

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

Antimykotische Zielstrukturen in *Aspergillus fumigatus*: Wirkungsweise der Azole und Charakterisierung des ERMES

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

vorgelegt von

Bernadette Geißel
aus Calw

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Kai Hell

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2024

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ZUSAMMENFASSUNG	8
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	12
TABELLENVERZEICHNIS	14
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	15
1. EINLEITUNG	17
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	17
1.1.1 Taxonomie und Morphologie von <i>A. fumigatus</i>	17
1.1.2 Zellwandaufbau	18
1.1.3 Verbreitung	19
1.1.4 Epidemiologie	19
1.1.5 Pathogenität und klinische Relevanz	20
1.2 Therapie.....	22
1.2.1 Polyene.....	23
1.2.2 Echinocandine	23
1.2.3 Azole.....	24
1.2.3.1 Wirkungsweise von Azolen.....	24
1.2.3.2 Auswirkungen des Ergosterol Mangels	25
1.2.4 Resistenzmechanismen	26
1.2.4.1 Der Zellwandintegritäts-Signalweg	26
1.2.5 Entwicklung von Resistenzen am Beispiel der Azole.....	27
1.2.5.1 Abnahme der effektiven Azol-Konzentration in der Zelle	27
1.2.5.2 Veränderung der Zielstruktur Erg11/ Cyp51A	29
1.2.5.3 Metabolische Umleitung der Ergosterolbiosynthese	29
1.2.6 Mitochondrielle Dysfunktion als Auslöser von Resistenzen	31
1.2.6.1 Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren mit mitochondrieller Dysfunktion/ retrograde Kontrolle von PDR5	32
1.2.7 Entwicklung neuer Antimykotika.....	33
1.2.7.1 Die ER-mitochondria encounter structure	33
1.2.7.2 Der ERMES als Zielstruktur für Antimykotika	34
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	35
2.1 Charakterisierung der <i>ER-mitochondria-encounter structure</i> und Validierung als mögliche Zielstruktur für Antimykotika.....	35
2.2 Analyse der Wirkung von Azolen auf <i>A. fumigatus</i> und mögliche Resistenzmechanismen	35
3. MATERIAL UND METHODEN.....	36

3.1 Pilzstämm	36
3.2 Plasmide	37
3.3 Oligonukelotide	37
3.4 Chemikalien und Enzyme	38
3.5 Antibiotika und Antimykotika	39
3.6 Geräte	39
3.7 Medien und Wachstumsbedingungen (Zellanzucht)	40
3.7.1 <i>A. fumigatus</i>	40
3.7.1.1 Medien.....	40
3.7.1.2 Anzucht und Ernte von Sporen.....	42
3.7.1.3 Anzucht und Ernte von Pilzmyzel.....	42
3.7.1.4 Bestimmung der Sporenzahl.....	42
3.7.1.5 Erstellung einer Verdünnungsreihe.....	43
3.7.2 <i>Escherichia coli</i> (Abk. <i>E. coli</i>).....	43
3.7.2.1 Medien.....	43
3.7.2.2 Anzucht und Ernte.....	44
3.8 Molekularbiologische Methoden	44
3.8.1 Isolation genomischer DNA.....	44
3.8.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
3.8.3 Polymerasekettenreaktion.....	45
3.8.4 PCR-Aufreinigung.....	46
3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	47
3.8.7 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	47
3.8.8 Transformation in <i>E. coli</i>	48
3.8.9 Plasmid Isolation.....	48
3.8.9.1 Miniprep.....	48
3.8.9.2 Midiprep.....	48
3.9 Herstellung von genetisch veränderten Pilzstämmen	49
3.9.1 Klonierung der Δ <i>mdm10</i> und Δ <i>mdm12</i> Deletionsmutanten in <i>A. fumigatus</i>	49
3.9.2 Klonierung von konditionellen Mutanten in <i>A. fumigatus</i>	50
3.9.3 Transformation in <i>A. fumigatus</i>	52
3.10 Wachstumsversuche	54
3.10.1 Tüpfeltest.....	54
3.10.2 Untersuchung des radialen Wachstums und von Wachstumsphänotypen.....	54
3.11 Testung der minimale Hemmkonzentration gegenüber Antimykotika	55
3.11.1 Epsilometer -Test.....	55
3.11.2 MHK-Testung mittels 96-well Platte.....	55
3.12 Testung der Bedeutung von Septen bei der Behandlung von <i>A. fumigatus</i> mit Azolen	55
3.13 Luciferin-Assay zur Untersuchung der Aktivierung des Zellwandintegritätswegs	56
3.14 <i>Galleria mellonella</i> Infektionsversuch	56
3.15 Mikroskopie	57
3.15.1 Fixierung von Hyphen für die Mikroskopie.....	57
3.15.2 Calcofluorweiß-Färbung.....	57

3.15.3 Mikroskopie der ERMES Mutanten	57
3.15.3.1 Mikroskopische Analyse des Wachstums und der Hyphen Morphologie der ERMES Mutanten	57
3.15.3.2 Life-Cell-Imaging der Mitochondrien Morphologie der ERMES Mutanten	58
3.15.3.3 Mikroskopie der Nukleole der ERMES Mutanten	58
3.15.4 Mikroskopie der Azol-Versuche	58
3.15.4.1 Life-Cell-Imaging der Azol-Versuche	58
3.15.4.2 Analyse der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen über die Zeit	58
3.15.4.3 Untersuchung der Bildung von Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in Sporen	59
3.15.4.4 Lokalisation der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen	59
3.15.4.5 Untersuchung der Wirkung von Caspofungin auf das Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen	59
3.15.4.6 Vergleich der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen im Wildtyp und der <i>fks1_{tetOn}</i> Mutante	59
3.15.4.7 Untersuchung der Wirkung von Caspofungin auf die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen	60
3.15.4.8 Versuch zur Ursache der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen über die Zeit	60
3.15.4.9 Mikroskopie, um die Ursache der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen zu untersuchen	60
3.10 Bioinformatische Methoden	61
3.10.1 Datenbanksuche, Sequenzanalysen und DNA-Alignment	61
3.10.2 Primerdesign	61
3.10.3 Sequenzierung	61
4. ERGEBNISSE	62
4.1 Charakterisierung des ERMES in <i>Aspergillus fumigatus</i>	62
4.1.1 Identifizierung der potenziellen ERMES Homologe in <i>A. fumigatus</i>	62
4.1.2 Konstruktion und Charakterisierung der Deletionsmutanten $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $\Delta mdm34$ und $\Delta mmm1$	64
4.1.3 Die Deletionsmutanten $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ wachsen extrem schlecht	66
4.1.4 Konstruktion der konditionellen Mutanten der Gene <i>mdm10</i> , <i>mdm12</i> , <i>mdm34</i> und <i>mmm1</i>	66
4.1.5 Vergleich des Wachstums der Deletionsmutanten $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ mit dem der konditionellen Mutanten <i>mdm10_{tetOn}</i> und <i>mdm12_{tetOn}</i>	68
4.1.6 Vergleich des Wachstums der konditionellen Mutanten <i>mdm10_{tetOn}</i> , <i>mdm12_{tetOn}</i> , <i>mdm34_{tetOn}</i> und <i>mmm1_{tetOn}</i>	69
4.1.7 Das Auflösen des ERMES führte zu langsamen großen sowie kleinen sehr schnell beweglichen Mitochondrien	71
4.1.8 Die Nukleole der konditionellen ERMES Mutanten aggregieren in den großen, immotilen Mitochondrien während die kleinen, schnellen Mitochondrien keine mtDNA mehr tragen	73
4.1.9 <i>Mmm1</i> ist wichtig für die Virulenz im <i>Galleria mellonella</i> Infektionsmodell	74
4.2 Azol induzierter Zelltod von <i>A. fumigatus</i> auf zellulärer Ebene	76
4.2.1 Die Membranintegrität von <i>A. fumigatus</i> wird durch die Behandlung mit Voriconazol destabilisiert	76
4.2.2 Abhängigkeit der beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren oder Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand) von der Azol-Konzentration	77
4.2.3 Azole lösen eine verzögerte Aktivierung des Zellwandintegritätswegs aus	79
4.2.4 Septen verlängern die Überlebenszeit von Voriconazol-behandelten Hyphen	81
4.2.5 Die Behandlung mit Azolen führt zur Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten	82
4.2.5.1 Voriconazol-Exposition führt zu Chitin-Ablagerung in <i>A. fumigatus</i> Hyphen	83
4.2.5.2 Voriconazol-Exposition führt zu Glukan-Ablagerung in <i>A. fumigatus</i> Hyphen	84
4.2.6 Die Bildung der Zellwand-Ablagerung korreliert mit der Aktivierung der Zellwandstress-Antwort in <i>A. fumigatus</i>	84

4.2.7 Sporen bilden nach der Behandlung mit Voriconazol ebenfalls Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen	85
4.2.8 Lokalisation der Azole-abhängigen Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen außerhalb der Zellmembran von <i>A. fumigatus</i>	86
4.2.9 Die Azole-abhängige Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten kann mit weiteren zellmembranständigen Stress-Sensoren dargestellt werden.....	88
4.2.10 Die Inhibierung der Glukansynthese Fks1 verändert die Wirkung von Azolen auf <i>A. fumigates</i>	89
4.2.10.1 Die durch Azole ausgelösten Chitin-Ablagerungen zeigen ein verändertes Aussehen und Auftreten bei Inhibierung der β -1,3-Glukansynthese durch Caspofungin	89
4.2.10.2 Die Inhibierung der Glukansynthese verzögert den fungiziden Effekt der Azole auf <i>A. fumigatus</i>	90
4.2.11 Die fehlende Expression der Lanosterol-14 α -Demethylase zeigt den Phänotyp eines <i>A. fumigatus</i> wt unter Azol-Stress.....	91
4.2.11.1 Die beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren oder Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand) sind Folgen des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase	92
4.2.11.2 Die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen unter Azol-Stress sind Folge des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase.....	93
5. DISKUSSION	94
5.1. Charakterisierung des ERMES in <i>A. fumigatus</i> und Validierung als Zielstruktur für Medikamente	94
5.1.1 Stark verlangsamtes Wachstum und verringerte Sporulation der Deletions- und konditionellen Mutanten, sowie Nachweis von immobilen, sphärischen sowie kleinen, sich schnell bewegenden Mitochondrien der konditionellen Mutanten.....	94
5.1.2 Der ERMES ist notwendig für die Stabilisierung der Lokalisierung der mitochondrialen DNA	97
5.1.3 Mmm1 ist wichtig für die Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	98
5.2 Wirkung von Azolen auf <i>A. fumigatus</i>.....	100
5.2.1 Azole induzieren verzögerten Zellwandstress und destabilisieren die Membranintegrität in <i>A. fumigatus</i>	100
5.2.2 Die Inhibierung der Lanosterol-14 α -Demethylase führt zu einer exzessiven Synthese von Zellwandkohlenhydraten, die vermutlich zum Tod des Pilzes führen	103
5.2.3 Ist eine Kombinationstherapie von Azolen und Echinocandinen sinnvoll?	109
6. AUSBLICK	111
6.1. Die Charakterisierung des ERMES in <i>Aspergillus fumigatus</i> und dessen Potential als „drug target“	111
6.2. Die Wirkung von Azolen auf <i>A. fumigatus</i>	111
LITERATURVERZEICHNIS.....	113
ANHANG.....	122
Einzelergebnisse zum Versuch die Inhibierung der Glukansynthese verzögert den fungiziden Effekt der Azole auf <i>A. fumigatus</i> Kapitel 4.2.10	122
DANKSAGUNG	123

AFFIDAVIT.....	124
PUBLIKATIONEN.....	125

Zusammenfassung

Invasive Pilzinfektionen sind jedes Jahr mit mindestens 1,5 Millionen Toten assoziiert. 90% der Tode durch Pilzinfektionen werden ausgelöst durch Erreger der Gattungen *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* and *Rhizopus* [1].

In immunkompetenten Patienten kann die Gattung *Aspergillus* chronische, nicht-invasive Infektionen verursachen, die von einem Pilzball innerhalb der Lunge (Aspergillom) bis zu einem chronischen, entzündlichen und fibrotischen Prozess, der als chronische Aspergillose bezeichnet wird, reichen [2,3].

Invasive pulmonale Aspergillose (IPA) ist mit 43 % bis 59 %, die am stärksten verbreitete Infektionskrankheit unter Stammzellenempfängern und Patienten mit Organtransplantation [4–11]. Des Weiteren sterben ca. 15 bis 20 % der Leukämie-Patienten an einer durch *Aspergillus* ausgelösten Pneumonie [12–14]. Außerdem zeigte eine Studie von Cadena *et al.* 2021, dass ca. 16-25 % der Patienten, die eine kritische COVID-19 Infektion überlebt haben, an einer COVID-19 assoziierten pulmonalen Aspergillose (CAPA) sterben [15].

Azole sind die erste Wahl für die Behandlung und Prävention von Mykosen. Es ist bekannt, dass diese Gruppe von Antimykotika die Ergosterolbiosynthese, durch die Inaktivierung der Lanosterol-14 α -Demethylase, hemmt. Die zellulären Prozesse, die durch diesen Mangel verursacht werden, sowie der dadurch ausgelöste Zelltod, sind weitgehend unbeschrieben. Durch die Untersuchung dieser Vorgänge, soll die Wirkung der Azole besser verstanden werden. Dies könnte zusätzlich Rückschlüsse zulassen auf die Bildung von Resistenzmechanismen.

Die Beobachtungen dieser Arbeit deuten auf folgenden möglichen Ablauf des Zelltods von *A. fumigatus* nach der Behandlung mit Azolen hin: Eine wachsende Hyphe oder anschwellende Spore wird mit Azol behandelt. Nach Aufnahme des Azols wird die Lanosterol-14 α -Demethylase inhibiert. Der Ergosterolmangel führt innerhalb von ca. 1 bis 2 h zu einem Wachstumsarrest. Der durch Azole ausgelöste Zellwandstress aktiviert den Zellwandintegritätsweg. Durch den Zellwandintegritätsweg wird die Transkription von Genen ausgelöst, die an der Zellwandbiogenese beteiligt sind. Chitin- und Glukansynthasen, sowie deren Substrate, werden in großem Maße an bestimmte Stellen der Zellmembran transportiert. Dort kommt es zu einem exzessiven Aufbau von Zellwand bzw. Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten außerhalb der Plasmamembran. Die sich formenden und schnell wachsenden Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen drücken auf die Zellmembran. So erhöht sich immer mehr der Druck auf die Plasmamembran, dem sie irgendwann nicht mehr standhalten kann. Es kommt zum Verlust der Membranzintegrität und dem Tod des Pilzes bzw. des Kompartiments. Ergebnisse von I. Klugherz zeigten, dass Azol-resistente klinische *A. fumigatus* Isolate keine Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen aufweisen. Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse eine neue Möglichkeit liefern, um klinische Isolate in der Routinediagnostik mikroskopisch schneller auf Ihre Empfindlichkeit gegenüber Azolen zu testen.

Zusätzlich sollte in dieser Arbeit die Verbindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien (Englisch *ER-mitochondria encounter structure*, kurz ERMES) als neuer Angriffspunkt für Medikamente evaluiert werden. Diese Struktur wurde bisher nur in Pilzen beschrieben [16]. Durch diese Einzigartigkeit stellt er theoretisch einen guten Angriffspunkt für Medikamente dar. Die

Experimente dieser Arbeit zeigten, dass der ERMES als einzelnes Ziel für Antimykotika ungeeignet zu sein scheint. Alle untersuchten konditionellen Mutanten unter reprimierten Bedingungen, sowie Deletionsmutanten ($\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $mdm10_{teton}$, $mdm12_{teton}$, $mdm34_{teton}$ und $mmm1_{teton}$), ausgenommen $\Delta mdm34$ und $\Delta mmm1$, waren lebensfähig. Zusätzlich zeigte $mmm1_{teton}$ in einem *Galleria melonella* Infektionsmodell eine geringe Virulenz. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass *A. fumigatus* durch die Inhibition des ERMES nicht komplett abgetötet werden kann. Durch den Selektionsdruck innerhalb des menschlichen Körpers könnte der Pilz Zusatzmutationen erwerben und so in kurzer Zeit Resistenzen entwickeln.

Für eine Kombinationstherapie mit anderen Antimykotika könnte der ERMES als Zielstruktur allerdings durchaus interessant sein. Dieser Ansatz könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Abstract

Invasive fungal infections are associated with at least 1.5 million deaths each year. 90% of deaths from fungal infections are caused by pathogens of the genera *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* and *Rhizopus* [1].

In immunocompetent patients, *Aspergillus* spec. can cause chronic, non-invasive infections ranging from a fungal ball within the lung (aspergilloma) to a chronic inflammatory and fibrotic process called chronic aspergillosis [2,3].

With 43 % to 59 % invasive pulmonary aspergillosis (abbr. IPA) is the most prevalent infectious disease among stem cell recipients and organ transplant patients [4–11]. Furthermore, approximately 15 % to 20 % of leukaemia patients die from pneumonia caused by *Aspergillus* [12–14]. In addition, a study by Cadena *et al.* 2021 showed that approximately 16-25 % of patients who survived a critical COVID-19 infection died from COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (abbr. CAPA) [15].

Azoles are the first choice for treatment and prevention of mycoses. This group of antifungal agents is known to inhibit ergosterol biosynthesis by inactivating lanosterol-14 α -demethylase. The cellular processes caused by this deficiency, as well as the thereby induced mechanism of cell death, are largely undescribed. By studying these processes, we tried to improve our understanding of the effect of azoles. This could additionally allow conclusions on the formation of resistance mechanisms.

The observations of this work suggest the following possible sequence of cell death of *A. fumigatus* after treatment with azoles: A growing hypha or swelling spore is treated with azole. After uptake of the azole, lanosterol-14 α -demethylase is inhibited. The ergosterol deficiency leads to growth arrest within approximately 1 to 2 h. Cell wall stress induced by azoles activates the cell wall integrity pathway. The cell wall integrity pathway triggers the transcription of genes involved in cell wall biogenesis. Chitin and glucan synthases, as well as their substrates, are transported in large quantities to specific sites on the cell membrane. There, excessive cell wall assembly or deposition of cell wall carbohydrates outside the plasma membrane occurs. The forming and rapidly growing cell wall carbohydrate deposits press on the cell membrane. Thus, the pressure on the plasma membrane increases more and more, which it eventually can no longer withstand. This results in loss of membrane integrity and death of the fungus or compartment. Results by I. Klugherz showed that azole-resistant clinical *A. fumigatus* isolates do not exhibit cell wall carbohydrate patches. Taken together, these results could provide a new way to microscopically test clinical isolates for their sensitivity to azoles more rapidly in routine diagnostics.

In addition, this work aimed to evaluate the connection between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria named ER-mitochondria encounter structure (abbr. ERMES) as a new drug target. Until now this structure has only been described in fungi [16]. Due to this uniqueness, it theoretically represents a good drug target. The experiments of this work showed that ERMES seems to be unsuitable as a single target for antifungal drugs. All conditional mutants studied under repressed conditions, as well as deletion mutants ($\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $mdm10_{teton}$, $mdm12_{teton}$, $mdm34_{teton}$, and $mmm1_{teton}$), except $\Delta mdm34$ and $\Delta mmm1$ were viable. In addition, $mmm1_{teton}$ showed low virulence in a *Galleria melonella* infection model. From these results, it is concluded that *A. fumigatus* cannot be completely

killed by inhibition of ERMES. Thus, due to selection pressure within the human body, the fungus could acquire additional mutations and thus develop resistance in a short time. However, for a combination therapy with other antimycotics, the ERMES could be quite interesting as a target structure. This approach could be investigated in further experiments.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>A. fumigatus</i> wt Kolonien auf AMM Agar nach 36 h Wachstum bei 37 °C.....	17
Abbildung 2: Zellwandaufbau von <i>A. fumigatus</i>	18
Abbildung 3: Schematischer Überblick über die häufigsten Lungenerkrankungen, die durch <i>Aspergillus</i> ssp. ausgelöst werden.....	20
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der derzeit existierenden Antimykotika und ihrer Wirkungsweise.....	23
Abbildung 5: Zielstruktur und Wirkungsweise von Azolen.....	25
Abbildung 6: Der Zellwandintegritätsweg in <i>A. fumigatus</i>	27
Abbildung 7: Dokumentierte Azolresistenzmechanismen in <i>Candida</i> Spezies, <i>A. fumigatus</i> und <i>Cr. neoformans</i>	30
Abbildung 8: Fusions- und Fissions-Komplexe in Hefe.....	31
Abbildung 9: Retrograder Signalweg zur Aktivierung von PDR5 durch p^0 Mitochondrien.....	32
Abbildung 10: Ein Modell des ERMES basierend auf Daten aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>N. crassa</i>	33
Abbildung 11: Konstruktion einer Deletionskassette am Beispiel des Gens <i>mdm10</i>	49
Abbildung 12: Konstruktion einer konditionellen Kassette am Beispiel des Gens <i>mmm1</i>	51
Abbildung 13: AMM-Agarplatte zur Bestimmung der MHK für Voriconazol mittels Teststreifen.....	55
Abbildung 14: Drei-Ösen-Ausstrich des heterokaryonten Δ <i>mdm12</i> Klon Nr. 2 auf AMM-Platten mit $0,1\mu\text{g mL}^{-1}$ Pyrithiamin bzw. ohne Pyrithiamin.....	65
Abbildung 15: Konstruktion und PCR-Validierung der Δ <i>mdm10</i> und Δ <i>mdm12</i> Deletionsmutanten.....	65
Abbildung 16: Deletionsmutanten der Gene <i>mdm10</i> und <i>mdm12</i> sind lebensfähig, wachsen aber extrem langsam.....	66
Abbildung 17: Konstruktion der konditionellen <i>mmm1</i> _{tetOn} -Mutante und Überprüfung der richtigen Integration der konditionellen Promotoren für <i>mmm1</i> , <i>mdm10</i> , <i>mdm12</i> und <i>mdm34</i>	67
Abbildung 18: Deletionsmutanten der Gene <i>mdm10</i> und <i>mdm12</i> sind lebensfähig, aber zeigen schwere Wachstumsdefekte.....	69
Abbildung 19: Wachstumsphänotyp von je drei unabhängigen Klonen der vier konditionellen ERMES Mutanten <i>mdm10</i> _{tetOn} , <i>mdm12</i> _{tetOn} , <i>mdm34</i> _{tetOn} und <i>mmm1</i> _{tetOn} auf AMM- und SAB-Agarplatten.....	70
Abbildung 20: Wachstumsphänotypen der vier konditionellen ERMES Mutanten <i>mdm10</i> _{tetOn} , <i>mdm12</i> _{tetOn} , <i>mdm34</i> _{tetOn} und <i>mmm1</i> _{tetOn} in flüssigem AMM.....	71
Abbildung 21: Das Ausschalten der Expression von <i>mmm1</i> , <i>mdm10</i> , <i>mdm12</i> oder <i>mdm34</i> resultiert in großen, immotilen und kleinen, schnell beweglichen Mitochondrien.....	73
Abbildung 22: Unter reprimierten Bedingungen, zeigen die großen Mitochondrien der Mutanten <i>mmm1</i> _{tetOn} , <i>mdm10</i> _{tetOn} , <i>mdm12</i> _{tetOn} und <i>mdm34</i> _{tetOn} aggregierte Nukleole während die kleinen Mitochondrien keine mtDNA mehr aufweisen.....	74
Abbildung 23: <i>Mmm1</i> ist wichtig für die Virulenz von <i>A. fumigatus</i> in einem <i>Galleria mellonella</i> Infektionsmodell.....	75
Abbildung 24: Zellwandintegritätsverlust ausgelöst durch Voriconazol führt zu 3 verschiedenen Absterbevarianten.....	78
Abbildung 25: Azole lösen eine verzögerte Aktivierung des Zellwandintegritätswegs aus in (A) SAB und (B) AMM.....	81
Abbildung 26: Septen verlängern die Überlebenszeit von <i>A. fumigatus</i> Hyphen unter Voriconazol-Stress.....	82
Abbildung 27: Voriconazol-Exposition führt zu Chitin-Ablagerung in <i>A. fumigatus</i> Hyphen.....	83
Abbildung 28: Durch Azole induzierte Ablagerungen an der Zellwand von <i>A. fumigatus</i> enthalten Glukan.....	84
Abbildung 29: Die Geschwindigkeit des Auftretens Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen ist abhängig von der Höhe der Voriconazol-Konzentration und fällt zeitlich mit dem Beginn des Zellwandstresses zusammen.....	85
Abbildung 30: Mit Voriconazol behandelte Sporen bilden Chitin-Ablagerungen an der Zellwand.....	86
Abbildung 31: Die Voriconazol-induzierte Ablagerungen von Zellwandkohlenhydraten findet an der Zellwand statt und stülpt die darunterliegende Zellmembran ein.....	87
Abbildung 32: Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen nach Zugabe von Voriconazol.....	88

Abbildung 33: Das Verdrängen der Zellmembran durch Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen kann ebenfalls durch MidA-GFP dargestellt werden.	89
Abbildung 34: Die Inhibierung der β -1,3-Glukansynthase führt zu einem veränderten Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen.	90
Abbildung 35: Die Behandlung mit Caspofungin verlängert die Überlebenszeit von <i>A. fumigatus</i> bei der Behandlung mit einer tödlichen Voriconazol-Konzentration.	91
Abbildung 36: Die beobachteten phänotypischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks sind Folgen des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase.	92
Abbildung 37: Der Mangel an Lanosterol-14 α -Demethylase verursacht die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in <i>A. fumigatus</i>	93
Abbildung 38: Modell des durch Azole ausgelösten Tod von <i>A. fumigatus</i>	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung von <i>A. fumigatus</i> .	17
Tabelle 2: weltweite Verbreitung von Aspergillose.	22
Tabelle 3: Die vier zurzeit existierenden Klassen an Antimykotika, die klinisch gegen invasive Pilzinfektionen eingesetzt werden.	22
Tabelle 4: Anzahl der ABC- und MFS-/MDR- Transporter in <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. fumigatus</i> und <i>Cr. neoformans</i> .	28
Tabelle 5: ABC-Transporter der PDR-Klasse, die mit der Resistenz gegenüber Azolen assoziiert sind in <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. fumigatus</i> und <i>Cr. neoformans</i> .	28
Tabelle 6: Zusammenfassung möglicher Aufgaben des ERMES und Indizien dafür.	34
Tabelle 7: Verwendete <i>A. fumigatus</i> Stämme in dieser Arbeit.	36
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.	37
Tabelle 9: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	37
Tabelle 10: Liste der verwendeten Antibiotika und Antimykotika.	39
Tabelle 11: Liste der verwendeten Geräte.	39
Tabelle 12: Verwendete Primer für die Amplifizierung der ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor <i>mdm10</i> und <i>mdm12</i> und ca. 1000 bp des 3'-UTR Bereichs nach <i>mdm10</i> und <i>mdm12</i> aus dem <i>A. fumigatus</i> Genom. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind grün und rot markiert.	50
Tabelle 13: Verwendete Primer für die Amplifizierung der ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor den Genen <i>mdm10</i> , <i>mdm12</i> , <i>mdm34</i> und <i>mmm1</i> und ca. 1000 bp des Start-Bereichs beginnend mit ATG des jeweiligen Gens aus dem <i>A. fumigatus</i> Genom. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind grün und rot markiert.	51
Tabelle 14: Proteinsequenzen der vier ERMES Komponenten aus <i>S.cerevisiae</i> aus der Yeast Genome Database (Stamm S288C) und deren durch BlastP identifizierte Homologe in <i>A. fumigatus</i> .	62
Tabelle 15: ERMES Homologe in <i>A. fumigatus</i> (Af293), <i>Candida albicans</i> (SC5314) und den Modell-Schimmelpilzen <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC A4) und <i>Neurospora crassa</i> (OR74A).	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABPA	<i>allergic bronchopulmonary Aspergillosis</i> (bronchopulmonale Aspergillose)
AMM	Aspergillus Minimal Flüssigmedium
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDR	Candida Drug Resistance
CFW	Calcofluorweiß
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
CNPA	<i>chronic necrotizing pulmonary Aspergillosis</i> (nekrotisierende pulmonale Aspergillose)
CoCl ₂	Cobalt (II)-chlorid
CPA	<i>chronic pulmonary Aspergillosis</i> (chronische pulmonale Aspergillose)
CuSO ₄	Kupfersulfat
CWI	<i>cell wall integrity pathway</i> (Zellwandintegritäts-Signalweg)
CYP51	Lanosterol-14 α -Demethylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
OD	optische Dichte
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERMES	<i>ER-mitochondria encounter structure</i> / Struktur, die das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien verbindet
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FeSO ₄	Eisensulfat
GAG	Galactosaminogalactan
GFP	<i>green fluorescence protein</i> / grün fluoreszierendes Protein
mtGFP	<i>mitochondrial tagged green fluorescence protein</i> / grün fluoreszierendes Protein mit einer mitochondriellen Signalsequenz
ggf.	gegebenenfalls
H ₃ BO ₃	Borsäure
H ₂ O	Wasser
dd H ₂ O	bidestilliertes Wasser
IPA	<i>invasive pulmonary Aspergillosis</i> (invasive pulmonale Aspergillose)
kB	Kilo basepaar (Kilo-Basenpaare)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
$MgCl_2$	Magnesiunchlorid
MDR	<i>multidrug resistance</i>
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
$MnCl_2$	Manganchlorid
NaCl	Natriumchlorid
$Na_3C_6H_5O_7$	Tri-Natriumcitrat Dihydrat
Na_4EDTA	Tetranatrium EDTA
$NaNO_3$	Natriumnitrat
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	Ammoniumheptamolybdat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDR	<i>pleiotropic drug response</i> / pleiotropische Antwort eines Gens auf Medikamente
p-Wert	<i>probability value</i> / Wahrscheinlichkeitswert
pH	Potential des Wasserstoffs, ist ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung. Er ist die Gegenzahl des dekadischen Logarithmus (Zehnerlogarithmus) der Wasserstoffionen-Aktivität
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
ptrA	Pyrithiamin
RFP	<i>red fluorescence protein</i> / rot fluoreszierendes Protein
SAFS	<i>severe asthmatic fungal sensitization</i> (schweres Asthma mit Pilzsensibilisierung)
SOB	Super Optimal Broth
TB	Transformation Buffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	untranslatierter Bereich
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Zinksulfat Heptahydrat
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 *Aspergillus fumigatus*

Die Gattung *Aspergillus* umfasst eine Reihe von Spezies, die in vielen Bereichen des Lebens eine wichtige Rolle einnehmen. *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus niger* werden zur biotechnologischen Gewinnung von Säuren und der Herstellung von Nahrungsmitteln eingesetzt [17]. Andere, wie z.B. *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), sind menschliche Pathogene. Bekannte Gemeinsamkeiten aller Spezies der Gattung *Aspergillus* sind,

- Lebensmittel zu verderben,
- Mykotoxine herzustellen
- und in vielen verschiedenen Habitaten überleben zu können [18,19].

1.1.1 Taxonomie und Morphologie von *A. fumigatus*

Die taxonomische Einteilung von *A. fumigatus* ist in Tabelle 1 dargestellt [19,20].

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung von *A. fumigatus*.

Klasse:	Eurotiomycetes
Unterklasse:	Eurotiomycetidae
Ordnung:	Eurotiales
Familie:	Trichocomaceae
Gattung:	Gießkannenschimmel (<i>Aspergillus</i>)
Sektion:	<i>Fumigati</i>
Art:	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Die Sektion *Fumigati* zeichnet sich durch die Bildung eines Konidiophors mit säulenförmigen Konidienköpfen aus. Die Konidiophore bestehen aus flaschenförmigen Bläschen, grünlichen Phialiden, welche die Konidien in fadenförmigen Gruppen produzieren. Die Konidien von *A. fumigatus* sind bläulich-grün bis blassgrün, echinuliert und ca. 2,5 bis 3,5 µm groß (siehe Abb. 1) [20,21].

A. fumigatus vermehrt sich hauptsächlich über asexuelle Sporen, kann aber, wie von Gorman *et al.* 2009 entdeckt, sich auch sexuell fortpflanzen [22].

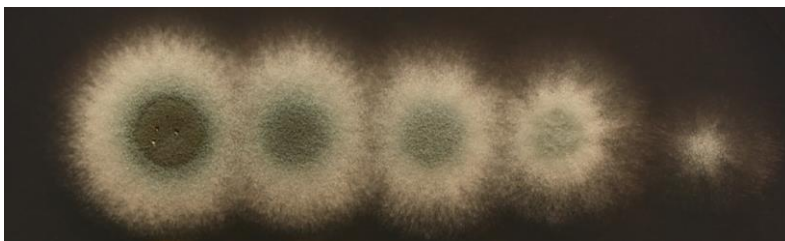


Abbildung 1: *A. fumigatus* wt Kolonien auf AMM Agar nach 36 h Wachstum bei 37 °C.

1.1.2 Zellwandaufbau

Die Zellwand von Pilzen ist, wie oft übersehen wird, ein dynamisches Gebilde, das ständig verändert wird je nach Umgebung oder Phase des Zellzyklus. Viele Veränderungen, die während des Lebenszyklus (Spore zu Hyphe) auftreten, sind eigentlich Veränderungen der Zellwand. Darüber hinaus stellt sie das Exoskelett der Hyphen dar. So muss sie gleichzeitig zur ständigen Veränderung auch ein starres Gebilde sein, das der Zelle Schutz bietet. Während die Konidien von *A. fumigatus* in eine hydrophobe Hülle mit innerer Melanin-Schicht verpackt sind, zeigen auskeimende Sporen und Hyphen vor allem α -1,3-Glukan, Galactomannan, Galactosaminogalactan und N-glykosylierte Proteine an ihrer Oberfläche (siehe Abb. 2) [23,24].

Die Zellwand einer *A. fumigatus* Hyphe besteht zu 90 % aus Polysacchariden. Der zentrale Kern der Zellwand besteht aus verzweigtem β -1,3-Glukan, das mit Chitin vernetzt ist [25]. Dieses Netz ist kovalent gebunden an weitere Polysaccharide, wie Galactomannan, β -1,3- und β -1,4-Glukan. Dieses Glukan ist in anderen Spezies wie *Candida albicans* (Abk. *C. albicans*) nicht vorhanden und kann so als Marker für *A. fumigatus* verwendet werden [26].

Das durch β -1,3-Glukan gebildete Netz wird ausgefüllt von α -1,3-Glukanen, die zu 1 % über eine α -1,4-Verbindung miteinander verknüpft sind [23]. Zusätzlich zu den oben erwähnten Bestandteilen der Zellwand, gehören auch einige Proteine dazu. Diese sind zum großen Teil nicht wichtig für den Aufbau der Zellwand, einige können aber zur Umstrukturierung dieser beitragen, wie z.B. Transglykosidasen. Diese sind über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden und können über eine kovalente Bindung mit dem β -Glukan auf die Zellwand übertragen werden. Sie können aber auch durch nicht kovalente Bindungen wie Ladung oder hydrophobe Bindungen im Polysaccharid-Netz gebunden sein [23,27].

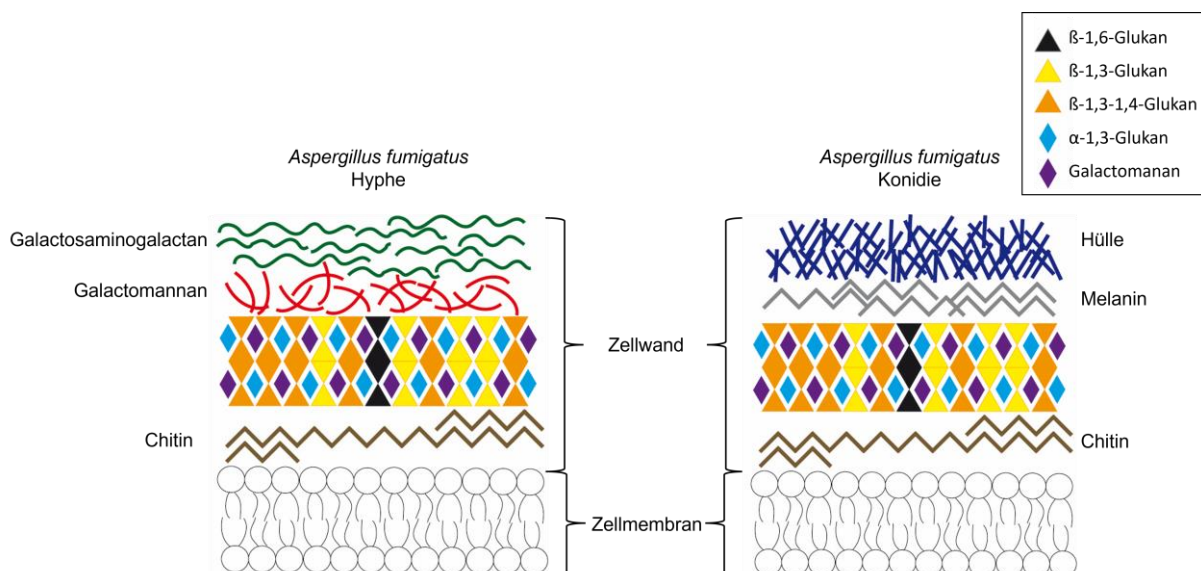


Abbildung 2: Zellwandaufbau von *A. fumigatus*.

Die Zellwand von Konidien und Hyphen sind unterschiedlich aufgebaut, bestehen aber aus ähnlichen Elementen. Der innere Kern der Zellwand von Hyphen und Konidien besteht aus β -1,3-Glukan, β -1,6-Glukan und Chitin. Die Konidien von *A. fumigatus* besitzen zusätzlich eine hydrophobe Hülle mit einer inneren Melanin-Schicht. Die *A. fumigatus* Hyphen besitzen in den äußeren Schichten Galactomannan und Galactosaminogalactan (Abk. GAG). Abbildung basierend auf Erwig *et al.* 2016, Schiefermeier-Mach *et al.* 2017, Gow *et al.* 2017 und Garcia-Rubio *et al.* 2020 [28–31].

1.1.3 Verbreitung

A. fumigatus ist ein saprophytisch lebender Pilz, dessen natürlicher Lebensraum der Boden ist, wo er sich von organischem Material ernährt [21]. Er vermehrt und verbreitet sich hauptsächlich über im Überfluss produzierte asexuelle Sporen. Diese Konidien werden durch den Wind von der Konidiophore abgelöst und weitergetragen [22].

Die optimalen Lebensbedingungen von *A. fumigatus* liegen bei 37 °C und einem pH-Wert zwischen 3,7 und 7,6. Allerdings kann der Pilz überall isoliert werden, wo zu zersetzendes Material zu finden ist, eine Bodentemperatur zwischen 12 °C und 65 °C herrscht und der pH-Wert zwischen 2,1 und 8,8 liegt [32]. Durch seine Thermo- und pH-Toleranz, sowie seine Möglichkeiten verschiedene organische Stoffe zu zersetzen, gehört er zu den am weitesten verbreiteten Pilzarten, deren Sporen durch die Luft verbreitet werden [21]. Das ubiquitäre Vorkommen von *A. fumigatus* kann auf die hohe Anzahl an Abwehrmechanismen gegenüber Umwelteinflüssen zurückgeführt werden. Zu diesen gehören unter anderem die Produktion von Sekundärmetaboliten und eine hohe Anzahl an Efflux-Pumpen [32].

1.1.4 Epidemiologie

Invasive Pilzinfektionen sind jedes Jahr mit mindestens 1,5 Millionen Toten assoziiert. 90% der Tode durch Pilzinfektionen werden ausgelöst durch Erreger der Gattungen *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* and *Rhizopus*. Aber auch andere Gattungen wie *Fusarium* oder *Scedosporium*, sowie die Klasse der *Zygomycetes*, gewinnen immer mehr Bedeutung in der Gruppe der Pilz-Pathogene [1].

Die Konidien von *A. fumigatus* können sich durch ihre geringe Größe sowohl außerhalb als auch innerhalb von Räumen in der Luft verbreiten und bis in die menschlichen Lungenalveolen vordringen. Durch das ubiquitäre Vorkommen der Konidien atmet jeder Mensch täglich mehrere hundert von ihnen ein. Bei immunkompetenten Menschen werden diese Sporen in der Lunge vom angeborenen Immunsystem abgetötet, da ihnen spezielle Virulenzfaktoren fehlen. Bei Menschen mit einer Immunschwäche können die Konidien allerdings auskeimen [21,32]. *A. fumigatus* kann aber auch andere Organe infizieren wie die Haut, die Leber, den Gastrointestinaltrakt, Knochen, Augen und das Peritoneum. Diese Infektionen sind aber eher selten [21].

1.1.5 Pathogenität und klinische Relevanz

Klinische Manifestationen der Aspergillose können sowohl in immunkompetenten als auch in immungeschwächten Patienten auftreten (siehe Abb. 3). Hierbei kann die Infektion chronisch oder akut verlaufen.

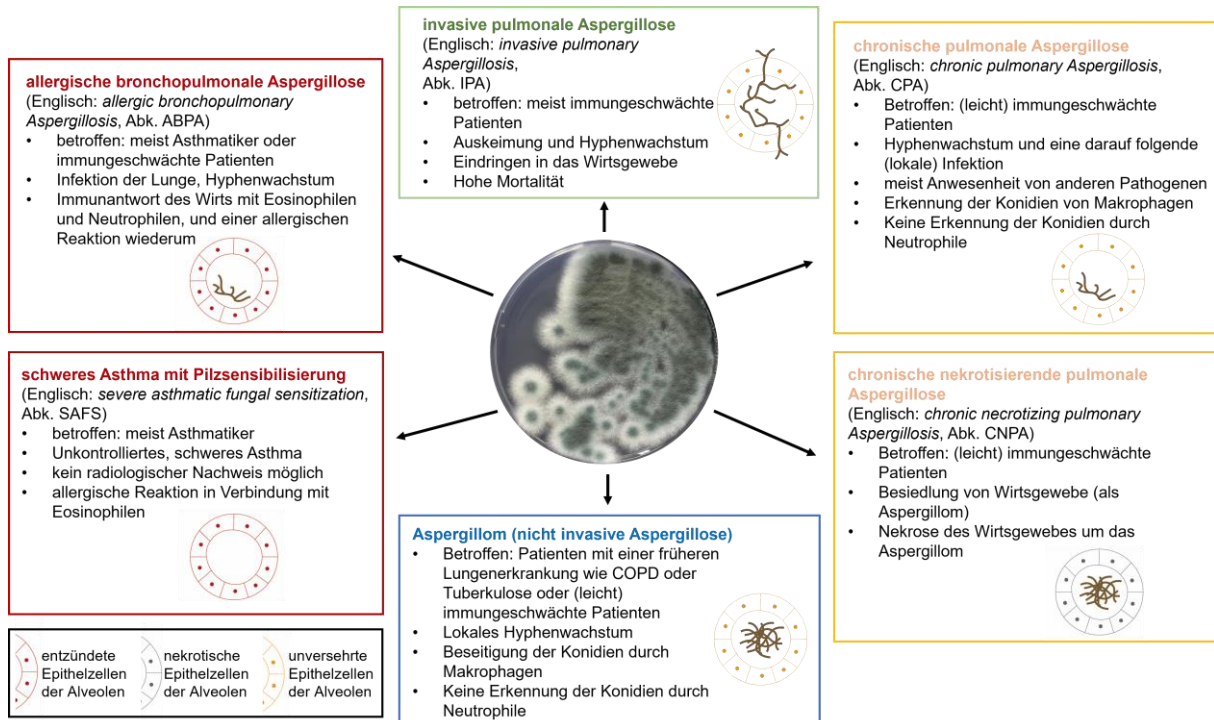


Abbildung 3: Schematischer Überblick über die häufigsten Lungenerkrankungen, die durch *Aspergillus* ssp. ausgelöst werden.

Dargestellt werden die sechs häufigsten Erkrankungen einer *Aspergillus*-Infektion. Es werden repräsentative Alveolen mit dem Wachstum von *A. fumigatus* bei *Aspergillus*-Infektionen, wie der Aspergillose, der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (Englisch: *allergic bronchopulmonary Aspergillosis*, Abk. ABPA), schwerem Asthma mit Pilzsensibilisierung (Englisch: *severe asthmatic fungal sensitization*, Abk. SAFS) oder chronischer obstruktive Lungenerkrankung (Englisch: *chronic obstructive pulmonary disease*, Abk. COPD) dargestellt. Die Umrandung der Kästchen gibt an, welche Patientengruppe größtenteils betroffen ist. Blau: immunkompetente Patienten, Gelb: Patienten mit Beeinträchtigung des Immunsystems, Grün: immungeschwächte Patienten, Rot: Asthmatiker. Abbildung basierend auf Verburg *et al.* 2022 [33].

In immunkompetenten Patienten treten meist folgende klinische Manifestationen auf [2,3]:

1. Aspergillom (Pilzball innerhalb der Lunge)

Bei einem Aspergillom handelt es sich um lokales Wachstum von Hyphen („Pilzball“). Ein Aspergillom entsteht meist durch die Besiedlung eines bereits vorhandenen Hohlraumes in der Lunge, der zum Beispiel durch eine Tuberkulose verursacht wurde. Es wird davon ausgegangen, dass 20 % der Patienten, die sich von einer kavitären Lungentuberkulose erholen, innerhalb der folgenden 3 Jahre ein Aspergillom entwickeln [3,34]. Eine Studie zeigte, dass 90 % der Aspergillom-Patienten in Entwicklungsländern zuvor mit Tuberkulose infiziert waren. Zusätzlich kann ein Aspergillom weitere kavitäre Lungenerkrankungen wie Sarkoidose oder andere Pilzinfektionen beeinflussen [3,34].

2. allergische bronchopulmonale Aspergillose (Englisch: *allergic bronchopulmonary Aspergillosis*, Abk. ABPA) und schweres Asthma mit Pilzsensibilisierung (Englisch: *severe asthmatic fungal sensitization*, Abk. SAFS)

Patienten mit zystischer Fibrose oder einer bestimmten genetischen Prädisposition können durch die Sensibilisierung mit *A. fumigatus* Allergenen eine allergische bronchopulmonale Aspergillose entwickeln [35–37]. Es wird angenommen, dass ca. 1 - 3,5 % der Asthmatiker durch ABPA betroffen sind. Dies sind ca. 4 Millionen Menschen weltweit [35,38,39]. Bei ABPA wird vermutet, dass durch Defekte der angeborenen und adaptiven Immunantwort die Persistenz von *A. fumigatus* verursacht wird. Hierbei wird durch die Exposition von *A. fumigatus* Antigenen das Immunsystem aktiviert, wodurch eine polyklonale Antikörperreaktion ausgelöst wird. Im Allgemeinen weisen die Patienten schlecht kontrolliertes Asthma, Keuchen, Hämoptysen und Husten auf. Weitere Symptome sind leichtes Fieber, Unwohlsein und Müdigkeit. Bei ca. 31 - 69 % der Patienten wird die Expektoration von bräunlichen schwarzen Schleimpfropfen beobachtet [35]. ABPA kann auch in immungeschwächten Patienten auftreten [33].

In Patienten mit leicht beeinträchtigten Immunsystem treten meist folgende klinische Manifestationen auf:

1. chronische pulmonale Aspergillose (Englisch: *chronic pulmonary Aspergillosis*, Abk. CPA)

Bei der chronischen pulmonalen Aspergillose handelt es sich um eine chronische Infektion mit *Aspergillus* ssp.. Bei dieser Infektion wachsen ähnlich wie beim Aspergillom lokal Hyphen in der Lunge. Insbesondere Patienten mit geschädigtem Lungengewebe oder einer Lungenerkrankung sind von dieser Manifestation der Aspergillose betroffen [33,40].

2. chronische nekrotisierende pulmonale Aspergillose (Englisch: *chronic necrotizing pulmonary Aspergillosis*, Abk. CNPA)

Die chronische nekrotisierende pulmonale Aspergillose entsteht bei einem Ausbreiten der Hyphen z.B. aus einem Aspergillom. Hierbei befallen die Hyphen Wirtsgewebe, welches dadurch abstirbt [33].

In Patienten mit ausgeprägter Immunschwäche tritt meist eine invasive pulmonale Aspergillose (Englisch: *invasive pulmonary Aspergillosis*, Abk. IPA) auf.

40 – 50 % der Tode von stark immungeschwächten Patienten mit akuter Leukämie oder einer Stammzellenspende werden durch *Aspergillus* verursacht [4–8]. Eine Studie in den 1990er Jahren zeigte einen 3- bis 4-fachen Anstieg an *Aspergillus* Infektionen in Krebszentren über die letzten beiden Jahrzehnte [41,42]. Die IPA ist mit einer Inzidenz von 43 % bis 59 %, die am stärksten verbreitete Infektionskrankheit unter Stammzellenempfängern und Patienten mit Organtransplantation [4–11].

Eine Studie unter Empfängern von Organtransplantaten mit invasiver Aspergillose ergab eine Überlebensquote von ca. 59 % nach einem Jahr [43]. Bei Stammzellenempfängern lag diese Quote bei ca. 25 % [44]. Des Weiteren sterben ca. 15 bis 20 % der Leukämie-Patienten an einer durch *Aspergillus* ausgelösten Pneumonie [12–14].

Die häufigsten *Aspergillus* ssp. Erkrankungen stellen die CPA, die IPA und die ABPA dar (siehe Tab. 2) [45].

Tabelle 2: weltweite Verbreitung von Aspergillose.

Übernommen aus Sen *et al.* 2022 [45].

Pilzkrankung	globale Belastung	Kommentare
ABPA	~ 4. 800 000	nur Erwachsene, selten bei Kindern
CPA	~ 3.000,000	etwa 10 Millionen jährlich gefährdet
IPA	~ 3.00,000	
zystische Fibrose-bedingte allergische bronchopulmonale Aspergillose	~ 6675	nur Erwachsene, beginnend bei Kindern ab einem Alter von 4 Jahren

Eine Studie, die sich mit Fehldiagnosen als möglicher Ursache für vermeidbare Morbidität und Mortalität auf der Intensivstation befasste, ergab, dass die Aspergillose zu den vier häufigsten Fehldiagnosen gehört, die wahrscheinlich den Tod des Patienten zur Folge hatte [46].

1.2 Therapie

Pilze, im Gegensatz zu Bakterien, gehören wie der Mensch zur Domäne der Eukaryoten. Dies erschwert die Entwicklung von antimykotischen Substanzen, da viele mögliche Zielstrukturen ebenfalls im Menschen vorhanden sind [1].

Zurzeit existieren vier Klassen an Antimykotika, die klinisch gegen invasive Pilzinfektionen eingesetzt werden. Diese sind Polyene, Flucytosine, Azole und Echinocandine (siehe Tab. 3 und Abb. 4). Für die Behandlung von Infektionen mit *A. fumigatus* werden drei dieser Klassen eingesetzt. Diese sind Polyene, Azole und Echinocandine.

Tabelle 3: Die vier zurzeit existierenden Klassen an Antimykotika, die klinisch gegen invasive Pilzinfektionen eingesetzt werden.

Übernommen aus Wall *et al.* 2020 [47].

Antimykotische Klasse	Wirkmechanismus	biologische Wirkung	Wirkungsspektrum
Polyene	Zielstruktur Ergosterol (Ergosterin), extrahieren Sterole aus der Pilzzellmembran	Fungizid	Breitband-Antimykotikum zur Behandlung von invasiven Pilzinfektionen; Resistenz ist selten
Flucytosine	Inhibiert DNA und RNA-Synthese	fungizid gegen <i>Cryptococcus</i> ssp.	wird fast ausschließlich zur Behandlung von <i>Cryptococcus</i> -Meningitis eingesetzt, Resistenzen sind extrem häufig, so dass es nie als Monotherapie eingesetzt wird.
Azole	Hemmung der Lanosterol-14 α -Demethylase und dadurch Hemmung der Ergosterol-Synthese (Ergosterin)	meist fungizid	Als Klasse weisen sie ein breites Spektrum gegen Hefen und Fadenpilze auf, obwohl einige Arten eine intrinsische Resistenz gegen häufig verwendete Derivate aufweisen; eine sekundäre Resistenz kann sich oft während der Behandlung entwickeln.
Echinocandine	zielen auf die β -1,3-Glukansynthase und verhindern so die Produktion von β -1,3-Glukan in der Zellwand.	fungizid gegen <i>Candida</i> ssp., aber fungistatisch gegen <i>Aspergillus</i> ssp.	Erstes Mittel zur Behandlung von Candidose und zur Behandlung von Aspergillose, wenn andere Behandlungen nicht anschlagen; Resistenzentwicklung schreitet voran

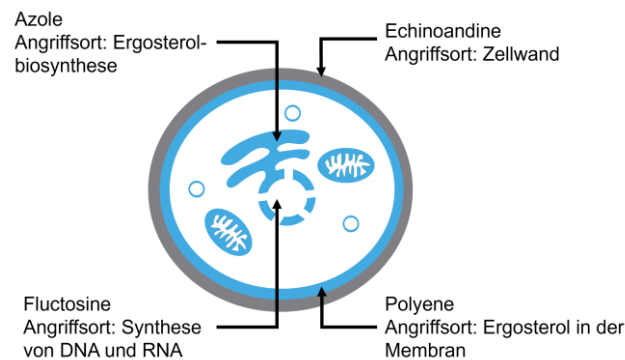


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der derzeit existierenden Antimykotika und ihrer Wirkungsweise. Die Zielstrukturen der vier Antimykotika Klassen lassen sich einteilen in die Zellwand (Echinocandine), die Zellmembran (Polyene), die Synthese von RNA und DNA bzw. Proteinsynthese (Flucytosine) und die Ergosterol-Biosynthese (Azole). Abbildung basierend auf Wall *et al.* 2020 [47].

Da Flucytosine allein für die Behandlung von *Cryptococcus* Meningitis eingesetzt werden, werden diese im Folgenden nicht genauer beschrieben.

1.2.1 Polyene

Die Polyene wurden in den 1940er und 1950er Jahren entdeckt und waren die ersten entdeckten Breitband-Antimykotika. Amphotericin B war das erste von der FDA zugelassene Antimykotikum für die Behandlung von invasiven Pilzinfektionen [48].

Es bindet an Ergosterol und wirkt als „Schwamm“, der Membranen Sterole entzieht. Dies führt zur Schwächung der Zellmembran und zum Austritt von Zytosol, was schlussendlich den Tod des Pilzes herbeiführt [47,49,50]. Aus diesem Grund werden Polyene als fungizid betrachtet und wirken gegen die meisten Pilzorganismen.

Der größte Nachteil von Amphotericin B war und ist seine Toxizität, die zu Nierenversagen führen kann. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Lipidformulierungen entwickelt, die im Allgemeinen eine geringere Toxizität und eine verbesserte Pharmakokinetik aufweisen. Diese sind allerdings deutlich teurer als das ursprüngliche Amphotericin B [47,51].

1.2.2 Echinocandine

Die Echinocandine sind die jüngste Klasse der Antimykotika. Sie wurden erstmals in den 1970er Jahren entdeckt, kamen aber erst in den frühen 2000er Jahren auf den Markt [47,52,53].

