⁵³. Die Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten eine Reihe von antimikrobiellen Proteinen wie Lysozym, Lipocalin, Lactoferrin und weitere, kleinere Peptide^{53,150}. Ihre Freisetzung könnte einen größeren Einfluss haben als die Bildung von ROS. Neutrophile Granulozyten besitzen aber noch weitere Mechanismen, um Krankheitserreger an der Etablierung einer Infektion zu hindern^{47,151}.

Ein weiterer Mechanismus ist die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), einem Netzwerk aus extrazellulären Fasern, DNA sowie daran anhaftenden Proteinen^{47,151}. Diese NETs können Pathogene wie Sporen oder Hyphen binden und durch die anhaftenden Proteine sowie durch Immobilisation am weiteren Wachstum hindern^{47,151}. Interessanterweise scheint die Bildung von ROS durch die MPO an der Aktivierung der NETs beteiligt zu sein^{152,153}. Die Bildung von ROS führt zur Translokation einer Neutrophilen-Elastase in den Zellkern der neutrophilen Granulozyten. Dort kommt es zu einer Dekompensation des Zellkerns, was die Bildung der NETs auslöst^{152,153}. ROS sind hochreaktiv, kurzlebig und der exakte Mechanismus dieser Aktivierung von NETs ist bisher nicht bis ins letzte Detail geklärt¹⁵³. Metzler et al. konnten aber in neutrophilen Granulozyten von SG-Patienten beobachten, dass durch die Stimulation mit *C. albicans* keine Translokation der Neutrophilen-Elastase in den Zellkern und keine NET-Bildung ausgelöst werden kann¹⁵³. Sie führen dies auf das Fehlen der MPO zurück¹⁵³. Diese Ergebnisse könnten die hohen Anfälligkeit der MPO-Knock-Out-Mäuse in den Infektionsexperimenten von Aratani et al. erklären¹⁴⁷. Demnach wäre nicht die fehlende direkte Abtötung von *C. albicans* und *A. fumigatus* durch ROS die Ursache der hohen Anfälligkeit, sondern die fehlende ROS-vermittelte Aktivierung der NETs.

Zusammenfassend scheint die durch ROS verursachte verstärkte Abtötung von $\Delta aspf3$ nicht die Ursache der im murinen Infektionsmodell beobachteten Avirulenz zu sein. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine direkte ROS vermittelte Abwehr von Pathogenen durch neutrophile Granulozyten einen geringeren Stellenwert zu haben scheint, wie er bisher angenommen wurde^{53,147,153}.

9.2 Die $aspf3_{tetOn}$ -Mutante hat einen Wachstumsdefekt unter Eisenmangel, der durch Deletion des Homologs Af3I1 verstärkt wird

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Wachstumsdefekt von $\Delta aspf3$ und $aspf3_{tetOn}$ unter Eisenmangel und reprimierten Bedingungen entdeckt und beschrieben. Beide Mutanten haben große Probleme, nach dem Entzug von Eisen aus dem Medium auszukeimen und zu wachsen. Dieser Wachstumsdefekt wird durch die zusätzliche Deletion des Gens des Aspf3-Homologs Af3I1 verstärkt. Sie führt zu einem Wachstumsarrest und langsamen Absterben der Hyphen. Das zweite Homolog, Af3I2, ist nicht beteiligt. In seiner Sequenz konnte eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz identifiziert werden. Sie sorgt dafür, dass Af3I2 in ein anderes Zellkompartiment transportiert wird und nicht an den Stoffwechselfvorgängen von Aspf3 und Af3I1 teilnimmt. Eine Zellkompartiment-übergreifende Detoxifizierung von ROS scheint hier nicht stattzufinden. Aber welche Bedeutung hat dieser Wachstumsphänotyp für *A. fumigatus*? Was ist bisher über Homologe von Aspf3 in anderen Pilzspezies bekannt? Gibt es eine Verbindung zum Eisenstoffwechsel?

Das in *S. cerevisiae* identifizierte Aspf3-Homolog ScAhp1, in *A. nidulans* Homologe AnPrxA und in *C. albicans* Homologe Ahp1 sind alle, wie Aspf3 in *A. fumigatus*, typische 2-Cys Peroxiredoxine^{77,154–156}. Sie bilden ein Homodimer und sind wie Aspf3 in ihrer jeweiligen Spezies an der Entgiftung von ROS beteiligt^{77,154–156}. Ein Wachstumsdefizit unter Eisenmangel wurde bei Deletion der jeweiligen Gene von Aspf3, ScAhp1, AnPrxA und CaAhp1 bisher nicht gezeigt. Eine Verbindung zum Eisenstoffwechsel wurde bisher nicht beschrieben^{77,154–156}. Auch das unter oxidativem Stress gebildete 1-Cys Peroxiredoxin Prx1 ist an der Entgiftung von ROS beteiligt¹⁵⁷. Es besitzt wie Aspf3 zwei weitere Homologe PrxB und PrxC, die beide, ähnlich zu Af3I2, eine mitochondriale Zielsequenz aufweisen¹⁵⁷. Die Deletionsmutante $\Delta prx1$ ist sehr ROS-sensibel und zeigte im Mausinfektionsexperiment ein abgeschwächte Virulenz¹⁵⁷. Ein Hinweis auf eine Verknüpfung mit dem Eisenmetabolismus wurde ebenfalls nicht gefunden¹⁵⁷. Da

bisher keine Verbindung zwischen Aspf3 oder anderen Peroxiredoxinen mit dem Eisenstoffwechsel beschrieben wurde, stellte sich die Frage, ob Aspf3 unter Eisenmangel wichtig für die Eisenaufnahme ist.

9.3 Aspf3 ist nicht an der Eisenaufnahme oder Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligt

Ein wichtiger Überlebensfaktor für *A. fumigatus* ist die Synthese von Siderophoren, um Eisen aus der Umgebung zu mobilisieren und aufzunehmen¹⁵⁸. Mutanten deren Siderophorensynthese beeinträchtigt ist zeigen unter Eisenmangel-Bedingungen ein gehemmtes Wachstum, das vergleichbar mit dem Wachstum von *aspf3_{tetOn}* bei Eisenmangel und reprimierten Bedingungen ist^{118,158}. Es wurde angenommen, dass der Wachstumsdefekt auf eine gestörte Regulation der Siderophorensynthese zurückzuführen sein könnte. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Haas (Institut für molekulare Biochemie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) erfolgte eine Analyse der Produktion der extrazellulären Siderophore Triacetylfusarinin C und Fusarinin C sowie des intrazellulären Siderophors Ferricrocin in der *aspf3_{tetOn}*-Mutante und WT unter induzierten und reprimierten Bedingungen.

