

Untersuchungen zur Verwertung proteinhaltiger Substrate als mögliche
Virulenzdeterminante des humanpathogenen Schimmelpilzes
Aspergillus fumigatus

Studies on utilisation of proteinaceous substrates as potential virulence
determinant of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Section: Infection and Immunity

vorgelegt von

Anna Bergmann

aus

Hamburg

Würzburg 2011

Eingereicht am: 29.09.2011

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller

1. Betreuer: PD Dr. Sven Krappmann

2. Betreuer: PD Dr. Knut Ohlsen

3. Betreuer: PD Dr. Jürgen Löffler

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:.....

Für Christoph

DANKSAGUNG

Ich danke ganz herzlich PD Dr. Sven Krappmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen.

PD Dr. Knut Ohlsen und PD Dr. Jürgen Löffler danke ich herzlich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens und für die wissenschaftlichen Gespräche der Jahresberichte.

Ich bedanke mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der „AG Krappmann“ für die Hilfsbereitschaft und die vielen aufmunternden Worte, wenn es mal wieder etwas hektisch wurde. Besonders danken möchte ich Anette, Patrick und Jorge, ohne die der Laboralltag wesentlich trister gewesen wäre. Natürlich sei auch der „Labormuddi“ gedankt, die unter anderem besonders gerne Azokoll und noch mehr Kölbchen für mich bestellt hat.

Ebenfalls möchte ich der Nachbargruppe „Candida“ danken, vor allem für den einen oder anderen Plausch auf dem Flur und natürlich für die gelegentlichen gemeinsamen Stunden zu Feierabend.

Außerdem danke ich den vielen Mitarbeitern des ZINF und IMIB für die technischen Ratschläge und die angenehme Atmosphäre.

Ebenso möchte ich mich bei Oliver Valerius für die Durchführung des 5' TRU bedanken.

Besonders danke ich Christoph, für seine ermutigenden Worte in schwierigen Phasen, die vielen fachlichen Gespräche und vor allem für die schöne gemeinsame Zeit in Unterfranken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die trotz der „böhmischen Dörfer“ immer an meiner Arbeit interessiert waren und mit denen ich während der seltenen, aber schönen Besuche das ein oder andere entspannende und abwechslungsreiche Wochenende verlebt habe.

Zu guter Letzt danke ich natürlich auch dem Rest meiner Familie für das stete Interesse am Fortgang meiner Doktorarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	2
2. EINLEITUNG	3
2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> -ein ubiquitärer Schimmelpilz	4
2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> als Krankheitserreger	4
2.3 Pathogenitätsfaktoren und Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	6
2.4 Der Stoffwechsel von <i>Aspergillus fumigatus</i> innerhalb des Wirts	8
2.5 Extrazelluläre Proteolyse durch <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
2.6 Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Pilzen	12
2.7 Signalwege der Stressantwort über eIF2 α -Kinasen	15
2.8 Ziel dieser Arbeit	17
3. MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Labormaterialien	18
3.1.2 Gerätenachweis	19
3.1.3 Oligonukleotide, Plasmide und Stämme	20
3.2 Methoden	24
3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen	24
3.2.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.1.2 Kultivierung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
3.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	26
3.2.2.1 MACHERY & NAGEL Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparationen	26
3.2.2.2 Isolierung von DNA aus <i>A. fumigatus</i>	26
3.2.2.3 Isolierung von RNA aus <i>A. fumigatus</i>	27
3.2.2.4 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung	27
3.2.2.5 Reverse Transkription von RNA	27
3.2.2.6 Realtime-PCR	27
3.2.3 Klonierungstechniken	28
3.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion	28
3.2.3.2 Restriktion von DNA	28
3.2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese	29
3.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose	29
3.2.3.5 Dephosphorylierung von DNA	29
3.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.2.3.7 GENEART [®] Seamless Cloning and Assembling Kit	30
3.2.3.8 Sequenzierung von DNA	30
3.2.4 Transformationsmethoden	30
3.2.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.2.4.2 Transformation von <i>A. fumigatus</i>	30
3.2.5 Southern-Hybridisierungstechnik	31
3.2.5.1 Herstellung der Sonden-DNA	31
3.2.5.2 Southern-Hybridisierung	31
3.2.6 Western-Hybridisierungstechnik	32
3.2.6.1 Herstellung von Protein-Rohextrakten	32
3.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	32

3.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.6.4 Western-Hybridisierungsanalyse	33
3.2.7 Mikroskopieren von <i>A. fumigatus</i>	34
3.2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie	34
3.2.7.2 Live-Imaging Mikroskopie	34
3.2.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten	35
3.2.8.1 Bestimmung der extrazellulären proteolytischen Aktivität	35
3.2.9 Tiermodelle der Aspergillose	35
3.2.9.1 Neutropenisches Mausmodell der pulmonalen Aspergillose	35
3.2.9.2 Virulenzmodell in der Wachsmottenlarve <i>Galleria mellonella</i>	36
3.2.10 Herstellung rekombinanter Plasmide	36
3.2.10.1 Generierung einer <i>prtT</i> -Deletionskassette	36
3.2.10.2 Generierung einer <i>prtT</i> -Komplementationskassette	36
3.2.10.3 Insertion der <i>prtT</i> -5'UTR in den 5'TRU-Testvektor	37
3.2.10.4 Generierung einer ^p <i>prtT-gfp</i> -Reporterkassette	37
3.2.10.5 Generierung der Δ <i>aroC</i> - und Δ <i>trpA</i> -Deletionskassetten	37
3.2.10.6 Generierung der Komplementationskassetten von Δ <i>aroC</i> und Δ <i>trpA</i>	38
3.2.10.7 Generierung einer <i>aroM</i> -Deletionskassette	39
3.2.10.8 Generierung einer <i>aroB</i> -Deletionskassette	39
3.2.10.9 Generierung einer Tet-on- <i>aroB</i> -Kassette	39
4. ERGEBNISSE	41
4.1 PrtT, ein Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität von <i>A. fumigatus</i> , trägt nicht zu dessen Virulenz bei	41
4.1.1 Das <i>Aspergillus fumigatus</i> -Genom kodiert für ein Orthologes von PrtT	41
4.1.2 Die 5'UTR von <i>prtT</i> scheint translationell regulierende Funktion zu haben	44
4.1.3 eIF2 α -Kinasen von <i>A. fumigatus</i> beeinflussen die Expression von PrtT zu einem frühen Zeitpunkt	50
4.1.4 eIF2 α -Kinasen von <i>A. fumigatus</i> beeinflussen die Transkriptmenge von PrtT	51
4.1.5 PrtT ist notwendig für den Abbau von Proteinen durch <i>A. fumigatus</i>	54
4.1.6 PrtT ist notwendig für die Sekretion von Proteasen durch <i>A. fumigatus</i>	55
4.1.7 PrtT reguliert die Transkription einiger sekretierter Proteasen	58
4.1.8 PrtT ist für die Virulenz von <i>A. fumigatus</i> in leukopenischen Mäusen überflüssig	60
4.2 Evaluation der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in <i>A. fumigatus</i> als möglicher antimykotischer Ansatzpunkt	62
4.2.1 Der Shikimat-Syntheseweg ist für <i>A. fumigatus</i> essentiell	62
4.2.2 Deletion von <i>aroC</i> und <i>trpA</i> resultiert in Auxotrophie hinsichtlich der entsprechenden aromatischen Aminosäuren	73
4.2.3 Der <i>aroC</i> -Deletionsstamm zeigt einen Wachstumsdefekt in Flüssigmedium	80
4.2.4 Ein <i>A. fumigatus</i> -Stamm mit einer Δ <i>trpA</i> ; Δ <i>aroC</i> -Doppeldeletion ist nicht lebensfähig	83
4.2.5 Die Virulenz der <i>aroC</i> - und <i>trpA</i> -Deletionsstämme ist im Tiermodell attenuiert	85
5. DISKUSSION	88
5.1 PrtT hat keinen Einfluss auf die Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	88
5.2 PrtT wird durch eIF2 α -Kinasen beeinflusst	92
5.3 Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren ist ein möglicher Angriffspunkt gegen <i>A. fumigatus</i>	95
6. REFERENZEN	102
7. ANHANG	114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ABPA	Allergische bronchopulmonare Aspergillose
amp	Ampicillin
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
β -rec	β Serin-Rekombinase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>ble</i>	Phleomycin-Resistenzgen aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
BSA	Rinderserum (<i>bovines serum albumin</i>)
B-Zelle	B-Helferzelle
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CADRE	Central <i>Aspergillus</i> Data REpository
cDNA	complementary DNA
CDG	Chronic Granulomatous Disease (chronische Granulotamose)
CDRP	Carboxyphenylamino-1-Desoxyribulose-5-Phosphat
CPC	Cross Pathway Control
C_t	threshold cycle
Δ	Deletion
DAHP	3-Desoxy-D-Arabinohexulose-7-Phosphat
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DHQ	5-Dehydroquinat
DHS	Destilliertes Wasser
dH ₂ O	Dehydroshikimat
DIC	differential interference contrast
DNA	Desoxyribonuclein acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E4P	Erythrose-4-Phosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2	eukaryotischer Initiationsfaktor 2
EPSP	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat
<i>et al.</i>	Und andere
FMN	Flavinmononukleotid
FMNH ₂	reduziertes Flavinmononukleotid
FUDR	5-Fluordesoxyuridin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

IA	Invasive Aspergillose
InGP	Indolglycerin-Phosphat
IRES	internal ribosomal entry site (interne ribosomale Eintrittsstelle)
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
<i>loxP</i>	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
M	Molar
MM	Minimal Medium
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NADP	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
N-Quelle	Stickstoffquelle
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
ORF	open reading frame
<i>p</i>	Promotor
<i>p</i>	<i>para</i>
PABA	<i>para</i> -aminobenzoic acid (Para-Aminobenzoesäure)
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PRA	Phosphoribosylanthranilat
PRPP	5-Phosphoribosylpyrophosphate
<i>ptrA</i>	Pyriithiamin-Resistenzgen aus <i>A. oryzae</i>
R	Resistenz
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Rotierung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
<i>six</i> -Region	Erkennungssequenz der β -Rekombinase
t	Terminator
TetO	Tetracyclin-Operator
TetR	Tetracyclin-Repressor-Protein
TBS	Tris-gepufferte Saline

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween20
<i>tk</i>	Thymidinkinase aus Herpes simplex Virus I
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
tRNA ^{Met}	mit Methionin beladene tRNA
TRU	translationally regulative UTR
TSS	Transkriptionsstartpunkt
T-Zelle	T-Helferzelle
U	Unit (Enzymeinheit)
UDP	Uridindiphosphat
uORF	upstream open reading frame
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid
<i>xylP</i>	<i>xylP</i> -Gen aus <i>Penicillium chrysogenum</i>

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die asexuellen Sporen von *Aspergillus fumigatus* sind ubiquitär verbreitete Luftkeime. Als Saprophyt ist dieser opportunistisch humanpathogene Pilz darauf spezialisiert, polymere Substanzen aus dem umgebenden Milieu zu zersetzen, um daraus die von ihm benötigten Nährstoffe zu generieren und aufzunehmen. Die Fähigkeit, verschiedene Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zu verwerten, trägt dabei zu seiner Virulenz bei und hierbei scheint die extrazelluläre Proteolyse eine wichtige Rolle zu spielen. Sekretierte Proteasen, die das umgebende Gewebe während einer Infektion mit *A. fumigatus* erschließen, könnten somit zu dessen Pathogenität beitragen. Dementsprechend sollte im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung einer Regulation der extrazellulären proteolytischen Aktivität von *A. fumigatus* für dessen Virulenz untersucht werden. Dies geschah durch Untersuchungen eines konservierten Transkriptionsfaktors, PrtT. Dabei stellte sich heraus, dass PrtT die Expression der drei Hauptproteasen von *A. fumigatus*, Alp, Mep und Pep stark beeinflusst, in einem murinen Tiermodell der pulmonaren Aspergillose scheint dieser Regulator jedoch keine Rolle für die Pathogenität von *A. fumigatus* zu spielen.

Um einen weiteren Aspekt des pilzlichen Aminosäurestoffwechsels zu beleuchten, wurde die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als mögliche Virulenzdetermine untersucht. Für den Menschen sind diese Aminosäuren essentiell, weshalb dieser Syntheseweg ein mögliches Ziel für antimykotische Substanzen darstellen könnte. Es konnten mehrere für *A. fumigatus* essentielle Komponenten des Shikimatweges identifiziert werden, des Weiteren wurden Deletionsmutanten in den Genen *aroC* und *trpA*, die für die Chorismatmutase bzw. Anthranilatsynthase der Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin bzw. Tryptophan kodieren, erzeugt und phänotypisch charakterisiert. Deren Untersuchung in einem alternativen Tiermodell der Aspergillose zeigte eine deutlich attenuierte Virulenz. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren für das Wachstum von *A. fumigatus* ist, und dass ein Eingriff in diesen Syntheseweg eine lohnende Strategie zur Entwicklung neuer Antimykotika sein könnte.

Die hier präsentierten Ergebnisse unterstreichen die für den Schimmelpilz *A. fumigatus* typische Redundanz bezüglich extrazellulärer proteolytischer Enzyme und dass diese nur bedingt hinsichtlich ihres Virulenzbeitrags untersucht werden können. Im Gegensatz hierzu lassen sich bestimmte Stoffwechselwege, die oftmals durch einzigartige Genprodukte katalysiert werden, unter Umständen besser als unspezifische aber vielversprechende Virulenzdeterminanten identifizieren.

SUMMARY

The air-borne spores of *Aspergillus fumigatus* are ubiquitously distributed. As a saprophyte, this fungus is well adapted to feed from the environment by degradation of polymeric substances and uptake of breakdown products. The nutritional versatility has to be regarded as virulence determinant in the development of pulmonary aspergillosis. Secreted proteolytic activities that degrade the surrounding lung tissue during infection may contribute to pathogenicity. Until now, knowledge on the regulation of the expression and secretion of proteases by *A. fumigatus* is scarce. Therefore, the role of extracellular proteolytic activity for pathogenicity of *A. fumigatus* was examined by characterisation of a global regulatory factor, PrtT, that acts on expression of secreted proteases. It could be shown that PrtT regulates the transcription of the major secreted proteases Alp, Mep and Pep. When tested in a leukopenic mouse model, the deletant strain is not attenuated in virulence, suggesting that the PrtT transcription factor - and accordingly extracellular proteolysis - supports virulence of this opportunistic pathogen only to a limited extent.

To gain insight into the fungal biosynthesis pathway of amino acids, the aromatic amino acid biosynthesis was investigated concerning the aspect of a virulence determinant. In contrast to mammals, fungi are able for *de novo* synthesis of the aromatic amino acids. Therefore it might be a usable target for antifungal therapy since such pathway does not exist in humans. Some genes of the shikimate pathway could be shown to be essential for the survival of *A. fumigatus*. Virulence tests of strains with deletion of the genes *aroC* or *trpA* which encodes for the chorismate mutase and anthranilate synthase respectively, showed attenuated virulence of both strains. These results clarify the stringent necessity of the aromatic amino acid biosynthesis for the survival of *A. fumigatus*, concluding this biosynthesis pathway as a usable target for antimycotic substances.

The results of this work emphasise the redundancy of extracellular proteolytic activities. In contrast specific pathways which are mostly catalysed by unique gene products may be identified as virulence determinant rather than unspecific factors.

2. EINLEITUNG

2.1 *Aspergillus fumigatus* – ein ubiquitärer Schimmelpilz

Der haploide, filamentöse Pilz *Aspergillus fumigatus* gehört zu den Ascomyceten, die sich aus über 180 Arten zusammensetzen und meist asexuelle Konidiosporen mit einem Durchmesser von 2-3 μm bilden, welche durch Luft oder Wasser verbreitet werden (Samson, 1999; Hohl und Feldmesser, 2007). Treffen die Konidiosporen auf geeignetes Substrat, können sie auskeimen und ein vegetatives, weit verzweigtes Myzel bilden, das aus vielkernigen, unregelmäßig septierten Hyphen besteht, die ein apikales Wachstum aufweisen. Unter günstigen Bedingungen entwickelt sich aus einer vegetativen Hyphenzelle zunächst eine Lufthyphe, an deren Spitze ein Vesikel gebildet wird, von dem sich flaschenförmige Zellen, sog. Phialiden, differenzieren. Durch wiederholte Sprossung und Mitose produzieren die Phialiden apikal lange Ketten von Konidiosporen, die in reifem Zustand abgeschnürt und durch Wind verbreitet werden. Bei den meisten anderen Aspergillen befindet sich zwischen Vesikel und Phialiden eine weitere Zellform, die Metulae, die jedoch bei *A. fumigatus* fehlen (Abb. 1) (Latgé, 1999).

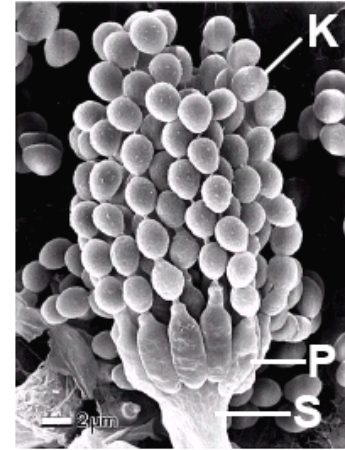


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sporenträgers von *Aspergillus fumigatus*. Konidien (K), Phialiden (P) und die Stammzelle (S) sind gekennzeichnet (Samson, 1999).

A. fumigatus gehört zu den echten Schlauchpilzen und wurde bis 2009 innerhalb der Euscomyceten zur künstlichen Gruppe der Deuteromyceten gezählt, da bis zu diesem Zeitpunkt trotz mehrerer Hinweise kein sexuelles Stadium nachgewiesen werden konnte (Pöggeler, 2002; Dyer *et al.*, 2003; Varga, 2003; Nierman *et al.*, 2005; Paoletti *et al.*, 2005; Pringle *et al.*, 2005). Inzwischen wurde jedoch unter speziellen Bedingungen eine sexuelle Form beobachtet und nach der dualen Nomenklatur (Pitt und Samson, 2007) als *Neosartorya fumigata* bezeichnet (O’Gorman *et al.*, 2009; Szewczyk und Krappmann, 2010).

A. fumigatus ist genetisch leicht zu manipulieren, da die Konidien nur einen einzigen haploiden Zellkern enthalten. Abgesehen vom erst kürzlich nachgewiesenen sexuellen Zyklus, sind auch parasexuelle Prozesse möglich, bei denen im stabilen Heterokaryon genetische Rekombinationsvorgänge stattfinden können (Berg und Garber, 1962).

Als ubiquitärer Pilz ist *A. fumigatus* überall verbreitet und ist daher sowohl auf verrottendem organischem Material, zum Beispiel im Kompost, als auch in der Luft zu

finden. Er dominiert meist gegenüber anderen Pilzen, sodass seine Konidiosporen zu den häufigsten Luftkeimen zählen (Chazalet *et al.*, 1998; Tekaia und Latgé, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007). Seine saprophytische Lebensweise erlaubt es ihm, aus pflanzlichem und abgestorbenem organischen Material Nährstoffe aufzunehmen, wobei diverse Enzyme die pflanzlichen Zellwandpolymere, wie zum Beispiel Zellulose, Hemizellulose und Pektin, abbauen (de Vries und Visser, 2001). Daher kommt *A. fumigatus* eine wichtige Rolle beim Abbau von Pflanzenteilen und Bestandteilen des Komposts zu. Im *A. fumigatus*-Genom wurden entsprechend viele Enzymfamilien gefunden, die pflanzliche Zellwandpolysaccharide abbauen können, wie sie auch in saprotrophen oder phytopathogenen Spezies (z. B. *M. grisea* oder *F. graminearum*) vorkommen, was zeigt, dass abgestorbenes pflanzliches Material die primäre ökologische Nische von *A. fumigatus* ist (Tekaia und Latgé, 2005). Es wurden keine universellen Unterschiede zwischen den Enzymen von phytopathogenen und saprotrophen Aspergillen gefunden, allerdings fehlen diese Enzyme bei Nicht-Phytopathogenen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, was auf eine direkte Verbindung zwischen Genetik und ökologischer Nische hinweist. Jedoch scheint *A. fumigatus* bei der Zersetzung von Holz keine wichtige Rolle zu spielen, da ihm unter anderem Gene fehlen, die homolog zur Lignin-Peroxidase sind und somit die Voraussetzungen für den Abbau von Hartholz nicht gegeben sind (Wesenberg *et al.*, 2003; Tekaia und Latgé, 2005).

2.2 *A. fumigatus* als Krankheitserreger

Jeder Mensch atmet täglich mehrere hundert Konidiosporen von *A. fumigatus* ein, die so in die Lunge gelangen, wo sie durch ein intaktes Immunsystem eliminiert werden. Es kommt erst dann zu einer Erkrankung des Wirtsorganismus, wenn dessen Immunantwort entweder zu stark oder aber zu schwach ist. Dabei wird zwischen verschiedenen Formen einer sog. Aspergillose unterschieden: es treten allergische Reaktionen auf, wie zum Beispiel die allergische bronchopulmonare Aspergillose (ABPA) und aspergilles Asthma, ausgelöst durch eine Überreaktion des Immunsystems (Patterson *et al.*, 1986; Latgé, 1999). Bei einer zu schwachen bzw. gestörten Immunantwort dagegen kann bei Patienten ohne Immunsuppression ein sogenannter „Pilzball“ bzw. ein Aspergillom auftreten, bei immunsupprimierten Patienten hingegen kann es zu einer invasiven Aspergillose (IA) kommen, die häufig als Sekundärinfektion nach Knochenmarktransplantationen, bei Krebspatienten oder Patienten mit septischer Granulomatose („chronic granulomatous disease“, CGD) auftritt (Latgé, 1999; Dagenais und Keller, 2009).

Die allergische bronchopulmonare Aspergillose kommt besonders häufig bei Patienten vor, die bereits an Asthma oder zystischer Fibrose leiden, wobei die verminderte Klärung der Atemwege wahrscheinlich eine nicht unbedeutende Rolle spielt. Die ABPA zeigt klinisch die gleiche zelluläre Immunantwort durch T-Zell-Produkte wie bei Asthma, sie kann jedoch Vernarbungen der Lunge hervorrufen. Da bei Patienten mit ABPA oft unterschiedliche Symptome auftreten und diese denen von klassischem Asthma sehr ähnlich sind, sind eindeutige Befunde, welche auf eine ABPA hinweisen, nur selten möglich (Lehrer und Jan, 1970; Patterson *et al.*, 1982; Greenberger *et al.*, 1989; Murali *et al.*, 1998; Latgé, 1999; Patterson und Streck, 2010).

Im Gegensatz zur ABPA ist das Aspergillom eine Art Myzelball, umschlossen von einer proteinhaltigen Masse und mit sporulierenden Strukturen an seiner Oberfläche. Es bildet sich in kleinen Lungenhohlräumen, die z. B. durch eine vorangegangene Tuberkuloseerkrankung entstanden sein können. Ein typisches Symptom ist das sogenannte Lungenbluten, das sich im Aushusten von Blut äußert, da die Blutgefäße an der Stelle, wo das Aspergillom sitzt, beschädigt sind. Mit Hilfe von Computertomographie kann ein Aspergillom, im Gegensatz zur ABPA, jedoch gut diagnostiziert werden (Beaumont, 1988; Dixon und Walsh, 1992; Broderick *et al.*, 1996; Latgé, 1999).

Die invasive Aspergillose tritt besonders bei Leukämiepatienten oder bei Patienten auf, bei denen zuvor eine Organtransplantation durchgeführt wurde, was den direkten Zusammenhang mit der Immunsuppression des Wirts verdeutlicht. Bei den Risikogruppen führt die invasive Aspergillose zu einer hohen Sterberate von über 50%, bei Leukämiepatienten von sogar 80% bis 90% (Denning *et al.*, 1991; Weinberger *et al.*, 1992; Kemper *et al.*, 1993; Ribaud *et al.*, 1994; Vogeser *et al.*, 1997; Kaiser *et al.*, 1998; Mylonakis *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 1998; Latgé, 1999; Lin *et al.*, 2001; Dagenais und Keller, 2009).

A. fumigatus besitzt demnach viele Eigenschaften die es ihm ermöglichen, pathogen zu sein, andererseits benötigt er dafür auch einen Wirt, der dies zulässt. Die Virulenz wird erst möglich durch die anfällige Eigenschaft immunsupprimierter Wirte oder deren genetischer Defizite und nicht ausschließlich durch die ausgezeichnete Anpassung von *A. fumigatus* als Saprophyt - denn treffen die über die Luft weit verbreiteten Sporen auf einen immunkompetenten Organismus, vernichtet dessen intaktes Immunsystem den Pilz (Latgé, 1999; Tekaia und Latgé, 2005; Dagenais und Keller, 2009; McCormick *et al.*, 2010)

Bis heute sind die therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung von Aspergillosen begrenzt, es mangelt besonders an wirksamen und gut verträglichen Substanzen. Das Ziel der Behandlung ist es, das Fortschreiten der Entzündungsreaktion, ausgelöst durch das

Immunsystem, zu stoppen und somit auch zu verhindern, dass die Lunge weiter zerstört wird; gleichzeitig ist es wünschenswert, Nebenwirkungen auf ein Minimum zu senken (Patterson und Streck, 2010). Unterschieden wird zwischen systemischen Kortikosteroiden, die die Grundlage der ABPA-Therapie bilden aber starke Nebenwirkungen auslösen, und antimykotischen Mitteln wie Amphotericin B und verschiedene Azole.

Amphotericin B, Itraconazol und Voriconazol gelten als Standard-Pharmazeutika gegen IA, wobei häufig eine gleichzeitige Gabe von anderen Medikamenten bei immunsupprimierten Patienten die Wirkung insbesondere von Azolen mindert. Auch sind Toxizität der Substanzen und Schwankungen bei oraler Verabreichung problematisch. Darüber hinaus sprechen Patienten mit Aspergillom weniger gut auf die Therapie mit Itraconazol an, und es wurden bereits Azol-resistente *A. fumigatus*-Stämme beschrieben. Daher ist man weiterhin auf der Suche nach geeigneten Stoffen, die eine geringe Nebenwirkung für den Patienten und gleichzeitig eine hohe Effizienz bei der Behandlung von Aspergillosen haben (De Beule, 1996; Denning *et al.*, 1997; Latgé, 1999; Marr *et al.*, 2004; Patterson und Streck, 2010).

2.3 Pathogenitätsfaktoren und Virulenz von *A. fumigatus*

Als Virulenzfaktoren werden im Allgemeinen entscheidende Eigenschaften eines Pathogens bezeichnet, die den Wirt schädigen (Casadevall, 2005), jedoch sind solche spezifischen Virulenzfaktoren in *A. fumigatus* bisher nicht bekannt (Casadevall, 2006). Trotzdem hat sich *A. fumigatus* einige typische Mechanismen der Stressresistenz angeeignet, die sein Überleben als charakteristischer Umweltkeim auch unter ungewöhnlichen Bedingungen ermöglicht. Hierzu zählt unter anderem der Schutz vor UV-Strahlung, der durch die vom Pilz gebildeten Melanin-Pigmente auch zur Resistenz gegenüber Zellyse und reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) beiträgt (Brakhage und Liebmann, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007). Melanin verleiht den Konidien ihre grau-grünliche Färbung (Youngchim *et al.*, 2004). Stämme, denen die PksP-Polyketidsynthase fehlt, die eine entscheidende Rolle in der Pigmentbiosynthese spielt, zeigen eine geschwächte Virulenz, da Melanin die Immunantwort beeinflusst, sodass die Phagozytose der Sporen nur reduziert erfolgt (Tsai *et al.*, 1998; Hohl und Feldmesser, 2007). Auch die Bildung von Glutathion und Oxidoreduktase-Aktivität liefert eine gewisse Resistenz gegenüber oxidativen Stressbedingungen, ebenso wie die zahlreichen Katalasen und Superoxid-Dismutasen, die Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale abbauen (Calera *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 2003; Tekaia und Latgé, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007).