Echinocandine hemmen das Enzym β -1,3-Glukansynthase. Dieses Enzym produziert das Polysaccharid β -1,3-Glukan, das die Hauptstrukturkomponente der meisten Pilzzellwände darstellt. Im Jahr 2001 wurde Caspofungin als erstes Echinocandine für die Behandlung am Menschen zugelassen. [54–56].

Ein Vorteil der Echinocandine besteht in ihrer Zielstruktur, da Säugetierzellen keine Zellwand aufweisen. Aus diesem Grund sind sie im Vergleich zu anderen Antimykotika weniger toxisch und haben weniger Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln [47,57].

Ursprünglich erhielten Echinocandine eine Zulassung für die Behandlung von Aspergillosen, die auf eine Behandlung mit anderen Antimykotika nicht ansprachen [34,54,58]. Mittlerweile werden sie ebenfalls für die Behandlung von Candidosen verwendet sowie für andere Pilzinfektionen [54].

Echinocandine sind fungizid für *Candida* ssp. [54], fungistatisch gegen *Aspergillus* ssp. und unwirksam gegen *Cryptococcus* ssp. [57,59].

1.2.3 Azole

Azole sind die erste Wahl bei der Behandlung und Prävention von Mykosen. Sie sind zyklische organische Moleküle, die in zwei Klassen eingeteilt werden können, diese sind Imidazole (Clotrimazol, Miconazol und Ketoconazol) und Triazole (z.B. Itraconazol, Fluconazol und Voriconazol).

Die ersten Berichte über die Wirkung von Imidazolen gegen Pilze stammen aus den 1960er Jahren [60]. Aufgrund ihrer hohen Toxizität, hohen Nebenwirkungen und Interaktionen mit anderen Medikamenten wurden sie durch Triazole ersetzt. Die ersten Triazole waren Itraconazol und Fluconazol. Diese weisen ein breiteres Wirkungsspektrum als Imidazole auf und weniger Nebenwirkungen. Fluconazol wirkt gegen die *Candida* Familie, *Cr. neoformans*, *Histoplasma*, *Blastomyces* und gegen die Gattung *Coccidioides*, allerdings nicht gegen Schimmelpilze. Itraconazol wirkt zusätzlich gegen Hefen und *Aspergillus* Spezies. Allerdings sind Itraconazol und Fluconazol unwirksam gegen *Scedosporium*, *Fusarium* und *Mucorales* Pathogene, die immer mehr an Bedeutung gewinnen. Fluconazol und Itraconazol werden im Allgemeinen als fungistatisch angesehen, worauf das schnelle Auftreten von Resistenzen zurückzuführen ist [1].

Zur nächsten Generation der Triazole gehörten Voriconazol und Posaconazol. Diese Triazole werden als fungizid angesehen und wirken zusätzlich gegen u.a. die Gattungen *Fusarium* und *Scedosporium*, die Klasse der *Zygomyceten* und *Cr. neoformans*.

Die fungizide Wirkung von Voriconazol gegen *A. fumigatus* übersteigt die aller anderen Azole. Es stellt daher die erste Wahl bei der Behandlung von invasiver Aspergillosen dar. Posaconazol ist das Mittel der Wahl zur Prophylaxe gegen invasiven Aspergillosen und *Candida* Infektionen [1].

Andere neue Triazole sind u.a. Efinaconazol und Isavuconazol. Efinaconazol wurde 2014 von der FDA für die Behandlung von Nagelmykosen zugelassen [61]. Isavuconazol wurde 2015 von der FDA für die Behandlung von invasiver Aspergillose und Mukormykosen zugelassen [1,62].

1.2.3.1 Wirkungsweise von Azolen

Azole binden an das Eisen-Atom im Porphyrin des aktiven Zentrums der Lanosterol-14 α -Demethylase (Hefen) oder der 14 α -Sterol Demethylase (CYP51 in Schimmelpilzen) (siehe Abb. 5) [1].

Diese Enzyme sind Cytochrom P450-Enzyme, und gehören damit zur ubiquitären Familie der Monooxygenasen, die sowohl in Prokaryoten sowie in Eukaryoten zu finden sind. Diese Enzyme katalysieren in der Regel spezifische Umwandlungen einer breiten Palette lipophiler Verbindungen in hydrophilere Derivate [63].

Die Familie der CYP51 ist eine strukturell und funktionell konservierte Proteinfamilie in Pilzen, deren Mitglieder an der Ergosterol-Biosynthese beteiligt sind [63]. In Hefen und filamentösen Pilzen katalysiert das Enzym die 14 α -Demethylierung von Lanosterol und Eburicol [63–66].

Trotz der konservierten Proteinstruktur weisen die P450 Enzyme verschiedener Pilzspezies Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind bestimmend für die unterschiedliche Wirkung der Azole auf unterschiedliche P450 Enzyme [1]. *A. fumigatus* besitzt zwei Lanosterol-14 α -Demethylasen, die durch die Gene *cyp51A* und *cyp51B* kodiert werden. Beide Orthologe können das Fehlen der anderen Demethylase kompensieren. Das Fehlen beider Proteine ist allerdings letal [66,67]. Auch in Säugetieren spielt die 14 α -Sterol Demethylase eine wichtige Rolle während der Cholesterinsynthese [68]. Azole zeigen eine größere Affinität für das aktive Zentrum der Pilz Demethylase als für die des Säugetierenzym und haben daher eine antimykotische Wirksamkeit [68,69].

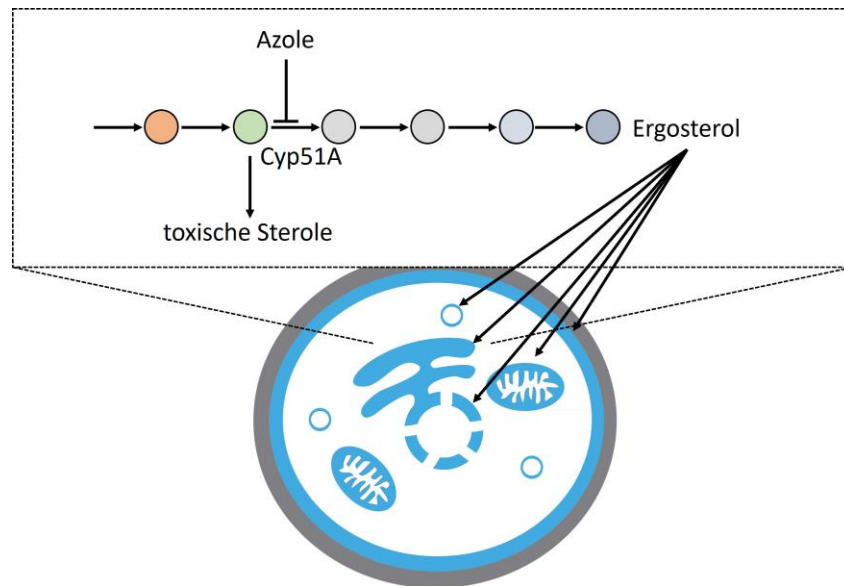


Abbildung 5: Zielstruktur und Wirkungsweise von Azolen.

Die verschiedenen bunten Kreise symbolisieren die Zwischenprodukte der Ergosterol-Biosynthese, die im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Die Pfeile zwischen den Kreisen stellen die daran beteiligten Enzyme dar. Der orangene Punkt stellt Lanosterol bzw. Eburicol dar, das durch CYP51 demethyliert wird. Azole binden an das Eisen-Atom im Porphyrin des aktiven Zentrums von CYP51 und inhibieren so die Synthese von Ergosterol, das für den Einbau in alle Membranen der Zelle benötigt wird. Durch diesen Vorgang wird die Rigidität und Elastizität aller Membranen der Zelle negativ beeinflusst. Zusätzlich kommt es zu einer Akkumulation von Lanosterol und anderen 14 α -methylierten Sterolen, die toxisch für die Zelle sein sollen. Abbildung basierend auf Cowen *et al.* 2008 [70].

1.2.3.2 Auswirkungen des Ergosterol Mangels

Durch die Bindung der Azole an das Enzym wird die Biosynthese von Ergosterol gehemmt und es kommt zur Akkumulation von Lanosterol und anderen 14 α -methylierten Sterolen, die toxisch für die Zelle sein sollen. Durch die Verarmung der Zelle an Ergosterol wird die Hauptfunktion des Sterols als Membranbestandteil gestört [71,72]. Für *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass durch die Behandlung mit Azolen die Plasmamembran eine veränderte Rigidität und Elastizität aufweist [73–75]. Darüber hinaus führt die Reduktion von Sterolen zu einer verringerten Fluidität der Membran, einer gestörten Endozytose, Zellpolarisation, Zellfusion und Zellwandaufbau [76–79].

Durch das Fehlen von Ergosterol wird außerdem die Aktivität verschiedener membrangebundener Enzyme, die für den Nährstofftransport oder die Chitin Synthese zuständig sind, verändert [69,71,80–82].

1.2.4 Resistenzmechanismen

Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten entwickeln sich im Laufe der Zeit. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht darin, sich schnell und effizient zu vermehren. Aus diesem Grund passen sich Mikroorganismen immer wieder den sich wechselnden Umweltbedingungen an. Basis für diese Anpassung ist zum einen die Fähigkeit des Organismus, seine Genexpression den vorherrschenden Bedingungen anzupassen, zum anderen die genetische Variabilität innerhalb der Population. Äußere Bedingungen werden über Sensoren in der Zelloberfläche wahrgenommen und können über Signalkaskaden die Genexpression im Zellkern verändern. Die genetische Vielfalt in einer Population wird durch zufällige stattfindende Rekombination und Mutation der DNA der einzelnen Organismen erweitert. So wird die Adaptation durch vorteilhafte Mutationen z.B. in der Zielstruktur eines Antimykotikums vorangetrieben [83].

Bei *A. fumigatus* ist die Zellwand einer der wichtigsten Angriffspunkte für Antimykotika. Um sie zu schützen, besitzt der Pilz einen Signalweg, über den die Zelle Zellwandstress wahrnehmen kann.

1.2.4.1 Der Zellwandintegritäts-Signalweg

Der Zellwandintegritäts-Signalweg (Englisch *cell wall integrity pathway*, Abk. CWI) gehört zu den mitogenaktivierten Proteinkinase-Signalwegen (Englisch *mitogen-activated protein kinase*, Abk. MAPK) und spielt eine zentrale Rolle im Auf- und Umbau der Zellwand.

Der CWI in *A. fumigatus* besteht aus drei stark konservierten Kinasen, diese sind Bck1 (MAPK Kinase Kinase, MAPKKK), Mkk2 (MAPK Kinase) und MpkA (MAPK).

Der Zellwandstress wird wahrgenommen durch Sensoren, die in der Zellmembran verankert sind (Wsc1, Wsc3 und MidA). Diese aktivieren durch Nukleotidaustausch über den GTP-Austauschfaktor (Englisch *guanosine triphosphate exchange factor*, Abk. GEF) Rom2 und das dazugehörige GTP-bindende Protein Rho1 die Proteinkinase PkcA [84]. Das Signal wird dann durch PkcA an die MAP-Kinase Kaskade bestehend aus Bck1 (MAPKKK) und den zwei weiteren MAP-Kinasen Mkk2 und MpkA weitergegeben. MpkA wird phosphoryliert und wandert in den Zellkern, wo es die Transkription verschiedener Gene beeinflusst (siehe Abb. 6) [84–88].

Wird eine der drei Kinasen dieses Moduls deletiert, führt dies immer zum selben Phänotyp. Durch die fehlende Phosphorylierung von MpkA wird die Veränderung der Genexpression im Kern und damit eine Anpassung an äußere Umstände verhindert [86].

Die Deletionen der verschiedenen Gene des MAPK Signalwegs zeigen alle ähnliche Phänotypen. Die Kolonien sind kleiner und kompakter als die des Wildtyps und zeigen reduziertes radiales Wachstum [85]. Zusätzlich sind sie anfällig gegenüber allen bekannten Zellwand-schädlichen Substanzen wie z.B. Calcofluorweiß [85,86].

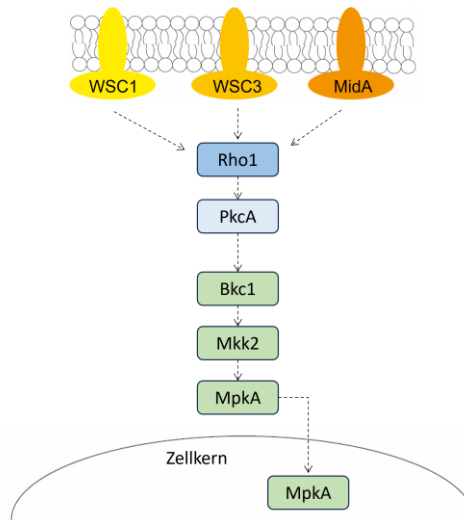


Abbildung 6: Der Zellwandintegritätsweg in *A. fumigatus*.

Der dargestellte Signalweg und seine Proteine sind Teil des CWI in *A. fumigatus*. Die Sensoren WSC1, WSC3 und MidA sitzen in der Zellmembran und nehmen Zellwandstress wahr. Diese aktivieren durch Nukleotidaustausch über Rho1 PkcA. PkcA wiederum überträgt das Signal auf die MAPK Kaskade bestehend aus Bck1 und den zwei weiteren MAP Kinasen Mkk2 und MpkA. MpkA wird phosphoryliert, wandert in den Zellkern und aktiviert spezielle Transkriptionsfaktoren [24,84–88]. Abbildung basierend auf Valiante *et al.* 2015 [24].

1.2.5 Entwicklung von Resistenzen am Beispiel der Azole

Azole sind die erste Wahl bei der Behandlung einer *A. fumigatus* Infektion und sind daher bei einer Langzeitbehandlung unerlässlich [60]. In den letzten Jahren hat das Auftreten von Azol-resistenten *Aspergillus* Isolaten alarmierend zugenommen. Es wird vermutet, dass die Bildung von Resistenzen auf der Verwendung von Azolen in der Therapie von chronisch infizierten Patienten sowie in der Landwirtschaft zurückzuführen ist [89]. Hier wird durch die ständige Nutzung ein Selektionsdruck auf vorteilhafte Mutationen, die zu Resistenz gegenüber Azolen führen, hervorgerufen.

Die bis jetzt bekannten Resistenz-Mechanismen gegen Azol-Antimykotika beruhen auf verschiedenen molekularen Veränderungen in der Zelle (siehe Abb. 7). Generell lassen sich diese Mechanismen in drei Kategorien einteilen:

1. Abnahme der effektiven Azol-Konzentration in der Zelle
2. Veränderung der Zielstruktur Erg11/ Cyp51A
3. Metabolische Umleitung der Ergosterolbiosynthese

Diese drei Mechanismen werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.2.5.1 Abnahme der effektiven Azol-Konzentration in der Zelle

1. Höhere Expression der Efflux-Pumpen (ABC- und MFS-Transporter)

Es ist bekannt, dass die Aktivität von Azolen bzw. Medikamenten im Allgemeinen durch die Aktivität bestimmter Efflux-Transport-Systemen des Zielorganismus beeinflusst werden kann. Zu diesen gehören unter anderem die ATP-bindenden Transporter (Englisch *ATP-binding cassette*, Abk. ABC) und die Major-Faciliator-Superfamilie (Abk. MFS) zu denen die MDR-Transporter (Englisch *multidrug resistance*, Abk. MDR) zählen. ABC-Transporter setzen die ATP-Hydrolyse ein, um Substanzen nach außen zu befördern, während MDR-Transporter hierfür die elektrochemische protonenmotorische Kraft nutzen [90,91].

Die Analysen der Genome von *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus* und *Cr. neoformans* ergab für jede Spezies eine andere Anzahl an ABC- und MDR-Transportern (siehe Tab. 4). Daraus lässt sich ableiten, dass in jedem Organismus andere Effluxpumpen für die Azolresistenz verantwortlich sein können. *A. fumigatus* besitzt fast dreifach so viele Effluxpumpen wie *C. albicans* und fast neunfach so viele wie *C. glabrata*.

Tabelle 4: Anzahl der ABC- und MFS-/MDR- Transporter in *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus* und *Cr. neoformans*.

Spezies	ABC-Transporter	MFS-/MDR-Transporter	Quellen
<i>C. albicans</i>	28	96	[92–94]
<i>C. glabrata</i>	18	33	[95,96]
<i>A. fumigatus</i>	45	275	[97,98]
<i>Cr. neoformans</i>	29	192	

Die Hochregulierung der ABC-Transporter ist assoziiert mit der Resistenz gegenüber allen Azolen, während die MDR-/MFS-Effluxpumpen speziell mit der Resistenz gegenüber Fluconazol verbunden sind [99]. Unter den ABC-Transportern sind wiederum nur die der PDR Klasse (Englisch *pleiotropic drug response*, Abk. PDR) assoziiert mit der Resistenz gegenüber Antimykotika [96].

In *C. albicans*, *C. glabrata* und *Cr. neoformans* sind spezielle PDR-Transporter bekannt, die für die Resistenz verantwortlich sind (siehe Tab. 5). In *A. fumigatus* ist eine Identifikation der dafür verantwortlichen Transporter durch die hohe Anzahl nicht so einfach. Nascimento *et al.* 2003 fanden eine Hochregulation von AfuMDR4 in Stämmen, die im Labor resistent gegen Itraconazol wurden [100]. Eine Transkriptom Analyse von *A. fumigatus*, der mit Voriconazol behandelt wurde, zeigte wiederum eine Hochregulation von 5 ABC-Transportern (*abcA-E*) und drei MFS-Transportern (*mfsA-C*) [101]. Von diesen hat nur *abcA* bzw. *cdr1B* eine direkte Verbindung zur Resistenz gegen Azole [102].

Tabelle 5: ABC-Transporter der PDR-Klasse, die mit der Resistenz gegenüber Azolen assoziiert sind in *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus* und *Cr. neoformans*.

Spezies	ABC-Transporter der PDR-Klasse assoziiert mit Azol-Resistenz
<i>C. albicans</i>	CDR1, CDR2 [99,103]
<i>C. glabrata</i>	CgCDR1, CgCDR2, CgSNQ2 [99,103,104]
<i>Cr. neoformans</i>	AFR1 [105]
<i>A. fumigatus</i>	?

Die Expression der oben genannten Effluxpumpen wird von pilzspezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert. Die eigentliche Mutation findet in diesen Transkriptionsfaktoren statt und führt so zu einer erhöhten Expression der Effluxpumpen.

2. Erhöhte Expression von Erg11

Die erhöhte Expression von Erg11 führt ebenfalls zu einer höheren Resistenz gegenüber Azolen. Umso mehr Protein vorhanden ist, umso mehr Azol wird benötigt, um die Reaktion effektiv zu hemmen.

In *C. albicans* beruht die Hochregulation auf einer Mutation in UPC2. UPC2 gehört zu den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Es wurde beschrieben, dass durch eine „*gain-of-function*“ Mutation in UPC2 viele Proteine hochreguliert werden, zu denen auch Erg11 gehört [106].

Auch in *A. fumigatus* gibt es Azol-resistente Stämme, die eine erhöhte Expression von *cyp51A* zeigen. Allerdings ist dies bedingt durch die Duplikation eines 34 bis 42 bp langen Elements im *cyp51A*-Promotor. Zusätzlich ist diese Duplikation assoziiert mit Mutationen im *cyp51*-Gen selbst [107].

1.2.5.2 Veränderung der Zielstruktur Erg11/ Cyp51A

1. *cyp51*-Mutationen aufgrund derer die Affinität des Proteins gegenüber Azolen abnimmt

Sowohl in *C. albicans*, *C. parapsilosis* als auch *C. tropicalis* sind Mutationen bekannt, die das Enzym so verändern, dass die Affinität gegenüber Azolen abnimmt [108–112].

2. Geringe Affinität von Azolen zu Erg11

C. krusei ist intrinsisch resistent gegen Fluconazol. Obwohl der genaue Mechanismus unbekannt ist, gibt es Studien, die behaupten, dass es an der Aktivität des ABC-Transporters Abc1p in Zusammenhang mit einer geringeren Affinität von Fluconazol zu Erg11p liegt [113–115].

3. Aneuploidie

Aneuploidie bezeichnet eine Mutation, bei der ein einzelnes Chromosom zusätzlich zum üblichen Chromosomensatz vorhanden ist oder fehlt.

In *C. albicans* wurde gezeigt, dass TAC1, ein Transkriptionsfaktor für die Hochregulierung der ABC-Transporter CDR1 und CDR2, die Azolresistenz vermitteln, notwendig ist. Eine Hyperaktivierung des Transkriptionsfaktors TAC1 führt zu einer konstitutiv hohen Expression von CDR1 und CDR2.

Beim Vergleich eines resistenten *C. albicans* mit empfindlichen Stämmen wurde entdeckt, dass die empfindlichen Stämme zwei *tac1* Allele trugen. Der resistente Stamm trug im Gegensatz dazu nur ein *tac1* Allel, das zusätzlich durch einen Einzelnukleotid-Polymorphismus hyperaktiviert war [116,117]. Diese Beobachtung wurde ebenfalls in *C. glabrata* [118], *C. krusei* [113], und *Cr. neoformans* [119,120] gemacht.

1.2.5.3 Metabolische Umleitung der Ergosterolbiosynthese

1. Veränderte Sterol Zusammensetzung in der Membran/ Inaktivierung von Erg3

Ein weiterer, aber weniger verbreiteter Resistenzmechanismus ist die Inaktivierung des Enzyms Erg3. Erg3 ist eine Sterol $\Delta^{5,6}$ Desaturase, die in der Ergosterolbiosynthese normalerweise eine C-5(6) Doppelbindung in Episterol einbaut. Kommt es allerdings zu einer Hemmung von Erg11 durch Azole, wandelt Erg3 14 α -methylierte Vorläufer von Ergosterol, die akkumuliert werden, in ein giftiges Steroldiol um. Wird dieses Enzym inaktiviert, wird die Bildung dieser giftigen Sterole verhindert. Dies wurde in *C. albicans* und *C. tropicalis* beobachtet [121–124].

2. Aufnahme von Sterolen aus der Umgebung

C. glabrata kann Sterole aus der Umgebung aufnehmen und diese für Membranen nutzen. Dies ist möglich sowohl neben der Ergosterolbiosynthese, als auch wenn diese geblockt wird [125–127].

Nakayama *et al.* 2007 identifizierten den Transporter Aus1p, der für die Aufnahme von Sterolen unter Azol-Stress zuständig ist [128].

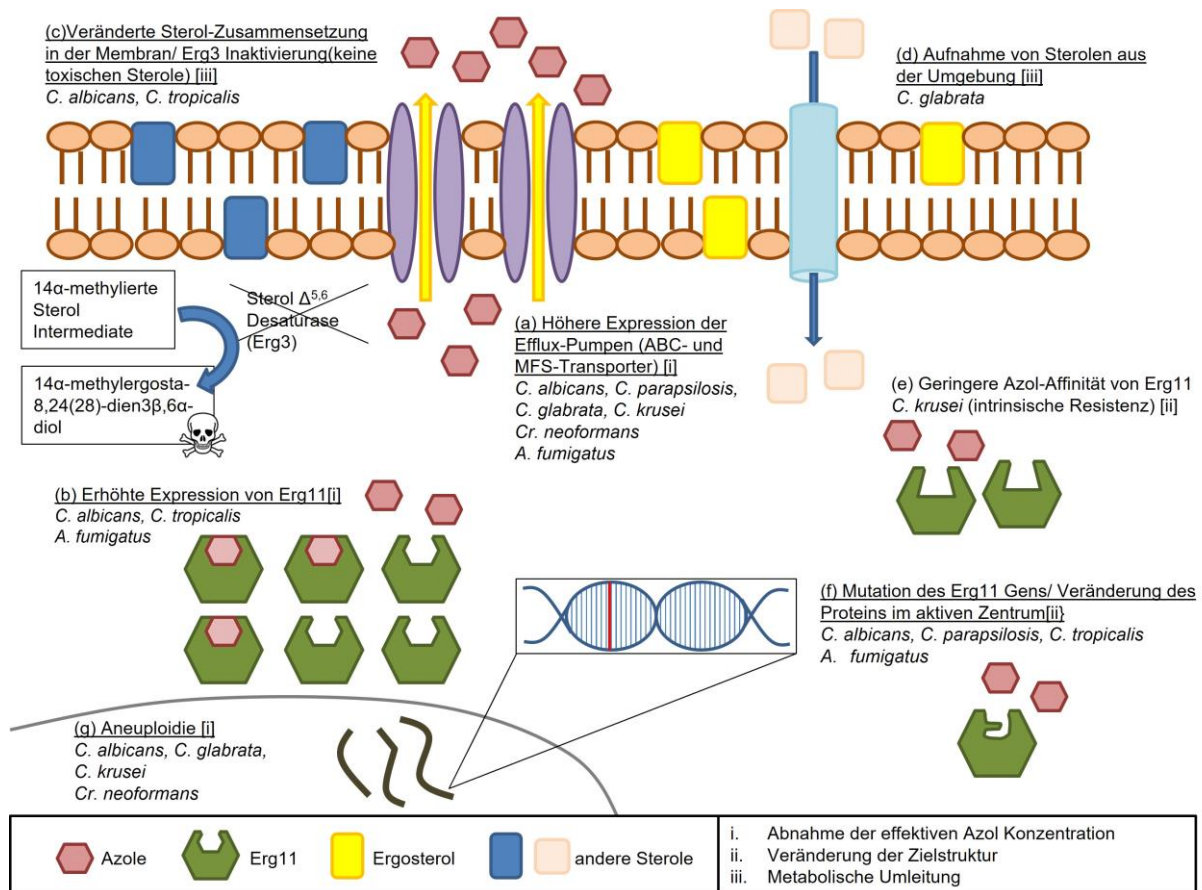


Abbildung 7: Dokumentierte Azolresistenzmechanismen in *Candida* Spezies, *A. fumigatus* und *Cr. neoformans*.

(a) Durch die erhöhte Produktion von Effluxpumpen (ABC- und MFS/MDR-Transporter) kann mehr Azol aus der Zelle gepumpt werden. (b) Die erhöhte Produktion von Erg11 Proteinen führt zu einer höheren benötigten Azoldosis für die Hemmung der Ergosterolbiosynthese. (c) Mutationen im ERG3 Gen führen zu einer Veränderung des Proteins, sodass es inaktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer anderen Sterol-Zusammensetzung in der Membran und toxische Sterole können nicht mehr produziert werden. (d) Die Aufnahme von Sterolen aus der Umgebung umgeht die Inhibition der eigenen Sterol-Produktion. (e) Vererbte geringere Affinität der Azole zu bestimmten Erg11 Proteinen bestimmter Spezies verringert die Wirkung der Azole (intrinsische Resistenz) (f) Mutationen im ERG11 Gen können durch die Veränderung bestimmter Aminosäuren die Affinität der Azole zum Protein verringern. (g) Aneuploidie und Hyperaktivierung des Transkriptionsfaktors TAC1 kann in *C. albicans* zur erhöhten Expression von Effluxpumpen führen. Alle beschriebenen Resistenzmechanismen können in drei Gruppen eingeteilt werden (i) Abnahme der effektiven Azol-Konzentration, (ii) Veränderung der Zielstruktur und (iii) metabolische Umleitung. Zu welcher Gruppe der jeweilige Resistenzmechanismus gehört ist in eckigen Klammern gekennzeichnet. Abbildung basierend auf Sanglard *et al.* 2016 und Whaley *et al.* 2017 [96,104].

1.2.6 Mitochondrielle Dysfunktion als Auslöser von Resistenzen

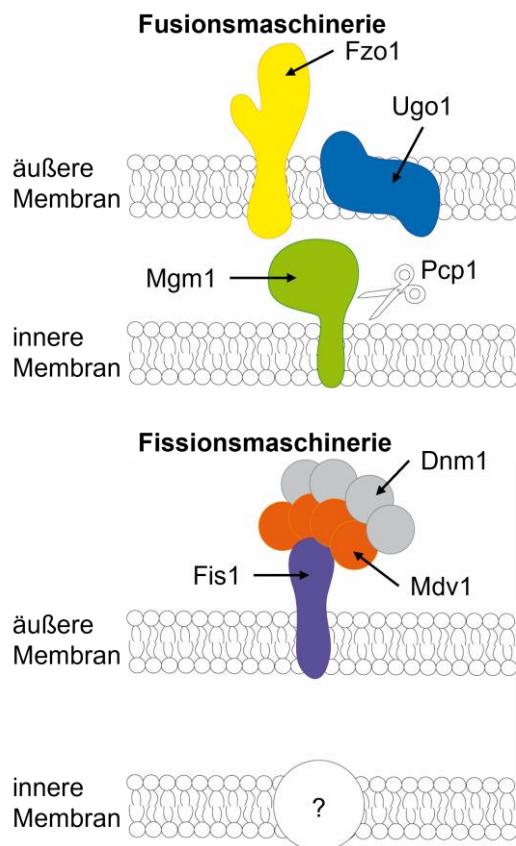


Abbildung 8: Fusions- und Fissions-Komplexe in Hefe.

Die Fusionsmaschinerie der Mitochondrien besteht aus Fzo1, Ugo1, Mgm1 und Pcp1. Die Fissionsmaschinerie aus Dnm1, Mdv1 und Fis1. Abbildung basierend auf Westermann *et al.* 2010 [130].

Drei Proteine bilden das Kernstück der Fusionsmaschinerie der Mitochondrien. Diese sind Fzo1 (GTPase), Ugo1 in der äußeren Membran und Mgm1, das mit der inneren Membran assoziiert ist (siehe Abb. 8) [131]. Die Fissionsmaschinerie wird gebildet durch Dnm1, Mdv1 und Fis1. Auch hier muss es ein Protein geben, das wie Mgm1, mit der inneren Membran verbunden ist. Dieses wurde bis jetzt noch nicht entdeckt. Wird eines der Proteine der Fusionsmaschinerie in *A. fumigatus* deletiert, so verliert die Zelle ihre mtDNA und stirbt. Wird ein Protein der Fissionsmaschinerie deletiert, überlebt der Pilz, zeigt allerdings verlangsamtes Wachstum, verringerte Sporulation, Hitzeempfindlichkeit und eine abweichende mitochondrielle Morphologie. Werden beide Vorgänge gestoppt, wächst der Pilz nur minimal langsamer als der Wildtyp [129].

In der Arbeit von Neubauer *et al.* 2015 wurde beschrieben, dass *A. fumigatus* durch die Inhibierung der Fusion und Fission der Mitochondrien resistenter gegenüber Azolen wird [129].

Mitochondrien gehören neben dem Zellkern, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat zu den Zellorganellen einer eukaryotischen Zelle. Die Zellorganellen haben gemeinsam, dass sie durch eine Zellmembran von Rest des Zytosols abgegrenzt sind und eine spezielle Funktion in der Zelle ausführen.

Mitochondrien sind semi-autonome Organellen, da sie eigene DNA, eine Proteinsynthese Maschinerie und eine doppelte Membran besitzen. Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist die Versorgung der Zelle mit Energie, die durch die Atmungskette gewonnen wird.

Alle Mitochondrien einer Zelle bilden ein gemeinsames tubuläres Netzwerk, mit dem sich einzelne Mitochondrien durch Fusion verbinden und über Fission abspalten.

Diese Prozesse sind nicht nur wichtig für die Verteilung von Mitochondrien in der Zelle, sondern auch für die Funktion der Mitochondrien (Verteilung der mitochondrialen DNA), Apoptose und das Altern der Zelle [130].

1.2.6.1 Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren mit mitochondrialer Dysfunktion/ retrograde Kontrolle von PDR5

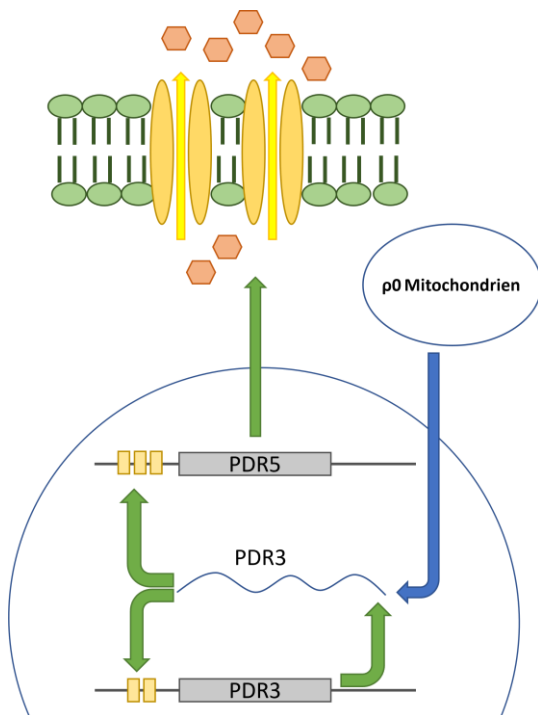


Abbildung 9: Retrograder Signalweg zur Aktivierung von PDR5 durch ρ^0 Mitochondrien.

Ein unbekanntes Signal aus den Mitochondrien, die ihre mtDNA verloren haben, wirkt auf das post-translationale PDR3 und aktiviert dieses. Das aktivierte Protein bindet an die zwei PDREs in seinem Promotor und reguliert so seine eigene Expression hoch. Es wirkt außerdem auf den Promotor von PDR5, sodass dessen Expression ebenfalls hochreguliert wird. Abbildung basierend auf Moye-Rowley *et al.* 2005 [145].

Bereits in den 70er Jahren wurden *S. cerevisiae* Mutanten isoliert, die gegen eine große Anzahl an Antimykotika resistent waren. Es wurde festgestellt, dass Pdr1 (Engl. für *pleiotropic drug resistance*), ein Transkriptionsfaktor mit einer Cys₆Zn₂-Domäne, für die multiple Resistenz verantwortlich war [132–134]. Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert den ATP-bindenden Transporter (Englisch *ATP-binding cassette*, Abk. ABC) Pdr5. Bei Mutation von *PDR1* wird *PDR5* überexprimiert [135]. In weiteren Studien wurde der Transkriptionsfaktor Pdr3 identifiziert, der in seiner DNA-Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu *PDR1* aufweist und bei Mutation ebenfalls eine Multiresistenz auslöst [136]. Für beide Transkriptionsfaktoren wurde festgestellt, dass durch einzelne Punktmutationen in deren DNA-Sequenzen eine Hyperaktivierung stattfindet. Diese Entdeckung führte zu dem Schluss, dass sie normalerweise reprimiert vorliegen und durch die Mutationen konstitutionell aktiviert werden (siehe Abb. 9) [137–139]. Bei der Untersuchung dieser Hypothese wurden zwei Gene entdeckt, bei deren Deletion *PDR5* hochreguliert wird. Diese Gene waren *FZO1* und *OXA1* [140]. Fzo1 ist wie oben

beschrieben, ein Protein, das an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist. Wird dieses Gen deletiert, verlieren Hefen ihre mitochondrielle DNA und können so keine Zellatmung mehr durchführen [141,142]. Oxa1 ist eine Insertase, die sowohl mitochondrielle Proteine als auch nukleäre Proteine aus der Matrix in die innere Membran der Mitochondrien einbaut [143]. Sie ist unter anderem wichtig für den Zusammenbau des Cytochrom C Komplexes und des Fo ATPase Subkomplexes [144]. Mutanten, in denen *oxa1* deletiert wurde, können ebenfalls keine Zellatmung mehr durchführen [145]. Bei weiteren Studien wurde beobachtet, dass durch die Deletion von *PDR3* in Zellen, die kein mitochondrielles Genom tragen (ρ^0), die höhere Expression von *PDR5* vollständig geblockt wurde. Dies war nicht der Fall bei der Deletion von *PDR1* [146]. Im Promotor des *PDR3* Gens wurden zusätzlich zwei autoregulatorische Elemente gefunden (Englisch *Pdr1/Pdr3 response element*, Abk. PDRE), an die Pdr3 selbst bindet und so seine Expression hochregulieren kann [136]. Diese Autoregulation wird benötigt für die Aktivierung von *PDR3* in ρ^0 Zellen [140]. Zhang *et al.* 2001 zeigten, dass nur ρ^0 Mutanten, denen die Fo ATPase-Subkomplex Funktion fehlt, *PDR3* und damit *PDR5* hochregulieren [147].

Im Gegensatz zu der Funktion der Pdr Proteine für die pleiotropische Resistenz, ist ihre eigentliche metabolische Funktion weitgehend unbekannt. Es wird spekuliert, dass sie eine Rolle in der Sphingolipidbiosynthese spielen [145,148].

1.2.7 Entwicklung neuer Antimykotika

Für die Entwicklung neuer Antimykotika wird nach Zielstrukturen innerhalb der Pilzzelle gesucht, die sich in ihrem Aufbau von denen einer menschlichen Zelle unterscheiden. Nur wenn die Strukturen in beiden Zell-Typen unterschiedlich genug sind, kann es gelingen, eine Substanz zu finden, die nur die Pilzzelle angreift. Eine solche Struktur könnte, die „*ER-mitochondria encounter structure*“ kurz ERMES sein.

1.2.7.1 Die ER-mitochondria encounter structure

Mitochondrien sind hoch komplexe Organellen. Sie sind ständig in Bewegung, verschmelzen miteinander und trennen sich wieder. Gleichzeitig werden lädierte Mitochondrien durch Mitophagie aus der Zelle entfernt. All diese Prozesse dienen dazu, die Funktion der Mitochondrien und damit die Energieproduktion für die Zelle aufrecht zu erhalten und zu optimieren. Die Kommunikation zwischen Organellen ist ein wichtiges Merkmal aller eukaryontischen Zellen. So werden die genannten Prozesse durch Verbindungen der Mitochondrien mit anderen Zellorganellen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), den Peroxisomen oder der Zellwand, stark beeinflusst [149]. Die Verbindung zwischen ER und Mitochondrium wird ERMES genannt (Englisch *ER-mitochondria encounter structure*, Abk. ERMES).

Kornmann et. al. 2009 suchten in *S. cerevisiae* nach den Komponenten, die an den Verbindungen zwischen Mitochondrien und ER beteiligt sind, und entdeckten dabei die vier Proteine des ERMES. Diese sind Mmm1, Mdm10, Mdm12 und Mdm34 (siehe Abb. 10) [150–155].

Eine Vielzahl von Studien beschrieben die Aufgaben des ERMES, dazu gehören u.a. Lipid Transport, Protein Import, mitochondrielle Dynamik und Vererbung und Mitophagie (siehe Tab. 6).

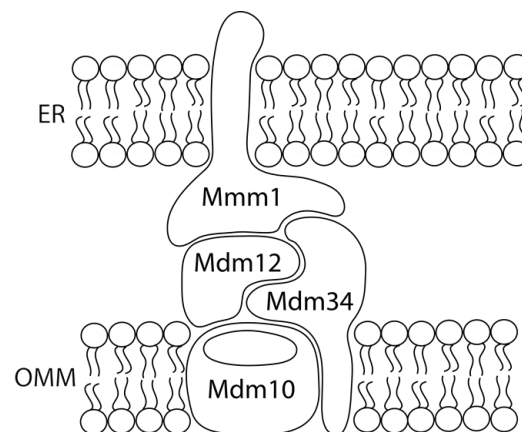


Abbildung 10: Ein Modell des ERMES basierend auf Daten aus *S. cerevisiae* und *N. crassa*.

Der ERMES ist eine Verbindung zwischen der ER-Membran und der äußeren Membran von Mitochondrien (Englisch *outer mitochondrial membrane*, Abk. OMM). Sie besteht aus den vier Proteinen Mmm1, Mdm10, Mdm12 und Mdm34. Mmm1 ist ein integrales ER-Membran Protein, Mdm10 ist ein β -Barrel Protein der äußeren mitochondrialen Membran und zusätzlich Teil des SAM-Komplexes (Englisch *Sorting and Assembly Machinery*). Mdm34 ist wie Mdm10 ein integrales Protein der äußeren mitochondrialen Membran und Mdm12 ist ein zytosolisches Protein. Abbildung basierend auf Lang et al. 2015 [156].

Tabelle 6: Zusammenfassung möglicher Aufgaben des ERMES und Indizien dafür.

Aufgabe	Indizien
Lipid Transport	<ul style="list-style-type: none"> ER und Mitochondrien bilden beide Glycerophospholipide, dafür muss Phosphatidylserin vom ER ins Mitochondrium transportiert werden. Es gibt keinen Vesikeltransport zum Mitochondrium [157]. Alle 4 ERMES Untereinheiten zeigten eine starke Korrelation mit Psd1 in einer epistatischen Miniarray-Profil. Psd1 ist eine Phosphatidylserin (PS)-Decarboxylase, die an der Biosynthese von Aminoglycerophospholipiden beteiligt ist [150]. Drei der vier ERMES Untereinheiten Mmm1, Mdm12 und Mdm34 besitzen eine SMP-Domäne (Engl. <i>synaptotagmin-like, mitochondrial and lipid-binding proteins</i>), die Lipide binden soll [158].
Protein Import	<ul style="list-style-type: none"> Mdm10, ein β-Barrel Protein, interagiert nicht nur mit dem ERMES sondern auch mit dem SAM-Komplex (Engl. <i>Sorting and Assembly Machinery</i>), der benötigt wird um β-Barrel Proteine in die äußere Membran von Mitochondrien einzubauen [159].
mitochondrielle Dynamik und Vererbung	<ul style="list-style-type: none"> Alle vier Proteine wurden entdeckt durch das Untersuchen der mitochondrialen Dynamik. Dies zeigen ihre Namen „Mdm“ in Mdm10, 12 und 34 steht für „<i>mitochondria distribution and morphology</i>“ und „Mmm“ in Mmm1 steht für „<i>mitochondria morphology maintenance</i>“. Durch die Zerstörung des ERMES formen sich „Ball“-ähnliche aufgeblasene Mitochondrien [153]. Die mitochondrielle Vererbung in Tochterzellen ist durch die veränderte Form der Mitochondrien gestört [160,161]. Durch den Verlust des ERMES, ist die Verteilung und Vererbung der mitochondrialen DNA gestört [161]. Der ERMES verbindet räumlich sich teilende Nukleole [155,162]. Der ERMES und die ERMES assoziierte Rho-GTPase Gem1 spielen im Prozess der mitochondrialen Teilung eine Rolle (Engl. <i>ER-associated mitochondrial division</i>, Abk. ERMD). Bei der Teilung von Mitochondrien wird der Ort der Teilung durch ER-Ausläufer umschlungen, so die Abschnürung erleichtert und die mtDNA an den Ort der Teilung gekoppelt [161,163].
Mitophagie	<ul style="list-style-type: none"> Die Proteine des ERMES scheinen mit Atg8 zu co-lokalisieren. Atg8 bindet an die Membran des Mitophagosoms während dessen Biogenese [164]. Der ERMES bildet Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien an denen die Mitophagosom-Bildung beginnt [164].

1.2.7.2 Der ERMES als Zielstruktur für Antimykotika

Zusätzlich zu seinen vielfältigen Aufgaben innerhalb der Zelle, stellt der ERMES ein mögliches Ziel für Antimykotika dar. Dies beruht auf der Tatsache, dass der ERMES in Pilzen eine konservierte Struktur darstellt, aber in den bisher untersuchten Metazoen nicht vorkommt [16]. Eine Studie von Widemann *et al.* 2013 zeigte, dass weder Mmm1 noch Mdm10, Mdm12 oder Mdm4 (Mmm2 in dieser Studie) in den hier untersuchten Vertretern der Metazoen vorhanden sind.

Alle untersuchten Vertreter der Pilze außer *Nosema ceranae* und *Encephalitozoon cuniculi* wiesen die vier ERMES Komponenten auf. Zu diesen gehörten u.a. auch *C. albicans*, *Cr. neoformans* und *A. fumigatus*, die zu den Hauptauslösern von invasiven Pilzinfektionen gehören [1].

2. Zielsetzung der Arbeit

2.1 Charakterisierung der *ER-mitochondria-encounter structure* und Validierung als mögliche Zielstruktur für Antimykotika

Der ERMES ist eine Verbindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien. Es ist eine Struktur, die bis jetzt nur in Pilzen nachgewiesen wurde [16]. Durch diese Einzigartigkeit stellt der ERMES prinzipiell einen guten Angriffspunkt für Medikamente dar. Ziel dieser Arbeit war es den ERMES in *A. fumigatus* zu charakterisieren. Hierfür wurden die Phänotypen von Mutanten, denen die ERMES Untereinheiten fehlen, untersucht. Daraus können dann Rückschlüsse gezogen werden, ob sich diese Struktur als Ziel für Antimykotika eignet.

2.2 Analyse der Wirkung von Azolen auf *A. fumigatus* und mögliche Resistenzmechanismen

Azole sind die erste Wahl bei der Behandlung und Prävention von Mykosen. Es ist bekannt, dass diese Gruppe von Antimykotika die Ergosterolbiosynthese durch die Inaktivierung der Lanosterol-14 α Demethylase hemmt. Die Vorgänge auf zellulärer Ebene, die diesem Mangel folgen und die daraus resultierenden, fatalen Konsequenzen für den Pilz sind weitgehend unbeschrieben. Durch die Untersuchung dieser Vorgänge soll die Wirkung der Azole besser verstanden werden. Dies könnte zusätzlich Rückschlüsse zulassen auf die Bildung von Resistenzmechanismen. Des Weiteren wurde nach der Verbindung von erhöhter Resistenz gegenüber Azolen und mitochondrialen Mutationen gesucht.

3. Material und Methoden

3.1 Pilzstämme

Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten *A. fumigatus* Stämme findet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Verwende *A. fumigatus* Stämme in dieser Arbeit.

Pilzstämme	relevante genetische – Veränderung	Ausgangsstamm	Referenz
<i>A. fumigatus</i> D141	Wildtyp	-	[165]
<i>A. fumigatus</i> Δ akuA (AfS35)	akuA::loxP	D141	[165,166]
<i>A. fumigatus</i> fks1 _{tetOn}	^P fks1::ptrA- ^P oliC-tetOn	AfS35 (wt)	[167]
<i>A. fumigatus</i> Δ rho4	rho4::loxP-hygro ^R /tk	AfS35 (wt)	[168]
<i>A. fumigatus</i> Δ rho4 Rho4	pSK379-rho4(p)-rho4	Δ rho4	[168]
<i>A. fumigatus</i> sGFP	pJW103	AfS35 (wt)	[167]
<i>A. fumigatus</i> wsc1-GFP	pJW103-gpdA(p)-wsc1-sGFP	D141	[167]
<i>A. fumigatus</i> midA-GFP	pJW103-gpdA(p)-midA-sGFP	D141	
<i>A. fumigatus</i> mitoGFP	pCH005	AfS35 (wt)	[129]
<i>A. fumigatus</i> Δ dnm1 mgm1 _{tetOn2}	^P mgm1::ptrA- ^P pkiA-tetOn	Δ dnm1	[129]
<i>A. fumigatus</i> mgm1 _{tetOn} Δ dnm1 mitoGFP	pCH005	Δ dnm1 mgm1 _{tetOn2}	
<i>A. fumigatus</i> cyp51A _{tetOn}	^P cyp51A::ptrA- ^P pkiA-tetOn	AfS35 (wt)	diese Arbeit [169]
<i>A. fumigatus</i> cyp51A _{tetOn} Δ cyp51B	cyp51B::loxP-hygro ^R /tk	cyp51A _{tetOn}	
<i>A. fumigatus</i> cyp51A _{tetOn} Δ cyp51B mitoGFP	pCH005	cyp51A _{tetOn} Δ cyp51B	
<i>A. fumigatus</i> cyp51A _{tetOn} Δ cyp51B mitoRFP	pYZ012	cyp51A _{tetOn} Δ cyp51B	
<i>A. fumigatus</i> agsA-Luciferase	pBG005-phleo	AfS35 (wt)	
<i>A. fumigatus</i> Δ rho4 sGFP	pJW103	Δ rho4	[168]
<i>A. fumigatus</i> Δ rho4 Rho4 sGFP	pJW103	Δ rho4 Rho4	[168]
<i>A. fumigatus</i> mmm1 _{tetOn}	^P mmm1::ptrA- ^P pkiA-tetOn	AfS35 (wt)	diese Arbeit [170]
<i>A. fumigatus</i> mdm10 _{tetOn}	^P mdm10::ptrA- ^P pkiA-tetOn	AfS35 (wt)	
<i>A. fumigatus</i> mdm12 _{tetOn}	^P mdm12::ptrA- ^P pkiA-tetOn	AfS35 (wt)	
<i>A. fumigatus</i> mdm34 _{tetOn}	^P mdm34::ptrA- ^P pkiA-tetOn	AfS35 (wt)	
<i>A. fumigatus</i> Δ mdm10	mdm10::loxP-pyr ^R /tk	AfS35 (wt)	diese Arbeit [170]
<i>A. fumigatus</i> Δ mdm12	mdm12::loxP-pyr ^R /tk	AfS35 (wt)	
<i>A. fumigatus</i> mmm1 _{tetOn} mitoGFP	pCH005	mmm1 _{tetOn}	
<i>A. fumigatus</i> mdm10 _{tetOn} mitoGFP	pCH005	mdm10 _{tetOn}	
<i>A. fumigatus</i> mdm12 _{tetOn} mitoGFP	pCH005	mdm12 _{tetOn}	
<i>A. fumigatus</i> mdm34 _{tetOn} mitoGFP	pCH005	mdm34 _{tetOn}	
<i>A. fumigatus</i> wsc1-GFP mtRFP	pYZ012	<i>A. fumigatus</i> wsc1-GFP	

3.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

A. fumigatus Afs35 DNA wurde als Template verwendet.

Plasmid	Grundgerüst/ Modifikation	Herkunft
psK379	pSK379_ptrA gpdA(p) PmeI his2A(t)	S. Krappmann, Würzburg
psK379-phleo	pSK379_phleo gpdA(p) PmeI his2A(t)	J. Wagener, München
pJW603	pBluKSP-surA::hygro(-260)/tk	J. Wagener, München
pJW103	pSK379 gpdA(p) PmeI sGFP (3) EcoRV his2A(t)_sequenced	J. Wagener, München
pCH005	pCH005 phleo gpdA(p) Mito-sGFP his2A(t)	C. Helmschrott, München
pYZ002	pYZ002 (pBluKSP-och1::Sfil-ptrA-AnigPkiA(p)-AvrII-rtTA-TcgrA-tetO7-Pmin-Sfil)	Z. Zhu, München
pYZ011	pYZ011 ptrA Abf2_with_Promotor [AFUA_1g10040] sGFP (3) EcoRV his2A(t)	Z. Zhu, München
pYZ012	pYZ012 phleo gpdA(p) Mito-mRFP1 his2A(t)	Z. Zhu, München
pBG001	pBG001 (pJW655 - pSK379_phleo gpdA(p) Mmm1 AFUA_6g04420 mRFP1 his2A(t))	diese Arbeit
pBG002	pBG002 (pSK379 akuA_with_pro AFUA_5g07740 his2A(t))	
pBG002-phleo	pBG002-phleo (pSK379 akuA_with_pro AFUA_5g07740 his2A(t))	
pNB04	Anig_agsA(p) mluc	K. van den Hondel, Leiden
pBN008	Anig_agsA(p) mluc	K. van den Hondel, Leiden
pBG005	pBG005 (pSK379 Anig_agsA(p) PmeI mluc his2A(t))	K. Dichtl, München
pBG005-phleo	pBG005-phleo (pSK379 Anig_agsA(p) PmeI mluc his2A(t))	K. Dichtl, München
pSK528	pSK528 Sfil - hygro six site - BLASTER - Sfil - AmpR	S. Krappmann, Würzburg
pSK529	pSK529 - hygro six site - BLASTER Topo KanR	S. Krappmann, Würzburg

3.3 Oligonuklotide

Oligonukleotide wurden von der Firma GATC bezogen. Die Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert. Primerdesign, Spezifität und Amplikonlänge wurden mit der CLC DNA Workbench Software bestimmt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind grün und rot markiert.

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'	Restriktionsenzym	G/C-Gehalt Anlagerungstemperatur	verwendete Polymerase
Mdm10-5g13460-5-fwd	CTGGCTCGATCGTGTGGC	-	18/12 - 61°C	Taq
Mdm10-5g13460-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TGTCATGAT-GTCTCAAATCAGTTC	Sfil	25/9 - 58°C	
Mdm10-5g13460-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC GGCCT-GAACTCCACCAGC	Sfil	18/12 - 61°C	Pfu
Mdm10-5g13460-3rev	GACACAGCGAGCGTCGTG	-	18/12 - 61°C	
Mdm12-1g14790-5-fwd	GCTCGCTGTTGAGTGCCTTG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm12-1g14790-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TACATGTGCGAC-CAAGGACG	Sfil	20/11 - 59°C	

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'	Restriktionsenzym	G/C-Gehalt Anlagerungs- temperatur	verwendete Poly- merase
Mdm12-1g14790-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC CTAT- GTGGCTGGTCCGTG	Sfil	18/11 - 58°C	Pfu
Mdm12-1g14790-3rev	GTCAACCGCGTCTATCGC	-	18/11 - 58°C	
Mmm1-6g04420-5fwd	TT GCGGCCGC GTCATCGGCATTTCCG- TATCC	NotI	21/11-60°C	Taq
Mmm1-6g04420-5rev	CG GGCCATCTAGGCC CTGTTGTAGATGT- TATCCGGTGC	Sfil	23/11-61°C	
PMmm1-6g04420-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGTCTTCTCA- GCTAAGTGCG	Sfil	21/10-58°C	Pfu
PMmm1-6g04420-3rev	TT GCGGCCGC AATTGAG- GAGCAGCTGCGTC	NotI	20/11-59°C	
Mdm10-5g13460-5-fwd	CTGGCTCGATCGTGTGGC	-	18/12 - 61°C	Taq
Mdm10-5g13460-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TGTCATGAT- GTCTCAAATCAGTTC	Sfil	25/9 - 58°C	
Mdm10-5g13460-3-fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGCTTGACTTCA- TGGACTACATCC	Sfil	25/11 - 61°C	Pfu
Mdm10-5g13460-3-rev	GAGGTTGTGGTTGTGCTAGATGC	-	23/12 - 62°C	
Mdm12-1g14790-5-fwd	GCTCGCTGTTGAGTGCCCTTG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm12-1g14790-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TACATGTGCGAC- CAAGGACG	Sfil	20/11 - 59°C	
Mdm12-1g14790-3-fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGTCCATAG- ACGTCAAATGGAG	Sfil	23/11 - 61°C	Pfu
Mdm12-1g14790-3-rev	GGTGATGCCTGTGACATTCAG	-	21/11 - 60°C	
Mdm34-4g09960-5-fwd	GCCAGAGGATGGAAGCACAG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm34-4g09960-5-ref	CG GGCCATCTAGGCC AGCAAAGCATT- GAGTGAAGATGG	Sfil	23/10 - 59°C	
Mdm34-4g09960-3-fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGGCGTTCA- ACTTCAAATGGTC	Sfil	23/11 - 61°C	Pfu
Mdm34-4g09960-3-rev	GATAATGTCCGTTGAGAGTCCG	-	22/11 - 60°C	

3.4 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).