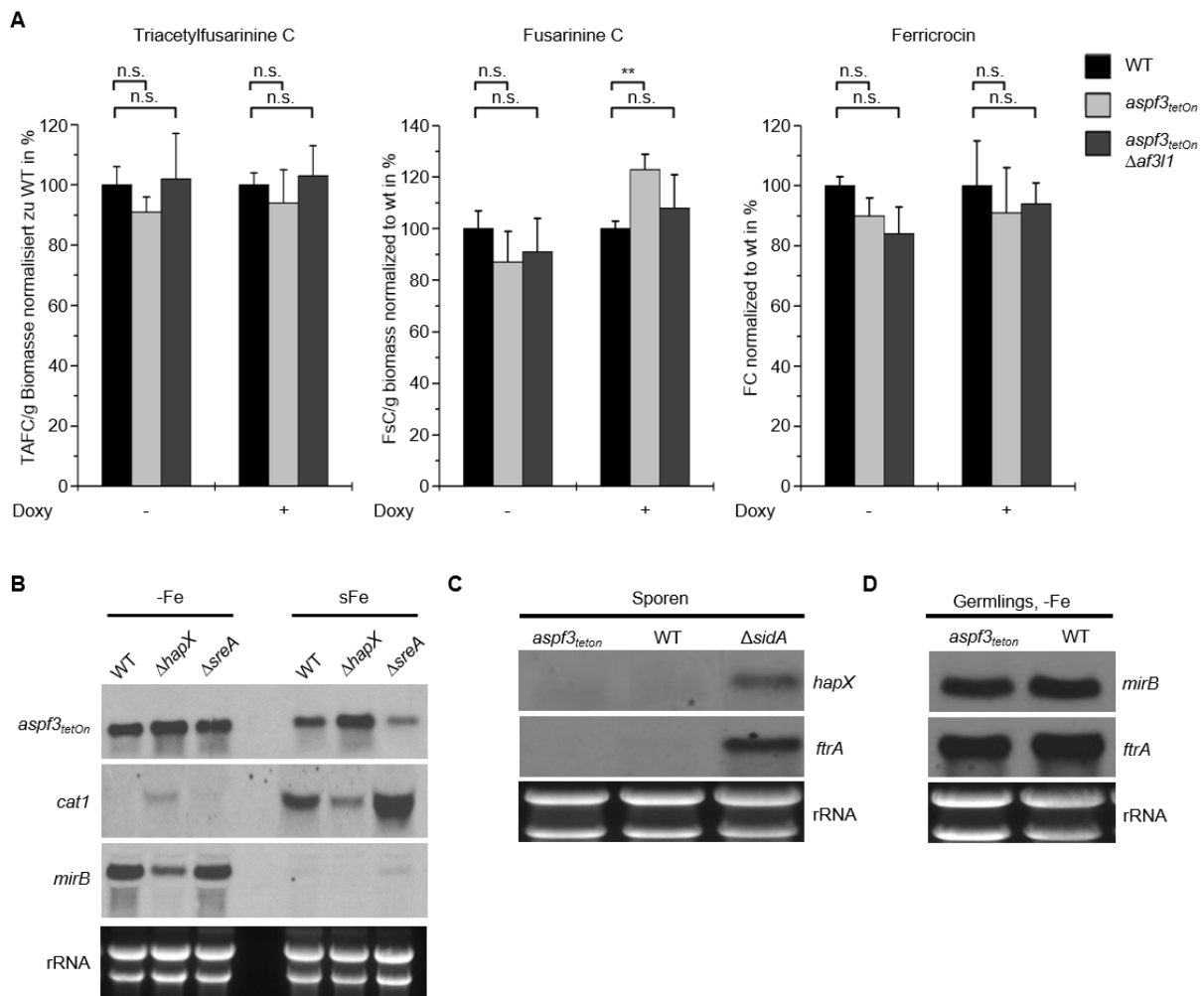


Abbildung 9.1 Die Siderophoren-Biosynthese ist in *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf311* unverändert. Die *aspf3*-Expression reagiert auf Eisen. **A:** Produktion der extrazellulären (Triacetylfulvarin C und Fusarinin C) sowie intrazellulären (Ferricrocin) Siderophore bei 37 °C für 18 h in einer flüssigen AMM-Variante. Die Biomasse wurde auf WT normiert. Wenn angegeben wurde dem Medium Doxycyclin (10mg/ml) zugegeben. Die statistische Signifikanz (n.s. nicht signifikant [P > 0,05]; **, P < 0,01) wurde mit einer einfaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey Test berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für drei technische Replikate. **B:** Sporen (1×10^6) von WT, $\Delta hapX$ und $\Delta sreA$ wurden jeweils in 100 ml flüssigem AMM in Schüttelkolben bei 37 °C für 18 h unter reduzierten Eisenbedingungen inkubiert (-Fe). Dann wurde 0,04 mM $FeSO_4$ zugegeben und für 1 weitere Stunde unter denselben Bedingungen wie zuvor inkubiert, um die kurzfristige Reaktion auf den Ausgleich des Eisenmangels zu einer ausgeglichenen Eisenadaptation zu beobachten (sFe). Die gesamte RNA wurde vor (-Fe) und nach Eisenzugabe (sFe) isoliert und eine Northernblot-Analyse mit *aspf3*-, *cat1*- und *mirB*-Hybridisierungssonden durchgeführt. Die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA wird als Kontrolle für die RNA-Beladung und Qualität abgebildet. **C:** Sporen von WT, *aspf3_{tetOn}* und $\Delta sreA$ wurden auf Complete-Medium für 72 h bei 37 °C unter reprimierten Bedingungen inkubiert und die Sporen geerntet. 3×10^9 Sporen wurden schockgefrostet und es wurde eine RNA-Isolation und Northern-Blot-analyse durchgeführt. **D:** 3×10^9 Sporen von WT und *aspf3_{tetOn}* wurden in 50 ml AMM für 9 h unter Eisenmangel (-Fe) bei 37 °C inkubiert. **B+C:** Die Gesamt-RNA wurde isoliert und es wurde eine Northern-Blot-Analyse mit *hapX*-, *ftrA*- und *mirB*-Hybridisierungssonden durchgeführt. Die Ethidiumbromid-Färbung der rRNA wird als Kontrolle für Beladung und Qualität gezeigt. Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ veröffentlicht und modifiziert übernommen.

Wie Abbildung 9.1 zeigt, konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der verschiedenen Siderophore festgestellt werden. Das Wachstumsdefizit von *aspf3_{tetOn}* ist nicht durch eine gehemmte Siderophorenbiosynthese zu erklären. Es wurde spekuliert, ob eine unvollständige Hemmung der Regulation von Eisenaufnahme-Regulatoren eine Ursache sein könnte. Deshalb wurde die Auswirkung einer Deletion

von *SreA*, einem Regulator, der die Siderophorenbiosynthese zentral steuert, untersucht. *SreA* hemmt transkriptionell unter ausreichender Eisenverfügbarkeit die Eisenaufnahme, während der Gegenspieler *HapX* die Eisenaufnahme aktiviert und eisenverbrauchende Stoffwechselwege bei Eisenmangel stoppt. Es zeigte sich interessanterweise, dass die Deletion von *sreA* in *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf3/1* den Wachstumsdefekt bei Eisenmangel und reprimierten Bedingungen teilweise kompensieren kann. Auch die ROS-Sensibilität von *aspf3_{tetOn} ΔsreA* und *aspf3_{tetOn} Δaf3/1 ΔsreA* ist unter reprimierten Bedingungen leicht reduziert. Diese partielle Kompensation deutet darauf hin, dass die ROS-Sensibilität und der Wachstumsphänotyp unter Eisenmangel nicht durch *SreA* vermittelt wird. Auch die Tatsache, dass die Siderophorenproduktion in *aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} Δaf3/1* normal ist, zeigt, dass *Aspf3* keinen Einfluss auf die Siderophorensynthese hat. Die ROS-Sensibilität und das Wachstum unter Eisenmangel scheinen aber zusammenzuhängen, da *SreA* beide beeinflusst.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Haas wurde untersucht, ob eine *aspf3*-Expression durch die Eisen-Homöostase reguliert wird. Dazu wurde WT mit Mutanten, denen *SreA* oder *HapX* fehlen, unter Eisenmangel und nach Zugabe von Eisen auf ihre Expression von *aspf3* untersucht. Als Kontrolle des Transkriptionsniveaus wurden die Gene *cat1* und *mirB* analysiert. Letzteres transkribiert für einen Siderophorentransporter^{120,121}. Unter Eisenmangel zeigte sich bei WT und den beiden Mutanten *ΔsreA* und *ΔhapX* zu Beginn ein ähnliches Transkriptionsniveau von *aspf3*. Nach Zugabe von Eisen reduzierte sich das *aspf3*-Transkriptionsniveau bei der *ΔsreA*-Mutante noch stärker als bei WT, während das Niveau bei der *ΔhapX*-Mutante unverändert blieb. Die verminderte Expression von *aspf3* in der *ΔsreA*-Mutante nach Zugabe von Eisen könnte durch die erhöhte Eisenaufnahme erklärt werden, die in der *ΔsreA*-Mutante zu finden ist¹⁵⁹. Die fehlende Herunterregulierung von *Aspf3* in der *ΔhapX*-Mutante deutet darauf hin, dass *HapX* für eine Hemmung von *Aspf3* während der kurzfristigen Anpassung an einen Eisenmangel erforderlich ist. Im Vergleich zu *cat1* zeigt sich eine gegenläufige Expression die in Abhängigkeit von der aktuellen Eisenverfügbarkeit steht. Um zu analysieren, ob während der Keimung ein Einfluss von *Aspf3* auf den Eisenstoffwechsel zu finden ist, wurden Sporen und auskeimende Hyphen auf Transkriptionsebene untersucht. Bei Mutanten wie z. B. der *ΔsidA*-Mutante, der

intrazelluläre Siderophore fehlen, können charakteristische Veränderungen im Transkriptom bei einer veränderten Eisenhomöostase beobachtet werden ¹¹⁹. In Abbildung 9.1 C ist zu sehen, dass weder *hapX* noch *ftrA* (kodierend für eine Eisenpermease, die an der reduktiven Eisenaufnahme beteiligt ist) in Konidien der *aspf3_{tetOn}*-Mutante vermehrt exprimiert sind. Auch das Transkriptionsniveau des Siderophorentransporters *mirB* und Eisenpermease *ftrA* veränderten sich während der Germination unter Eisenmangel und reprimierten Bedingungen nicht in der *aspf3_{tetOn}*-Mutante. In Zusammenarbeit mit Prof. Haas konnte gezeigt werden, dass Asp3 keinen Einfluss auf die Regulation der Siderophorensynthese in *A. fumigatus* hat. Die Expression von *aspf3* ist abhängig von HapX sowie der Eisenverfügbarkeit und ist gegenläufig zur Expression von *cat1*.