Die primäre ökologische Nische von *A. fumigatus* ist abgestorbenes pflanzliches Material, trotzdem kann er auch pathogen sein und sich, wie bereits erwähnt, im respiratorischen Trakt von Säugern ausbreiten (Tekaiia und Latgé, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007). Eine hierfür wesentliche Voraussetzung ist unter anderem seine Thermotoleranz, die es *A. fumigatus* ermöglicht, bis zu einer Temperatur von 55°C zu wachsen. Sein Überleben ist sogar bis zu 75°C gewährleistet, die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch bei 37°C (Tekaiia und Latgé, 2005). Diese Eigenschaft macht es ihm möglich, in Warmblütern zu wachsen, aber auch andere warme Substrate können als Nischen erschlossen werden, sodass er zu den typischen Vertretern der Mikroflora im Kompost gehört. Die molekulare Basis der Thermotoleranz ist noch nicht ganz geklärt, zudem scheinen die hierfür verantwortlichen Gene in *A. fumigatus* anders reguliert zu werden, als die entsprechenden Gene anderer Pilze (Haines, 1995; Tekaiia und Latgé, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007).

Auch die Zusammensetzung der Zellwand von *A. fumigatus* spielt eine wichtige Rolle für das Überleben im immunsupprimierten Wirt. Sie ist die erste Abwehr und liefert der Zelle Widerstand und physikalischen Schutz gegenüber dem Wirt. Andererseits ist die Zellwand auch das erste Ziel des Immunsystems während der Infektion, wodurch *A. fumigatus* erkannt und durch das intakte Immunsystem eines immunkompetenten Wirts vernichtet werden kann. Dies zeigt, dass der Aufbau der pilzlichen Zellwand entscheidend für eine hohe Anpassung an die Immunantwort des Wirts und somit auch für die Pathogenität des Pilzes ist (Hohl und Feldmesser, 2007; Abad *et al.*, 2010). Die Zellwand von *A. fumigatus* besteht hauptsächlich aus Polysacchariden (mind. 90%) und Proteinen, wobei hydrophobe Proteine, sog. Hydrophobine, die Interaktion mit dem Wirt fördern, indem sie an Kollagen oder Albumin binden und somit das Anheften der Sporen auf z. B. Lungengewebe ermöglichen (Wessels, 1993; Thau *et al.*, 1994; Bouchara *et al.*, 1995; Latgé, 1999; Abad *et al.*, 2010). Andererseits ist *A. fumigatus* auch in der Lage die Aktivität des Immunsystems herabzusetzen, wie z. B. durch die Pigmentierung der Konidienoberfläche oder durch Binden gewisser Faktoren wie H, FHL-1 und C4BP, was zu einer Reprimierung der Komplementkaskade des Immunsystems führt (Tsai *et al.*, 1998; Meri *et al.*, 2002; Behnsen *et al.*, 2008; Vogl *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010).

Ebenso können Mycotoxine einen wichtigen Faktor für die Pathogenität darstellen. Sie werden durch den Pilz gebildet, um ihn vor Konkurrenz in der gleichen ökologischen Nische zu schützen bzw. um den Wirt direkt anzugreifen. Je nach Toxin kann die Proteinsynthese, DNA- und RNA-Synthese blockiert oder die Zellmembran beeinträchtigt werden, wodurch

der Wirt geschädigt wird, was letztendlich zu dessen Tod führen kann (Latgé, 1999; Abad *et al.*, 2010). Das einflussreichste Toxin, das von *A. fumigatus* gebildet wird, ist Gliotoxin, welches unter anderem die Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile verhindert, deren Apoptose induziert und die T- und B-Zell-Aktivierung blockiert. Obwohl Gliotoxin ein äußerst potentes Mycotoxin ist und es zeitweise im Verdacht stand, für die Pathogenität von *A. fumigatus* hauptverantwortlich zu sein, ist inzwischen bekannt, dass viele verschiedene Faktoren zur Pathogenität beitragen, von denen jeder einzelne nur einen Baustein bildet (Müllbacher und Eichner, 1984; Eichner *et al.*, 1986; Latgé, 1999; Yamada *et al.*, 2000; Stanzani *et al.*, 2005; Hohl und Feldmesser, 2007; Kwon-Chung und Sugui, 2009; Abad *et al.*, 2010). Darüber hinaus können Virulenzfaktoren nicht eindeutig definiert werden, ohne die Eigenschaften des Wirts zu berücksichtigen. Der Mensch als Wirt liefert enorm viele Angriffsziele für Pathogene, wobei Kombinationen dieser Ziele die Virulenz von bereits etablierten und auch von sich neu entwickelnden Pathogenen ermöglicht. Zudem tragen genetische Vorgänge wie Rekombination, Mutation oder Austausch von Genen in Kombination mit Klimawandel, sowie dem Aussterben unterschiedlicher Wirte und Mikroorganismen dazu bei, dass die globalen Ziele der Virulenz sich mit der Zeit ändern können (Casadevall, 2006).

2.4 Der Stoffwechsel von *A. fumigatus* innerhalb des Wirts

A. fumigatus ist sehr vielseitig hinsichtlich der Erschließung von Nährstoffen. Seine primäre ökologische Nische ist Kompost, wo er durch die Zersetzung von organischem Material oligomere Abbauprodukte generiert und aufnimmt (Tekaiia und Latgé, 2005; Rhodes, 2006). Seine Fähigkeit mit Nährstoffmangel umgehen zu können, ist für sein Überleben notwendig und seine Eigenschaft verschiedene Stickstoff- und Kohlenstoffquellen aufzuspüren und zu verwerten, trägt dazu bei, dass *A. fumigatus* fähig ist, immungeschwächte Säuger zu infizieren (Latgé, 1999; Marr *et al.*, 2002; Rhodes, 2006).

Bei der Verwertung von Kohlenstoffquellen spielt vor allem der cAMP-abhängige PKA (Proteinkinase A) -Signaltransduktionsweg, der durch Anwesenheit von Glukose reprimiert wird, eine wesentliche Rolle. Mutation von Genen des PKA-Wegs führte *in vivo* zu einer deutlich attenuierten Virulenz von *A. fumigatus*. Dies ließ vermuten, dass Mutationen, die die Fähigkeit des Organismus beeinträchtigen, Stoffwechselwege zur Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen anzuschalten, zur Folge haben können, dass der Pilz an Virulenz verliert, wenn sein Wachstum eingeschränkt ist (Thevelein und de Winde, 1999; Oliver *et al.*, 2002; Rhodes, 2006).

A. fumigatus kann als prototropher Organismus verschiedene Stickstoffquellen wie Nitrat oder Aminosäuren nutzen und alle benötigten Nukleotide, Aminosäuren und Vitamine aus einfachen Vorläufern herstellen (Rhodes, 2006). Frei verfügbares Nitrat kann aus der Umgebung aufgenommen und zu Ammonium umgewandelt werden, welches in Form von Glutamin und Glutamat in den Metabolismus eingeschleust wird. Unterschiedliche Gene und deren Produkte spielen bei der Verwertung von stickstoffhaltigen Quellen eine Rolle oder werden durch Anwesenheit bestimmter Stickstoffquellen (primär/sekundär) reguliert, hierzu gehören unter anderem *rhbA*, *cpcA* und *areA* (Hensel *et al.*, 1998; Rhodes, 2006; Dagenais und Keller, 2009; Abad *et al.*, 2010). *AreA* reguliert transkriptionell die Expression von Proteinen, die an Stickstofftransport und -verarbeitung beteiligt sind, und im neutropenischen Mausmodell der invasiven Aspergillose zeigte sich eine *areA*-Mutante genauso virulent wie der Wildtyp, obwohl ihr Wachstum im Lungengewebe verlangsamt war (Hensel *et al.*, 1998; Dagenais und Keller, 2009; Abad *et al.*, 2010). *RhbA* codiert für ein Ras-verwandtes Protein, dessen Expression unter Stickstoffmangelbedingung induziert ist. Eine entsprechende Mutante wuchs langsamer auf Medium mit sekundärer Stickstoffquelle und zeigte eine signifikant attenuierte Virulenz im Mausmodell. Dies zeigt, dass auch die flexible Verwendung unterschiedlicher Stickstoffquellen eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *A. fumigatus* spielt (Panepinto *et al.*, 2003; Dagenais und Keller, 2009; Abad *et al.*, 2010). Aminosäuren sind eine weitere Stickstoffquelle, wobei im Wirt nicht alle frei verfügbar sind, sondern durch Abbau von Proteinen generiert werden oder durch stickstoff- und kohlenstoffhaltige Vorgänger synthetisiert werden müssen. Bei Aminosäuremangel ist *cpcA*, ein Schlüsselgen der sog. „*Cross-Pathway Control*“ (CPC) aktiviert. Dies reguliert die Expression von Genen der Aminosäurebiosynthese, und die Deletion von *cpcA* führt zu einer geringeren Virulenz im Mausmodell der invasiven Aspergillose (Krappmann *et al.*, 2004; Dagenais und Keller, 2009; Abad *et al.*, 2010). Der Nährstoffbedarf von *A. fumigatus* während einer Infektion wurde auch durch auxotrophe Mutanten metabolischer Wege untersucht. Mutanten, welche auxotroph waren für Uracil ($\Delta pyrG$), Folat ($\Delta pabaA$) oder Lysin ($\Delta lysF$) zeigten eine verminderte Virulenz bzw. Avirulenz (Sandhu *et al.*, 1976; D'Enfert *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2000; Liebmann *et al.*, 2004; Rhodes, 2006; Dagenais und Keller, 2009). Auch der α -Aminoacidipat-Syntheseweg ist essentiell für die Lysin-Biosynthese, sodass eine *hcsA*-Deletionsmutante zu Auxotrophie für Lysin führt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Deletionsstamm im Mausmodell der bronchopulmonalen Aspergillose stark attenuiert, jedoch nach intravenöser Injektion genauso virulent wie der Wildtypstamm war (Schobel *et al.*, 2010). Daher scheint die Lysin-Biosynthese kein vielversprechendes Ziel für

Antimykotika in Bezug auf invasive Aspergillose zu sein. Der Methylcitrat-Zyklus ist wichtig für das Überleben und die Pathogenität von *A. fumigatus*, da sich beim Abbau von Aminosäuren toxisches Propionyl-CoA in den Zellen anhäuft, was durch das erste Enzym (Methylcitrat-Synthase) des Methylcitrat-Zyklus' inhibiert wird. Das *mcsA*-Gen codiert für die Methylcitrat-Synthase in *A. fumigatus* und es wurde gezeigt, dass die Virulenz eines *mcsA*-Deletionsstammes im Mausmodell der invasiven Aspergillose stark attenuiert ist (Maerker *et al.*, 2005; Ibrahim-Granet *et al.*, 2008). Die Untersuchungen dieser Mutanten verdeutlicht die Notwendigkeit von metabolischen Wegen und der Biosynthese einiger Aminosäuren für das Überleben von *A. fumigatus* im Wirt und zeigt, wie wichtig die Biosynthese von Nährstoffen, die nicht direkt im Wirt verfügbar sind, für den Pilz ist. Der größte Anteil an Aminosäuren ist jedoch in den Proteinen des Wirts fixiert (Fleck *et al.*, 2011), für deren Generierung proteolytische Enzyme notwendig sind.

2.5 Extrazelluläre Proteolyse durch *A. fumigatus*

Saprotrophes Wachstum zeichnet sich unter anderem durch die Nahrungsaufnahme über Absorption aus, welche auf dem extrazellulären Abbau des umgebenden polymeren Nährbodens und der sukzessiven Aufnahme von oligomeren Abbauprodukten beruht. Hierfür werden verschiedenste hydrolytische Enzyme exprimiert und sekretiert, wobei Proteasen eine bedeutende Rolle zu haben scheinen, verdeutlicht durch das enorme Spektrum an proteolytischer Aktivität, das im Genom von *A. fumigatus* codiert ist und mehr als 100 Proteasen umfasst (Nierman *et al.*, 2005; Monod *et al.*, 2009). Die drei bedeutendsten Proteasen, die während der Infektion von *A. fumigatus* sekretiert werden, sind eine alkalische Serinprotease (Alp), eine Metalloprotease (Mep) und eine Aspartatprotease (Pep) (Monod *et al.*, 1999). Die Produktion dieser Proteasen wird durch die Anwesenheit von proteinhaltigen Substanzen im Medium ausgelöst, wohingegen freie Aminosäuren oder Oligopeptide ihre Expression unterdrücken. Verschiedene Punkte sprechen sowohl für als auch gegen eine Beteiligung der extrazellulären proteolytischen Aktivität an der Entstehung einer invasiven Aspergillose: die Expression mehrerer Proteasen während der Infektion konnte nachgewiesen werden (Reichard *et al.*, 1990; Moutaouakil *et al.*, 1993; Markaryan *et al.*, 1994; Reichard *et al.*, 1994), und einer von *A. fumigatus* exprimierten elastinolytischen Aktivität wurde die Fähigkeit zugeschrieben, invasive Aspergillose zu unterstützen (Kothary *et al.*, 1984). Ebenso wurde gezeigt, dass die alkalische Serinprotease Strukturveränderungen des Aktinzytoskeletts kultivierter Pneumozysten induziert (Kogan *et al.*, 2004). Auch scheinen die Abbauprodukte von Proteinen eine Rolle bei der Nährstoffversorgung zu spielen (Ibrahim-Granet *et al.*,

2008). Dagegen konnte in einem einzelnen Fall keine Elastinolyse der Gefäßwände während invasiver Aspergillose beobachtet werden (Denning *et al.*, 1992), und es konnte bislang für keine Mutante mit Einfach- oder Mehrfachdeletion bezüglich extrazellulärer Proteasen eine verminderte Virulenz festgestellt werden (Monod *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1993; Jatou-Ogay *et al.*, 1994; Reichard *et al.*, 1997).

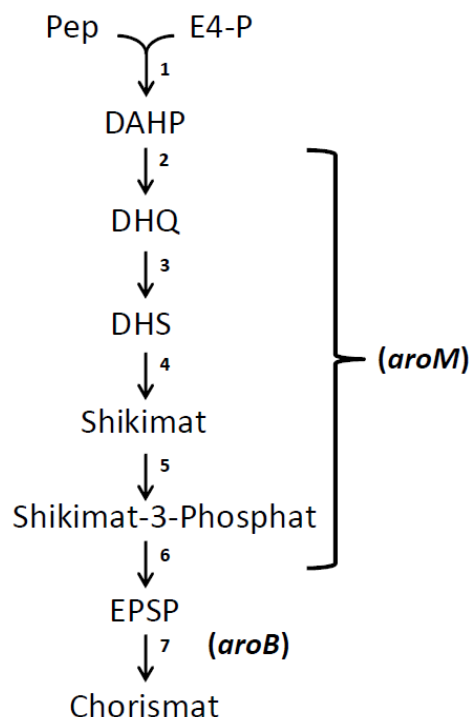
Nach wie vor ist über die Regulation der Expression und Sekretion von Proteasen durch *Aspergillus* kaum etwas bekannt. Bislang konnte nur gezeigt werden, dass die Expression einiger prominenter sekretierter Proteasen von *A. fumigatus* durch die Anwesenheit von Protein als einziger Stickstoffquelle stark induziert wird, wobei freie Aminosäuren oder kleinere Peptide dies reprimieren. Auch führt die Anwesenheit einer primären Stickstoffquelle, wie zum Beispiel Ammonium, zu einem sehr niedrigen Niveau an extrazellulärer proteolytischer Aktivität, was verdeutlicht, dass die Expression der sekretierten Proteasen durch die Stickstoff-Katabolitrepression kontrolliert wird. Eine detaillierte Untersuchung der Sekretion von Proteasen durch *A. fumigatus* bei Anwesenheit von komplexen Substraten wie Gelatine, Matrigel, Serum, Rinderserumalbumin (BSA) oder Pneumozysten enthüllte ein vielfältiges Muster der Expression von sekretierten Proteasen (Gifford *et al.*, 2002). Bei Anwesenheit geringer Konzentrationen an hydrolysiertem Protein (0,1%) in Form von Pepton konnte vor allem die extrazelluläre Proteolyse, zumindest die Serinprotease-Aktivität, aufrechterhalten werden (Bouchara *et al.*, 1993). Im Modelorganismus *A. nidulans* wurde der Einfluss der Stickstoffquelle auf die Sekretion von Proteasen dokumentiert, ebenso wie der Einfluss der Kohlenstoffquelle und der damit verbundenen Katabolitrepression. Hierbei scheint der Transkriptionsfaktor XprG eine generelle Rolle bei der Regulation der Expression von extrazellulären Proteasen als Antwort auf Mangelbedingung zu spielen (Katz *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2006).

In *A. niger* wurde ein spezifischer Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität identifiziert (Mattern *et al.*, 1992). Das *prtT*-Gen (*prt*: protease deficient) codiert für ein Protein der Zn₂Cys₆ Familie, die in filamentösen Pilzen hoch konserviert ist (Punt *et al.*, 2008). Weiterführende Analyse der Mutanten in *A. niger* und *A. oryzae* bestätigte die Funktion von PrtT als Regulator der zentralen Proteasegene. Im Spezies-übergreifenden Genomvergleich wurde jedoch ersichtlich, dass das *prtT*-Gen in etlichen Aspergillen vorkommt, interessanterweise jedoch nicht in *A. nidulans*, wofür wahrscheinlich eine evolutionsbedingte Gendeletion verantwortlich ist.

2.6 Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Pilzen

Im Gegensatz zu Säugetieren und Menschen können Mikroorganismen und Pflanzen die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan *de novo* synthetisieren (Herrmann, 1995). Chorismat ist das letzte gemeinsame Zwischenprodukt der aromatischen Aminosäuren und *para*-Aminobenzoesäure (PABA) und wird über den Shikimat-Syntheseweg gebildet (Abb. 2). Im ersten Schritt erfolgt durch die 3-Desoxy-D-Arabinoheptulosonat-7-Phosphat (DAHP) -Synthase eine

Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P) zu DAHP, eine Reaktion, die nahezu analog zur Aldolkondensation ist. Die fünf zentralen Schritte des Shikimat-Weges werden bei vielen Eukaryonten wie z. B. *S. cerevisiae* und *A. nidulans* durch ein pentafunktionelles Enzym codiert, das durch Fusion von fünf Enzymen zu einem multifunktionellen Protein entstanden ist und als Dimer vorliegt (Charles *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Braus, 1991; Hawkins *et al.*, 1993). Dieses Enzym wandelt DAHP zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) um, die einzelnen Schritte werden im Folgenden erklärt: bei der Katalyse von DAHP durch die 5-Dehydroquinat (DHQ) -Synthase, entsteht nach Abspaltung eines Phosphats und einer Oxidationsreaktion zyklisches DHQ. Die dritte Reaktion des Shikimat-Synthesewegs wird katalysiert durch die 3-Dehydroquinat (DHQ) -Dehydratase, die DHQ zu Dehydroshikimat (DHS) konvertiert und dabei die erste Doppelbindung des aromatischen Ringes einbringt. DHS wird durch die



DHS-Dehydrogenase zu Shikimat, und dieses zusammen mit ATP durch die Shikimatkinase zu Shikimat-3-Phosphat umgewandelt. Im sechsten Schritt wird Shikimat-3-Phosphat zusammen mit einem weiteren Molekül PEP durch die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP-Synthase) zu EPSP umgesetzt. Chorismat wird während der siebten Reaktion des Shikimat-Synthesewegs gebildet, durch Abspaltung eines Phosphats und der Entstehung einer zweiten Doppelbindung durch die Chorismat Synthase (Braus, 1991;

Abbildung 2: Schematische Abbildung des Shikimatwegs (Prä-Chorismatweg), mod. nach (Tzin und Galili, 2010). Die Enzyme sind mit Zahlen neben den Reaktionspfeilen gekennzeichnet und stehen für: (1) DAHP-Synthase, (2) DHQ-Synthase, (3) DHQ-Dehydratase, (4) DHS-Dehydrogenase, (5) Shikimatkinase, (6) EPSP-Synthase, (7) Chorismatsynthase. Die Reaktion von DAHP zu EPSP wird bei *A. fumigatus* durch ein multifunktionelles Enzym (*aroM*), die Chorismatsynthase durch *aroB* codiert.

Hawkins *et al.*, 1993; Macheroux *et al.*, 1999; Tzin und Galili, 2010). In *A. fumigatus* wird das pentafunktionelle Enzym des Shikimat-Synthesewegs, das die Schritte zwei bis sechs katalysiert, durch das Gen *aroM*, und die Chorismatsynthase, die den siebten Schritt katalysiert, durch das Gen *aroB* codiert. Die DAHP-Synthase scheint in *A. fumigatus* durch die Gene *aroF* und *aroG* und codiert zu sein.

Chorismat ist das letzte gemeinsame Zwischenprodukt der drei aromatischen Aminosäuren und wird sowohl für den Phenylalanin/Tyrosin- als auch für den Tryptophan-Zweig benötigt, wobei es außerdem für die Synthese von anderen aromatischen Verbindungen wie Vitamin K, Ubiquinon oder *p*-Aminobenzoesäure (PABA) notwendig ist (Abb. 3). Im ersten Schritt des Phenylalanin/Tyrosin-Zweiges wird Chorismat zu Prephenat durch die Chorismatmutase umgewandelt, bevor sich der Syntheseweg erneut verzweigt und entweder Phenylpyruvat oder 4-Hydroxyphenylpyruvat gebildet wird. Die Prephenat-Dehydratase katalysiert die Umwandlung von Prephenat zu Phenylpyruvat, und im letzten Schritt des Phenylalanin-Zweiges erfolgt eine Transaminierung von Phenylpyruvat zu Phenylalanin, katalysiert durch eine Aminotransferase. Im Tyrosin-Zweig wird Prephenat durch die Prephenat-Dehydrogenase oxidativ decarboxyliert und dehydrolisiert, wodurch 4-Hydroxyphenylpyruvat entsteht, welches im letzten Syntheseschritt durch eine Aminotransferase zu Tyrosin umgewandelt wird (Braus, 1991; Tzin und Galili, 2010). Das erste Enzym des Phenylalanin/Tyrosin-Zweiges, die Chorismatmutase wird in *A. fumigatus* durch das Gen *aroC* codiert.

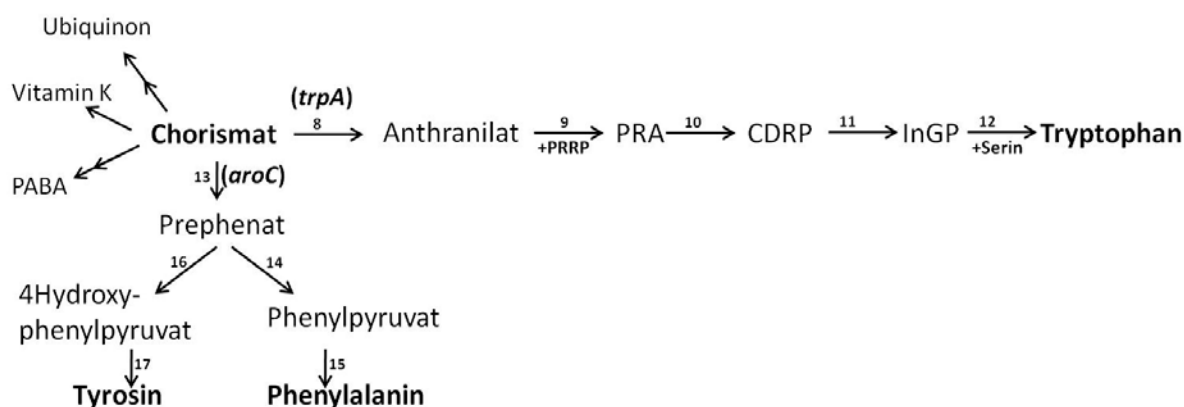


Abbildung 3: Biosynthese von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, mod. nach (Tzin und Galili, 2010). Die Enzyme sind mit Zahlen auf den Reaktionspfeilen gekennzeichnet und stehen für: (8) Anthranilatsynthase, (9) Anthranilat-Phosphoribosyltransferase, (10) PRA-Isomerase, (11) InGP-Synthase, (12) Tryptophansynthase, (13) Chorismatmutase, (14) Prephenat-Dehydratase, (15) Phenylalanin-Aminotransferase, (16) Prephenat-Dehydrogenase, (17) Tyrosin-Transferase. Die Anthranilatsynthase wird bei *A. fumigatus* durch das Gen *trpA* und die Chorismatmutase durch *aroC* codiert.

Im Tryptophan-Zweig wird Chorismat in fünf Schritten zu Tryptophan umgewandelt. Die erste Reaktion wird katalysiert durch einen Anthranilatsynthase-Komplex, dessen Enzyme Chorismat mit Hilfe von Glutamin, als Donor der Aminogruppe, zu Anthranilat umsetzen. Dieses Enzym wird in *A. fumigatus* durch das Gen *trpA* codiert. Im zweiten Schritt wird eine 5-Phosphoribosyl-Untereinheit von 5-Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) zu der Aminogruppe des Anthranilat überführt, wodurch Phosphoribosylanthranilat (PRA) entsteht, welches in der nächsten Reaktion durch die PRA-Isomerase in einer Redox-Reaktion zu Carboxyphenylamino-1-Deoxyribulose-5-Phosphat (CDRP) umgewandelt wird. Im vierten Schritt der Tryptophan-Synthese wird CDRP decarboxyliert und die Entstehung des zweiten Rings führt zu InGP. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Indolglycerin-Phosphat-(InGP)-Synthase. Der letzte Reaktionsschritt wird durch die Tryptophansynthase katalysiert, wobei InGP gespalten, und Tryptophan aus einer Reaktion von Indol und Serin gebildet wird (Abb. 3). Es konnte gezeigt werden, dass in Hefe und anderen Pilzen wie z. B. *Neurospora crassa*, *A. nidulans*, *A. niger* und *Penicillium chrysogenum* ein Enzym des Anthranilatsynthase-Komplexes, die Glutamin-Amidotransferase, an die InGP-Synthase gekoppelt ist, sodass ein multifunktionelles Enzym vorliegt (Braus, 1991; Tzin und Galili, 2010).

Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass an verschiedenen Punkten des Shikimat-Synthesewegs *feedback*-Inhibierung stattfindet. So wird die DAHP-Synthase durch die Endprodukte Phenylalanin und Tyrosin inhibiert. Außerdem wird die Aktivität des Anthranilatsynthase-Komplexes durch Tryptophan inhibiert und die der Chorismatmutase durch Tyrosin, letztere wird allerdings auch durch Tryptophan aktiviert. Dies hat zur Folge, dass die Verteilung des Chorismats in den Phenylalanin/Tyrosin- oder den Tryptophan-Zweig durch die Endprodukte dieser Wege kontrolliert wird, um eine ausgewogene Synthese der aromatischen Aminosäuren zu gewährleisten (Braus, 1991; Krappmann *et al.*, 2000).