3.5 Antibiotika und Antimykotika

Die Antibiotika wurden in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst, steril filtriert (0,22 µm) und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Zusätzliche Informationen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Antibiotika und Antimykotika.

Antibiotika/ Antimykotika	Hersteller	Lösungs- mittel	Konzentration Stammlösung	finale Konzentration im Medium/ Agarplatten, falls nicht anders angegeben	
				<i>E. coli</i>	<i>A. fumi- gatus</i>
Ampicillin		ddH ₂ O	100 mg ml ⁻¹	100 µg ml ⁻¹	-
Doxyzyklin	Clontech; Mountain View, CA, USA	Ethanol	10 mg ml ⁻¹	-	10 µg ml ⁻¹
Pyriithiamin hydrobromide	Santa Cruz; Dallas, TX, USA	ddH ₂ O	1 mg ml ⁻¹	-	0,1 µg ml ⁻¹
Hygromycin	PAA Laboratories, Pa- sching, Österreich	ddH ₂ O	20 mg ml ⁻¹	-	200 µg ml ⁻¹
Casposfungin	Sigma-Aldrich	ddH ₂ O	4 mg ml ⁻¹	-	4 µg ml ⁻¹

3.6 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Digitalkamera	Canon, EOS 550D
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
Probenkammern	Ibidi 8-well
Schüttelinkubator	Brunswick Scientific, Series 25
Sterilbank Heraeus	Hera Safe
Thermomixer	Eppendorf
Vortexer	Scientific Instruments
Zentrifuge	Sigma Laboratory, 6K15, Eppendorf, 5417R
NanoDrop Spectrophotometer	ND-1000 UV Nanodrop Technologies
CLARIOstar Plus	BMG LABTECH

3.7 Medien und Wachstumsbedingungen (Zellanzucht)

3.7.1 *A. fumigatus*

3.7.1.1 Medien

Aspergillus Minimal Flüssigmedium (Abk. AMM), 2-fach konzentriert

Salzmischung ohne MgSO ₄ (20-fach konzentriert)	50 mL
0,4 M MgSO ₄ Lösung (200-fach konzentriert)	5 mL
Glucose 40% (w/v)	25 mL
Spurenelemente-Stammlösung	1 mL
destilliertes H ₂ O	auffüllen auf 1000 mL

Alle Zutaten außer den Spurelementen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert und dann steril zusammengefügt. Der pH-Wert von AMM liegt bei ca. 6,6 und muss daher nicht mehr angepasst werden. Das Medium wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für AMM Agar Platten wurde 2-fach AMM ohne Glucose mit erwärmtem 2xAMM Agar (2 % (w/v) Glucose, 4% (w/v) Bacto-Agar) im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die obengenannten Bestandteile des AMM wurden wie folgt hergestellt:

Salzmischung ohne MgSO₄ (20-fach konzentriert):

1,4 M NaNO ₃	120 g
0,14 M KCl	10,4 g
0,12 M KH ₂ PO ₄	16,3 g
0,12 M K ₂ HPO ₄	20,9 g
H ₂ O	auffüllen auf 1000 mL

Die oben genannten Salze wurden in einem Liter ddH₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

0,4M MgSO₄ Lösung (200-fach konzentriert):

MgSO ₄ x 7H ₂ O	10,4 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 100 mL

Die angegebene Menge an Magnesiumsulfat wurde in 80 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend auf 100 mL aufgefüllt. Dann wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

40% Glucose (w/v):

C ₆ H ₁₂ O ₆	200 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 500 mL

Die angegebene Menge Glucose wurde eingewogen, mit destilliertem Wasser auf 500mL aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Die komplette Menge Glucose löst sich meist erst beim Autoklavieren. Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Spurenelemente-Stammlösung (1000-fach konzentriert):

Die Spurenelemente-Stammlösung wurde nach dem Protokoll von Hill *et al.* 2001 wie folgt hergestellt [171]. Hierfür wurden die folgenden Salze in angegebener Reihenfolge in 80 mL destilliertem Wasser gelöst (Lösung 1):

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1,0 g
EDTA	10,0 g

Danach wurde der pH-Wert mit KOH-Pellets eingestellt. Die Lösung nahm bei einem pH-Wert von ca. 5,5 eine gold-gelbe Färbung an und wurde dann zur Weiterverarbeitung genutzt.

Ebenso wurden die folgenden Salze in angegebener Reihenfolge in 80 mL destilliertem Wasser gelöst (Lösung 2):

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,4 g
H ₃ BO ₃	2,2 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,0 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,326 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,32 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,22 g

Lösung 1 und 2 wurden dann vereint und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Er wurde erst durch KOH-Pellets verändert und dann durch eine KOH-Lösung mit niedrigerer Konzentration. Danach wurde die Lösung auf 200 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Anschließend wurden 1 mL Aliquots in 1,5 mL Eppendorf-Gefäßen hergestellt und bei -4 °C aufbewahrt.

Sabouraud-Medium (Abk. SAB)

2% Pepton-Lösung (w/v) pH 7.0	50 mL
40% Glucose (w/v)	10 mL
ddH ₂ O	auffüllen auf 100 mL

Für Sabouraud-Medium wurden die oben genannten Lösungen steril zusammengefügt und die Lösung anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für Sabouraud Agar Platten wurde 2 % Pepton (w/v) mit erwärmtem 2x Sabouraud-Agar (8 % (w/v) Glucose, 4 % (w/v) Bacto-Agar) im Verhältnis 1:1 gemischt.

2% Pepton-Lösung (w/v)

Pepton	10 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 500 mL

Die oben angegebene Menge Pepton wurde eingewogen und anschließend auf ca. 400 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit KOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung auf 500mL aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde die Pepton-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.1.2 Anzucht und Ernte von Sporen

Pilzsporen wurden gelöst in sterilem ddH₂O bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Anzucht neuer Sporen wurden sterile Zellkulturflaschen verwendet (75 cm²). Diese wurden mit 50 mL AMM Agar gefüllt und anschließend wurden zur Verteilung der Sporen sterile Glasperlen (d = 4 mm) hinzugegeben.

Bei Stämmen mit z.B. GFP-Plasmiden oder konditionellen Promotoren wurde dem AMM Agar ein Antimykotikum oder Doxyzyklin hinzugefügt.

Zur Anzucht neuer Sporen wurden zwei verschiedene Ansätze genutzt. Entweder die Sporen wurden direkt aus einem Sporenstock verwendet oder sie wurden von einem Klon auf einer Ausstrichplatte gepickt. Aus der Sporensuspension wurden 30 µL in die Zellkulturflasche überführt. Die Sporen wurden dann durch das Bewegen der Glasperlen auf dem Agar verteilt. Die Sporen der Ausstrichplatte wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse in sterilem ddH₂O gelöst, die Sporensuspension anschließend in die Zellkulturflasche gegeben und ebenfalls durch das Bewegen der Glasperlen verteilt.

Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert, abhängig vom jeweiligen Stamm. Während dieser Zeit bildete sich ein sporulierendes Myzel, von dem die neuen Sporen geerntet werden konnten.

Für die Ernte wurden ca. 10 mL steriles ddH₂O in die Zellkulturflasche gegeben. Durch Schwenken der Flasche lösten sich die Glasperlen und mit ihnen die gebildeten Sporen, kleine Agarstückchen und Myzel. Um die Agarstückchen, das Myzel und die Glasperlen aus der Sporenlösung zu entfernen, wurde die Lösung über einen sterilen Miracloth-Filter in ein Falcon filtriert. Die Filter bestanden aus einem Trichter, der mit Miracloth-Papier ausgelegt war und vor der Benutzung autoklaviert wurde.

Die so gewonnene Sporenlösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei dieser Lagerung sind die Sporen über einen sehr langen Zeitraum haltbar. Die Nutzung der gewonnenen Sporen für Experimente wurde auf ca. 2 Wochen beschränkt, da danach ein Einfluss der Lagerung auf das Auskeimen und das Überleben der Sporen nicht ausgeschlossen werden konnte.

3.2.1.3 Anzucht und Ernte von Pilzmyzel

Für die Anzucht von Pilzmyzel wurden Sporen aus einer Sporensuspension in Flüssigmedium gegeben und anschließend aerob bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit, abhängig von der weiteren Nutzung (z.B. Transformation, Extraktion chromosomaler DNA, Extraktion RNA), wurde das Myzel abgeerntet. Für die Ernte wurde das gesamte Flüssigmedium mit dem darin befindlichen Myzel über Miracloth-Filter filtriert und das Myzel vom Filterpapier in neue Probengefäße überführt.

3.2.1.4 Bestimmung der Sporenzahl

Die Sporenzahl einer Suspension wurde mit Hilfe ihrer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) ermittelt. Das Messgerät wurde mit ddH₂O geeicht und anschließend je nach Trübung der Sporenlösung eine 1:10 oder 1:20 Verdünnung erstellt und die OD dieser Verdünnung gemessen. Der gemessene OD-Wert sollte sich zwischen 0,2 und 0,4 befinden, da nur hier ein linearer Messbereich anzunehmen ist (Diese Erkenntnis stammt aus Arbeitsgruppen-internen Vorversuchen, in denen die hier angewandte OD-Messmethode mit der klassischen Zytometer-Methode korreliert wurde). Falls der Wert außerhalb

dieses Bereichs war, musste gegebenenfalls eine niedrigere oder höhere Verdünnung hergestellt werden. Die Sporenzahl wurde dann mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konidienzahl pro ml} = \text{gemessene OD}_{600} \times \text{Verdünnung} \times 2,24 \times 10^7$$

3.2.1.5 Erstellung einer Verdünnungsreihe

Um in einem Experiment eine genau definierte Anzahl von Sporen einsetzen zu können, wurden Verdünnungsreihen der Sporensuspensionen hergestellt. Die niedrigste gewählte Verdünnung war 5×10^7 . Von dieser Verdünnung wurden 1:10 Verdünnungen bis 5×10^3 hergestellt.

Die 5×10^7 Verdünnung wurde aus dem Sporenstock hergestellt. Hierzu wurde berechnet wieviel der Sporensuspension mit ddH₂O verdünnt werden muss, um auf 1 mL eine Lösung mit 5×10^7 Sporen ml⁻¹ zu erhalten:

$$x \text{ } \mu\text{L des Sporenstocks} = \frac{1000 \text{ } \mu\text{l} \times 5 \times 10^7}{\text{Konzentration der Stammlösung (n} \times 5 \times 10^7)}$$

Anschließend wurde die hergestellte Verdünnung überprüft, indem erneut die OD₆₀₀ bestimmt wurde. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung der 5×10^7 Sporenlösung hergestellt. Die OD dieser Verdünnung sollte 0,21 betragen (Diese Erkenntnis stammt aus Arbeitsgruppen-internen Vorversuchen, in denen die hier angewandte OD-Messmethode mit der klassischen Zytometer-Methode korreliert wurde). Falls dies nicht der Fall war, wurde die 5×10^7 Lösung nochmals mit ddH₂O verdünnt oder die Sporenzahl durch Zugabe aus dem Sporenstock erhöht. Dies wurde wiederholt, bis die OD₆₀₀ von 0,21 erreicht war.

3.7.2 *Escherichia coli* (Abk. *E. coli*)

3.7.2.1 Medien

LB-Medium (Englisch für *Lysogeny Broth* oder *Luria Broth*)

1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v) und 1 % NaCl (w/v) wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Für LB-Agar wurde der Lösung 2 % Bacto-Agar (w/v) (214030; BD) vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Für die Selektierung von transformierten *E. coli* wurde dem LB-Agar vor dem Gießen Ampicillin (Stock 100mg mL⁻¹) in einer Endkonzentration von 100 µg mL⁻¹ hinzugefügt.

SOB (Super Optimal Broth)-Medium

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl wurden in 950 mL destilliertem Wasser gelöst und dann 10 mL 250 mM KCl hinzugefügt. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt, die Lösung auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Vor der Benutzung wurden 5 mL steriles 2 M MgCl₂ pro Liter hinzugefügt.

3.6.2.2 Anzucht und Ernte

Für die Anzucht von *E. coli* wurde die gewünschte Menge LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und gegebenenfalls mit Ampicillin auf eine Endkonzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ versetzt. Dann wurden die Bakterien mittels einer sterilen Pipettenspitze oder einer abgeflamnten Impföse hinzugefügt. Anschließend wurde der Erlenmeyerkolben bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien z.B. für die Plasmid Isolation geerntet.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus *A. fumigatus* erfolgte mit Hilfe des MasterPure™ Yeast DNA Purification Kits (Epicentre Biotechnologies, Madison USA).

Hierzu wurde entweder wie oben beschrieben *A. fumigatus* in Flüssigmedium angezogen oder direkt von der Platte gepickt mit Hilfe einer sterilen Impföse.

Das Myzel wurde in ein steriles 2 mL Sammelgefäß mit Schraubverschluss gegeben, indem sich bereits $250 \mu\text{L}$ Lyse-Lösung, eine Holzkugel und Quarzsand befanden. Anschließend wurde das Sammelgefäß für 40 s bei 6000 rpm gevortext und dann 30 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Danach wurde $125 \mu\text{L}$ Protein Präzipitationslösung hinzugefügt und die Röhren 10 min bei $10\,000 \text{ rpm}$ zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein $1,5 \text{ mL}$ Eppendorfgefäß überführt und die DNA mittels $500 \mu\text{L}$ 99% Isopropanols gefällt. Die gefällte DNA wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $15\,000 \text{ rpm}$ 15 min lang abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, ohne das DNA-Pellet zu beschädigen und danach $500 \mu\text{L}$ 70% Ethanol hinzugefügt. Danach wurde erneut 15 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $15\,000 \text{ rpm}$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in $100 \mu\text{L}$ ddH_2O gelöst, das mit RNase versetzt war. Die gelöste DNA wurde eingefroren aufbewahrt.

3.8.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines NanoDrop bestimmt. Dazu wurde die DNA gegen eine Leerprobe mit ddH_2O gemessen. Um die Reinheit der DNA festzustellen, wurde das Verhältnis der ermittelten OD bei 260 nm und 280 nm betrachtet. Ein Verhältnis von 260 nm zu 280 nm von $1,8$ bis $2,0$ zeigte eine proteinfreie DNA-Probe.

3.8.3 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die Polymerasekettenreaktion (Abk. PCR) benutzt. Die Primer, kurze Oligonukleotide die am Start und komplementär am Ende des zu amplifizierenden Bereichs binden, wurden bei der Firma Metabion (München) bestellt.

Als Template bzw. Startmaterial wurde genomische DNA von *A. fumigatus* AfS35 verwendet. Für die Amplifikation wurde die *Taq*-Polymerase oder die *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität und damit eine *proof reading*-Funktion. Die *Taq*-Polymerase besitzt diese Aktivität nicht, deshalb beträgt die Fehlerrate dieser Polymerase ca. 8×10^{-6} pro Basenpaar [172]. Aus diesem Grund wurde die *Pfu*-Polymerase für DNA-Fragmente eingesetzt, die für Klonierungen benutzt wurden. Die *Taq*-Polymerase wurde für Kontroll-PCRs oder nicht kodierende Genbereiche verwendet.

PCR-Zusammensetzung *Taq*-Polymerase

Komponente	50 μ L Ansatz	finale Konzentration
10 x Dream Taq Puffer	5 μ L	1 x
10 mM dNTPs	1 μ L	200 μ M
10 μ M Primer vorwärts	0,5 μ L	0,2 μ M
10 μ M Primer rückwärts	0,5 μ L	0,2 μ M
genomische DNA	1 μ L	variabel (< 1 ng)
Taq-Polymerase	0,25 μ L	1.25 units/ 50 μ L Ansatz
ddH ₂ O	41,75 μ L	-

PCR-Zusammensetzung *Pfu*-Polymerase

Komponente	50 μ L Ansatz	finale Konzentration
10xPfu Polymerase Puffer mit MgSO ₄	5 μ L	1 x
10 mM dNTPs	1 μ L	200 μ M
10 μ M Primer vorwärts	0,5 μ L	0,2 μ M
10 μ M Primer rückwärts	0,5 μ L	0,2 μ M
genomische DNA	1 μ L	variabel (< 0,5 μ g)
Pfu-Polymerase (2-3u/ μ L)	0,7 μ L	1,4-2,1 units/ 50 μ L Ansatz
ddH ₂ O	41,3 μ L	-

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
(1) Initial Denaturierung	95 °C	2 min
(2) Denaturierung	95 °C	30 s
(3) Anlagerung der Primer	abhängig von errechneten Schmelztemperatur der Primer ^(*)	30 s
(4) Verlängerung	72 °C	je nach Länge des PCR-Fragments ^(**)
(5) Finale Verlängerung	72 °C	ca. das Doppelte der Verlängerungszeit
(6) Abkühlung	4 °C	-

(*) Die Temperatur für die Anlagerung der Primer lag ca. 2-3 Grad unter der errechneten Schmelztemperatur.

(**) Die Verlängerungszeit orientierte sich an der Länge des gewünschten PCR-Fragments. Die *Taq*-Polymerase amplifiziert in der Minute 1000 bp, die *Pfu*-Polymerase amplifiziert in der Minute 500 bp.

3.8.4 PCR-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurden das Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) und das PrepEase™ Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB-Corporation, Cleveland, USA) verwendet. Beide wurden nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die Aufreinigung wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Kontrolle amplifizierter DNA-Fragmente fand über Agarose-Gelelektrophorese statt.

Die Gelelektrophorese ist das Standardlaborverfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe. Die elektrophoretische Auftrennung folgt dem Prinzip, dass die negativ geladene DNA durch das Anlegen eines elektrischen Feldes durch eine Agarosegel-Matrix in Richtung einer positiven Elektrode wandert. Die kleineren DNA-Fragmente wandern schneller und damit weiter durch die Agarosegel-Matrix als größere Fragmente. Durch das Laufen eines DNA-Fragments mit einem Größenstandard (einer Sammlung von DNA-Fragmenten mit bekannter Länge) auf einem Agarosegel, kann so dessen ungefähre Größe bestimmt werden.

Für die Agarosegel wurde 1 % Agarose (w/v) in TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst und aufgekocht. Die warme Gelmasse wurde in einen mit einem Kamm vorbereiteten Träger gegossen, sodass während des Aushärtens Taschen für die DNA-Proben entstehen. Der Träger mit dem ausgehärteten Agarosegel wurde in eine Kammer gefüllt mit 1xTAE-Puffer gegeben. Der Kamm wurde entfernt und die zuvor mit Ladepuffer gemischte DNA in die Taschen gegeben. Zusätzlich wurde in eine Tasche ein 1 kB-Größenstandard geladen. Anschließend wurde eine Spannung von 100 bis 120 V angelegt.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kammer und dem Schlitten entnommen und in einem Ethidiumbromid-Bad für ca. 20 min gefärbt. Das gefärbte Gel wurde anschließend kurz in 1xTAE Puffer gewaschen und dann mittels eines Geldokumentationsgerätes ausgewertet. Das

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und erhöht so die Emission der DNA. Diese wird mittels UV-Licht (240 nm) angeregt und kann so aufgenommen werden.

50xfach konzentrierter TAE-Puffer

Für den Puffer wurden 242 g TRIS (2 M) eingewogen, 100 mL 0,5 M EDTA-Lösung (pH=8,0) und 57,1 mL Essigsäure (100 %) hinzugefügt. Anschließend wurde alles auf 1 L mit ddH₂O aufgefüllt.

6xfach konzentrierter Ladepuffer für DNA-Elektrophorese

Der Ladepuffer wurde hergestellt aus 30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau und 1x TAE-Puffer [173].

3.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die mittels Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden im Agarosegel konnten auch, falls gewünscht, aus dem Gel ausgeschnitten werden und anschließend mit dem Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) oder dem PrepEase™ Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB-Corporation, Cleveland, USA) extrahiert werden. Beide wurden nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt.

3.8.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden *DH5α E. coli* aus dem -80 °C Stock auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 mL SOB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 mL SOB-Medium mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur und 180 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte (ca. 4 h). Dann wurde die Kultur in 50 mL Falcons überführt und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 2500 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, jedes Pellet in 10 mL TB-Puffer resuspendiert und wieder 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2500 x g und 4 °C für 15 min erneut abzentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden 18,6 mL kalter TB-Puffer mit 1,4 mL DMSO (7 %) gemischt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 5 mL des kalten TB-DMSO Puffers resuspendiert. Die Suspension wurde erneut 10 min auf Eis inkubiert, dann in 200 µL Aliquotes in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die aliquotierten kompetenten Zellen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

1 L TB-Puffer

TB-Puffer wurde jedes Mal frisch zubereitet, wenn erneut kompetente Zellen hergestellt wurden.

10 mM PIPES Na-Salz	3,35 g
15mM CaCl ₂	2,2 g
250mM KCl	18,64 g
55mM MnCl ₂	10,9 g

PIPES, CaCl₂ und KCl wurden in ca. 800 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH auf 6,7 eingestellt. Danach wurde das MnCl₂ hinzugefügt und das Volumen mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert und im Kühlschrank kühl gestellt.

3.8.8 Transformation in *E. coli*

Chemisch kompetente *DH5α E. coli* Bakterien wurden dazu genutzt, Plasmide zu vervielfältigen. Dazu wurden die *E. coli* Zellen auf Eis von -80 °C aufgetaut und anschließend Plasmid DNA (1 µL) oder ein Ligationsansatz (10 µL) hinzugegeben. Anschließend wurden sie 30 min auf Eis inkubiert und dann erfolgte für 90 s der Hitzeschock bei 42 °C. Dann wurden sie für 2 min auf Eis gekühlt, 1 mL LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm wachsen gelassen. Die gewachsenen *E. coli* wurden 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Dann wurde ca. 800 µL Überstand abgenommen und die Bakterien in den restlichen 400 µL resuspendiert.

Anschließend wurden sie, falls eine Ligation transformiert wurde, auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert oder in 60 mL LB-Medium mit Ampicillin gegeben, falls ein Plasmid transformiert wurde.

3.8.9 Plasmid Isolation

3.8.9.1 Miniprep

Für die Überprüfung von Plasmid Klonierungen wurde aus den Transformanten DNA isoliert. Für die Isolation von geringen Plasmid DNA Mengen (ca. 1-7 µg) wurde das PureYield™ MiniPrep Kit (Promega, Madison, USA) genutzt.

Jeder Klon der Transformationsplatte wurde zum einen auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin ausgestrichen und zum anderen 3 mL LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin mit ihm angeimpft. Die LB_{AMP}-Agarplatte wurde bei 37 °C und das LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die LB_{Amp}-Agarplatte aus dem Inkubator entnommen und weiter im Kühlschrank aufbewahrt, um das weitere Wachstum der Bakterien zu stoppen. Aus den in 10 mL Falcons angezogenen Bakterienkulturen wurde mittels des PureYield™ Plasmid Miniprep Kits (Promega, Madison, USA) das Plasmid nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.8.9.2 Midiprep

Um größere Mengen bereits korrekt klonierter Plasmide zu erhalten, wurde das Plasmid erneut in kompetente *E. colis* transformiert (siehe 3.8.8 Transformation in *E. coli*) und anschließend 60 mL LB_{Amp}-Flüssigmedium mit den resuspendierten *E. coli* angeimpft. Am nächsten Morgen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep Kit nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.9 Herstellung von genetisch veränderten Pilzstämmen

In dieser Arbeit wurde der *A. fumigatus* Stamm AfS35 als Wildtyp verwendet. Dieser Stamm ist abgeleitet von dem Wildtypisolat D141, indem Krappmann *et al.* 2006 [166] das Gen *akuA* deletierten. *AkuA* bildet zusammen mit *AkuB* ein Heterodimer, das zuständig ist für „*non-homologous end-joining*“. Durch die Deletion dieses Komplexes, kann der AfS35 DNA nur noch über homologe Rekombination einbauen. Durch die Deletion der non-homologen Integration wird der prozentuale Anteil der Transformanten, mit korrekt integrierter Deletionskassette stark erhöht.

3.9.1 Klonierung der $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ Deletionsmutanten in *A. fumigatus*

In AfS35 wurden *mdm10* und *mdm12* mit Hilfe von Deletionskassetten über homologe Rekombination ausgeschaltet. Dafür wurden mit speziell designten Primern ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor dem Gen und ca. 1000 bp des 3'-UTR Bereichs nach dem Gen liegend aus dem *Aspergillus* Genom mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 11). Dafür wurde entweder die *Taq*-Polymerase oder falls ein anderes Gen in unmittelbarer Nähe lag die *Pfu*-Polymerase genutzt. Die Primer 5'-rückwärts und 3'-vorwärts hängten jeweils eine *SfiI*-Schnittstelle an die amplifizierten Fragmente, um die Fragmente später an die Resistenzkassette ligieren zu können (siehe Tab. 12).

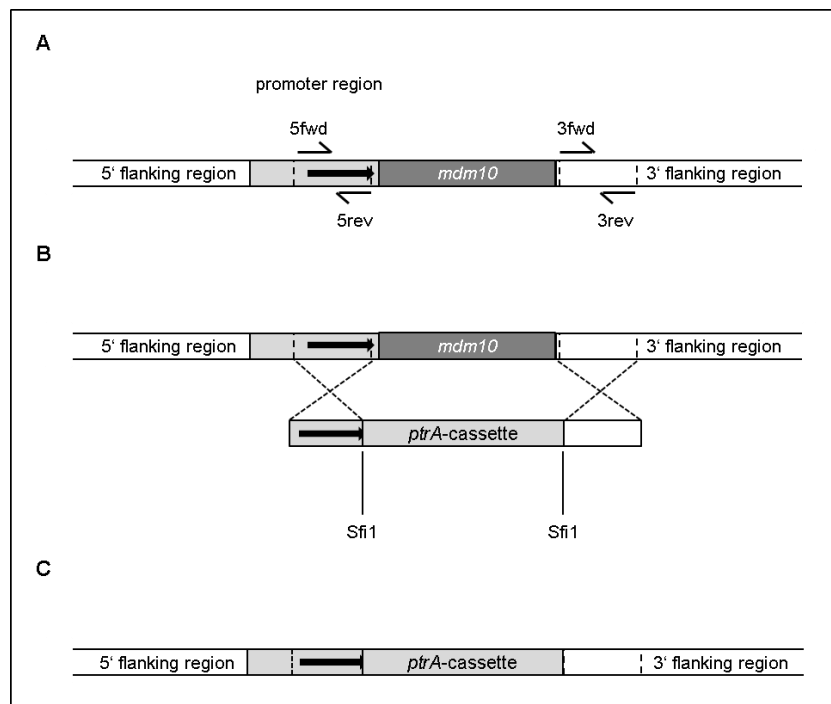


Abbildung 11: Konstruktion einer Deletionskassette am Beispiel des Gens *mdm10*.

(A) Es wurden mittels PCR und speziell designten Primern ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor dem Gen und ca. 1000 bp des 3'-UTR Bereichs nach dem Gen aus dem *A. fumigatus* Genom amplifiziert. (B) Durch die Primer wurde jeweils eine *SfiI*-Schnittstelle an die amplifizierten Fragmente gehängt. Diese wurden mit *SfiI* geschnitten und mittels Ligase an eine Resistenzkassette mit komplementären Schnittstellen ligiert. Die fertige Resistenzkassette wurde in *A. fumigatus* Wildtyp transformiert und integrierte dort durch homologe Rekombination in das Pilz-Genom. (C) Aussehen des neuen Gen-Lokus mit der integrierten *ptrA*-Kassette und dem fehlenden *mdm10*-Gen.

Tabelle 12: Verwendete Primer für die Amplifizierung der ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor *mdm10* und *mdm12* und ca. 1000 bp des 3'-UTR Bereichs nach *mdm10* und *mdm12* aus dem *A. fumigatus* Genom. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind grün und rot markiert.

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Restriktions-enzym	G/C-Gehalt Anlage- rungs-tem- peratur	verwendete Polymerase
Mdm10-5g13460-5-fwd	CTGGCTCGATCGTGTGGC	-	18/12 - 61°C	Taq
Mdm10-5g13460-5-rev	CG GCCATCTAGGCC TGTC AATGAT- GTCTCAAATCAGTTC	SfiI	25/9 - 58°C	
Mdm10-5g13460-3fwd	GT GGCC T G A G T GGCC GGCCT- GAACTCCACCAGC	SfiI	18/12 - 61°C	Pfu
Mdm10-5g13460-3rev	GACACAGCGAGCGTCGTG	-	18/12 - 61°C	
Mdm12-1g14790-5-fwd	GCTCGCTGTTGAGTGCCTTG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm12-1g14790-5-rev	CG GCCATCTAGGCC TACAT- GTGCGACCAAGGACG	SfiI	20/11 - 59°C	
Mdm12-1g14790-3fwd	GT GGCC T G A G T GGCC CTAT- GTGGCTGGTCCGTG	SfiI	18/11 - 58°C	Pfu
Mdm12-1g14790-3rev	GTCAACCGCGTCTATCGC	-	18/11 - 58°C	

Die PCRs wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Fragmentgröße überprüft, anschließend aufgereinigt und dann mit dem Enzym SfiI über Nacht bei 50 °C verdaut und wieder aufgereinigt. Gleichzeitig wurde der Vektor pSK379 mit SfiI über Nacht bei 50 °C verdaut, um die Pyrimidin-Resistenzkassette herauszuschneiden. Der Vektor-Verdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Auftrennung, die entsprechende Bande mit ca. 2000 bp aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Auch diese Aufreinigung wurde überprüft und die aufgereinigte Resistenzkassette an die geschnittenen PCR-Fragmente mittels T4-DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) nach Protokoll des Herstellers ligiert. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und am nächsten Tag mittels PrepEase™ Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB Corporation, Cleveland, USA) aufgereinigt. Die aufgereinigte Ligation wurde zur Transformation von *A. fumigatus* AfS35 genutzt.

3.9.2 Klonierung von konditionellen Mutanten in *A. fumigatus*

Für alle vier Gene der ERMES Komponenten (*mmm1*, *mdm10*, *mdm12* und *mdm34*) wurden konditionelle Mutanten hergestellt, bei denen der endogene Promotor durch einen Doxzyklin induzierbaren Promotor ersetzt wurde. Dafür wurden mit speziell designten Primern ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor dem Gen und ca. 1000 bp des Start-Bereichs beginnend mit ATG des Gens aus dem *A. fumigatus* Genom mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 12). Für den 5'-UTR Bereich wurde entweder die Taq-Polymerase oder falls ein anderes Gen in unmittelbarer Nähe lag die Pfu-Polymerase genutzt. Der Start des Gens wurde mit der Pfu-Polymerase amplifiziert, da es sich hier um kodierenden Bereich handelte. Die Primer 5'-rückwärts und 3'-vorwärts hängten jeweils eine SfiI- Schnittstelle an die amplifizierten Fragmente, um die Fragmente später an die Resistenzkassette ligieren zu können (siehe Tab. 13).

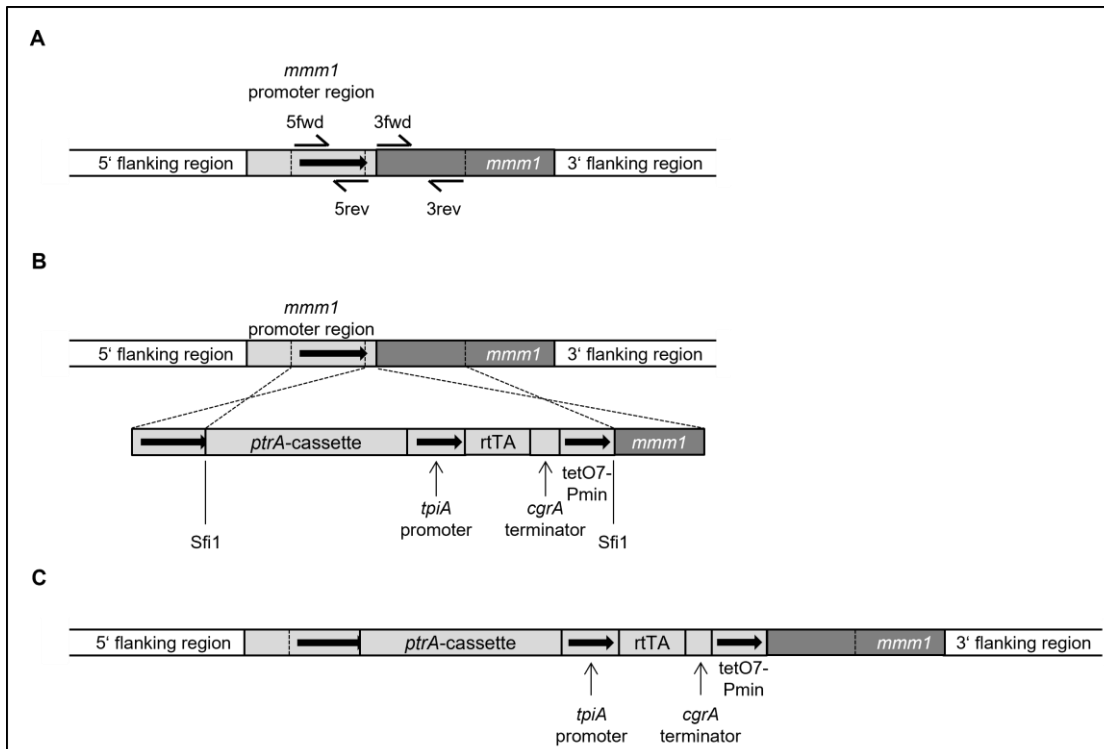


Abbildung 12: Konstruktion einer konditionalen Kasse am Beispiel des Gens *mmm1*.

(A) Es wurden mittels PCR und speziell designten Primern ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor dem Gen und ca. 1000 bp des Start-Bereichs des Gens beginnend mit ATG aus dem *A. fumigatus* Genom amplifiziert. (B) Durch die Primer wurde jeweils eine SfiI-Schnittstelle an die amplifizierten Fragmente gehängt. Diese wurden mit SfiI geschnitten und mittels Ligase an eine Resistenzkassette zusammen mit einem durch Doxizyclin induzierbaren Promotor ligiert. Es handelt sich hierbei um das Tet-On Expressionssystem aus dem Plasmid pCH008, das durch Helmschrott *et al.* generiert wurde [174]. Dieses besteht aus der Pyriithiamin Resistenzkassette (*ptrA* cassette), dem *tpiA* Promotor aus *A. nidulans* (*tpiA* cassette), dem reversen Tetrazyclin-Transaktivator *rtTA2S-M2* (*rtTA*), die terminierende Region von *cgrA* aus *A. fumigatus* (*cgrA* terminator) und dem chimären *pgpdA*-basierten *tetO⁷*-*P_{min}*-Promotor (*tetO7*-*P_{min}*). Die fertige Resistenzkassette wurde in *A. fumigatus* Wildtyp transformiert und integrierte dort durch homologe Rekombination in das Pilz-Genom. (C) Aussehen des neuen Gen-Lokus mit der integrierten *ptrA*-Kassette und dem durch Doxizyclin induzierbaren Promotor.

Tabelle 13: Verwendete Primer für die Amplifizierung der ca. 1000 bp des 5'-UTR Bereichs vor den Genen *mdm10*, *mdm12*, *mdm34* und *mmm1* und ca. 1000 bp des Start-Bereichs beginnend mit ATG des jeweiligen Gens aus dem *A. fumigatus* Genom. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind grün und rot markiert.

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Restriktions-enzym	G/C-Gehalt Anlagerungs-temperatur	verwendete Polymerase
Mmm1-6g04420-5fwd	TT GCGGCCGC GTCATCGGCATTT-CGGTATCC	NotI	21/11-60°C	Taq
Mmm1-6g04420-5rev	CG GGCCATCTAGGCC CTGTTGTAG-ATGTTATCCGGTGC	SfiI	23/11-61°C	
PMmm1-6g04420-3fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGTCTTCT-CAGCTAAGTGCC	SfiI	21/10-58°C	Pfu
PMmm1-6g04420-3rev	TT GCGGCCGC AATTGAG-GAGCAGCTGCGTC	NotI	20/11-59°C	
Mdm10-5g13460-5-fwd	CTGGCTCGATCGTGTGGC	-	18/12 - 61°C	Taq
Mdm10-5g13460-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TGCAAT-GATGTCTCAAATCAGTTC	SfiI	25/9 - 58°C	
Mdm10-5g13460-3-fwd	GT GGCCTGAGTGGCC ATGCTT-GACTTCATGGACTACATCC	SfiI	25/11 - 61°C	Pfu
Mdm10-5g13460-3-rev	GAGGTTGTGTTGTGCTAGATGC	-	23/12 - 62°C	
Mdm12-1g14790-5-fwd	GCTCGCTGTGAGTGCCTTG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm12-1g14790-5-rev	CG GGCCATCTAGGCC TACAT-GTGCGACCAAGGACG	SfiI	20/11 - 59°C	
Mdm12-1g14790-3-fwd	GT GGCCTGAGTGGCC AT-GTCCATAGACGTCAACTGGAG	SfiI	23/11 - 61°C	Pfu
Mdm12-1g14790-3-rev	GGTGATGCCTGTGACATTCAG	-	21/11 - 60°C	

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Restriktions-enzym	G/C-Gehalt Anlagerungs-temperatur	verwendete Polymerase
Mdm34-4g09960-5-fwd	GCCAGAGGATGGAAGCACAG	-	20/12 - 61°C	Taq
Mdm34-4g09960-5-ref	CG GGCC ^{AGT} AGGCC AGCAAAGCATTGAGTGAAGATGG	Sfi1	23/10 - 59°C	
Mdm34-4g09960-3-fwd	GT GGCC ^{TGAGT} GGCC ATGGCGTT- CAACTTCAACTGGTC	Sfi1	23/11 - 61°C	Pfu
Mdm34-4g09960-3-rev	GATAATGTCCGTTGAGAGTCCG	-	22/11 - 60°C	

Die PCRs wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Fragmentgröße überprüft, anschließend aufgereinigt und dann mit dem Enzym SfiI über Nacht bei 50 °C verdaut und wieder aufgereinigt. Gleichzeitig wurde der Vektor pYZ002 über Nacht mit ApaI bei 37 °C und dann für 5 h mit SfiI bei 50 °C verdaut, um das Tet-On Expressionssystem [174] herauszuschneiden. Der Vektor-Verdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Auftrennung, die entsprechende Bande mit ca. 4300 bp aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Auch diese Aufreinigung wurde überprüft und die aufgereinigte Resistenzkassette an die geschnittenen PCR-Fragmente mittels T4-DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) nach Protokoll des Herstellers ligiert. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und am nächsten Tag mittels PrepEase™ Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB Corporation, Cleveland, USA) aufgereinigt. Die aufgereinigte Ligation wurde zur Transformation von *A. fumigatus* AfS35 genutzt.

3.9.3 Transformation in *A. fumigatus*

Die Transformation von *A. fumigatus* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sven Krappmann (Universität Würzburg) durchgeführt, das auf dem Protokoll von Punt *et al.* 1987 [165] beruht.

Für die Transformation wurden 300 mL AMM mit 1 mL einer frischen, dichten Sporensuspension angeimpft und über Nacht (ca. 16 h) bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Dann wurde das Pilzmyzel über einen autoklavierten Filter, der mit Miracloth-Papier ausgelegt war, geerntet und anschließend mit Zitratpuffer drei Mal gewaschen. Das trockene Myzel wurde in einem 200 mL Erlenmeyerkolben mit 20 mL Enzymlösung überführt und anschließend bei 30 °C und 80 rpm für 45 min inkubiert. Danach wurden die Protoplasten über einen sterilen Miracloth-Filter in ein 50 mL Falcon geerntet und der Filter anschließend mit STC1700 (4 °C) gespült, bis das 50 mL Falcon gefüllt war. Die Protoplasten wurden ab diesem Zeitpunkt immer auf 4 °C gehalten. Die gewonnenen Protoplasten wurden bei 1500 x g und 4 °C für 12 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten mit 50 mL STC1700 gespült und erneut bei 1500 x g und 4 °C für 12 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten im restlichen STC1700 resuspendiert. Die resuspendierten Protoplasten wurden in ein oder mehrere vorbereitete 15 mL Falcons gegeben, die 30 µL Kassetten DNA oder Plasmid DNA enthielten. Diese wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 250 µL PEG4000-Mix hinzugefügt und die Falcons sanft geschüttelt. Anschließend wurde dieser Schritt wiederholt und als dritten Schritt 850 µL PEG4000-Mix hinzugefügt und erneut sanft geschüttelt. Die Falcons wurden dann für 20 min über Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie mit STC1700 aufgefüllt und die Protoplasten erneut bei 1500 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Protoplasten im restlichen STC1700 resuspendiert. Diese Suspension wurde mit

5 mL Softagar (ca. 50 °C) gemischt. Der Softagar mit den Protoplasten wurde anschließend auf einer Sorbitol-Agarplatte ausplattiert. Die Sorbitol-Agarplatten enthielten ein entsprechendes Antimykotikum zur Selektion der Transformanten. Die Transformationsplatten wurden bei 37 °C für ca. 3 Tage inkubiert bis kleine Kolonien auf der Platte sichtbar waren.

Die folgenden Puffer wurden für die Transformation genutzt und vorher angesetzt:

Zitratpuffer

150mM KCl	22,36 g
580mM NaCl	67,78 g
50mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2H ₂ O	29,4 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 2000 mL

Die Salze wurden in ca. 1500 mL ddH₂O gelöst, der pH mit HCl auf 5,5 eingestellt und anschließend mit ddH₂O auf 2000 mL aufgefüllt. Der Zitratpuffer wurde autoklaviert und danach bei Raumtemperatur aufbewahrt.

STC1700

1,2 M Sorbitol	218 g
10 mM TRIS pH 5,5	10 mL von 1 M TRIS pH 5,5 mit HCl
50 mM CaCl ₂	7,3 g
35 mM NaCl	2 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 1 L

Die Salze und die TRIS-Lösung wurden in ddH₂O gelöst, auf 1 L aufgefüllt und anschließend autoklaviert. STC1700 wurde nach dem Autoklavieren bei 4 °C aufbewahrt.

PEG4000-Mix

10 mM Tris pH 7,5	1 mL von 1 M TRIS pH 7,5 mit HCl
50 mM CaCl ₂	0,73 g
60 % (w/v) PEG4000	60 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 100 mL

Die Substanzen wurden in ddH₂O gelöst, auf 100 mL aufgefüllt und dann autoklaviert.

Enzymlösung

1 % (w/v) Vinotaste wurde in 20 mL Zitratpuffer gelöst und anschließend mit einem 0,22 µm Sterilfilter steril filtriert. Die Enzymlösung wurde für jede Transformation frisch hergestellt.

2x Sorbitol Agar

4 % (w/v) Bactoagar	20 g
2 % (w/v) D-Glukose	10 g
2,4 M Sorbitol	218,2 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 500 mL

Sorbitol, Bactoagar und D-Glukose wurden in ddH₂O gelöst, auf 500 mL aufgefüllt und autoklaviert. Um Agarplatten zu gießen, wurde der Agar aufgekocht und mit 2x AMM ohne Glukose 1:1 gemischt. Den Transformations-Platten wurde das entsprechende Antimykotikum bzw. 0,5 µg ml⁻¹ Doxyzyklin hinzugefügt.

2x Softagar

2 % (w/v) D-Glukose	5 g
0,7 % (w/v) Bactoagar	3,5 g
1,2 M Sorbitol	109 g
ddH ₂ O	auffüllen auf 250 mL

D-Glukose, Bactoagar und Sorbitol wurden in ddH₂O gelöst, auf 250 mL aufgefüllt und autoklaviert. Vor der Verwendung wurde der 2x Softagar aufgekocht und 1:1 mit 2x AMM ohne Glukose gemischt. Anschließend wurde er bei 50 °C bis zu seiner Verwendung warmgehalten.

3.10 Wachstumsversuche

3.10.1 Tüpfeltest

Ein Tüpfeltest dient dazu, das Wachstum bzw. die Empfindlichkeit gegenüber einem Wirkstoff von mehreren Klonen einer Mutante mit dem Wildtyp zu vergleichen. Je nach Anwendung wurde dafür AMM- oder SAB-Agarplatten verwendet und verschiedene Wirkstoffe hinzugegeben.

Für den Tüpfeltest wurde von jedem verwendeten Pilzstamm eine Verdünnungsreihe mit den Sporenkonzentrationen 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 und 5×10^3 hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden jeweils 3 µL auf einen vorgegebenen Punkt in horizontale Reihen in absteigender Sporenkonzentration getüpfelt. Danach wurden die Platten getrocknet und anschließend bei 37 °C inkubiert.

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Inkubator entnommen und das Wachstum der verschiedenen Stämme verglichen. Zur Dokumentation wurden die Agarplatten fotografiert.

3.10.2 Untersuchung des radialen Wachstums und von Wachstumsphänotypen

Für den Vergleich des radialen Wachstums und des Wachstumsphänotyps einer Mutante mit dem Wildtyp wurden jeweils 3 µL einer 5×10^7 Sporen-Suspension in die Mitte einer AMM- oder SAB-Agarplatte getropft. Die Platte wurde über einen bestimmten Zeitraum bei 37 °C inkubiert und anschließend das radiale Wachstum und das Aussehen der Kolonien verglichen.

3.11 Testung der minimale Hemmkonzentration gegenüber Antimykotika

Die minimale Hemmkonzentration (Abk. MHK) beschreibt die geringste Konzentration eines Antimykotikums, bei der Sporen von *A. fumigatus* nicht mehr auskeimen bzw. Hyphen, auf die das Antimykotikum gegeben wird, nicht mehr weiterwachsen. Dieser Wert wurde durch den Epsilon-Test und die Bestimmung der MHK mittels 96-well Platte bestimmt.

3.11.1 Epsilon-Test

Epsilon-Tests (Abk. E-Test) wurden durchgeführt mit Teststreifen der Firma bioMérieux (Marcyl'Etoile, Frankreich). Diese Teststreifen enthalten ein bestimmtes Antimykotikum in zunehmender Konzentration (siehe Abb. 13). Für die Untersuchung wurden sowohl AMM- als auch SAB-Agarplatten verwendet. Auf diesen Platten wurden 1×10^6 Sporen ausplattiert. Hierfür wurden 250 μL der 5×10^7 Sporen-Verdünnung mit 750 μL autoklaviertem Wasser gemischt und anschließend 800 μL auf die Platte gegeben. Durch das große Volumen ließen sich die Sporen leicht auf dem Agar verteilen. Anschließend wurde die Platte getrocknet und in trockenem Zustand der E-Test darauf gegeben. Die Platten wurden dann 48 h inkubiert, bis die MHK abzulesen war.

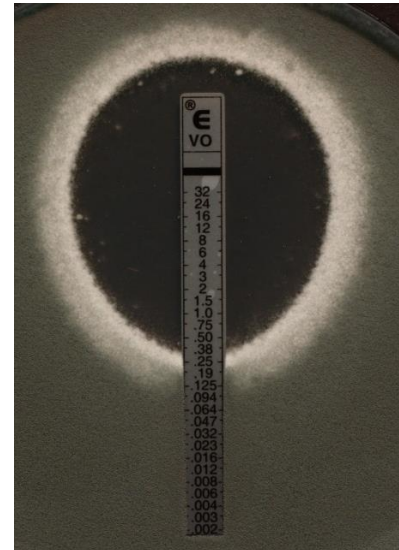


Abbildung 13: AMM-Agarplatte zur Bestimmung der MHK für Voriconazol mittels Teststreifen.

3.11.2 MHK-Testung mittels 96-well Platte

Die MHK von Wildtyp und Mutanten kann außer durch E-Tests auch durch das Behandeln von Sporen bzw. ausgekeimten Hyphen in einer 96-well Platte bestimmt werden. Dafür wählt man verschiedene, geeignete Konzentrationen des Antimykotikums aus und gibt diese zusammen mit Sporen oder auf ausgekeimte Hyphen in einer 96-well Platte. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C für 48 h inkubiert. Im Anschluss wurde abgelesen, bis zu welcher Konzentration die Pilze das well zuwuchsen.

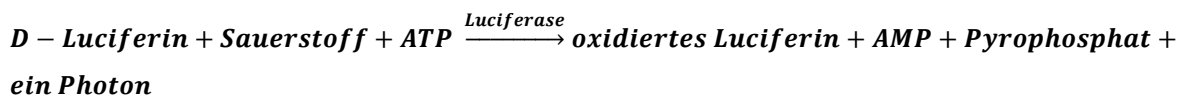
3.12 Testung der Bedeutung von Septen bei der Behandlung von *A. fumigatus* mit Azolen

Für diese Fragestellung wurde das Überleben von wt Hyphen, mit dem von $\Delta\rho\theta 4$ Hyphen und deren Komplementante $\Delta\rho\theta 4 + \rho\theta 4$ unter Azol-Stress verglichen. Jeweils 5000 Wildtyp, $\Delta\rho\theta 4$ und $\Delta\rho\theta 4 \rho\theta 4$ Sporen, die ein zytosolisches GFP exprimierten, wurden auf Deckgläschen in einer 24-well Platte für 11 h bei 37 °C in SAB ausgekeimt. Dann wurde dem Medium $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphen für weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden das komplette Medium abgenommen und die Hyphen mit Trypanblau gefärbt. Trypanblau kann durch seine negative Ladung nur in tote Zellen eindringen und in diesen die noch vorhandene GFP-Fluoreszenz quenchen. [175]. Es wurden ca. 100 Hyphen pro Stamm betrachtet. Dabei wurden die Hyphen mit mindestens einem lebendigen Kompartiment (partiell lebendig) und komplett intakten Hyphen anonymisiert ausgezählt.

Für die Aufnahme von Beispielbildern wurden Wildtyp Sporen, die ein zytosolisches GFP exprimierten, in 60 μ -Dish Schalen (Ibidi; Martinsried, Deutschland) für 11 h bei 37 °C in SAB ausgekeimt. Anschließend wurde 1,27 μ g ml⁻¹ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphen für weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde dem Medium Trypanblau zur Färbung hinzugefügt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Leica SP5-Mikroskop (Leica Microsystems; Mannheim, Deutschland) aufgenommen.

3.13 Luciferin-Assay zur Untersuchung der Aktivierung des Zellwandintegritätswegs

Der Luciferin-Assay wurde dazu verwendet, festzustellen, welche äußeren Einflüsse, wie z.B. Azole, den Zellwandintegritätsweg aktivieren. Dazu wurde der Stamm *A. fumigatus* agsA-Luciferase verwendet. Dieser trägt eine Glühwürmchen Luciferase unter der Kontrolle des *agsA* Promotors aus *A. nidulans*. Wird der Zellwandintegritätsweg aktiviert, wird die Luciferase produziert und kann ihr Substrat Luciferin umsetzen, wodurch messbare Lumineszenz entsteht:



Für die Untersuchung wurden 30 000 Sporen in 100 μ L AMM oder SAB in einer 96-well Polystyrol Mikrotiterplatte mit transparentem Boden (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) für 7 h ausgekeimt. Anschließend wurden 100 μ L desselben Mediums mit Voriconazol (Endkonzentrationen 0 μ g mL⁻¹, 3 μ g mL⁻¹, 2,25 μ g mL⁻¹, 1,69 μ g mL⁻¹, 1,27 μ g mL⁻¹, 0,95 μ g mL⁻¹, 0,71 μ g mL⁻¹, 0,53 μ g mL⁻¹, 0,4 μ g mL⁻¹, und 0,3 μ g mL⁻¹) und Luciferin (Endkonzentration 0,5 mM) hinzugeben. Nach der Zugabe wurde sofort die Messung im CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) gestartet und die Platte über 16 h gemessen. Beispielbilder der einzelnen Bedingungen wurden nach den 16 h Inkubationszeit mit einem Axiovert 25 Inversmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) und einer EOS 550D Digitalkamera (Canon, Tokyo, Japan) aufgenommen.

3.14 *Galleria mellonella* Infektionsversuch

Für die Untersuchung der Virulenz der ERMES Mutanten wurde das Tiermodell *Galleria mellonella* (Abk. *G. melonella*) verwendet. Die Larven zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, bei Temperaturen von 37 °C zu überleben, bei denen Virulenzfaktoren von Pilzen untersucht werden. Darüber hinaus wurden die Larven bereits als Modellorganismen für die Untersuchung der Virulenz von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen oder Protozoen validiert [176,177].

Für diesen Versuch wurden kommerziell für den Anglersport verwendete Larven der Gattung *Galleria mellonella* stets vom gleichen Händler und (lt. Händlerangabe) vom gleichen Zulieferer sowie frisch (< 24 h Lagerperiode beim Händler) bezogen. Die Maden wurden nach ihrem Gewicht in verschiedene Gruppen eingeteilt (< 0,2 g; 0,2 - 0,3 g; 0,3 - 0,4 g; 0,4 - 0,5 g und > 0,5 g). Nur Maden mit einem Gewicht von 0,2 g bis 0,5 g wurden für die Experimente verwendet. Für jeden zu untersuchenden Pilz bzw. Bedingung wurden 10 Larven verwendet. Die Larven der drei Gewichtsguppen wurden gleichmäßig auf die zu untersuchenden Pilze bzw. Bedingungen aufgeteilt.

Jede Larve wurden mit 5×10^5 Konidien in 10 μL ddH₂O infiziert. Als Kontrollen wurden ebenfalls je 10 Larven nicht behandelt, mit 10 μL ddH₂O oder mit 10 μL ddH₂O und 5 μg Doxyzyklin pro g Larve injiziert. Die Maden wurden dabei auf einer festen Unterlage mit den Fingern sanft fixiert und dann mit einer 24 Gauge Injektionskanüle in den linken hintersten Fußfortsatz beimpft.

Die Larven wurden im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Alle 8 h erfolgte eine Zählung abgestorbener Maden und ggf. die Entfernung dieser aus dem Versuch. Sich verpuppende Maden wurden zensiert und aus dem Pool entfernt. Die Darstellung erfolgte mittels einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Log-Rank (Mantel-Cox) Test.

3.15 Mikroskopie

3.15.1 Fixierung von Hyphen für die Mikroskopie

Sollten Hyphen fixiert werden, wurden die Sporen auf Coverslips inokuliert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Hyphen mit 3,7 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Dulbecco-Salzlösung 3 Minuten lang fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium mit oder ohne DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingefasst.

3.15.2 Calcofluorweiß-Färbung

Für die Färbung von Chitin wurde die Calcofluorweiß-Färbung verwendet. Calcofluorweiß (Abk. CFW) ist eine fluoreszierende Substanz oder optischer Aufheller. Dieser Farbstoff bindet an β -1,3- oder β -1,4-Polysaccharide, die zum Beispiel in Cellulose oder Chitin vorkommen. Bei Anregung mit UV-Strahlung, fluoresziert der Farbstoff in einer intensiven weiß/blauen Farbe (193).

Für die CFW-Färbung wurden fixierte Proben mit 10 mg ml⁻¹ CFW, gelöst in ddH₂O, für ca. 1 min gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingefasst.

3.15.3 Mikroskopie der ERMES Mutanten

3.15.3.1 Mikroskopische Analyse des Wachstums und der Hyphen Morphologie der ERMES Mutanten

Für die Untersuchung des Wachstums und der Morphologie in Flüssigmedium wurden 1 mL Medium (AMM oder SAB) mit 2500 Sporen oder 5000 Sporen angeimpft und für 18 h bis 72 h inkubiert. Wurden Mutanten mit einem Tet-On Expressionssystem untersucht, so wurden diese sowohl induziert (mit Doxyzyklin) als auch mit ausgeschaltetem Promotor untersucht.