9.4 Durch Zugabe von Eisen lässt sich die Virulenz der Asp3-defizienten Mutante in einem Mausinfektionsexperiment wiederherstellen

Um eine Infektion zu etablieren und aufrechtzuerhalten, ist die Versorgung mit essentiellen Spurenelementen wie Eisen für *A. fumigatus* von entscheidender Bedeutung ^{113,117}. Im menschlichem Serum wird durch eisenbindende Transferrine ein eisenarmes Milieu erzeugt ^{144,145}. In der Lunge entsteht dieses Milieu durch Lactoferrin, das zu den Transferrinen gehört und in hohen Konzentrationen in Lungensekret zu finden ist ^{88,89}. *Aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn}Δaf311* haben bei Eisenmangel, induziert durch Lactoferrin, BPS oder durch Transferrine, Schwierigkeiten auszukeimen und zu wachsen. Somit stellt sich die Frage, ob durch das Wachstumsdefizit unter Eisenmangel die Avirulenz im Mausinfektionsmodell erklärt werden kann.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hillmann (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V., Jena, Deutschland) wurde basierend auf den Ergebnisse dieser Arbeit erneut ein Mausinfektionsexperiment durchgeführt.

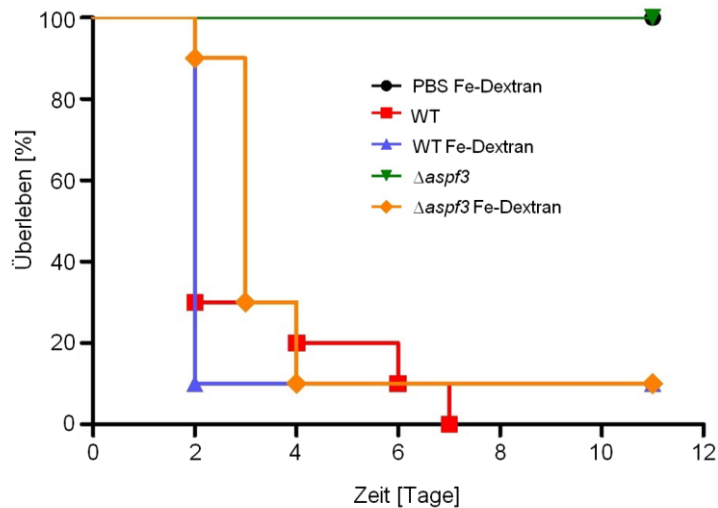


Abbildung 9.2 Die Avirulenz von $\Delta aspf3$ ist mit der Eisenaufnahme aus seiner Umgebung verbunden: Verlauf eines Mausinfektionsmodells. Mäuse der jeweiligen Gruppen (n=10) wurden durch zweimalige Injektion von Prednisolonacetat (1g/kg KG) immunkomprimiert. Die letzte Injektion Prednisolonacetat erfolgte drei Tage vor der Infektion mit 1×10^6 Sporen in 20 μ l PBS. Der Kontrollgruppe (n=4) wurde mit PBS verabreicht. Die Mäuse wurden für die Infektion mit Midazolam, Fentanyl und Medetomidine anästhesiert. Der prozentuale Anteil der Überlebenden nach jedem Tag ist im Graphen abgebildet, *, P<0,001 (log-rank-Test und Gehan-Wilcoxon Test). Die Abbildung wurde in Brantl et al. ¹³⁴ publiziert und modifiziert übernommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Supplementierung von Eisen die Virulenz von $\Delta aspf3$ im Mausinfektionsexperiment wiederherstellt. Immunzellen wie z. B. neutrophile Granulozyten können ein eisenarmes Milieu durch die Freisetzung von Lactoferrin erzeugen ¹⁶⁰. Zember et al. konnten zeigen, dass die Granula von SG-Patienten eine hohe Konzentration an Lactoferrin aufweisen und *A. fumigatus*-Sporen am auskeimen hindern ⁵³. Die hohe Empfindlichkeit gegenüber ROS-Stress ist nicht für die Avirulenz von $\Delta aspf3$ verantwortlich. Das Ergebnis zeigt vielmehr, dass die Avirulenz auf ihre Unfähigkeit, unter Eisenmangel-Bedingungen zu wachsen, zurückzuführen ist.

9.5 Mechanistische Erklärung

Wie sichern Aspf3 und Af311 *A. fumigatus* das Überleben unter eisenarmen Bedingungen? Cruz-Garcia et al. untersuchten das Wachstum von *S. cerevisiae* unter Mangelbedingungen. Sie konnte unter diesen Bedingungen eine vermehrte intrinsische ROS-Konzentration messen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Hefezelle auf die anfallenden ROS mit einer verstärkten Expression von antioxidativen Enzymen, darunter das Aspf3/Af311-Homolog Ahp1, reagieren ¹⁶¹. Die Autoren diskutieren, dass in *S. cerevisiae* so eine ROS-Homöostase innerhalb des Organismus aufrechterhalten wird, die es erlaubt, bei Stress in einem Erhaltungsmodus zu verharren. Später kann unter günstigen

Wachstumsbedingungen schnell in eine Wachstumsphase übergegangen werden¹⁶²⁻¹⁶⁴. *Aspf3* und *Af3l1* sind bei Eisenmangel wichtig, um die ROS-Homöostase aufrechterhalten zu können. Andere antioxidative Enzyme wie *Cat1*, *Cat2* und die Cytochrom-c-Peroxidase sind funktionell von Eisen abhängig und werden entgegengesetzt zu *Aspf3* bei Eisenmangel vermindert translatiert^{121,162}. Peroxiredoxine sind nicht auf eine Häm-Gruppe angewiesen, die ein zweiwertiges Eisenatom in ihrem Zentrum trägt. So können sie eisenunabhängig in dieser Situation anfallende ROS entgiften^{77,134}. Bei ausreichender Eisenverfügbarkeit wird *aspf3* vermindert exprimiert. Bei Eisenmangel wird *cat1* vermindert und *aspf3* vermehrt exprimiert, was dabei hilft anfallenden ROS-Stress unter den jeweiligen Bedingungen abzufangen. Aber welchen Einfluss hat eine ROS-Homöostase auf *A. fumigatus*?

Die Verteilung von ROS innerhalb der Hyphen von filamentösen Pilzen ist für das gerichtete Wachstum und die Bildung neuer Hyphenabzweigungen wichtig¹⁶⁵. Semighini et al. untersuchten den Einfluss von ROS auf die Keimung und das Wachstum von *A. nidulans* in der Auskeimungsphase¹⁶³. Sie konnten durch Färbung mit Nitroblue-Tetrazolium ROS innerhalb des Myzels anfärben¹⁶³. In den Spitzen konnten höhere Konzentrationen festgestellt werden als im Mycel¹⁶³. Durch diese lokale Akkumulation von ROS während der Keimung erhalten wird die Polarität festgelegt, was das weitere Wachstum steuert¹⁶³. In *A. nidulans* konnte NoxA, eine NADPH-Oxidase gefunden werden, die zusammen mit dem Regulator NoxR und der GTPase Rac einen Komplex bildet, der für die Produktion von ROS in auskeimenden Sporen verantwortlich ist^{166,167}. In *A. fumigatus* wurde zusätzlich der Regulator RacA, der einen Komplex mit NoxA und NoxR bildet, als weiteres wichtiges Enzym gefunden^{165,168}. Eine $\Delta racA$ -Mutante zeigte eine deutlich reduzierte ROS-Produktion und einen Wachstumsphänotyp mit einem ausgeprägten verzweigten Wachstum. Unter Eisenmangel zeigte der WT ein verzweigtes Wachstum, was durch eine veränderte ROS-Homöostase mit erniedrigtem intrazellulärem ROS durch die vermehrte Expression von *Aspf3* erklärbar wäre. So kann ein langsames, ressourcenschonendes Wachstum stattfinden. *Aspf3_{tetOn}* und *aspf3_{tetOn} $\Delta af3l1$* zeigen bei Eisenmangel und unter reprimierten Bedingungen kein verzweigtes Wachstum, sondern ein gehemmtes Auskeimen mit fast keinen Verzweigungen. Die Mitochondrienmorphologie zeigt fragmentierte und geclusterte Mitochondrien, was für

eine hohe intrazelluläre ROS-Konzentration sprechen könnte. Durch die Zugabe des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein konnte bei gleichen, eisenarmen Bedingungen ein verbessertes Wachstum festgestellt werden. Dieses ist durch eine Reduktion der intrazellulären ROS-Spezies durch den Radikalfänger erklärbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Peroxiredoxine nicht nur die Aufgabe der Entgiftung von exogenem ROS-Stress haben, sondern möglicherweise auch einen wichtigen Beitrag für die intrazelluläre ROS-Homöostase leisten. Diese Homöostase ist für ein gerichtetes, koordiniertes Wachstum der Pilzhyphen wichtig. In künftigen Studien sollte die Funktion der Peroxiredoxine beim zielgerichteten Wachstum von filamentösen Pilzen eingehender untersucht werden.