Der Shikimat-Syntheseweg könnte als therapeutisches Ziel zur Behandlung von Mykosen dienen, da er im Menschen nicht vorkommt aber für Algen, Pflanzen, Bakterien und eben Pilze essentiell ist, wie bereits am nichtselektiven Herbizid „Glyphosat“ (*N*-Phosphomethylglycin) gezeigt werden konnte (Braus, 1991; Hawkins *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 2006). Glyphosat ist ein Strukturanalogon von Phosphoenolpyruvat und inhibiert die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase (EPSPS), wodurch der gesamte Shikimat-Weg blockiert und damit die Synthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan unterbunden wird. Zudem führt die Inhibierung von EPSPS zu einer verminderten *feedback*-Inhibierung des Shikimat-Synthesewegs, was wiederum zu einer Anhäufung von Shikimat führt. Hierbei

ist nicht vollständig geklärt ob die mit Glyphosat behandelten Pflanzen durch den Mangel an aromatischen Aminosäuren sterben, oder durch die Anhäufung von Kohlenstoffverbindungen für die Shikimatsynthese, der dann an anderer Stelle für weitere essentielle Synthesewege fehlt (Steinrucken und Amrhein, 1980; Cerdeira und Duke, 2006; de Mendonca *et al.*, 2007; Duke und Powles, 2008). Auch wird vermutet, dass eine Behandlung mit Glyphosat u. a. zu oxidativem Stress führt (Ahsan *et al.*, 2008; Diaz Vivancos *et al.*, 2011). Obwohl die genaue Wirkungsweise von Glyphosat noch nicht bekannt ist, wäre es denkbar, auch den Shikimat-Syntheseweg anderer Organismen wie z. B. pathogener Pilze zu inhibieren, um deren Wachstum zu hemmen.

2.7 Signalwege der Stressantwort über eIF2 α -Kinasen

Ständige Veränderungen von Umweltbedingungen, Stressfaktoren und Nährstoffangebot fordern eine schnelle und gezielte Antwort des jeweiligen Organismus. Hierzu wurden unterschiedliche Mechanismen entwickelt, wie die Regulation der Transkription, translationelle Regulation, Regulation der Proteinprozessierung oder Katabolit-Repression.

Die translationelle Regulation ist ein grundlegender Schritt in der Regulation von Genexpression bei Eukaryonten. Eine wichtige Funktion hat hierbei eine Familie von Proteinkinasen, die die α -Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors 2 (eIF2) als

Antwort auf Mangelbedingung phosphorylieren. eIF2 bildet einen ternären Komplex zusammen mit GTP und der tRNA die mit Methionin beladen ist (tRNA^{Met}). Diese ternären Komplexe sind entscheidend für die Initiation der Translation. Das GTP wird nach jedem Initiierungs-Zyklus zu GDP hydrolysiert. Da eIF2 eine höhere Affinität zu GDP als zu GTP hat, muss der Translationsinitiationsfaktor eIF2-GDP zu eIF2-GTP regenerieren. Durch eine Phosphorylierung von eIF2 α wird jedoch die Aktivität des Initiationsfaktors eIF2 reduziert, da nun die Regenerierung von eIF2-GDP zu eIF2-GTP durch den Translationsinitiationsfaktor eIF2B

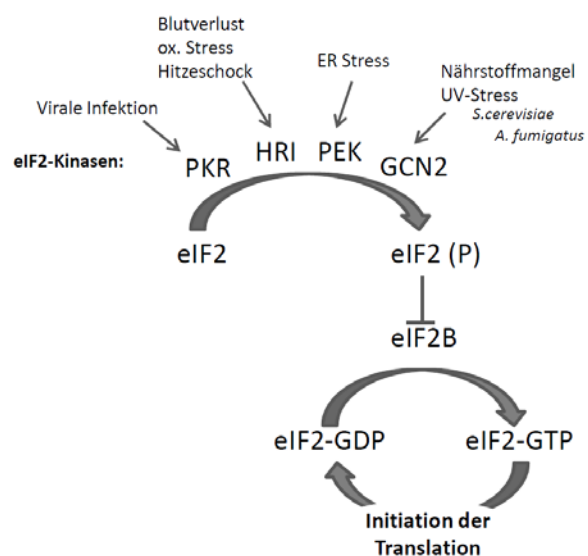


Abbildung 4: Schema der translationellen Regulation durch Proteinkinasen, mod. nach (Wek *et al.*, 2006). eIF2 α -Kinasen von Säugern sind: PKR (RNA-dependent protein kinase), HRI (haem-regulated inhibitor) und PEK (pancreatic eIF2 α kinase). eIF2 α -Kinasen von Pilzen: GCN2 (general control nonderepressible, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, entspricht CpcC, cross-pathway control, in *A. fumigatus*).

blockiert ist, die aber notwendig ist für die Initiierung der Translation (Abb. 4). Folglich nimmt die Translationsrate ab, wobei andererseits die Expression von spezifischen regulatorischen Faktoren zunimmt, die eine Stressantwort auslösen (Wek, 1994; Wek *et al.*, 2006; Zaborske *et al.*, 2010). In Säugern wurden bisher vier eIF2-Kinasen gefunden, die auf verschiedene Stressbedingungen wie oxidativen Stress, Hitzeschock, virale Infektion oder Nährstofflimitierung reagieren. Gcn2p ist die einzige untersuchte Kinase für eIF2-Phosphorylierung in *S. cerevisiae* (Hinnebusch, 2005) und reagiert auf Aminosäuremangel. Auch das Genom von *C. albicans* codiert nur eine dieser Kinasen. In *A. fumigatus* sind bisher zwei eIF2 α -Kinasen bekannt, von denen eine entscheidend für die *Cross-Pathway Control* ist, welche von Aminosäuremangel abhängig und bereits intensiv untersucht worden ist. Von der zweiten *A. fumigatus* eIF2 α -Kinase ist bisher keine zelluläre Funktion bekannt (Wek *et al.*, 2006; Sasse *et al.*, 2008; Zaborske *et al.*, 2010).

Für eIF2 α -Kinase Signalwege von *S. cerevisiae* wurden lange 5'-*leader*-Sequenzen beobachtet, die sog. *upstream open reading frames* (uORFs) enthalten, welche der translationellen Regulation des Zielgens *GCN4* dienen. Dieser Mechanismus wurde bereits bei der Sensorkinase Gcn2p in *S. cerevisiae* intensiv untersucht, wobei die *leader*-Sequenz im Transkript des Gens *GCN4* vier uORFs beinhaltet (Hinnebusch, 1984). Dagegen sind für die Regulation der *Cross-Pathway Control* durch die Sensorkinase CpcC von *A. fumigatus* und *A. nidulans* nur zwei uORFs im Transkript des Gens beobachtet worden (Wek, 1994; Sachs, 1996; Hoffmann *et al.*, 2001; Krappmann *et al.*, 2004; Wek *et al.*, 2006; Sasse *et al.*, 2008).

Nicht-Mangelbedingung führt zu ausreichender Menge an beladener tRNAs, welche die Bildung von genügend ternären Komplexen für die Translation ermöglichen. Nachdem die Translation am ersten uORF erfolgt ist, müssen die ribosomalen Untereinheiten zusammen mit einem ternären Komplex erneut assembliert werden, damit die Translation am zweiten uORF erfolgen kann. Die geringe Distanz zwischen zweitem uORF und dem Startkodon des eigentlichen Gens hindert jedoch anschließend die erneute Reassemblierung der Ribosomen, wodurch die Expression des Genprodukts reprimiert ist. Unter Aminosäure-Mangelbedingungen hingegen kommt es zu einer Anhäufung von unbeladenen tRNAs, welche daraufhin an eine Sensorkinase (Gcn2p oder CpcC) binden, die dadurch aktiviert wird und die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2 phosphoryliert. Dadurch wird die Menge an ternären Komplexen und damit auch die generelle Translation verringert. Dies führt zwar zu einer reduzierten Translation der uORFs, ermöglicht jedoch den Ribosomen, nach nicht erfolgter Translation des zweiten uORFs, am Startkodon der kodierenden Sequenz zu binden,

sodass es zur Translation des Zielgens kommt. Im Vergleich zu Nicht-Mangelbedingung ist somit unter Mangelbedingungen die Expression stark de-reprimiert (Braus *et al.*, 2004).

2.8 Ziel dieser Arbeit

Die saprophytische Lebensweise von *A. fumigatus* ist eine der Voraussetzungen für seine Virulenz, wobei die Sekretion von Proteasen, welche die Assimilierung von proteinhaltigen Substraten ermöglicht, eine entscheidende Funktion für den Saprophyt hat. Die Bedeutung der extrazellulären proteolytischen Aktivität für die Pathogenität von *A. fumigatus* ist jedoch umstritten.

Um dieses Thema genauer zu beleuchten, sollten im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Aspekte der Nährstoffversorgung von *A. fumigatus* im Wirt untersucht werden, wobei der Fokus auf die Verwertung von Proteinen und den Aminosäuremetabolismus gelegt wurde. Hierbei sollte das *p_{prtT}*-Genprodukt als globaler Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität in *A. fumigatus* eingehend charakterisiert werden, zunächst durch Erzeugung einer entsprechenden Mutante und deren eingehende Analyse bezüglich ihrer Eigenschaft, Proteine als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwenden. Ein *p_{prtT}-gfp* Reporterstamm sollte einen Einblick in eine vermutete posttranskriptionelle Regulation der *p_{prtT}*-Expression durch eIF2 α -Kinase-Signaltransduktion liefern. Um die Rolle der sekretierten Proteasen auch in Bezug auf die Virulenz der pathogenen Spezies *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden Infektionsversuche im leukopenischen Mausmodell der pulmonalen Aspergillose durchgeführt.

Des Weiteren ist bekannt, dass Pilze im Gegensatz zu Säugern zur *de novo* Synthese der drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan fähig sind. Der hierfür benötigte Shikimat-Syntheseweg könnte daher von therapeutischem Nutzen für die Behandlung von Aspergillose sein, da dieser Syntheseweg im Menschen nicht vorkommt. Um diese Fragestellung zu verfolgen, sollten Mutanten von *A. fumigatus*, die auxotroph für eine oder mehrere aromatische Aminosäuren sind, näher charakterisiert und im Rahmen von Virulenztests im leukopenischen Mausmodell der invasiven Aspergillose untersucht werden. Dadurch sollte die Rolle der pilzlichen Biosynthese aromatischer Aminosäuren für die invasive Aspergillose analysiert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Labormaterialien

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen MERCK (Darmstadt, D), ROCHE GMBH (Mannheim, D), CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D), INVITROGEN GMBH (Karlsruhe, D), FLUKA (Neu-Ulm, D) und SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D) bezogen. Das zur Gewinnung von Protoplasten benötigte Enzym Vinoflow FCE wurde bei der Firma NOVOZYMES A/S (Denmark) erworben. Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von MBI FERMENTAS (Vilnius, LIT), NEW ENGLAND BIOLABS (D), PROMEGA (Madison, WI, USA) und NOVAGEN (Darmstadt, D) erworben. RNase I_f stammt von NEW ENGLAND BIOLABS. Als DNA-Größenstandard wurde der „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ von MBI FERMENTAS bzw. der „1 kb DNA Ladder“ von NEW ENGLAND BIOLABS und als Protein-Größenstandard der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ von MBI FERMENTAS verwendet. Agarose wurde von PEQLAB (Erlangen, D) bezogen. Columbia-Agar mit Schafblut wurde von der Firma OXOID GMBH (DE, Wesel) bezogen.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden Kits der Firma MACHERY & NAGEL GMBH & CO. KG (Düren, D) verwendet.

Synthetische Oligonukleotide wurden von MWG BIOTECH bezogen. Zur Detektion von Western-Hybridisierungen und Southern-Hybridisierungen wurde ein „FUJI medical X-Ray film“ der Firma FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf, D) benutzt.

Angewachsenes Myzel von *A. fumigatus* wurde unter der Verwendung von Miracloth-Filtergewebe (CALBIOCHEM) vom Flüssigmedium getrennt.

Alle spektrometrischen Messungen wurden an einem Biophotometer der Firma EPPENDORF (Hamburg, D) bzw. Nanodrop1000 der Firma PAQLAB (Erlangen, D) durchgeführt. Zum Mikroskopieren wurden Objektträger der Firma MENZEL (Braunschweig, D) und MARIENFELD benutzt.

3.1.2 Gerätenachweis

Brutschränke:	HeraCell, HERAEUS INSTRUMENTS
Gel Doc:	Gel Doc 2000, BIO-RAD
Gelkammern:	PerfectBlue Mini M+L, PEQLAB mit Power Pac EV222, PEQLAB Mini-Protean Tetra System mit Power Pac 1000, BIO-RAD (für SDS-Gele)
Heizblöcke:	LIEBISCH GRANT BOEKEL
Hybridi- sierungsofen:	Shake ‚n‘ Stack, HYBAID
Kamera:	Digital camera Powershot A650 IS, CANON
Mikroskope:	Binokular: Axiolab, ZEISS Fluoreszenzmikroskop: Axiolab 100, ZEISS Live Cell Imaging: Leica AF6000, LEICA
PCR-Cycler:	PeqStar 96 universal gradient, PEQLAB GMBH Mastercycler gradient, EPPENDORF
pH-Meter:	pH-Meter 526, WTW GMBH (Weilheim, D)
Photomaschine:	Cawomat 2000 IR, CAWO
Photometer:	Spektrophotometer (BioPhotometer), EPPENDORF
Schüttler:	KS15, EDMUND BÜHLER
Semidry-Blot:	Semi-dry transfer cell, Trans-Blot SD, BIO-RAD
Schwenker:	Swip, EDMUND BÜHLER Duomax1030, HEIDOLPH
Sterilbank:	biological safety cabinet, NUNC GMBH
Thermohaube:	TH 15, EDMUND BÜHLER
UV-Tisch:	BIOMETRA
UV-Crosslinker:	Stratalinker 1800, STRATAGENE
Zentrifugen:	Biofuge pico, HERAEUS INSTRUMENTS Biofuge fresco 21, HERAEUS INSTRUMENTS Biofuge primo R, HERAEUS INSTRUMENTS Multifuge X1R, HERAEUS INSTRUMENTS

3.1.3 Oligonukleotide, Plasmide und Stämme

Zur Klonierung wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α [F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsd17*, (r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] (Woodcock *et al.*, 1989) verwendet. In Tabelle 1 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die verwendeten Plasmide und *A. fumigatus*-Stämme sind in Tabelle 2 bzw. Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Größe	Sequenz
AB17	32-mer	5'-TAT AGT TTA AAC ATT AGG TAA ATG CAT TCT AC-3'
AB18	32-mer	5'-TAT AGT TTA AAC AAG AAT TGA CTG ATA TGC TA-3'
AB19	40-mer	5'-TAT AGG CCA TCT AGG CCT ATT GTC AAT CAT ACA TGG AAT T-3'
AB20	39-mer	5'-TAT AGG CCT GAG TGG CCG GCG GTT GAG TCT TAA ATT TTC-3'
AB28	20-mer	5'-CCA ATG ACA GCA GTG TGT CC-3'
AB29	19-mer	5'-TCC CCG TCC AAG CTG TAG C-3'
AB30	21-mer	5'-CAA ACT CAC GAG GAG ATG AAG-3'
AB31	19-mer	5'-GCA CTG AGG GGT GAT GAC C-3'
AB34	20-mer	5'-TGC CTA CGT TGT CGA CAG TG-3'
AB35	21-mer	5'-TTT GAG GCA TCA CTG TTC TCG-3'
AB36	20-mer	5'-TGA CTC GGA ATA CCT GAC CC-3'
AB37	20-mer	5'-CCA ACT GGG ACT TGA CAG TG-3'
AB38	19-mer	5'-ACT TTC CGC GTG GTC GAC G-3'
AB39	20-mer	5'-GTC GGT CTC AAC TCT CCA TG-3'
AB51	19-mer	5'-GTT CCA GCG AGA TGA GGC G-3'
AB52	30-mer	5'-TAT AGG ATC CAC AGA GGC CCA TCG ATA TCG-3'
AB53	29-mer	5'-TAT AGG ATC CGG CCT CAG AGT ATG GGC AC-3'
AB60	21-mer	5'-CTT AGG AGG ATG ATC GTC GAT-3'
AB61	30-mer	5'-CTC TGA GGC CAT GAG TAA AGG AGA AGA ACT-3'
AB62	19-mer	5'-GGC CTC AGA GTA TGG GCA C-3'
AB63	30-mer	5'-ATA CAA ATA AGA TCC ACT TAA CGT TAC TGA-3'
AB64	23-mer	5'-TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC-3'
AB65	24-mer	5'-AAA GAA GGA TTA CCT CTA AAC AAG-3'
AB67	33-mer	5'-TAT AGT TTA AAC ATA TGA CTT TTT ACC ATT GTA-3'
AB70	27-mer	5'-TAT AGT TTA AAC GCA GGG CTG GGT GCA-3'
AB72	55-mer	5'-GCC GGG TAT TCT CTA AGC TaC CCC AGT TTC TAG GAT CTT GGG CTA TTC TGA GCT A-3'
AB73	55-mer	5'-GAA ACT GGG GtA GCT TAG AGA ATA CCC GGC GAA CCT GAG CTT AAC AGA AGC ATG G-3'
AB74	55-mer	5'-CGG GGG TTT AAA AGT GCC cGC GAT GGG GAA AAT AAT GCG CAC GGA GTT AAT CCG G-3'
AB77	55-mer	5'-GCG CAT TAT TTT CCC CAT CGC gGG CAC TTT TAA ACC CCC GCA GAG AAC CTT TTC C-3'
AB78	23-mer	5'-ATT CAG GAG TAT GTG AGT CAA GC-3'
AB79	25-mer	5'-TTG CTT GGT TCT ACT GGC GGA GAC G-3'
AB80	45-mer	5'-CAG GAA CAG AAG ACC AAT TCG CAA CTC AGG CCT ATA GGT CAA TAG-3'

MATERIAL UND METHODEN

AB81	35-mer	5'-TGA GTT GCG AAT TGG TCT TCT GTT CCT GTA TAT GC-3'
AB82	30-mer	5'-ATC TAA CCT GTT TCT CCT AGC ATT TAT ATC-3'
AB83	47-mer	5'-ATA TAA ATG CTA GGA GAA ACA GGT TAG ATG GCC ATA TTA TGC TCA AC-3'
Sv523	27-mer	5'-GTT AAC TTA TCA CCC CCA GTC GAG GAG-3'
Sv524	40-mer	5'-ATG GCC TGA GTG GCC GGT AGA GAG GAT GGG AGG GGA TAG C-3'
Sv525	37-mer	5'-ATG GCC ATC TAG GCC TGG AAT GAT CGA AAA ATC TAC G-3'
Sv526	27-mer	5'-GTT AAC GTG CGA TTG GTG ACT GAG AAG-3'
Sv527	25-mer	5'-ACG AAA AGC TTC CGC AAC AGC CGT GG-3'
Sv528	27-mer	5'-TTG CAG TTT AAG CTT GCG ACT TGT ACG-3'
Sv532	22-mer	5'-ATG GAT TCT GAC ATG AAA GAC G-3'
Sv533	23-mer	5'-GTT AAC AGT ACC ATG AAG GCT CG-3'
Sv534	39-mer	5'-ACA TGG CCT GAG TGG CCG CTT TGT TAA GCT CAG GTT CG-3'
Sv535	39-mer	5'-ACA TGG CCA TCT AGG CCA CGA TTT TAG TAG CCT CGC CAG-3'
Sv536	24-mer	5'-GTT AAC TCA TTT TCT GAA TGC TTG-3'
Sv537	23-mer	5'-ATA GAT TAT CCT AGA AGA CTT GG-3'
Sv538	37-mer	5'-ATG GTG GCT AGC TTT CTC CTT CG-3'
Sv539	25-mer	5'-GTT AAC ACA GGT AAA TTT ATC TTC C-3'
Sv540	37-mer	5'-ACA TGG CCT GAG TGG CCT CTC GGT GAT AAG TCT AGT G-3'
Sv541	40-mer	5'-ACA TGG CCA TCT AGG CCA GAG GCG TTT TAG GGC TAT TC-3'
Sv542	25-mer	5'-GTT AAC ACG AGC GCG GTC CCG ATT C-3'
Sv543	22-mer	5'-ACT ATT ATG AGG GTG AAA TTG G-3'
Sv551	21-mer	5'-AAC AGA AGA GAC AAG TGA AGG-3'
Sv556	21-mer	5'-TTC GGG ATT TTG AAC GTC TCG-3'
Sv576	22-mer	5'-GTC ATT TGT CGG CTG CTG ATC C-3'
Sv589	24-mer	5'-ACA GAG GCC CAT CGA TAT CGC TGC-3'
Sv790	44-mer	5'-TCG ACG GTA TCG ATA GTT AAC GAC TAG TTG AGG TCA TAC GTG AG-3'
Sv791	40-mer	5'-CCA TCT AGG CCA TCA TGC GAA TTG GTC TTC TGT TCC TGT A-3'
Sv792	41-mer	5'-CAG ACA TCA CCG TTT ATG TCG ACG TGG GGA GAA TAC TTT CG-3'
Sv794	42-mer	5'-ATT GGA GCT CCA CCG TTA ACT TGG AAG ACC GAA GTA GAT AGA-3'
TubFw	20-mer	5'-GGA CGT TAC CTC ACC TGC TC-3'
TubRev	20-mer	5'-CAC GCT TGA ACA ACT CCT GA-3'
RTDpp4 Fw	20-mer	5'-TGT CGA CGC ACA GCA CAT CG-3'
RTDpp4 Rev	20-mer	5'-CCG GAT CGC ACT GGC ATT GT-3'
qPCRf	18-mer	5'-GAT ACC GTC GTA GTC TTA-3'
qPCRR	18-mer	5'-TGT CTG GAC CTG GTG AGT-3'

Tabelle 2: Verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
TOPO TA (pCR [®] II-TOPO [®])	Klonierungs-Vektor, (amp ^R)	Invitrogen
pCR [®] -BluntII-TOPO [®]	Klonierungs-Vektor, (kan ^R)	Invitrogen
pJET1.2/blunt	Klonierungs-Vektor, pUC19 Derivat (<i>bla</i> , multiple-cloning site in Eco47IR) (amp ^R)	Fermentas
pBluescript [®] II KS ⁺	Klonierungs-Vektor (amp ^R ; MCS)	Stratagene
pAN7-1	Hygromycinresistenzkassette (<i>PgpdA::hph::trpC^t</i>)	(Punt und van den Hondel, 1992)
pSK215	Cre Rekombinase Expressionsmodul in autonom replizierendem Vektor pPTRII (<i>niaD::cre</i>)	(Krappmann und Braus, 2005)
pSK275	Pyriithiamin-Resistenz Markerkonstrukt (<i>loxP-PgpdA::ptrA/tk::trpC^t-loxP</i>)	(Krappmann <i>et al.</i> , 2006)
pSK341	Phleomycin-Resistenz Markerkonstrukt (<i>loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	(Krappmann <i>et al.</i> , 2005)
pSK392	<i>gfp2-5::cpcA</i> -Kassette	(Sasse <i>et al.</i> , 2008)
pSK443	<i>aroM</i> -Deletionskassette (<i>aroM::loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	(Hamer, 2008)
pSK444	<i>aroC</i> -Deletionskassette (<i>aroC::loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	(Hamer, 2008)
pSK445	<i>trpA</i> -Deletionskassette (<i>trpA::loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	(Hamer, 2008)
pSK462	<i>prtT</i> -Deletionskassette (<i>prtT::loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	diese Arbeit
pSK463	Δ <i>prtT</i> -Komplementationskassette (<i>prtT::loxP-PgpdA::ptrA/tk::trpC^t-loxP</i>)	diese Arbeit
pSK485	β - <i>rec/six</i> blaster Kassette (<i>six-PxylP::β-rec::trpC^t-ptrA-six</i>)	(Hartmann <i>et al.</i> , 2010)
pJW121	Tet-on -Kassette (<i>ptrA/tk-PgpdA::rtTA::cgrA^t::TetO7-Pmin::his2A^t</i>)	Johannes Wagner, persönliche Mitteilung
pAB17	5' <i>prtT</i> in pJET1.2	diese Arbeit
pAB22A	<i>gfp</i> -Reporterkassette <i>PprtT-gfp-trpC^t</i>	diese Arbeit
pAB22	<i>gfp</i> -Reporterkassette mit Selektionsmarker <i>PprtT-gfp-trpC^t;ptrA/tk</i>	diese Arbeit
pAB23	Δ <i>trpA</i> -Komplementationskassette (<i>trpA</i> *Nukl.-72 - <i>loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	diese Arbeit
pAB24	Δ <i>aroC</i> -Komplementationskassette (<i>aroC</i> *Nukl.-41 - <i>loxP-PgpdA::ble/tk::trpC^t-loxP</i>)	diese Arbeit
pAB28	<i>aroB</i> -Deletionskassette (<i>aroB::six-PxylP::β-rec::trpC^t-ptrA-six</i>)	diese Arbeit
pAB29	Tet-on- <i>aroB</i> Kassette (<i>aroB::ptrA/tk-PgpdA::rtTA::TcgrA::TetO7-Pmin</i>)	diese Arbeit

Tabelle 3 Verwendete und hergestellte *A. fumigatus* -Stämme

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Stamm Hintergrund	Referenz
D141	<i>Aspergillus fumigatus</i> Wildtyp-Stamm		(Reichard <i>et al.</i> , 1990)
ATCC 46645	<i>Aspergillus fumigatus</i> Wildtyp-Stamm		(Hearn und Mackenzie, 1980)
AfS12	<i>pabaA</i> -Deletion (<i>pabaA::loxP</i>)	D141	(Krappmann <i>et al.</i> , 2005)
AfS27	<i>cpcC</i> -Deletion (<i>cpcC::loxP</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	(Sasse <i>et al.</i> , 2008)
AfS35	<i>akuA</i> -Deletion (<i>akuA::loxP</i>)	D141	(Krappmann <i>et al.</i> , 2006)
AfS37	<i>ifkB</i> -Deletion (<i>ifkB::loxP</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	(Sasse <i>et al.</i> , 2008)
AfS38	<i>cpcC</i> - und <i>ifkB</i> -Deletion (<i>cpcC::loxP</i> ; <i>ifkB::loxP</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	Anette Schedler, persönliche Mitteilung
AfS57	<i>aroC</i> -Deletion (<i>aroC::loxP-phleo/tk</i>)	D141	(Hamer, 2008)
AfS58	<i>trpA</i> -Deletion (<i>trpA::loxP-phleo/tk</i>)	D141	(Hamer, 2008)
AfS61	<i>prtT</i> -Deletion (<i>prtT::loxP-Phleo^R-loxP</i>)	ATCC	diese Arbeit
AfS62	<i>prtT</i> -Komplementation (<i>prtT</i> < <i>ptrA</i> >)	ATCC	diese Arbeit
AfB23	<i>gfp</i> -Reporterstamm (<i>^pprtT::^pprtT-gfp-trpC^t;ptrA;ΔifkB</i>)	AfS37	diese Arbeit
AfB24	<i>gfp</i> -Reporterstamm (<i>^pprtT::^pprtT-gfp-trpC^t;ptrA;ΔcpcC</i>)	AfS27	diese Arbeit
AfB26	<i>gfp</i> -Reporterstamm (<i>^pprtT::^pprtT-gfp-trpC^t;ptrA</i>)	ATCC	diese Arbeit
AfB27	<i>gfp</i> -Reporterstamm (<i>^pprtT::^pprtT-gfp-trpC^t;ptrA;ΔcpcC;ΔifkB</i>)	AfS38	diese Arbeit
AfB29	Δ <i>trpA</i> nach Marker-Exzision (<i>trpA::loxP</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	diese Arbeit
AfB30	Δ <i>trpA</i> Komplementation (<i>trpA</i> *Nukl.-72 C \rightarrow g; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	diese Arbeit
AfB31	Δ <i>aroC</i> nach Marker-Exzision (<i>aroC::loxP</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	diese Arbeit
AfB32	Δ <i>aroC</i> Komplementation (<i>aroC</i> *Nukl.-41 A \rightarrow t; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	diese Arbeit
AfB33	Tet-on- <i>aroB</i> (<i>aroB::TetO7-aroB</i> ; Δ <i>akuA</i>)	AfS35	diese Arbeit

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

3.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde in Luria-Bertani-Vollmedium (LB: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) bei 37°C kultiviert. Für die Selektivmedien wurden die Antibiotika Ampicillin (Endkonzentration: 100 μ g/ml), Kanamycin (Endkonzentration: 50 μ g/ml), Doxycyclin (Endkonzentration: 10 μ g/ml) oder Tetracyclin (Endkonzentration: 100 μ g/ml) eingesetzt. Festmedien enthielten 2% Agar. SOB- und SOC-Medium für die Präparation und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurden nach Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm gegen Wasser verfolgt. Dabei entspricht eine OD_{595nm} = 1 einer Zelldichte von ca. 2·10⁸ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986).