Aufgrund der fehlenden Sporulation der Deletionsmutanten $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$, wurde für die Untersuchung des Wachstums im Flüssigmedium Sporen der heterokaryonten Stämme der Transformationsplatte verwendet. Mit diesen wurde AMM mit und ohne 0,1 μg mL⁻¹ Pyriithiamin angeimpft.

3.15.3.2 Life-Cell-Imaging der Mitochondrien Morphologie der ERMES Mutanten

Die Mitochondrienmorphologie der ERMES Mutanten wurden mit einem UltraView LCI Spinning Disc Konfokalsystem (Perkin-Elmer; Waltham, MA, USA) und einer Orca-Flash 4.0 Kamera (Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, Japan) an einem Eclipse TE300 Mikroskop (Nikon; Tokio, Japan), das mit einer temperaturgesteuerten Inkubationskammer ausgestattet war, aufgenommen.

Hierfür wurden 2500 Konidien in 300 μL AMM oder SAB sowohl mit 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxyzyklin als auch ohne Doxyzyklin in 15 μ -Slide eight-well Objektträgern (Ibidi; Martinsried, Deutschland) für 9 h bis 11 h bei 37 °C inokuliert. Anschließend wurden die gewachsenen Hyphen mikroskopiert.

3.15.3.3 Mikroskopie der Nukleoide der ERMES Mutanten

Sporen der konditionellen Mutante *mmm1_{tetOn}*, *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}* und *mdm34_{tetOn}*, die ein mtGFP exprimierten, wurden sowohl mit 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxyzyklin als auch ohne Doxyzyklin auf Coverslips in AMM inokuliert. Nach 11 h bei 37 °C wurden die Hyphen fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingefasst.

Anschließend wurden sie mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

3.15.4 Mikroskopie der Azol-Versuche

3.15.4.1 Life-Cell-Imaging der Azol-Versuche

Die Bilder und Videos der Azol-Versuche wurden mit einem konfokalen Leica SP5-Mikroskop (Leica Microsystems; Mannheim, Deutschland) aufgenommen, das mit einer temperaturgesteuerten Inkubationskammer ausgestattet war. Hierfür wurden Konidien in 15 μ -Slide eight-well Objektträger oder 60 μ -Dish Schalen (Ibidi; Martinsried, Deutschland) inokuliert.

6×10^4 Wildtyp-Sporen, die ein mtGFP exprimieren, wurden für 9 h bei 37 °C in SAB ausgekeimt. Nach 9 h wurde entweder 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oder 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol dem Medium hinzugefügt. Einzelne Hyphen wurden ca. alle 5 min über 13 h aufgenommen.

3.15.4.2 Analyse der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen über die Zeit

Für die Analyse der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen über die Zeit, wurden 10 000 wt Sporen in einer 24-well Platte auf Deckgläschen in SAB für 7 h ausgekeimt. Anschließend wurde dem Medium 0,53, 0,71, 1,27 oder 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt. Nach 2, 3 und 5 h Co-Inkubation wurden die Hyphen mit 3,7 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Dulbecco-Salzlösung 3 Minuten lang fixiert. Das Chitin wurden CFW-gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingefasst.

Die Anzahl der Hyphen mit Chitin-Ablagerungen wurde mit einem Leica DMLB Fluoreszenz-Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Pro Bedingung wurden in einem Experiment 100 Hyphen betrachtet. Hyphen mit einer einzelnen Ablagerung in der Hyphenspitze wurden nicht gezählt, da an dieser Stelle auch in unbehandelten Hyphen solche Ablagerungen gefunden werden können.

3.15.4.3 Untersuchung der Bildung von Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in Sporen

Wildtyp Konidien, die ein mtGFP exprimierten, wurden in einem 15 μ -Slide eight-well Objektträger (Ibidi; Martinsried, Deutschland) mit 300 μ L SAB und 1,27 μ g ml⁻¹ Voriconazol für 45 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sporen durch die Zugabe von 3,33 μ g ml⁻¹ CFW ins Medium gefärbt. Als Kontrolle wurden Sporen in SAB gegeben und direkt mit 3,33 μ g ml⁻¹ CFW-gefärbt. Die ruhenden Sporen wurden mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

3.15.4.4 Lokalisation der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen

A. fumigatus Sporen, die ein mtRFP und ein Wsc1-GFP exprimierten, wurden in einem 15 μ -Slide eight-well Objektträger (Ibidi; Martinsried, Deutschland) mit 3000 μ L SAB für 9 h bei 37 °C ausgekeimt. Anschließend wurde dem Medium 0,53 μ g ml⁻¹ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphen für weitere 4 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die lebenden Hyphen mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

3.15.4.5 Untersuchung der Wirkung von Caspofungin auf das Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen

Die Wirkung von Echinocandinen auf die Bildung der Zellwandkohlenhydrate aufgrund von Azolen wurde an *A. fumigatus* Hyphen untersucht. Hierfür wurden wt Konidien in einer 24-well Platte auf Deckgläschen in 1 mL SAB für 9 h bei 37 °C ausgekeimt. Anschließend wurde 1,27 μ g ml⁻¹ Voriconazol hinzugefügt. Nach weiteren 30 min bei 37 °C wurde dem Medium zusätzlich 4 μ g ml⁻¹ Caspofungin hinzugegeben. Eine Kontrolle ohne Caspofungin wurde mitgeführt.

Nach 4 h Co-Inkubation wurden die Hyphen fixiert und CFW-gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingefasst und mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

3.15.4.6 Vergleich der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen im Wildtyp und der *fks1_{tetOn}* Mutante

Sporen von *A. fumigatus*, die ein zytosolisches GFP exprimierten, wurden zusammen mit Sporen einer konditionelle β -1,3-Glukan Synthase Mutante (*fks1_{tetOn}*) unter reprimierten Bedingungen auf Deckgläschen in einer 24-well Platte in 1 mL SAB bei 37 °C ausgekeimt. Nach 8 h wurden das Medium abgenommen und mit SAB und 1,27 μ g ml⁻¹ Voriconazol ersetzt. Danach wurden die Hyphen für weitere 10 h inkubiert. Anschließend wurden die Hyphen fixiert und mit Anilinblau gefärbt.

Anilinblau ist ein Fluorochrome, das spezifisch an β -1,3-Glukan bindet und bei einer Anregung mit Licht zwischen ca. 360 bis 370 nm grün-gelblich fluoresziert (ca. 495 nm). Ist kein 1,3-Glukan in der Zellwand vorhanden, so fluoresziert diese unspezifisch bläulich (181,194).

Für die Anilinblaufärbung wurde die Färbelösung für jeden Versuch frisch zubereitet. Hierfür wurden 0,05 % (w/v) Anilinblau-Diammoniumsalz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Dulbeccos PBS gelöst und anschließend der pH-Wert auf 9,5 eingestellt. Die Proben wurden mit dieser Lösung 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der Färbelösung eingefasst und direkt analysiert. Hierfür wurde BX61-Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) und einem modifizierten U-MNUA2-Filterwürfel

(Extinktionsfilter, 360 bis 370 nm; dichromatischer Spiegel, 400 nm; Olympus, Tokio, Japan). Zu diesem Zweck wurde der Emissionsfilter des U-MNUA2-Würfels (420 bis 460 nm) durch den Emissionsfilter (510 bis 550 nm) des U-MWIBA-Würfels (Olympus, Tokio, Japan) ersetzt.

3.15.4.7 Untersuchung der Wirkung von Caspofungin auf die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen

Wt Sporen, die ein mtGFP exprimierten, wurden in 4 einer 8-well ibidi-Kammer (ibidi; Martinsried, Deutschland) für 9 h bei 37 °C ausgekeimt. Anschließend wurde 1,27 µg ml⁻¹ Voriconazol hinzugefügt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 37 °C, wurde in zwei wells zusätzlich 4 µg ml⁻¹ Caspofungin gegeben. Nach 5 h Co-Inkubation wurde für ein well mit Caspofungin und ein well ohne Caspofungin die Anzahl der lebenden und toten Hyphenkompartimente mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert. Die Bestimmung fand anhand ihrer mitochondrialen Morphologie und Bewegung statt. Für die beiden weiteren wells wurde diese Untersuchung nach 6 h Co-Inkubation durchgeführt.

3.15.4.8 Versuch zur Ursache der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen über die Zeit

Um die Ursache der Kohlenhydratablagerungen zu untersuchen, wurden 3000 Sporen der *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B* Mutante, die ein mtGFP exprimierten, in einem 15µ-Slide eight-well Objektträger (ibidi; Martinsried, Deutschland) mit 3000 µL SAB und 15 µg ml⁻¹ Doxyzyklin für 11 h ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium komplett abgenommen, verworfen und durch SAB ohne Doxyzyklin ersetzt. Darauf folgend wurde mittels einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) die Morphologie der Mitochondrien über die Zeit beobachtet.

3.15.4.9 Mikroskopie, um die Ursache der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen zu untersuchen

Wt Sporen und *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B* Sporen, die ein mtGFP exprimierten, wurden in 1 mL SAB und 15 µg ml⁻¹ Doxyzyklin für 9 h bei 37 °C auf Deckgläschen in einer 24 well Platte ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, verworfen und durch SAB ohne Doxyzyklin ersetzt (Lanosterol 14α-Demethylase Mangel in *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B*). Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Hyphen fixiert, CFW-gefärbt und mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

3.10 Bioinformatische Methoden

3.10.1 Datenbanksuche, Sequenzanalysen und DNA-Alignment

Die folgenden Datenbanken und Genom-Zusammenstellungen wurden verwendet, um Protein- und DNA-Sequenzen für die jeweiligen Arten zu erhalten.

S. cerevisiae: Yeast Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>), S288C (13.01.2015);

A. fumigatus: Aspergillus Genome Database (<http://aspgd.org>), Af293 (20.08.2015);

Aspergillus nidulans: Aspergillus Genome Database (<http://aspgd.org>), FGSC A4 (20.08.2015);

Candida albicans: Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>), SC5314 (assembly 22);

Neurospora crassa (<http://www.broadinstitute.org>) OR74A (Version 7).

Für die Identifizierung von Proteinen wurde Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) unter Verwendung der Standardparameter eingesetzt.

Für DNA-Alignments und die Suche nach homologen Genen und Proteinen wurden die Programme BLASTN und BLASTP des National Center for Biotechnology Information (Rockville Pike, USA) genutzt.

3.10.2 Primerdesign

Für das Herstellen von Mutanten in *A. fumigatus*, das Verifizieren dieser Mutanten, und das Klonieren von Vektoren wurden Primer benötigt. Diese wurden mit Hilfe der Datenbank „Aspergillus Genome Database“ hergestellt. Ein Primer sollte zwischen 18 und 25 Basenpaare lange sein und ca. 60 % Guanin (G) oder Cytosin (C) Nukleinbasen enthalten. Guanin und Cytosin bilden eine stärkere Bindung aus als Adenin und Thymin und sind deshalb wichtig für das spezifische Binden des Primers an den DNA-Strang. Außerdem sollten die Primer mit G oder C beginnen und vor allem enden. Jeder Primer hat bedingt durch seine Länge und seinen G/C-Gehalt eine spezifische Temperatur, bei der er an die DNA bindet. Diese wurde berechnet mit der untenstehenden Formel:

$$T_M = 69,3 + 41 * \left(\frac{G+C}{G+C+A+T} \right) - \left(\frac{650}{G+C+A+T} \right)$$

3.10.3 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des ERMES in *Aspergillus fumigatus*

Der ERMES, eine physikalische Verbindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien, ist eine Struktur, die in fast allen Pilzen und einzelnen anderen einzelligen Organismen vorkommt, nicht aber in mehrzelligen Eukaryoten wie dem Menschen zu finden ist [16].

Für die Charakterisierung des ERMES in *A. fumigatus* wurden zunächst die Proteine identifiziert, die zu den bekannten Bestandteilen des ERMES Komplexes der Hefe homolog sind. Anschließend wurden die Folgen der Herunterregulation dieser Gene für die Zelle betrachtet. Sollte der ERMES Komplex essenziell sein, würde ihn das, zu einer potenziellen Zielstruktur für Antimykotika und Wirkstoffe gegen pathogene Einzeller machen.

4.1.1 Identifizierung der potenziellen ERMES Homologe in *A. fumigatus*

Die Proteinsequenzen der vier *S. cerevisiae* ERMES Komponenten Mdm10, Mdm12, Mdm34 und Mmm1 aus der *Yeast Genome Database* (Stamm S288C) (siehe Tab. 14) wurden genutzt, um mittels des BLASTP Algorithmus homologe Proteine in *A. fumigatus* (Stamm Af293) zu identifizieren. Die Homologie-Analyse identifizierte die Gene AFUA_5G13460 (*mdm10*), AFUA_1G14790 (*mdm12*), AFUA_4G09960 (*mdm34*) und AFUA_6G04420 (*mmm1*), die analog zu den *S. cerevisiae* Homologen *mdm10*, *mdm12*, *mdm34* und *mmm1* benannt wurden.

Tabelle 14: Proteinsequenzen der vier ERMES Komponenten aus *S. cerevisiae* aus der Yeast Genome Database (Stamm S288C) und deren durch BlastP identifizierte Homologe in *A. fumigatus*.

<i>S.cerevisiae</i> (S288C)	<i>A. fumigatus</i> (Af293)	Homologie
Mdm10 (YAL010C) MLPYMDQVLRAFYQSTHWSTQNSYEDI- TATSRTLLDFRIPSAIHLQISNKSTPNTFNSLD- FSTRSRINGSLSYLYSDAQQLEKFMNRNSTDIPLQ DATETYRQLQPNLNFVSSANTLSSDNTT- VDNDKLLHDSKFFVKKSLYYG- RMYYPSSDLEAMIIKRLSPQTQFMLKGVSSFKE SLNVLTCYFQRDSHRNLQEWIFSTSDLLCGYRV- LHNFLTTPSKFNFS- LYNSSLSLGAEFWLGLVLSLSPGCSTTLRYTH STNTGRPLTLTSWNPLFGHISSTYSAKT- GTNSTFCAKYDFNLYSIESNLSFG- CEFWQKKHLLLETNKNNDKLEPISDELVDINP NSRATKLLHENVPDLNSAVNDIPST- LDIPVHKQKLLNDLTYAFSSSLRKIDEER- STIEKFDNKINSIFTSVWKLSTSLRDKTLKLLWE GKWRGFLISAGTELVFTRGFQESLSDDEKND- NAISISATDTENGNI PVFPAKFGIQFYST*	Afu5g13460 MLDFMDYIQLAFAEATNWNCDNSYSSL- TATAQSLDFSTPERLRVHLSSLATPHFAT- SYTLGTVGLIDGSVSYLYSTVPLNNTPSRSALIP LRKLARGYRQVQPPVA- PVEDCGWQSLGGLGSSSESKPSGND- DSQPSPGRKATLLNATLHL- PPPTILNALFLRRMSPTMQLSLAVCSTRGAPLS NSAPQASLLGQLSHDTGKYSNEYLFST- DNSLFGWRGLWNFGPDPRHPKENS SPQLS LLSAGAEAYSPVSSLIGMSTGLRFSTLPAA- TEMPSSSSASSTTTTSHDTPISTFPYTLT- LVLTPLTGSLSTTYSLRASPNAFSSRFGNVY SWESEMVAGCELWRKRRKPSPPP VDDGLE- WARRKMRMADTPAFAPVEPTTHNRDE- ENES- VLKIRVDQSWNVRLLEWGRVKELLVSAGVGLG PSSFSSPSRAANSTPAGGGQSVGGGISGR- SYWHGVGVSISYSS*	quantitative Bewertung der Ähnlichkeit = 330 (131 bits) Identität = 134/484 (27.7%) Positive = 209/484 (43.2%) Lücken = 95/484 (19%)

<p>Mdm12 (YOL009C)</p> <p>MSFDINWSTLESNRLNLDLIRKHLN- SYLQNTQLPSYVSNLRLVDFDLGKVGPAIT- LKEIT- DPLDEFYDSIREADQETEENNDNKEDSEHICP DRTIANHEGPKDDFEAPVVMPSNDIQFLE- VEYKGDLLVTIGADLVNYPVEKFMPLPVKL- SISDIGLHSLCIVACLKQLFLSFLCDVSDPALDD NQTVLDPKGPILAATKPLERISIVRSMKIETEIGE- QYQQGGSVLRVSVGELEQLFTIFKD- FLRKEALAWPSWINLDFNDGDE*</p>	<p>Afu1g14790</p> <p>MSIDVNWRFATSGPDGEALAERIRSFH- DRFQQVALPRFIRSVQVHAFDFGTIPPELEI- KDF- CEPFADFYEEEDDDHTSDASEERGEHSSRW NSTHPELNPSYREDTAVNHSLRDPF- PDGFPTSPLRSPLGEHLNPHFLPRAST- PGIPGGTST- LGYHMLSLGGLSGTQTPLAAVAGGNPFASGW SDSGMGPGNRGRSETHAGMQHPRAEPEIDT- SNSTRPSTANTLPSPSGSSKNS GQAATGRNDHPSLHAGEHLEDS- VTQQQLPLPPMRERRRPFDFQVLCH- VKYAGDVRLSLTAEILLDYPMPFSVGLPLKLVN TGITFDGVAVIAYIRKRVHFCFLSAEDADALIG- PEQQQQRESAGDDHRPQSRPDSSASASQK- RHGGLLQEIIRVESEIGRKEDGKQVLKNGVKE RFVLAQVRRIFEELVYPSFWTFLI*</p>	<p>quantitative Bewertung der Ähnlichkeit = 196 (80,1 bits) Identität = 43/159 (27,0 %) Positive = 87/159 (54,7 %) Lücken = 16/159 (10,0 %)</p>
<p>Mdm34 (YGL219C)</p> <p>MSFRFNEAVFGDNSFNERIREKLSTALNSPS- KKKLDILKSGIKVQKVDFTPIQLEILD- LDIITQPKSLAKGICKISCKDAMLRIQTVIESNLLLI NEQDTPSFTMPQLINNGSFTIPITMTFSSIE- LEAITNIFVKNPGIGISFNDVDLD- FKFDCSVKILQSTIERRLKESMHVVFKDVLPSLIF NTSQNWFTNRGESTSTIPGKREHHHQQT- MSRNVILDGSDFQELSPINMLRLSSIVSSRST- LSLHSTVMNLSAIPGCLERQNLRFISRMPSLN NYYSQSFPQPKSSTVSSKQLVKPFYCSHLL- PKTVLDSSQYDLATITIKISRLFDRSNSND- DNAKPRRRKIKCKKTRTPSNLQSQGEQAVDDST AIETVTSTPVQTPPIPELEEQSPPYLKTTVSIRD- KYVIPEKISNLDSKKDTSKKK- PFYFIGLNSQEPSNNWKGWGEDSPPPYH*</p>	<p>Afu4g09960</p> <p>MAFNFNWSPLMADASFYTRAQDLL- TAAANKSPKPIIVDDIIVTELNLGSIPELEILEI- GD- LAEDRFRGIFKMSYSGDAFLTKTRVQANPLN TYLLTRPSFATPRPLAAATPLTIPLQITLSD- KLSGFVILVFSKQKGITVFRNDP- LESLKVSSTFDSIPFVRDFLQKEIEAQLRILFMD ELPAIHRSLRLWVPEYRAGEELQQTASAN- GEGPGQDPLASPPQDPVDALGNALNESEI- ESLSDSSVETHSLFSQKNLLRLAALTDSQRTL SLFTPSIREVVYRAWTSPDQTDASGSVTSF- FPVLSRTQSQVGSMSFSDASMVSSQSR- STPFHTFSGYGLSLGAGRHSKAHARKRKRKRV VDLRRPKTTDDAPSVDESSTESTSAPS ICSAPLVLDEQTDVTPPLSPDNDLHL- PAIPERHRMSISRPLRRENASEMIRDTAECK- PSSNAVQQAIEEDLSATPRAAVRAHGASVLE KGKQDPDSSAGSSRQLSSTILPFINDNPT- GGVVDQALVERLAGEIARRMRDEKFMAS- NACGPFWDRHSQEESEPPPAYGH*</p>	<p>quantitative Bewertung der Ähnlichkeit = 162 (67,0 bits) Identität = 73/285 (26,0 %) Positive = 134/285 (47,0 %) Lücken = 40/285 (14,0 %)</p>
<p>Mmm1 (YLL006W)</p> <p>MTDSENESTETDSLMTFDDYISKELPEHLQRLI- MENLKGSTTNDLKQTSNNEFNVSKNGS- FKGLDDAIQALQMQLVHPSSLGSLATSSKFSG WSFAQGFVFGQLSIVLLFIFFLKFFIFSDEPSKS- KNPKPAASRHRSKFKKEYPFISREFLTS- LVRKGAKQHYELNEEAENEHLQELALILEKTYYN VDVHPAESLDWFNVLVAQIIQQFRSEAWHRD- NILHSLNDFIGRKSPLDPEYLDTIKITEL- DTGDDFPFISNCRIQYSPNSGNKKLEAKIDIDLN DHLTLGVETKLLLNYPK PGIAALPINLVSVIRFQACLTVSLTNAEEFASTS- NGSSSENGMEGNSGYFLM- FSFSPEYRMEFEIKSLIGSRSKLENIPKIGSVIEYQ IKKWVFERCPEPRFQFVRLPSMWPRS- KNTREEKPTL*</p>	<p>Afu6g04420</p> <p>MSSQLNDPTPIPAQSSLSFTQGFLLGQLSVVL- LIAAFIKFFIFGEAPPPSRGLSHRSATHR- RSNSIFSSAQHDGSTRTLREKPSNSNVLRPVP SSATNTRSILRKTYTIAIPTNPSSKH- GRHRIHHSSHQPELSD- WFNVLIAQTIAQYRQTAYLL- KDSPTSSILNSLTAALNNPEKKPSFIDKITVTDIS LGEEFFIFSNCRHIAVDDPNSDGGRLQALM- DVDLSDDNLSIAVETQLL- LNYPKPCSAILPVALSISVVRFSGLCISLVPAS TPPLDTPSHSPSPPTAQTITAAGRSKREDQTS- GSHSHAGGSSKEPSGENPPKTSPKSNVAFS- FLPDYRLDLSVRSLSIGSRSLQDVPKVAQLVEA RVHAWFEERVVEPRVQVGLPDLWPRMGRT- GVR TGDDSETGSNVPRSSTAADASGSARHEDSS- REPEVLRFGSLLGTRPPFDLASRTSS- FNVETGDLRSRSMTREESNGNLSD QFHMPGSLPGSGVATT*</p>	<p>quantitative Bewertung der Ähnlichkeit = 578 (227 bits) Identität = 142/396 (35,9 %) Positive = 197/396 (49,7 %) Lücken = 83/396 (20,0 %)</p>

Es gab zwei alternative Methoden, um die Bedeutung der identifizierten Proteine in *A. fumigatus* zu analysieren. Entweder die Herstellung von Deletionsmutanten oder alternativ, falls die Gene essenziell sind, die Etablierung von Stämmen mit einer regulierbaren Expression des jeweiligen Zielgens. Durch den regulierbaren Promotor können auch Gene untersucht werden, deren Verlust zum Tod des Pilzes führen würden. Beide Methoden wurden für die Charakterisierung der ERMES Proteine in *A. fumigatus* verwendet.

4.1.2 Konstruktion und Charakterisierung der Deletionsmutanten $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $\Delta mdm34$ und $\Delta mmm1$

Für die vier Gene derERMES Komponenten (*mdm10*, *mdm12*, *mdm34* und *mmm1*) wurde versucht mittels homologer Rekombination mit einer Resistenzkassette Deletionen herzustellen. Bei den Genen *mdm34* (Afu4g09960) und *mmm1* (Afu6g04420) wuchsen auch nach mehrmaligen Versuchen und verlängerter Inkubation keine resistenten Klone nach der Transformation. Bei den Deletionsmutanten der Gene *mdm10* (Afu5g13460) und *mdm12* (Afu1g14790) wuchsen nach der Transformation resistente Kolonien, die wildtypartiges Wachstum und Sporulation zeigten.

Sporen, der wildtypartigen Kolonien, wurden nach der Transformation sowohl auf AMM-Platten mit und ohne Selektionsmarker ausgestrichen. Die entstandenen Kolonien auf der Platte ohne Selektionsmarker zeigten wildtypartiges Wachstum und Sporulation. Im Gegensatz dazu wuchsen auf der Platte mit Selektionsmarker erst nach verlängerter Inkubationszeit kleine, nicht sporulierende Kolonien (siehe Abb. 14).

Nach der Transformation mit einer Resistenzkassette entstehen zunächst Klone, in denen Kerne mit dem nativen und andere Kerne mit dem mutierten Gen nebeneinander existieren. Dieser Zustand wird heterokaryont genannt. Sporen von *A. fumigatus* sind haploid. Bilden die heterokaryonten Hyphen Sporen, so tragen diese entweder das native oder das mutierte Gen. Die auf der Selektionsplatte ausgestrichenen auskeimenden Sporen trugen daher allein das mutierte Gen.

Dies könnte eine Erklärung sein für das extrem langsame Wachstum der Kolonien auf den Selektionsplatten im Vergleich zur parentalen Kolonie. Zugleich würde das extrem langsame Wachstum der homokaryonten Deletionsmutanten auf eine essenzielle Funktion der vermutetenERMES-Komponenten hindeuten.

Eine analytische PCR der $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ Klone zeigte sowohl Banden für das Wildtyp Gen als auch für die Deletion. Dies bestätigte, dass das gewachsene Myzel heterokaryont war (siehe Abb. 15). Selbst nach langer Inkubationszeit wurden von den Mutanten keine Sporen gebildet, die man zur Subkultivierung und für Versuche hätte nutzen können. Aus diesem Grund wurden zusätzlich konditionelle Mutanten hergestellt.

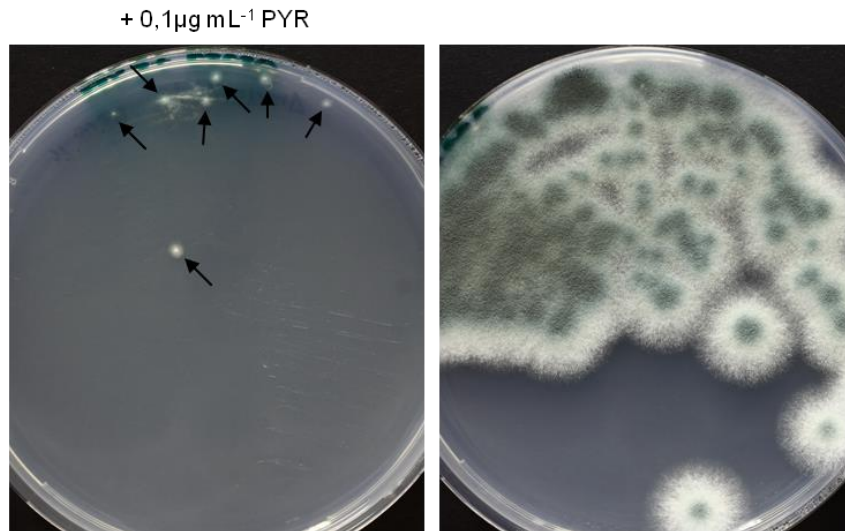


Abbildung 14: Drei-Ösen-Ausstrich des heterokaryonten $\Delta mdm12$ Klon Nr. 2 auf AMM-Platten mit $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Pyriithiamin bzw. ohne Pyriithiamin.

Die Sporen des Klons wurden direkt von einer der auf der Transformations-Platte gewachsenen Kolonien auf zwei AMM-Platten mit $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Pyriithiamin bzw. ohne Pyriithiamin ausgestrichen. Auf der Platte ohne Antimykotikum zeigte die Mutante wildtypartiges Wachstum, auf der Platte mit Pyriithiamin wuchs sie extrem langsam und bildete erst nach verlängerter Inkubation kleine, nicht sporulierende Kolonien (markiert durch Pfeile).

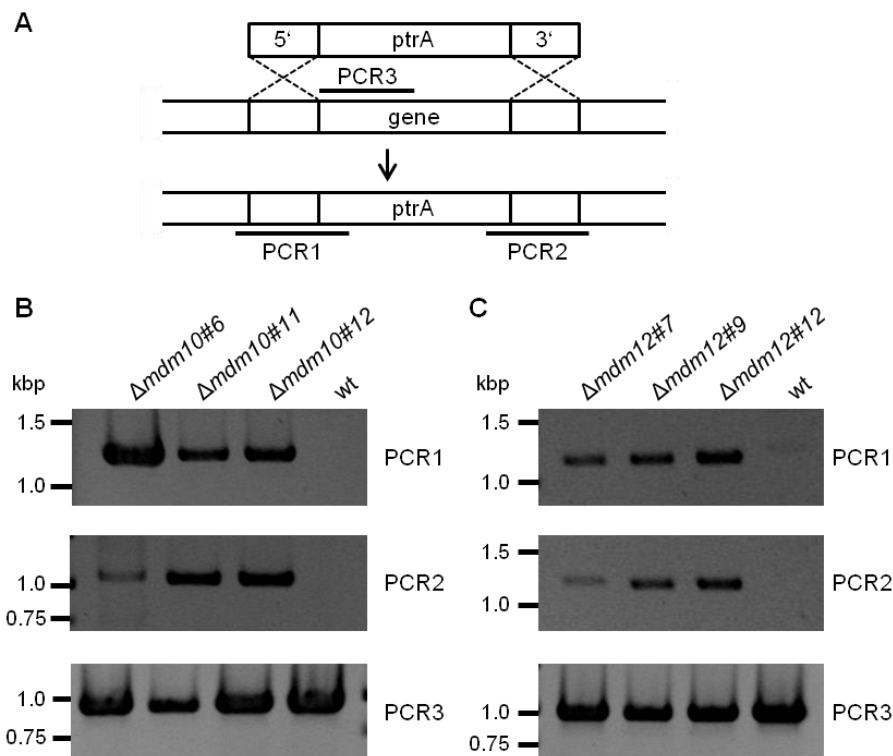


Abbildung 15: Konstruktion und PCR-Validierung der $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ Deletionsmutanten.

(A) Schematische Darstellung des DNA-Bereichs von *A. fumigatus*, der deletiert werden sollte (Zielgene waren *mdm10* oder *mdm12*) und die dafür genutzten Resistenzkassetten. Diese bestanden aus jeweils ca. 1 kB des nicht kodierenden 5'- und 3'-Bereichs vor und hinter dem Gen und der Pyriithiamin (*ptrA*) Resistenzkassette. Die drei eingezeichneten PCR-Fragmente dienen dazu die Integration der Resistenzkassette im Zielgen nachzuweisen. PCR 1 amplifizierte ein 1,1 kB großes Fragment und PCR 2 amplifizierte ein 1,0 oder 1,1 kB großes Fragment in den Deletionsstämmen $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$. PCR 3 amplifizierte den Anfangsbereich des *mdm10* oder *mdm12* Gens. Dieses Stück wurde sowohl im Wildtyp als auch in den heterokaryonten Deletionsstämmen amplifiziert. Der 5'-Primer für PCR 1 und der 3'-Primer für PCR 2 binden außerhalb der 5'- und 3'-Region, die für die Deletion genutzt wurden. Sowohl von $\Delta mdm10$ (A) als auch von $\Delta mdm12$ (B) konnten jeweils drei unabhängige heterokaryont Klone identifiziert werden. Die Klone $\Delta mdm10\#6$ und $\Delta mdm12\#12$ wurden für einen Vergleich des Wachstums genutzt.

4.1.3 Die Deletionsmutanten $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ wachsen extrem schlecht

Das Auskeimen der Sporen und Wachstum der Keimlinge der heterokaryonten Klone von $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ in AMM supplementiert mit Pyrithiamin wurde über einen längeren Zeitraum verfolgt (siehe Abb. 16). Heterokaryonte Stämme bilden Sporen sowohl mit der Mutation als auch Sporen mit dem Wildtyp Allel. Im Medium mit Pyrithiamin können nur die Sporen wachsen, die statt des Gens die Resistenzkassette trugen. Im Medium ohne Antimykotikum können sowohl die Sporen mit Deletion als auch die Sporen mit dem Wildtyp Gen auskeimen.

In Abbildung 16 ist das extrem schlechte Wachstum der Keimlinge mit einer Deletion von $mdm10$ oder $mdm12$ zu sehen. Nach 87 h sind die Mikrokolonien der $\Delta mdm10$ Sporen in etwa so weit wie der Wildtyp nach 20 h und die der $\Delta mdm12$ Sporen so weit wie der Wildtyp nach 16 h. Außerdem war zu beobachten, dass die $\Delta mdm10$ Keimlinge etwas schneller wuchsen als die der $\Delta mdm12$ Mutante.

Darüber hinaus konnten Sporen beobachtet werden, die erst nach ca. 80 h Inkubation anfangen auszu-keimen (siehe Abb. 16, Konidien mit Pfeil markiert). Dies sind vermutlich Sporen ohne Resistenzkassette mit dem Wildtyp Gen. Dies weist darauf hin, dass über die Zeit die Wirkung des Pyrithiamin nachließ und die Wildtyp Konidien dann auskeimen konnten.

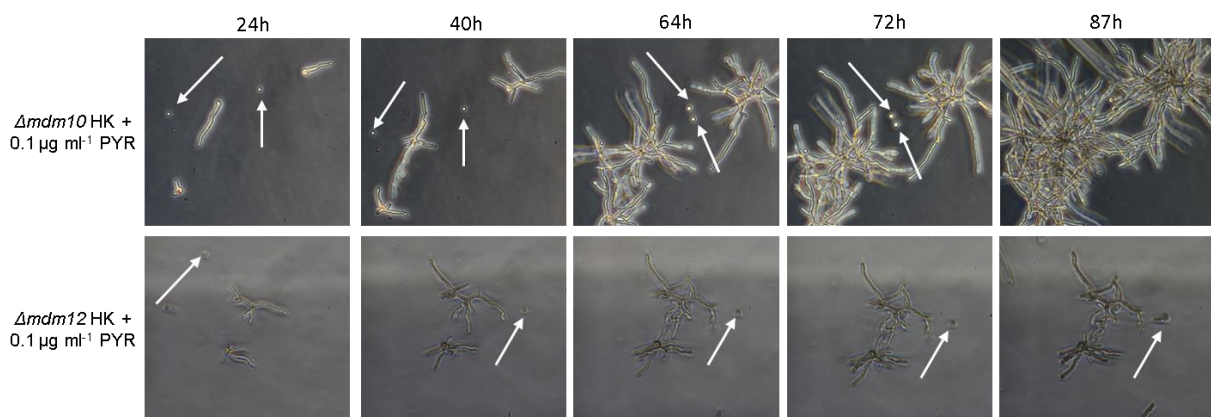


Abbildung 16: Deletionsmutanten der Gene $mdm10$ und $mdm12$ sind lebensfähig, wachsen aber extrem langsam.

Konidien der heterokaryonten Deletionsstämme $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ wurden in einer 24-well Platte in AMM mit $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Pyrithiamin bei 37°C inokuliert. Das Pyrithiamin sollte die Auskeimung von Wildtyp Konidien verhindern, diese Selektion ließ aber nach ca. 80 h nach, sodass einzelne Konidien doch auskeimen konnten (markiert mit Pfeilen). Repräsentative Bilder wurden nach 24, 40, 64, 72 und 87 h aufgenommen.

4.1.4 Konstruktion der konditionellen Mutanten der Gene $mdm10$, $mdm12$, $mdm34$ und $mmm1$

Auf Grund der fehlenden Sporulation und des extremen langsamen Wachstums war es nicht möglich, mit den Deletionsmutanten von $mdm10$ und $mdm12$ weiterzuarbeiten. Zusätzlich konnten keine Mutanten von $mdm34$ und $mmm1$ generiert werden. Aus diesen Gründen wurden zusätzlich konditionelle Mutanten in allen vier ERMES Mutanten hergestellt, bei denen die endogenen Promotoren durch homologe Rekombination durch einen Doxzyklin induzierbaren Promotor ersetzt wurde.

Der Doxzyklin induzierbare Promotor ermöglicht die gezielte Expression des nachgeschalteten Gens durch die Supplementierung des Mediums mit dem Antibiotikum Doxzyklin. In Abb. 17 wird die

Konstruktion der Mutanten anhand des *mmm1* Lokus gezeigt. Diese Stämme wurden *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* genannt.

Die korrekte Integration des konditionellen Promotors vor das Gen wurde mit Hilfe von drei PCRs verifiziert (siehe Abb. 17). Für jedes Gen wurden zwei Primerpaare verwendet. Das erste Paar bestand aus einem Primer, der vor dem Gen im 5'-Bereich bindet und einem Primer, der in der Kassetten bindet. Das zweite Paar bestand aus einem Primer, der im Gen nahe dem Promotor bindet, und einem Primer, der ebenfalls in der Kassetten bindet. Die dritte PCR wurde mit den beiden Primern, die außerhalb der Kassetten binden, durchgeführt, um die Größe des ursprünglichen Lokus im Vergleich zum mutierten zu erhalten. Für alle vier Gene wurden jeweils 3 Klone identifiziert, für die eine richtige Integration mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Diese Klone wurden für weitere Experimente genutzt.

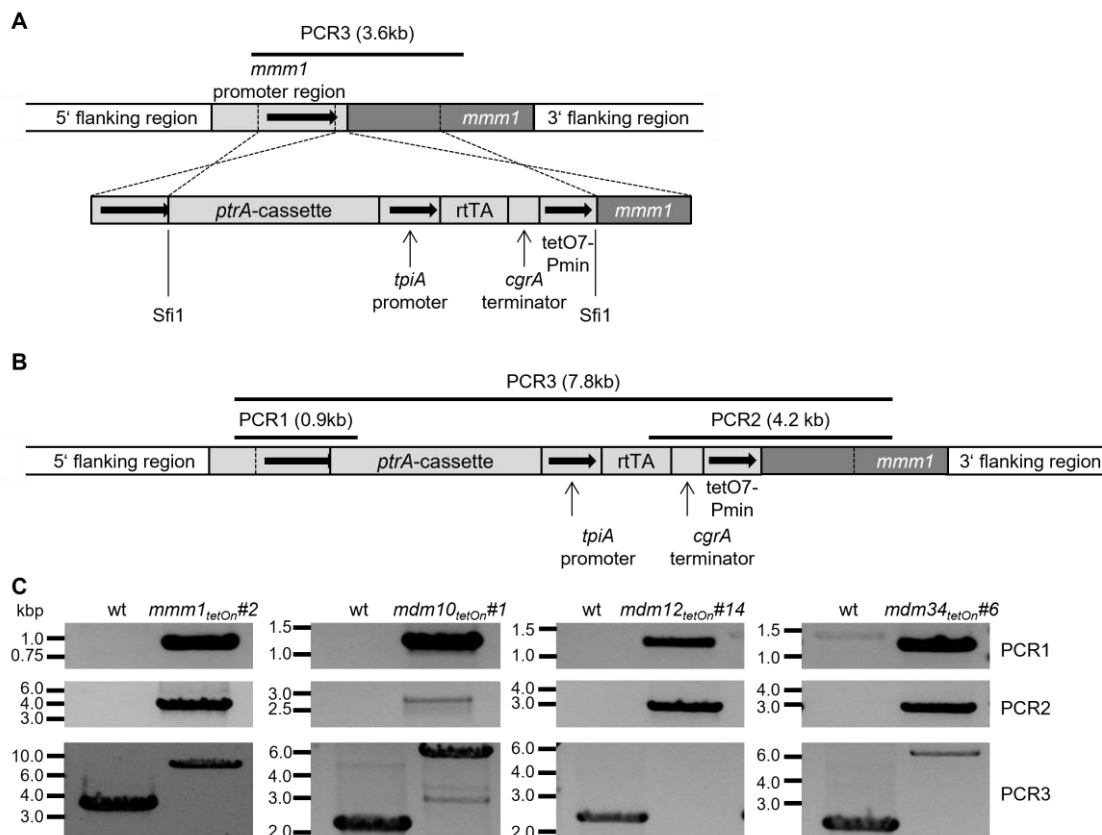


Abbildung 17: Konstruktion der konditionellen *mmm1_{tetOn}*-Mutante und Überprüfung der richtigen Integration der konditionellen Promotoren für *mmm1*, *mdm10*, *mdm12* und *mdm34*.

(A) Struktur des *mmm1*-Lokus im Genom von *A. fumigatus* und der Tet-On Kassetten, die anstelle des endogenen Promotors integriert wurde. Die Kassetten bestand aus ca. 1 kb des nicht kodierenden 5'-Bereichs von *mmm1*, einer Pyrimidin Resistenzkassetten (*ptrA*), dem *Aspergillus niger pkiA* Promotor, der die Expression des Transaktivators (*rTA*) reguliert, des *cgrA* Terminators, der *tetO7::Pmin* Promotorsequenz und des ca. 1 kb großen 3' flankierenden Bereichs, der in diesem Fall aus einer Teilsequenz des *mmm1* Gens bestand. (B) Lokus des *mmm1* Gens nach der homologen Rekombination mit der Resistenzkassetten. Ungefähr 0,7 kb des *mmm1* Promotors wurden ausgetauscht. Durch 3 PCRS wurde die Lage und die Größe des integrierten Fragments überprüft und so die korrekte Integration der Kassetten verifiziert. PCR 1 amplifiziert ein 1 kb großes Fragment in der *mmm1_{tetOn}* Mutante, wobei die Primer im nicht ausgetauschten Bereich des Promotors und in der *ptrA* Kassetten binden. PCR 2 amplifiziert in der Mutante ein 4,2 kb großes Fragment, wobei der 3'reverse-Primer auch außerhalb der Kassetten bindet. PCR 3 amplifiziert ein 3,6 kb großes Fragment im Wildtyp und ein 7,8 kb großes Fragment in der Mutante. Hierfür wurden die beiden Primer der beiden anderen PCRS verwendet, die außerhalb der Kassetten binden. (C) Die *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, und *mdm34_{tetOn}* Mutanten wurden nach dem gleichen Prinzip überprüft. Für jedes Gen wurde repräsentativ ein Klon ausgewählt. PCR 1 amplifiziert ein 1,2 kb großes Fragment in *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, und *mdm34_{tetOn}*. PCR 2 amplifiziert ein 2,8 kb großes Fragment in *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, und *mdm34_{tetOn}*. PCR 3 amplifiziert ein 6,6 kb großes Fragment in *mdm10_{tetOn}* und *mdm12_{tetOn}*, und ein 6,7 kb großes Fragment in *mdm34_{tetOn}*. In den dazugehörigen Wildtyp Kontrollen wird jeweils ein 2,3 kb großes Fragment durch PCR amplifiziert. In *mdm12_{tetOn}* wurde kein Produkt für die dritte PCR amplifiziert, was wahrscheinlich auf die Länge (6,6 kb) des zu amplifizierenden DNA-Stücks zurückzuführen ist.

4.1.5 Vergleich des Wachstums der Deletionsmutanten $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ mit dem der konditionellen Mutanten $mdm10_{tetOn}$ und $mdm12_{tetOn}$

Deletionsmutanten und Stämme mit konditionellem Promotor, die für die Charakterisierung desselben Gens hergestellt wurden, können sich in ihrem Wachstumsverhalten unterscheiden. Das Tet-On Expressionssystem wird durch das Fehlen von Doxyzyklin nicht völlig ausgeschaltet. Je nach Menge an benötigtem Protein dieses Gens, kann so der Phänotyp stärker oder schwächer abgemildert werden. Deshalb wurden die Sporen der heterokaryonten Deletionsstämme $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ mit den konditionellen Mutanten $mdm10_{tetOn}$ und $mdm12_{tetOn}$ in ihrem Wachstumsverhalten in Flüssigmedium verglichen. Hierfür wurde flüssiges, Pyrithiamin enthaltendes, AMM mit Sporen der konditionellen Mutanten und der heterokaryonten Klone der Deletionsmutanten inokuliert. Die Sporen der heterokaryonten Klone wurden zusätzlich in Medium ohne Pyrithiamin gegeben, um das Auskeimen der Sporen ohne Deletion ebenfalls beobachten zu können.

In Abbildung 18 werden Fotos nach 24 h, 40 h und 64 h Inkubation bei 37 °C gezeigt. Nach 24 h zeigten sowohl die heterokaryonten Klone der Deletionsstämme als auch die konditionellen Mutanten von $mdm10$ und $mdm12$ mehrere verzweigte Hyphen. Im Gegensatz dazu wiesen die Sporen der Deletionsmutanten von $mdm10$ und $mdm12$ nur kurze Keimlinge ohne Hyphenverzweigungen auf (vgl. Abb. 18). Die Kolonien der $\Delta mdm10$ Mutante waren in Medium mit Pyrithiamin etwas kleiner als in dem ohne Selektionsmarker. Der Grund hierfür ist die leicht verlangsamte Auskeimung der Sporen bedingt durch das Pyrithiamin im Medium.

In den wells ohne Pyrithiamin waren die heterokaryonten Stämme von $mdm10$ und $mdm12$ nach 40 h überwachsen. Die Mikrokolonien der dazugehörigen konditionellen Mutanten hatten ebenfalls ihre wells zum Großteil mit Myzel bedeckt. Im Gegensatz dazu waren die Mikrokolonien der Deletionsstämme, die unter Selektionsdruck gewachsen waren, klein und hatten nur wenige Verzweigungen gebildet.

Dies zeigt, dass die Sporen mit einer Deletion in $mdm10$ oder $mdm12$ deutlich schlechter wachsen als eine Mutante, in der das Gen durch einen konditionellen Promotor „ausgeschaltet“ wird.

Dies legt nahe, dass die geringe Expression, die der Doxyzyklin induzierbare Promotor zulässt, ausreicht, um den Phänotyp der Deletion der beiden ERMES Gene abzumildern.

Die Deletionsstämme wuchsen allerdings so schlecht, dass sie keine Sporen bildeten und so auch nicht weiter kultiviert werden konnten. Außerdem war es nicht möglich Deletionsstämme von $mdm34$ und $mmm1$ zu generieren. Dies schloss weitere Experimente mit diesen Stämmen aus. Die konditionellen Stämme können den Verlust der ERMES Protein nicht vollständig darstellen, können aber Ergebnisse liefern, die Rückschlüsse auf die Auswirkungen des tatsächlichen Verlusts des ERMES zulassen.

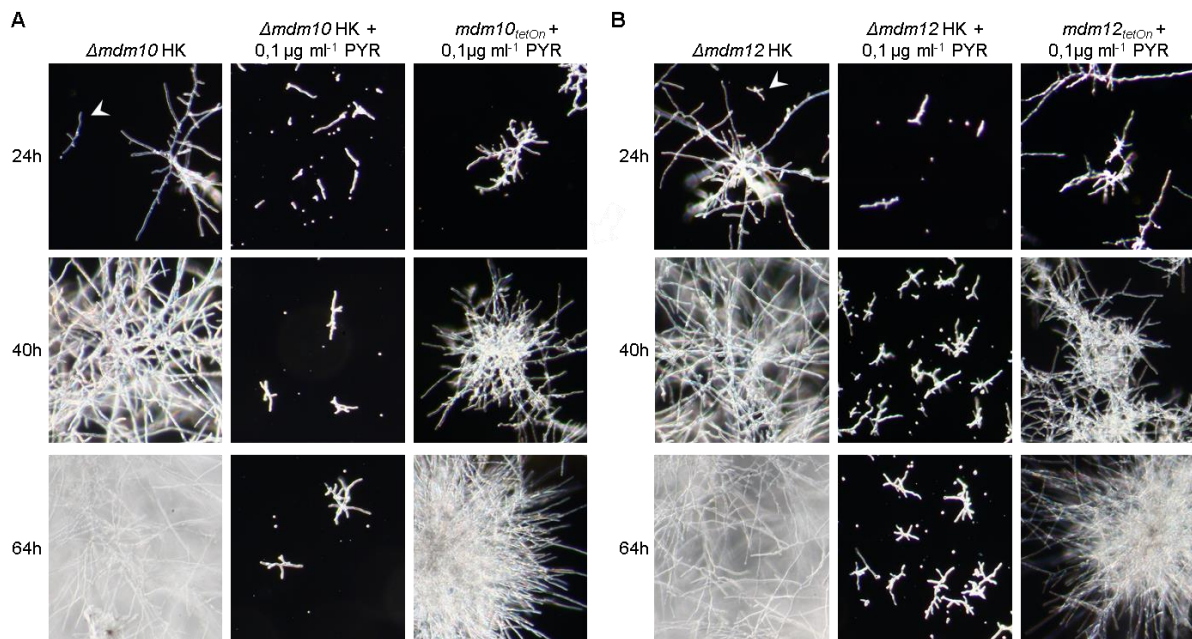


Abbildung 18: Deletionsmutanten der Gene *mdm10* und *mdm12* sind lebensfähig, aber zeigen schwere Wachstumsdefekte.

In einer 24-well Platte wurde flüssiges AMM mit Konidien der heterokaryonten (HK) Deletionsstämme $\Delta mdm10$ (A) und $\Delta mdm12$ (B) und Konidien der konditionellen Stämme $mdm10_{tetOn}$ (A) und $mdm12_{tetOn}$ (B) inokuliert. Falls angegeben, wurde das Medium mit $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Pyrithiamin (PYR) supplementiert. Mit dem Pyrithiamin sollte die Auskeimung von Wildtyp Konidien verhindert werden, die von den heterokaryonten Stämmen gebildet wurden. Die Platte wurde bei 37°C inkubiert und repräsentative Bilder wurden nach 24 h, 40 h und 64 h aufgenommen. In der Bedingung ohne Pyrithiamin wurden nach 24 h die Mikrokolonien mit Pfeilspitzen markiert, bei denen es sich vermutlich um Deletionsmutanten der jeweiligen Gene handelt. Zusätzlich sind in diesen wells zahlreiche Sporen zu sehen, die nicht auskeimen. Es handelt sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um Wildtyp Sporen, denen das Resistenzgen fehlte.

4.1.6 Vergleich des Wachstums der konditionellen Mutanten $mdm10_{tetOn}$, $mdm12_{tetOn}$, $mdm34_{tetOn}$ und $mmm1_{tetOn}$

Aus den vorhergehenden Experimenten war bekannt, dass die basale Expression des Doxzyklin induzierbaren Promotors ausreicht, um den Wachstumsphänotyp der konditionellen Mutanten zu verringern. Für die Gene *mdm34* und *mmm1* war es nur möglich Mutanten mit einem Tet-On Expressionssystem herzustellen. Daher konnte nur der Wachstumsphänotyp der vier konditionellen Mutanten der Gene *mdm10*, *mdm12*, *mdm34* und *mmm1* untereinander verglichen werden. Ihr Wachstumsverhalten wurde sowohl im Tüpfeltest (siehe Abb. 19), als auch im Flüssigmedium (siehe Abb. 20) untersucht.

Unter reprimierten Bedingungen zeigten alle vier Mutanten stark reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum aller vier konditionellen Mutanten war auf SAB-Agar schlechter als auf AMM-Agar (vgl. Abb. 19 A und B).

Im Vergleich des Wachstums der konditionellen Stämme $mdm10_{tetOn}$, $mdm12_{tetOn}$, $mdm34_{tetOn}$ und $mmm1_{tetOn}$ untereinander fällt auf, dass $mdm10_{tetOn}$ und $mdm12_{tetOn}$ besser wuchsen als $mdm34_{tetOn}$ und $mmm1_{tetOn}$. Während $mdm10_{tetOn}$ und $mdm12_{tetOn}$ auf AMM bis in die 5×10^5 Verdünnung wuchsen, schafften es die Klone von *mmm1* nur bis in den 5×10^6 und *mdm34* nur bis 5×10^7 Tüpfel zu wachsen. Auf SAB-Agar war der Wachstumsdefekt aller vier Mutanten ausgeprägter. Allerdings blieb der Unterschied zwischen den Mutanten derselbe.

Der stärkere Wachstumsphänotyp von $mdm34_{tetOn}$ und $mmm1_{tetOn}$ zeigte sich auch im Flüssigmedium (siehe Abb. 20). Hier ist zusätzlich zu erkennen, dass trotz starkem Wachstumsdefekt, alle Konidien der

vier Mutanten unter reprimierten Bedingungen auskeimen können. Außerdem unterscheidet sich deren Hyphen Morphologie nicht von der des Wildtyps.

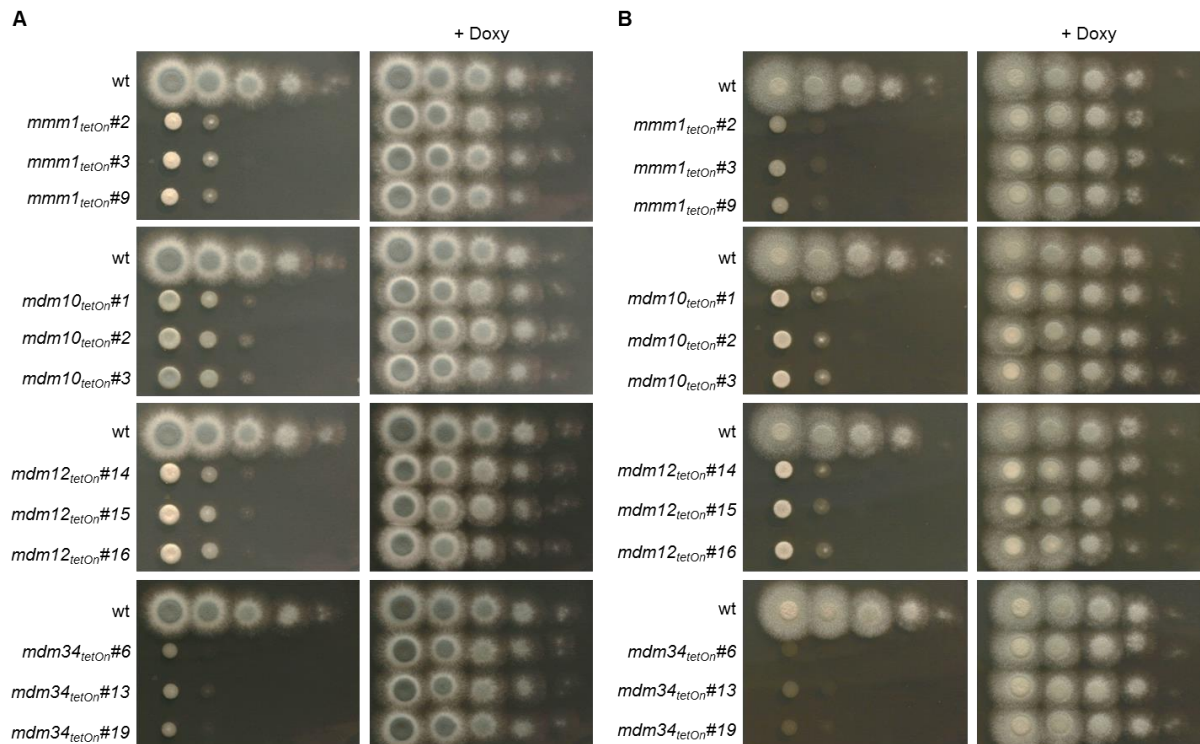


Abbildung 19: Wachstumspheänotyp von je drei unabhängigen Klonen der vier konditionalen ERMES Mutanten *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* auf AMM- und SAB-Agarplatten.