10 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge:

Publikationen:

Brantl Victor, Jana Boysen, Annie Yap, Evgeny Golubtsov, Dominik Ruf, Thorsten Heinekamp, Marie Straßburger, Karl Dichtl, Hubertus Haas, Falk Hillmann, Johannes Wagener *mBio*. **2021** Aug 31;12(4)

“Peroxiredoxin Asp3 Is Essential for *Aspergillus fumigatus* To Overcome Iron Limitation during Infection”

Ruf Dominik, **Brantl Victor**, Wagener Johannes *Front. Cell. Infec. Microbio*. **2018** May 14;8:128:

“Mitochondrial Fragmentation in *Aspergillus fumigatus* as Early Marker for Granulocyte Killing Activity”

Tagungsbeiträge

Vorträge

53. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft
„New insights into the cellular function of the peroxiredoxin Asp3 in *Aspergillus fumigatus*”

Victor Brantl, Dominik Ruf, Karl Dichtl, Hubertus Haas, Falk Hillmann, Johannes Wagener

05-07.09.2019

Poster

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
e.V.

„New methods to measure killing of *Aspergillus hyphae* by neutrophil granulocytes”

Dominik Ruf, Victor Brantl, Karl Dichtl, Johannes Wagener

11-14.09.2016

11 Literatur

- (1) Bossche, H. V. D.; Cauwenbergh, G.; MacKenzie, D. W. R. *Aspergillus and Aspergillosis*; Springer US, 1988.
- (2) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* **2017**, 5 (4).
- (3) Targioni Tozzetti, G.; Targioni-Tozzetti, A. *Notizie Della Vita e Delle Opere Di Pier'Antonio Micheli : Botanico Fiorentino*; F. Le Monnier: Firenze :
- (4) Schmidt, A. [Gerog Fresenius and the species *Aspergillus fumigatus*]. *Mycoses* **1998**, 41 Suppl 2, 89–91.
- (5) O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. *Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus Nature. 2009 Jan 22;457(7228):471-4.*
- (6) Latgé, J.-P.; Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, 33 (1).
- (7) Balhara, M.; Ruhil, S.; Kumar, M.; Dhankhar, S.; Chhillar, A. K. Inhibition of Conidiophore Development in *Aspergillus fumigatus* by an *Escherichia coli* DH5 α Strain, a Promising Antifungal Candidate against Aspergillosis. *J. Mycol. Medicae* **2014**, 24 (1), 1–12.
- (8) Latgé, J.-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12 (2), 310–350.
- (9) Abad, A.; Fernández-Molina, J. V.; Bikandi, J.; Ramírez, A.; Margareto, J.; Sendino, J.; Hernando, F. L.; Pontón, J.; Garaizar, J.; Rementeria, A. What Makes *Aspergillus fumigatus* a Successful Pathogen? Genes and Molecules Involved in Invasive Aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* **2010**, 27 (4), 155–182.
- (10) *The Fungi - 2nd Edition*. <https://www.elsevier.com/books/the-fungi/carlile/978-0-12-738445-0>.
- (11) Rohde, M.; Schwienbacher, M.; Nikolaus, T.; Heesemann, J.; Ebel, F. Detection of Early Phase Specific Surface Appendages during Germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 206 (1), 99–105.
- (12) Leonhardt, Y.; Kakoschke, S. C.; Wagener, J.; Ebel, F. Lah Is a Transmembrane Protein and Requires Spa10 for Stable Positioning of Woronin Bodies at the Septal Pore of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 44179.
- (13) Eisenman, H. C.; Casadevall, A. Synthesis and Assembly of Fungal Melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93 (3), 931–940.

- (14) Geiser, D. M.; Klich, M. A.; Frisvad, J. C.; Peterson, S. W.; Varga, J.; Samson, R. A. The Current Status of Species Recognition and Identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2007**, *59*, 1–10.
- (15) Lai, C.-C.; Yu, W.-L. COVID-19 Associated with Pulmonary Aspergillosis: A Literature Review. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* **2021**, *54* (1), 46–53.
- (16) Denning, D. W. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26* (4), 781–803.
- (17) Dagenais, T. R. T.; Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (3), 447–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>.
- (18) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (165), 165rv13-165rv13.
- (19) Shah, A.; Panjabi, C. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2016**, *8* (4), 282–297.
- (20) Chotirmall, S. H.; Al-Alawi, M.; Mirkovic, B.; Lavelle, G.; Logan, P. M.; Greene, C. M.; McElvaney, N. G. *Aspergillus*-Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 723129.
- (21) Thompson, G. R.; Patterson, T. F. Pulmonary Aspergillosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *29* (2), 103–110.
- (22) Knutsen, A.; Slavin, R. G. Allergic Bronchopulmonary Mycosis Complicating Cystic Fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* **1992**, *7* (3), 179–192.
- (23) Dagenais, T. R. T.; Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (3), 447–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>.
- (24) Kozel, T. R.; Wickes, B. Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (4), a019299. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019299>.
- (25) de Kort, E. A.; Maertens, J.; Verweij, P. E.; Rijnders, B. J. A.; Blijlevens, N. M. A. Diagnostic-Driven Management of Invasive Fungal Disease in Hematology in the Era of Prophylaxis and Resistance Emergence: Dutch Courage? *Med. Mycol.* **2019**, *57* (Supplement_3), S267–S273.
- (26) Ellsworth, M.; Ostrosky-Zeichner, L. Isavuconazole: Mechanism of Action, Clinical Efficacy, and Resistance. *J. Fungi Basel Switz.* **2020**, *6* (4), E324.

- (27) Maertens, J. A. History of the Development of Azole Derivatives. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 1–10.
- (28) Paris, S.; Boisvieux-Ulrich, E.; Crestani, B.; Houcine, O.; Taramelli, D.; Lombardi, L.; Latgé, J. P. Internalization of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Epithelial and Endothelial Cells. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (4), 1510–1514.
- (29) Park, S. J.; Mehrad, B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (4), 535–551.
- (30) Gravelat, F. N.; Beauvais, A.; Liu, H.; Lee, M. J.; Snarr, B. D.; Chen, D.; Xu, W.; Kravtsov, I.; Hoareau, C. M. Q.; Vanier, G.; Urb, M.; Campoli, P.; Al Abdallah, Q.; Lehoux, M.; Chabot, J. C.; Ouimet, M.-C.; Baptista, S. D.; Fritz, J. H.; Nierman, W. C.; Latgé, J. P.; Mitchell, A. P.; Filler, S. G.; Fontaine, T.; Sheppard, D. C. *Aspergillus* Galactosaminogalactan Mediates Adherence to Host Constituents and Conceals Hyphal β -Glucan from the Immune System. *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (8).
- (31) WasylInka, J. A.; Moore, M. M. *Aspergillus fumigatus* Conidia Survive and Germinate in Acidic Organelles of A549 Epithelial Cells. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (Pt 8), 1579–1587.
- (32) Croft, C. A.; Culibrk, L.; Moore, M. M.; Tebbutt, S. J. Interactions of *Aspergillus fumigatus* Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 472.
- (33) Paris, S.; Debeauvais, J.-P.; Cramer, R.; Carey, M.; Charlès, F.; Prévost, M. C.; Schmitt, C.; Philippe, B.; Latgé, J. P. Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69* (3), 1581–1588.
- (34) Aimanianda, V.; Bayry, J.; Bozza, S.; Knemeyer, O.; Perruccio, K.; Elluru, S. R.; Clavaud, C.; Paris, S.; Brakhage, A. A.; Kaveri, S. V.; Romani, L.; Latgé, J.-P. Surface Hydrophobin Prevents Immune Recognition of Airborne Fungal Spores. *Nature* **2009**, *460* (7259), 1117–1121.
- (35) Bernard, M.; Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* Cell Wall: Composition and Biosynthesis. *Med. Mycol.* **2001**, *39 Suppl 1*, 9–17.
- (36) Latgé, J. P.; Mouyna, I.; Tekai, F.; Beauvais, A.; Debeauvais, J. P.; Nierman, W. Specific Molecular Features in the Organization and Biosynthesis of the Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **2005**, *43 Suppl 1*, S15-22.
- (37) Luther, K.; Torosantucci, A.; Brakhage, A. A.; Heesemann, J.; Ebel, F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Murine Macrophages