3.2.1.2 Kultivierung von *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus -Stämme wurden in sterilem Minimalmedium (1% (w/v) Glukose, 1x AspA (70 mM NaNO₃, 7 mM KCl, 11,2 mM KH₂PO₄, pH 5,5), 2 mM MgSO₄, 1x Spurenelemente (76 μ M ZnSO₄, 178 μ M H₃BO₃, 25 μ M MnCl₂, 18 μ M FeSO₄, 7,1 μ M CoCl₂, 6,4 μ M CuSO₄, 6,2 μ M Na₂MoO₄, 174 μ M EDTA)) (Bennett und Lasure, 1991) kultiviert. Für die Selektion durch Resistenzmarker wurden die Antibiotika Pyriithiamin (Endkonzentration 100 ng/ml) oder Phleomycin (Endkonzentration: 20 μ g/ml) hinzugesetzt. Alle Medien wurden vor der Inokulation autoklaviert. Feste Medien wurden durch Zugabe von 2% Agar hergestellt. Für die Anzucht vegetativen Myzels wurde Flüssigmedium mit 10⁶ bis 10⁷ Sporen inokuliert und 12 bis 18 h bei 37°C angezogen. Das vegetative Myzel wurde mit Hilfe von sterilen Miracloth-Filtern von dem Flüssigmedium getrennt und mit Saline (0,96% NaCl) gewaschen, um gereinigtes Myzel für weitere Methoden zu erhalten.

Für die Isolierung genomischer DNA wurden die *A. fumigatus*-Stämme in Vollmedium (1% Glukose, 1xAspA (70 mM NaNO₃, 7 mM KCl, 11,2 mM KH₂PO₄, pH 5,5), 2 mM MgSO₄, 0,1% Hefeextrakt, 0,1% Kasaminosäuren, 0,2% Pepton, 1x Spurenelemente (s.o.)) angezogen.

Für das Wachstum auf alternativen Stickstoffquellen wurde das Minimalmedium folgendermaßen modifiziert: Minimalmedium ohne primäre Stickstoffquelle (1% Glukose,

Aspergillus-Salzlösung (7 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 11,2 mM KH₂PO₄), 1x Spurenelemente, pH 6,5), 0.1 mM Ammonium-Tartrat und eine der folgenden Stickstoffquellen: 0,4% BSA, 0,4% Kasein oder 0,1% Pepton.

Für das Wachstum auxotropher Stämme hinsichtlich der aromatischen Aminosäuren mussten die entsprechenden Aminosäuren dem Medium zugefügt werden: *p*-Aminobenzoesäure (PABA) (5 µM), Tyrosin (4 mM), Phenylalanin (4 mM) und Tryptophan (4 mM).

Lungenagar wurde folgendermaßen hergestellt: frisches, bzw. durch Lagerung bei -20°C konserviertes Lungenmaterial vom Schwein wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen und ein Volumen von 10 ml in ein 50 ml Falcon abgefüllt. Es wurden 10 ml sterile Saline zugegeben, sodass nach kurzer Inkubation bei 50°C und wiederholtem Mischen eine Suspension entstand. Zu diesem Gemisch wurden 30 ml Wasseragar (2%) gegeben, vorsichtig geschwenkt und auf zwei bereits erkaltete Wasseragarplatten als zweite Schicht gegossen. Um das Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, die sich bereits in dem nicht-sterilen Lungengewebe befanden, wurde Tetracyclin (10µg/ml) zu dem Saline/Lungengemisch gegeben. Für das Wachstum der Tet-on-*aroB* Mutante wurde statt Tetracyclin Chloramphenicol (10µg/ml) verwendet, da Tetracyclin das Tet-on-System induziert, was somit zu einem verfälschten Ergebnis führen würde. Weitere Zusätze wie Aminosäuren wurden in oben beschriebener Konzentration zur pulverisierten Lunge gegeben und dementsprechend weniger Saline für die Suspension eingesetzt.

Um den Resistenzmarker der Deletionsstämme zu entfernen, waren die Deletionskassetten flankiert durch *loxP*-Regionen. Nach einer zweiten Transformationsrunde mit pSK215 und Selektion auf Medium mit Nitrat wurde eine vorübergehende Expression der *Cre*-Rekombinase ausgelöst, die die *loxP*-Regionen erkennt und rekombiniert. Durch Rekombination der *loxP*-Stellen konnte der Bereich innerhalb der *loxP*-Stellen ausgeschnitten werden, sodass der Resistenzmarker für weitere Transformationen zur Verfügung stand (Krappmann *et al.*, 2005). Die Primärtransformanten wurden anschließend auf Agarplatten mit FUDR (5-Fluorodesoxyuridin, 20µM) selektiert, da erfolgreiche Exzision des Markers zu einer geringeren FUDR-Sensitivität führt.

3.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.2.1 MACHERY & NAGEL Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparationen

E. coli-Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in 5 ml Selektivmedium auf einem Rotationsschüttler kultiviert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 15-50 µl NE-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) bzw. dH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2 Isolierung von DNA aus *A. fumigatus* (Kolar *et al.*, 1988)

Zur Gewinnung der DNA aus *A. fumigatus* wurde Myzel aus frischen Sporen über Nacht bei 37°C in flüssigem Minimalmedium unter Schütteln angezogen, dieses durch sterilen Miracloth filtriert und mit 0,96% -iger NaCl-Lösung oder sterilem Wasser gewaschen.

Alternativ wurde das vegetative Myzel mit Hilfe von IsoporeTM Membran Filter (0,4µm HTPP, MILLIPORE) angezogen: die *A. fumigatus*-Sporen wurden direkt auf der Membran inokuliert, welche zuvor auf entsprechende Agarplatten gelegt worden war. Zum Ernten des Myzels wurde das auf der Membran gewachsene Myzel mit 0,96% -iger NaCl-Lösung oder sterilem Wasser gewaschen.

Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mörser zerrieben. Im Verhältnis 1:1 wurde das nun pulverförmige aufgeschlossene Myzel mit 0,8 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol) gemischt und für mindestens 1 Stunde bei 65°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,8 ml TE-gesättigtem Chloroform/Phenol (1:1). Die Suspension wurde durchmischt und 30 Minuten bei 13.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen NaOAc (pH 4,8) und 0,8 Volumen Isopropanol gefällt und bei 13.000 g 2 Minuten zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70% -igem Ethanol gewaschen und in 100-150 µl EB-Puffer aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurde der Ansatz 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl RNase (20mg/ml) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 37°C zur Aktivierung der RNase inkubiert. Die erhaltene genomische DNA wurde bei 8°C aufbewahrt.

Für die DNA Isolierung aus homogenisiertem Mauslungengewebe wurde das „DNeasy blood and tissue kit“ von QUIAGEN verwendet

3.2.2.3 Isolierung von RNA aus *A. fumigatus*

Für die Isolierung von RNA aus *A. fumigatus* wurde Myzel aus frischen Sporen über Nacht bei 37°C in flüssigem Minimalmedium unter Schütteln angezogen, durch Filtrieren mit Hilfe von sterilem Miracloth vom Medium getrennt und mit 0,96% -iger NaCl-Lösung oder sterilem Wasser gewaschen. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mörser zerrieben. Im Verhältnis 1:2 wurde das nun pulverförmige aufgeschlossene Myzel mit „TRIzol® reagent“ (INVITROGEN) in einem 10 ml Falcon kräftig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. 800 µl des Gemischs wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß zusammen mit 160 µl Chloroform gegeben und erneut gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben 15 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert und 200 µl des Überstandes in einem RNase freien 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 240 µl Isopropanol gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C wurde das Pellet zweimal mit 70% EtOH für je 5 Minuten unter ständigem schütteln bei RT gewaschen und anschließend 5 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets bei 37°C für 15 min wurde es in 100 µl RNase freiem Wasser etwa 10 Minuten bei RT gelöst und die RNA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.4 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung

Die isolierte RNA wurde nach den Angaben des Herstellers mit RNase-freier DNase von NEB behandelt: das Gesamtvolumen von 100 µl enthielt 10 µl DNaseI, 10 µl Puffer und 10 µl RNA. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die RNA direkt mit dem „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die Qualität spektrophotometrisch mit Hilfe des „Nanodrop 1000“ (PEQLAB) überprüft.

3.2.2.5 Reverse Transkription von RNA

Um die zuvor mit DNaseI behandelte RNA in cDNA umzuschreiben wurde der „SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR“ von INVITROGEN gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.2.6 Realtime-PCR

Um Transkriptlevel zu quantifizieren, wurde „quantitative Realtime PCR“ (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde der Thermocycler „CFX96“ von BIORAD und der iQ™ SYBR® Green Supermix von BIORAD nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR wurde in einer 96-well PCR Platte (weiß, BIORAD) durchgeführt, die mit dem „Microseal B film“ von

BIORAD verschlossen wurde. Pro Ansatz wurde ein Volumen von 25 µl gewählt, das eine 1:40 Verdünnung der zuvor umgeschriebenen cDNA als Matrize, 100 nM pro Primer und eine 1:2 Verdünnung des iQTM SYBR[®] Green Supermix enthielt. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms „Primer3Plus“ (Untergasser *et al.*, 2007) ausgewählt und auf ihre Eignung überprüft. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ihr Produkt 100-200 bp umfasste. Das „2-step“ qRT-PCR Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: 10-minütige Inkubation bei 95°C, 45 Zyklen von 10 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C. Nach jedem Elongationsschritt wurde die Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen. Die Schmelzkurve der einzelnen Endprodukte wurde durch Erhitzen auf 95°C für 10 Sekunden, Herunterkühlen auf 65°C und schrittweises Erhitzen auf 95°C in 0,5°C Schritten ermittelt. Alle Proben wurden in technischen Triplikaten gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe der „CFX-Manager Software“ von BIORAD ausgewertet und basierend auf der $\Delta\Delta C_t$ Methode quantifiziert (Aarskog und Vedeler, 2000; Pfaffl, 2001).

Für die qRT-PCR bezüglich der Transkripte verschiedener sekretierter Proteasen wurde abweichend vom oben beschriebenen Protokoll ein MyiQ iCycler von BIORAD verwendet. Zudem setzten sich die einzelnen Reaktionsansätze aus 0,3 µl cDNA und 1pmol pro Primer zusammen. Das qRT-PCR Programm bestand aus folgenden Schritten: 3-minütige Inkubation bei 95°C, 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C und 15 Sekunden bei 60°C mit anschließender Elongation für 25 Sekunden bei 72°C.

3.2.3 Klonierungstechniken

3.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden mit den thermostabilen Enzymen *Taq*-Polymerase (FERMENTAS), *Paq*-Polymerase (STRATAGENE) und *Phusion*-Polymerase (FINNZYMES) durchgeführt. Es wurden 5-50 pmol Primer-Oligonukleotid und 10-100 ng DNA als Matrize in 20-50 µl Reaktionspuffer entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich nach den Angaben der Hersteller, den verwendeten Oligonukleotiden und der Matrizen-DNA. Fusions-PCR wurde durchgeführt wie bei Szewczyk *et al.* (2006) beschrieben.

3.2.3.2 Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 0.5 µg DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym (FERMENTAS oder NEB) in einem Volumen von 20 µl bei spezifischer

Temperatur nach Angaben des Herstellers für 2-3 h bzw. über Nacht inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen an DNA wurden entsprechend größere Volumina und Enzymmengen eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Gegebenenfalls wurden Restriktionsansätze über eine Säule des Gelextraktionssystems „NucleoSpin Extrakt II“ (MACHERY & NAGEL) gereinigt.

3.2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur DNA-Lösung wurde ein entsprechendes Volumen der „6x Loading Dye Solution“ von FERMENTAS gegeben und die DNA-Fragmente in einem 1% -igen horizontalen Agarosegel in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) bei 80-90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend für 15-20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und die DNA-Banden mittels eines UV-Transilluminators bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ detektiert.

3.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

DNA-Banden wurden unter UV-Licht niedriger Energie ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden die Säulen und Puffer des Gelextraktionssystems „NucleoSpin Extrakt II“ (MACHERY & NAGEL, Düren, D) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Zur Elution der DNA wurden 50 μl dH₂O verwendet. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.3.5 Dephosphorylierung von DNA

Für die Dephosphorylierung wurden linearisierte DNA-Fragmente jeweils mit 10 U Shrimp-alkalischer-Phosphatase der ROCHE GMBH im dafür vorgesehenen Puffer bei 37°C 1-3 h inkubiert. Durch Erhitzen auf 65°C wurde die Reaktion gestoppt.

3.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Lineare DNA-Fragmente wurden in einem 20 μl Reaktionsgemisch aus Ligationspuffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,6 mM ATP, pH 7,6), 5 U T4-DNA-Ligase und DNA-Lösung über Nacht bei 16°C oder 4 h bei 20°C inkubiert. Die Konzentration der DNA betrug 1-10 $\mu\text{g/ml}$, das molare Verhältnis Vektor/Insert-DNA lag zwischen 1:5 und 1:10. Die Reaktion wurde durch 10-15-minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Die DNA wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation eingesetzt.

3.2.3.7 GENEART[®] Seamless Cloning and Assembling Kit

Das Plasmid pAB29 wurde mit Hilfe des Seamless Cloning Kits von INVITROGEN nach Angaben des Herstellers konstruiert (Vgl. 3.2.11.8).

3.2.3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde bei der GATC BIOTECH AG (Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der „Lasergene Biocomputing Software“ von DNAS[®] vorgenommen.

3.2.4 Transformationsmethoden

3.2.4.1 Transformation von *E. coli* (nach Mandel und Higa, 1970)

In einem 1 l-Kolben wurden 250 ml SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) beimpft und bei 18°C unter leichtem Schütteln für ca. 24 h inkubiert, bis eine OD₅₉₅ von 0,6 erreicht war. Zum Ernten wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 3000 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7) resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Im Anschluß wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert, bevor der Ansatz mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% versetzt wurde. Nach vorsichtigem Durchmischen folgte ein weiterer 10-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Abschließend wurde der Ansatz aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen, kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu je 200 µl der Zellen wurden 1-5 µl DNA hinzugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden und die Abkühlung der Zellen für 5 Minuten auf Eis. Dem Ansatz wurden 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium mit 20 mM Glukose) zugefügt. Es folgte 1 h Inkubation bei 37°C. Danach wurde der Ansatz auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4.2 Transformation von *A. fumigatus* (nach Punt und van den Hondel, 1992)

Über Nacht bei 37°C in Flüssigkultur angezogenes Myzel von *A. fumigatus* wurde mit Hilfe eines sterilen Miraclothfilters gesammelt und mit Citratpuffer (580 mM NaCl, 150 mM KCl, 50 mM Na-Citrat, pH 5,5) gewaschen. Das Myzel wurde in einem sterilen Kolben in Citratpuffer (20 ml/g Myzel) mit 1 mg/ml Lysozym und der gleichen Menge β-D-Glucanase

(Panzym-FinoG) resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 30°C ca. 1,5 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bildung der Protoplasten wurde mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Nach 1h bis 1,5 h wurde die Suspension durch einen Miraclothfilter gegeben, wobei die gebildeten Protoplasten den Filter passieren und so vom restlichen Zellmaterial getrennt werden konnten. Die Protoplasten wurden dann mit osmotisch stabilisiertem Puffer STC1700 (1,2 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6,5) versetzt, bei 1200 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und einmal mit STC1700 gewaschen. Die Protoplasten wurden in STC1700 resuspendiert, so dass eine Endkonzentration von etwa 10⁷ Protoplasten/ml erhalten wurde. Zur Transformation wurden 10 µg DNA mit 150 µl Protoplastenlösung 25 Minuten über Eis inkubiert, um dann sukzessiv mit 250 µl, 250 µl und 850 µl PEG4000-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 6,5, 50 mM CaCl₂, 60% PEG 4000) versetzt zu werden. Darauf folgte eine weitere 20-minütige Inkubation über Eis. Die Suspension wurde mit 10 ml STC1700 verdünnt und die Protoplasten bei 1200 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl STC1700 resuspendiert und in flüssigem Top-Agar (0,7% Minimalmedium mit 1,2 M Sorbitol) aufgenommen und dann auf selektives Minimalmedium mit 1,2 M Sorbitol gebracht. Für die Generierung von auxotrophen Mutanten wurden die entsprechend benötigten Substanzen dem Sorbitol-Minimalmedium zugesetzt.

Die Platten wurden für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend von den erhaltenen Transformanten Sporen für Vereinzelausstriche entnommen.

3.2.5 Southern-Hybridisierungstechnik

3.2.5.1 Herstellung der Sonden-DNA

Zur Herstellung der Sonden-DNA wurden das „Alk Phos Direct labelling kit“ der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES, (Freiburg) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die benötigte DNA wurde als PCR-Amplifikat oder nach Fragment-Isolierung aus Plasmidvektoren eingesetzt.

3.2.5.2 Southern-Hybridisierung (nach Southern, 1975)

Für die Southern-Hybridisierung wurden ca. 10 µg chromosomaler DNA 16 h mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Die Fragmente wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, welches anschließend für 10 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt wurde (Depurination). Denaturiert wurde das Gel in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl für 25 Minuten und letztendlich neutralisiert für 30 Minuten in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris (pH 7,4). Die DNA

wurde nun durch einen Kapillarblot (mindestens 2,5 h) auf eine Nylonmembran Hybond-N⁺ der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES (Freiburg) transferiert. Anschließend wurde die Membran für 2 Minuten in 2xSSC gewaschen und für etwa 10 Minuten bei 75°C getrocknet. Durch 5-minütige UV-Bestrahlung (254 nm) wurde die DNA kovalent auf der Membran gebunden. Die Membran wurde mit 15 ml Prähybridisierungspuffer (4% „blocking reagent“, 0,5 M NaCl, Hybridisierungspuffer) mindestens 30 Minuten bei 55°C in einem Hybridisierungsröhrchen prä-hybridisiert, bevor die DNA-Sonde in den Prähybridisierungspuffer zugegeben und die Hybridisierung bei 55°C über Nacht erfolgte. Nach zweimaligem Waschen für 10 Minuten bei 55°C mit Waschpuffer I (2 M Urea, 50 mM SDS, 50 mM NaPhosphat (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2% „blocking reagent“) erfolgte erneutes Waschen mit Waschpuffer II (Tris Base 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 10, MgCl₂ 2 mM) für 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend mit 2 ml „CDP Detection Reagent“ der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES (Freiburg) in Folie eingeschweißt und für 5 Minuten einmassiert. Für die Detektion wurde das „Detection Reagent“ abgossen, die Membran gut getrocknet und in Folie gelegt zum Exponieren mit Hilfe eines „FUJI medical X-Ray film“ der Firma FUJIFILM für 20-50 Minuten. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.2.6 Western-Hybridisierungstechnik

3.2.6.1 Herstellung von Protein-Rohextrakten

Zur Herstellung von Rohextrakten wurde *A. fumigatus* in flüssigem Minimalmedium mit Glukose über Nacht angezogen. Anschließend wurde das Myzel abfiltriert und nach Waschen mit Saline (NaCl 0,96%) in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml B⁺-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 20% Glycerin, 5mM EDTA, frischer Zugabe von 1/1000 vol 14 mM β-Mercaptoethanol und 1/25 vol. „Protease Inhibitor cocktail tablets“ (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) wurde das gemörserte Myzel auf Eis für ca. 1 min gevortext bis eine homologe Suspension entstand. Danach wurde das Gemisch für 10 min bei 4°C und 13000 upm zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Der Protein-Rohextrakt wurde bei -20°C oder -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Der Proteingehalt der Proteinlösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Proteinstandard bestimmt. 10 µl des Proteinextraktes wurden mit 300 µl Bradford-

Reagenz (Roti-Quant) der Firma ROTH (5% Ethanol, 10% H₃PO₄, 0,007% Serva Blue G) vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und mit einem BSA-Standard der Konzentrationen 1-10 µg/ml abgeglichen.

Alternativ konnte der Proteingehalt der Extrakte spektrophotometrisch mit Hilfe des „Nanodrop1000“ abgeglichen werden. Hierfür wurde als Probenart „Protein A280“ gewählt und die Proteinextrakte bei 280 nm gemessen. Deren Konzentrationen wurden durch die Software des Geräts automatisch mittels Extinktionskoeffizient von 6,7 (BSA) berechnet.

3.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Vertikalgelen. Diese Gele setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: dem 4% -igen Sammelgel (3,67 ml H₂O, 0,625 ml Tris (1 M, pH 6,8), 0,65 ml Rotiphorese®Gel (CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)) (30%), 50 µl SDS (10%), 25 µl 10% APS, 5 µl TEMED), welches zur Bandenschärfung dient, und dem Trenngel in 12% -iger Konzentration (2,1 ml H₂O, 3,75 ml Tris (1 M, pH 8,8), 4 ml Rotiphorese®Gel (30%), 100 µl SDS (10%), 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED) zur Auftrennung der Proteine im Gel. Zunächst wurde das Trenngel in eine im Gießstand vorbereitete Gelform gegossen, mit Isopropanol überschichtet und zur vollständigen Polymerisation mindestens 20 min stehen gelassen. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug ebenfalls mindestens 20 min. Nach vollständiger Verfestigung des Sammelgels konnte der Probenkamm entfernt werden. Die Proteinextrakte wurden unterdessen mit Probenpuffer (250 mM Tris-HCL (pH 6,8), 15% β-Mercaptoethanol, 30% Glycerol, 7% SDS, 0,3% Bromphenolblau) versehen, für 15 Minuten auf 65°C erhitzt und konnten dann ebenso wie der Protein-Größenstandard („Page Ruler Prestained Protein Ladder“ von MBI FERMENTAS) aufgetragen werden. Die Auftrennung der Proben erfolgte in Lämmli-Puffer (250 mM Tris-Base, 2,5 M Glycin, 1% SDS) bei einer Anfangsspannung von 100 V für etwa 15 min und dann, abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins, für 30 bis 45 min bei 200 V.

3.2.6.4 Western-Hybridisierungsanalyse

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran wurde durch Semi-dry-Elektroblotting für 1 h bei 350 mA in einer „Semi-dry Trans-Blot“-Apparatur von BIO-RAD mit Transfer-Puffer (25 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,02% SDS,

frische Zugabe von 20% Methanol) durchgeführt. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran 2 min in PonceauS-Lösung (0,2% PonceauS, 3% TCA) gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurde die Membran 1 h in TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05% Tween-20) mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Die darauf folgende Inkubation mit dem polyklonalen mouse-anti-GFP-Antikörper (1:2000) in TBST mit 5% Milchpulver wurde für 1h bei Raumtemperatur durchgeführt. Ungebundene GFP-Antikörper wurden durch zwei-maliges, insgesamt 10-minütiges Waschen in TBST entfernt. Danach erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten rabbit-anti-mouse Antikörper (1:1000). Nach mehrmaligem Waschen für insgesamt 5 Minuten wurden die Signale mit der ECL-Methode (Tesfaigzi *et al.*, 1994) visualisiert. Dazu wurden Luminol-Lösung (2,5 mM Luminol, 90 μ M Paracuomarat, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) und Wasserstoffperoxid-Lösung (5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) einzeln angesetzt, vereinigt und dann auf die Membran gegeben. Nach Inkubation von 2 min wurde ein „FUJI medical X-Ray film“ der Firma FUJIFILM auf die Membran gelegt und für 1 bis 10 Sekunden, je nach Signalstärke, exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.2.7 Mikroskopieren von *Aspergillus fumigatus*

3.2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Auf einem Deckgläschen der Firma MENZEL wurden 0,5 ml Flüssigminimalmedium (mit und ohne Ammonium-Tartrat, dann aber mit Rinderserumalbumin (BSA, 0,4%, Albumin Fraktion V, ROTH) als Stickstoffquelle verteilt und ca. 2000 Sporen des entsprechenden *A. fumigatus*-Stammes über Nacht bei 37°C angezogen. Am folgenden Tag wurde das Deckgläschen auf einen Objektträger der gleichen Firma gebracht und mit Nagellack fixiert. Anschließend wurde das ausgekeimte Myzel mit einem Leica AF6000-Mikroskop (DMI 6000) untersucht und mit einer Leica-Kamera (DFC 360 DFX) photographiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: 63x Optischer Zoom (Objektiv: HCX PL APO 63x1,4 OIL), Belichtungszeit 82 ms (DIC) bzw. 1,4 s (GFP-Filter).

3.2.7.2 Live-Imaging Mikroskopie

Zur Untersuchung der Keimungsrate wurden ca. 2000 Sporen des entsprechenden *A. fumigatus*-Stammes in 300-500 μ l Flüssigminimalmedium verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur zum Anschwellen der Sporen inkubiert. Anschließend wurde deren Auskeimen für 2-8 Stunden in einer Inkubationskammer bei 37°C am Live-Imaging

Mikroskop verfolgt (Leica AF6000-Mikroskop, DMI 6000) untersucht und mit einer Leica-Kamera (DFC 360 DFX) photographiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: 40x Optischer Zoom (Objektiv: HCX PL FLUOTAR L40x0,6 DRY), Belichtungszeit 21 ms (DIC), 4 Bilder/h.

3.2.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.2.8.1 Bestimmung der extrazellulären proteolytischen Aktivität

Die Überstände der entsprechenden *Aspergillus fumigatus*-Stämme wurden mit Hilfe von Miracloth-Filtergewebe (MERCK) vom Myzel getrennt und auf Eis gekühlt. Um deren proteolytische Aktivität zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Tests ausgewählt, ein qualitativer Test basierend auf Verdau der Gelatineschicht eines unentwickelten Röntgenfilms (Cheung *et al.*, 1991), und eine quantitative Messung der Hydrolyse eines an Azo-Farbstoff gekoppelten Kollagens, durch die sekretierten Proteasen in den entsprechenden Überständen (Chavira *et al.*, 1984; Jiang, 2007).