Jeweils 3 μL einer Sporensuspension einer 1:10 Verdünnungsreihe, beginnend mit 5×10^7 Konidien pro mL wurden vom Wildtyp und den Mutanten auf AMM- (A) oder SAB-Agar (B) getüpfelt. Die AMM-Agarplatten wurden für 36 h bei 37 °C und die SAB-Agarplatten für 24 h bei 37 °C inkubiert. Falls markiert mit "+ Doxy", wurde dem Medium $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Doxyzyklin hinzugefügt. Die konditionalen Klone *mmm1_{tetOn}*#2, *mdm10_{tetOn}*#1, *mdm12_{tetOn}*#14 und *mdm34_{tetOn}*#6 wurden für die weiterführenden Experimente verwendet.

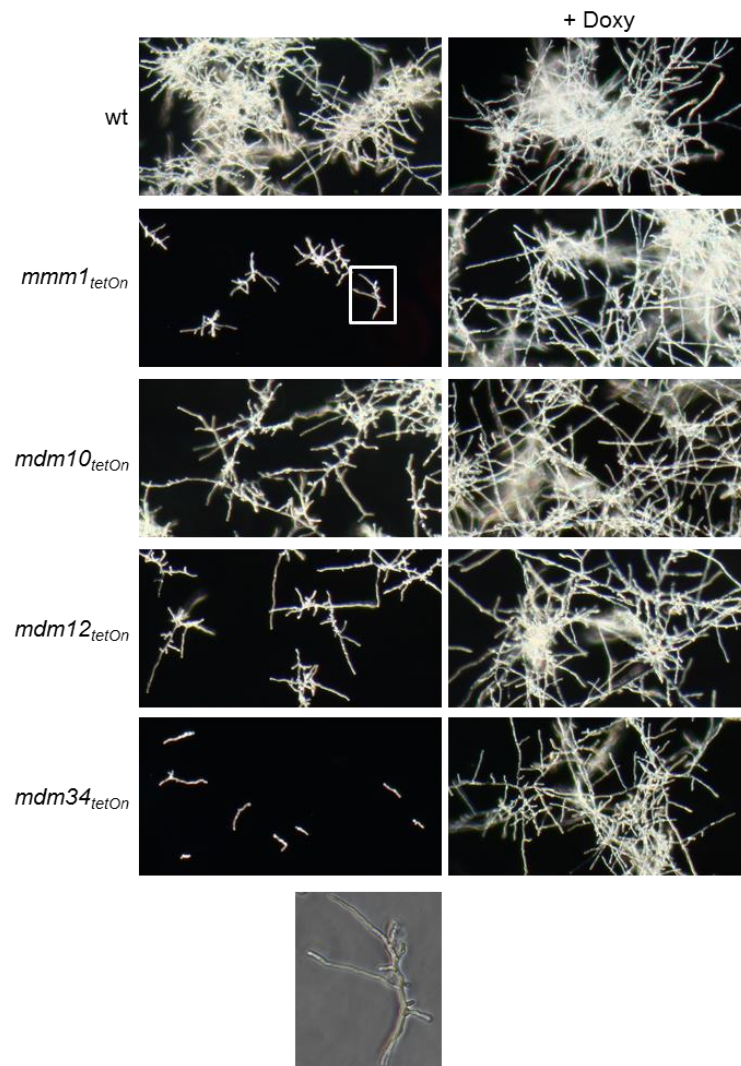


Abbildung 20: Wachstumsphänotypen der vier konditionalen ERMES Mutanten *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* in flüssigem AMM.

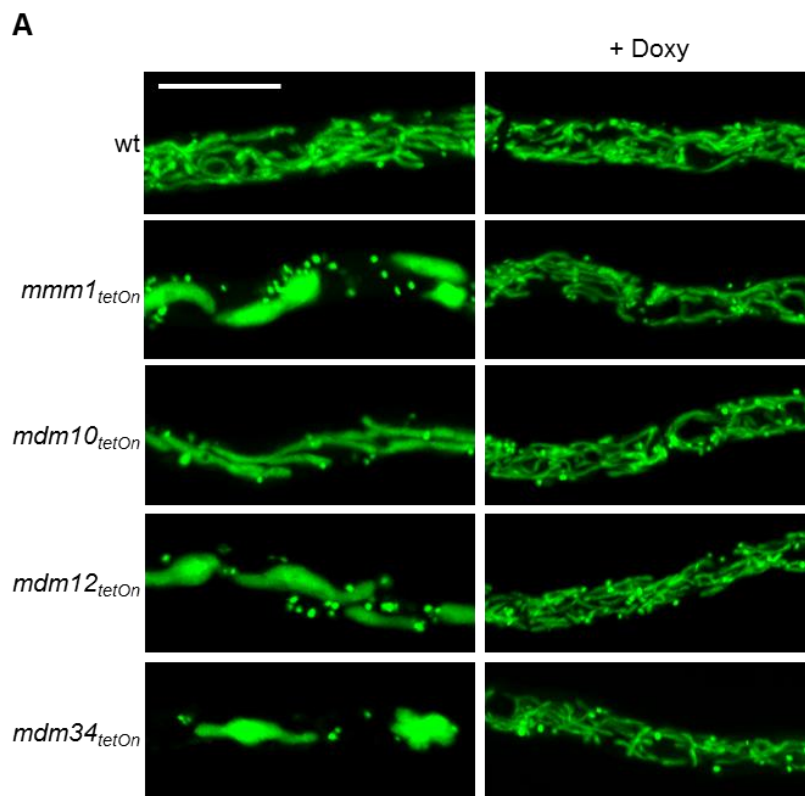
In einer 24-well Platte wurde flüssiges AMM mit Konidien der *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* Mutanten inokuliert (2000 Sporen pro mL; 1 mL pro well). Bilder wurden nach 18 h Inkubation bei 37 °C aufgenommen. Falls angegeben wurde dem Medium 10 µg mL⁻¹ Doxyzyklin hinzugefügt. Der Kasten in der Abbildung von *mmm1_{tetOn}* markiert den Ausschnitt, der unten vergrößert dargestellt ist.

4.1.7 Das Auflösen des ERMES führte zu langsamen großen sowie kleinen sehr schnell beweglichen Mitochondrien

Der ERMES ist eine physikalische Verbindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der Verlust des ERMES zu einer veränderten Morphologie des mitochondriellen Netzwerks führt [154,155,178]. Dies warf die Frage auf, welche Auswirkungen der Verlust der einzelnen ERMES Komponenten für die mitochondrielle Morphologie in *A. fumigatus* hat. Für die Untersuchung der Mitochondrien wurden konditionelle Mutanten hergestellt, die ein GFP mit mitochondrieller Signalsequenz exprimierten. Flüssiges AMM oder (siehe Abb. 21 A) oder SAB (siehe Abb. 21 B) mit und ohne Doxyzyklin wurde mit Sporen der konditionalen Mutanten *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* inokuliert und anschließend mikroskopiert. Unter induzierten Bedingungen zeigten *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* eine wildtypartige, tubuläre Mitochondrien Morphologie, sowohl in AMM als auch in SAB. Wie beim Wildtyp war

dieses Netzwerk in den Mutanten unter induzierten Bedingungen in SAB kompakter und die einzelnen Tubuli dicker.

Unter reprimierten Bedingungen wiesen die konditionellen Mutanten *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* große, amorphe Mitochondrien auf, die kaum miteinander verbunden waren. Diese waren im Vergleich zum Wildtyp sehr langsam bis unbeweglich. Zwischen diesen großen starren Mitochondrien waren immer wieder wenige sehr winzige Mitochondrien zu beobachten, die sich sehr schnell durch die Hyphe bewegten. Vergleicht man die ERMES Mutanten untereinander, so zeigte *mdm34_{tetOn}* eine höhere Beeinträchtigung der Mitochondrien. In AMM hatte die *mdm34_{tetOn}* Mutante nur noch wenige sehr große Mitochondrien, während *mdm10_{tetOn}* noch Mitochondrien zeigte, die stärker tubulär waren und auch in der Anzahl eher dem Wildtyp entsprachen. Auch *mmm1_{tetOn}* zeigte einen stärkeren Phänotyp als *mdm10_{tetOn}* und *mdm12_{tetOn}*. Generell war in SAB der Phänotyp der vier Mutanten deutlich ausgeprägter (siehe Abb. 21 B). Hier zeigen alle vier Mutanten sehr große, kompakte, amorphe Mitochondrien und es schien, als wären hier mehr der kleinen schnellen Mitochondrien vorhanden gewesen.



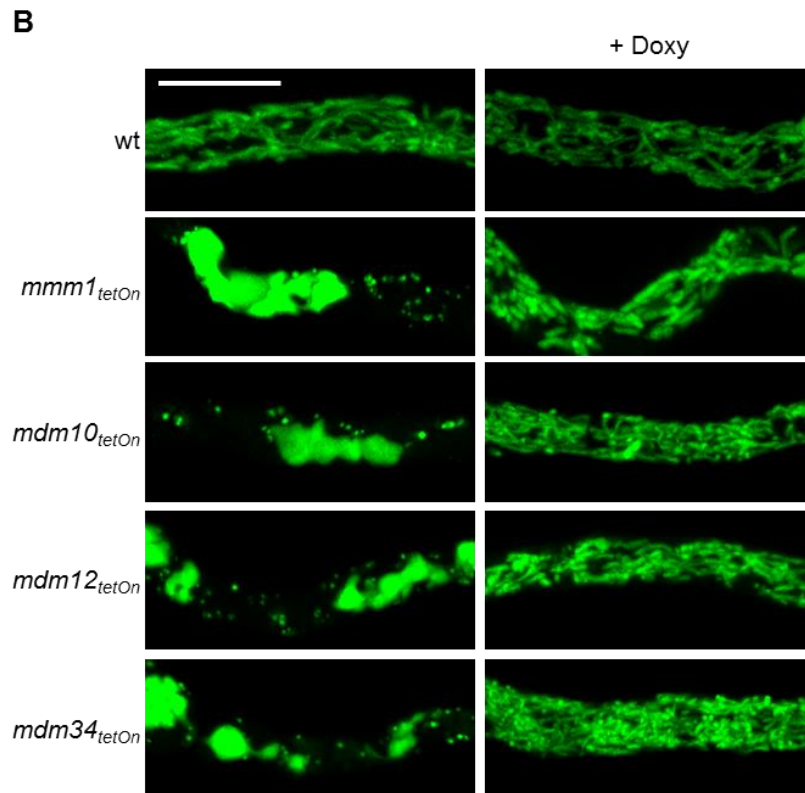


Abbildung 21: Das Ausschalten der Expression von *mmm1*, *mdm10*, *mdm12* oder *mdm34* resultiert in großen, immotilen und kleinen, schnell beweglichen Mitochondrien.

In einem 15 μ -Slide eight-well Objektträger wurde AMM (A) oder SAB (B) mit Sporen des Wildtyps oder der vier ERMES Mutanten, die ein mtGFP exprimierten, inokuliert. Nach ca. 13 h bei 37 °C wurde die mitochondrielle Morphologie mittels eines konfokalen Lasermikroskops analysiert. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m. Falls angegeben wurde dem Medium 10 μ g ml⁻¹ Doxycyclin hinzugefügt.

4.1.8 Die Nukleoide der konditionellen ERMES Mutanten aggregieren in den großen, immotilen Mitochondrien während die kleinen, schnellen Mitochondrien keine mtDNA mehr tragen

Eine Theorie bezüglich der Funktion des ERMES besagt, dass die Verbindung zwischen ER und Mitochondrien dazu dient, die mtDNA an einem bestimmten Ort im Mitochondrium zu lokalisieren [155,162]. Um die Verteilung der mtDNA in den konditionellen ERMES Mutanten zu bestimmen, wurden diese mit Doxycyclin (Gene induziert) und ohne Doxycyclin (Gene herunterreguliert) angezogen, fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt.

Im Wildtyp ist die mtDNA normalerweise in kleinen, punktförmigen Nukleoiden organisiert, die sich über das gesamte tubuläre System der Mitochondrien gleichmäßig verteilen (siehe Abb. 22 Wildtyp). Unter induzierten Bedingungen zeigten alle vier Mutanten diese gleichmäßige Verteilung.

Wurden die konditionellen Mutanten unter reprimierten Bedingungen angezogen, so aggregierte die mtDNA in einem Punkt der großen amorphen Mitochondrien. Die kleinen, schnellen Mitochondrien schienen keine mtDNA zu tragen (siehe Abb. 22). Vergleicht man hier die Mutanten untereinander, so war der Unterschied sehr gering. Die aggregierten Nukleoide wirkten bei *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* etwas größer als bei *mdm10_{tetOn}* und *mdm12_{tetOn}*. Dies zeigt, dass auch in *A. fumigatus* der ERMES für die Lokalisierung der mtDNA von großer Bedeutung zu sein scheint.

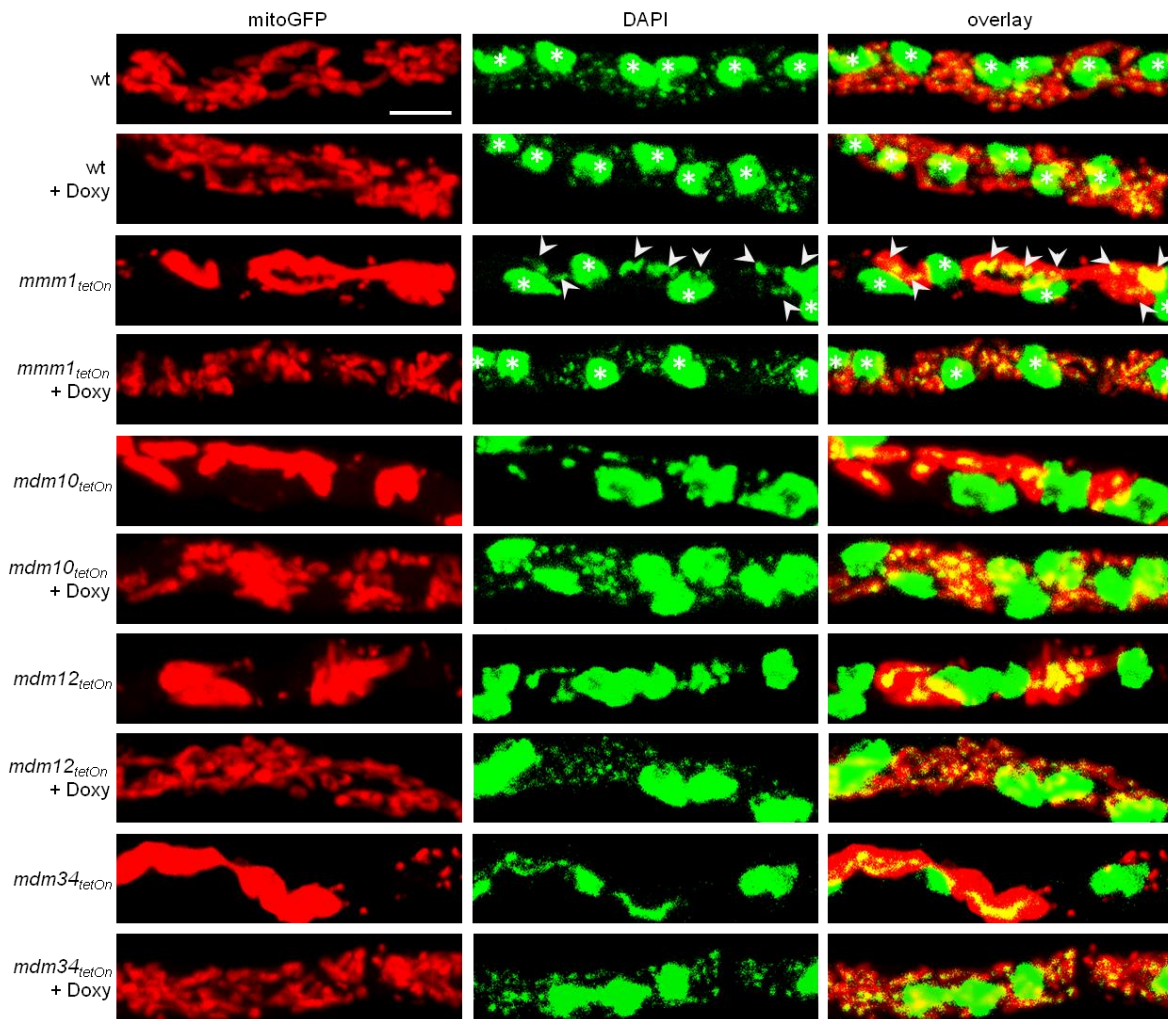


Abbildung 22: Unter reprimierten Bedingungen, zeigen die großen Mitochondrien der Mutanten *mmm1_{tetOn}*, *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}* und *mdm34_{tetOn}* aggregierte Nukleole während die kleinen Mitochondrien keine mtDNA mehr aufweisen.

In einer 24-well Platte mit Coverslips wurde flüssiges AMM mit Konidien der konditionalen Mutante *mmm1_{tetOn}*, *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}* und *mdm34_{tetOn}*, die ein mtGFP exprimierten, inokuliert. Nach 11 h bei 37 °C wurden die Hyphen fixiert und mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden sie mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die Bilder zeigen übereinandergelagerte z-Stacks und bilden so die gesamte Hyphe im Fokus ab. Zur besseren Sichtbarmachung der Ergebnisse, sind die Fluoreszenzsignale in Falschfarben dargestellt. Die linke Spalte zeigt das GFP-Signal (rot), die mittlere Spalte das DAPI-Signal (grün) und die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle. In den Abbildungen des Wildtyps und der *mmm1_{tetOn}*-Mutante wurden repräsentativ die Zellkerne mit einem Stern markiert, aggregierte Nukleole mit einem Pfeilkopf. Der weiße Balken repräsentiert 3 µm. „+Doxy“ zeigt an, dass dem Medium 10 µg ml⁻¹ Doxycyclin hinzugefügt wurde.

4.1.9 *Mmm1* ist wichtig für die Virulenz im *Galleria mellonella* Infektionsmodell

Nachdem in den vorhergehenden Experimenten gezeigt wurde, dass der Verlust des ERMES starke Auswirkungen auf die Fitness von *A. fumigatus* hat, stellte sich die Frage, nach der Bedeutung des ERMES für die Virulenz. Dies wurde in einem *Galleria mellonella* Infektionsmodell getestet. Dafür wurden die Maden mit Wildtyp ohne und mit Doxycyclin, sowie *mmm1_{tetOn}* mit und ohne Doxycyclin infiziert und dann beobachtet, wie lange die Maden überleben. Als Kontrollen wurden Maden ohne Injektion, mit ddH₂O und mit Doxycyclin in ddH₂O mitgeführt.

In den Kontrollgruppen ohne Injektion, mit ddH₂O und mit Doxycyclin in ddH₂O starben bis zum Ende des Experiments nach 144 h nur einzelne Maden. Dies zeigte, dass weder die Inkubation noch die Injektion oder das Doxycyclin Einfluss auf das Sterben der Larven hatten.

Nach 96 h waren in der „Wildtyp-Gruppe“ alle Larven tot, während in der Gruppe „infiziert mit *mmm1_{tetOn}* unter reprimierten Bedingungen“ nach 144 h noch ca. 60 % der Larven lebten (vgl. Abb. 23; *p*-Wert *mmm1_{tetOn}* vs. Wildtyp: < 0,0001).

Dieses Ergebnis passt gut zu dem schlechten Wachstum von *mmm1_{tetOn}* unter *in vitro* Bedingungen. Erstaunlich war allerdings, dass die *mmm1_{tetOn}* Mutante unter reprimierten Bedingungen trotz ihres extrem langsamen Wachstums, einen Teil ihrer Virulenz zu behalten schien und immerhin 40 % der Maden tötete.

Unter induzierten Bedingungen näherte sich die Virulenz der *mmm1_{tetOn}* Mutante wieder der des Wildtyps an. Allerdings trotz kompletter Aktivierung des Promotors, erreichte die Mutante auch unter diesen Bedingungen nicht die Virulenz des Wildstammes (*p*-Wert *mmm1_{tetOn}* vs. *mmm1_{tetOn}* + Doxy: 0,0004). So lebten nach 144 h in der Gruppe, die mit der Mutante mit Doxyzyklin infiziert war, noch ca. 25 % der Larven, wo hingegen beim Wildtyp wie oben erwähnt nach 96 h bereits alle Larven gestorben waren (*p*-Wert *mmm1_{tetOn}* + Doxy vs. Wildtyp + Doxy: 0,0606).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Verlust des ERMES die Virulenz von *A. fumigatus* reduziert wird.

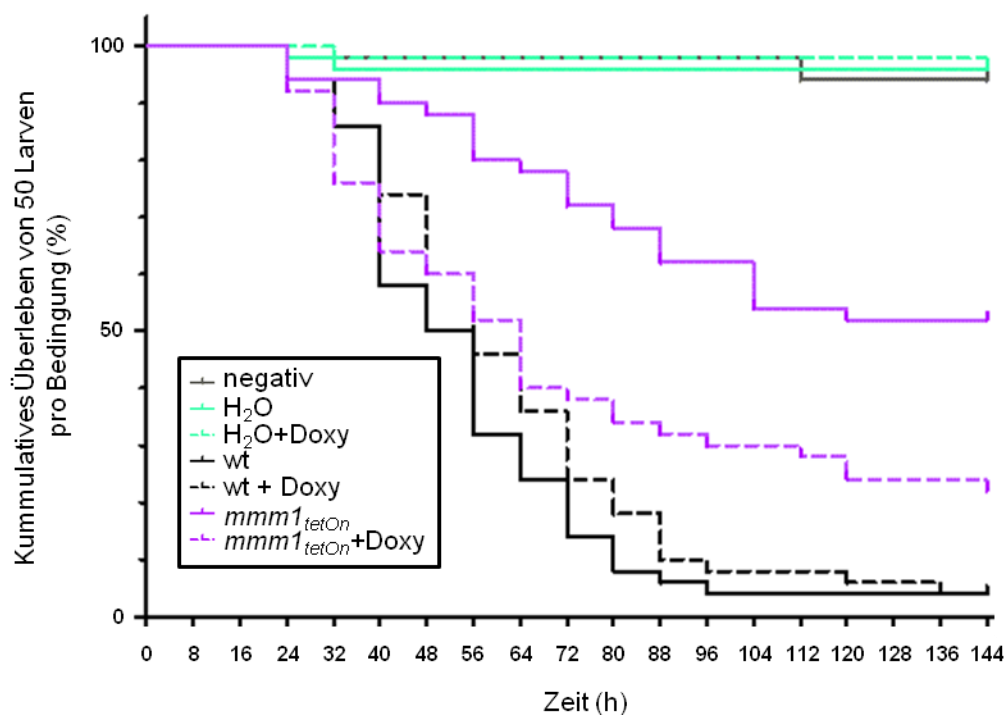


Abbildung 23: *Mmm1* ist wichtig für die Virulenz von *A. fumigatus* in einem *Galleria mellonella* Infektionsmodell.

Jeweils 10 *G. mellonella* Larven wurden mit einer Sporensuspension des wt und *mmm1_{tetOn}* (5×10^5 Konidien in Wasser für eine Larve) mit und ohne Doxyzyklin (angezeigt mit „+ Doxy“, 5 µg Doxyzyklin pro g Larve) infiziert. Als Kontrollen wurden ebenfalls 10 Larven nicht behandelt, mit 10 µl ddH₂O oder mit 10 µl ddH₂O mit 5 µg Doxyzyklin pro g Larve (+Doxy) injiziert. Die Larven wurden im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Alle 8 h wurde gezählt, wie viele Larven lebten. Die Abbildung zeigt das Überleben der einzelnen Gruppen und ist eine Zusammenfassung aus 5 Experimenten (50 Larven für eine Bedingung). *p*-Wert für *mmm1_{tetOn}* vs. wt: < 0,0001; *p*-Wert für *mmm1_{tetOn}* vs. *mmm1_{tetOn}* + Doxy: 0,0004; *p*-Wert für *mmm1_{tetOn}* + Doxy vs. wt + Doxy: 0,0606.

4.2 Azol induzierter Zelltod von *A. fumigatus* auf zellulärer Ebene

Bei der Untersuchung der Fusions- und Fissionsmaschinerie der Mitochondrien von *A. fumigatus*, konnte von Neugebauer *et al.* 2015 gezeigt werden, dass sowohl die Fissions- als auch die Fusions-/ Fissions-Doppelmutante $\Delta dnm1\ mgm1_{tetOn}$ im Vergleich zum Wildtyp resistenter gegenüber Azolen sind [129].

Basierend auf den Ergebnissen wurde vermutet, dass durch die dysfunktionalen Mitochondrien der Mutanten, entweder die intrazelluläre Azol-Konzentration vermindert, die Inhibition der Lanosterol-14 α -Demethylase reduziert oder die tödlichen Auswirkungen des Ergosterolmangels herabgesetzt würden [99]. Im Folgenden wurde das Verhalten des mitochondrialen Netzwerks bei Azol Behandlung *in vitro* näher betrachtet, um den Zusammenhang von mitochondrialer Dysfunktion und Azolresistenz genauer zu verstehen.

4.2.1 Die Membranintegrität von *A. fumigatus* wird durch die Behandlung mit Voriconazol destabilisiert

Der Einfluss von Azolen auf das mitochondriale Netzwerk wurde in *A. fumigatus* Hyphen *in vitro* untersucht. Die Resistenz eines Pilzes gegenüber einem Antimykotikum wird in der Medizin mittels der minimalen Hemmkonzentration bestimmt. Sie stellt die kleinste Wirkstoffkonzentration einer antimikrobiellen Substanz dar, welche das visuelle Wachstum verhindert (Englisch *minimal inhibitory concentration*, Abk. MIC) [179]. Die Wirkung von Antimykotika kann sich zwischen Konzentrationen etwas bzw. weit über der MIC unterscheiden. Beispielsweise bei Echinocandinen kann es bei Konzentrationen weit oberhalb der MIC zu „paradoxem Wachstum“ kommen [180]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Azole auf das mitochondriale Netzwerk sowohl bei einer Konzentration nahe der minimalen Hemmkonzentration als auch bei einer sehr hohen Konzentration untersucht. Auf Grundlage früherer experimenteller Daten wurde 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, als Konzentration nahe der minimalen Hemmkonzentration und 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ als hohe und sicher tödliche Konzentration ausgewählt [129].

Für die Untersuchung der Mitochondrien in den Hyphen wurden wt Sporen, die ein GFP mit mitochondrialer Signalsequenz exprimieren [129], 9 h ausgekeimt. Anschließend wurden die Hyphen 0,4 oder 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol ausgesetzt und für weitere 13 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne Hyphen wurden über diesen Zeitraum mittels eines konfokalen Lasermikroskops beobachtet.

Die Analyse der aufgenommenen Videos (GFP-Fluoreszenz und Durchlicht) zeigte drei Beobachtungen:

- I. Unabhängig von der Azol-Konzentration wuchsen die beobachteten Hyphen, innerhalb der ersten Stunde der Co-Inkubation in nahezu derselben Geschwindigkeit weiter wie zuvor. Das mitochondriale Netzwerk zeigte weder eine Veränderung in seiner Morphologie noch in seiner Dynamik [181].
- II. Nach ca. einer Stunde Co-Inkubation konnte bei allen Hyphen, die mit 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol inkubiert waren, und bei ca. 80 % der Hyphen, die mit 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt wurden, ein Wachstumsarrest beobachtet werden.

- III. Nach dem Wachstumsarrest konnte in den folgenden 1-2 h ein Anschwellen einzelner Kompartimente der Hyphen beobachtet werden. Die Morphologie und Dynamik des mitochondrialen Netzwerks zeigten weiterhin keine Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Hyphen.

Nach 5 h Inkubation der Hyphen mit beiden Voriconazol-Konzentrationen wurden drei Ereignisse innerhalb der Hyphen beobachtet (siehe Abb. 24 A-C):

- I. Es kam zu einer Explosion der Zellmembran und Zellwand einiger Hyphenkompartimente, wodurch das Zytoplasma der Zelle zusammen mit den Mitochondrien nach außen geschleudert wurde.
- II. Ein plötzliches Fragmentieren des normalerweise tubulären mitochondrialen Netzwerks einiger Kompartimente setzte ein.
- III. Eine plötzliche Lyse der Mitochondrien in einigen Kompartimente der Hyphe konnte beobachtet werden.

Eine detaillierte Analyse der Videos ergab, dass sowohl dem Fragmentieren als auch dem Lysieren der Mitochondrien ein plötzliches Schrumpfen des jeweiligen Kompartiments unmittelbar vorausging. Das Schrumpfen wurde durch eine leichte Bewegung der Hyphe angezeigt. Darauf folgend fragmentierten oder lysierten die Mitochondrien dieser Kompartimente sofort und deren Fluoreszenz verblasste im Verlauf der nächsten Stunden langsam.

Alle drei beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks zeigten den Zelltod des betroffenen Kompartiments an [182]. Das Fragmentieren der Mitochondrien und die Lyse der äußeren mitochondrialen Membran sind beides Merkmale der induzierten Apoptose in *S. cerevisiae* [183].

Gleichzeitig stellen das beobachtete Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand und das Schrumpfen der Hyphe deutliche Anzeichen für den Verlust der Membranintegrität und der damit verbundenen Zellintegrität dar. Dieser Schaden führt zum Verlust des Zellmilieus und damit zum Tod. Daher lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass Azole initial zu einem Wachstumsarrest, dann verzögert zu einem Zellwandintegritätsverlust und Tod einzelner oder mehrere Kompartimente einer Hyphe führen.

Darüber hinaus zeigten die aufgenommenen Videosequenzen, dass sich der Zeitpunkt des Absterbens zwischen einzelnen Kompartimenten einer Hyphe unterscheiden kann. Dies lieferte einen Hinweis, dass Septen nicht nur bei der Behandlung von *A. fumigatus* mit Echinocandinen eine Rolle spielen könnten [24,168], sondern ebenfalls bei der Behandlung mit Azolen.

4.2.2 Abhängigkeit der beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren oder Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand) von der Azol-Konzentration

Die Abhängigkeit der oben beschriebenen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks, die zum Zelltod führen, mit den eingesetzten Azol-Konzentrationen, sollte untersucht werden. Für diesen Versuch wurden wt-Sporen für 9 h bei 37 °C ausgekeimt und anschließend mit denselben Voriconazol-Konzentrationen, wie im vorhergehenden Versuch behandelt (0,4 µg ml⁻¹ Voriconazol als Konzentration nahe der MIC und 1,27 µg ml⁻¹ Voriconazol als hohe und sicherlich tödliche Konzentration [129]) Anschließend wurden sie für weitere 13 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne Hyphen wurden mittels konfokaler

Mikroskopie (GFP-Fluoreszenz und Durchlicht) aufgenommen. Anschließend wurden die Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks der einzelnen Kompartimente quantifiziert (siehe Abb. 24 D).

Bei $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol starben ca. die Hälfte der Kompartimente durch die Explosion der Zellmembran und der Zellwand. Ca. 10 % der Hyphen starben durch einen Verlust der Zellmembranintegrität und dem dadurch ausgelösten Zelltod mit dem apoptotischen Merkmal der Fragmentierung der Mitochondrien. Ca. 15 % der Hyphen starben durch einen Verlust der Zellmembranintegrität und dem dadurch ausgelösten Zelltod mit dem apoptotischen Merkmal der Lyse der Mitochondrien. Außerdem überlebten ca. 15 % der Kompartimente 13 h Voriconazol-Behandlung.

Im Gegensatz dazu starben bei einer Konzentration von $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol ca. 70 % der Kompartimente durch einen Verlust der Zellmembranintegrität und dem dadurch ausgelösten Zelltod mit dem apoptotischen Merkmal der Lyse der Mitochondrien und ca. 30 % durch einen Verlust der Zellmembranintegrität und dem dadurch ausgelösten Zelltod mit dem apoptotischen Merkmal der Fragmentierung der Mitochondrien. Bei dieser hohen Azol-Konzentration überlebten keine Kompartimente 13 h Inkubation.

Dieser Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Azol-Konzentration einen Einfluss auf die Art des Absterbens der Hyphen Kompartimente hat.

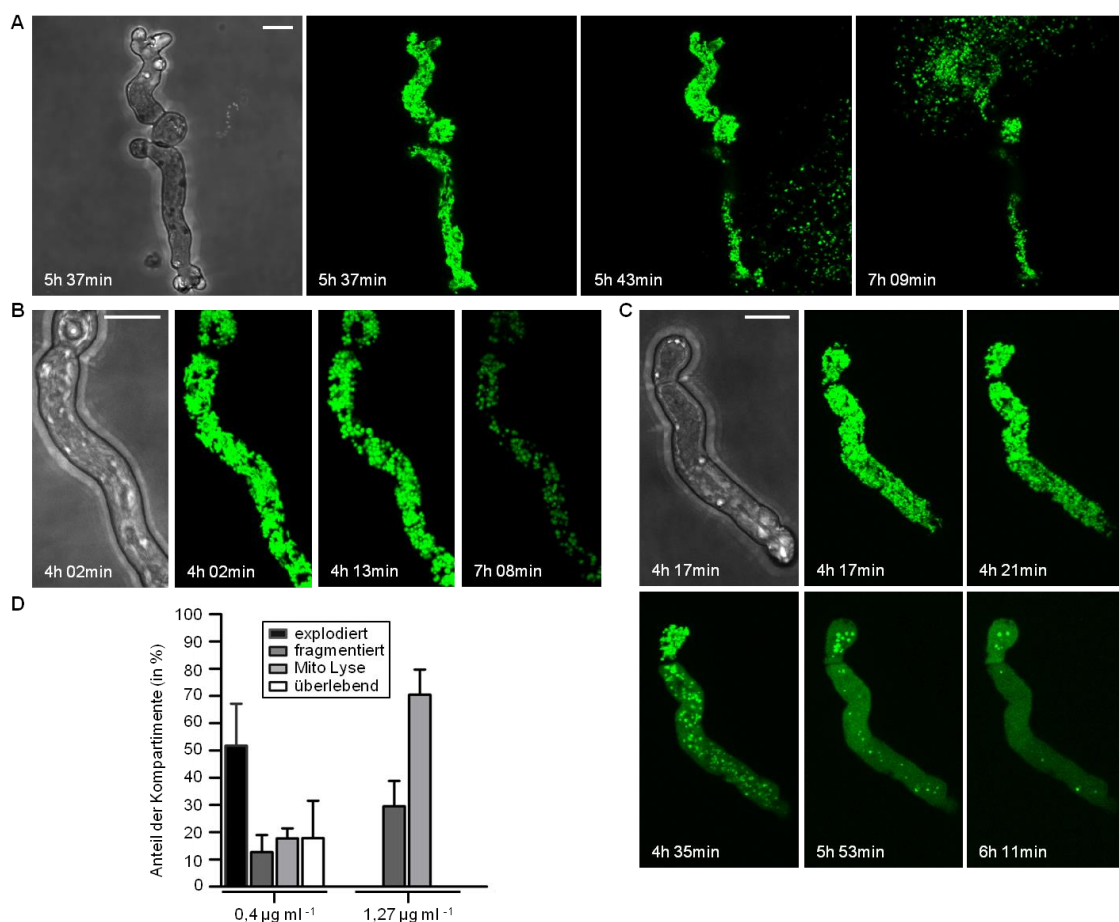


Abbildung 24: Zellwandintegritätsverlust ausgelöst durch Voriconazol führt zu 3 verschiedenen Absterbevarianten. (A-D) 6×10^4 wt Sporen, die ein mtGFP exprimieren, wurden für 9 h bei 37°C in SAB ausgekeimt. Nach 9 h wurde entweder $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (A, D) oder $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ (B, C und D) Voriconazol dem Medium hinzugefügt. (A-C) Einzelne Hyphen wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskops ca. alle 5 min über 13 h aufgenommen. Zu sehen sind ausgewählte Durchlicht- und GFP-Fluoreszenz-Bilder. Die Bilder zeigen übereinandergelegte z-Stacks und bilden so die gesamte Hyphe ab. Der Größenbalken in den Abbildungen entspricht $10 \mu\text{m}$ und gilt für alle Bilder einer Hyphe. (D) Quantifizierung der beobachteten Absterbevarianten. Etwa 160 Hyphen Kompartimente wurde für jede Konzentration über 13 h analysiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.2.3 Azole lösen eine verzögerte Aktivierung des Zellwandintegritätswegs aus

Die verschiedenen beobachteten Absterbevarianten, deuteten alle darauf hin, dass *A. fumigatus* bei Behandlung mit Azolen durch den Verlust seiner Membranintegrität stirbt. Dies ähnelt dem Effekt der Echinocandine [24,84], deren fungistatische Wirkung auf der Hemmung der β -1,3-Glukansynthase beruht. Die daraus resultierende Destabilisierung der Zellwand führt zu einem Aufplatzen der Zellen und aktiviert den Zellwandintegritätsweg [24,84,168,185]. Daraus ergab sich die Frage, ob Azole ebenfalls den Zellwandintegritätsweg aktivieren.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Reporterkonstrukt bestehend aus dem Promotor des *agsA* Gens aus *A. niger* und einer durch ihn regulierten Luciferase genutzt. Das *agsA* Gen kodiert in *A. niger* eine 1,3- α -D-Glukansynthase, die durch den Zellwandintegritätsweg aktiviert wird [186]. Die Aktivierung des Zellwandintegritätsweges führt im Reporterkonstrukt zur Expression der Luciferase, die unter ATP-Verbrauch im Medium vorhandenes Luciferin in Lumineszenz umsetzt.

Für diesen Versuch wurden *A. fumigatus* Sporen, die dieses Konstrukt trugen, in AMM oder SAB für 7 h bei 37 °C in einer Mikrotiterplatte ausgekeimt. Anschließend wurde Voriconazol in den Konzentrationen 0; 3; 1,27; 0,71 und 0,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Konzentrationen angelehnt an die Versuche in [129]) und 4 mM Luciferin hinzugefügt und die Mikrotiterplatte im CLARIOstar Plus bei 37 °C für weitere 13 h inkubiert. Während dieser Zeit wurde die emittierte Lumineszenz jeder Vertiefung der Platte ca. alle 5 min gemessen. Die Ergebnisse einer Messung in AMM und in SAB sind in Abb. 25 dargestellt.

Die aufgenommenen Lumineszenz-Messungen zeigten für die fünf untersuchten Voriconazol-Konzentrationen sowie beide Medien einen vergleichbaren Kurvenverlauf über die Zeit. Erst nach 6 h Inkubation waren Unterschiede der Kurven in beiden Medien erkennbar und dies sowohl in der Intensität des Signals als auch im Verlauf der Kurven.

Die höchste Intensität der gemessenen Lumineszenz zeigten in beiden Medien die Hyphen, die mit 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt wurden. Die Intensität der Lumineszenz nahm mit der Azol-Konzentration in beiden Medien ab. Zusätzlich war die gemessene Intensität der Lumineszenz der Mikrokolonien in SAB höher als die der Mikrokolonien in AMM.

Der Verlauf der gemessenen Lumineszenz zeigte nach 2 h Co-Inkubation (Gesamt-Inkubationszeit 9 h) einen Anstieg der emittierten Lumineszenz und dies unabhängig von der Konzentration des Voriconazols. Dies wies darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt der Zellwandintegritätsweg und damit der Promotor des *agsA* Gens durch Zellwandstress aktiviert wurde.

In der darauffolgenden Zeit stieg die Lumineszenz immer weiter an, bis sie nach 3 h bis 4 h Co-Inkubation mit Voriconazol ihren Höhepunkt erreichte. Nach diesem Höhepunkt fiel die Lumineszenz bis 6 h nach Zugabe des Azols stetig ab. In SAB wurde bei allen getesteten Azol-Konzentrationen mit Ausnahme von 0,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nach 6 h keine Lumineszenz mehr detektiert. Bei 0,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fiel die Lumineszenz auf ein bestimmtes Level ab und blieb dann nahezu konstant bis zum Ende der Messung.

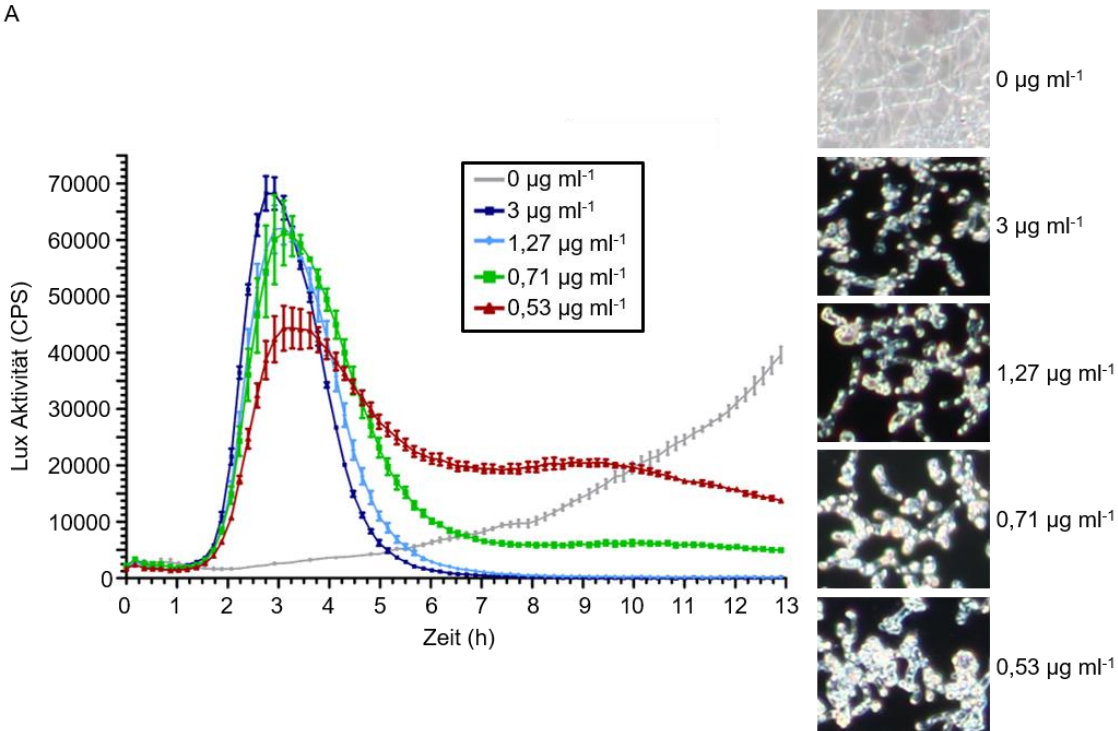
In AMM fiel die Lumineszenz bei den Voriconazol-Konzentrationen 3 und 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nach 6 h Co-Inkubation ebenfalls auf 0 ab. Bei 0,71 und 0,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol fiel die Lumineszenz auf ein basales Level ab, verblieb ca. 1 - 2 h auf diesem Niveau und begann dann bis zum Ende der Messung wieder anzusteigen.

Der einheitliche Kurvenverlauf deutet darauf hin, dass der zeitliche Verlauf der Voriconazol Wirkung unabhängig von der Konzentration des Azols ist. Der Anstieg der Lumineszenz nach 2 h lässt den Schluss zu, dass zu diesem Zeitpunkt der Zellwandintegritätsweg durch alle getesteten Voriconazol-Konzentrationen aktiviert wurde. 3 – 4 h nach Zugabe des Azols begannen vermutlich Hyphen zu sterben, wodurch die gemessene Lumineszenz sank, bis nach 6 h Co-Inkubation alle Hyphen tot waren. Da bei $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ in SAB wahrscheinlich einige Hyphen überlebten, fiel hier die Lumineszenz nicht komplett auf 0 ab. Dies stimmt mit den zugehörigen Bildern, die nach den Messungen von den Kulturen aufgenommen wurden, überein (siehe Abb. 25).

Die in den AMM-Kulturen gemessenen Kurven zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die in SAB gewachsenen Kulturen. Das deutet darauf hin, dass die Aktivierung des Zellwandintegritätsweges in beiden Medien ähnlich ablief. Bei $0,71$ und $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol zeigte sich 6 h nach Zugabe des Azols ein Unterschied in der gemessenen Lumineszenz. Hier fiel die gemessene Lumineszenz nicht auf 0 ab und stieg nach einer Stagnationsphase von ca. 1 - 2 h wieder stetig bis zum Ende der Messung an. Die Umsetzung von Luciferin in Lumineszenz erfordert ATP. Aus diesem Grund lässt der fehlende Abfall auf 0 vermuten, dass ein gewisser Anteil der Hyphen die Behandlung mit Voriconazol überlebte.

Der Anstieg der Lumineszenz im weiteren Verlauf der Messung, könnte damit erklärt werden, dass eine basale Aktivität des *agsA* Promotors auch ohne Aktivierung des Zellwandintegritätsweges vorhanden war. So fand eine geringe Expression der Luciferase statt, wie es bei Doxzyklin-induzierbaren Promotoren bereits beobachtet wurde [174]. Auf Grund der zugewachsenen Kulturen, könnte vermutet werden, dass die Hyphen, die den Azol-Stress überlebten, nach 2 h Arrest weiterwuchsen. So wurde durch die Erhöhung der Biomasse der Umsatz an Luciferin durch die basal exprimierten Luciferase immer weiter gesteigert.

A



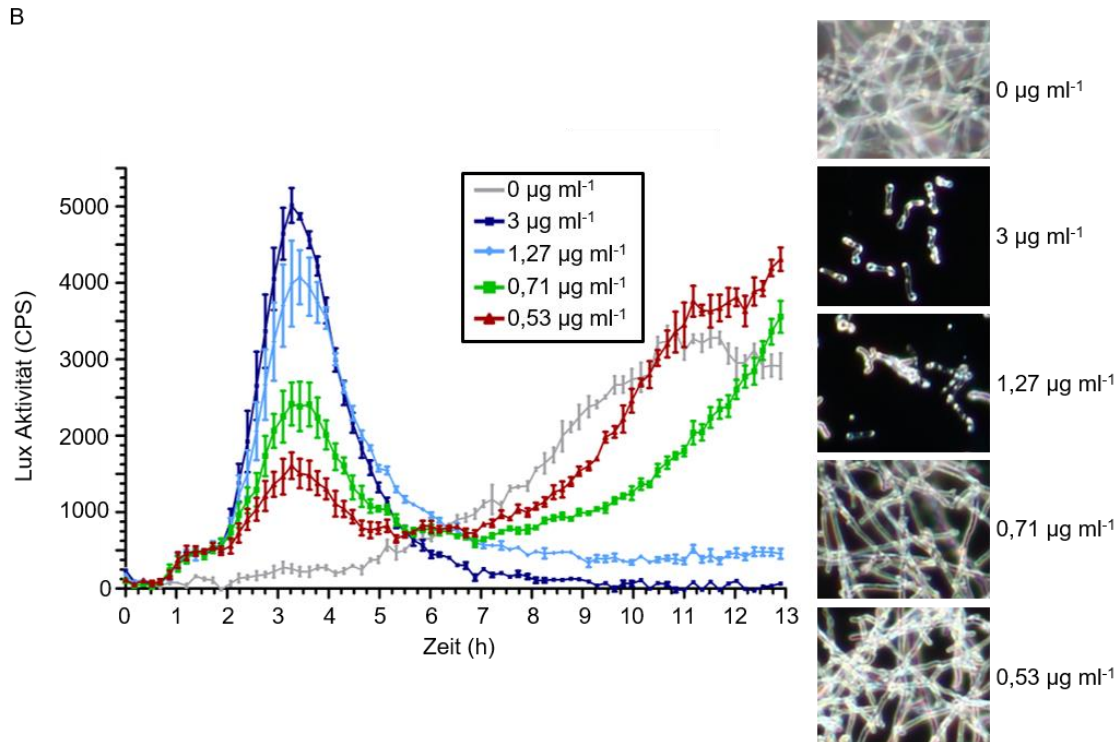


Abbildung 25: Azole lösen eine verzögerte Aktivierung des Zellwandintegritätswegs aus in (A) SAB und (B) AMM.

A. fumigatus Sporen, die ein Luciferase-Reporterkonstrukt unter dem *agsA* Promotor von *A. niger* exprimierten, wurden in (A) SAB und (B) AMM in einer Mikrotiterplatte 7 h bei 37 °C ausgekeimt. Anschließend wurde Voriconazol in den Konzentrationen 0, 3, 1,27, 0,71 und 0,53 µg ml⁻¹ und 4 mM Luciferin hinzugefügt. Für die folgenden 13 h wurde die entstehende Lumineszenz mit einem CLARIOstar Plus gemessen. Nach 17 h Inkubation mit Voriconazol wurden exemplarische Fotos der gemessenen Kulturen aufgenommen, diese sind neben den Diagrammen zu sehen.

4.2.4 Septen verlängern die Überlebenszeit von Voriconazol-behandelten Hyphen

Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass Azole die Zellwandintegrität des Pilzes beeinträchtigen. Wie bereits erwähnt, stellt dies eine Parallele zur Wirkung der Echinocandine dar. Für diese Wirkstoffe konnte gezeigt werden, dass Septen eine wichtige Rolle für das Überleben des Pilzes spielen. Die Inhibierung der β -1,3-Glukansynthase führt zu geschwollenen, kurzen und stark verzweigten Hyphen mit dickerer Zellwand, von denen einige lysieren [187,188]. Durch Septen wird die Schädigung der Hyphen auf wenige, direkt betroffene Kompartimente beschränkt [167,189]. Bei der Behandlung mit Azolen kommt es unter anderem ebenfalls zur Lyse von Hyphen (siehe Kapitel 4.2.1). Dies warf die Frage auf, ob Septen ebenfalls zum Überleben von *A. fumigatus* in Gegenwart von Azolen beitragen.

Für diese Fragestellung wurde das Überleben von Hyphen des Wildtyps, der $\Delta\rho4$ Mutante und deren Komplementante $\Delta\rho4 + \rho4$ unter Azol-Stress verglichen. Rho4 gehört zu den Rho-GTPasen und spielt während der Zytokinese eine wichtige Rolle. Es lagert sich an den Stellen der Septum-Bildung an und kontrolliert dort die Bindung und Entstehung des Aktin-Rings. Ohne Rho4 kann dieser Prozess nicht stattfinden, wodurch $\Delta\rho4$ keine oder nur wenige Septen bildet [168,190,191]. Alle drei Stämme exprimierten ein zytosolisches GFP.

Für den Versuch wurden Sporen aller drei Stämme 11 h ausgekeimt und dann für 5 h 1,27 µg ml⁻¹ Voriconazol ausgesetzt. Anschließend wurden die partiell lebendigen (mind. 1 lebendes Kompartiment), die komplett intakten (alle Kompartimente sind noch lebendig) und die toten Hyphen der jeweiligen Stämme ausgezählt (siehe Abb. 26).

Sowohl wt als auch die Komplementante $\Delta rho4 + rho4$ wiesen nach 5 h Co-Inkubation ca. 60-70 % Hyphen auf, bei denen noch mind. 1 Kompartiment lebendig war und ca. 5 % bei denen die komplette Hyphe noch lebendig war. Von den $\Delta rho4$ Hyphen lebten nur noch ca. 5 %. Diese waren alle komplett intakt. Die Anzahl der lebenden Hyphen der $\Delta rho4$ Mutante, entsprach in etwa dem Anteil der komplett intakten Hyphen des wt und der Komplementante.

Dies legte den Schluss nahe, dass Septen eine Rolle beim Überleben unter Azol-Stressbedingungen zukommt und dass sie die Überlebenszeit von *A. fumigatus* Hyphen bei einer tödlichen Voriconazol-Konzentration verlängern können. Dieser Effekt zeigte sich allerdings zeitlich begrenzt. Da diese Voriconazol-Konzentration deutlich über der MIC lag [129], starben nach einer verlängerten Inkubation alle Hyphen des wt als auch der $\Delta rho4$ Mutante und deren Komplementante $\Delta rho4 + rho4$.

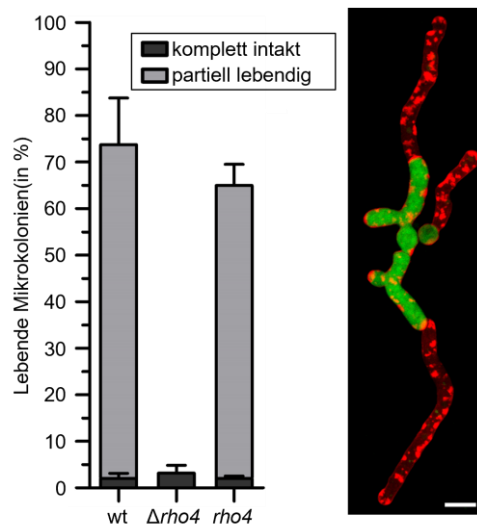


Abbildung 26: Septen verlängern die Überlebenszeit von *A. fumigatus* Hyphen unter Voriconazol-Stress.

A. fumigatus wt, $\Delta rho4$ - und $\Delta rho4 + rho4$ Sporen, die ein zytosolisches GFP exprimierten, wurden für 11 h bei 37 °C in SAB ausgekeimt. Dann wurden dem Medium $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphen für weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit Trypanblau gefärbt. Trypanblau kann durch seine negative Ladung nur in tote Zellen eindringen und in diesen die noch vorhandene GFP-Fluoreszenz quenchen. [175]. Die Hyphen mit mind. einem lebendigen Kompartiment (partiell lebendig) und komplett intakte Hyphen wurden anonymisiert ausgezählt. Pro Stamm wurden insgesamt ca. 400 Hyphen gezählt. Das Balkendiagramm zeigt das Ergebnis eines Experiments. Die Fehlerbalken im Diagramm zeigen die Standardabweichung. Auf der rechten Seite wird ein exemplarisches Fluoreszenzbild einer teilweise lebendigen wt Hyphe gezeigt. Das Bild zeigt übereinandergelagerte z-Stacks und bildet so die gesamte Hyphe ab (grün, GFP; rot, Trypanblau). Im toten Kompartiment der Hyphe wurden durch das Trypanblau Ablagerungen, die sich scheinbar an der Zellwand befinden, eingefärbt. Es ist zu vermuten, dass es sich dabei um Chitin oder Glukan handelt [175]. Der Größenbalken im Bild entspricht 10 μm .

4.2.5 Die Behandlung mit Azolen führt zur Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten

Die Trypanblau-Färbung im vorhergehenden Experiment zur Rolle der Septen in Azol-behandelten Hyphen färbte zusätzlich zur Löschung des GFP-Signals in den toten Kompartimenten rundliche Strukturen innerhalb der Hyphen an (vgl. Abb. 26).