- Involves Recognition by the Dectin-1 Beta-Glucan Receptor and Toll-like Receptor 2. *Cell. Microbiol.* **2007**, 9 (2), 368–381.
- (38) Meier, A.; Kirschning, C. J.; Nikolaus, T.; Wagner, H.; Heesemann, J.; Ebel, F. Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 Are Essential for *Aspergillus*-Induced Activation of Murine Macrophages. *Cell. Microbiol.* **2003**, 5 (8), 561–570.
- (39) Latgé, J. P. The Pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **2001**, 9 (8), 382–389.
- (40) Segal, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, 23, 197–223.
- (41) Circu, M. L.; Aw, T. Y. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, and Apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48 (6), 749–762.
- (42) Sahoo, S.; Meijles, D. N.; Pagano, P. J. NADPH Oxidases: Key Modulators in Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases? *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **2016**, 130 (5), 317–335.
- (43) Philippe, B.; Ibrahim-Granet, O.; Prévost, M. C.; Gougerot-Pocidallo, M. A.; Sanchez Perez, M.; Van der Meer, A.; Latgé, J. P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. *Infect. Immun.* **2003**, 71 (6), 3034–3042.
- (44) McCormick, A.; Loeffler, J.; Ebel, F. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an Opportunistic Human Pathogen. *Cell. Microbiol.* **2010**, 12 (11), 1535–1543.
- (45) Heinekamp, T.; Schmidt, H.; Lapp, K.; Pätz, V.; Shopova, I.; Köster-Eiserfunke, N.; Krüger, T.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A. A. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the Immune Response. *Semin. Immunopathol.* **2015**, 37 (2), 141–152.
- (46) Schaffner, A.; Douglas, H.; Braude, A. I.; Davis, C. E. Killing of *Aspergillus* Spores Depends on the Anatomical Source of the Macrophage. *Infect. Immun.* **1983**, 42 (3), 1109–1115.
- (47) Gazendam, R. P.; van Hamme, J. L.; Tool, A. T. J.; Hoogenboezem, M.; van den Berg, J. M.; Prins, J. M.; Vitkov, L.; van de Veerdonk, F. L.; van den Berg, T. K.; Roos, D.; Kuijpers, T. W. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2016**, 196 (3), 1272–1283.
- (48) Levitz, S. M.; Farrell, T. P. Human Neutrophil Degranulation Stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *J. Leukoc. Biol.* **1990**, 47 (2), 170–175.

- (49) Mircescu, M. M.; Lipuma, L.; van Rooijen, N.; Pamer, E. G.; Hohl, T. M. Essential Role for Neutrophils but Not Alveolar Macrophages at Early Time Points Following *Aspergillus fumigatus* Infection. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200* (4), 647–656.
- (50) Diamond, R. D.; Krzesicki, R.; Epstein, B.; Jao, W. Damage to Hyphal Forms of Fungi by Human Leukocytes in Vitro. A Possible Host Defense Mechanism in Aspergillosis and Mucormycosis. *Am. J. Pathol.* **1978**, *91* (2), 313–328.
- (51) Enjalbert, B.; MacCallum, D. M.; Odds, F. C.; Brown, A. J. P. Niche-Specific Activation of the Oxidative Stress Response by the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **2007**, *75* (5), 2143–2151.
- (52) Urban, C. F.; Ermert, D.; Schmid, M.; Abu-Abed, U.; Goosmann, C.; Nacken, W.; Brinkmann, V.; Jungblut, P. R.; Zychlinsky, A. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **2009**, *5* (10).
- (53) Zarembek, K. A.; Sugui, J. A.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J.; Gallin, J. I. Human Polymorphonuclear Leukocytes Inhibit *Aspergillus fumigatus* Conidial Growth by Lactoferrin-Mediated Iron Depletion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *178* (10), 6367–6373.
- (54) Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12* (2), 310–350.
- (55) Segal, B. H.; Romani, L. R. Invasive Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease. *Med. Mycol.* **2009**, *47 Suppl 1*, S282-290.
- (56) Dinauer, M. C.; Orkin, S. H.; Brown, R.; Jesaitis, A. J.; Parkos, C. A. The Glycoprotein Encoded by the X-Linked Chronic Granulomatous Disease Locus Is a Component of the Neutrophil Cytochrome b Complex. *Nature* **1987**, *327* (6124), 717–720.
- (57) Volpp, B. D.; Nauseef, W. M.; Clark, R. A. Two Cytosolic Neutrophil Oxidase Components Absent in Autosomal Chronic Granulomatous Disease. *Science* **1988**, *242* (4883), 1295–1297.
- (58) Nunoi, H.; Rotrosen, D.; Gallin, J. I.; Malech, H. L. Two Forms of Autosomal Chronic Granulomatous Disease Lack Distinct Neutrophil Cytosol Factors. *Science* **1988**, *242* (4883), 1298–1301.

- (59) Diamond, R. D.; Clark, R. A. Damage to *Aspergillus fumigatus* and Rhizopus Oryzae Hyphae by Oxidative and Nonoxidative Microbicidal Products of Human Neutrophils in Vitro. *Infect. Immun.* **1982**, *38* (2), 487–495.
- (60) Paik, Y.-H.; Brenner, D. A. NADPH Oxidase Mediated Oxidative Stress in Hepatic Fibrogenesis. *Korean J. Hepatol.* **2011**, *17* (4), 251–257.
- (61) Lessing, F.; Kniemeyer, O.; Wozniok, I.; Loeffler, J.; Kurzai, O.; Haertl, A.; Brakhage, A. A. The *Aspergillus fumigatus* Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6* (12), 2290–2302.
- (62) Imlay, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 755–776.
- (63) Korshunov, S.; Imlay, J. A. Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (17), 6326–6334.
- (64) Korshunov, S.; Imlay, J. A. Two Sources of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75* (6), 1389–1401.
- (65) Lambou, K.; Lamarre, C.; Beau, R.; Dufour, N.; Latge, J.-P. Functional Analysis of the Superoxide Dismutase Family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75* (4), 910–923.
- (66) Lambou, K.; Lamarre, C.; Beau, R.; Dufour, N.; Latge, J.-P. Functional Analysis of the Superoxide Dismutase Family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75* (4), 910–923.
- (67) Calera, J. A.; Paris, S.; Monod, M.; Hamilton, A. J.; Debeaupuis, J. P.; Diaquin, M.; López-Medrano, R.; Leal, F.; Latgé, J. P. Cloning and Disruption of the Antigenic Catalase Gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (11), 4718–4724.
- (68) Paris, S.; Wysong, D.; Debeaupuis, J.-P.; Shibuya, K.; Philippe, B.; Diamond, R. D.; Latgé, J.-P. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (6), 3551–3562.
- (69) Kuge, S.; Jones, N. YAP1 Dependent Activation of TRX2 Is Essential for the Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Oxidative Stress by Hydroperoxides. *EMBO J.* **1994**, *13* (3), 655–664.

- (70) Qiao, J.; Kontoyiannis, D. P.; Calderone, R.; Li, D.; Ma, Y.; Wan, Z.; Li, R.; Liu, W. Afp1, Encoding a BZip Transcriptional Factor of *Aspergillus fumigatus*, Contributes to Oxidative Stress Response but Is Not Essential to the Virulence of This Pathogen in Mice Immunosuppressed by Cyclophosphamide and Triamcinolone. *Med. Mycol.* **2008**, *46* (8), 773–782.
- (71) Henriët, S. S. V.; Hermans, P. W. M.; Verweij, P. E.; Simonetti, E.; Holland, S. M.; Sugui, J. A.; Kwon-Chung, K. J.; Warris, A. Human Leukocytes Kill *Aspergillus nidulans* by Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (2), 767–773.
- (72) Hemmann, S.; Ismail, C.; Blaser, K.; Menz, G.; Cramer, R. Skin-Test Reactivity and Isotype-Specific Immune Responses to Recombinant Asp3, a Major Allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **1998**, *28* (7), 860–867.
- (73) Asif, A. R.; Oellerich, M.; Armstrong, V. W.; Riemenschneider, B.; Monod, M.; Reichard, U. Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (4), 954–962.
- (74) Ito, J. I.; Lyons, J. M.; Hong, T. B.; Tamae, D.; Liu, Y.-K.; Wilczynski, S. P.; Kalkum, M. Vaccinations with Recombinant Variants of *Aspergillus fumigatus* Allergen Asp3 Protect Mice against Invasive Aspergillosis. *Infect. Immun.* **2006**, *74* (9), 5075–5084.
- (75) Albrecht, D.; Guthke, R.; Brakhage, A. A.; Kniemeyer, O. Integrative Analysis of the Heat Shock Response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 32.
- (76) Kniemeyer, O.; Lessing, F.; Brakhage, A. A. Proteome Analysis for Pathogenicity and New Diagnostic Markers for *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **2009**, *47 Suppl 1*, S248-254.
- (77) Hillmann, F.; Bagramyan, K.; Straßburger, M.; Heinekamp, T.; Hong, T. B.; Bzymek, K. P.; Williams, J. C.; Brakhage, A. A.; Kalkum, M. The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33396.
- (78) Chae, H. Z.; Chung, S. J.; Rhee, S. G. Thioredoxin-Dependent Peroxide Reductase from Yeast. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (44), 27670–27678.