3.2.9 Tiermodelle der Aspergillose

3.2.9.1 Neutropenisches Mausmodell der pulmonalen Aspergillose

Für Tierexperimente wurden männliche Mäuse (Outbred, Stamm CD1, 20 bis 28 g; Charles Rivers Breeders) verwendet. Immunsuppression wurde ausgelöst durch subkutane Injektion von 112 mg/kg Hydrokortisonacetat und intraperitonealer Injektion von 150 mg/kg Cyclophosphamid wie bei Smith *et al.* (1994) beschrieben. Durch Zugabe von 1 g/l Tetracyclin und 64 mg/l Ciproxacin zum Trinkwasser wurden bakterielle Infektionen verhindert. *Aspergillus*-Sporen wurden nach fünftägigem Wachstum auf Festmedium geerntet, durch Miracloth Filtergewebe (CALBIOCHEM) filtriert und anschließend mit Saline gewaschen. Durch Inhalation von Isofluran wurden die Mäuse anästhesiert und durch intranasales Einflößen von 3×10^4 Sporen in 40 μ l Saline infiziert. Das Gewicht der infizierten Tiere wurde 4 Tage lang zweimal täglich kontrolliert, bis die Lungen entnommen wurden um von je 250 mg homogenisiertem Lungenmaterial genomische DNA von *A. fumigatus* herzustellen (Bowman *et al.*, 2001; Sheppard *et al.*, 2006). Um die Belastung der Lungen durch Konidiosporen quantitativ zu bestimmen, wurden von gleichen Mengen (100 ng) isolierter genomischer DNA qPCRs durchgeführt. Um dabei den 18S rRNA-Lokus des *A. fumigatus*-Genoms zu amplifizieren, wurden die Oligonukleotide qPCRf und qPCRr verwendet.

3.2.9.2 Virulenzmodell in der Wachsmottenlarve *Galleria mellonella*

Mit Hilfe des Insektenmodells der großen Wachsmottenlarve *Galleria mellonella* (Cotter *et al.*, 2000; Kavanagh und Reeves, 2004; Maerker *et al.*, 2005) wurde die Virulenz verschiedener *A. fumigatus*-Mutanten getestet. Die ausgelösten Wachsmottenlarven wurden bezogen von FAUNA TOPICS GMBH (Marbach/Neckar-Rielingshausen) und bis zur Infektion bei etwa 20°C gelagert.

Es wurden je 15 Larven pro Stamm mit 1×10^6 bzw. 3×10^6 Sporen in 20 µl Saline mit 10 µg/ml Rifampizin (zur Vermeidung von bakterieller Infektion) infiziert und bei 30°C für 7 Tage inkubiert. Die Infektion erfolgte durch Injektion durch das letzte Pseudopodium in das Haemocoel der Larven. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe Larven nur Saline mit Rifampicin injiziert um auszuschließen, dass die Injektionslösung einen Einfluss auf das Überleben der Tiere hat. Auch wurde eine Gruppe unbehandelter Tiere beobachtet um bereits vorhandene Infektionen oder einen Einfluss der Umgebungstemperatur auszuschließen. Die Überlebensrate der Tiere wurde nach der Infektion über einen Zeitraum von 7 Tagen protokolliert und unter Zuhilfenahme von geeigneten Kontrollen ausgewertet.

3.2.10 Herstellung rekombinanter Plasmide

3.2.10.1 Generierung einer *prtT*-Deletionskassette

Die *prtT*-Deletionskassette wurde nach der Methode von Kämper (2004) konstruiert. Mit den Primern AB17 und AB20 wurden 2,3 kb des 5'-flankierenden Bereichs des Ziellokus' amplifiziert und mit Hilfe der Primer AB18 und AB19 1,6 kb der 3'-flankierenden Region. Nach *Sfi*I-Verdau wurden die Fragmente zusammen mit der *Sfi*I-flankierten Phleomycin-Resistenzkassette (2,9 kb) aus pSK341 ligiert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 integriert. Aus dem resultierenden Plasmid pSK462 wurde durch Verdau mit *Pme*I die 6,8 kb große Deletionskassette herausgeschnitten und durch doppeltes *crossing over* homolog in den *A. fumigatus*-Stamm ATCC 46645 integriert.

3.2.10.2 Generierung einer *prtT*-Komplementationskassette

Mit Hilfe der Primer AB17 und AB18 wurden 6,7 kb der kodierenden Sequenz des *prtT* amplifiziert und in den Vektor pJET1.2 integriert. Mit den Primern Sv551 und Sv556 wurde die Pyriithiamin-Resistenzkassette (2 kb) aus dem Plasmid pSK275 amplifiziert und über eine *Eco*RI-Restriktionsstelle hinter der *prtT*-kodierenden Sequenz eingefügt. Aus dem generierten Plasmid pSK463 konnte durch Verdau mit *Pme*I das Komplementations-Konstrukt (8,6 kb) isoliert werden.

3.2.10.3 Insertion der *prtT*- 5'UTR in den 5'TRU-Testvektor

Mit Hilfe der Primer AB52 und AB53 wurde ein Fragment (Nukleotide -1 bis -690) aus der 5'UTR des *prtT* amplifiziert und in den pJET-Vektor ligiert. Über die durch die Primer eingefügten *Bam*HI-Schnittstellen konnte der gesamte Bereich (0,69 kb) ausgeschnitten und in den Testvektor des 5'TRU inseriert werden.

3.2.10.4 Generierung einer *^pprtT-gfp-Reporterkassette*

Mit Hilfe der Primer AB60 und AB62 wurden 2,5 kb der *prtT* 5'UTR von genomischer DNA des *Aspergillus fumigatus*-Isolats ATCC 46645 amplifiziert. Das *gfp*-Gen wurde mit den Primern AB61 und AB64 mittels PCR aus dem Plasmid pSK392 generiert und das Amplifikat von 0,72 kb isoliert. Der außerdem benötigte *trpC*-Terminatorbereich wurde aus dem Plasmid pAN7-1 mit den Primern AB63 und AB65 amplifiziert. Da die Primer AB61 und AB63 einen 10 bp langen Überhang amplifizierten, der komplementär zu den entsprechend benachbarten Fragmenten ist, konnten die drei Fragmente nach Extraktion mittels Fusions-PCR (Szewczyk *et al.*, 2006) und den Primern AB60 und AB65 fusioniert werden. Nach Extraktion des 4 kb großen Amplifikats wurde das Fragment in den Vektor „TOPO-TA“ von INVITROGEN ligiert. Nach Überprüfung des so erhaltenen Plasmids pAB22A mittels Sequenzierung wurde ein *ptrA*-Marker in das Plasmid integriert. Das Markerfragment (2 kb) wurde mit den Primern Sv551 und Sv556 aus dem Plasmid pSK275 amplifiziert und über die *Not*I Restriktionsstelle in den Vektor pAB22A integriert. Das entstandene Plasmid pAB22 konnte nun über ein einfaches *crossing over* über den 5'-Bereich des *prt*-Gens homolog in verschiedene *A. fumigatus*-Stämme integriert werden.

3.2.10.5 Generierung der Δ *aroC*- und Δ *trpA*-Deletionskassetten

Beide Deletionskassetten wurden nach der Methode von Kämper (2004) konstruiert. Mit Hilfe der Primer Sv532/Sv534 bzw. Sv538/Sv540 wurden die 5' Bereiche (1,6 kb bzw. 1,8 kb) stromaufwärts der Gene *aroC* bzw. *trpA* amplifiziert. Die 3' Bereiche (1,4 kb bzw. 1,8 kb) wurden mit den Primern Sv535/Sv537 bzw. Sv541/Sv543 amplifiziert. Für beide Deletionskassetten wurde ein Phleomycin-Resistenzmarker (2,9 kb) verwendet, der durch Verdau mit *Fsp*I aus dem Plasmid pSK341 ausgeschnitten wurde. Nach Verdau des Markerfragments mit *Sfi*I wurde es zusammen mit den zuvor mit *Sfi*I verdauten 3'- und 5'-flankierenden Bereichen ligiert. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurde der 1:10 verdünnte Ligationsansatz als Matrize einer nested PCR mit Hilfe der Primer Sv533/Sv536 bzw. Sv539/Sv542 verwendet und das Amplifikat nach Aufreinigung in den Vektor pJET1.2/blunt

ligiert. Das daraus resultierende Plasmid, welches die *aroC*-Deletionskassette enthält, wurde mit pSK444, das mit der *trpA*-Deletionskassette mit pSK445 bezeichnet (Hamer, 2008). Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *HpaI* konnte die 6,3 kb große Deletionskassette herausgeschnitten und nach Transformation über ein doppeltes *crossing over* homolog in den *A. fumigatus*-Stamm AfS35 integriert werden.

3.2.10.6 Generierung der Komplementationskassetten von Δ *aroC* und Δ *trpA*

Für die Herstellung der Komplementationskassetten wurden Primer gewählt, die jeweils eine Punktmutation in das Amplifikat einfügen sollten, dies waren AB74 und AB77 für die Δ *trpA*-Komplementation (*ctrpA*) und AB72 und AB73 für die Δ *aroC*-Komplementation (*caroC*). Auf diese Weise konnte der 5'UTR-Bereich (1,8 kb) mit den Primern Sv538/AB74 für die Δ *trpA*-Komplementation amplifiziert werden, wobei durch den Primer AB74 eine Punktmutation (Basenaustausch von Nucleotid -72, C→G) im Bereich einer *NaeI*-Schnittstelle entstand, woraufhin das Restriktionsenzym diesen Bereich nicht mehr als Schnittstelle erkennen konnte. Die kodierende Sequenz des Gens *trpA* und dessen 3'UTR-Bereich (3,7 kb) wurde mit den Primern Sv543/AB77 amplifiziert, wobei der Primer AB77 einen kleinen Teil des 5'UTR-Bereichs (93 Basen) amplifizierte und dieselbe Mutation einfügte wie der komplementäre Primer AB74. Somit entstand ein überlappender Bereich von 40 Basen, durch den mit Hilfe einer Fusions-PCR mit den Primern Sv539/Sv542 das gesamte Komplementationskonstrukt (5,4 kb) amplifiziert werden konnte. Auf die gleiche Art wurde das Komplementationskonstrukt für Δ *aroC* hergestellt, wobei der 5'UTR-Bereich (1,7 kb) mit den Primern Sv532/AB72, die kodierende Sequenz mit 3'UTR-Bereich (2,6 kb) und 30 Basen überlappendem 5'UTR-Bereich mit den Primern Sv537/AB73 amplifiziert wurde. Das gesamte Konstrukt (4 kb) wurde dann über Fusions-PCR mit den Primern Sv533/Sv536 generiert. In der 5'UTR von *aroC* ergab sich somit eine Punktmutation im Bereich einer *HindIII*-Restriktionsstelle (Basenaustausch von Nucleotid -41, A→T), woraufhin das Restriktionsenzym diesen Bereich nicht mehr als Schnittstelle erkennen konnte. Beide Konstrukte wurden in den pCR[®]-BluntII-TOPO[®]-Vektor ligiert und die durch die speziellen Primer eingefügten Punktmutationen mittels Sequenzierung kontrolliert. Durch die Amplifikation des *ctrpA*-Konstruktes mit den Primern Sv539/Sv542 wurden zwei *HpaI*-Restriktionsstellen erzeugt, über die das gesamte Konstrukt aus dem Vektor separiert und über ein doppeltes *crossing over* homolog über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche in den *trpA*-Deletionsstamm integriert werden konnte. Das Komplementations-Konstrukt für *aroC* wurde

mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Vektor geschnitten und ebenfalls homolog in die Δ *aroC*-Mutante integriert.

3.2.10.7 Generierung einer *aroM*-Deletionskassette

Die *aroM*-Deletions-Kassette wurde nach der Methode von Kämper (2004) konstruiert. Mit Hilfe der Primer Sv523/Sv524 bzw. Sv525/Sv526 wurden die flankierenden 5'UTR- und 3'UTR-Bereiche (je 1,7 kb) des *aroM*-Gens amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes D141. Es wurde ein Phleomycin-Resistenzmarker (2,9 kb) verwendet, der durch Verdau mit *FspI* aus dem Plasmid pSK341 ausgeschnitten und nach *SfiI*-Verdau zusammen mit den ebenfalls zuvor mit *SfiI* verdauten 3'-und 5'-flankierenden Bereichen ligiert wurde. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurde der 1:10 verdünnte Ligationsansatz als Matrize einer nested PCR mit Hilfe der Primer Sv527/Sv528 verwendet und das Amplifikat (6,3 kb) nach Aufreinigung in den Vektor pJET1.2/blunt ligiert. Das daraus resultierende Plasmid welches die *aroM*-Deletionskassette enthält wurde mit pSK443 bezeichnet (Hamer, 2008). Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII* konnte die 6,3 kb große Deletionskassette herausgeschnitten und über ein doppeltes *crossing over* homolog in den *A. fumigatus*-Stamm AfS35 integriert werden.

3.2.10.8 Generierung einer *aroB*-Deletionskassette

Mit den Primern AB67/AB81 bzw. AB70/AB82 wurden 2,3 kb der 5'UTR von *aroB* bzw. 2 kb der 3'UTR amplifiziert. Der 5,35 kb große β -rec/*six*-Marker (Hartmann *et al.*, 2010) wurde mit den Primern AB80/AB83 aus dem Plasmid pSK485 amplifiziert. Die Primer AB80/AB81 bzw. AB82/AB83 amplifizierten darüber hinaus Überhänge, die zueinander komplementär waren, sodass alle drei Fragmente mit Hilfe einer Fusions-PCR (Szewczyk *et al.*, 2006) durch die Primer AB78/AB79 fusioniert werden konnten. Das Amplifikat von 9,5 kb wurde anschließend in den Vektor pCR[®]-BluntII-TOPO[®] ligiert und das daraus resultierende Plasmid mit pAB28 bezeichnet. Die 9,5 kb große *aroB*-Deletionskassette konnte durch Restriktion von pAB28 mit *FspI* isoliert werden.

3.2.10.9 Generierung einer Tet-on-*aroB*-Kassette

Durch Restriktion von pJW121 mit *PmeI* und *AleI* wurde zunächst der *his2A*-Terminator entfernt, um stattdessen das *aroB*-Gen mit anschließender 3'UTR integrieren zu können. Dies erlaubte später eine homologe Rekombination der entsprechenden Position im Genom und nicht des *his2A*-Lokus. Die *upstream*- und *downstream*-Bereiche von *aroB* wurden mit den

Primern Sv790/Sv791, für den 5'UTR-Bereich (1,6 kb), und Sv792/794, für *aroB* mit 3'UTR-Bereich (1,7 kb), amplifiziert, wobei die Primer so gewählt worden waren, dass sie entsprechende homologe Überhänge amplifizierten, sodass alle Fragmente mit Hilfe des „seamless-cloning kits“ (INVITROGEN) in einem einzigen Ligationsschritt zu dem Plasmid pAB29 ligiert werden konnten. Die 7,3 kb große Tet-on-*aroB*-Kassette konnte anschließend mit dem Restriktionsenzym *HpaI* verdaut und über ein doppeltes *crossing over* homolog in den *A. fumigatus*-Stamm AfS35 integriert werden.

4. ERGEBNISSE

4.1 PrtT, ein Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität von *A. fumigatus*, trägt nicht zu dessen Virulenz bei

Die Virulenz von *A. fumigatus* basiert zum Teil auf seiner saprotrophen Lebensweise, die es dem Pilz ermöglicht organisches Material zu zersetzen, um benötigte Nährstoffe zu assimilieren. Für den Abbau eines proteinhaltigen Substrats ist die Sekretion von Proteasen unerlässlich und gehört daher zu einer der Grundvoraussetzungen des Saprophytismus. In *A. niger* reguliert der Transkriptionsfaktor PrtT die Expression verschiedener extrazellulärer Proteasen (Punt *et al.*, 2008). Da ein Beitrag der proteolytischen Aktivität von *A. fumigatus* zu dessen Virulenz umstritten ist, sollte der Einfluss eines PrtT-Orthologen in diesem Krankheitserreger auf seine Pathogenität untersucht werden.

4.1.1 Das *A. fumigatus*-Genom kodiert für ein Orthologes von PrtT

Um das *A. fumigatus*-Orthologe des *prtT*-Gens aus *A. niger* zu identifizieren, wurde die Datenbank CADRE verwendet (Mabey *et al.*, 2004). Eine BLAST-Suche mit der *A. niger* *prtT*-Gensequenz im *A. fumigatus*-Genom ergab einen automatisch annotierten Eintrag des Gens mit der Kennung AFUA_4G10120. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz zeigte eine hohe Konservierung dieses Genproduktes zu den PrtT-Faktoren aus *A. niger*, *A. oryzae*, *A. clavatus* und *Penicillium crysogenum* mit einer Homologie von 51% bis 81%. Die automatische Annotierung ergab ein Genprodukt von 696 Aminosäureresten mit einem schwach konservierten N-terminalen Bereich, basierend auf einem ungewöhnlich großen Intron von 386 Nukleotiden Länge. Um diese Region des *prtT*-Transkriptes genauer zu untersuchen, wurden diagnostische PCRs auf cDNA durchgeführt, wobei verschiedene spezifische Primerkombinationen eingesetzt wurden, mit denen der fragliche 5' Bereich amplifiziert werden konnte. Abbildung 5 zeigt, dass die Verwendung der Primer Sv589/AB51 zu einem 1,156 kb großen Amplifikat führt, wenn genomische DNA als Matrize eingesetzt wird. Dagegen führt die PCR mit den gleichen Primern bei der Verwendung von cDNA als Matrize zu einem Fragment von 1,039 kb und 1,156 kb. Das größere Amplifikat ist hierbei auf Verunreinigung mit genomischer DNA zurückzuführen. Die Differenz dieser beiden Fragmentgrößen beträgt jedoch 117 bp und entspricht damit exakt der Größe des zweiten annotierten Introns, was darauf hindeutet, dass der Bereich des ersten beschriebenen Introns auch nach erfolgter Prozessierung der Prä-mRNA vorhanden ist.

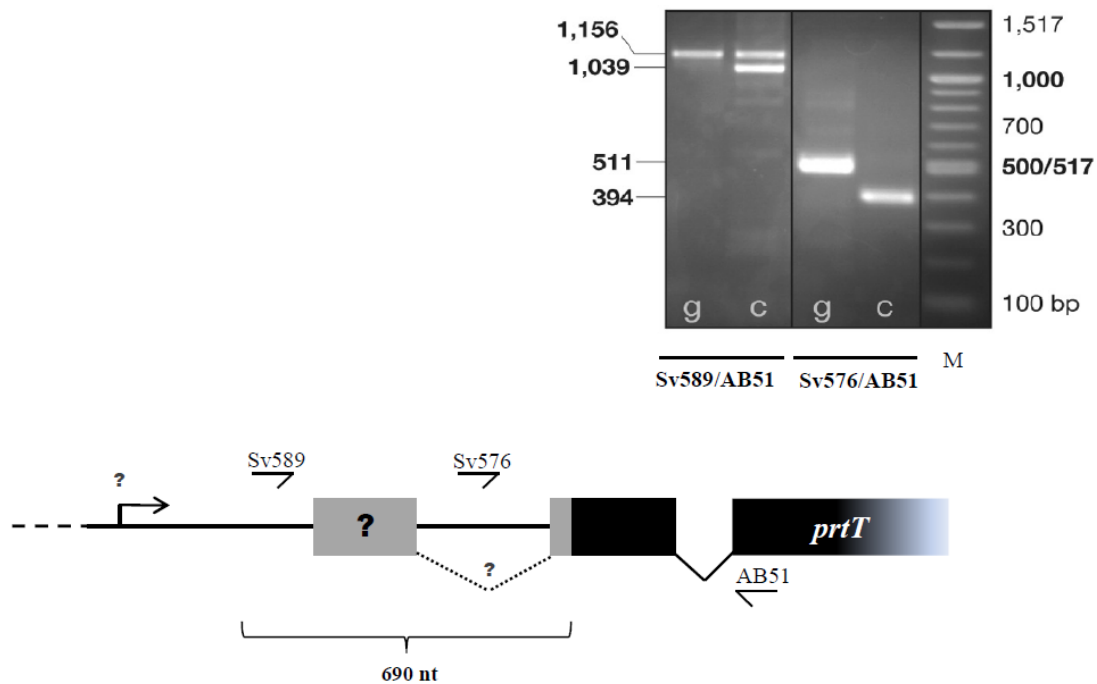


Abbildung 5: Diagnostische PCR der fraglichen Intronsequenz des *prtT*-Lokus. Das erste annotierte Intron (gestrichelte Linien) wurde durch diagnostische PCRs überprüft, mit denen die fragliche 5'-Region erfasst werden konnte. Das Ergebnis zeigt, dass der kodierenden Sequenz des *prtT* eine ungewöhnlich lange *leader*-Sequenz vorangeht. Der vermutete N-Terminus des Gens, welcher auf dem vermuteten Intron basiert, ist in grau dargestellt und die tatsächliche kodierende Sequenz in schwarz. Die verwendeten Oligonukleotide waren Sv589, Sv576 und AB51. Die Fragmentgrößen der Amplifikate von der genomischen DNA (g) beziehungsweise cDNA (c) sind angegeben. Als Größenstandard wurde ein 100-bp DNA Marker (M) verwendet. Das Ergebnis der diagnostischen PCRs war für den Stamm ATCC46645 und einen unabhängigen Stamm (D141) übereinstimmend (Daten nicht gezeigt). Das größere Amplifikat der Primerkombination Sv589/AB51 von der cDNA ist auf Kontamination mit gDNA zurückzuführen. Die aufgrund dieser Ergebnisse vermutete Position des translationellen Startkodons ist als Pfeil gekennzeichnet.

Amplifizierung mittels der Primer Sv576/AB51 bei Verwendung von cDNA führte zu einer Fragmentgröße von 394 bp, wohingegen die gleichen Primer ein Fragment von 511 bp von der genomischen DNA amplifizierten. Die Tatsache, dass die PCR mittels Sv576/AB51 bei Verwendung von cDNA überhaupt ein Produkt liefert, setzt voraus, dass der Primer Sv576 binden konnte. Da dieser Bereich jedoch als Intron-Sequenz beschrieben worden war, ließ das Ergebnis der diagnostischen PCRs darauf schließen, dass es sich hierbei um eine lange *leader*-Region von mindestens 690 Nukleotiden stromaufwärts des translationellen Startkodons des *prtT*-Transkriptes handelt. Außerdem wurde vermutet, dass eines der distalen AUG-Triplets als tatsächliches Startkodon für die Translation dient, wodurch sich eine enge Verwandtschaft des PrtT-Proteins zu den Orthologen in anderen *Aspergillus*-Spezies ergibt (Abb. 6). Hinsichtlich des Sequenzvergleichs scheint das PrtT aus *A. fumigatus* aus 613 Aminosäuren zu bestehen. Versuche, den genauen transkriptionellen Startpunkt durch sog.

5' rapid amplification of cDNA ends (5'RACE) zu bestimmen, scheiterten vermutlich aufgrund von ungenügender Expression des *prtT*-Gens.



Abbildung 6: Sequenzvergleich der PrtT-Sequenz von *Aspergillus fumigatus* mit Orthologen anderer Pilze: *A. fumigatus* (A.f.; Kennung XP_751814), *A. niger* (A.n.; Kennung XP_001402055), *A. oryzae* (A.o.; BAF74781), *A. clavatus* (A.c.; XP_001271888) und *P. crysogenum* (P.c.; CAP98521). Übereinstimmende Aminosäure-Reste sind in schwarz markiert, durch einen grauen Balken ist die Position der hoch konservierten Zn2Cys6 DNA-Bindedomäne gekennzeichnet.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *prtT*-Gens enthält eine DNA-Bindedomäne der Klasse der C6-Zink-Finger-Domäne, die unter den orthologen Genprodukten anderer Pilze (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *P. crysogenum*) hoch konserviert ist (Abb. 6). Abgesehen hiervon konnten keine speziellen Domänen mit spezifischer Funktion identifiziert werden. Trotzdem zeigt der Sequenzvergleich, dass zusätzlich zur C6-Zink-Finger-Domäne viele Sequenzabschnitte eine hohe Homologie innerhalb der PrtT-Orthologen der miteinander verglichenen Pilze aufweisen. Das Kladogramm in Abbildung 7 zeigt die Verwandtschaft der *prtT*-Genprodukte der in Abbildung 6 für den Sequenzvergleich verwendeten Pilze.

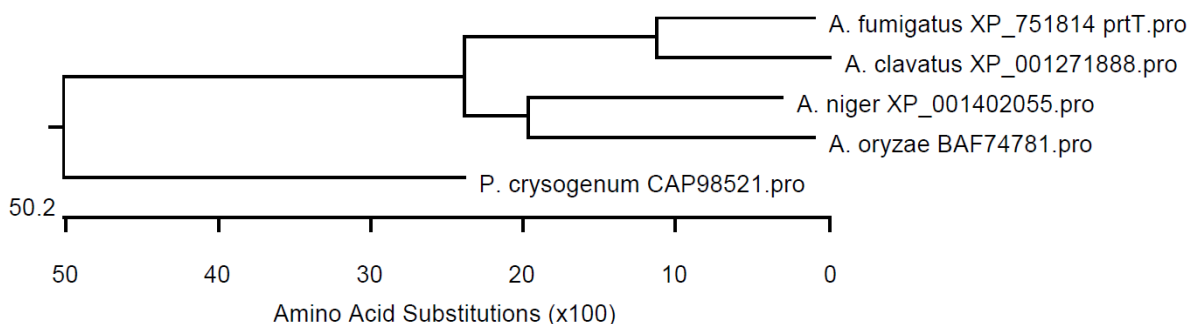


Abbildung 7: Kladogramm von PrtT-Orthologen. Mit Hilfe des Programms „MegAlign“ von „DNA-Star“ wurde die Konservierung der PrtT-Orthologe von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten nach der Methode „Clustal V“ dargestellt. Die X-Achse definiert den Austausch von Aminosäuren. Hierbei ist zu sehen, dass die PrtT-Orthologen aus *A. fumigatus* und *A. clavatus* näher miteinander verwandt sind, als die von *P. crysogenum* und *A. fumigatus*.

So scheint das PrtT-Orthologe von *A. fumigatus* näher mit dem aus *A. clavatus* und den beiden anderen *Aspergillus*-Arten verwandt zu sein, als mit dem von *P. crysogenum*. Insgesamt ist PrtT innerhalb dieser Arten jedoch hoch konserviert, wobei allerdings zu bemerken ist, dass in dem Modelorganismus *A. nidulans* kein Orthologes identifiziert werden konnte.