In der Literatur wurde beschrieben, dass Trypanblau Zellwandkohlenhydrate anfärben kann [175]. Dies ließ vermuten, dass es sich bei den eingefärbten Strukturen um Zellwandkohlenhydrate handeln könnte. Um diese Ablagerungen genauer zu charakterisieren, wurden zwei Färbemethoden angewendet, die spezifisch Zellwandbestandteile anfärben:

1. Calcofluorweiß (Abk. CFW) ist eine fluoreszierende Substanz oder optischer Aufheller. Dieser Farbstoff bindet an β -1,3- oder β -1,4-Polysaccharide, die zum Beispiel in Cellulose oder Chitin

vorkommen. Bei Anregung mit UV-Strahlung, fluoresziert der Farbstoff in einer intensiven weiß/blauen Farbe [192].

2. Anilinblau ist ein Fluorochrom, das spezifisch an β -1,3-Glukan bindet und bei einer Anregung mit Licht zwischen ca. 360 bis 370 nm grün-gelblich fluoresziert (ca. 495 nm). Ist kein 1,3-Glukan in der Zellwand vorhanden, so fluoresziert die Zellwand unspezifisch bläulich [180,193].

4.2.5.1 Voriconazol-Exposition führt zu Chitin-Ablagerung in *A. fumigatus* Hyphen

Mittels CFW-Färbung wurde untersucht, ob die beobachteten Azol-induzierten Ablagerungen Chitin enthalten. Wt Sporen eines *A. fumigatus* Stammes, der ein mtGFP exprimierte, wurden 10 h in auf Deckgläschen ausgekeimt. Anschließend wurden die Hyphen mit $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Kontrolle), $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ oder $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol 5 h co-inkubiert, fixiert und CFW-gefärbt. Die fixierten Hyphen wurden mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops analysiert (siehe Abb. 27).

Die unbehandelten Hyphen zeigten ein tubuläres mitochondriales Netzwerk, sowie eine gleichmäßig CFW-gefärbte Zellwand und Septen (Chitin). Das mitochondriale Netzwerk, der mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelten Hyphen, war größtenteils fragmentiert und einige Hyphen zeigten eine zytosolische GFP-Fluoreszenz. Die Hyphen, die mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt wurden, zeigten meist eine zytosolische GFP-Fluoreszenz, während einige ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk aufwiesen.

Die CFW-Färbung zeigte bei allen mit Voriconazol behandelten Hyphen Chitin-Ablagerung an der Zellwand bzw. Zellmembran. Die eingefärbten Strukturen entsprachen in Menge, Auftreten und Aussehen, den mit Trypanblau-angefärbten Strukturen des vorhergehenden Experiments.

Dies zeigt, dass die durch Azole hervorgerufenen Ablagerungen zu einem signifikanten Teil aus Chitin bestehen.

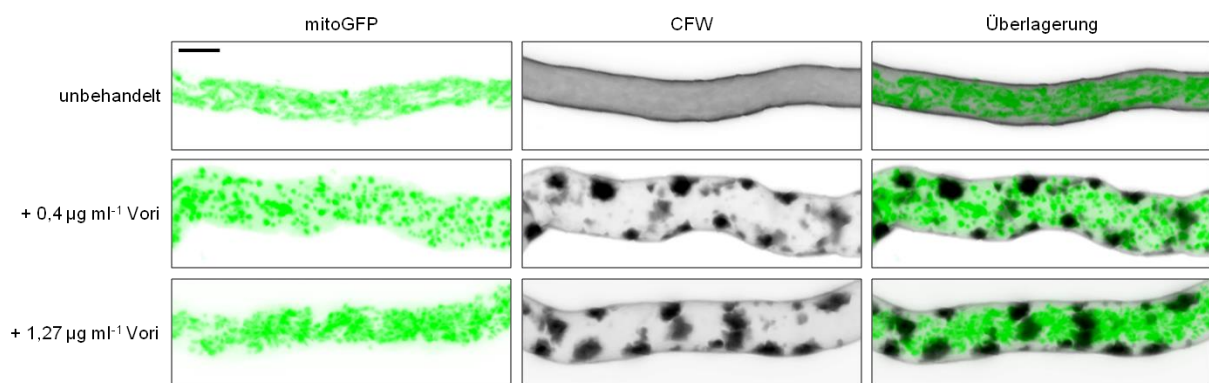


Abbildung 27: Voriconazol-Exposition führt zu Chitin-Ablagerung in *A. fumigatus* Hyphen.

A. fumigatus Sporen, die ein mtGFP exprimierten, wurden auf Deckgläschen in SAB für 10 h bei 37 °C ausgekeimt. Anschließend wurde 0 ; $0,4$ oder $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt und nach weiteren 5 h Co-Inkubation wurden die Hyphen mit Formaldehyd fixiert, mit CFW-gefärbt und mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die Bilder zeigen übereinandergelegte z-Stacks und bilden so die gesamte Hyphe ab. Gezeigt werden die Mitochondrien (GFP, linke Spalte), Chitin (CFW-Färbung, mittlerer Spalte) und die Überlagerung beider Kanäle (rechter Spalte). Der Größenbalken im Bild entspricht $10 \mu\text{m}$ und gilt für alle gezeigten Bilder.

4.2.5.2 Voriconazol-Exposition führt zu Glukan-Ablagerung in *A. fumigatus* Hyphen

Die CFW-Färbung zeigte, dass die durch Azole ausgelösten Ablagerungen Chitin enthalten. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Ablagerungen ebenfalls β -1,3-Glukan, den Hauptbestandteil der *Aspergillus*-Zellwand, enthalten [168]. Ausgekeimte Hyphen des wt und einer Mutante, deren β -1,3-Glukansynthase Gen unter der Kontrolle eines Doxyzyklin-induzierbaren Promotors stand (*fks1_{tetOn}* [167], unter reprimierten Bedingungen), wurden für 8 h in SAB ausgekeimt und anschließend mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt. Nach 10 h Co-Inkubation wurden die Hyphen fixiert und mit Anilinblau gefärbt [169]. Die *fks1_{tetOn}* Mutante unter reprimierten Bedingungen diente dabei als Kontrolle für die β -1,3-Glukan-spezifische Färbung. Die Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Veronika Loiko durchgeführt. Wie in der Arbeit von V. Loiko beschrieben [169], fluoresziert die durch Anilinblau angefärbte Zellwand von *A. fumigatus* wt bei Anregung Glukan-spezifisch grün. Das Fehlen von β -1,3-Glukan wird durch eine unspezifische blaue Fluoreszenz angezeigt.

Abb. 28 zeigt Aufnahmen der Anilinblau-Fluoreszenz und das Durchlichtbild von Hyphen des wt und der *fks1_{tetOn}* Mutante nach Azol-Exposition. Während die *fks1_{tetOn}* Hyphen unspezifisch blau fluoreszierten, zeigten die wt Hyphen eine grüne Fluoreszenz. Die Ablagerungen in den wt Hyphen waren ebenfalls grün-fluoreszierend zu sehen. Dies bestätigte, dass die Ablagerungen, die durch Voriconazol in den Hyphen entstehen, neben Chitin ebenfalls Glukan enthalten.

Diese Experimente zeigten, dass die durch Azol ausgelösten Ablagerungen die beiden wichtigsten Zellwandkohlenhydrate β -1,3-Glukan und Chitin enthalten.

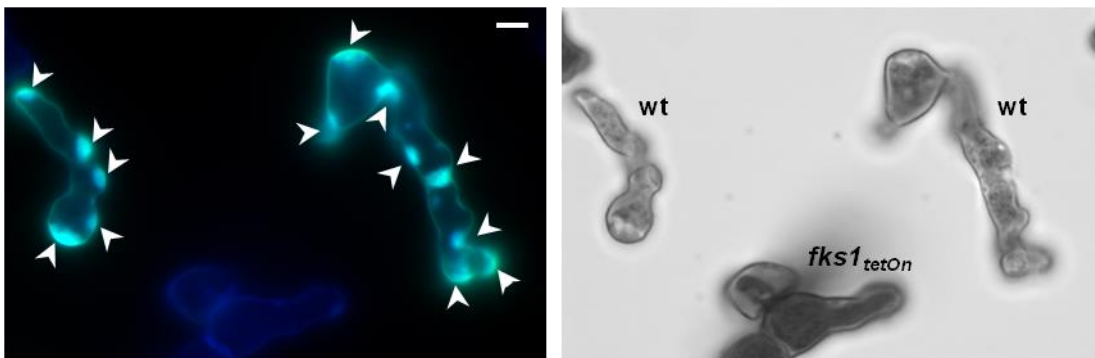


Abbildung 28: Durch Azole induzierte Ablagerungen an der Zellwand von *A. fumigatus* enthalten Glukan.

Sporen von *A. fumigatus*, die ein zytosolisches GFP exprimierten, wurden zusammen mit Sporen einer konditionelle β -1,3-Glukan Synthase Mutante (*fks1_{tetOn}*) unter reprimierten Bedingungen auf Deckgläschen in SAB bei 37°C ausgekeimt. Nach 8 h wurden sie mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt und weitere 10 h inkubiert. Anschließend wurden die Hyphen fixiert, mit Anilinblau gefärbt und direkt mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Veronika Loiko durchgeführt. Im linken Bild wird die Glukan-spezifische (grün) und -unspezifische (*fks1_{tetOn}*; blau) Fluoreszenz gezeigt. Das rechte Bild zeigt den Durchlicht-Kanal. Im Durchlichtbild sind die Hyphen der verschiedenen Stämme gekennzeichnet. Die Maßpfeile markieren die Glukan-Ablagerungen des wt. Der Größenbalken entspricht $5 \mu\text{m}$ gilt für beide Bilder.

4.2.6 Die Bildung der Zellwand-Ablagerung korreliert mit der Aktivierung der Zellwandstress-Antwort in *A. fumigatus*

Sowohl der mittels des Ags/Lux-Reporterkonstrukts nachgewiesene Zellwandstress als auch das Auftreten der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerung folgten nicht direkt nach Voriconazol-Exposition, sondern traten erst zeitlich versetzt auf.

Um einen möglichen Zusammenhang des Auftretens der Ablagerungen mit dem zeitlichen Verlauf des Zellwandstresses zu untersuchen, wurden *A. fumigatus* wt Sporen für 7 h ausgekeimt und anschließend

mit verschiedenen Konzentrationen an Voriconazol behandelt (0,53, 0,71, 1,27 oder 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ angelehnt an den Versuch aus Kapitel 4.2.3). Nach 2, 3 und 5 h Co-Inkubation wurden die Hyphen fixiert, CFW-gefärbt und anschließend der Anteil der Hyphen mit Ablagerungen quantifiziert.

Hierbei wurden die Hyphen, die nur eine Zellwandkohlenhydrat-Ablagerung in der Hyphenspitze zeigten, nicht gezählt, da an dieser Stelle auch in unbehandelten Hyphen solche Ablagerungen gefunden werden können [180]. Die untersuchten Zeitpunkte markieren den Beginn, den Höhepunkt und das Ende des Zellwandstresses im Versuch mit dem Ags/Lux-Reporter.

In Abb. 29 sind die prozentualen Anteile der Hyphen gezeigt, die zum untersuchten Zeitpunkt bei der jeweiligen Voriconazol-Konzentration Ablagerungen aufwiesen. Nach 2 h Co-Inkubation waren bei allen vier Konzentrationen in unter 10 % der Hyphen Ablagerungen nachweisbar. Nach 3 h Co-Inkubation wiesen ca. 78 % der Hyphen bei 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ und ca. 71 % bei 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ablagerungen auf. Im Gegensatz dazu waren bei 0,71 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol nur ca. 35 % und bei 0,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nur ca. 19 % der Hyphen betroffen. Nach 5 h zeigten in allen untersuchten Voriconazol-Konzentrationen fast 100 % der Hyphen Chitin Ablagerungen. Die Anzahl der Ablagerungen nahm umso schneller zu, je höher die Konzentration an Voriconazol war.

Dies zeigt, dass die Zeit des Auftretens und die Anzahl der Ablagerungen von der verwendeten Azol-Konzentration abhängen. Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass zwischen den Ablagerungen und dem Zellwandstress ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte.

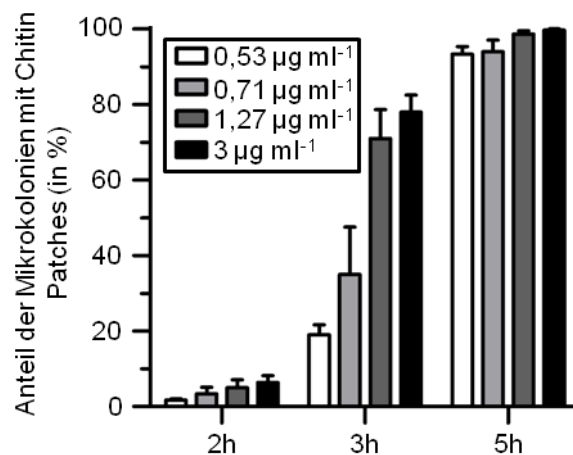


Abbildung 29: Die Geschwindigkeit des Auftretens Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen ist abhängig von der Höhe der Voriconazol-Konzentration und fällt zeitlich mit dem Beginn des Zellwandstresses zusammen.

Wt-Sporen wurden 7 h in SAB ausgekeimt (vgl. Kapitel 4.2.3) und dann dem Medium 0,53; 0,71; 1,27 oder 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt. Nach 2, 3 und 5 h Co-Inkubation wurden die Hyphen fixiert und CFW-gefärbt. Die Anzahl der Hyphen mit Chitin-Ablagerungen wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Hyphen mit einer einzelnen Ablagerung in der Hyphenspitze wurden nicht gezählt, da an dieser Stelle auch in unbehandelten Hyphen solche Ablagerungen gefunden werden können. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.2.7 Sporen bilden nach der Behandlung mit Voriconazol ebenfalls Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen

In allen vorhergehenden Experimenten wurde der Einfluss von Azolen und das Auftreten der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in *A. fumigatus* Hyphen untersucht. Allerdings werden durch Azole nicht nur Hyphen, sondern auch Sporen erfolgreich abgetötet [129]. Um *A. fumigatus* Sporen auf das Auftreten solcher Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen zu untersuchen, wurden Sporen, die ein mtGFP

exprimierten, mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol in SAB für 45 h inkubiert und anschließend CFW-gefärbt. Als Vergleich dienten Sporen des gleichen Stammes, die in SAB ohne Voriconazol gegeben und CFW-gefärbt wurden (siehe Abb. 30).

Die Sporen ohne Azol Behandlung zeigten eine durch CFW-gefärbte gleichförmige Zellwand und ein tubuläres Netzwerk an Mitochondrien. Im Vergleich dazu waren die mit Voriconazol behandelten Sporen angeschwollen und zeigten entweder keine oder eine zytosolische GFP-Fluoreszenz. Das Fehlen der GFP-Fluoreszenz, deutete darauf hin, dass die Sporen abgestorben waren.

Die CFW-Färbung färbte an der Zellwand der mit Voriconazol inkubierten Sporen Strukturen an, die den beobachteten Kohlenhydrat-Ablagerungen stark ähnelten.

Daraus konnte abgeleitet werden, dass Sporen bei Behandlung mit Azolen ebenfalls Zellwandbestandteile ablagern und möglicherweise durch dieselben Mechanismen abgetötet werden, wie ausgekeimte Azol-exponierte Hyphen.

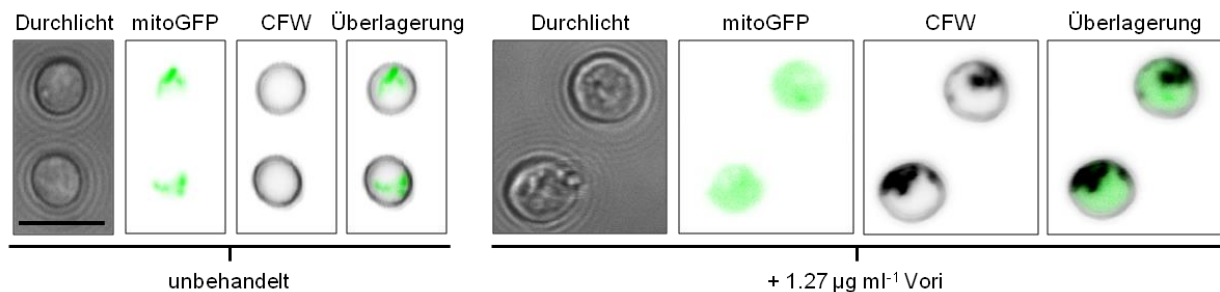


Abbildung 30: Mit Voriconazol behandelte Sporen bilden Chitin-Ablagerungen an der Zellwand.

Sporen, die ein mtGFP exprimieren, wurden entweder direkt CFW-gefärbt (linke Bildhälfte) oder mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol für 45 h bei 37°C in SAB inkubiert (rechte Bildhälfte) und anschließend CFW-gefärbt. Die ruhenden Sporen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Gezeigt werden repräsentative Einzelbilder des Durchlichts (rechts), des mtGFPs (Mitte links), der CFW-Färbung (Mitte rechts) und der Überlagerung von mtGFP und CFW (rechts). Der Größenbalken entspricht $5 \mu\text{m}$ und gilt für alle gezeigten Aufnahmen.

4.2.8 Lokalisation der Azole-abhängigen Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen außerhalb der Zellmembran von *A. fumigatus*

Die bisherigen Experimente konnten den Ort, an dem sich die Zellwandbestandteile ablagern, nicht mit Sicherheit zeigen. Vorstellbar war innerhalb der Zellmembran in intrazellulären Vesikeln oder außerhalb der Zellmembran an der Zellwand. Für die genaue Lokalisation der Ablagerungen wurde ein *A. fumigatus* Stamm verwendet, der ein GFP-markiertes Wsc1 und gleichzeitig ein mtRFP [129] exprimierte. Wsc1 ist ein Zellmembran-verankerter Stress-Sensor des Zellwandintegritätswegs [24,168]. Er diente in diesem Versuch dazu die Zellmembran zu markieren. Das mtRFP markierte die Mitochondrien.

Die für 9 h ausgekeimten Hyphen dieses Stammes wurden mit $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt und nach ca. 4 h Co-Inkubation mit einem konfokalen Mikroskop untersucht (siehe Abb. 31).

Die Hyphen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch ein intaktes, tubuläres mitochondrielles Netzwerk (mtRFP). Die durch Wsc1 markierte Zellmembran war an manchen Stellen ins Zellinnere gewendet und verdrängte dadurch das mitochondrielle Netzwerk. In der Durchlichtaufnahme ist zu sehen, dass sich in diesen Einstülpungen die bereits beobachteten Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen gebildet hatten.

Die Markierung der Zellmembran durch Wsc1-GFP demonstriert, dass es sich bei den Ablagerungen nicht um intrazelluläre Vesikel handelt, sondern um Ablagerungen an der Zellwand außerhalb der Zellmembran.

Das rechte äußere Bild in Abb. 31 stellt eine „Heatmap“ der Fluoreszenz des Wsc1-GFP dar. Die „Heatmap“ zeigt ein erhöhtes Vorkommen des Sensors an den Stellen, an denen die Ablagerungen die Zellmembran einstülpen (markiert durch Maßpfeile). Es ist zu vermuten, dass das erhöhte Vorkommen der Sensoren auf erhöhten lokalen Zellwandstress zurückzuführen ist.

Durch die Markierung der Zellmembran war es außerdem möglich, den zeitlichen Verlauf der Kohlenhydrat-Ablagerungen zu verfolgen (siehe Abb. 32). Nach ca. 2 h Co-Inkubation begann sich die Membran einzustülpen. Die Ablagerungen wurden dann bis ca. 5 h nach Zugabe des Azols immer größer. Zu diesem Zeitpunkt zeigte Wsc1, wie in der Abbildung zu erkennen, die höchste Fluoreszenz-Intensität im Bereich der Membran nahe der Ablagerungen. Die in Abb. 32 gezeigte Hyphe starb nach ca. 6 h Co-Inkubation. Zu diesem Zeitpunkt verteilte sich die Fluoreszenz des Wsc1-GFPs in der kompletten Hyphe.

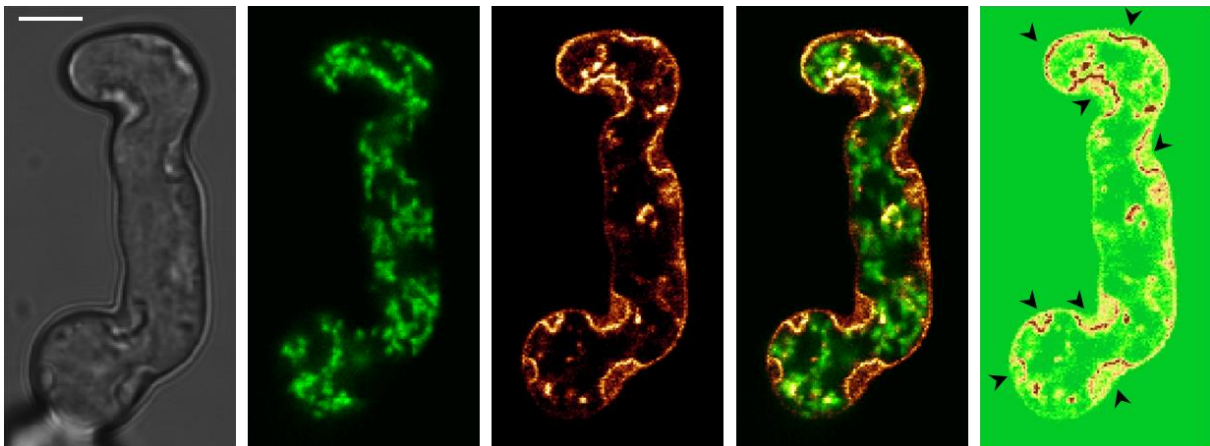


Abbildung 31: Die Voriconazol-induzierte Ablagerungen von Zellwandkohlenhydraten findet an der Zellwand statt und stülpt die darunterliegende Zellmembran ein.

A. fumigatus Sporen, die ein mtRFP und ein Wsc1-GFP exprimierten, wurden in SAB für 9 h bei 37 °C ausgekeimt. Dann wurde dem Medium $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphe für weitere 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Hyphe mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die Bilder zeigen übereinandergelegte z-Stacks und bilden so die gesamte Hyphe ab. Die Bilder zeigen die Durchlichtaufnahme (links), die Mitochondrien, gefärbt durch mtRFP (grün eingefärbt, Mitte links), das Wsc1-GFP (eingefärbt in „glow dark color“, Mitte), die Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Kanäle (Mitte Rechts) und die Wsc1-GFP Fluoreszenz dargestellt als Heatmap, die zeigt an welchen Stellen die höchste Dichte an Wsc1 zu finden war (rechts). Die Stellen, an denen die Zellmembran durch die gebildeten Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen eingedrückt wird und die höchste Dichte an Wsc1-GFP vorliegt, werden durch Maßpfeile markiert. Der Größenbalken entspricht $5 \mu\text{m}$ und kann auf alle gezeigten Bilder angewendet werden.

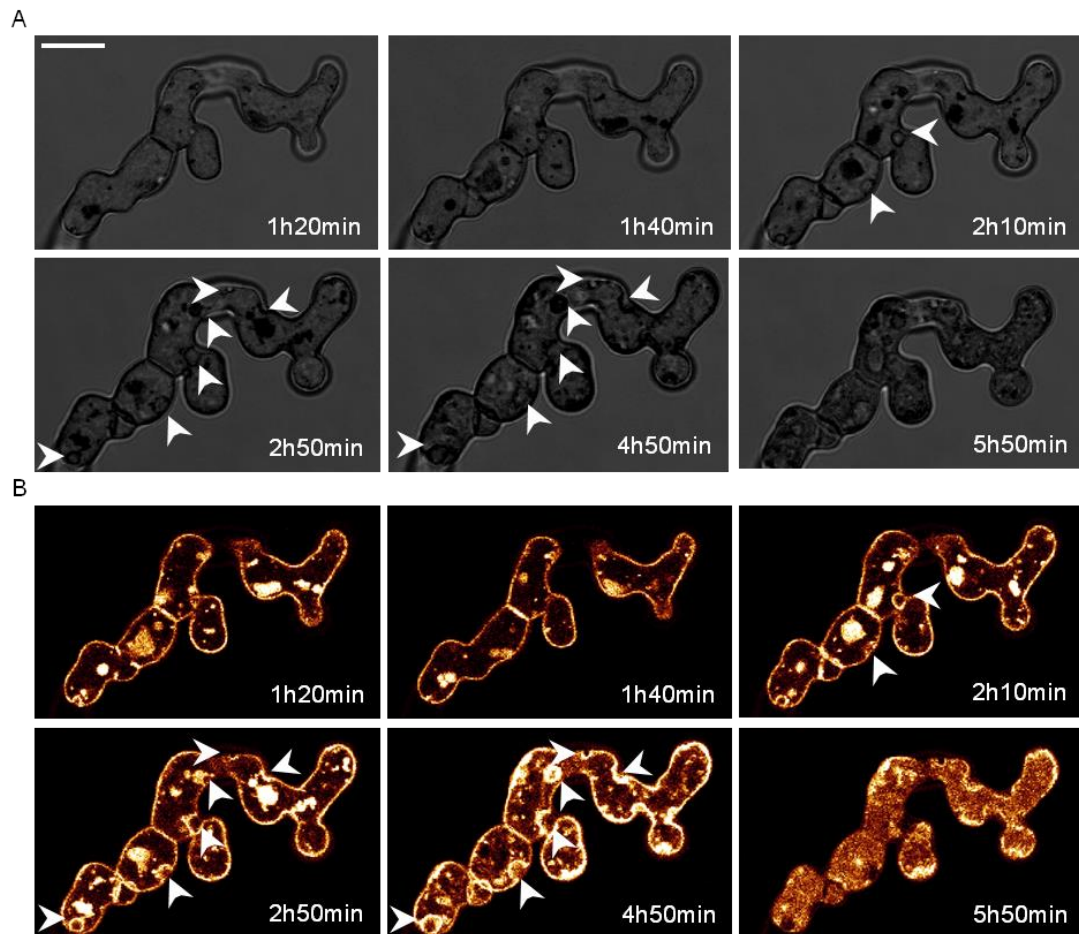


Abbildung 32: Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen nach Zugabe von Voriconazol.

Eine *A. fumigatus* Hyphe, die Wsc1-GFP exprimiert, wurde nach 9 h Wachstum in SAB bei 37 °C mit $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt. Anschließend wurde die Hyphe mit einem konfokalen Lasermikroskop über die Zeit aufgenommen. Die Bilder zeigen übereinandergelagerte z-Stacks und bilden so die gesamte Hyphe ab. Die Bilder zeigen den Durchlicht-Kanal (A) und das Wsc1-GFP (eingefärbt in „glow dark color“, B). Die Stellen, an denen die Zellmembran durch die gebildeten Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen eingedrückt wird und die höchste Dichte an Wsc1-GFP vorliegt, werden durch Maßpfeile markiert. Der Größenbalken entspricht 10 μm und gilt für alle gezeigten Bilder.

4.2.9 Die Azole-abhängige Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten kann mit weiteren zellmembranständigen Stress-Sensoren dargestellt werden

Wsc1 stellt nur einen der Stress-Sensoren der *A. fumigatus* Zellmembran innerhalb des Zellwandintegritätsweges dar [24]. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob MidA, ebenfalls ein membranständiger Sensor des Zellwandintegritätsweges [168], auch als Markierung für die Veränderungen der Zellwand bei Azol-Stress genutzt werden kann.

Für diesen Versuch wurde ein *A. fumigatus* Stamm genutzt, der ein MidA-GFP exprimiert [168]. Er wurde analog zum Wsc1 Experiment 9 h ausgekeimt und dem Medium anschließend $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$

Voriconazol hinzugefügt. Die Hyphen wurden dann mit einem konfokalen Lasermikroskop über 13 h aufgenommen. MidA-GFP markierte, wie Wsc1-GFP, die Zellmembran der beobachteten Hyphen.

Die Aufnahmen in Abb. 33 zeigen, dass während der Bildung der Zellwandkohlenhydrate, die durch MidA-GFP markierte Zellwand nach innen verdrängt wurde. Diese Beobachtung entspricht der Beobachtung des Wsc1-GFP Experiments und bestätigte diese.

Die GFP-Fluoreszenz des Sensors innerhalb der Membran war, wie im Wsc1-GFP Experiment, an den Stellen der Zellwandkohlenhydrate erhöht (markiert durch Maßpfeile in Abb. 33). Dies lässt den Schluss zu, dass es an diesen Stellen zu einem erhöhten Vorkommen mehrerer Zellwand Stress-Sensoren kommt. Wie oben erwähnt, lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass das erhöhte Vorkommen der Sensoren auf erhöhten lokalen Zellwandstress zurückzuführen ist.

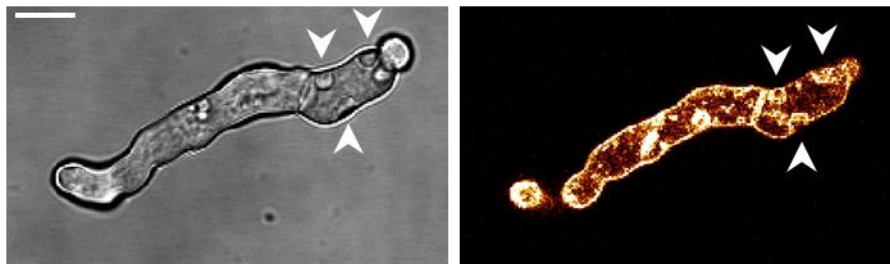


Abbildung 33: Das Verdrängen der Zellmembran durch Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen kann ebenfalls durch MidA-GFP dargestellt werden.

A. fumigatus Sporen, die ein MidA-GFP exprimierten, wurden in SAB-Medium für 9 h bei 37 °C ausgekeimt. Dann wurden dem Medium $0,53 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol hinzugefügt und die Hyphen mit einem konfokalen Lasermikroskop über die Zeit aufgenommen. Die gezeigten Aufnahmen stellen Überlagerungen eines z-Stacks an Bildern dar, der durch die gesamte Hyphe aufgenommen wurden. Die Bilder zeigen die Durchlichtaufnahme (links) und das MidA-GFP (eingefärbt in „glow dark color“, rechts). Die erhöhte Fluoreszenz des MidA-GFP an den Stellen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen wurde zusätzlich durch Maßpfeile markiert. Der Größenbalken entspricht $10 \mu\text{m}$ und gilt für alle gezeigten Bilder.

4.2.10 Die Inhibierung der Glukansynthase Fks1 verändert die Wirkung von Azolen auf *A. fumigatus*

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Azole, die Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten an der Zellwand von *A. fumigatus* auslösen. Diese Anreicherung führt zum Verdrängen der Zellmembran und so zu Zellwandstress. Wie in einem der vorhergehenden Experimente gezeigt, ist β -1,3-Glukan, ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von *A. fumigatus* [24,167,168,180], in den Ablagerungen vorhanden. Eine andere Klasse der Antimykotika, die Echinocandine, hemmen die Synthese dieses Zellwandbestandteils, indem sie non-kompetitiv an die Fks1-Untereinheit des Enzyms binden [55,194].

Bei einer Behandlung von *A. fumigatus* mit Azolen und Echinocandinen wäre es vorstellbar, dass durch die Inhibition der β -1,3-Glukansynthase die durch Azole ausgelösten Ablagerungen von Glukan an der Zellwand reduziert werden könnten. Diese mögliche antagonistische Wirkung beider Antimykotika wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

4.2.10.1 Die durch Azole ausgelösten Chitin-Ablagerungen zeigen ein verändertes Aussehen und Auftreten bei Inhibierung der β -1,3-Glukansynthase durch Caspofungin

Der Einfluss von Caspofungin auf die Bildung und das Aussehen der durch Voriconazol ausgelösten Kohlenhydrat-Ablagerungen wurde, wie in den vorhergehenden Experimenten, an ausgekeimten Hyphen untersucht. Die wt Sporen wurden für 9 h in SAB ausgekeimt und dann mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol

behandelt. Nach 30 min Co-Inkubation wurde dem Medium $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Caspofungin hinzugefügt und die Hyphen nach weiteren 4 h Co-Inkubation fixiert und CFW-gefärbt (siehe Abb. 34).

Die durch Voriconazol ausgelösten Zellwand Ablagerungen sahen in Kapitel 4.2.5.1 und in diesem Versuch (vgl. Abb. 27 und Abb. 34) aus wie große kristalline Strukturen, die sich vor allem an der Zellwand und an den Septen bildeten. Die Hyphe, die zusätzlich mit Caspofungin behandelt wurde, zeigte im Unterschied dazu deutlich mehr und kleinere Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen (vgl. Abb. 34). Diese Ablagerungen waren außerdem gleichmäßiger in der Hyphe verteilt.

Das veränderte Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen deutete darauf hin, dass die zusätzliche Behandlung mit einem Echinocandine, einen Einfluss auf die Ablagerungen hat und dass eine antagonistische Wirkung beider Antimykotika möglich ist.

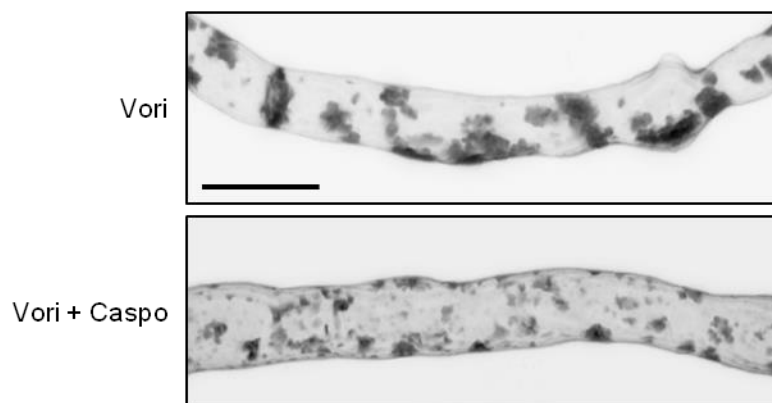


Abbildung 34: Die Inhibierung der β -1,3-Glukansynthase führt zu einem veränderten Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen.

A. fumigatus wt Sporen wurden in SAB auf Deckgläschen für 9 h ausgekeimt. Dann wurden dem Medium $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol (Vori) hinzugefügt und wenn angegeben nach 30 min zusätzlich $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Caspofungin (Vori+Caspo). Nach 4 h Co-Inkubation wurden die Hyphen fixiert, CFW-gefärbt und mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die gezeigten Aufnahmen stellen Überlagerungen eines z-Stacks an Bildern dar, der durch die gesamte Hyphe aufgenommen wurden. Der Größenbalken stellt $10 \mu\text{m}$ dar und gilt für beide gezeigten Bilder.

4.2.10.2 Die Inhibierung der Glukansynthase verzögert den fungiziden Effekt der Azole auf *A. fumigatus*

Die CFW-Färbung im vorhergehenden Experiment zeigte, dass die simultane Behandlung mit Voriconazol und Caspofungin einen Einfluss auf das Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen hat. Darauf folgend wurde untersucht, ob Echinocandine ebenfalls den fungiziden Effekt der Azole auf *A. fumigatus* verändern können.

Dazu wurden 9 h ausgekeimte Hyphen, die ein mtGFP exprimierten, mit $1,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol behandelt. Nach 30 min Co-Inkubation wurde einem Teil der Hyphen zusätzlich $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Caspofungin hinzugefügt. Nach 5 h und 6 h Co-Inkubation wurden für beide Bedingungen die überlebenden Kompartimente ausgezählt. Lebende Kompartimente wurden anhand ihrer tubuläre Mitochondrien-Morphologie und Bewegung der Mitochondrien identifiziert (vgl. [182]). Die Grafik in Abb. 35 zeigt die Ergebnisse aus sieben unabhängigen Experimenten.

Nach 5 h Co-Inkubation wurden ca. ein Drittel mehr (37 % vs. 60 %) überlebende Kompartimente innerhalb der Hyphen, die mit Voriconazol und Caspofungin behandelt wurden, gezählt. Nach 6 h Co-Inkubation waren es in dieser Bedingung ca. doppelt so viele überlebende Kompartimente (17 % vs. 43 %) im Vergleich zu den Hyphen, die nur mit Voriconazol behandelt wurden.

Der höhere Anteil an überlebenden Hyphen nach 5 h und 6 h Co-Inkubation mit beiden Antimykotika, deutet darauf hin, dass Caspofungin und damit die Inhibition der Glukansynthase den fungiziden Effekt der Azole verzögern kann. Der beobachtete Effekt scheint durch eine weitere Stunde Co-Inkubation sogar noch verstärkt zu werden. Diese Beobachtungen könnten auf eine antagonistische Wirkung beider Antimykotika unter in vitro-Bedingungen hindeuten.

Nach verlängerter Inkubation starben trotz der verlängerten Lebenszeit alle der mit Voriconazol und Caspofungin behandelten Hyphen.

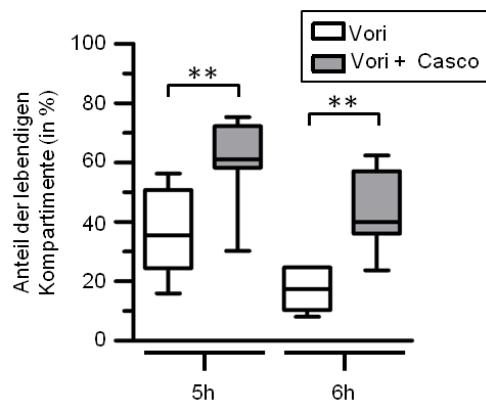


Abbildung 35: Die Behandlung mit Caspofungin verlängert die Überlebenszeit von *A. fumigatus* bei der Behandlung mit einer tödlichen Voriconazol-Konzentration.

Sporen, die ein mtGFP exprimierten, wurden in einem 15 μ -Slide eight-well Objektträger für 9 h bei 37 °C in SAB ausgekeimt. Anschließend wurde 1,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol (Vori) hinzugefügt und wenn angegeben nach weiteren 30 min zusätzlich 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Caspofungin. Nach 5 h und 6 h Co-Inkubation wurden die Anzahl der lebenden und toten Hyphenkompartimente anhand ihrer mitochondrialen Morphologie und Bewegung bestimmt. Pro Bedingung wurden mindestens 975 Kompartimenten mit einem konfokalen Lasermikroskop in sieben unabhängigen Experimenten analysiert. Der *box-and-whiskers* Graph zeigt den prozentualen Anteil an lebendigen Kompartimenten der jeweiligen Bedingung. Die Signifikanz (**, $p < 0.01$) wurde mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test (mit angenommener Normalverteilung der Werte) berechnet. Die Einzelergebnisse des Experiments sind im Anhang, S. 122 zu finden.

4.2.11 Die fehlende Expression der Lanosterol-14 α -Demethylase zeigt den Phänotyp eines *A. fumigatus* wt unter Azol-Stress

Ursächlich für die in den bisherigen Experimenten beobachteten phänotypischen Auswirkungen der Azole, die folgende Punkte umfassen:

- (1) die Bildung von Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen,
- (2) deren Druck auf die Zellmembran und die daraus resultierende Verdrängung der Zellmembran,
- (3) der Verlust der Membranintegrität bzw. das Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand,
- (4) und die verschiedenen beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren)

könnte entweder die Inhibition der Ergosterolbiosynthese oder andere sekundäre Effekte der Azole sein. Um die Ursache der bisher beschriebenen phänotypischen Effekte zu identifizieren, wurde in Zusammenarbeit mit Laura Sturm eine Doppelmutante der beiden Homologe der Lanosterol-14 α -Demethylase (*cyp51A* und *cyp51B*) in *A. fumigatus* erstellt. Durch diese Mutante können die Folgen des Ergosterolmangels ohne Behandlung durch Azole dargestellt werden und somit sekundäre Effekte der Azole ausgeschlossen werden.

A. fumigatus ist ohne Lanosterol-14 α -Demethylase nicht lebensfähig [67], daher wurde vor das *cyp51A*-Gen ein mit Doxyzyklin induzierbarer Promotor kloniert [174]. Die Anzucht der Mutante erfolgte mit induziertem *cyp51A*-Gen.

4.2.11.1 Die beobachteten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren oder Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand) sind Folgen des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase

Für die Untersuchung des mitochondrialen Netzwerks unter Lanosterol-14 α -Demethylase-Mangel der *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B*-Mutante wurden Sporen der Doppelmutante, die ein mtGFP exprimierten, für 11 h in Gegenwart von 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxyzyklin in SAB ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium komplett abgenommen und durch Medium ohne Doxyzyklin ersetzt. Durch das Entfernen des Doxyzyklins wurde die Expression von *cyp51A* herunterreguliert. Danach wurden einzelne Hyphen der Mutante und deren mitochondriales Netzwerk mittels konfokaler Lasermikroskopie über mehrere Stunden beobachtet (vgl. Abb. 36).

Die Auswertung der Video-Sequenzen ergab, dass die Mutante bei Fehlen der Lanosterol-14 α -Demethylase dieselben phänotypischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks zeigte, wie ein wt Stamm unter Azol-Stress. So starb eine beobachtete *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B*-Hyphle durch das Bersten der Zellmembran und der Zellwand Ihrer Kompartimente, wodurch das Zytoplasma der Zelle zusammen mit den Mitochondrien nach außen geschleudert wurden (vgl. Abb. 36 A).

Die Hyphle in Abb. 36 B zeigte nach ca. 6 h ein plötzliches Schrumpfen, angezeigt durch eine leichte Bewegung der Hyphle. Darauffolgend lysierten die Mitochondrien, deren GFP sich in der gesamten Hyphle verteilte und dann ganz langsam verblasste.

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Fragmentieren, Lysieren oder Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand) Folgen des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase sind und nicht auf andere sekundäre Effekte der Azole zurückzuführen sind.

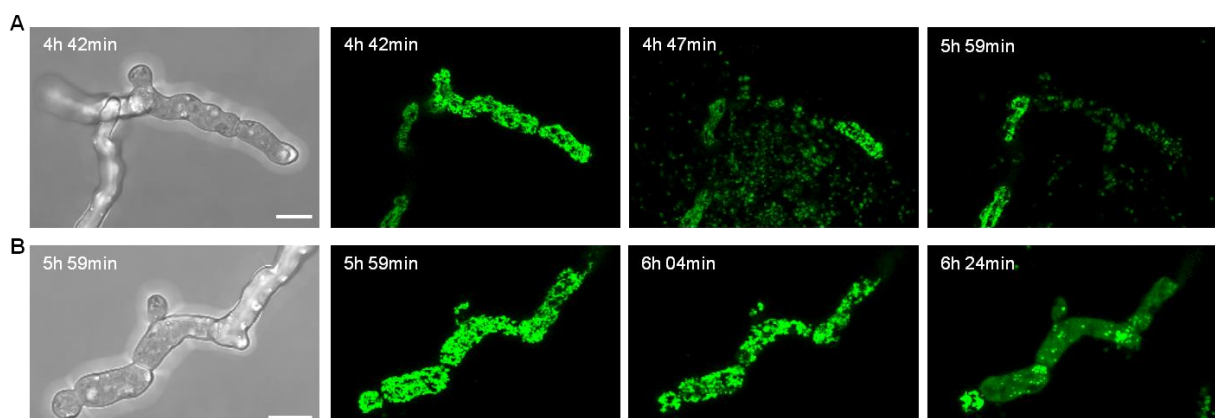


Abbildung 36: Die beobachteten phänotypischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks sind Folgen des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase.

(A und B) Sporen der *cyp51A_{tetOn} Δcyp51B*-Mutante, die ein mtGFP exprimierten, wurden in SAB mit 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxyzyklin für 11 h ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium komplett abgenommen, verworfen und durch SAB ohne Doxyzyklin ersetzt. Darauffolgend wurde mittels eines konfokalen Lasermikroskops die Morphologie der Mitochondrien über die Zeit beobachtet. Exemplarische Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen der untersuchten Hyphen sind abgebildet. Die gezeigten Aufnahmen stellen Überlagerungen eines z-Stacks an Bildern dar, der durch die gesamte Hyphle aufgenommen wurden. Der Größenbalken stellt 10 μm dar und gilt für alle gezeigten Bilder einer Hyphle.

4.2.11.2 Die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen unter Azol-Stress sind Folge des Mangels an Lanosterol-14 α -Demethylase

Der vorhergehende Versuch lieferte Hinweise darauf, dass die Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks auf den Mangel an Lanosterol-14 α -Demethylase durch die Behandlung mit Azolen zurückzuführen sind.

Für die Untersuchung des Zusammenhangs der Inhibierung der Lanosterol-14 α -Demethylase und der Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen wurden ausgekeimte Hyphen der *cyp51A_{tetOn} Δ cyp51B*-Mutante unter reprimierten Bedingungen CFW-gefärbt. Dafür wurden Sporen der Mutante sowie wt Sporen, die ein mtGFP exprimierten, für 9 h in SAB mit 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxzyklin ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, verworfen und durch SAB ohne Doxzyklin ersetzt. Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Hyphen fixiert und CFW-gefärbt (vgl. Abb. 37).

Während die wt Hyphen ein tubuläres mitochondriales Netzwerk und eine CFW-gefärbte Zellwand zeigten, wiesen die *cyp51A_{tetOn} Δ cyp51B*-Hyphen stark fragmentierte Mitochondrien auf. Die CFW-Färbung dieser Hyphe färbte deren Zellwand, sowie Kohlenhydrat-Ablagerungen an deren Zellwand an. Diese Ablagerungen wiesen starke Ähnlichkeit mit den beobachteten Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in wt Hyphen unter Azol-Stress auf. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Inhibierung der Lanosterol-14 α -Demethylase durch Azole die Bildung dieser Ablagerungen verursacht.

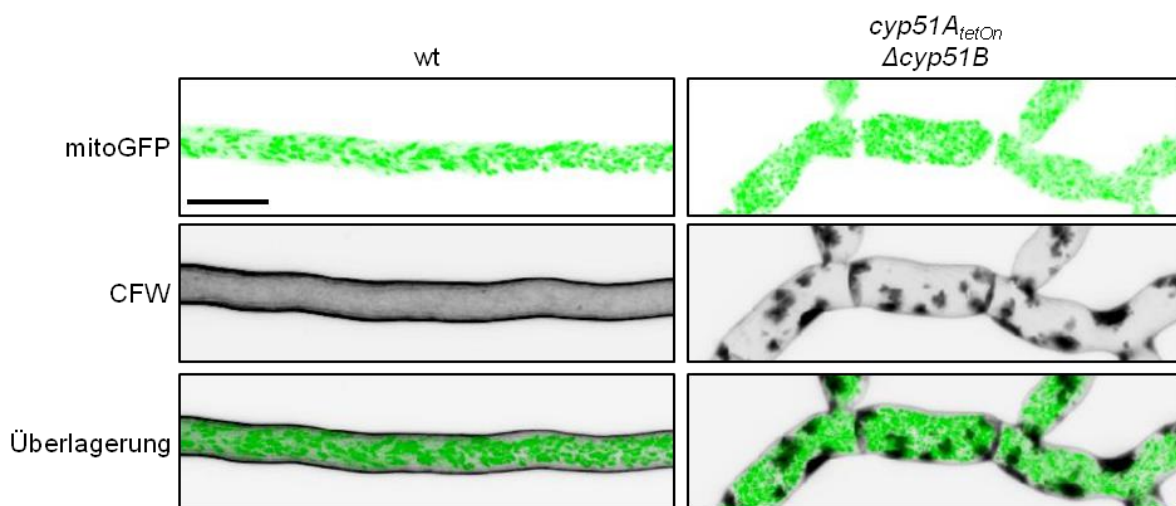


Abbildung 37: Der Mangel an Lanosterol-14 α -Demethylase verursacht die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen in *A. fumigatus*.

Wt Sporen und *cyp51A_{tetOn} Δ cyp51B*-Sporen, die ein mtGFP exprimierten, wurden in SAB mit 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Doxzyklin für 9 h bei 37°C ausgekeimt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, verworfen und durch SAB ohne Doxzyklin ersetzt (Lanosterol-14 α -Demethylase Mangel in *cyp51A_{tetOn} Δ cyp51B*). Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Hyphen fixiert, CFW-gefärbt und mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die gezeigten Aufnahmen stellen Überlagerungen eines z-Stacks an Bildern dar, der durch die gesamte Hyphe aufgenommen wurden. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen des mtGFPs (oben), der CFW-Färbung (Mitte) und der Überlagerung von mtGFP und CFW (unten). Der Größenbalken stellt 10 μm dar und gilt für alle gezeigten Aufnahmen.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung des ERMES in *A. fumigatus* und Validierung als Zielstruktur für Medikamente

Der ERMES ist eine physikalische Verbindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien. Diese Struktur kommt in fast allen Pilzen und einzelnen anderen einzelligen Organismen vor, ist aber nicht in mehrzelligen Eukaryoten wie dem Menschen zu finden [16].

In dieser Arbeit sollte die essenzielle Funktion des ERMES in *A. fumigatus* überprüft werden. Anhand dieser sollte seine Eignung als potenzielle Zielstruktur für Antimykotika bewertet werden.

5.1.1 Stark verlangsamtes Wachstum und verringerte Sporulation der Deletions- und konditionellen Mutanten, sowie Nachweis von immobilen, sphärischen sowie kleinen, sich schnell bewegenden Mitochondrien der konditionellen Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Homologe, der zuvor in der Bäckerhefe untersuchten ERMES-Komponenten Mmm1, Mdm10, Mdm34/Mmm2 und Mdm12 in *A. fumigatus* identifiziert und durch Herstellung entsprechender Deletions- und konditioneller Mutanten funktionell charakterisiert werden. Die Deletion der ERMES Gene führte nur im Falle von *mdm10* und *mdm12* zum Erfolg. Für die Gene *mdm34* und *mmm1* war es nur möglich heterokaryonte Klone zu generieren.

Unabhängig davon gelang die Herstellung konditioneller Mutanten aller 4 Komponenten (Mdm10, Mdm12, Mdm34 und Mmm1).

Sowohl die konditionellen Mutanten unter reprimierten Bedingungen als auch die Deletionsmutanten wiesen ein stark verlangsamtes ($\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, *mdm10_{tetOn}*, *mdm12_{tetOn}*, *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}*) bis gar kein ($\Delta mdm34$ und $\Delta mmm1$) Wachstum und eine verringerte Sporulation auf.

Die konditionellen Mutanten *mdm34_{tetOn}* und *mmm1_{tetOn}* zeigten ein stärker eingeschränktes Wachstum, sowie stärker fragmentierte Mitochondrien als *mdm10_{tetOn}* und *mdm12_{tetOn}*.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gelang auch Carr *et al.* 2010 keine Deletion der *A. fumigatus* Gene, die die Homologe von ScMdm34 und ScMmm1 kodieren [195]. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von *mdm34* und *mmm1* tödlich ist für *A. fumigatus*.

Die oben beschriebenen Ergebnisse decken sich außerdem mit einem Mutanten-Screening in *C. albicans* und *A. fumigatus*, das zeigte, dass der ERMES-Komplex wichtig ist für die Lebensfähigkeit und die Virulenz dieser beiden Pathogene [195–197]. Außer in diesen beiden Organismen wurde der ERMES auch in den Modellorganismen *N. crassa* [198,199] und *A. nidulans* [200] untersucht. Die im folgenden beschriebenen Gene und deren Wachstumsdefekte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Deletionsmutanten von *mdm10* und *mdm12* in *N. crassa* und *A. nidulans* zeigten vergleichbares bis etwas langsameres Wachstum als der Wildtyp. Die Deletion von *mmm1* führte in *N. crassa* zu stark

verringertem Wachstum. [198,200]. Die Beobachtung, dass der Verlust von *mdm10* und *mdm12* einen geringeren Einfluss auf das Wachstums- und Sporulationsverhalten des Pilzes zeigt als der Verlust von *mmm1*, stimmt mit dieser Arbeit überein. Ein Unterschied findet sich in der Stärke des Wachstumsphänotyps bei der Deletion von *mdm10* und *mdm12*. Während *N. crassa* und *A. nidulans* nur leicht beeinträchtigt sind, zeigt *A. fumigatus* Δ *mdm10* und Δ *mdm12* ein stark verlangsamtes Wachstum und verringerte Sporulation.

Das stark verringerte Wachstum der *N. crassa* Δ *mmm1* Mutante ist ebenfalls in Übereinstimmung mit den hier gemachten Beobachtungen, bei denen die konditionellen Mutanten in *mmm1*_{teton} unter reprimierten Bedingungen ein stark verlangsamtes Wachstum und keine Sporulation zeigten. Wobei, wie oben beschrieben, *A. fumigatus* bei einer Deletion von *mmm1* vermutlich nicht lebensfähig ist.

Die Deletion von *mdm34/ mmm2* zeigte in *N. crassa* nur geringfügig verlangsamtes Wachstum [198].

Das leicht verlangsamte Wachstum der Deletion von *mdm34* in *N. crassa* steht im Gegensatz zu dem stark verlangsamten Wachstum, das bei der konditionellen Mutante in *A. fumigatus* unter reprimierten Bedingungen beobachtet wurde.

Tabelle 15: ERMES Homologe in *A. fumigatus* (Af293), *Candida albicans* (SC5314) und den Modell-Schimmelpilzen *Aspergillus nidulans* (FGSC A4) und *Neurospora crassa* (OR74A).

Die Übereinstimmung der Proteinsequenzen mit den entsprechenden Sequenzen der *A. fumigatus*-Proteine ist in Prozent in Klammern angegeben. Falls Phänotypen bekannt waren, sind diese in eckigen Klammern beschrieben.

	Mdm10	Mdm12	Mdm34	Mmm1
<i>S. cerevisiae</i>	Mdm10 (30,21%) [verlangsamtes Wachstum auf Glucose, vernachlässigbares Wachstum auf nicht fermentierbarem Medium [201]]	Mdm12 (25,30%)	Mdm34 (23,50%) [lebensfähig auf Glucose, nicht lebensfähig auf nicht fermentierbarem Medium [152]]	Mmm1 (39,53%) [langsames Wachstum auf Glucose, nicht lebensfähig auf nicht fermentierbarem Medium, Defekt in mtDNA Stabilisierung [153,202]]
<i>A. fumigatus</i>	AFUA_5G13460/ Mdm10	AFUA_1G14790/ Mdm12	AFUA_4G09960/ Mdm34	AFUA_6G04420/ Mmm1
<i>A. nidulans</i>	AN6901/ MdmB (75,75%) [lebensfähig, leicht verlangsamtes Wachstum [200]]	AN0821 (69,18%)	AN2055 (77,90%)	AN9528 (80,30%)
<i>C. albicans</i>	C2_04800C_A/ Mdm10(31,49%) [verlangsamtes Wachstum bei 30 °C, kein Wachstum bei 37°C auf Glucose, unfähig penetrative Filamente zu bilden und sensitiv gegenüber Caspofungin bei 37 °C [196,203]]	C7_01180W_A/ Mdm12(30,06%)	C1_06230C_A/ Mdm34(31,89%) [verlangsamtes Wachstum bei 30 °C, kein Wachstum bei 37°C auf Glucose [196]]	C4_00560C_A/ Mmm1(41,46%) [verlangsamtes Wachstum bei 30 °C, kein Wachstum bei 37°C auf Glucose, möglicherweise nicht lebensfähig, kein Entkommen aus dem Phagosom von Makrophagen [196,203]]
<i>N. crassa</i>	NCU07824/ Mdm10 (38,37%) [Wachstum vergleichbar mit Wildtyp bei 16 °C, 30 °C und 37 °C [198]]	NCU02067/ Mdm12 (50,23%) [leicht verlangsamtes Wachstum bei 30 °C und 37 °C [198]]	NCU00357/ Mmm2 (50,45%) [leicht verlangsamtes Wachstum [198]]	NCU06193/ Mmm1 (55,05%) [stark verringertes Wachstum [178,198]]

Die oben beschriebenen Beobachtungen sowie die Zusammenfassung in Tabelle 15 zeigen, dass in *C. albicans* [197] und *A. fumigatus* [196] der Verlust des ERMES zu stark verlangsamtem Wachstum und verringerter Sporulation führte. Im Gegensatz dazu zeigten *N. crassa* [198,199] und *A. nidulans* [200] nach Verlust des ERMES nur ein gering eingeschränktes Wachstum.