- (79) Rhee, S. G.; Kang, S. W.; Chang, T. S.; Jeong, W.; Kim, K. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life* **2001**, *52* (1–2), 35–41.
- (80) Wood, Z. A.; Schröder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Structure, Mechanism and Regulation of Peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28* (1), 32–40.
- (81) Declercq, J.; Evrard, C.; Clippe, A.; Stricht, D.; Bernard, A.; Knoops, B. Crystal Structure of Human Peroxiredoxin 5, a Novel Type of Mammalian Peroxiredoxin at 1.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 751–759.
- (82) Sorensen, M.; Sorensen, S. P. L. The proteins in whey. *C. r. Trav. Lab. Carlsberg Ser Chim* **1940**, *23* (7), 55–99.
- (83) Johanson, B. Isolation of an Iron-Containing Red Protein from Human Milk. *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14* (2), 510–512.
- (84) Groves, M. L. The Isolation of a Red Protein from Milk². *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (13), 3345–3350.
- (85) Blanc, B.; Isliker, H. [Isolation and characterization of the red siderophilic protein from maternal milk: lactotransferrin]. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **1961**, *43*, 929–943.
- (86) Montreuil, J.; Tonnelat, J.; Mullet, S. Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 413–421.
- (87) Masson, P.; Heremans, J.; Schonke, E. Lactoferrin, an Iron- Binding Protein in Neutrophilic Leukocytes. *J. Exp. Med.* **1969**, *130*, 643–658.
- (88) Gernez-Rieux, C.; Biserte, G.; Havez, R.; Voisin, C.; Cuvelier, R. Biochemical study of bronchial sputum, *Pathol. Biol.* **1963**, *11*, 729–741.
- (89) Åbrink, M.; Larsson, E.; Gobl, A.; Hellman, L. Expression of Lactoferrin in the Kidney: Implications for Innate Immunity and Iron Metabolism. *Kidney Int.* **2000**, *57* (5), 2004–2010.
- (90) Spik, G.; Strecker, G.; Fournet, B.; Bouquelet, S.; Montreuil, J.; Dorland, L.; van Halbeek, H.; Vliegenthart, J. F. Primary Structure of the Glycans from Human Lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *121* (2), 413–419.
- (91) Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Dodson, E. J.; Norris, G. E.; Rumball, S. V.; Waters, J. M.; Baker, E. N. Structure of Human Lactoferrin at 3.2-Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (7), 1769–1773.

- (92) Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Norris, G. E.; Rice, D. W.; Baker, E. N. Structure of Human Lactoferrin: Crystallographic Structure Analysis and Refinement at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1989**, *209* (4), 711–734.
- (93) Baker, E. N.; Baker, H. M. Molecular Structure, Binding Properties and Dynamics of Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2005**, *62* (22), 2531–2539.
- (94) Baker, E. N.; Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Haridas, M.; Jameson, G. B.; Norris, G. E.; Rumball, S. V.; Smith, C. A. Structure, Function and Flexibility of Human Lactoferrin. *Int. J. Biol. Macromol.* **1991**, *13* (3), 122–129.
- (95) Vega-Bautista, A.; de la Garza, M.; Carrero, J. C.; Campos-Rodríguez, R.; Godínez-Victoria, M.; Drago-Serrano, M. E. The Impact of Lactoferrin on the Growth of Intestinal Inhabitant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19).
- (96) Baker, E. N. Structure and Reactivity of Transferrins. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Sykes, A. G., Ed.; Academic Press, 1994; Vol. 41, pp 389–463.
- (97) Baker, E. N.; Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Day, C. L.; Haridas, M.; Norris, G. E.; Rumball, S. V.; Smith, C. A.; Thomas, D. H. Three-Dimensional Structure of Lactoferrin in Various Functional States. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**, *357*, 1–12.
- (98) Peterson, N. A.; Anderson, B. F.; Jameson, G. B.; Tweedie, J. W.; Baker, E. N. Crystal Structure and Iron-Binding Properties of the R210K Mutant of the N-Lobe of Human Lactoferrin: Implications for Iron Release from Transferrins. *Biochemistry* **2000**, *39* (22), 6625–6633.
- (99) Norris, G. E.; Anderson, B. F.; Baker, E. N.; Baker, H. M.; Gärtner, A. L.; Ward, J.; Rumball, S. V. Preliminary Crystallographic Studies on Bovine Lactoferrin. *J. Mol. Biol.* **1986**, *191* (1), 143–145.
- (100) Aisen, P.; Leibman, A. Lactoferrin and Transferrin: A Comparative Study. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *257* (2), 314–323.
- (101) Mazurier, J.; Spik, G. Comparative Study of the Iron-Binding Properties of Human Transferrins. I. Complete and Sequential Iron Saturation and Desaturation of the Lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *629* (2), 399–408.
- (102) Zarembek, K. A.; Cruz, A. R.; Huang, C.-Y.; Gallin, J. I. Antifungal Activities of Natural and Synthetic Iron Chelators Alone and in Combination with Azole and Polyene Antibiotics against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (6), 2654–2656.

- (103) Haas, H. Iron - A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 28.
- (104) Ellett, F.; Jorgensen, J.; Frydman, G. H.; Jones, C. N.; Irimia, D. Neutrophil Interactions Stimulate Evasive Hyphal Branching by *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **2017**, *13* (1), e1006154.
- (105) Gehrke, A.; Heinekamp, T.; Jacobsen, I. D.; Brakhage, A. A. Heptahelical Receptors GprC and GprD of *Aspergillus fumigatus* Are Essential Regulators of Colony Growth, Hyphal Morphogenesis, and Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (12), 3989–3998.
- (106) Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, *1121* (1), 130–136.
- (107) van der Kraan, M. I. A.; Groenink, J.; Nazmi, K.; Veerman, E. C. I.; Bolscher, J. G. M.; Nieuw Amerongen, A. V. Lactoferrampin: A Novel Antimicrobial Peptide in the N1-Domain of Bovine Lactoferrin. *Peptides* **2004**, *25* (2), 177–183.
- (108) van, der K. M. I. A.; Nazmi, K.; Teeken, A.; Groenink, J.; van, 't Hof Wim; Veerman, E. C. I.; Bolscher, J. G. M.; Nieuw, A. A. V. Lactoferrampin, an Antimicrobial Peptide of Bovine Lactoferrin, Exerts Its Candidacidal Activity by a Cluster of Positively Charged Residues at the C-Terminus in Combination with a Helix-Facilitating N-Terminal Part. *Biol. Chem.* **2005**, *386* (2), 137–142.
- (109) Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1121* (1–2), 130–136.
- (110) Arnold, R. R.; Cole, M. F.; McGhee, J. R. A Bactericidal Effect for Human Lactoferrin. *Science* **1977**, *197* (4300), 263–265.
- (111) Yamauchi, K.; Tomita, M.; Giehl, T. J.; Ellison, R. T. Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-Derived Lactoferrin Peptide Fragment. *Infect. Immun.* **1993**, *61* (2), 719–728.
- (112) Fernandes, K. E.; Carter, D. A. The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms of Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*.
- (113) Schrettl, M.; Bignell, E.; Kragl, C.; Joechl, C.; Rogers, T.; Arst, H. N.; Haynes, K.; Haas, H. Siderophore Biosynthesis but Not Reductive Iron Assimilation Is

- Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *J. Exp. Med.* **2004**, *200* (9), 1213–1219.
- (114) Haas, H. Molecular Genetics of Fungal Siderophore Biosynthesis and Uptake: The Role of Siderophores in Iron Uptake and Storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62* (4), 316–330.
- (115) Kosman, D. J. Redox Cycling in Iron Uptake, Efflux, and Trafficking. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (35), 26729–26735.
- (116) Kaplan, C. D.; Kaplan, J. Iron Acquisition and Transcriptional Regulation. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (10), 4536–4552.
- (117) Schrettl, M.; Haas, H. Iron Homeostasis—Achilles' Heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14* (4), 400–405.
- (118) Schrettl, M.; Bignell, E.; Kragl, C.; Sabiha, Y.; Loss, O.; Eisendle, M.; Wallner, A.; Jr, H. N. A.; Haynes, K.; Haas, H. Distinct Roles for Intra- and Extracellular Siderophores during *Aspergillus fumigatus* Infection. *PLoS Pathog.* **2007**, *3* (9), e128.
- (119) Wallner, A.; Blatzer, M.; Schrettl, M.; Sarg, B.; Lindner, H.; Haas, H. Ferricrocin, a Siderophore Involved in Intra- and Transcellular Iron Distribution in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (12), 4194–4196.
- (120) Schrettl, M.; Kim, H. S.; Eisendle, M.; Kragl, C.; Nierman, W. C.; Heinekamp, T.; Werner, E. R.; Jacobsen, I.; Illmer, P.; Yi, H.; Brakhage, A. A.; Haas, H. SreA-Mediated Iron Regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **2008**, *70* (1), 27–43.
- (121) Schrettl, M.; Beckmann, N.; Varga, J.; Heinekamp, T.; Jacobsen, I. D.; Jöchl, C.; Moussa, T. A.; Wang, S.; Gsaller, F.; Blatzer, M.; Werner, E. R.; Niermann, W. C.; Brakhage, A. A.; Haas, H. HapX-Mediated Adaption to Iron Starvation Is Crucial for Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **2010**, *6* (9).
- (122) Clark, H. L.; Jhingran, A.; Sun, Y.; Vareechon, C.; de Jesus Carrion, S.; Skaar, E. P.; Chazin, W. J.; Calera, J. A.; Hohl, T. M.; Pearlman, E. Zinc and Manganese Chelation by Neutrophil S100A8/A9 (Calprotectin) Limits Extracellular *Aspergillus fumigatus* Hyphal Growth and Corneal Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2016**, *196* (1), 336–344.
- (123) Gazendam, R. P.; van de Geer, A.; van Hamme, J. L.; Tool, A. T. J.; van Rees, D. J.; Aarts, C. E. M.; van den Biggelaar, M.; van Alphen, F.; Verkuijlen, P.; Meijer, A. B.; Janssen, H.; Roos, D.; van den Berg, T. K.; Kuijpers, T. W.

- Impaired Killing of *Candida albicans* by Granulocytes Mobilized for Transfusion Purposes: A Role for Granule Components. *Haematologica* **2016**, *101* (5), 587–596.
- (124) Gazendam, R. P.; van de Geer, A.; Roos, D.; van den Berg, T. K.; Kuijpers, T. W. How Neutrophils Kill Fungi. *Immunol. Rev.* **2016**, *273* (1), 299–311.
- (125) Ruf, D.; Brantl, V.; Wagener, J. Mitochondrial Fragmentation in *Aspergillus fumigatus* as Early Marker of Granulocyte Killing Activity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 128.
- (126) Bruns, S.; Kniemeyer, O.; Hasenberg, M.; Amanianda, V.; Nietzsche, S.; Thywissen, A.; Jeron, A.; Latgé, J.-P.; Brakhage, A. A.; Gunzer, M. Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* in Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* **2010**, *6* (4).
- (127) McCormick, A.; Heesemann, L.; Wagener, J.; Marcos, V.; Hartl, D.; Loeffler, J.; Heesemann, J.; Ebel, F. NETs Formed by Human Neutrophils Inhibit Growth of the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* **2010**, *12* (12–13), 928–936.
- (128) Jhingran, A.; Mar, K. B.; Kumasaka, D. K.; Knoblaugh, S. E.; Ngo, L. Y.; Segal, B. H.; Iwakura, Y.; Lowell, C. A.; Hamerman, J. A.; Lin, X.; Hohl, T. M. Tracing Conidial Fate and Measuring Host Cell Antifungal Activity Using a Reporter of Microbial Viability in the Lung. *Cell Rep.* **2012**, *2* (6), 1762–1773.
- (129) Jhingran, A.; Kasahara, S.; Hohl, T. M. Flow Cytometry of Lung and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cells from Mice Challenged with Fluorescent *Aspergillus* Reporter (FLARE) Conidia. *Bio-Protoc.* **2016**, *6* (18).
- (130) Espinosa, V.; Jhingran, A.; Dutta, O.; Kasahara, S.; Donnelly, R.; Du, P.; Rosenfeld, J.; Leiner, I.; Chen, C.-C.; Ron, Y.; Hohl, T. M.; Rivera, A. Inflammatory Monocytes Orchestrate Innate Antifungal Immunity in the Lung. *PLoS Pathog.* **2014**, *10* (2), e1003940.
- (131) Brunel, S. F.; Bain, J. M.; King, J.; Heung, L. J.; Kasahara, S.; Hohl, T. M.; Warris, A. Live Imaging of Antifungal Activity by Human Primary Neutrophils and Monocytes in Response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Vis. Exp. JoVE* **2017**, No. 122.




- (132) Heung, L. J.; Jhingran, A.; Hohl, T. M. Deploying FLAREs to Visualize Functional Outcomes of Host-Pathogen Encounters. *PLoS Pathog.* **2015**, *11* (7), e1004912.
- (133) Krappmann, S.; Sasse, C.; Braus, G. H. Gene Targeting in *Aspergillus fumigatus* by Homologous Recombination Is Facilitated in a Nonhomologous End- Joining-Deficient Genetic Background. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5* (1), 212–215.
- (134) Brantl, V.; Boysen, J. M.; Yap, A.; Golubtsov, E.; Ruf, D.; Heinekamp, T.; Straßburger, M.; Dichtl, K.; Haas, H.; Hillmann, F.; Wagener, J. Peroxiredoxin AspF3 Is Essential for *Aspergillus fumigatus* To Overcome Iron Limitation during Infection. *mBio* **2021**, *12* (4), e0097621.
- (135) Hill, T.; Käfer, E. Improved Protocols for *Aspergillus* Minimal Medium: Trace Element and Minimal Medium Salt Stock Solutions. *Fungal Genet Newsl* **2001**, *48*, 20–21.
- (136) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia-Forming Moulds. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *14* (10), 982–984.
- (137) Monteiro, M. C.; de la Cruz, M.; Cantizani, J.; Moreno, C.; Tormo, J. R.; Mellado, E.; De Lucas, J. R.; Asensio, F.; Valiante, V.; Brakhage, A. A.; Latgé, J.-P.; Genilloud, O.; Vicente, F. A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17* (4), 542–549.
- (138) Cohen, S. N.; Chang, A. C. Y.; Hsu, L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69* (8), 2110–2114.
- (139) Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene* **1990**, *96* (1), 23–28.
- (140) Hanahan, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166* (4), 557–580.
- (141) 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79 (5), 1751–1754.
- (142) 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.
- (143) Miranda, R. U.; Gómez-Quiroz, L. E.; Mendoza, M.; Pérez-Sánchez, A.; Fierro, F.; Barrios-González, J. Reactive Oxygen Species Regulate Lovastatin Biosynthesis in *Aspergillus terreus* during Submerged and Solid-State Fermentations. *Fungal Biol.* **2014**, 118 (12), 979–989.
- (144) Petzer, V.; Wermke, M.; Tymoszuk, P.; Wolf, D.; Seifert, M.; Ovaçin, R.; Berger, S.; Orth-Höller, D.; Loacker, L.; Weiss, G.; Haas, H.; Platzbecker, U.; Theurl, I. Enhanced Labile Plasma Iron in Hematopoietic Stem Cell Transplanted Patients Promotes *Aspergillus* Outgrowth. *Blood Adv.* **2019**, 3 (11), 1695–1700.
- (145) Hissen, A. H. T.; Chow, J. M. T.; Pinto, L. J.; Moore, M. M. Survival of *Aspergillus fumigatus* in Serum Involves Removal of Iron from Transferrin: The Role of Siderophores. *Infect. Immun.* **2004**, 72 (3), 1402–1408.
- (146) Brakhage, A. A.; Bruns, S.; Thywissen, A.; Zipfel, P. F.; Behnsen, J. Interaction of Phagocytes with Filamentous Fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, 13 (4), 409–415.
- (147) Aratani, Y.; Kura, F.; Watanabe, H.; Akagawa, H.; Takano, Y.; Suzuki, K.; Dinauer, M. C.; Maeda, N.; Koyama, H. Relative Contributions of Myeloperoxidase and NADPH-Oxidase to the Early Host Defense against Pulmonary Infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **2002**, 40 (6), 557–563.
- (148) Ito, J. I.; Lyons, J. M.; Hong, T. B.; Tamae, D.; Liu, Y.-K.; Wilczynski, S. P.; Kalkum, M. Vaccinations with Recombinant Variants of *Aspergillus fumigatus* Allergen AspF3 Protect Mice against Invasive Aspergillosis. *Infect. Immun.* **2006**, 74 (9), 5075–5084.
- (149) Gazendam, R. P.; Hamme, J. L. van; Tool, A. T. J.; Hoogenboezem, M.; Berg, J. M. van den; Prins, J. M.; Vitkov, L.; Veerdonk, F. L. van de; Berg, T. K. van den; Roos, D.; Kuijpers, T. W. Human Neutrophils Use Different Mechanisms