4.1.2 Die 5'UTR von *prtT* scheint translationell regulierende Funktion zu haben

Die bisherigen Ergebnisse lieferten Hinweise auf eine post-transkriptionelle Regulation von *prtT*, möglicherweise über die ungewöhnlich lange 5'-Region vor dem translationellen Startkodon des kodierenden Bereiches. Dementsprechend wurde die Möglichkeit einer Regulation über untranslatierte 5'-Regionen (5' untranslated regions, 5'UTRs) in Betracht gezogen, da grundsätzlich die Menge einer bestimmten mRNA in der Zelle nicht der Menge des gebildeten Proteins entsprechen muss und solche Unterschiede von mRNA- und Protein-Menge auf eine post-transkriptionelle Regulation hindeuten (Rachfall *et al.*, 2009). Derartige untranslatierten Bereiche können translationell regulative Elemente wie z. B. Haarnadelschleifen, stromaufwärtsgelegene offene Leseraster (uORFs) oder interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) beinhalten, die die Translation der kodierenden Sequenz regulieren. Um herauszufinden, ob der *leader*-Region des *prtT*-Gens eine regulierende Funktion zukommt, wurde die Methode des 5'TRU (translationally regulative 5'UTR) verwendet, die es ermöglicht, regulierende untranslatierte Regionen zu identifizieren (Rachfall *et al.*, 2009; Rachfall *et al.*, 2011). Das Testprinzip macht sich die Eigenschaft einiger Gene bzw. Proteine in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zunutze, deren Transkriptmenge unter Mangelbedingung reduziert bzw. basal ist, wohingegen die deren Translation deutlich ansteigt. Das Testsystem für die 5'UTRs besteht aus einem Vektor, der einen konstitutiven Promotor (*^pPGK1*) mit definiertem Transkriptionsstartpunkt (TSS) und konstant hohen Transkriptionsraten zusammen mit einem *lacZ*-Reporter gen beinhaltet (Abb. 8). Zwischen Promotor und *lacZ*-Startkodon wurde eine Restriktionsstelle eingefügt, die die Insertion der zu testenden 5'UTR erlaubt. Dieses Reporterplasmid, ein 2µm Hefe-*E. coli* shuttle-Vektor, kann nach Transformation in *S. cerevisiae* genutzt werden, um nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen die Aktivität der durch das *lacZ*-Reporter gen gebildete β-Galaktosidase zu bestimmen. Ein Beispiel hierfür sind durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) ausgelöste Mangelbedingungen, die einem Histidinmangel in der Zelle entsprechen. Dieser induziert die eIF2α-Kinase vermittelte zelluläre Stressantwort der *Cross-Pathway Control*. Dabei führt die Aktivierung der Gcn2p-Kinase zu einer erhöhten

Expressionsrate des Transkriptionsfaktors Gcn4p, auf dessen Transkript dem kodierenden Bereich eine lange *leader*-Sequenz mit vier uORFs vorgelagert ist (Hinnebusch, 2005). Hat nun eine in diesem System zu testende 5'UTR regulatorische Funktion auf die Translation seiner mRNA und wird diese durch eine eIF2 α -Kinase vermittelt, führt dies zu einer erhöhten Expression des Reportergens in Gegenwart des Antimetaboliten 3-AT (Rachfall *et al.*, 2009).

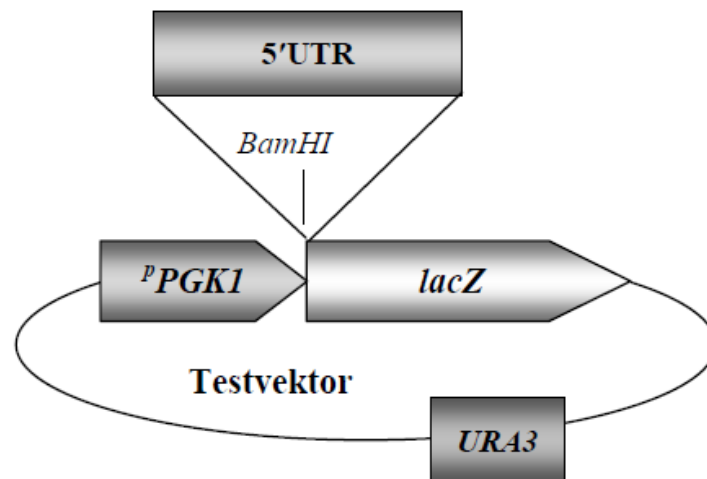


Abbildung 8: Testsystem für translationell regulierende 5'UTRs (nach Rachfall *et al.*, 2009). Der Testvektor besteht aus dem konstitutiven *PGK1*-Promotor, dem *lacZ*-Reportergen inklusive Startkodon und einem Selektionsmarker (*URA3*). Die *BamHI*-Restriktionsstelle erlaubt die Insertion einer zu untersuchenden 5'UTR. Nach Insertion der interessierenden 5'UTR kann ihr Effekt auf die Expression des *lacZ*-Reportergens untersucht werden.

Um dieses System für die Untersuchung der 5'UTR des *priT*-Gens nutzen zu können, wurde die postulierte 5'UTR des *priT*-Gens in den Testvektor des 5'TRU inseriert und die β -Galaktosidase-Aktivität in *S. cerevisiae*-Zellen bei An- bzw. Abwesenheit von 3-AT gemessen (Abb. 9). Zur Kontrolle wurde ein Reporterplasmid verwendet, in das die 5'UTR von *GCN4* kloniert worden war. Der zur Kontrolle des Testvektors verwendete *GCN4*-5'UTR-Reporterstamm zeigte wie erwartet unter Nichtmangelbedingung eine basale *lacZ*-Expression, die nach Zugabe von 3-AT dereprimiert wurde. Der Testvektor ohne 5'UTR zeigte keine Änderung der *lacZ*-Expression im Vergleich von Mangel- zu Nichtmangelbedingung, wodurch die Funktionalität des Testsystems bestätigt wurde. Bei der Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität unter der Kontrolle der 5'UTR des *priT*-Gens wurde eine deutlich niedrigere *lacZ*-Expression gemessen, wobei Nichtmangelbedingung zu einer geringeren β -Galaktosidase-Aktivität führte als unter Histidinmangel beobachtet werden konnte. Dies zeigt eine Reprimierung der *lacZ*-Expression unter Nichtmangelbedingung von

etwa 50%, genau wie bei dem zur Kontrolle verwendeten *GCN4*-5'UTR-Reporterstamm. Die 5'UTR des *prtT* wirkt sich also regulierend auf die Expression des *lacZ*-Gens aus, was auf eine post-transkriptionelle Regulation der *prtT*-Expression durch dessen 5'UTR, und gegebenenfalls durch eine eIF2a-Kinase vermittelt, hindeutet.

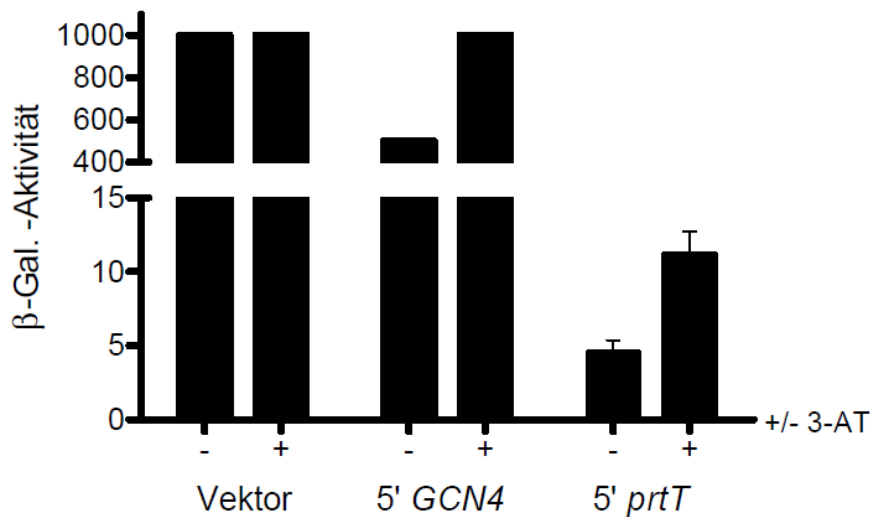


Abbildung 9: Untersuchung regulatorischer 5'UTRs via 5'TRU. Dargestellt ist die β -Galaktosidase-Aktivität unter Mangel- (+ 3-AT) bzw. Nichtmangelbedingung (- 3-AT). Der Testvektor ohne regulierende 5'UTR (Vektor) führt sowohl bei Histidinmangel als auch bei Nichtmangel zu einer hohen *lacZ*-Expression, wohingegen die Insertion der *GCN4*-5'UTR unter Nichtmangelbedingung zu einer reprimierten *lacZ*-Expression führt, die jedoch unter Mangelbedingung dereprimiert ist. Durch Insertion der *prtT*-5'UTR wird insgesamt deutlich weniger *lacZ* exprimiert, wobei Nichtmangelbedingung zu einer reprimierten Expression von *lacZ* führt. Dies zeigt, dass die 5'UTR des *prtT* regulierende Funktion auf die Expression des *lacZ*-Gens im 5'TRU-Testsystem hat. Für die Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität des Testvektors mit der *prtT*-5'UTR wurden sieben Messungen durchgeführt und deren Mittelwert verwendet, daher ergibt sich nur für diesen Klon eine Standardabweichung.

Aufgrund der Untersuchungen der *prtT*-5'UTR mittels des 5'TRU-Testsystems wurde vermutet, dass die ungewöhnlich lange *leader*-Sequenz eine regulatorische Funktion besitzt. Um diese Regulation der *prtT*-Expression näher zu untersuchen, wurde in darauffolgenden Arbeiten ein *A. fumigatus* *gfp*-Reporterkonstrukt mit dem Promoterbereich und der 5'UTR des *prtT*-Gens hergestellt. Dabei wurde das ^{*p*}*prtT*-*gfp*-Reporterkonstrukt pAB22 durch einfache Rekombination über den 5'-Bereich des *prtT*-Gens homolog in unterschiedliche *A. fumigatus*-Stämme integriert. Hierbei ist zu beachten, dass das gesamte Plasmid aufgenommen wurde, und im Gegensatz zu einem doppelten *crossing over* der *prtT* 5'-Bereich nach der Integration dupliziert vorliegt (Abb.10).

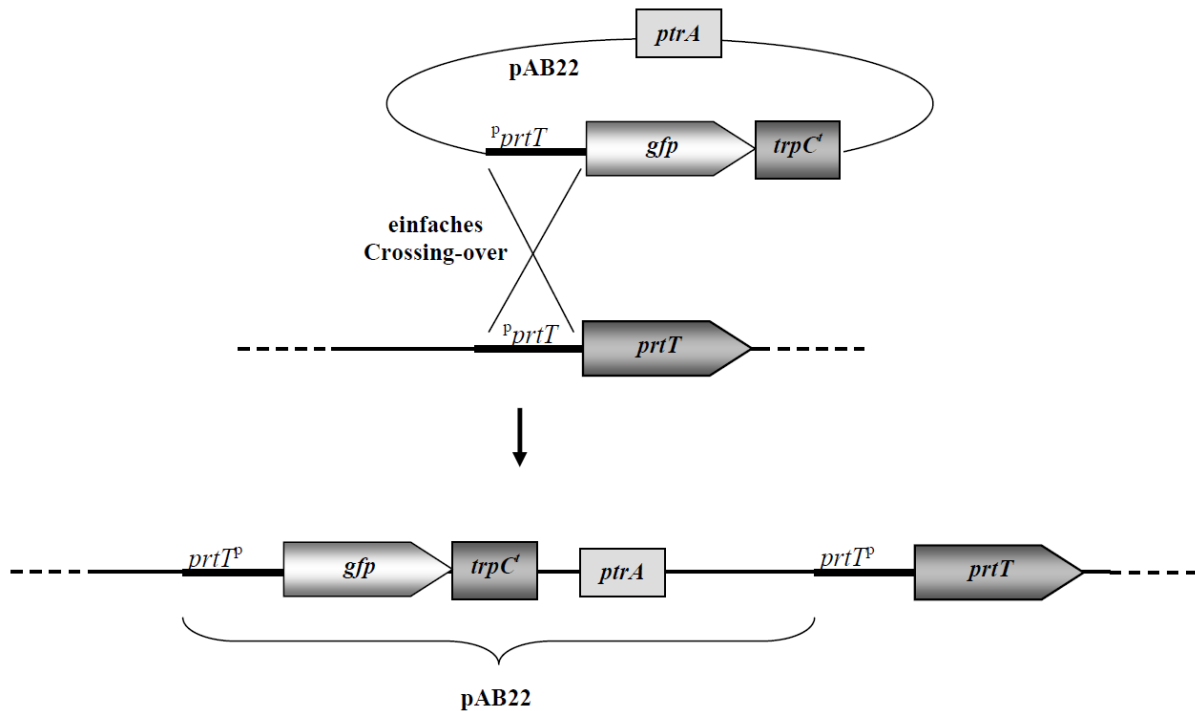


Abbildung 10: Integration von pAB22 in das Genom von *A. fumigatus*. Die Aufnahme des Plasmids pAB22 in *A. fumigatus* erfolgte homolog über ein einfaches *crossing over*. Dadurch ist nach erfolgter Integration das gesamte Plasmid, gefolgt von der ursprünglichen *prtT*-Promotorregion des *prtT*-Lokus, vorhanden. Die *prtT*-5'UTR dient dem *gfp* als Promotorbereich.

Das Plasmid pAB22 wurde in drei unterschiedliche *A. fumigatus*-Stämme integriert, die bereits Deletionen im Bereich der Gene, die für eine der eIF2 α -Sensorkinase CpcC bzw. Ikb codieren, aufwiesen (Sasse *et al.*, 2008; Anette Schedler, persönliche Mitteilung). Zum Vergleich wurde auch ein Reporterstamm im Wildtyp-Stammhintergrund hergestellt, wobei das Isolat ATCC 46645 verwendet wurde. Auf diese Weise wurden die vier *gfp*-Reporterstämme AfB23 (p_{prtT} -*gfp*; Δ *ifkB*), AfB24 (p_{prtT} -*gfp*; Δ *cpcC*), AfB27 (p_{prtT} -*gfp*; Δ *cpcC*; Δ *ifkB*) und AfB26 (p_{prtT} -*gfp*) generiert und mittels Southern-Hybridisierung auf die korrekte und homologe Integration von pAB22 überprüft. Die hierfür verwendete Sonde wurde so gewählt, dass sie an den 5'-Bereich des *prtT*-Gens bindet, sodass ein zusätzliches Signal für die vier generierten Stämme im Vergleich zu den zwei Wildtyp-Signalen erwartet wurde. Die Tabelle aus Abbildung 11 zeigt die erwarteten Signalgrößen der Southern-Hybridisierung nach Restriktion der gDNA der konstruierten Stämme mit den entsprechenden Enzymen. Links sind die zu erwartenden Signale der generierten *gfp*-Reporterstämme nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *PvuI* und nach Anlagerung der für die Hybridisierung verwendeten Sonde zu sehen. Unspezifische Hybridisierungssignale, wie sie beim Wildtyp und dem Reporterstamm p_{prtT} -*gfp*; Δ *ifkB* bei etwa 3 kb zu sehen waren, wurden aufgrund ihrer schwachen Intensität im Vergleich zu den deutlich stärkeren erwarteten Signalen

vernachlässigt. Somit konnte die erfolgreiche homologe Integration des *gfp*-Reporterkonstruktes in die entsprechenden Hintergrundstämme validiert und die Stämme für weitere Untersuchungen verwendet werden.

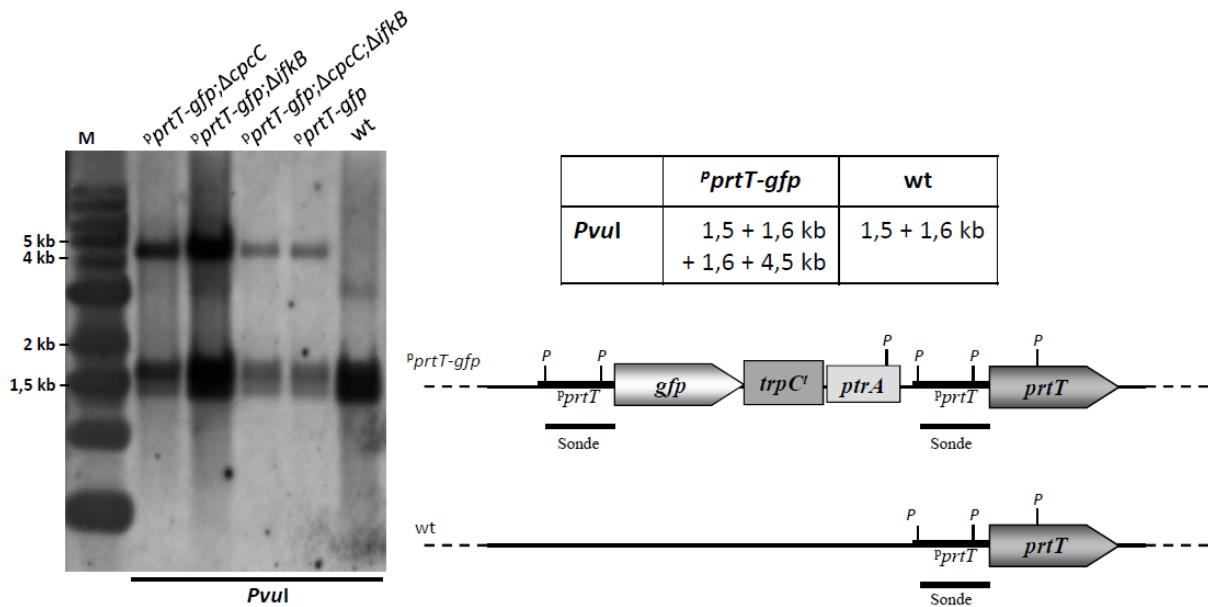


Abbildung 11: Southern-Hybridisierung der *gfp*-Reporterstämme. Links ist das Ergebnis der Southern-Hybridisierung zu sehen, nach Verdau der genomischen DNA der vier *gfp*-Reporterstämme und dem Wildtyp mit *PvuI* und nach Hybridisieren der Sonde die im *prtT*-Promotorbereich bindet. Die entscheidenden Markersignale sind links außen gekennzeichnet und der Marker mit M beschriftet. Die Tabelle rechts oben zeigt die erwarteten Signale der verschiedenen Stämme nach Verdau mit *PvuI* und nach Anlagerung der Sonde. Da sich die *PvuI*-Restriktionsstelle in dem Bereich befand in dem die Sonde bindet, wurden jeweils zwei Signale erwartet, wobei für die Reporterstämme insgesamt nur drei zu unterscheiden waren, da zwei von ihnen die gleiche Größe hatten. Unter der Tabelle ist eine schematische Abbildung des entsprechenden genomischen Locus der *gfp*-Reporterstämme bzw. des Wildtyps. Der Bereich in dem die gewählte Sonde für die Southern-Hybridisierung bindet ist eingezeichnet, ebenso wie die Positionen der *PvuI*-Restriktionsstellen (P). Im Gegensatz zum Wildtyp wird erwartet, dass die Sonde bei den Reporterstämmen zweimal bindet, da hier der *prtT*-Promotorbereich doppelt vorhanden ist.

Die Funktionalität des *gfp*-Reporters wurde zunächst über Fluoreszenzmikroskopie überprüft, wobei jeweils 2000 Sporen der entsprechenden Reporterstämme über Nacht bei 37°C in 500 µl Medium angezogen wurden, welches statt einer primären Stickstoffquelle BSA (4g/l) enthielt, wodurch die *gfp*-Expression über den *prtT*-Promotorbereich induziert werden sollte. In Abbildung 12 ist zu sehen, dass die *gfp*-Expression, wie erwartet, durch Inkubation von Sporen der Reporterstämme in Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle, induziert wurde. Dabei erlaubt die Regulation der *gfp*-Expression durch den *prtT*-Promotor anhand der Stärke des GFP-Signals Rückschlüsse über die Aktivität des *prtT*-Promotors unter den jeweiligen gewählten Bedingungen.

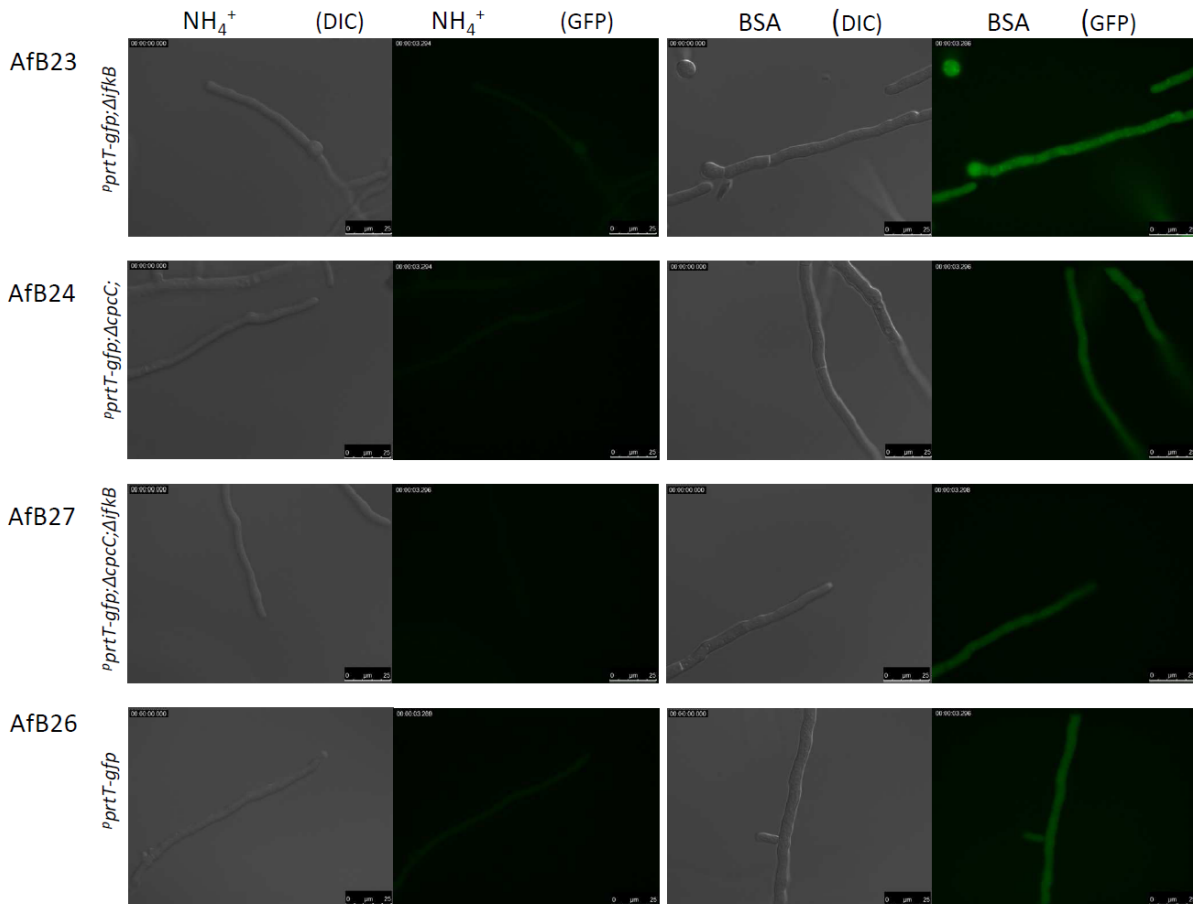


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopie der *gfp*-Reporterstämme. Die Stämme AfB23 (*^pprtT-gfp;ΔifkB*), AfB24 (*^pprtT-gfp;ΔcpcC*), AfB26 (*^pprtT-gfp*) und AfB27 (*^pprtT-gfp;ΔcpcC;ΔifkB*) wurden über Nacht in Flüssigmedium mit Ammonium (NH_4^+) bzw. Rinderserumalbumin (BSA) als einziger Stickstoffquelle angezogen. Zu sehen sind jeweils Durchlicht- (DIC) und GFP-Filter-Aufnahmen (GFP) der einzelnen Proben. Da die 5'UTR von *prtT* als Promotor des *gfp* diene, konnte anhand der *gfp*-Expression die Promotoraktivität unter bestimmten Bedingungen untersucht werden. Ammonium als einzige Stickstoffquelle führt zu einer kaum erkennbaren *gfp*-Expression, wohingegen BSA zu einer deutlich verstärkten Expression von *gfp* führt.

Ist BSA als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden, wird der *prtT*-Promotor induziert und die entsprechend cytoplasmatisch gebildete GFP-Proteinmenge der Reporterstämme ist im GFP-Filter deutlich zu sehen. Wird Ammonium als primäre Stickstoffquelle ins Medium gegeben, wird der *prtT*-Promotor nicht induziert. Somit ist bei Anwesenheit einer primären Stickstoffquelle auch kein, oder nur ein basales Level an *gfp*-Expression zu erkennen. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten die Funktionalität des *^pprtT-gfp*-Konstruktes und den Einfluss der Stickstoffquelle auf die *gfp*-Expression. Daher konnten die generierten Stämme für weitere Untersuchungen verwendet werden.

4.1.3 eIF2 α -Kinasen von *A. fumigatus* beeinflussen die Expression von *prtT* zu einem frühen Zeitpunkt

Mit Hilfe von Western-Immunoblotting sollte die GFP-Menge der Reporterstämme unter verschiedenen Bedingungen quantifiziert werden. Hierfür wurden Flüssigkulturen der entsprechenden Stämme auf Minimalmedium über Nacht angezogen und dann in Medium transferiert, das BSA als alleinige Stickstoffquelle enthielt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Kultur in frisches Minimalmedium überführt. Nach erneuter Inkubation von unterschiedlicher Dauer (eineinhalb, zwei und vier Stunden) wurde aus den erhaltenen Kulturen Proteinextrakt gewonnen. Es wurde von allen Stämmen die gleiche Menge an Protein für die SDS-PAGE aufgetragen, so dass nach erfolgtem Immunoblot mit GFP-Antikörper (Abb. 13) anhand der Intensität der Signale auf die *gfp*-Expression geschlossen werden konnte.

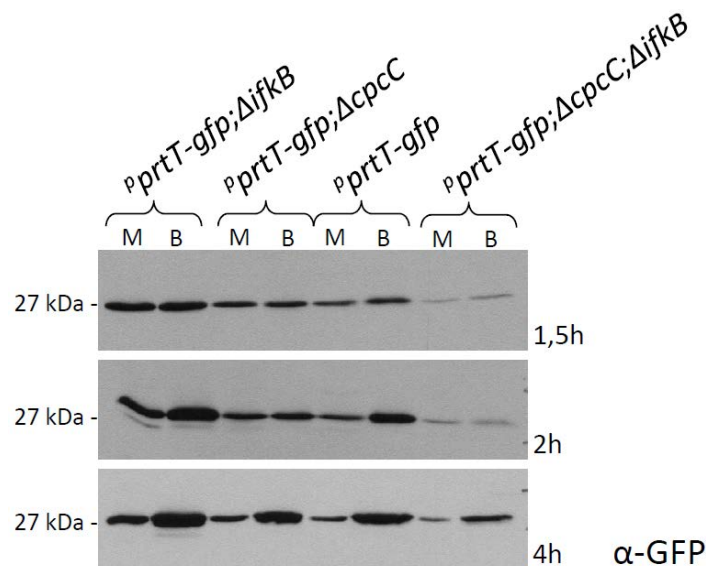


Abbildung 13: Western-Hybridisierung der *gfp*-Reporterstämme. Die Proteinextrakte stammen von Kulturen, die nach Wachstum in Flüssigkultur mit Ammonium (M) als primärer Stickstoffquelle in frisches Medium bzw. in Medium mit BSA (B) als einziger Stickstoffquelle überführt und erneut für 90 min., 2 Stunden oder 4 Stunden inkubiert worden waren. Es ist deutlich zu sehen, dass der Reporterstamm im $\Delta cpcC; \Delta ifkB$ - Hintergrund weniger GFP bildet als die anderen Reporterstämme. Zudem war bei dem gleichen Stamm erst nach vierstündiger Inkubation in BSA-haltigem Medium ein Anstieg der GFP-Menge im Vergleich zu Wachstum in Medium mit Ammonium zu beobachten.