Dies könnte zum einen dadurch zu erklären sein, dass die Funktionen des ERMES in den verschiedenen Spezies unterschiedlich wichtig sind. Eine andere Erklärung könnte die Beobachtung von Berger *et al.* 1997 in *S. cerevisiae* sein, dass ERMES Mutanten ihren Phänotyp über die Zeit verlieren [151]. Sie

zeigten, dass eine Punktmutation in *SOT1* (Engl. *suppressor of mdm10/mdm12*) ausreicht, um das Fehlen von *mdm10* und *mdm12* zu kompensieren. Darüber hinaus untersuchten Lang *et al.* 2015 die künstliche Expression von *Vps13* (Engl. *vacuolar protein sorting 13*) mit einer einzelnen substituierten Aminosäure in einer Δ *MMM1*-Mutante. *Vps13* ist ein Protein, das mit der Endosom-Membran assoziiert ist und dessen Funktion noch unbekannt ist. Durch die künstliche Expression des Proteins zeigten die Zellen ein normales mitochondrielles Netzwerk, sowie eine stabile mtDNA [156].

Diese These wird außerdem durch eine Beobachtung in der Δ *MDM10*-Mutante in *S. cerevisiae* unterstützt. Durch die Überexpression der Proteine *Mcp1* und *Mcp2* (Engl. *MDM10 complementing protein*) wird das verlangsamte Wachstum und die veränderte mitochondrielle Morphologie, sowie Defekte im Aufbau der Atmungskette aufgehoben [204]. Diese Ergebnisse zusammen mit Beobachtungen in dieser Arbeit, legen den Schluss nahe, dass ERMES Mutanten einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind. Der Selektionsdruck könnte zu einem schnellen Erwerb weiterer Mutationen führen, die den Defekt im ERMES (zumindest in seiner Wirkung) wieder aufheben. Dies könnte auch den geringen Phänotyp der entsprechenden Mutanten in *N. crassa* und *A. nidulans* erklären.

Eisenberg-Bord *et al.* 2019 zeigten in *S. cerevisiae*, dass der CoQ-Komplex (Coenzym Q oder Ubiquinon) und der ERMES-Komplex sich räumlich koordinieren. Ubiquinon ist ein essentielles Lipid für den Elektronentransport der Atmungskette in den Mitochondrien [205].

Durch die gestörte Synthese und Verteilung des CoQ6, einem Teil des CoQ-Komplexes, und dessen Vorläufer-Peptiden, kommt es bei Verlust des ERMES zu einer Destabilisierung des Coenzym Q (Ubiquinon oder CoQ) [206].

Da *A. fumigatus* strikt aerob ist, könnte dies das langsame Wachstum der ERMES Mutanten erklären, da durch den gestörten Aufbau des Ubiquinon die Atmungskette möglicherweise beeinträchtigt wird.

Zusätzlich zum stark eingeschränkten Wachstum der konditionellen Mutanten, wiesen diese eine veränderte Morphologie des mitochondriellen Netzwerks auf. Mitochondrien bilden normalerweise ein verzweigtes Netzwerk in der Zelle, das ständig in Bewegung ist und sich über Fusion und Fission neu formiert [130]. Alle vier konditionellen ERMES Mutanten zeigten unter Repression große, amorphe Mitochondrien, die sich kaum bis gar nicht bewegten. Zusätzlich wurden aber auch kleine, sich schnell bewegende Mitochondrien beobachtet. Mittels DAPI-Färbung konnte gezeigt werden, dass die großen Mitochondrien aggregierte Nukleole aufwiesen, während die kleinen keine mtDNA zu tragen schienen. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor in *A. nidulans* [200], *N. crassa* [198,199], *S. cerevisiae* [202] und anderen Studien in *A. fumigatus* gemacht [196].

Die Bewegung der Mitochondrien in der Zelle erfolgt in *S. cerevisiae* und *A. nidulans* ATP-abhängig über das Aktin-Zytoskelett [207–209]. Boldogh *et al.* 2006 zeigten, dass *Mmm1*, *Mdm10* und *Mdm12* für die ATP-abhängige Bindung an das Aktin-Zytoskelett notwendig sind und dass durch die Deletion der Gene die Bewegung der Mitochondrien zum Stillstand kommt [202,209]. Dies würde die hier dargestellte nicht vorhandene Bewegung der großen amorphen Mitochondrien erklären. Diese mitochondriale Veränderung wurde in dieser Arbeit allerdings nicht nur für die konditionellen Mutanten *mmm1_{tetOn}*, *mdm10_{tetOn}* und *mdm12_{tetOn}* beobachtet, sondern ebenfalls für *mdm34_{tetOn}*. Diese Komponente des ERMES wurden durch Boldogh *et al.* 2006 nicht untersucht. Es ist daher zu vermuten, dass auch das Fehlen dieser ERMES-Komponente die Bindung an das Aktin-Zytoskelett stört und dadurch die fehlende Beweglichkeit der Mitochondrien zustande kommt. Boldogh *et al.* 2003 untersuchten außerdem die Motilität der

veränderten Mitochondrien in einer *S. cerevisiae* $\Delta MDM12$ -Mutante und einem *S. cerevisiae* Stamm mit fehlender mtDNA (bezeichnet als rho⁰). Sie stellen dabei fest, dass während Mitochondrien im Wildtyp eine hohe Beweglichkeit zeigten, die Mitochondrien der $\Delta MDM12$ -Mutante sich nur minimal oszillierend bewegten. Die Mitochondrien der rho⁰ Zellen hingegen bewegten sich doppelt so schnell wie die Mitochondrien des Wildtyps. Dieser Effekt war unabhängig von der fehlenden Atmung. Sie stellten die Hypothese auf, dass der ERMES-Komplex benötigt wird, um die Mitochondrien an das Aktin-Zytoskelett zu binden bzw. zu lösen und sich fortzubewegen. Durch den Verlust der mtDNA wird die Bindung an das Aktin geschwächt und so eine schnellere Bewegung möglich [202].

In dieser Arbeit wurde in den konditionellen ERMES Mutanten in *A. fumigatus* unter reprimierten Bedingungen sowohl große, starre Mitochondrien mit aggregierten Nukleoiden, sowie kleine, sich schnell bewegende Mitochondrien ohne mtDNA beobachtet. Diese Beobachtungen weisen ebenfalls auf die durch Boldogh *et al.* 2003 aufgestellte Hypothese hin, dass die Bindung und die Bewegung der Mitochondrien auf dem Aktin-Zytoskelett sowohl durch den ERMES-Komplex als auch die mtDNA beeinflusst wird.

So könnte auch in *A. fumigatus* durch das Fehlen der ERMES-Komponenten die Bindung bzw. die Ablösung der Mitochondrien vom Aktin-Zytoskelett gestört sein. Durch den Verlust der mtDNA in den kleinen Mitochondrien kommt es zu einer geschwächten Bindung der Mitochondrien an das Zytoskelett und so zu einer schnelleren Bewegung. Die Assoziation der großen, amorphen Mitochondrien an das Aktin-Zytoskelett könnte durch die aggregierten Nukleotide möglicherweise sogar verstärkt werden. Dies könnte auch bei der fehlenden Beweglichkeit eine Rolle spielen.

5.1.2 Der ERMES ist notwendig für die Stabilisierung der Lokalisierung der mitochondrialen DNA

In Kapitel 4.1.8 wurde gezeigt, dass durch die Abwesenheit des ERMES die mtDNA in den großen, sphärischen Mitochondrien akkumuliert und gleichzeitig die kleinen, schnellen Mitochondrien ihre mtDNA verlieren.

Dieses Phänomen wurde auch in anderen Pilze beobachtet und beschrieben [196,198–200]. Das oben genannte Model von Boldogh *et al.* 2003 und die dazu gehörigen Versuche, sowie Versuche in *N. crassa* beschreiben die Bedeutung des ERMES für die Stabilisierung der mtDNA Nukleotide [16,150,202]. So verliert *S. cerevisiae* ohne den ERMES die mtDNA und dadurch die Fähigkeit auf Kohlenstoffen, die nicht zur Gärung genutzt werden können, zu wachsen [210]. Murley *et al.* 2013 stellten die Theorie auf, dass ERMES-Komplexe das ER mit den Mitochondrien entlang des mitochondrialen Netzwerks verbinden. So werden aktive, sich replizierende Nukleotide am Ort der mitochondrialen Fission gehalten [161]. Die hier beschriebenen Ergebnisse erweitern dieses Modell. Es wurden zwei verschiedene Arten von Mitochondrien nach Herunterregulation der ERMES Gene beobachtet: Mitochondrien mit akkumulierter mtDNA als auch Mitochondrien ohne mtDNA. Dies könnte auf die beeinträchtigte Stabilisierung der mtDNA Nukleotide am Ort der Fission zurückzuführen sein. Durch diese ungleichmäßige Verteilung der Nukleotide könnte die beobachtete Akkumulation in den großen sphärischen Mitochondrien sowie der Verlust in den kleinen Mitochondrien verursacht worden sein.

5.1.3 Mmm1 ist wichtig für die Virulenz von *A. fumigatus*

Die Virulenz der konditionellen *mmm1_{tetOn}* Mutante wurde in einem *G. melonella* Infektionsmodell untersucht. Die Herunterregulation von *mmm1* verringert die Virulenz von *A. fumigatus* deutlich, allerdings kommt es nicht zu einer kompletten Avirulenz. Dies ist erstaunlich, da die Mutante, wie oben beschrieben, extrem langsam wächst. Neubauer *et al.* 2015 zeigten in einem ähnlichen Versuch, dass das Auskeimen von *A. fumigatus* nicht ausreicht, um die Larven zu töten [129]. Sie infizierten *G. melonella* Larven mit der konditionellen Mutante *mgm1_{tetOn}*, einer mitochondrialen GTPase, die für die Fusion der Mitochondrien notwendig ist. Diese Mutante zeigt unter induzierten Bedingungen wildtypartiges Wachstum, kann allerdings unter reprimierten Bedingungen lediglich auskeimen. Nach 24 h kommt es dann zu einem kompletten Wachstumsarrest. Diese Mutante war im Infektionsversuch komplett avirulent. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch geringes Wachstum von *A. fumigatus* oder die dadurch ausgelöste Immunreaktion ausreichen kann, um *G. melonella* zu töten.

Tucey *et al.* 2016 beschrieben, dass *C. albicans* den ERMES für die Abwehr von Makrophagen und die Evasion des Immunsystems benötigt [196]. Dieses Ergebnis passt zu der in dieser Arbeit beobachteten geringeren Virulenz im *G. melonella* Modell.

Die verringerte Virulenz von Mutanten, die Teile ihrer mitochondrialen Funktionen verloren haben, wurde auch in anderen Pathogenen beschrieben. So sind *C. glabrata* Mutanten mit einer defekten Atmungskette aufgrund fehlender oder mutierter mtDNA (*petite* Mutanten) in einem Mausmodell weniger virulent. Dies gilt ebenfalls für *C. neoformans* Mutanten, die eine Deletionen der mitochondrialen Superoxid Dismutase SOD2 aufweisen [211,212]. Bei *C. albicans* führt die Inaktivierung des mitochondrialen Proteins Goa1, einer möglichen Untereinheit des Komplex 1 der Mitochondrien, zu einer attenuierten Virulenz im Mausmodell [213]. Zusätzlich wurde in *C. albicans* gezeigt, dass Mmm1 ebenfalls für die Virulenz wichtig ist. Darüber hinaus wurde in *C. albicans* gezeigt, dass der Verlust von Mdm10 nicht nur der ERMES beeinflusst wird, sondern auch den SAM-Komplex (Engl. *sorting and assembly machinery*). Dieser ist zuständig für den Zusammenbau von β -Barrel-Proteinen und für den Transfer von Proteinen in die mitochondriale Membran und Matrix. Mutanten, denen eine Komponente dieses Komplexes fehlt, sind unter anderem beeinträchtigt in ihrer Zellwandintegrität und ihrer Virulenz [214–216].

Shingu-Vazquez *et al.* 2011 sahen einen Zusammenhang zwischen der verringerten Virulenz dieser Mutanten und einer verringerten Fitness, einem veränderten Metabolismus und einer höheren Sensitivität gegenüber oxidativem Stress [217].

Die Inhibierung des ERMES Komplexes in *A. fumigatus* führt zu einem Fitnessverlust, auch durch die möglicherweise auftretende Destabilisierung der zellulären Atmung in den Mitochondrien [206]. Dies führt vermutlich zur hier beobachteten reduzierten Virulenz.

Allerdings gibt es auch einen Bericht über einen *C. glabrata* Stamm, der trotz Verlust seiner mtDNA eine erhöhte Virulenz zeigte. Interessant ist, dass der klinische Ausgangstamm, durch den Ethidiumbromid-induzierten Verlust der mtDNA nicht virulenter wurde [218]. Hier mutmaßen Shingu-Vazquez *et al.* 2011, dass es innerhalb des Wirts zu einem großen Selektionsdruck auf Mutanten mit Defekten in der mitochondrialen Funktion kommt. Dieser Selektionsdruck könnte zu Zusatzmutationen oder Aktivierung kompensatorischer Signalwege führen, die den Pilz gleichzeitig virulenter machen [217]. Diese Theorie könnte, die hier beobachtete Virulenz der *mmm1_{tetOn}* Mutante erklären (vgl. Kapitel 4.1.9 40 % der

Maden wurden getötet). Durch den Selektionsdruck innerhalb des Infektionsmodell könnte die konditionelle Mutante *mmm1_{tetOn}* Zusatzmutationen erwerben oder bestimmte kompensatorische Signalwege aktivieren, die ihre Virulenz erhöhen. Allerdings erreichte die Virulenz der *mmm1_{tetOn}* Mutante nicht die Virulenz des Wildtyps. Während die *mmm1_{tetOn}* Mutante nach 144 h 40 % der Maden getötet hatte, waren in der Gruppe der Maden, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, bereits nach 96 h alle Larven gestorben. Eine Erklärung hierfür könnte das langsame Wachstum der *mmm1_{tetOn}* Mutante sein. Was zusätzlich in den präsentierten Daten auffällt ist, dass die Komplementation des Phänotyps durch Zugabe von Doxyzyklin nicht vollständig erreicht wurde. Die Mutante erreichte auch unter induzierten Bedingungen nicht die Virulenz des Wildtypstammes. Die Ursache für dieses Problem ist wahrscheinlich die tatsächlich verfügbare Konzentration an Doxyzyklin innerhalb der Larve. Diese Theorie wird unterstützt durch die Daten von Neubauer *et al.* 2015, hier wurde der Phänotyp der *mgm1_{tetOn2}* und *fzo1_{tetOn}* Mutante durch die Zugabe von Doxyzyklin ebenfalls nicht vollständig komplementiert [129].

5.2 Wirkung von Azolen auf *A. fumigatus*

Azole wie Voriconazol und Posaconazol sind die aktuell empfohlene Therapie für invasive Aspergillose. In den letzten Jahren hat das Auftreten von Azol-resistenten *Aspergillus* Isolaten alarmierend zugenommen. Es wird vermutet, dass die Bildung von Resistenzen auf der Nutzung von Azolen in der Therapie von chronisch infizierten Patienten und in der Landwirtschaft zurückzuführen ist [89].

Es ist bekannt, dass Azole die Lanosterol-14 α -Demethylase (CYP51), ein Cytochrom P450-Protein, das eine Demethylierungs-Reaktion innerhalb des Biosynthesewegs des Pilz-spezifischen Membranbestandteils Ergosterol übernimmt, hemmen [219,220]. Die genaue Wirkung der Azole und des durch sie ausgelösten Ergosterolmangels in Schimmelpilzen ist weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Inhibition von CYP51 genauer untersucht.

5.2.1 Azole induzieren verzögerten Zellwandstress und destabilisieren die Membranintegrität in *A. fumigatus*

Die Zellwand von Pilzen stellt das Exoskelett der Pilzzelle dar. Neben ihrer Stärke und Festigkeit ist sie eine sehr flexible Struktur, die schnell und effektiv durch Signale aus der Zelle sowie von außen beeinflusst werden kann. Der Zellwandintegritätsweg spielt eine wichtige Rolle in der Umsetzung dieser Signale für den Auf- und Abbau der Zellwand [24].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Azole Zellwandstress auslösen und der Zellwandintegritätswegs dabei aktiviert wird. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sorgo *et al.* 2011 in *C. albicans* und Agarwal *et al.* 2003 in *S. cerevisiae*. Sie zeigten, dass bei der Behandlung mit einem Azol unter anderem *PIR1*, sowie mehrere Gene des Zellwandintegritätswegs hochreguliert waren [201,221]. *PIR1* ist eine Glykosidase, die für die Quervernetzung von β -1,3- and β -1,6-Glukan innerhalb der Zellwand zuständig ist [222].

A. fumigatus besitzt zwei Lanosterol-14 α -Demethylasen, die durch die Gene *cyp51A* und *cyp51B* kodiert werden. Beide Orthologe können das Fehlen der anderen Demethylase kompensieren. Das Fehlen beider Proteine ist allerdings letal [66,67]. In einer Studie in *A. fumigatus* wurde gezeigt, dass *Cyp51A* und *B* durch die Behandlung mit Voriconazol, Caspofungin, und Congo-Rot vermehrt an den Hyphenspitzen zu finden waren. Sie vermuteten, dass dies auf dem ausgelösten Zellwandstress beruhte [223]. Es ist zu vermuten, dass auch durch Azol-Stress die vorhandenen Enzyme anders lokalisiert werden. So könnten diese vor allem an wichtigen Stellen, wie z.B. aktiv wachsende Hyphenspitzen gebracht werden.

Eine zusätzliche Beobachtung in dieser Arbeit war, dass die Expression der Gene des Zellwandintegritätsweges erst 1 - 2 h nach Zugabe des Azols beginnt. Hokken *et al.* 2019 stellten fest, dass *A. fumigatus* ca. 60 min benötigt, um sein Transkriptom nach Itraconazol-Exposition anzupassen [224]. Dies könnte die hier beobachteten 1-2 h erklären, in denen *A. fumigatus* keine phänotypischen Veränderungen zeigte, sowie kein Zellwandstress detektiert wurde. Allerdings könnte diese Zeit auch benötigt werden, um das bis dahin produzierte Ergosterol „aufzubauchen“.

Nach diesen 2 h ohne phänotypische Veränderungen wurden folgende Ereignisse beobachtet:

- I. Es kam zu einem Aufbrechen der Zellmembran und Zellwand einiger Hyphenkompartimente. Aufgrund des Zellinnendrucks wurde das Zytoplasma der Zelle zusammen mit den Mitochondrien dabei nach außen geschleudert.
- II. Ein plötzliches Schrumpfen der Hyphe gefolgt von einer Fragmentierung des normalerweise tubulären mitochondriellen Netzwerks einiger Kompartimente.
- III. Ein plötzliches Schrumpfen der Hyphe gefolgt mit der Lyse der Mitochondrien einiger Kompartimente der Hyphe.

Alle drei beobachteten Veränderungen des mitochondriellen Netzwerks, zeigten den Zelltod des betroffenen Kompartiments an. Auch das Fragmentieren kann als solches angesehen werden, wie von Ruf *et al.* 2018 in *A. fumigatus* gezeigt wurde [182]. Gleichzeitig stellen das beobachtete Bersten der Zellmembran bzw. Zellwand und das Schrumpfen der Hyphe deutliche Anzeichen für den Verlust der Membranintegrität und der damit verbundenen Zellintegrität dar.

Azole inhibieren das Enzym Cyp51 [1]. Es wurde bereits beschrieben, dass dadurch die Ergosterol-Biosynthese gehemmt wird, und dass es zu einer Akkumulation von Lanosterol und anderen 14 α -methylierten Sterolen kommt. Es wird vermutet, dass diese Sterole toxisch sind für den Pilz. Zusätzlich verändert sich durch das Fehlen von Ergosterol die Permeabilität und Fluidität der Pilzmembran [1,48,99].

Echinocandine, die Inhibitoren der Glukansynthase lösen ebenfalls eine Zell-Lyse in *A. fumigatus* aus. Anders als bei dem hier beobachteten Membranintegritätsverlust kommt es dabei durch das Fehlen von Glukan zu einer vollständigen Lyse von Membran und Zellwand. Charakteristisch für die Lyse können im umgebenden Medium Bestandteile der Zelle lichtmikroskopisch identifiziert werden [167,180,225]. Im Gegensatz dazu, kann der hier beobachtete Membranintegritätsverlust allein durch ein plötzliches Schrumpfen des jeweiligen Kompartiments und der durch mtGFP markierten Mitochondrien festgestellt werden.

Für *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass nach Behandlung mit Azolen die Plasmamembran eine veränderte Rigidität und Elastizität aufweist [73–75]. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass das fehlende Ergosterol dazu führt, dass die Plasmamembran gestört wird und es dadurch zum Verlust der Membranintegrität kommt.

Die Beobachtungen in dieser Arbeit zeigten außerdem, dass der jeweilige Anteil der hier beobachteten Absterbevarianten von der Azol-Konzentration abhängig war. So starben bei einer Konzentration nahe der MIC ca. die Hälfte der Kompartimente durch das Aufplatzen der Zellmembran bzw. Zellwand. Im Gegensatz dazu starben bei einer Konzentration oberhalb der MIC ca. 70 % der Kompartimente durch Lyse der Mitochondrien und ca. 30 % durch Fragmentieren der Mitochondrien.

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Studie in *C. albicans* liefern. Sie wies nach, dass die Ergosterol-Biosynthese und damit der gesamte Stoffwechsel des Pilzes dosisabhängig durch Posaconazol, Fluconazol und Voriconazol gehemmt wird [226,227]. So könnten die hier gemachten Beobachtungen, so interpretiert werden: Kommt es durch eine niedrige Azol-Konzentration bei einem leicht gehemmten Stoffwechsel und hohem verbliebenen Zellinnendruck zum Verlust der Membranintegrität, wird das Zytoplasma nach außen „katapultiert“. Bei einer bereits stark reduzierten Stoffwechselaktivität

durch eine hohe Azol-Konzentration und niedrigem Zellinnendruck, kommt es durch den Verlust der Membranintegrität lediglich zur Fragmentierung/ Lyse der Mitochondrien.

In diesem Zusammenhang beleuchtete ein Vergleich der Zahl der überlebenden Kompartimente von wt Hyphen, $\Delta rho4$ Hyphen und deren Komplementante $\Delta rho4+rho4$ die Rolle von Septen unter Azol-Stress. Sie können die Überlebenszeit von *A. fumigatus* Hyphen bei einer tödlichen Voriconazol-Konzentration verlängern. Rho4 gehört zu den Rho-GTPasen und spielt eine wichtige Rolle während der Zytokinese [190]. Es lagert sich an den Stellen der Septum-Bildung an und kontrolliert dort die Bindung und Entstehung des Aktin-Rings. Ohne Rho4 kann dieser Prozess nicht stattfinden, wodurch $\Delta rho4$ keine oder kaum Septen bildet [168,190,191]. Der hier beobachtete Effekt zeigte sich allerdings zeitlich begrenzt. Da die Voriconazol-Konzentration deutlich über der MIC lag [129], starben nach einer verlängerten Inkubation alle Hyphen des wt als auch der $\Delta rho4$ Mutante und deren Komplementante $\Delta rho4+rho4$.

Wie bereits erwähnt, stellt dies eine Parallele zur Wirkung der Echinocandine dar, bei deren Behandlung Septen eine wichtige Rolle für das Überleben des Pilzes spielen. Die Inhibierung der Glukansynthese durch Echinocandine führt zu geschwollenen, kurzen und stark verzweigten Hyphen mit instabiler Zellwand. Diese Instabilität verursacht eine gelegentliche Lyse an den apikalen Hyphen-Spitzen [187,188]. Die an das lysierte Kompartiment anschließenden Kompartimente werden durch die Septen geschützt und der Verlust des Zellurgors eingedämmt [167,189].

Wie bei der Behandlung mit Echinocandinen wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass durch die Abtrennung einzelner Kompartimente, die Überlebenszeit der Hyphen verlängert werden konnte.

Gegensätzlich zur Wirkung der Echinocandine war die Beobachtung, dass der Verlust der Zellintegrität durch das Bersten der Zellmembran an vermutlich einer bestimmten Stelle auch gleichzeitig mehrere Kompartimente betreffen konnte. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der Schutz der Septen in bestimmten Fällen nicht ausreicht, bzw. die Septen nicht komplett verschlossen werden konnten bis zum Zelltod. Für den Verschluss der Poren innerhalb des Septums sind Woroninkörperchen verantwortlich. Dabei handelt es sich um aus dem Peroxisom hervorgehende Organellen, die nahe den Poren verankert sind und bei Zellstress die Poren schließen. Steinberg *et al.* 2017 beschrieben das ca. 85 % der durch Woroninkörperchen vermittelten Schließungen der Septum-Poren durch Zellurgor-Druckgradienten ausgelöst werden [228,229]. Der hier beobachtete Verlust des Zellurgors war oft nur durch ein plötzliches Schrumpfen der Hyphe sichtbar. Eine Erklärung könnte sein, dass der Zellurgor-Druckgradient in den Fällen, in denen mehrere Kompartimente gleichzeitig starben, zu gering war und so das Schließen der Poren nicht ausgelöst wurde. Dies könnte mit ein Grund für die größere Effektivität von Azolen gegenüber *A. fumigatus* im Gegensatz zu Echinocandinen sein.

Dichtl *et al.* 2015 führten ein ähnliches Experiment mit *A. fumigatus* wt Hyphen und $\Delta rho4$ Hyphen durch, die 2 h mit Caspofungin behandelt wurden. Ca. 5 % der $\Delta rho4$ Hyphen überlebten die Behandlung mit Caspofungin, was in etwa dem Anteil der komplett lebendigen wt Hyphen entsprach [167]. Dies entspricht ebenfalls dem Anteil der in dieser Arbeit festgestellten $\Delta rho4$ Hyphen, die nach 5 h Voriconazol-Exposition noch lebendig waren und dem Anteil der vollständig intakten Hyphen des wt und der Komplementante $\Delta rho4+rho4$. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass dieser Anteil an Hyphen unabhängig der Wahl des Antimykotikums einen bestimmten intrinsischen Vorteil hat, der ihnen ein verlängertes Überleben ermöglicht. Tegelaar *et al.* 2020 zeigten, dass die äußeren Kompartimente von

A. niger und *A. oryzae* Mikrokolonien aufgrund von Umwelteinflüssen verschiedene Transkriptions- und Translationsprofile zeigten. Dies wurde hervorgerufen durch geschlossene Woroninkörperchen, die ein Vermischen des Zytoplasmas verhinderten [230]. Ein solcher Unterschied zwischen den Kompartimenten könnte auch bei der Behandlung mit Azolen vorliegen und zu einer unterschiedlichen Expression von Transkriptionsfaktoren oder Effluxpumpen führen. Der hier beobachtete Effekt des verlängerten Überlebens durch Septen zeigte sich als zeitlich begrenzt, da die verwendete Azol-Konzentration oberhalb der MIC lag. Allerdings könnte dieser Effekt bei Azol-Konzentrationen nahe der MIC für die Entwicklung von Resistenzen verantwortlich sein.

5.2.2 Die Inhibierung der Lanosterol-14 α -Demethylase führt zu einer exzessiven Synthese von Zellwandkohlenhydraten, die vermutlich zum Tod des Pilzes führen

Verschiedene Färbung von Voriconazol-behandelten *A. fumigatus* Hyphen zeigten, dass die beiden wichtigsten Zellwandkohlenhydrate Glukan und Chitin in großen Mengen außerhalb der Zellmembran an der Zellwand abgelagert werden. Außerdem zeigte Wsc1, ein Zellmembran-verankerter Stress-Sensor des Zellwandintegritätswegs ein erhöhtes Vorkommen an den Stellen, an denen die Ablagerungen die Zellmembran einstülpten (siehe Ergebnisse Abb. 31) [24,168].

Diese Ergebnisse werden durch bereits in den 1980er Jahren gemachte Beobachtungen in *Ustilago maydis*, *Penicillium italicum* und *C. albicans* unterstützt, die Chitin Ablagerungen nach Behandlung mit dem Azolen Imidazol und dem Morpholine Fenpropimorph nachwiesen [80,231,232].

In Übereinstimmung mit der hier gemachten Studie zeigten Pfaller *et al.* 1992, dass durch die Behandlung mit Fluconazol der Chitin-Gehalt bei *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *C. krusei* anstieg. Interessanterweise stieg der Gehalt an α - und β -Glukan nur bei *C. krusei* an. Bei den anderen drei Spezies sank der Gehalt an α - und β -Glukan im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle [233]. Darüber hinaus zeigten Gautam *et al.* 2016, dass in *A. fumigatus* durch die Behandlung mit Itraconazol mehrere Proteine des Kohlenhydratstoffwechsels hochreguliert werden, was auch in *C. albicans* beobachtet wurde [234,235].

Dies deutet darauf hin, dass durch den Verlust von Ergosterol und dem damit verbundenen Stress, die Produktion der Zellwandkohlenhydrate Chitin, α - und β -Glukan bzw. die Produktion der gesamten Zellwand hochreguliert wird. Allerdings scheint dieser Mechanismus in *C. albicans* und *A. fumigatus* unterschiedlich zu sein, da in *C. albicans* der Gehalt α - und β -Glukan nach der Behandlung mit einem Azol nicht anstieg [233].

Zusätzlich zum exzessiven Aufbau von β -1,3-Glukan und Chitin, wurde in dieser Arbeit ein erhöhtes Vorkommen, der Wsc1-Rezeptoren innerhalb der Plasmamembran unterhalb der Ablagerungen beobachtet. Koch *et al.* beschrieben in ihrem Review 2015, dass Zellwandstress-Sensoren wie Wsc1 in sogenannten Mikrodomänen zu finden sind. Diese stellen spezialisierte Bereiche der Plasmamembran dar [236]. Es könnte angenommen werden, dass die Azol-vermittelte Aktivierung des Zellwandintegritätsweges aufgrund der Azole innerhalb dieser Mikrodomänen stattfindet. Durch die Aktivierung des CWI werden Chitin- und Glukansynthasen rekrutiert und so die Ablagerungen an diesen Domänen gebildet.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass Azole vor allem auf sich im Wachstum befindende Teile der Hyphe wirken. Es wurde allerdings beobachtet, dass auch Sporen durch Azole erfolgreich abgetötet werden [129]. Ein Experiment dieser Studie zeigte ebenfalls, dass Sporen, die ein mtGFP exprimierten und mit einer tödlichen Konzentration an Voriconazol behandelt wurden, abgetötet wurden. Die toten Sporen waren angeschwollen und zeigten keine oder eine zytosolische GFP-Fluoreszenz, was auf eine Lyse der Mitochondrien hindeutet. Es konnten ebenfalls mittels CFW-Färbung Strukturen beobachtet werden, die den in den Hyphen beobachteten Kohlenhydrat-Ablagerungen stark ähnelten. Die Aktivierung von ruhenden Konidien führt zu einem Anstieg des intrazellulären osmotischen Drucks und der Aufnahme von Wasser. Die Konidien schwellen in dieser Zeit um das Doppelte ihres Durchmessers an. Dieses Anschwellen wird auch isotropisches Wachstum genannt. In dieser Phase wird in alle Richtungen neue Zellwand aufgebaut und damit auch neue Plasmamembran [237].

Die Beobachtung, dass die abgestorbenen Sporen angeschwollen waren, deutet darauf hin, dass sie in der Phase des isotropischen Wachstums starben. Daher ist zu vermuten, dass Azol-Moleküle aufgenommen wurden und während des Aufbaus der neuen Zellwand die Ergosterol-Biosynthese hemmten, was zum Verlust der Zellintegrität führte. Es ist also zu vermuten, dass dieselben Mechanismen sowohl den Tod der Sporen als auch den der Hyphen verursachen.

Für *Ustilago maydis*, der den Maisbeulenbrand verursacht, wurde gezeigt, dass Chitin- und Glukansynthasen in denselben Vesikeln zur Zellmembran transportiert werden [238–240]. Taheri-Talesh *et al.* 2008 stellten für *A. nidulans* ein Modell auf, in dem Zellwandbestandteile mit Vesikeln über Mikrotubuli aus dem Zellinneren zur Plasmamembran transportiert werden. Sie werden dann innerhalb der wachsenden Hyphe durch Exozytose an die Oberfläche der Membran abgegeben. Die in die Plasmamembran eingebauten Bestandteile der sekretorischen Vesikel werden beim weiteren Wachstum der Hyphe rückgewonnen. Sie wandern dann am Zytoskelett entlang zurück ins Zellinnere, um erneut Zellwandbestandteile zur Membran zu transportieren [241]. Dieses Modell bringt den Aufbau der Zellwand, sowie die Exo- und Endozytose von Vesikeln mit der Plasmamembran in räumliche Nähe [242]. Diese beiden Beobachtungen könnten eine Erklärung für die hier beobachtete Co-Lokalisation der Ablagerung von Chitin und β -1,3-Glukan sein.

In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass Defekte in der Ergosterol-Biosynthese zu einer gestörten Endozytose, Zellpolarisation, Zellfusion und Zellwandaufbau führen. Darüber hinaus beschrieben Degreif *et al.* 2019, dass es in *S. cerevisiae* durch die Reduktion von Sterolen zu einer verringerten Fluidität der Membran kommt, was die Endo- aber auch Exozytose beeinflusst [76–79]. Die Beobachtungen in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass durch die Behandlung mit Azolen der Transport von Zellwandkohlenhydraten zur Zellmembran gestört wird.

Chelius *et al.* 2020 untersuchten die Veränderungen des Transkriptom von *A. nidulans* nach Zellwandstress. Sie beobachteten, dass *A. nidulans* Hyphen, die einem Echinocandin ausgesetzt wurden, mehr Septen bildeten als Hyphen, die unbehandelt waren. Sie mutmaßten, dass Septierung durch die Aktivierung des CWI hervorgerufen wird. Sie stellten außerdem fest, dass die Aktinfilamente durch die Aktivierung des CWI verändert werden, wodurch die Endozytose beeinflusst wird [243].

Die Beobachtungen in *A. nidulans* könnten darauf hindeuten, dass der durch Azolstress aktivierte CWI die vermehrte Bildung von Septen hervorruft. So könnte vermutet werden, dass die Ablagerungen vor

allem in Stressregionen gebildet werden, in denen der Pilz versucht als Abwehrmechanismus mehr Septen zu bilden.

Sowohl der bei Hyphen beobachtete Zellwandstress wie auch die Zellwandkohlenhydrat-Ablagerung traten nicht direkt nach Voriconazol-Exposition, sondern zeitlich versetzt auf. Durch die Quantifizierung der Ablagerungen bei verschiedenen Voriconazol-Konzentrationen wurde gezeigt, dass Ablagerungen mit Beginn des detektierten Zellwandstress auftraten. Nach 3 h Co-Inkubation wiesen ca. 78 % der *Aspergillus* Hyphen, die mit einer tödlichen Konzentration an Voriconazol behandelt worden waren, Ablagerungen auf. Nach 5 h zeigten sich bei allen untersuchten Voriconazol-Konzentrationen bei fast 100 % der Hyphen Chitin-Ablagerungen. Die Anzahl der Ablagerungen nahm umso schneller zu, je höher die Konzentration an Voriconazol war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen den Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen und dem Tod des Pilzes.

Diese These wird durch weitere Experimente dieser Arbeit unterstützt: *A. fumigatus* Hyphen, die mit Voriconazol und Caspofungin behandelt wurden, zeigten ein unterschiedliches Aussehen der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen. In Hyphen die allein mit Voriconazol behandelt wurden, sahen die Ablagerungen wie große kristalline Strukturen aus, die sich vor allem an der Zellwand und an den Septen bildeten. Eine Hyphe, die zusätzlich mit Caspofungin behandelt wurde, zeigte im Unterschied dazu deutlich mehr und kleinere Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen. Diese Ablagerungen waren außerdem gleichmäßiger in der Hyphe verteilt. Dies zeigt, dass eine Inhibition der Glukansynthase die Ablagerungen beeinflussen kann.

In einem weiteren Experiment wurde die Überlebensdauer von wt Hyphen, die mit einer tödlichen Dosis Voriconazol behandelt wurden, mit Hyphen verglichen, die zusätzlich Caspofungin ausgesetzt waren. Nach 5 h und 6 h Co-Inkubation zeigten die wt Hyphen eine signifikant höhere Anzahl an lebenden Kompartimenten. Nach 5 h Co-Inkubation wurden ca. ein Drittel mehr (37 % vs. 60 %) überlebende Kompartimente innerhalb der Hyphen, die mit Voriconazol und Caspofungin behandelt wurden, gezählt. Nach 6 h Co-Inkubation waren es in dieser Bedingung ca. doppelt so viele überlebende Kompartimente (17 % vs. 43 %) im Vergleich zu den Hyphen, die nur mit Voriconazol behandelt wurden.

Allerdings wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Caspofungin der Tod der untersuchten Hyphen nur verzögert, nicht aber verhindert. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es auch andere Azol-abhängige Mechanismen gibt, die den Pilz unter bestimmten Bedingungen ebenfalls töten können. Dieser Effekt wurde ebenfalls in einem Experiment von V. Loiko mit einer konditionellen β -1,3-Glukansynthase Mutante *fks1_{tetOn}* [167] unter reprimierten Bedingungen beobachtet [169]. Für diesen Versuch wurde eine konditionelle β -1,3-Glukansynthase Mutante (*fks1_{tetOn}*) verwendet, da *A. fumigatus* Δ *fks1* eine stark reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit aufweist [167]. Das Überleben dieser Mutante wurde bei Behandlung mit Voriconazol unter induziertem und herunterreguliertem *fks1* Gen verglichen.

Sporen der *fks1_{tetOn}* Mutante wurden für diesen Versuch unter reprimierten Bedingungen für 11 h in SAB ausgekeimt. Anschließend wurden sie für 6 h mit Voriconazol (*fks1* Gen inaktiv) oder mit Voriconazol und Doxyzyklin (*fks1* Gen aktiv) co-inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium verworfen und die Hyphen beider Bedingungen in SAB für weitere 10 h bis 30 h inkubiert. Anschließend wurden die überlebenden Mikrokolonien quantifiziert.

Die Auszählung der überlebenden Mikrokolonien ergab, dass dabei ca. doppelt so viele Hyphen der *fks1_{tetOn}* Mutante, die unter reprimierten Bedingungen mit Voriconazol behandelt wurden (26 %) im

Vergleich zu einem parallelen Ansatz, der mit Voriconazol und Doxyzyklin inkubiert wurde (13 %, *fk1*-Expression induziert) überlebten.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass durch die Inhibition der β -1,3-Glukansynthase die Bildung der Ablagerungen und dadurch der fungizide Effekt der Azole verzögert wird.

Außerdem unterstützen mehrere Experimente von I. Klugherz in der Veröffentlichung von Geißel *et al.* 2018 [169] ebenfalls die Vermutung, dass die Kohlenhydratablagerung für den Tod von *A. fumigatus* durch Azole verantwortlich sind. In den Experimenten wurde die Wirkung von Azolen auf *A. fumigatus* wt Hyphen mit der auf Mutanten, die in der Atmungskette beeinträchtigt waren, verglichen (*cycA_{tetOn}* und *rip2_{tetOn}*).

RIP1 ist das Eisen-Schwefel-Protein des Cytochrom bc1-Komplexes, das Ubichinol oxidiert [244], das *cycA*-Gen kodiert Cytochrom C [245]. Obwohl *A. fumigatus* zum Überleben eine funktionierende Atmungskette benötigt [246], sind diese Mutanten aufgrund der alternativen Oxidase trotz reprimierten Bedingungen überlebensfähig. Dieses Protein katalysiert den Transfer von Elektronen vom reduzierten Ubiquinon direkt zu Sauerstoff und umgeht so den Komplex III und IV2 [245].

Beide Mutanten zeigten im Voriconazol E-Test unter reprimierten Bedingungen dieselbe oder eine geringere inhibitorische Konzentration verglichen mit dem Wildtyp. Gleichzeitig zeigten sie mikroskopisch im Gegensatz zum Wildtyp minimales Wachstum innerhalb der Inhibitionszone des E-Tests. Ähnliche Ergebnisse wurden im selben Versuch mit der Resistenztestung mittels Mikrodilutionsverfahren erzielt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Azole eine von der Atmungskette unabhängige fungistatische Wirkung auf *A. fumigatus* haben. Ihre fungizide Wirkung beruht allerdings auf der Funktionalität der Atmungskette.

Um den Zusammenhang zwischen dem Zelltod und der Bildung der Kohlenhydratablagerungen zu untersuchen, wurde ebenfalls das Überleben der Stämme *cycA_{tetOn}* und *rip2_{tetOn}* unter verschiedenen Azol-Konzentrationen untersucht. Bei Voriconazol-Konzentrationen, bei denen der Wildtyp bereits Kohlenhydrat-Ablagerungen aufwies (0,4; 0,8 und 1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$), zeigten die Mutanten in *cycA_{tetOn}* und *rip2_{tetOn}* keine Ablagerungen. Höhere Azol-Konzentrationen (3,2 und 6,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) führten zu einer signifikanten Bildung von Ablagerungen und zu einer zunehmenden Hemmung des minimalen Myzelwachstums.

Um den Zusammenhang zwischen der Bildung der Kohlenhydratablagerungen und dem Tod der Hyphen genauer zu untersuchen, wurden Hyphen der *rip2_{tetOn}* unter reprimierten Bedingungen 2,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Voriconazol ausgesetzt. Nach 15 h Inkubation wurden die Hyphen fixiert, CFW-gefärbt und anschließend analysiert, welche Kompartimente noch lebendig waren und wie groß und zahlreich die gebildeten Kohlenhydratablagerungen waren. Das Experiment zeigte eine signifikante Korrelation des Todes der Hyphen mit der Präsenz und Größe von Kohlenhydratablagerungen [169]. Alle diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die Bildung der Kohlenhydratablagerungen mit der fungiziden Wirkung der Azole korreliert [169].

Ein Grund für die erhöhte Resistenz der mitochondriellen Fusions-/Fissions-Mutante ($\Delta\text{dnm1 mgm1}_{\text{tetOn}}$) [129], sowie der Mutanten mit Defekten in der Atmungskette, könnte eine erhöhte Aktivierung von Effluxpumpen sein [140,169]. Sturm *et al.* 2020 verglichen hierzu das Transkriptom eines *A. fumigatus* Wildtyps mit einer mitochondriellen Fusions-/Fissions-Mutante ($\Delta\text{dnm1 mgm1}_{\text{tetOn}}$). Im Vergleich der Transkriptome fanden sie 7 hochregulierte ABC-Transporter und 21 MFS-Transporter. Aufgrund der hohen Anzahl der MFS-Transporter, konzentrierten sich die Autoren auf die 7 ABC-Transporter. Die Analyse

von konditionellen Mutanten der ABC-Transporter ergab, dass keiner von ihnen wesentlich zur Azolresistenz des Wildtyps beiträgt. Zusätzlich analysierten sie 17 Transkriptionsfaktoren, deren Expression sich am stärksten von der im Wildtyp unterschied. Auch konditionelle Mutanten dieser Transkriptionsfaktoren zeigten keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber Azolen unter reprimierten Bedingungen. Aufgrund dieser Beobachtungen schlossen die Autoren, dass eine mitochondrielle Dysfunktion in *A. fumigatus* die Expression mehrerer funktionell redundanter Gene verändert, sodass die Deletion einzelner Gene keinen Effekt zeigen würde. Aus diesem Grund testeten sie, ob einzelne identifizierte ABC-Transporter oder Transkriptionsfaktoren für die erhöhte Azolresistenz der Fusions-/Fissions-Mutante verantwortlich ist. Hierfür deletierten sie die Kandidaten-Gene in der $\Delta dnm1\ mgm1_{tetOn}$ Mutante. Die Deletion der einzelnen Gene hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die erhöhte Azol Toleranz der $\Delta dnm1\ mgm1_{tetOn}$ Mutante. Laut der Autoren deutete dies darauf hin, dass die identifizierten Gene nicht allein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sind. Sie mutmaßten, dass die funktionelle Redundanz der identifizierten Transkriptionsfaktoren ein Grund für das Fehlen eines sichtbaren Effekts sein könnte. Allerdings beobachteten sie außerdem eine leicht erhöhte Expression des *cyp51A*-Gens, das ebenfalls Einfluss auf die erhöhte Toleranz haben könnte [247].

Die Beobachtungen dieser Arbeit zusammen mit den beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeiten deuten auf folgenden möglichen Ablauf des Zelltods von *A. fumigatus* nach der Behandlung mit Azolen hin (siehe Abb. 38):

Eine wachsende Hyphe oder anschwellende Spore wird mit Azol behandelt. Nach Aufnahme des Azols, wird die Lanosterol-14 α -Demethylase inhibiert (siehe Abb. 38 A). Der daraus resultierende Ergosterolmangel führt innerhalb von ca. 1 bis 2 h zu einem Wachstumsarrest (siehe Abb. 38 B). Möglicherweise wird diese Zeit auch benötigt, damit ein Ergosterolmangel auftreten kann, der Auswirkungen auf die Zelle zeigt. Ein weiterer Grund könnte die Zeit, die für die Umstellung des Transkriptoms von *A. fumigatus* nötig ist, sein [224].

Der durch Azole ausgelöste Zellwandstress aktiviert den CWI. Durch diesen wird die Transkription von Genen ausgelöst, die an der Zellwandbiogenese beteiligt sind. Chitin- und Glukansynthasen, sowie deren Substrate werden in großem Maße an bestimmte Stellen der Zellmembran transportiert. Aufgrund des Modells von Taheri-Talesh *et al.* 2008 für *A. nidulans* [241] ist zu vermuten, dass durch Azole eine Destabilisierung des Aktin- und Myosin-Zytoskeletts stattfindet. Die mit Chitin-Synthasen und Glukansynthasen beladenen Vesikel werden daher vor allem in Stressregionen der Hyphe transportiert, in denen sich auch vermehrt Wsc1-Rezeptoren sammeln [76–79,241–243]. Dort kommt es zu einem exzessiven Aufbau von Zellwand bzw. zur Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten außerhalb der Plasmamembran (siehe Abb. 38 C).

Die sich formenden und schnell wachsenden Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen drücken auf die Zellmembran. Gleichzeitig blockiert das Azol die Synthese des wichtigen Membranbestandteils Ergosterol. So erhöht sich immer mehr der Druck auf die Plasmamembran, dem sie irgendwann nicht mehr standhalten kann. Es kommt zum Verlust der Membranintegrität und dem Tod des Pilzes bzw. des Kompartiments (siehe Abb. 38 D). Ein zusätzlicher Einfluss könnte hier auch eine durch Azole gestörte Endozytose sein, die wie oben beschrieben in *S. cerevisiae* beobachtet wurde [76–79].

Septen können in manchen Fällen angrenzende Hyphen-Kompartimente vor dem Membranintegritätsverlust schützen und so die Überlebenszeit des Pilzes verlängern. Der hier beobachtete Verlust dieser

Integrität war oft nur durch ein plötzliches Schrumpfen der Hyphe sichtbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Zellturgor-Druckgradient in den Fällen, in denen mehrere Kompartimente gleichzeitig starben, zu gering war, um das Schließen der Poren auszulösen.

Dieser Ablauf des Zelltodes kann durch die Inhibition von *fks1*, z.B. durch Echinocandine oder eine verringerte Expression von *fks1* aufgehoben werden. Die Inhibition oder verringerte Expression führt zu einer verringerten Bildung der Ablagerung und kann so den fungiziden Effekt der Azole verzögern.

A. fumigatus Stämme mit einer dysfunktionalen Atmungskette oder Defekten in der mitochondrialen Fusions-/Fissions-Maschinerie zeigen im Gegensatz zum Wildtyp Stamm in Gegenwart von niedrigen Azol-Konzentrationen keine Ablagerung von Zellwandkohlenhydraten (siehe Abb. 38 C). Dies könnte möglicherweise auf eine erhöhte Aktivierung von Effluxpumpen zurückzuführen sein [247].

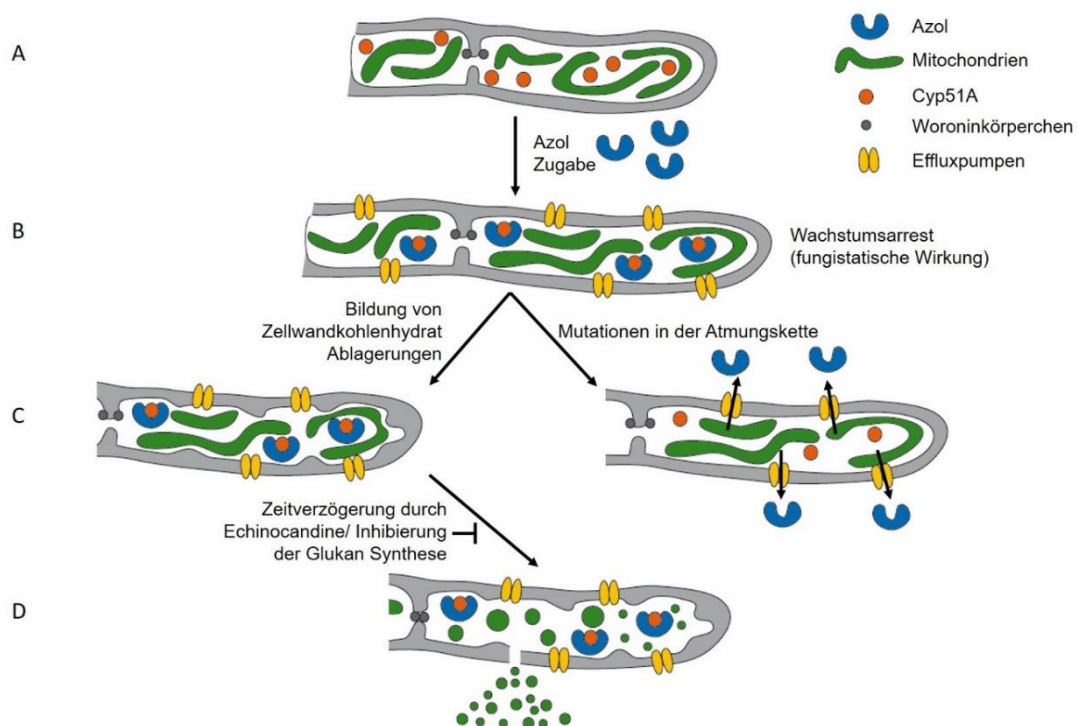


Abbildung 38: Modell des durch Azole ausgelösten Tod von *A. fumigatus*.

(A) Eine wachsende Hyphe wird mit Azol behandelt und nimmt dieses auf. (B) Durch die Inhibition von CYP51 kommt es zu einem Mangel des für den Aufbau der Zellmembran benötigten Ergosterols. Innerhalb der nächsten Stunde führt der wachsende Ergosterolmangel zu einem Wachstumsarrest der Hyphe. (C) Darauf folgend beginnt der Pilz Vesikel, die mit Chitin Synthasen und Glukan Synthasen, sowie deren Substraten beladen sind in großen Mengen zur Zellmembran zu transportieren. Sie werden vor allem in Stressregionen der Hyphe transportiert, in denen sich auch vermehrt Wsc1-Rezeptoren sammeln. Dort beginnt eine übermäßige Produktion von Glukan und Chitin. Pilzstämme mit einer dysfunktionalen Atmungskette zeigen einen starken Wachstumsphänotyp, aber bilden in Gegenwart von niedrigen Azol-Konzentrationen keine Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen, möglicherweise durch eine erhöhte Aktivierung von Effluxpumpen [247]. (D) Die sich formenden und schnell wachsenden Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen drücken so lange auf die Zellmembran, bis diese ihre Integrität verliert und die Hyphe stirbt. Angrenzende Hyphen-Kompartimente werden über das Verschließen der Septen-Poren durch Woroninkörperchen geschützt. Die Inhibition der Glukansynthese durch Echinocandine oder eine verringerte Expression der Glukansynthese *Fks1* verringert die Bildung dieser Ablagerungen und verzögert den fungiziden Effekt der Azole [137–139]. Abbildung basierend auf Geißel *et al.* 2018 [169].

5.2.3 Ist eine Kombinationstherapie von Azolen und Echinocandinen sinnvoll?

In den letzten Jahren hat das Auftreten von Azol-resistenten *Aspergillus* Isolaten alarmierend zugenommen [89]. Aus diesem Grund ist es notwendig, neue Strategien für die Behandlung invasiver Aspergillose zu finden. Zu diesen Strategien könnte die Kombination verschiedener Klassen an Antimykotika zählen. Eine Kombination aus verschiedenen Medikamenten wird bereits bei der Behandlung von *Mycobacterium tuberculosis* und dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) eingesetzt [248–250]. Für *A. fumigatus* liegen hierzu allerdings keine ausreichenden Daten vor.

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass *A. fumigatus* Hyphen in Gegenwart von Caspofungin und Voriconazol länger überleben als bei einer Behandlung mit Voriconazol allein. Allerdings wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Caspofungin der Tod der untersuchten Hyphen nur verzögert, nicht aber verhindert. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es auch andere Azol-abhängige Mechanismen gibt, die den Pilz unter bestimmten Bedingungen ebenfalls töten können.

Manavathu *et al.* 2003 untersuchten die Wirkung von verschiedenen Triazolen in Kombination mit Caspofungin auf verschiedene klinische Isolate von *A. fumigatus* [251]. In ihrer *in vitro*-Studie stellten sie fest, dass Itraconazol und sein Analog Posaconazol in Kombination mit Caspofungin die MIC beider Antimykotika verringerte. Im Gegensatz dazu hatte die Kombination aus Voriconazol und seinem Analog Ravuconazol mit Caspofungin keinen Effekt auf die MIC.

Die Autoren spekulierten, dass diese Unterschiede entstehen könnten, da

- andere Wirkmechanismen der Azole in der Kombination mit Caspofungin zum Tragen kommen,
- die Aufnahme der Azole in Gegenwart von Caspofungin selektiv beeinflusst oder erhöht wird,
- ein unterschiedlicher Aufbau der Azol-Moleküle (Lipophilie) dazu führt, dass sie unterschiedlich mit Caspofungin interagieren.

Ihre Schlussfolgerung war, dass die *in vitro*-Wirkung von Azolen mit Caspofungin unterschiedlich und daher nicht vorhersagbar ist.