- To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J. Immunol.* **2016**, 196 (3), 1272–1283.
- (150) Faurschou, M.; Borregaard, N. Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation. *Microbes Infect.* **2003**, 5 (14), 1317–1327.
- (151) Yipp, B. G.; Kubes, P. NETosis: How Vital Is It? *Blood* **2013**, 122 (16), 2784–2794.
- (152) de Bont, C. M.; Koopman, W. J. H.; Boelens, W. C.; Pruijn, G. J. M. Stimulus-Dependent Chromatin Dynamics, Citrullination, Calcium Signalling and ROS Production during NET Formation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2018**, 1865 (11 Pt A), 1621–1629.
- (153) Metzler, K. D.; Goosmann, C.; Lubojemska, A.; Zychlinsky, A.; Papayannopoulos, V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **2014**, 8 (3), 883–896.
- (154) Xia, Y.; Yu, H.; Zhou, Z.; Takaya, N.; Zhou, S.; Wang, P. Peroxiredoxin System of *Aspergillus nidulans* Resists Inactivation by High Concentration of Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidative Stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 28 (1), 145–156.
- (155) Lee, J.; Spector, D.; Godon, C.; Labarre, J.; Toledano, M. B. A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (8), 4537–4544.
- (156) Truong, T.; Zeng, G.; Qingsong, L.; Kwang, L. T.; Tong, C.; Chan, F. Y.; Wang, Y.; Seneviratne, C. J. Comparative Ploidy Proteomics of *Candida albicans* Biofilms Unraveled the Role of the AHP1 Gene in the Biofilm Persistence Against Amphotericin B. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2016**, 15 (11), 3488–3500.
- (157) Rocha, M. C.; de Godoy, K. F.; Bannitz-Fernandes, R.; Fabri, J. H. T. M.; Barbosa, M. M. F.; de Castro, P. A.; Almeida, F.; Goldman, G. H.; da Cunha, A. F.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A.; Malavazi, I. Analyses of the Three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* Reveal That Cytosolic Prx1 Is Central to H₂O₂ Metabolism and Virulence. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 12314.
- (158) Leal, S. M.; Roy, S.; Vareechon, C.; Carrion, S. deJesus; Clark, H.; Lopez-Berges, M. S.; Di Pietro, A.; diPietro, A.; Schrettl, M.; Beckmann, N.; Redl, B.; Haas, H.; Pearlman, E. Targeting Iron Acquisition Blocks Infection with the

- Fungal Pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (7), e1003436.
- (159) Oberegger, H.; Schoeser, M.; Zadra, I.; Abt, B.; Haas, H. SREA Is Involved in Regulation of Siderophore Biosynthesis, Utilization and Uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **2001**, *41* (5), 1077–1089.
- (160) Lepanto, M. S.; Rosa, L.; Paesano, R.; Valenti, P.; Cutone, A. Lactoferrin in Aseptic and Septic Inflammation. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1323.
- (161) Cruz-Garcia, D.; Brouwers, N.; Malhotra, V.; Curwin, A. J. Reactive Oxygen Species Triggers Unconventional Secretion of Antioxidants and Acb1. *J. Cell Biol.* **2020**, *219* (4), e201905028.
- (162) Kurucz, V.; Krüger, T.; Antal, K.; Dietl, A.-M.; Haas, H.; Pócsi, I.; Kniemeyer, O.; Emri, T. Additional Oxidative Stress Reroutes the Global Response of *Aspergillus fumigatus* to Iron Depletion. *BMC Genomics* **2018**, *19*.
- (163) Semighini, C. P.; Harris, S. D. Regulation of Apical Dominance in *Aspergillus nidulans* Hyphae by Reactive Oxygen Species. *Genetics* **2008**, *179* (4), 1919–1932.
- (164) Malagnac, F.; Lalucque, H.; Lepère, G.; Silar, P. Two NADPH Oxidase Isoforms Are Required for Sexual Reproduction and Ascospore Germination in the Filamentous Fungus *Podospira Anserina*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2004**, *41* (11), 982–997.
- (165) Li, H.; Barker, B. M.; Grahl, N.; Puttikamonkul, S.; Bell, J. D.; Craven, K. D.; Cramer, R. A. The Small GTPase RacA Mediates Intracellular Reactive Oxygen Species Production, Polarized Growth, and Virulence in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10* (2), 174–186. <https://doi.org/10.1128/EC.00288-10>.
- (166) Takemoto, D.; Tanaka, A.; Scott, B. A P67Phox-like Regulator Is Recruited to Control Hyphal Branching in a Fungal-Grass Mutualistic Symbiosis. *Plant Cell* **2006**, *18* (10), 2807–2821.
- (167) Takemoto, D.; Tanaka, A.; Scott, B. NADPH Oxidases in Fungi: Diverse Roles of Reactive Oxygen Species in Fungal Cellular Differentiation. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2007**, *44* (11), 1065–1076.
- (168) Chi, M.-H.; Craven, K. D. RacA-Mediated ROS Signaling Is Required for Polarized Cell Differentiation in Conidiogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **2016**, *11* (2), e0149548.

12 Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Victor Alber Brantl

Name, Vorname

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

Die Bedeutung des Thioredoxins Aspf3 für Wachstum und Virulenz des opportunistisch humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*

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

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

München, 14.11.2023

Victor Brantl

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

13 Danksagung

Ohne das Zutun von Kollegen und Freunden wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, wofür ich mich herzlich bedanken möchte:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Wagener, für die langjährige exzellente Betreuung, auch über Städte- und Landesgrenzen hinweg. Die fortwährenden kritischen Hinterfragungen, Anregungen und konstruktiven Kritiken der Ergebnisse haben mir viel Raum für die Entwicklung des Projekts gegeben und mein Wissen und Verständnis für wissenschaftliches Arbeiten gestärkt. Auch Dr. Karl Dichtl danke ich für die wissenschaftliche Begleitung, Expertise sowie Hilfe bei Problemen aber auch ehrliche Kritik an mancher Stelle. Die ist es nämlich die einen vorwärts bringt. Bei Dr. Julian Willibald und Dr. Toni Pfaffeneder, meinen ehemaligen Betreuern der Bachelor- und Masterarbeit möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls bedanken. Ohne die Grundlagen die Ihr mich gelehrt habt, (auch die Stärkung der Frustrationstoleranz) wäre alles deutlich steiniger gewesen und hätte niemals so viel Spaß gemacht.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Mitstreiter der Aspergillus-Labor-WG: Bernadette Geißel, Isabell Klugherz, Yannik Leonhard, Evgeny Golubtsov, Laura Sturm, Helena Schrattenecker, Miriam Penka, Veronika Loiko, Sara + Tamara Karkoschke und insbesondere Dominik Ruf danke ich für die unvergesslichen Momente in der langen Laborzeit. Die vielen Events, Weihnachtsfeiern, Käsefondues und Kinoabende aber auch die gegenseitige Unterstützung im Labor waren immer klasse. Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle auch Barbara Schmidinger, Benjamin Busch, Evelyn Weiss und Clara Lettl aus der AG Haas sowie Simone Herp und Diana Ring aus der AG Stecher. Vielen Dank für die großartige Zeit im Max-von-Pettenkofer-Institut! Eva Renner möchte ich an dieser Stelle auch für Ihre fortwährende Unterstützung und Korrekturen danken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die unendliche Unterstützung in all den Jahren. Im speziellen muss ich aber meiner Frau Ellen für Deine immense Geduld und Verständnis danken, auch „mal“ nachts noch in der Zellkultur vorbeizuschauen. Danke für Deine Unterstützung!