Nach 90-minütiger Inkubation der Kulturen in BSA-haltigem Medium erfolgte ein leichter Anstieg der Expression des *gfp*-Reporterkonstruktes im Wildtyp-Stammhintergrund. Bei den anderen drei Stämmen ist kaum ein Unterschied zwischen Ammonium und BSA als Stickstoffquelle zu sehen. Auffällig ist jedoch, dass die Signale im Stammhintergrund der $\Delta cpcC; \Delta ifkB$ -Doppelmutante deutlich schwächer sind als die der anderen Stämme, wohingegen die Signale des Reporterstammes im Hintergrund der $\Delta ifkB$ -Mutante am

stärksten sind. Erfolgte nach dem Wechsel der Stickstoffquelle eine Inkubation der Stämme für zwei Stunden, wurde der Unterschied der *gfp*-Expression deutlicher, je nachdem ob die Stämme erneut Ammonium als N-Quelle zur Verfügung hatten oder in BSA-haltigem Medium inkubiert wurden. Auch hier waren die Signale im Stammhintergrund der $\Delta cpcC;\Delta ifkB$ -Doppelmutante deutlich schwächer als die der anderen drei Stämme und es ist kein Anstieg der *gfp*-Expression nach Shift auf BSA als einzige N-Quelle zu sehen, obwohl für alle Proben die gleiche Menge an Gesamtprotein eingesetzt wurde. Dies lässt vermuten, dass CpcC und IfkB die Expression des Reporterkonstruktes bei einem Wechsel von Ammonium zu BSA im Medium beeinflussen. Hierbei scheint die Anwesenheit einer der beiden Sensorkinasen ausreichend zu sein, wohingegen das Fehlen beider zu einer sehr geringen GFP-Proteinmenge führt.

Da die Reporterstämme so konstruiert wurden, dass das *gfp*-Gen durch den *prtT*-Promotor kontrolliert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Menge an gebildetem GFP auch der Menge an PrtT entspricht.

4.1.4 eIF2 α -Kinasen von *A. fumigatus* beeinflussen die Transkriptmenge von *prtT*

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR sollte untersucht werden, ob die verschiedenen GFP-Reporterstämme unter verschiedenen Stickstoffbedingungen auch unterschiedliche Mengen an Transkript bilden. Es wurden die gleichen Stickstoffquellen verwendet wie für die Expressionsstudien *via* Western-Hybridisierung, also Ammonium als präferierte Stickstoffquelle und BSA als unverdaute, proteinhaltige Stickstoffquelle. Entsprechend der Kulturen, die für die Western-Studien verwendet wurden, wurden auch für die qRT-PCR alle Stämme zunächst in Minimalmedium mit Ammonium als Stickstoffquelle angezogen und anschließend für eine bzw. vier Stunden in Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle inkubiert. Zum Vergleich wurde jeweils ein Aliquot in frischem Minimalmedium mit Ammonium inkubiert. Als interne Kontrolle für die qRT-PCR wurde ein *housekeeping* Gen verwendet, das für die β -Untereinheit des Tubulins codiert (AFUA_1G10910) und über die Primer TubFw und TubRev amplifiziert. Für das *gfp*-Transkript wurden die Primer AB86 und AB87 verwendet und für das *prtT*-Transkript die Primer AB84 und AB85.

In Abbildung 14 ist der Anstieg des *prtT*-Transkriptes nach Wechsel der Proben auf BSA-haltiges Medium und anschließende Inkubation für eine bzw. vier Stunden zu sehen. Hierbei wurde die Expression über die mRNA-Mengen des β -Tubulin-Gens normalisiert und die Expression des Stammes *^pprtT-gfp* nach Inkubation in Medium mit Ammonium willkürlich auf 1 gesetzt.

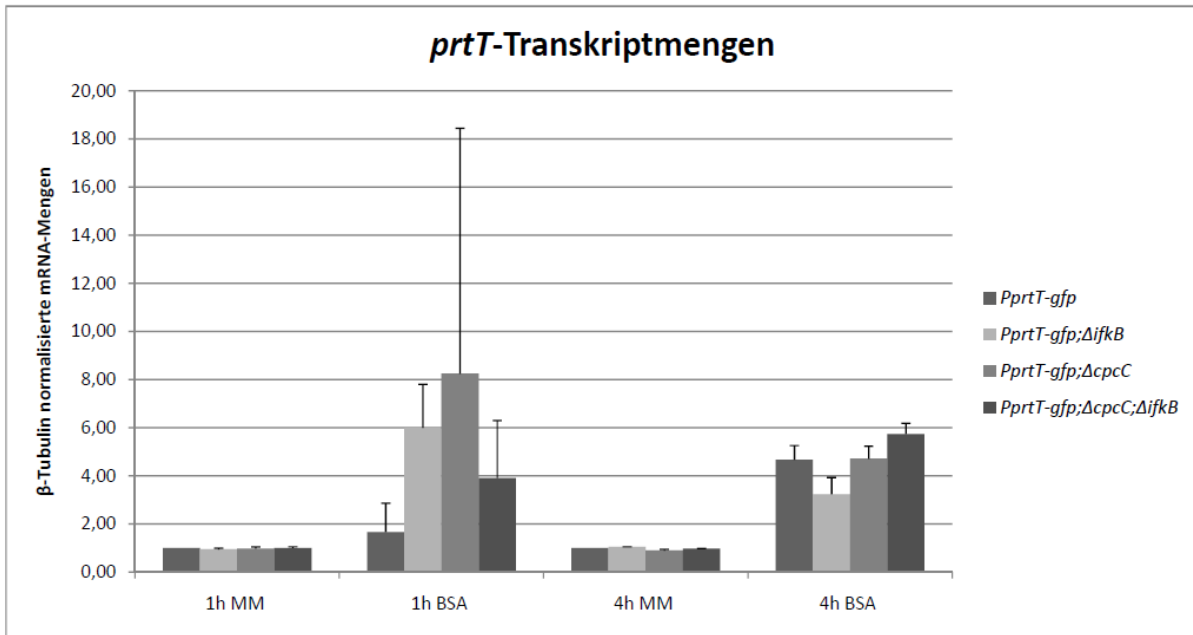


Abbildung 14: *prtT*-Transkriptmengen nach Wechsel der Stickstoffquelle. Zu sehen sind die unterschiedlichen Transkriptmengen nach Wechsel der Stickstoffquelle im Medium von Ammonium (MM) zu Rinderserumalbumin (BSA) und anschließender Inkubation für eine bzw. vier Stunden. Die Transkriptmengen wurden durch qRT-PCR verfolgt, wobei die Expression über die mRNA-Mengen des β -Tubulin-Gens normalisiert wurden. Die Expression des Stammes *PprtT-gfp* nach Inkubation in Medium mit Ammonium wurde willkürlich auf 1 gesetzt. Für den *gfp*-Reporterstamm im $\Delta cpcC$ -Stammhintergrund wurde der größte Anstieg der *prtT*-Transkriptmenge beobachtet, wobei die hohe Standardabweichung verdeutlicht, dass die Expressionsmengen dieses Stammes die größten Schwankungen aufwiesen. Die Transkriptmengen der *gfp*-Reporterstämme im Wildtyp- und $\Delta cpcC; \Delta ifkB$ -Stammhintergrund nahmen im Vergleich zu den anderen Stämmen am wenigsten zu nach einem Wechsel auf Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle.

Für den *gfp*-Reporterstamm im $\Delta cpcC$ -Stammhintergrund konnte bereits nach einer Stunde der größte Anstieg (achtfach) der *prtT*-Transkriptmenge beobachtet werden, wobei bei diesem Stamm hohe Schwankungen in den biologischen Replikaten zu einer hohen Standardabweichung führten, sodass dieses Ergebnis eventuell nicht die wirkliche mRNA-Menge widerspiegelt. Dagegen stieg die Transkriptmenge des gleichen Stammes nach vierstündiger Inkubation in BSA-haltigem Medium nur um das etwa Viereinhalbfache an und zeigte damit die gleiche Änderung der *prtT*-Transkriptmenge wie der *gfp*-Reporterstamm im Wildtyp-Stammhintergrund. Insgesamt scheint das Fehlen einer, bzw. beider Sensorkinasen die Transkriptmenge von *prtT* bei einstündiger Inkubation in BSA-haltigem Medium zu steigern, wobei nach vierstündiger Inkubation in dem gleichen Medium die *prtT*-Transkriptmengen aller *gfp*-Reporterstämme ungefähr den gleichen Anstieg zeigen.

Im Vergleich dazu wurde auch die Menge an *gfp*-Transkripten nach Wechsel der Stickstoffquelle und anschließender Inkubation der Proben in Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle für eine, bzw. vier Stunden untersucht (Abb. 15).

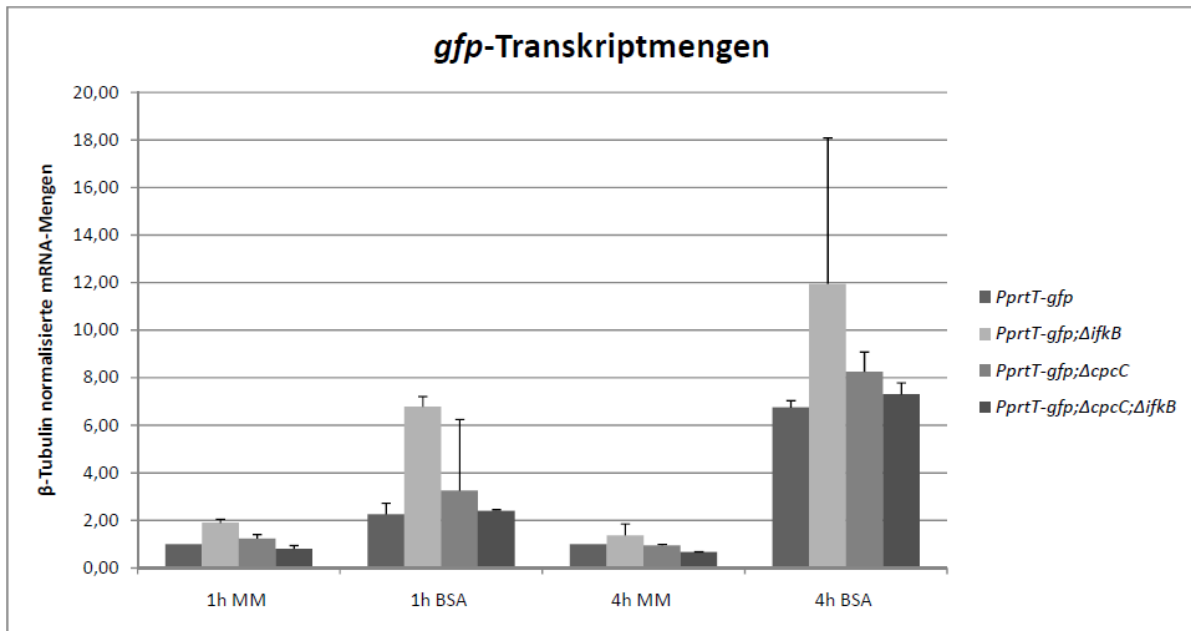


Abbildung 15: *gfp*-Transkriptmengen nach Wechsel der Stickstoffquelle. Zu sehen sind die unterschiedlichen Transkriptmengen nach Wechsel der Stickstoffquelle im Medium von Ammonium (MM) zu Rinderserumalbumin (BSA) und anschließender Inkubation für eine bzw. vier Stunden. Die Transkriptmengen wurden durch qRT-PCR verfolgt, wobei die Expression über die mRNA-Mengen des β -Tubulin-Gens normalisiert wurden. Die Expression des Stammes *PprtT-gfp* nach Inkubation in Medium mit Ammonium wurde willkürlich auf 1 gesetzt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Transkriptmengen des *gfp*-Gens nach vierstündiger Inkubation nach einem Wechsel auf Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle deutlich ansteigen im Vergleich zur einstündigen Inkubation.

Für den *gfp*-Reporterstamm im $\Delta ifkB$ -Stammhintergrund (*PprtT-gfp;ΔifkB*) konnte hierbei im Vergleich zu den anderen Stämmen der größte Anstieg der Transkriptmenge sowohl nach einstündiger, als auch nach vierstündiger Inkubation verzeichnet werden. Allerdings führten bei Letzterem die qRT-PCRs der unterschiedlichen biologischen Replikate zu einer sehr hohen Abweichung. Die Transkriptmenge des *gfp*-Reporterstammes im Wildtyp-Stammhintergrund (*PprtT-gfp*) stieg nach einstündiger Inkubation in Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle um etwa das Zweifache an, nach vierstündiger Inkubation in BSA-haltigem Medium sogar um mehr als das Sechsfache. Auch die Menge der *gfp*-Transkripte der anderen Reporterstäme war nach längerer Inkubation deutlich höher, als nach einstündiger Inkubation in BSA-haltigem Medium. Dieser Effekt konnte jedoch nicht für die *prtT*-Transkripte beobachtet werden, obwohl beide Gene, *prtT* und *gfp*, im Reporterkonstrukt durch die 5'UTR des *prtT* reguliert wurden. Insgesamt fiel bei den *gfp*-Transkripten auf, dass das Fehlen der *ifkB*-Sensor kinase (*PprtT-gfp;ΔifkB*) zu höheren *gfp*-Transkriptmengen führt, als bei den anderen Reporterstämmen.

Die Ergebnisse der qRT-PCRs zeigen, dass die Gene *prtT* und *gfp* der Reporterstäme unterschiedliche Mengen an Transkript bilden, obwohl beide Gene durch den Promoter und

die 5'leader-Region des *prtT*-Gens in ihrer Expression reguliert wurden. Zudem scheint sich das Fehlen einer, bzw. beider Sensorkinasen positiv auf die *prtT*-Transkriptmenge nach einstündiger Inkubation der Reporterstämme in BSA-haltigem Medium auszuwirken.

4.1.5 PrtT ist notwendig für den Abbau von Proteinen durch *A. fumigatus*

Um die zelluläre Funktion des *prtT*-Genproduktes zu untersuchen, wurde ein Deletionsstamm durch doppeltes *crossing over* und daraus resultierender homologen Rekombination des *prtT*-Gens gegen einen Selektionsmarker hergestellt (Abb. 16).

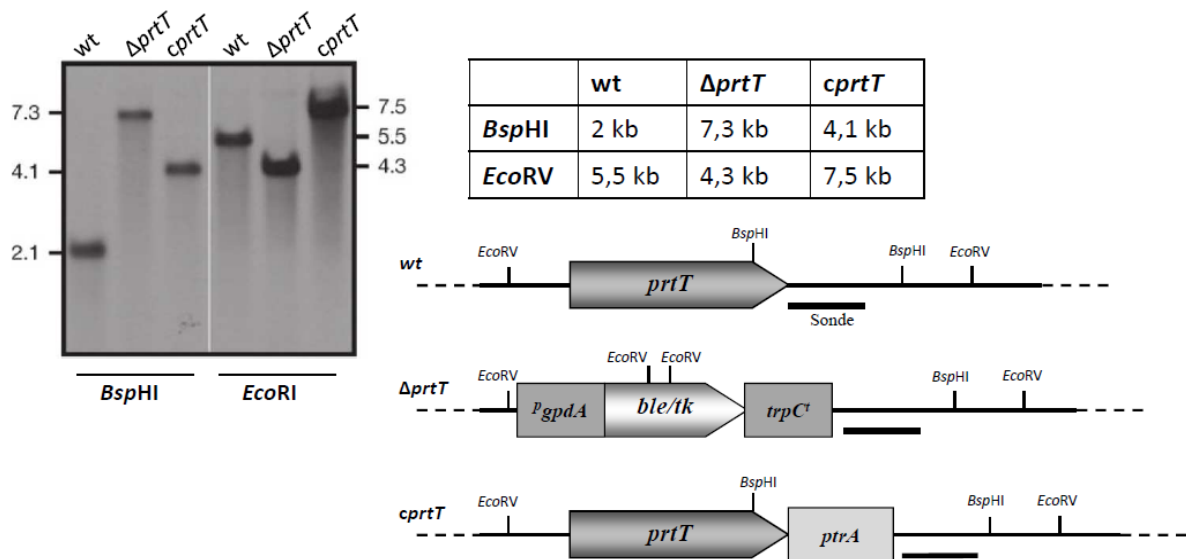


Abbildung 16: Southern-Hybridisierung der *prtT*-Mutanten. Der genomische Locus ist schematisch dargestellt für den Wildtyp-Stamm ATCC 46645, den *prtT*-Deletionsstamm ($\Delta prtT$), und den rekonstituierten Stamm (*cprtT*). Auf der linken Seite sind die erwarteten Signale der Southern-Hybridisierung nach Verdau der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen *BspHI* und *EcoRV* und nach Hybridisierung mit einer 3'-spezifischen Sonde abgebildet. Die Tabelle zeigt die zu erwartenden Signalgrößen.

Durch Southern-Analyse wurde dabei die homologe Rekombination überprüft und der validierte *prtT*-Deletionsstamm für weitere Untersuchungen verwendet. Basierend auf dem Deletionsstamm ($\Delta prtT$, AfS61) wurde ein Komplementationsstamm (*cprtT*, AfS62) durch Einfügen des *prtT*-Gens zusammen mit einem Selektionsmarker an der entsprechenden Genomposition hergestellt und ebenfalls durch Southern-Hybridisierung validiert (Abb. 16). Die generierten Stämme wurden auf verschiedenen Medien hinsichtlich eines Wachstumsdefizits untersucht (Abb. 17). Der auffallendste Phänotyp konnte dabei auf Platten beobachtet werden, die das Protein BSA als einzige Stickstoffquelle enthielten. Auf diesem Medium wurde ein starker Wachstumsdefekt des Deletionsstammes AfS61 beobachtet, wobei nahezu kein Myzel zu sehen war. Erst nach längerer Inkubation der Platten wurde ein sehr

dünnes Myzelgeflecht gebildet, wohingegen der Wildtyp- und der rekonstituierte Stamm normales Wachstum mit Sporulation zeigten. Nach Zugabe von vorverdaulichem Protein (0,1% Pepton) zusätzlich zu BSA als Stickstoffquelle konnte der Phänotyp des Deletionsstammes komplementiert werden. Auf Minimalmedium mit Kasein als einziger Stickstoffquelle erfolgte nach ein- bis dreitägiger Inkubation bei 37°C eine Ansäuerung des Mediums, was ein Ausfällen des Kaseins zur Folge hatte und als trüber Ring rund um den wachsenden Wildtyp- und Komplementationsstamm zu beobachten war. Nach fünf- bis siebentägiger Inkubation wurde das Kasein durch sekretierte Proteasen hydrolytisch abgebaut, sodass es zu einem ringförmigen, klaren Hof um Wildtyp- und Komplementationsstamm kam. Im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen konnte bei dem *priT*-Deletionsstamm kein klarer Hof um das wachsende Myzel und damit keine Hydrolyse des Kaseins beobachtet werden (**Abb. 17**).

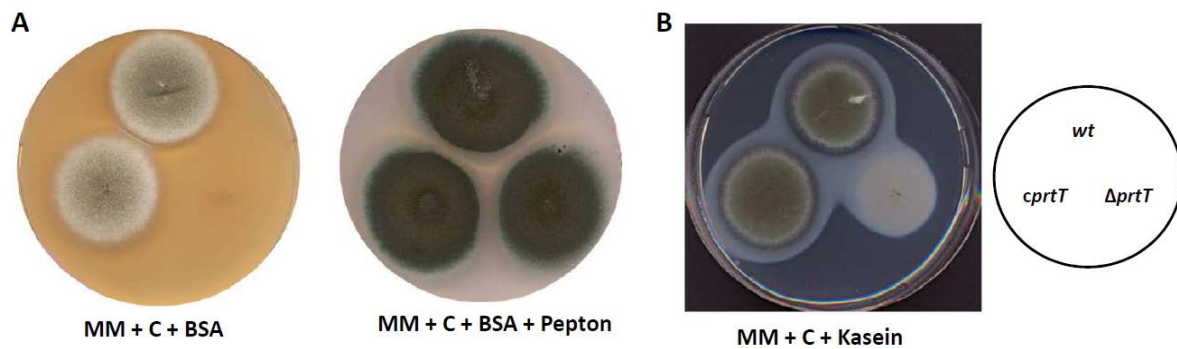


Abbildung 17: Phänotypische Untersuchungen der generierten Stämme. A, Wachstumstests auf Minimalmedium (MM) mit Glukose (C), nach Zugabe von BSA oder BSA mit Pepton als einziger Stickstoffquelle. Auf alle Platten wurde die gleiche Sporenanzahl der einzelnen Stämme (Wildtyp: *wt*; Deletion: $\Delta priT$; Komplementation: *cpriT*) aufgetropft und bei 37°C inkubiert. Auf Platten mit unverdaulichem Protein (BSA) als einziger Stickstoffquelle konnte ein starker Wachstumsdefekt des *priT*-Deletionsstammes beobachtet werden. Dieser Phänotyp konnte durch Zugabe von hydrolysiertem Protein (Pepton) aufgehoben werden. B, Wachstum auf Medium mit Kasein zeigt die Abwesenheit eines klaren Hofes um die Kolonie des Deletionsstammes und weist damit auf verminderten Abbau von präzipitiertem Protein hin.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Wachstumsdefekt des Deletionsstammes, in Anwesenheit von BSA als einziger Stickstoffquelle, auf der Unfähigkeit des Stammes beruht, unhydrolysiertes Protein abzubauen.

4.1.6 *PriT* ist notwendig für die Sekretion von Proteasen durch *A. fumigatus*

Aufgrund der Hypothese, dass der *priT*-Deletionsstamm stark darin beeinträchtigt ist, Proteasen zu sekretieren, wurde dessen Abbau von Protein in flüssigem Medium mit BSA und geringen Mengen an Pepton untersucht (Bouchara *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Pepton hierbei das Wachstum der Mutante unterstützt, jedoch nicht die Sekretion der extrazellulären Proteasen des Wildtyp-Stammes unterdrückt. Dementsprechend erlauben diese

Bedingungen einen direkten Vergleich des Wachstums der analysierten Stämme. Überstände der BSA/Pepton-Kulturen und der Kulturen mit alternativen Stickstoffquellen wurden für einen Schnelltest der proteolytischen Aktivität eingesetzt. Hierfür wurden Aliquots der jeweiligen Überstände auf einen unentwickelten Röntgenfilm aufgetropft und die Hydrolyse der Gelatine auf der Filmoberfläche beobachtet (Cheung *et al.*, 1991). Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ammonium als primärer Stickstoffquelle die Expression der extrazellulären proteolytischen Aktivität unterdrückt. Dagegen konnte die Hydrolyse der Gelatine, in Form einer Klärung des Films an der Stelle der Probenapplikation, nur für Überstände der Stämme beobachtet werden, die *prtT* exprimieren und die in Medium mit BSA und/oder Pepton als einziger Stickstoffquelle inkubiert worden waren (Abb. 18).

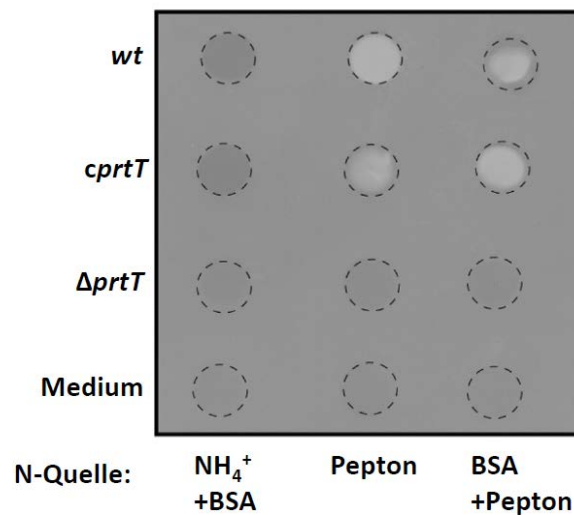


Abbildung 18: Untersuchung der proteolytischen Aktivität via Röntgenfilm. Überstände von Pilzkulturen, die in verschiedenen Stickstoffquellen gewachsen waren, wurden auf einen unentwickelten Röntgenfilm getropft um die sekretierte proteolytische Aktivität der einzelnen Stämme zu untersuchen. In Anwesenheit von Ammonium (NH_4^+) als einziger Stickstoffquelle konnte keine Klärung der Gelatineschicht beobachtet werden, was auf Abwesenheit sekretierter proteolytischer Aktivität hindeutet. Bei Anwesenheit von BSA und/oder Pepton hingegen konnte für den Wildtyp (*wt*) und den Komplementationsstamm (*cprtT*) proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint die *prtT*-Deletion ($\Delta prtT$) keine extrazellulären Proteasen zu produzieren. Applikation der Überstände ist gekennzeichnet durch gestrichelte Kreise, unbeimpftes Medium wurde zum Vergleich verwendet.

Um den Abbau von Proteinen während des pilzlichen Wachstums zu untersuchen, wurden die Überstände der BSA/Pepton-Kulturen *via* SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 19). Der Abbau von BSA durch den Wildtyp- und den Komplementationsstamm konnte schon nach 24-stündiger Inkubation beobachtet werden, wohingegen der Deletionsstamm zu diesem Zeitpunkt kein Protein abgebaut hatte. Nach längerer Inkubation (48 Stunden) wurde das Substrat vollständig durch die Stämme, die das *prtT*-Gen enthielten, hydrolysiert, der

Deletionsstamm hingegen konnte das BSA nur teilweise abbauen, so dass ein Degradationsprodukt von etwa 50 kDa entstand. Experimente bei denen angezogenes Myzel des Deletionsstammes in Medium mit BSA aber ohne Pepton überführt wurde, zeigten nicht das vorher beschriebene Degradationsmuster (Daten nicht gezeigt), was bedeutet, dass die Expression der proteolytischen Aktivität in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum des Pilzes steht.

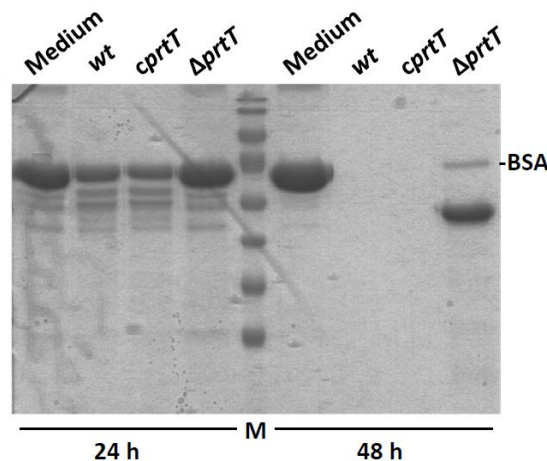


Abbildung 19: Visualisierung des Proteinabbaus. Überstände von 24- und 48-Stunden Kulturen von Wildtyp (*wt*), Deletionsstamm ($\Delta prtT$) und Komplementationsstamm (*cprtT*) wurden elektrophoretisch über SDS-PAGE aufgetrennt und zeigen die fast vollständige Abwesenheit von extrazellulären Proteasen in den Überständen mit BSA und Pepton des *prtT*-Deletionsstammes. Zum Vergleich wurde unbeimpftes Medium verwendet.