Eine Reihe von Studien untersuchten ebenfalls die Wirkung von Azolen in Kombination mit Echinocandinen und stellten meist eine synergistische Wirkung fest, allerdings nicht für alle Isolate [248,252–255]. Die Kombination aus Anidulafungin und Voriconazol zeigte ebenfalls synergistische Effekte gegen Azol-resistente *A. fumigatus* Stämme [256,257].

Chatzimoschou *et al.* 2011 untersuchten die Wirkung von Triazolen und Echinocandinen in Kombination auf *C. albicans* und *C. parapsilosis* Biofilme [258]. Dabei stellten sie fest, dass bei einer Vorbehandlung mit einem Echinocandin, die Effizienz des folgenden Triazols gesteigert wurde. Bei einer gleichzeitigen Behandlung waren die Ergebnisse unterschiedlich je nach Echinocandin und Triazol.

Siopi *et al.* 2016 untersuchten den Einfluss der verwendeten Dosis auf synergistische Effekte. Sie zeigten, dass eine Kombination aus Voriconazol mit einer niedrigen Konzentration von Anidulafungin einen synergistischen Effekt hatte, während höhere Dosen eher antagonistisch wirkten [259].

All diese Studien untersuchten die MIC der Stämme und nicht das Überleben der einzelnen Hyphe. Dadurch könnten die hier gemachten Beobachtungen übersehen worden sein. Zusätzlich deuten diese Studien darauf hin, dass es eine Rolle spielt, welches Azol mit welchem Echinocandin in welcher Dosis kombiniert wird, um eine synergistische oder antagonistische Wirkung zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde, wie oben beschrieben, beobachtet, dass die zusätzliche Behandlung mit Caspofungin der Tod der untersuchten Hyphen nur verzögerte, nicht aber verhinderte. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Manavathu *et al.* 2003 [251], dass eine Kombination aus Voriconazol und Caspofungin keinen Einfluss auf die MIC des untersuchten Stammes hat.

Zusätzlich zeigten Elefanti *et al.* 2013, dass Serum die synergistische Wirkung von Echinocandinen in Verbindung mit Voriconazol und Amphotericin B verringerte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die *in vitro* beobachteten Effekte nicht auf die *in vivo* Situation übertragbar sind. Außerdem zogen sie die Schlussfolgerung, dass auch das Wachstumsmedium einen Einfluss auf mögliche synergistische Effekte hat [260].

Eine große klinische Studie versuchte zu klären, ob eine Kombinationstherapie aus Azolen und Echinocandinen einen Vorteil hätte [261]. Die Studie sah eine leichte Verbesserung des Überlebens für Patienten mit Aspergillose, wenn eine Kombinationstherapie angewendet wurde. Die Diskrepanz dieser Daten zu den hier präsentierten *in vitro* Ergebnissen, kann mehrere Ursachen haben. Eigenschaften des Medikaments, wie die Bioverfügbarkeit oder verlängerte Wirkungszeit, die *in vivo* eine Rolle spielen, könnten einen Einfluss haben.

Für die Beurteilung der Effizienz einer Azol-Echinocandin Kombinationstherapie fehlen immer noch ausreichend klinische Daten. Allerdings empfehlen Experten diese Therapie als Alternative zu einer Amphotericin B Monotherapie in Gegenden mit einer hohen Prävalenz an Azol-Resistenzen [262,263].

Aus diesem Grund sollten für eine abschließende Beurteilung weitere klinische Daten gesammelt und ausgewertet werden.

6. Ausblick

6.1. Die Charakterisierung des ERMEs in *Aspergillus fumigatus* und dessen Potential als „drug target“

Der ERMES scheint als einzelnes Ziel für Antimykotika ungeeignet zu sein, da sowohl die konditionellen Mutanten unter reprimierten Bedingungen als auch die Deletionsmutanten ($\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $mdm10_{teton}$, $mdm12_{teton}$, $mdm34_{teton}$ und $mmm1_{teton}$), ausgenommen $\Delta mdm34$ und $\Delta mmm1$, lebensfähig waren. Zusätzlich zeigte $mmm1_{teton}$ im *G. melonella* eine geringe Virulenz.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass *A. fumigatus* durch die Inhibition des ERMES nicht komplett abgetötet werden kann. Durch den Selektionsdruck innerhalb des menschlichen Körpers könnte der Pilz außerdem Zusatzmutationen erwerben und so in kurzer Zeit Resistenzen entwickeln.

Wie in der Diskussion erwähnt, könnte er aber durchaus als Ziel in Kombination mit anderen Antimykotika interessant sein. Daher könnte im nächsten Schritt die Wirkung von Echinocandinen oder Azolen auf die hier hergestellten ERMES Mutanten untersucht werden.

Es wird angenommen, dass der ERMES für den Transport von Lipiden zum Mitochondrium zuständig ist. Phosphatidylserin wird in der ER Membran synthetisiert, zum Mitochondrium transportiert und dort in Phosphatidylethanolamine umgewandelt [264]. Um die Funktion des ERMES in *A. fumigatus* genauer zu charakterisieren und die Anwendbarkeit dieser Theorie auf *A. fumigatus* zu überprüfen, könnte daher die Menge an Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamine in den ERMES Mutanten untersucht werden.

Als drittes könnten die kleinen sehr schnellen Mitochondrien, die durch den Verlust des ERMES entstehen, genauer untersucht werden. Wie verhält sich ihre Anzahl über die Zeit? Bewegen sie sich nach einem bestimmten Muster? Und sind sie trotz fehlender mitochondrieller DNA funktionsfähig? So könnten weitere Erkenntnisse über die Bewegung der Mitochondrien auf dem Zytoskelett in *A. fumigatus* gewonnen werden, sowie die Bedeutung des ERMES und der mtDNA für diese Bewegung.

6.2. Die Wirkung von Azolen auf *A. fumigatus*

Diese Arbeit zeigte, dass die Behandlung von *A. fumigatus* mit Azolen und der daraus resultierende Ergosterolmangel Zellwandstress und eine exzessive Produktion der Zellwandkohlenhydrate Chitin und Glukan auslösen. Diese Moleküle werden außerhalb der Zellmembran abgelagert bzw. in die Zellwand eingebaut. Diese Ablagerungen lösen durch Druck auf die Plasmamembran den Verlust der Zellintegrität aus und lösen so den Tod von *A. fumigatus* aus.

In weiteren Experimenten könnte die Wirkung von Azolen in Zusammenhang mit Echinocandinen weiter untersucht werden, wie z.B. die Untersuchung der Aktivierung des Zellwandintegritätsweges in *A. fumigatus* bei Behandlung mit Azolen und Echinocandinen. Darüber hinaus könnten die Auswirkungen von Echinocandinen auf die konditionelle Mutante $cyp51A_{teton} \Delta cyp51B$ untersucht werden, um so weitere Anhaltspunkte für eine synergistische oder antagonistische Wirkung zu erhalten.

Darüber hinaus könnte die Wirkung weiterer Antimykotika, wie Nikkomyzin Z (Chitin-Inhibitor), auf die Bildung der Zellwandkohlenhydrat-Ablagerungen untersucht werden.

Daneben könnten die 1-2 h, in denen keine Veränderung an den Hyphen von *A. fumigatus* beobachtet wurden, genauer untersucht werden. Hierbei könnte der Ergosterolgehalt der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden, um festzustellen, wie sich dieser ändert. Gleichzeitig könnte die Veränderung der Genexpression der Glukan- und Chitinsynthasen untersucht werden, um die hier gemachten Beobachtungen zu bestätigen.

Um die Wirkung des Ergosterolmangels auf die Vesikel, deren Transport und die Plasmamembran besser zu verstehen, könnte das Aktin und Myosin-Zytoskelett von *A. fumigatus* untersucht werden. Hierfür könnten Vesikeln mittels eines GFP-markierten CHS6 markiert werden. CHS6 bindet an CHS5-ARF1P, das für den spezifischen Export von Cargo-Proteinen, wie der Chitinsynthase 3 [238] verantwortlich ist. Außerdem könnte in einem Stamm mit GFP-markierten Woroninkörperchen deren Rolle während des durch Azole ausgelösten Zelltods untersucht werden.

Darüber hinaus könnten der 5%-Anteil der Hyphen-Kompartimente der in Experimenten sowohl mit Echinocandinen als auch mit Azolen einen intrinsischen Vorteil zu haben scheint, genauer untersucht werden, z.B. durch einen Vergleich der Transkriptions- und Translationsprofile. Diese Kompartimente sind besonders interessant, da sie bei einer Resistenzbildung von besonderer Bedeutung sein können.

Literaturverzeichnis

1. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2017. S. 86–96. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.019
2. Alastruey-Izquierdo A, Cadranet J, Flick H, Godet C, Hennequin C, Hoenigl M, u. a. Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives. *Respiration*. 2018;96: 159–170. doi:10.1159/000489474
3. Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, u. a. Chronic pulmonary aspergillosis: Rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47: 45–68. doi:10.1183/13993003.00583-2015
4. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science; 2012. S. 165rv13-165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
5. Robin C, Cordonnier C, Sitbon K, Raus N, Lortholary O, Maury S, u. a. Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25: 354–361. doi:10.1016/j.bbmt.2018.09.028
6. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, u. a. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: The SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect*. 2011;17: 1882–1889. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03548.x
7. Montagna MT, Lovero G, Coretti C, Martinelli D, Delia M, De Giglio O, u. a. SIMIFF study: Italian fungal registry of mold infections in hematological and non-hematological patients. *Infection*. 2014;42: 141–151. doi:10.1007/s15010-013-0539-3
8. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: Update 2012. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier; 2012. S. 293–300. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012
9. Kuster S, Stampf S, Gerber B, Baettig V, Weisser M, Gerull S, u. a. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A Swiss transplant cohort study. *Transpl Infect Dis*. 2018;20: e12981. doi:10.1111/tid.12981
10. Harrison N, Mitterbauer M, Tobudic S, Kalhs P, Rabitsch W, Greinix H, u. a. Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: A retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2015;15: 584. doi:10.1186/s12879-015-1329-6
11. Herbrecht R, Bories P, Moulin J-C, Ledoux M-P, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1272: 23–30. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06829.x
12. Lehrnbecher T, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*. 2010;61: 259–265. doi:10.1016/j.jinf.2010.06.018
13. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a University Hospital. *J Infect*. 1996;33: 23–32. doi:10.1016/S0163-4453(96)92700-0
14. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, u. a. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: An autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Hematologica*. 2006;91: 986–989. Abgerufen: <https://mdanderson.elsevierpure.com/en/publications/invasive-fungal-infections-in-patients-with-hematologic-malignanc>
15. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35: 415–434. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.008>
16. Wideman JG, Gawryluk RMR, Gray MW, Dacks JB. The ancient and widespread nature of the ER-mitochondria encounter structure. *Mol Biol Evol*. 2013;30: 2044–2049. doi:10.1093/molbev/mst120
17. Rolf Sauermost DF. Aspergillus - Lexikon der Biologie. 1999. Abgerufen: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/aspergillus/5467>. Zugegriffen 18. November 2022.
18. Baker S, Bennett J. An Overview of the Genus Aspergillus. 2007. S. 3–13. doi:10.1201/9781420008517.sec1
19. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, u. a. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. *Stud Mycol*. 2014;78: 141–173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
20. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. Aspergillus fumigatus and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019786
21. Latgé JP. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 1999. S. 310–350. doi:10.1128/cmr.12.2.310
22. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. *Nature*. 2009;457: 471–474. doi:10.1038/nature07528
23. Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*. *Cell Microbiol*; 2010. S. 863–872. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x
24. Valiante V, Macheleidt J, Föge M, Brakhage AA. The Aspergillus fumigatus cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*. 2015;6: 325. doi:10.3389/fmicb.2015.00325
25. Latgé JP. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. *Mol Microbiol*; 2007. S. 279–290. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x
26. Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, u. a. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of Aspergillus fumigatus cell wall. *J Biol Chem*. 2000;275: 27594–27607. doi:10.1074/jbc.M909975199
27. Morelle W, Bernard M, Debeaupuis JP, Buitrago M, Tabouret M, Latgé JP. Galactomannoproteins of Aspergillus fumigatus. *Eukaryot Cell*. 2005;4: 1308–1316. doi:10.1128/EC.4.7.1308-1316.2005
28. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2016. S. 163–176. doi:10.1038/nrmicro.2015.21
29. N S-M, R B, E F, S P. Combined Effect of Platelets and Anidulafungin against Aspergillus fumigatus Infections. *J Infect Dis Ther* 2017 55. 2017;5: 1–6. doi:10.4172/2332-0877.1000334
30. Gow NAR, Latgé J-P, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*.

- 2017;5. doi:10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016
31. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Front Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/FMICB.2019.02993
 32. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *Heitman J, Herausgeber. PLoS Pathog.* 2013;9: e1003743. doi:10.1371/journal.ppat.1003743
 33. Verburg K, van Neer J, Duca M, de Cock H. Novel Treatment Approach for Aspergilloses by Targeting Germination. *J Fungi* 2022, Vol 8, Page 758. 2022;8: 758. doi:10.3390/JOF8080758
 34. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, u. a. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases.* Oxford University Press; 2016. S. e1–e60. doi:10.1093/cid/ciw326
 35. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, u. a. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy.* 2013;43: 850–873. doi:10.1111/cea.12141
 36. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax.* BMJ Publishing Group; 2015. S. 270–277. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206291
 37. Vacher G, Niculita-Hirzel H, Roger T. Immune responses to airborne fungi and non-invasive airway diseases. *Seminars in Immunopathology.* Springer Verlag; 2015. S. 83–96. doi:10.1007/s00281-014-0471-3
 38. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Medical Mycology.* Oxford University Press; 2013. S. 361–370. doi:10.3109/13693786.2012.738312
 39. Greenberger PA, Bush RK, Demain JG, Luong A, Slavin RG, Knutsen AP. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2: 703–708. doi:10.1016/j.jaip.2014.08.007
 40. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ.* 2011;89: 864–872. doi:10.2471/BLT.11.089441
 41. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, u. a. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood.* 2003;102: 827–833. doi:10.1182/blood-2003-02-0456
 42. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: Changes in epidemiology and risk factors. *Blood.* 2002;100: 4358–4366. doi:10.1182/blood-2002-05-1496
 43. Webb BJ, Ferraro JP, Rea S, Kaufusi S, Goodman BE, Spalding J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5. doi:10.1093/OFID/OFY187
 44. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, u. a. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis.* 2010;50: 1091–1100. doi:10.1086/651263
 45. Sen P, Vijay M, Singh S, Hameed S, Vijayaraghvan P. Understanding the environmental drivers of clinical azole resistance in *Aspergillus* species. *Drug Target Insights.* 2022;16. doi:10.33393/DTI.2022.2476
 46. Winters B, Custer J, Galvagno SM, Colantuoni E, Kapoor SG, Lee HW, u. a. Diagnostic errors in the intensive care unit: a systematic review of autopsy studies. *BMJ Qual Saf.* 2012;21: 894–902. doi:10.1136/BMJQS-2012-000803
 47. Wall G, Lopez-Ribot JL. Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2020;9: 1–10. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9080445
 48. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003;11: 272–279. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117-3
 49. Te Welscher YM, Van Leeuwen MR, De Kruijff B, Dijksterhuis J, Breukink E. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 11156–11159. doi:10.1073/PNAS.1203375109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201203375SI.PDF
 50. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, u. a. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol* 2014 105. 2014;10: 400–406. doi:10.1038/nchembio.1496
 51. Janknegt R, de Marie S, Bakker-Woudenberg IAJM, Crommelin DJA. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clinical pharmacokinetics.* *Clin Pharmacokinet.* 1992;23: 279–291. doi:10.2165/00003088-199223040-00004
 52. Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. New facets of antifungal therapy. *Virulence.* 2017;8: 222–236. doi:10.1080/21505594.2016.1257457
 53. Cappelletty D, Eiselstein-McKittrick K. The echinocandins. *Pharmacotherapy.* 2007;27: 369–388. doi:10.1592/PHCO.27.3.369
 54. Suher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother.* 2009;43: 1647–1657. doi:10.1345/APH.1M237
 55. Chen SC-A, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. *Drugs.* 2011;71: 11–41. doi:10.2165/11585270-000000000-00000
 56. Johnson MD, Perfect JR. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4: 807–823. doi:10.1517/14656566.4.5.807
 57. Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49: 889–891. doi:10.1093/JAC/DFK045
 58. Aigner M, Lass-Flörl C. Treatment of drug-resistant *Aspergillus* infection. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16: 2267–2270. doi:10.1517/14656566.2015.1083976
 59. Aguilar-Zapata D, Petraitiene R, Petraitis V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clin Infect Dis.* 2015;61 Suppl 6: S604–S611. doi:10.1093/CID/CIV814
 60. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology; 1999. S. 501–517. doi:10.1128/cmr.12.4.501
 61. Saunders J, Maki K, Koski R, Nybo SE. Tavaborole, Efinaconazole, and Luliconazole: Three New Antimycotic Agents for the Treatment of Dermatophytic Fungi. *J Pharm Pract.* 2017;30: 621–630. doi:10.1177/0897190016660487
 62. Ellsworth M, Ostrosky-Zeichner L. Isavuconazole: Mechanism of Action, Clinical Efficacy, and Resistance. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2020;6: 1–10. doi:10.3390/JOF6040324
 63. Črešnar B, Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1814: 29–35. doi:10.1016/J.BBAPAP.2010.06.020
 64. Aoyama Y, Yoshida Y, Sato R. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450(14)DM and by intact microsomes. *J Biol Chem.* 1984;259: 1661–1666.
 65. Aoyama Y, Yoshida Y. Different substrate specificities of lanosterol 14 α -demethylase (P-45014DM) of *Saccharomyces*

- cerevisiae and rat liver for 24-methylene-24,25-dihydrolanosterol and 24,25-dihydrolanosterol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178: 1064–1071. doi:10.1016/0006-291X(91)91000-3
66. Warrilow A, Ugochukwu C, Lamb D, Kelly D, Kelly S. Expression and characterization of CYP51, the ancient sterol 14-demethylase activity for cytochromes P450 (CYP), in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Lipids*. 2008;43: 1143–1153. doi:10.1007/S11745-008-3239-5
 67. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 2431–2438. doi:10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001
 68. Koltin Y, Hitchcock CA. The search for new triazole antifungal agents. *Curr Opin Chem Biol*. 1997;1: 176–182. doi:10.1016/S1367-5931(97)80007-5
 69. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12: 40–79. doi:10.1128/CMR.12.1.40/ASSET/85F96AFD-9542-4E8F-82C4-D4E5C90698AE/ASSETS/GRAPHIC/CM0190008T82.JPEG
 70. Cowen LE. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 2008 6. 2008;6: 187–198. doi:10.1038/nrmicro1835
 71. Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40: 279–291. doi:10.1128/AAC.40.2.279
 72. Parks LW, Lorenz RT, Casey WM. Functions for Sterols in Yeast Membranes. *Emerg Targets Antifungal Chemother*. 1992; 393–409. doi:10.1007/978-1-4615-3274-3_15
 73. Sgheri C, Porta A, Castellano S, Pinzino C, Quartacci MF, Calucci L. Effects of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: A spin probe EPR study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014;1838: 465–473. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.015
 74. Kodedová M, Sychrová H. Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0139306
 75. Parks LW, Smith SJ, Crowley JH. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast-A review. *Lipids*. Springer-Verlag; 1995. S. 227–230. doi:10.1007/BF02537825
 76. Jordá T, Puig S. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)*. 2020;11: 1–18. doi:10.3390/GENES11070795
 77. Joshua IM, Höfken T. From Lipid Homeostasis to Differentiation: Old and New Functions of the Zinc Cluster Proteins *Ecm22*, *Upc2*, *Sut1* and *Sut2*. *Int J Mol Sci*. 2017;18. doi:10.3390/IJMS18040772
 78. Heese-Peck A, Pichler H, Zanolari B, Watanabe R, Daum G, Riezman H. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2002;13: 2664–2680. doi:10.1091/MBC.E02-04-0186
 79. Degreif D, Cucu B, Budin I, Thiel G, Bertl A. Lipid determinants of endocytosis and exocytosis in budding yeast. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864: 1005–1016. doi:10.1016/J.BBALIP.2019.03.007
 80. Vanden Bossche H. Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. *Current topics in medical mycology*. *Curr Top Med Mycol*; 1985. S. 313–351. doi:10.1007/978-1-4613-9547-8_12
 81. Georgopapadakou NH, Bertasso A. Effects of squalene epoxidase inhibitors on *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36: 1779–1781. doi:10.1128/AAC.36.8.1779
 82. K B-B, L N, P P. Biochemical changes associated with the antifungal action of the triazole ICI 153,066 on *Candida albicans* and *Trichophyton quinckeanum*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991;63: 127–131. doi:10.1016/0378-1097(91)90074-K
 83. Jain K. Interference Effects of Deleterious and Beneficial Mutations in Large Asexual Populations. *Genetics*. 2019;211: 1357. doi:10.1534/GENETICS.119.301960
 84. Levin DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69: 262–91. doi:10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005
 85. Valiante V, Jain R, Heinekamp T, Brakhage AA. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 2009;46: 909–918. doi:10.1016/j.fgb.2009.08.005
 86. Valiante V, Heinekamp T, Jain R, Härtl A, Brakhage AA. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol*. 2008;45: 618–627. doi:10.1016/j.fgb.2007.09.006
 87. Dirr F, Echtenacher B, Heesemann J, Hoffmann P, Ebel F, Wagener J. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300: 496–502. doi:10.1016/j.ijmm.2010.03.001
 88. Jain R, Valiante V, Remme N, Docimo T, Heinekamp T, Hertweck C, u. a. The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 2011;82: 39–53. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07778.x
 89. Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55: 105807. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.011
 90. Sipos G, Kuchler K. Fungal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Drug Resistance & Detoxification. *Curr Drug Targets*. 2006;7: 471–481. doi:10.2174/138945006776359403
 91. Klein C, Kuchler K, Valachovic M. ABC proteins in yeast and fungal pathogens. *Essays Biochem*. 2011;50: 101–119. doi:10.1042/BSE0500101
 92. Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, u. a. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 2008;9: 579. doi:10.1186/1471-2164-9-579
 93. Paulsen IT, Sliwinski MK, Nelissen B, Goffeau A, Saier MH. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd; 1998. S. 116–125. doi:10.1016/S0014-5793(98)00629-2
 94. Prasad R, Goffeau A. Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66: 39–63. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150111
 95. Gbelska Y, Krijger J-J, Breunig KD. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. *FEMS Yeast Res*. 2006;6: 345–355. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00058.x
 96. Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*. *Frontiers Media S.A.*; 2016. S. 1. doi:10.3389/fmed.2016.00011
 97. Kovalchuk A, Driessen AJM. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics*. 2010;11: 177. doi:10.1186/1471-2164-11-177
 98. Lamping E, Baret P V., Holmes AR, Monk BC, Goffeau A, Cannon RD. Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology,

- motifs and function. *Fungal Genet Biol.* 2010;47: 127–142. doi:10.1016/j.fgb.2009.10.007
99. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingróff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7: 453–460. doi:10.1586/eri.09.18
 100. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SAE, Delmas G, Oza U, u. a. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47: 1719–1726. doi:10.1128/AAC.47.5.1719-1726.2003
 101. da Silva Ferreira ME, Malavazi I, Savoldi M, Brakhage AA, Goldman MHS, Kim HS, u. a. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr Genet.* 2006;50: 32–44. doi:10.1007/s00294-006-0073-2
 102. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, u. a. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-cyp51a-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68: 1486–1496. doi:10.1093/jac/dkt075
 103. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 2009;9: 1029–1050. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x
 104. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2017. S. 2173. doi:10.3389/fmicb.2016.02173
 105. Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in fungi: La pièce de résistance. *PLoS Pathogens.* Public Library of Science; 2009. doi:10.1371/journal.ppat.1000486
 106. Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhäuser J, Rogers PD. A gain-of-function mutation in the transcription factor *Upc2p* causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell.* 2008;7: 1180–1190. doi:10.1128/EC.00103-08
 107. Snelders E, Melchers WJG, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiology.* 2011. S. 335–347. doi:10.2217/fmb.11.4
 108. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, u. a. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (*Erg11p*, *Cyp51p*) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1999;145: 2701–2713. doi:10.1099/00221287-145-10-2701
 109. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gygas SE, u. a. Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2012;11: 1289–1299. doi:10.1128/EC.00215-12
 110. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, u. a. *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2013;13: 386–393. doi:10.1111/1567-1364.12042
 111. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59: 1030–1037. doi:10.1128/AAC.04613-14
 112. Choi MJ, Won EJ, Shin JH, Kim SH, Lee W-G, Kim M-N, u. a. Resistance Mechanisms and Clinical Features of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis* Isolates Compared with Fluconazole-Less-Susceptible Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60: 3653–3661. doi:10.1128/AAC.02652-15
 113. Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Tyndall JDA, Niimi K, Holmes AR, u. a. *Abc1p* is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53: 354–369. doi:10.1128/AAC.01095-08
 114. Guinea J, Sánchez-Somolinos M, Cuevas O, Peláez T, Bouza E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: The contribution of efflux-pumps. *Med Mycol.* 2006;44: 575–578. doi:10.1080/13693780600561544
 115. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, u. a. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42: 2645–2649. doi:10.1128/aac.42.10.2645
 116. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, u. a. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* 2006;172: 2139–2156. doi:10.1534/genetics.105.054767
 117. Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. *Mol Microbiol.* 2008;68: 624–641. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06176.x
 118. Marichal P, Vanden Bossche H, Odds FC, Nobels G, Warnock DW, Timmerman V, u. a. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41: 2229–2237. doi:10.1128/aac.41.10.2229
 119. Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog.* 2010;6: 1–13. doi:10.1371/journal.ppat.1000848
 120. Sionov E, Chang YC, Kwon-Chung KJ. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57: 5127–5130. doi:10.1128/AAC.00694-13
 121. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegville M, Le pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\delta 5,6$ -desaturase (*Erg3p*) confer azole resistance: Characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67: 2131–2138. doi:10.1093/jac/dks186
 122. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, u. a. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54: 4527–4533. doi:10.1128/AAC.00348-10
 123. Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, Laverdiere M, Cacciapuoti A, McNicholas PM. Inactivation of sterol $\Delta 5,6$ -desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49: 3646–3651. doi:10.1128/AAC.49.9.3646-3651.2005
 124. Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, u. a. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57: 3182–3193. doi:10.1128/AAC.00555-13
 125. Nakayama H, Izuta M, Nakayama N, Arisawa M, Aoki Y. Depletion of the squalene synthase (*ERG9*) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44: 2411–2418. doi:10.1128/AAC.44.9.2411-2418.2000
 126. Tsai HF, Bard M, Izumikawa K, Krol AA, Sturm AM, Culbertson NT, u. a. *Candida glabrata erg1* mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 2483–2489. doi:10.1128/AAC.48.7.2483-2489.2004
 127. Bard M, Sturm AM, Pierson CA, Brown S, Rogers KM, Nabinger S, u. a. Sterol uptake in *Candida glabrata*: Rescue of

- sterol auxotrophic strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;52: 285–293. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.03.001
128. Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, u. a. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene CgAUS1 protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60: 1264–1272. doi:10.1093/jac/dkm321
129. Neubauer M, Zhu Z, Penka M, Helmschrott C, Wagener N, Wagener J. Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Mol Microbiol*. 2015;98: 930–945. doi:10.1111/mmi.13167
130. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2010. S. 872–884. doi:10.1038/nrm3013
131. Merz S, Hammermeister M, Altmann K, Dürr M, Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biological Chemistry*. De Gruyter; 2007. S. 917–926. doi:10.1515/BC.2007.110
132. Rank GH, Bech-Hansen NT. Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in *S. cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1973;126: 93–102. doi:10.1007/BF00330986
133. Colson AM, Goffeau A, Briquet M, Weigel P, Mattoon JR. Nucleo-cytoplasmic interaction between oligomycin-resistant mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1974;135: 309–326. doi:10.1007/BF00271146
134. MacPherson S, Laroche M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70: 583–604. doi:10.1128/MMBR.00015-06
135. Balzi E, Goffeau A. Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27: 71–76. doi:10.1007/BF02110333
136. Delahodde A, Delaveau T, Jacq C. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol*. 1995;15: 4043–4051. doi:10.1128/mcb.15.8.4043
137. Carvajal E, Van Den Hazel HB, Cybularz-Kolaczowska A, Balzi E, Goffeau A. Molecular and phenotypic: Characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Genet*. 1997;256: 406–415. doi:10.1007/s004380050584
138. Nourani A, Papajova D, Delahodde A, Jacq C, Subik J. Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol Gen Genet*. 1997;256: 397–405. doi:10.1007/s004380050583
139. Simonics T, Kozovska Z, Michalkova-Papajova D, Delahodde A, Jacq C, Subik J. Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal pdr3 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2000;38: 248–255. doi:10.1007/s002940000164
140. Hallstrom TC, Moyer-Rowley WS. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000;275: 37347–37356. doi:10.1074/jbc.M007338200
141. Herrmann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, u. a. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*. 1998;143: 359–373. doi:10.1083/jcb.143.2.359
142. Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998;273: 20150–20155. doi:10.1074/jbc.273.32.20150
143. Keil M, Bareth B, Woellhaf MW, Peleh V, Prestele M, Rehling P, u. a. Oxa1-ribosome complexes coordinate the assembly of cytochrome c oxidase in mitochondria. *J Biol Chem*. 2012;287: 34484–34493. doi:10.1074/jbc.M112.382630
144. Altamura N, Capitano N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G. The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett*. 1996;382: 111–115. doi:10.1016/0014-5793(96)00165-2
145. Moyer-Rowley WS. Retrograde regulation of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 2005. S. 15–21. doi:10.1016/j.gene.2005.03.019
146. Katzmann DJ, Burnett PE, Golin J, Mahé Y, Moyer-Rowley WS. Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product. *Mol Cell Biol*. 1994;14: 4653–4661. doi:10.1128/mcb.14.7.4653
147. Zhang X, Moyer-Rowley WS. *Saccharomyces cerevisiae* Multidrug Resistance Gene Expression Inversely Correlates with the Status of the F0 Component of the Mitochondrial ATPase. *J Biol Chem*. 2001;276: 47844–47852. doi:10.1074/jbc.M106285200
148. Hallstrom TC, Lambert L, Schorling S, Balzi E, Goffeau A, Moyer-Rowley WS. Coordinate Control of Sphingolipid Biosynthesis and Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2001;276: 23674–23680. doi:10.1074/jbc.M101568200
149. Klecker T, Böckler S, Westermann B. Making connections: Interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2014. S. 537–545. doi:10.1016/j.tcb.2014.04.004
150. Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, u. a. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* (80-). 2009;325: 477–481. doi:10.1126/science.1175088
151. Berger KH, Sogo LF, Yaffe MP. Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol*. 1997;136: 545–553. doi:10.1083/jcb.136.3.545
152. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, u. a. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2002;13: 847–853. doi:10.1091/mbc.01-12-0588
153. Burgess SM, Delannoy M, Jensen RE. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol*. 1994;126: 1375–1391. doi:10.1083/jcb.126.6.1375
154. Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, u. a. The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major β -barrel assembly pathway of mitochondria. *EMBO J*. 2007;26: 2229–2239. doi:10.1038/sj.emboj.7601673
155. Aiken Hobbs AE, Srinivasan M, McCaffery JM, Jensen RE. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol*. 2001;152: 401–410. doi:10.1083/jcb.152.2.401
156. Lang AB, John Peter ATAT, Walter P, Kornmann B. ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. *J Cell Biol*. 2015;210: 883–890. doi:10.1083/jcb.201502105
157. Osman C, Voelker DR, Langer T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press; 2011. S. 7–16. doi:10.1083/jcb.201006159
158. Kopec KO, Alva V, Lupas AN. Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics*. 2010;26: 1927–1931. doi:10.1093/bioinformatics/btq326
159. Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Sanjuán Szklarz LK, Milenkovic D, Kozjak V, u. a. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*. 2004;7: 61–71.

- doi:10.1016/j.devcel.2004.06.003
160. Nguyen TT, Lewandowska A, Choi JY, Markgraf DF, Junker M, Bilgin M, u. a. Gem1 and ERMES Do Not Directly Affect Phosphatidylserine Transport from ER to Mitochondria or Mitochondrial Inheritance. *Traffic*. 2012;13: 880–890. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01352.x
 161. Murley A, Lackner LL, Osman C, West M, Voeltz GK, Walter P, u. a. ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*. 2013;2013: 422. doi:10.7554/eLife.00422
 162. Meeusen S, Nunnari J. Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol*. 2003;163: 503–510. doi:10.1083/jcb.200304040
 163. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-)*. 2011;334: 358–362. doi:10.1126/science.1207385
 164. Böckler S, Westermann B. Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev Cell*. 2014;28: 450–458. doi:10.1016/j.devcel.2014.01.012
 165. Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. 1987;56: 117–124. doi:10.1016/0378-1119(87)90164-8
 166. Krappmann S, Sasse C, Braus GH. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell*. 2006;5: 212–215. doi:10.1128/EC.5.1.212-215.2006
 167. Dichtl K, Samantaray S, Aimaniananda V, Zhu Z, Prévost M-C, Latgé J-P, u. a. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol Microbiol*. 2015;95: 458–471. doi:10.1111/mmi.12877
 168. Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol*. 2012;83: 506–519. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07946.x
 169. Geißel B, Loiko V, Klugherz I, Zhu Z, Wagener N, Kurzai O, u. a. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. *Nat Commun*. 2018;9: 3098. doi:10.1038/s41467-018-05497-7
 170. 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: 37–43. doi:10.1016/j.IJMM.2016.11.005
 171. 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. doi:10.4148/1941-4765.1173
 172. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1996;24: 3546–3551. doi:10.1093/NAR/24.18.3546
 173. 6x Gel-loading buffer. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006;2006: pdb.rec8658. doi:10.1101/PDB.REC8658
 174. 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: 1751–1754. doi:10.1128/AEM.03626-12
 175. Liesche J, Marek M, Günther-Pomorski T. Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Front Microbiol*. 2015;6: 107. doi:10.3389/fmicb.2015.00107
 176. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7: 214–229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289
 177. Durieux MF, Melloul É, Jemel S, Roisin L, Dardé ML, Guillot J, u. a. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*. 2021;12: 818–834. doi:10.1080/21505594.2021.1893945
 178. H P, W N, B W. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*. 2000;11: 2961–2971. doi:10.1091/MBC.11.9.2961
 179. Snelders E, Van Der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, u. a. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008;5: 1629–1637. doi:10.1371/journal.pmed.0050219
 180. Loiko V, Wagener J. The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the β -1,3-Glucan Synthase Fks1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61. doi:10.1128/AAC.01690-16
 181. 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. doi:10.3389/fcimb.2018.00128
 182. 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. doi:10.3389/fcimb.2018.00128
 183. Falcone C, Mazzoni C. External and internal triggers of cell death in yeast. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73: 2237. doi:10.1007/S00018-016-2197-Y
 184. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, u. a. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg Med Chem*. 2012;20: 5678–5698. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.045
 185. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, u. a. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. *Bioorg Med Chem*; 2012. S. 5678–5698. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.045
 186. Damveld RA, vanKuyk PA, Arentshorst M, Klis FM, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. Expression of agsA, one of five 1,3- α -d-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal Genet Biol*. 2005;42: 165–177. doi:10.1016/J.FGB.2004.11.006
 187. Moreno-Velázquez SD, Seidel C, Juvradi PR, Steinbach WJ, Read ND. Caspofungin-mediated growth inhibition and paradoxical growth in *Aspergillus fumigatus* involve fungicidal hyphal tip lysis coupled with regenerative intrahyphal growth and dynamic changes in β -1,3-glucan synthase localization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61. doi:10.1128/AAC.00710-17
 188. Kurtz MB, Heath IB, Marrinan J, Dreikorn S, Onishi J, Douglas C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38: 1480–1489. doi:10.1128/AAC.38.7.1480
 189. Douglas CM. Understanding the microbiology of the *Aspergillus* cell wall and the efficacy of caspofungin. *Med Mycol*. 2006;44: 95–99. doi:10.1080/13693780600981684
 190. Rasmussen CG, Glass NL. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2005;4: 1913–1925. doi:10.1128/EC.4.11.1913-1925.2005
 191. Justa-Schuch D, Heilig Y, Richthammer C, Seiler S. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*. 2010;76: 220–235.

- doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07093.x
192. Harrington BJ, Hageage GJ. Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. *Lab Med.* 2003;34: 361–367. doi:10.1309/eph2tdt8335gh0r3
 193. Wood PJ, Fulcher RG. Specific interaction of aniline blue with (1 → 3)- β -d-glucan. *Carbohydr Polym.* 1984;4: 49–72. doi:10.1016/0144-8617(84)90044-4
 194. Lima SL, Colombo AL, de Almeida Junior JN. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2019. S. 2573. doi:10.3389/fmicb.2019.02573
 195. Carr PD, Tuckwell D, Hey PM, Simon L, D'Enfert C, Birch M, u. a. The transposon impala is activated by low temperatures: Use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2010;9: 438–448. doi:10.1128/EC.00324-09
 196. Tukey TM, Verma-Gaur J, Nguyen J, Hewitt VL, Lo TL, Shingu-Vazquez M, u. a. The Endoplasmic Reticulum-Mitochondrion Tether ERMES Orchestrates Fungal Immune Evasion, Illuminating Inflammation Responses to Hyphal Signals. *mSphere.* 2016;1. doi:10.1128/msphere.00074-16
 197. Becker JM, Henry LK, Jiang W, Koltin Y. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect Immun.* 1995;63: 4515–4518. doi:10.1128/iai.63.11.4515-4518.1995
 198. Wideman JG, Lackey SWK, Srayko MA, Norton KA, Nargang FE. Analysis of Mutations in *Neurospora crassa* ERMES Components Reveals Specific Functions Related to β -Barrel Protein Assembly and Maintenance of Mitochondrial Morphology. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0071837
 199. Wideman JG, Go NE, Klein A, Redmond E, Lackey SWK, Tao T, u. a. Roles of the Mdm10, Tom7, Mdm12, and Mmm1 proteins in the assembly of mitochondrial outer membrane proteins in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell.* 2010;21: 1725–1736. doi:10.1091/mbc.E09-10-0844
 200. Koch K V., Suelmann R, Fischer R. Deletion of *mdmB* impairs mitochondrial distribution and morphology in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003;55: 114–124. doi:10.1002/cm.10117
 201. Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, Bekker M, Brul S, de Koster CG, u. a. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2011;10: 1071–1081. doi:10.1128/EC.05011-11
 202. Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, u. a. A Protein Complex Containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p Links Mitochondrial Membranes and DNA to the Cytoskeleton-based Segregation Machinery. *Mol Biol Cell.* 2003;14: 4618–4627. doi:10.1091/mbc.E03-04-0225
 203. B K, TM T, TL L, S N, P B, A T. The Mitochondrial GTPase Gem1 Contributes to the Cell Wall Stress Response and Invasive Growth of *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2017;8. doi:10.3389/FMICB.2017.02555
 204. Tan T, Özbacı C, Brügger B, Rapaport D, Dimmer KS. Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J Cell Sci.* 2013;126: 3563–3574. doi:10.1242/jcs.121244
 205. Awad AM, Bradley MC, Fernández L, Fernández-Del-Río F, Nag A, Tsui HS, u. a. Coenzyme Q 10 deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays Biochem.* 2018;62: 361–376. doi:10.1042/EBC20170106
 206. Eisenberg-Bord M, Tsui HS, Antunes D, Fernández-del-Río L, Bradley MC, Dunn CD, u. a. The Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure Complex Coordinates Coenzyme Q Biosynthesis. *Contact.* 2019;2: 251525641882540. doi:10.1177/2515256418825409
 207. Lazzarino DA, Boldogh I, Smith MG, Rosand J, Pon LA. Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol Biol Cell.* 1994;5: 807–818. doi:10.1091/mbc.5.7.807
 208. Berepiki A, Lichius A, Read ND. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature Reviews Microbiology.* Nature Publishing Group; 2011. S. 876–887. doi:10.1038/nrmicro2666
 209. Boldogh IR, Pon LA. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* Elsevier; 2006. S. 450–462. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.02.014
 210. Youngman MJ, Hobbs AEA, Burgess SM, Srinivasan M, Jensen RE. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol.* 2004;164: 677–688. doi:10.1083/jcb.200308012
 211. Brun S, Dalle F, Saulnier P, Renier G, Bonnin A, Chabasse D, u. a. Biological consequences of petite mutations in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56: 307–314. doi:10.1093/jac/dki200
 212. Narasipura SD, Chaturvedi V, Chaturvedi S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol.* 2005;55: 1782–1800. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04503.x
 213. Bambach A, Fernandes MP, Ghosh A, Kruppa M, Alex D, Li D, u. a. Goa1p of *Candida albicans* localizes to the mitochondria during stress and is required for mitochondrial function and virulence. *Eukaryot Cell.* 2009;8: 1706–1720. doi:10.1128/EC.00066-09
 214. Qu Y, Jelacic B, Pettolino F, Perry A, Lo TL, Hewitt VL, u. a. Mitochondrial sorting and assembly machinery subunit Sam37 in *Candida albicans*: Insight into the roles of mitochondria in fitness, cell wall integrity, and virulence. *Eukaryot Cell.* 2012;11: 532–544. doi:10.1128/EC.05292-11
 215. Becker JM, Kauffman SJ, Hauser M, Huang L, Lin M, Sillaots S, u. a. Pathway analysis of *Candida albicans* survival and virulence determinants in a murine infection model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 22044–22049. doi:10.1073/pnas.1009845107
 216. Verma S, Shakya VPS, Idnurm A. Exploring and exploiting the connection between mitochondria and the virulence of human pathogenic fungi. *Virulence.* 2018;9: 426–446. doi:10.1080/21505594.2017.1414133
 217. Shingu-Vazquez M, Traven A. Mitochondria and fungal pathogenesis: Drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic Cell.* *Eukaryot Cell;* 2011. S. 1376–1383. doi:10.1128/EC.05184-11
 218. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, Torelli R, Posteraro B, Vandeputte P, u. a. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 1852–1860. doi:10.1128/AAC.01271-10
 219. Nes WD. Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chem Rev.* 2011;111: 6423–6451. doi:10.1021/CR200021M
 220. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2007;1770: 467–477. doi:10.1016/j.bbagen.2006.07.018
 221. Agarwal AK, Rogers PD, Baerson SR, Jacob MR, Barker KS, Cleary JD, u. a. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2003;278: 34998–35015. doi:10.1074/jbc.M306291200
 222. Fonzi WA. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. *J Bacteriol.* 1999;181: 7070–7079. doi:10.1128/jb.181.22.7070-7079.1999
 223. Roundtree MT, Juvvadi PR, Keats Shwab E, Christopher Cole D, Steinbacha WJ. *Aspergillus fumigatus* Cyp51A and

- Cyp51B proteins are compensatory in function and localize differentially in response to antifungals and cell wall inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64. doi:10.1128/AAC.00735-20
224. Hokken MWJ, Zoll J, Coolen JPM, Zwaan BJ, Verweij PE, Melchers WJG. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; An expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. *BMC Genomics.* 2019;20. doi:10.1186/s12864-018-5255-z
225. Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, u. a. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3001–3012. doi:10.1128/AAC.46.9.3001-3012.2002
226. Munayyer HK, Mann PA, Chau AS, Yarosh-Tomaine T, Greene JR, Hare RS, u. a. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 α -demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 3690–3696. doi:10.1128/AAC.48.10.3690-3696.2004
227. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41: 2492–2496. doi:10.1128/aac.41.11.2492
228. Steinberg G, Harmer NJ, Schuster M, Kilaru S. Woronin body-based sealing of septal pores. *Fungal Genet Biol.* 2017;109: 53–55. doi:10.1016/j.fgb.2017.10.006
229. Leonhardt Y, Beck J, Ebel F. Functional characterization of the Woronin body protein WscA of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol.* 2016;306: 165–173. doi:10.1016/j.ijmm.2016.03.008
230. Tegelaar M, Bleichrodt RJ, Nitsche B, Ram AFJ, Wösten HAB. Subpopulations of hyphae secrete proteins or resist heat stress in *Aspergillus oryzae* colonies. *Environ Microbiol.* 2020;22: 447–455. doi:10.1111/1462-2920.14863
231. Barug D, de Groot C. Microscopic studies of *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata* after in vitro treatment with bifonazole. Freeze fracture electron microscopy. *Arzneimittelforschung.* 1983;33: 538–45. Abgerufen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6347210>
232. Kerkenaar A, Barug D. Fluorescence microscope studies of *Ustilago maydis* and *Penicillium italicum* after treatment with imazalil or fenpropimorph. *Pestic Sci.* 1984;15: 199–205. doi:10.1002/ps.2780150211
233. Pfaller M, Riley J. Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992;11: 152–156. doi:10.1007/BF01967067
234. Gautam P, Mushahary D, Hassan W, Kumar Upadhyay S, Madan T, Sirdeshmukh R, u. a. In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. *Med Mycol.* 2016;54: 524–536. doi:10.1093/mmy/myv122
235. Hoehamer CF, Cummings ED, Hilliard GM, Rogers PD. Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54: 1655–1664. doi:10.1128/AAC.00756-09
236. Kock C, Dufrêne YF, Heinisch JJ. Up against the wall: Is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and Environmental Microbiology.* American Society for Microbiology; 2015. S. 806–811. doi:10.1128/AEM.03273-14
237. Baltussen TJH, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020;84. doi:10.1128/mmr.00049-19
238. Schuster M, Martin-Urdiroz M, Higuchi Y, Hacker C, Kilaru S, Gurr SJ, u. a. Co-Delivery of Cell-Wall-Forming enzymes in the same vesicle for coordinated fungal cell wall formation. *Nat Microbiol.* 2016;1: 1–11. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.149
239. Schuster M, Treitschke S, Kilaru S, Molloy J, Harmer NJ, Steinberg G. Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.* 2012;31: 214–227. doi:10.1038/emboj.2011.361
240. Pacheco-Arjona JR, Ramirez-Prado JH. Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in *Aspergillus* genomes. *PLoS One.* 2014;9: e104920. doi:10.1371/journal.pone.0104920
241. Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, u. a. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell.* 2008;19: 1439–1449. doi:10.1091/mbc.E07-05-0464
242. Commer B, Shaw BD. Current views on endocytosis in filamentous fungi. *Mycology.* 2021;12: 1–9. doi:10.1080/21501203.2020.1741471
243. Chelius C, Huso W, Reese S, Doan A, Lincoln S, Lawson K, u. a. Dynamic Transcriptomic and Phosphoproteomic Analysis During Cell Wall Stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Proteomics.* 2020;19: 1310–1329. doi:10.1074/MCP.RA119.001769
244. Graham LA, Brandt U, Sargent JS, Trumpower BL. Mutational analysis of assembly and function of the iron-sulfur protein of the cytochrome bc1 complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr.* 1993;25: 245–257. doi:10.1007/BF00762586
245. Grahl N, Dinamarco TM, Willger SD, Goldman GH, Cramer RA. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses, and fungal pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2012;84: 383. doi:10.1111/J.1365-2958.2012.08034.X
246. Tudella VG, Curti C, Soriani FM, Santos AC, Uyemura SA. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36: 162–172. doi:10.1016/S1357-2725(03)00194-8
247. Sturm L, Geißel B, Martin R, Wagener J. Differentially Regulated Transcription Factors and ABC Transporters in a Mitochondrial Dynamics Mutant Can Alter Azole Susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2020;11. doi:10.3389/FMICB.2020.01017/FULL
248. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In Vitro Evaluation of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 970–978. doi:10.1128/AAC.48.3.970-978.2004
249. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8: 180–199. doi:10.1128/CMR.8.2.180
250. Shalit I, Shadkchan Y, Samra Z, Osherov N. In vitro synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47: 1416–1418. doi:10.1128/AAC.47.4.1416-1418.2003
251. Manavathu EK, Alangaden GJ, Chandrasekar PH. Differential activity of triazoles in two-drug combinations with the echinocandin caspofungin against *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51: 1423–1425. doi:10.1093/jac/dkg242
252. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. In vitro interaction of caspofungin

- acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3039–3041. doi:10.1128/AAC.46.9.3039-3041.2002
253. Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, u. a. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49: 3572–3574. doi:10.1128/AAC.49.8.3572-3574.2005
254. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Buitrago MJ, u. a. Combined activity in vitro of caspofungin, amphotericin B, and azole agents against itraconazole-resistant clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49: 1232–1235. doi:10.1128/AAC.49.3.1232-1235.2005
255. Raffetin A, Courbin V, Jullien V, Dannaoui E. In vitro combination of isavuconazole with echinocandins against azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62. doi:10.1128/AAC.01382-17
256. Krishnan-Natesan S, Wu W, Chandrasekar PH. In vitro efficacy of the combination of voriconazole and anidulafungin against voriconazole-resistant cyp51A mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73: 135–137. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.003
257. S S, RJ B, WJ M, AJ R, PE V, JW M. Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68. doi:10.1093/JAC/DKS402
258. Chatzimoschou A, Katragkou A, Simitopoulou M, Antachopoulos C, Georgiadou E, Walsh TJ, u. a. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 1968–1974. doi:10.1128/AAC.00959-10
259. Siopi M, Siafakas N, Vourli S, Mouton JW, Zerva L, Meletiadis J. Dose optimization of voriconazole/anidulafungin combination against *Aspergillus fumigatus* using an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model and response surface analysis: Clinical implications for azole-resistant aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71: 3135–3147. doi:10.1093/jac/dkw276
260. Elefanti A, Mouton JW, Verweij PE, Tsakris A, Zerva L, Meletiadis J. Amphotericin B- and voriconazole-echinocandin combinations against *Aspergillus* spp.: Effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57: 4656–4663. doi:10.1128/AAC.00597-13
261. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, u. a. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2015;162: 81–89. doi:10.7326/M13-2508
262. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, Arendrup MC, Brüggemann RJ, Chowdhary A, u. a. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat.* 2015;21–22: 30–40. doi:10.1016/j.drug.2015.08.001
263. Aruanno M, Glampedakis E, Lamoth F. Echinocandins for the treatment of invasive aspergillosis: From laboratory to bedside. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 2019. doi:10.1128/AAC.00399-19
264. Lang A, John Peter AT, Kornmann B. ER-mitochondria contact sites in yeast: Beyond the myths of ERMES. *Current Opinion in Cell Biology.* Elsevier Ltd; 2015. S. 7–12. doi:10.1016/j.ceb.2015.03.002

Anhang

Einzelergebnisse zum Versuch die Inhibierung der Glukansynthese verzögert den fungiziden Effekt der Azole auf *A. fumigatus* Kapitel 4.2.10

Experiment Nr.	überlebende Kompartimente [%]			
	nach 5 h Co-Inkubation		nach 6 h Co-Inkubation	
	Voriconazol	Voriconazol + Caspofungin	Voriconazol	Voriconazol + Caspofungin
1	16,67	23,33	11,54	35,48
	13,51	33,33	12,12	21,43
	21,62	55,56	0,00	31,03
	10,00	31,58	33,33	16,67
	11,11	19,05	13,79	10,00
	22,73	18,52	9,76	27,27
2	36,00	71,43	11,11	45,00
	23,81	75,00	0,00	28,57
	20,00	43,75	12,50	41,67
	27,59	60,00	11,76	28,57
	28,57	51,85	9,52	42,31
	10,53	71,43	3,45	53,57
3	51,85	57,89	25,00	20,00
	50,00	52,94	10,00	20,00
	58,33	41,18	36,67	57,89
	51,85	66,67	21,74	47,06
	34,48	63,16	23,08	40,00
	57,89	68,00	31,58	33,33
4	28,00	89,29	40,00	47,37
	45,16	88,00	28,00	76,92
	36,36	52,63	15,79	77,78
	36,00	87,50	13,04	56,52
	23,81	70,97	0,00	65,52
	43,48	63,33	7,41	50,00
5	20,83	79,17	15,63	40,00
	33,33	65,52	12,00	48,00
	33,33	57,14	8,33	32,00
	25,00	42,42	3,33	23,33
	39,39	60,00	13,33	42,31
	46,43	62,50	9,38	30,77
6	34,78	55,56	21,21	29,63
	54,17	51,85	22,22	31,03
	25,00	65,22	-	52,00
	53,33	52,17	13,79	54,84
	25,00	52,17	23,33	46,15
	58,33	82,86	20,69	45,83
7	53,85	88,24	6,67	63,64
	55,56	65,00	30,00	55,56
	42,86	68,42	5,26	57,69
	88,24	73,33	28,00	61,11
	60,87	68,42	40,00	54,55
	36,36	70,00	38,10	50,00
Mittelwert	36,81	59,91	16,89	42,68
StabW	16,89	17,76	11,27	15,85

Dankagung

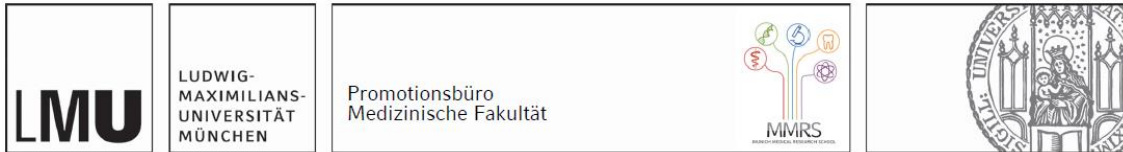
„Je schöner und voller die Erinnerung, desto schwerer ist die Trennung. Aber die Dankbarkeit verwandelt die Erinnerung in eine stille Freude.“ (Dietrich Bonhoeffer)

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Ebel und meinem Betreuer Prof. Dr. Johannes Wagener. Vor allem Prof. Dr. Johannes Wagener war stets zur Hilfe und Diskussion zur Stelle, sowohl in der Zeit der experimentellen Arbeit, sowie in der langen Zeit der Fertigstellung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich mich vor allem bei den tollen Arbeitskollegen bedanken, welche die Zeit im Labor zu einer besonderen Erinnerung machen, an die ich gerne zurückdenke.

Besonders möchte ich mich darüber hinaus bei meinen Freunden Stefan, Marko und Sarah bedanken, die mich stets motiviert haben diese Arbeit fertigzustellen.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Geißel, Bernadette

Name, Vorname

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

Antimykotische Zielstrukturen in *Aspergillus fumigatus*: Wirkungsweise der Azole und Charakterisierung desERMES

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.

Renningen, 30.07.2024

Bernadette Geißel

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationen

Aus dieser Dissertationsschrift sind zwei Publikation in einem internationalem Fachjournal hervorgegangen. Der Autor dieser Dissertationsschrift ist dabei der Erstautor dieser Arbeiten.

Der Titel der ersten Publikation lautet „The ER-mitochondria encounter structure contributes to hyphal growth, mitochondrial morphology and virulence of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*“ und ist am 27.11.2016 im International Journal of Medical Microbiology [170] erschienen. Darin veröffentlicht wurde der erste Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.1).

Der Titel der zweiten Publikation lautet “Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*“ und ist am 06.08.2018 im Journal Nature Communications [169] erschienen. Darin veröffentlicht wurde der zweite Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.2).