Um die Menge an proteolytischer Aktivität in den Überständen zu bestimmen, wurde ein kolorimetrischer Test mit Azokoll als unspezifischem Substrat durchgeführt (Chavira *et al.*, 1984; Jiang, 2007). Hierbei war nahezu keine proteolytische Aktivität der Überstände des $\Delta prtT$ -Stammes messbar, im Gegensatz zu einer deutlichen Aktivität in den Überständen des Wildtyps und des Komplementationsstammes (Abb. 20).

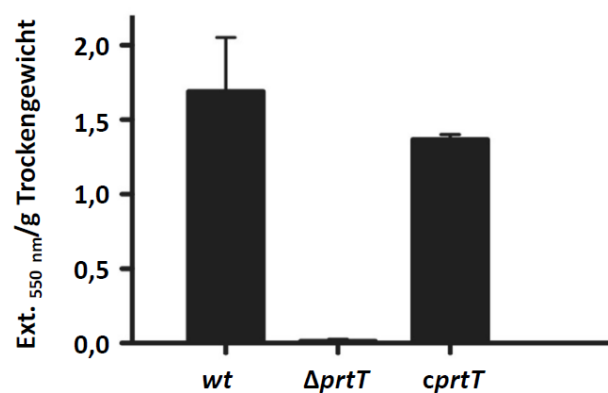


Abbildung 20: Bestimmung der proteolytischen Aktivität via Azokoll. Die quantitative Auswertung der sekretierten extrazellulären proteolytischen Aktivität durch den Wildtyp (*wt*), den Komplementationsstamm (*cprtT*) und den *prtT*-Deletionsstamm ($\Delta prtT$) zeigt die fast vollständige Abwesenheit von extrazellulären Proteasen im Überstand des Deletionsstammes.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass *prtT* entscheidend für die Expression von extrazellulären Proteasen durch *A. fumigatus* ist, wodurch dem saprotrophen Pilz die Verwendung von Protein als Substrat ermöglicht wird.

4.1.7 PrtT reguliert die Transkription einiger sekretierter Proteasen

Aufgrund der Ergebnisse, dass das *prtT*-Genprodukt die Expression der extrazellulären proteolytischen Aktivität reguliert, sollte auch deren Transkriptmenge in die Untersuchungen einbezogen werden. Daher wurde die Transkriptmenge einiger ausgewählter Gene, die für bedeutende sekretierte Proteasen von *A. fumigatus* kodieren, mit Hilfe von qRT-PCR quantifiziert. Die untersuchten Gene der sekretierten Proteasen waren *alp1* (AFUA_84G11800), das für eine Serinprotease der Subtilisin-Unterfamilie codiert (Jaton-Ogay *et al.*, 1992), *mep* (AFUA_8G07080), welches für eine Metallprotease codiert (Jaton-Ogay *et al.*, 1994), *pep1* (AFUA_5G13300), eine Aspartatprotease der Pepsinfamilie (Reichard *et al.*, 1995), *sedB/tppA* (AFUA_4G03490), ein sogenanntes Sedolisin (Reichard *et al.*, 2006), *dppIV* (AFUA_4G09320) und *dppV* (AFUA_2G09030), zwei Dipeptidylproteasen (Beauvais *et al.*, 1997; Beauvais *et al.*, 1997), (Abb. 21). Nach einem Wechsel von Minimalmedium mit primärer Stickstoff- und Kohlenstoffquelle (Ammonium und Glukose) zu Medium mit BSA als einziger Stickstoffquelle konnte ein Anstieg der Expression der extrazellulären Protease-kodierenden Transkripte *alp1*, *mep* und *pep1* im Wildtypstamm beobachtet werden. Diese transkriptionelle Induktion galt dagegen nicht für den *prtT*-Deletionsstamm. Es konnte kein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge des Sedolisin-kodierenden Gens *sedB* nach Wechsel auf BSA im Medium beobachtet werden, wohingegen die Transkription der zwei Gene, die für die Dipeptidyl-Proteasen kodieren (*dppIV* und *dppV*), bei Anwesenheit von BSA im Medium stark induziert war. Dieses regulatorische Muster war für *dppV* unverändert im genetischen Hintergrund des *prtT*-Deletionsstammes. Eine geringere Zunahme der Induktion konnte jedoch für *dppIV* gezeigt werden, was in einem basalen Transkriptionslevel resultierte.

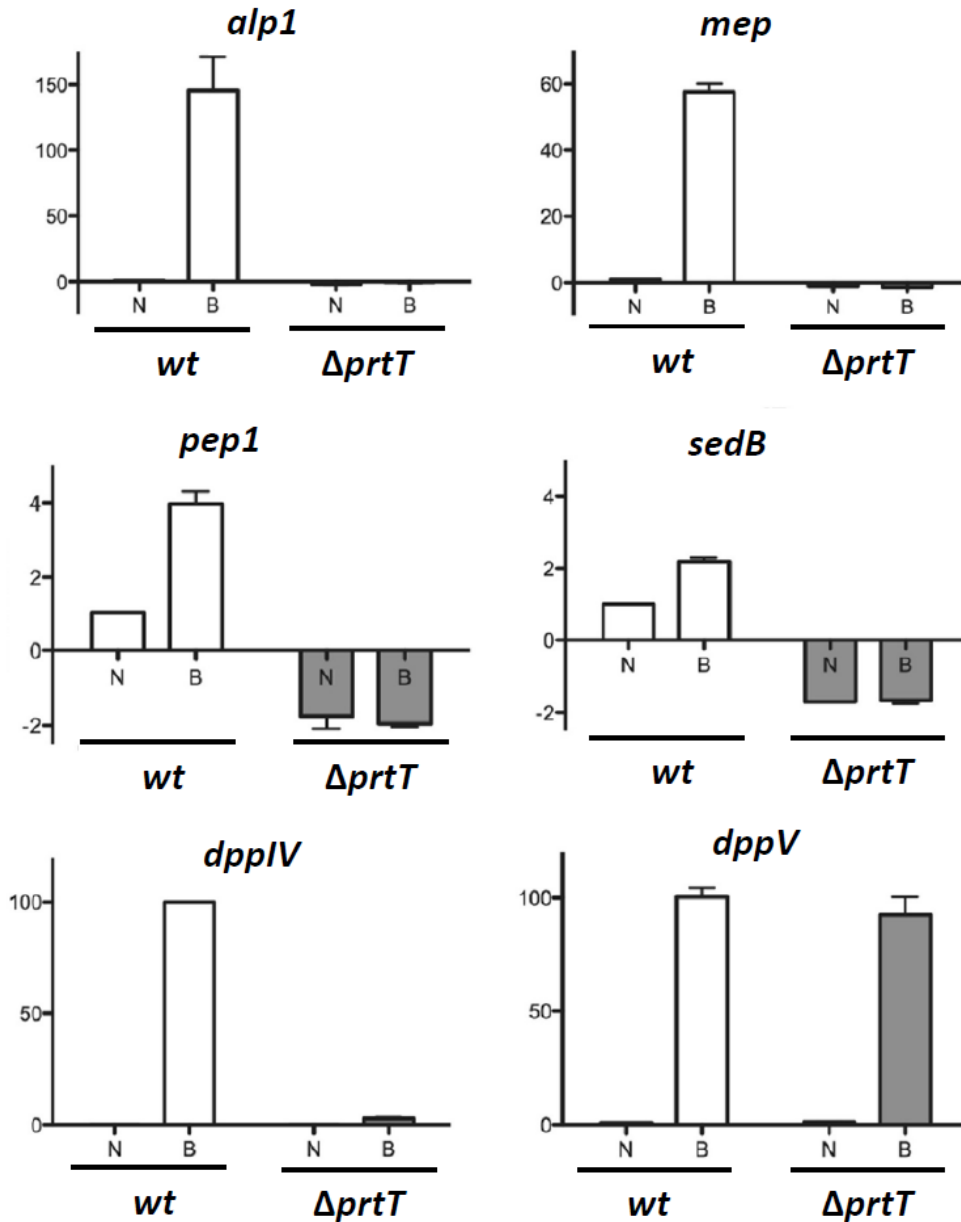


Abbildung 21: PrtT reguliert transkriptionell die Induktion einiger sekretierter Proteasen. Die Transkriptmenge einiger Protease-kodierender Gene wurde anhand von qRT-PCR bestimmt, nach einem Wechsel von Minimalmedium mit Ammonium (N) als primärer Stickstoffquelle zu Medium mit BSA (B) als einziger Stickstoffquelle nach zweistündiger Inkubation. Die Expressionsrate wurde auf das mRNA Level des β -Tubulin-kodierenden Gens (AFUA_1G10910) normalisiert und willkürlich auf 1 gesetzt für den Wildtyp in Minimalmedium, außer für die Expression von *dppIV*, die nicht in Medium mit Ammonium erfasst werden konnte; für dieses Gen wurde die Transkriptmenge des in BSA gewachsenen Wildtyps willkürlich auf 100 gesetzt.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass PrtT die Expression einiger sekretierten Proteasen auf transkriptioneller Ebene reguliert, wobei die Regulation anderer extrazellulärer Proteasen nicht ausschließlich von PrtT abhängig ist, wie zum Beispiel für das *dppV*-Gen, das für eine Dipeptidyl-Protease kodiert, gezeigt werden konnte.

4.1.8 PrtT ist für die Virulenz von *A. fumigatus* in leukopenischen Mäusen überflüssig

Um einen möglichen Einfluss des Regulators PrtT auf die Virulenz von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden der *prtT*-Deletionsstamm und der Wildtyp ATCC46645 in einem leukopenischen Mausmodell der pulmonalen Aspergillose getestet. Die Gewichtsabnahme von jeweils fünf immunsupprimierten Mäusen, die mit $1 \cdot 10^4$ Sporen des *prtT*-Deletions- bzw. des Wildtypstammes infiziert worden waren, wurde nach Infektion vier Tage lang beobachtet (Abb. 22).

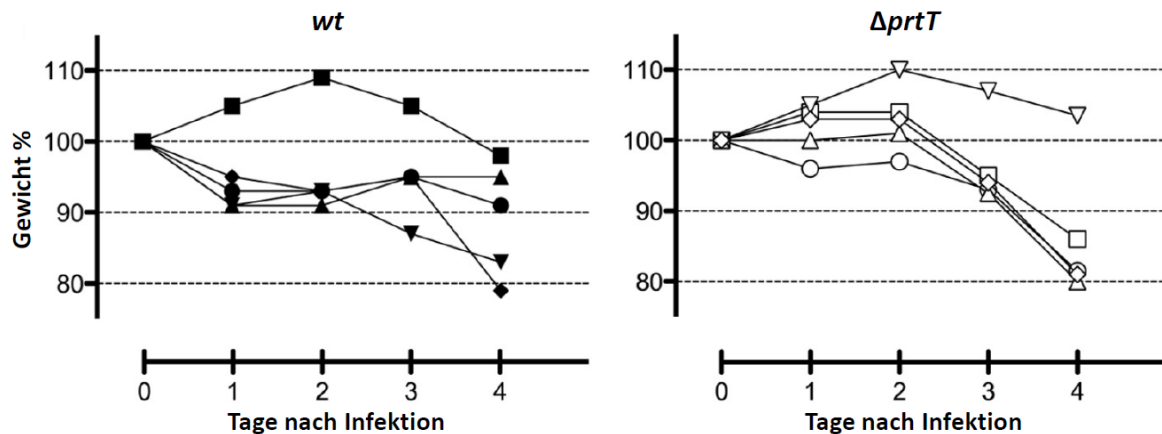


Abbildung 22: Gewichtsabnahme der mit *A. fumigatus*-Sporen infizierten leukopenischen Mäuse. Die Infektion mit $1 \cdot 10^4$ Sporen des *prtT*-Deletionsstammes ($\Delta prtT$) zeigt den gleichen Krankheitsverlauf der Tiere wie nach Infektion mit $1 \cdot 10^4$ Wildtyp-Sporen (*wt*). Zu sehen ist die Gewichtsabnahme in Prozent, die über vier Tage hinweg nach Infektion kontrolliert wurde.

Diese Daten zeigen den gleichen Verlauf nach Infektion der leukopenischen Mäuse mit Sporen des Wildtyps und des *prtT*-Deletionsstammes. Außerdem wurden die Lungen der infizierten Tiere vier Tage nach der Infektion isoliert um die genomische DNA der beiden *Aspergillus*-Stämme aus homogenisiertem Lungengewebe zu extrahieren. Mit Hilfe von quantitativer PCR, bei der der 18S-rRNA-Lokus des *A. fumigatus*-Genoms amplifiziert wurde, konnte die relative Menge an pilzlicher DNA in den infizierten Lungen ermittelt werden (Abb. 23).

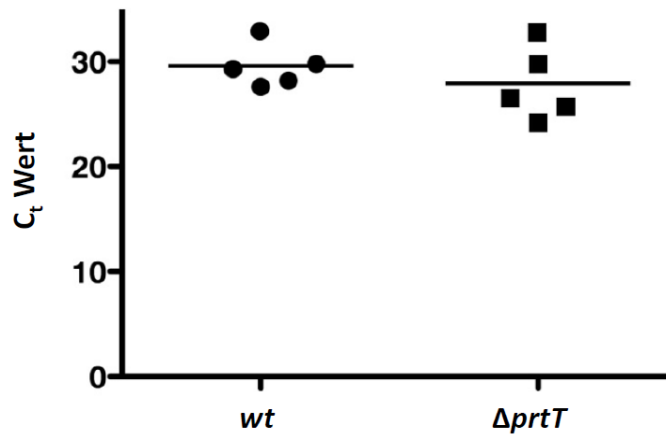


Abbildung 23: qPCRs von extrahierter DNA aus dem Lungengewebe. Die Wachstumsrate des *prtT*-Deletionsstammes ($\Delta prtT$) in den Lungen der infizierten leukopenischen Mäuse ist vergleichbar zu der des Wildtypstammes (*wt*). Zu sehen sind die berechneten *threshold cycle* (C_t) von $\Delta prtT$ -Mutanten- und Wildtyp-DNA. Aufgrund des gleichen Krankheitsverlaufs und der gleichen Menge an Sporenbelastung durch den Wildtyp und den *prtT*-Deletionsstamm kann ausgeschlossen werden, dass der Deletionsstamm die Virulenz innerhalb des hier verwendeten Mausmodells beeinflusst.

Da keine signifikanten Unterschiede im Krankheitsverlauf und der pulmonaren Pilzbelastung zwischen den mit Sporen des *prtT*-Deletionsstammes und des Wildtypstammes infizierten Tieren zu erkennen war, konnte daraus geschlossen werden, dass die Virulenz von *A. fumigatus* in dem hier verwendeten Mausmodell der pulmonalen Aspergillose nicht durch Regulation der Expression einiger bedeutender extrazellulärer Proteasen bestimmt ist.

4.2 Evaluation der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in *A. fumigatus* als möglicher antimykotischer Ansatzpunkt

Da die aromatischen Aminosäuren für Säuger essentiell sind, sie also keine Gene für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren besitzen, stellt dieser Syntheseweg in *A. fumigatus* ein mögliches Ziel für antimykotische Substanzen dar. In dieser Arbeit sollten verschiedene *A. fumigatus*-Stämme hergestellt werden, die Mutationen in unterschiedlichen Genen der Biosynthese aromatischer Aminosäuren aufweisen. Mit Hilfe dieser Stämme sollte die Rolle der Biosynthese aromatischer Aminosäuren für die Virulenz von *A. fumigatus* im Tiermodell untersucht werden.

4.2.1 Der Shikimat-Syntheseweg ist für *A. fumigatus* essentiell

In einer vorangegangenen Arbeit (Hamer, 2008) sollte eine *A. fumigatus*-Mutante hergestellt werden, die eine Auxotrophie für alle drei aromatischen Aminosäuren aufweist. Hierbei sollte das multifunktionelle Gen *aroM* (AFUA_1G13740) aus dem Shikimat-Syntheseweg deletiert werden, welches die Enzyme der Schritte zwei bis sechs exprimiert, die DAHP zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) umwandeln (vgl. Einleitung, Abbildung 2).

Die *aroM*-Deletionskassette wurde aus dem zuvor generierten Plasmid pSK443 durch Verdau mit *Hind*III isoliert und sollte durch doppeltes *crossing over*, über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des Gens, homolog in den *A. fumigatus*-Stamm AfS35 integriert werden (Abb. 24).

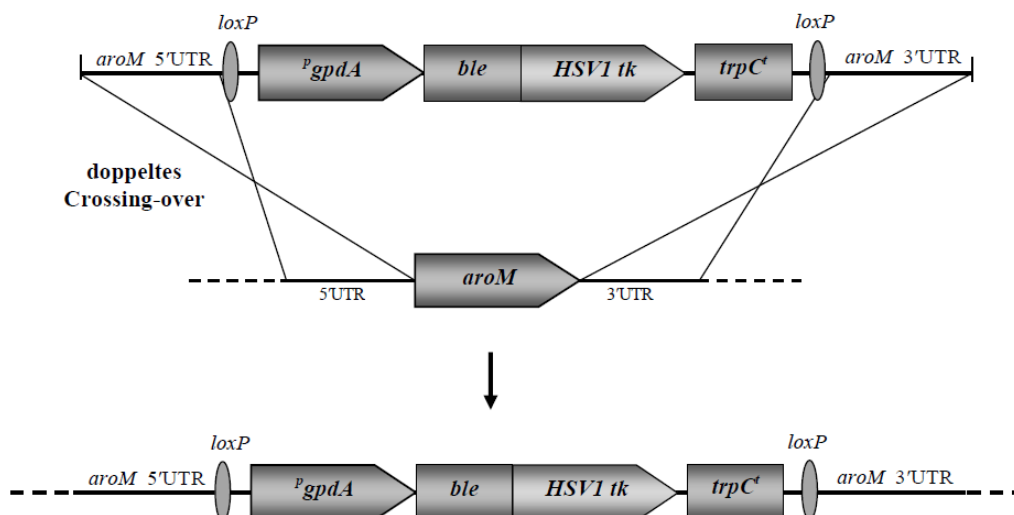


Abbildung 24: Generierung des Δ aroM-Stammes. Das Plasmid pSK443 wurde mit *Hind*III verdaut um die 6,3 kb große *aroM*-Deletionskassette durch ein doppeltes *crossing over* über die 5' und 3' -flankierenden Bereiche des *aroM*-Gens an entsprechender Stelle im Genom von *A. fumigatus* zu integrieren. Die Marker cassette besteht aus dem bakteriellen Phleomycin-Resistenzgen *ble* und dem Gen der Thymidin-Kinase des Herpes-simplex Virus 1 (HSV1 tk). Der *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* führt zu konstitutiver Transkription der Marker cassette. Über die flankierenden *loxP*-Regionen kann später der gesamte Markerbereich herausgeschnitten werden, sodass nur einer der *loxP*-Bereiche übrig bleibt.

Der Stamm AfS35 weist eine Deletion des *akuA*-Gens auf, was zu einer höheren homologen Rekombinationsrate führt als es bei dem entsprechenden Wildtyp der Fall ist (Krappmann *et al.*, 2006). Auffällig hierbei war, dass nur sehr wenige Klone nach der Transformation erhalten wurden, obwohl der Ausgangsstamm eine erhöhte homologe Rekombinationsrate ermöglicht, sodass normalerweise eher viele Klone erwartet werden. Da nach einer Transformation zunächst ein sogenanntes Heterokaryon entstehen kann, das zwei unterschiedliche Arten von Zellkernen enthält, von denen eine die Deletionskassette enthält, die andere hingegen das ursprüngliche Gen, ist es für eine genaue Charakterisierung der Transformanten notwendig, die erhaltenen Klone zu vereinzeln. Dies wird auf Selektivmedium bezüglich des integrierten Selektionsmarkers durchgeführt, wodurch nur noch diejenigen Sporen auskeimen, die die Resistenzkassette in ihr Genom aufgenommen haben. Nach zwei Vereinzelausstrichen der potentiellen Δ *aroM*-Klone blieben jedoch nur drei Klone übrig, die die Resistenzkassette enthielten, aber nicht auxotroph für die drei aromatischen Aminosäuren waren, sodass bei ihnen offensichtlich das *aroM*-Gen nicht deletiert worden war. Daher wurde vermutet, dass die Deletion des *aroM*-Gens einen lethalen Effekt für den Pilz hat. Die Primärklone, die auf Medium mit Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und PABA unter Selektionsdruck durch Phleomycin gewachsen waren, wurden deshalb mit Hilfe der sogenannten *heterokaryon rescue*-Analyse (Osmani *et al.*, 2006) überprüft, wobei die Primärtransformanten auf Minimalmedium mit Selektionsdruck (d. h. in Gegenwart des Antibiotikums) und auf Medium mit den drei Aminosäuren, sowohl mit als auch ohne Selektionsdruck, getestet wurden. Handelt es sich um ein essentielles Gen, können die Sporen, welche das ursprüngliche Gen noch exprimieren, nur auf Medium ohne Selektionsdruck auskeimen, wobei auf Selektivmedium weder die Sporen auskeimen, die die homolog integrierte Resistenzkassette enthalten, noch die Sporen, die sie nicht enthalten. Hierbei war auffällig, dass 21 der getesteten 24 Primärklone nicht in der Lage waren, auf selektivem Medium trotz Zugabe der Aminosäuren und PABA zu wachsen, wohingegen sie auf dem gleichen Medium ohne Selektionsdruck wachsen konnten (Abb. 25). Nur drei der insgesamt getesteten 24 Primärklone (Abb. 25 zeigt exemplarisch zwölf von ihnen) zeigten Wachstum auf Medium mit Selektionsdruck, wobei diese Klone nicht die Aminosäuren und PABA zum Auskeimen benötigten, was auf eine ektopische Integration der Deletionskassette hindeutet.

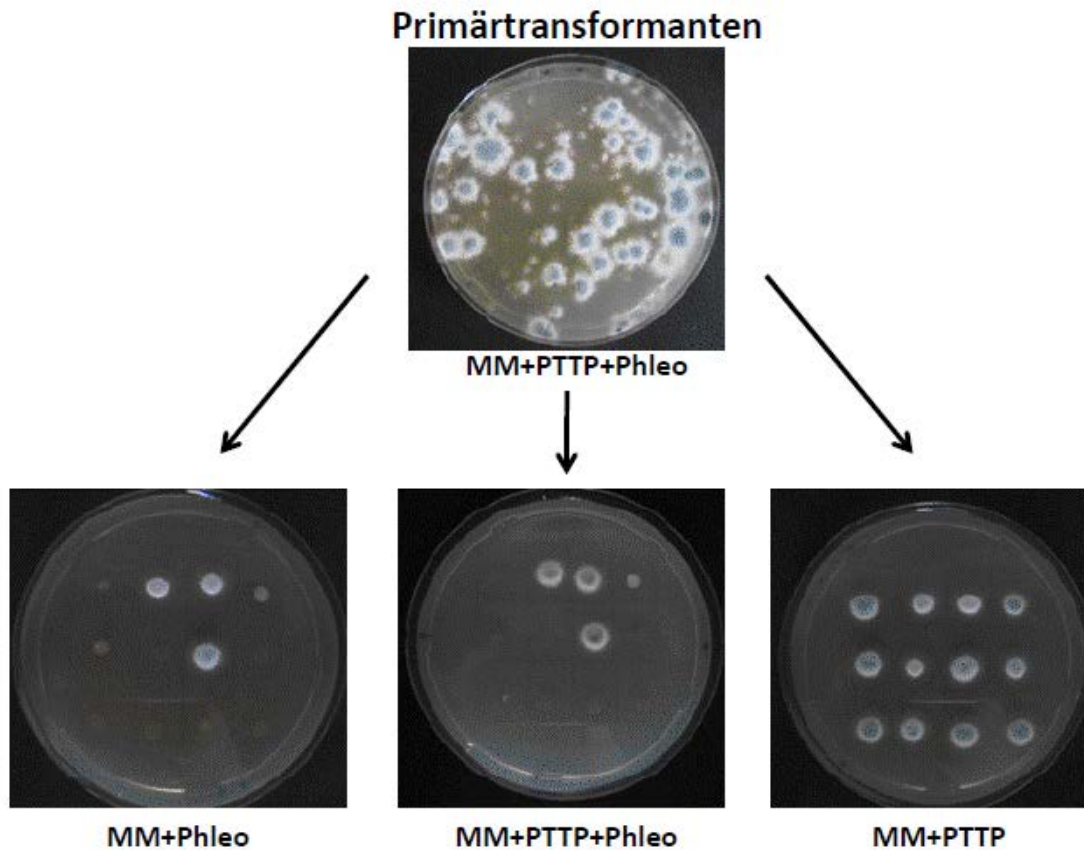


Abbildung 25: Heterokaryon-Rescue der Primärklone nach Transformation mittels *aroM*-Deletionskassette (Hamer, 2008). Sporen der Primärklone wurden phänotypisch auf Minimalmedium (MM) ohne bzw. mit Selektionsdruck (Phleo), ohne bzw. mit Zugabe von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und PABA (PTTP) untersucht. Nur drei der hier gezeigten zwölf Klone konnten auf selektivem Medium wachsen, was auf die Integration des Resistenzmarkers schließen lässt. Da diese Klone allerdings auch auf Selektivmedium ohne Aminosäuren und PABA wuchsen, wurde vermutet, dass die *aroM*-Deletionskassette ektopisch in den Stamm AfS35 integriert worden war.

Die Tatsache, dass alle Klone auf Medium ohne Selektionsdruck aber nur drei auf Selektivmedium wachsen, bei denen jedoch scheinbar keine homologe Integration der Deletionskassette erfolgt ist, weist darauf hin, dass das *aroM*-Gen unter den getesteten Bedingungen essentiell ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die Verwendung des Stammes AfS35 zu einer gesteigerten homologen Rekombinationsrate führt, jedoch im Falle der *aroM*-Deletionskassette ausschließlich Klone selektiert werden konnten, bei denen die Integration ektopisch erfolgt war.

Um dennoch eine Mutante zu generieren, die für alle drei aromatischen Aminosäuren auxotroph ist, wurde ein Plasmid kloniert, das eine Deletionskassette für die Deletion des Gens *aroB* (AFUA_1G06940) enthält, welches für die Chorismatsynthase, das letzte Enzym im Shikimat-Syntheseweg, kodiert. Hierfür wurde eine sogenannte β -Rec/*six*-Markerkassette gewählt (Hartmann *et al.*, 2010). Dieses System hat den Vorteil, dass eine in der Markerkassette integrierte Rekombinase abhängig von der Kohlenstoffquelle exprimiert wird,

sodass der Selektionsmarker durch Anwesenheit von Xylose *via* Rekombination zweier flankierenden *six*-Regionen herausgeschnitten wird, ohne dass eine erneute Transformationsrunde erfolgen muss. Wird mit Hilfe dieser Kassetten ein Gen deletiert, bleibt nach Exzision des Markers nur eine *six*-Region am ursprünglichen Genlokus zurück.

Nach Generierung des $\Delta aroB$ -Deletionskonstruktes (pAB28) konnte die 9,5 kb große Deletionskassette durch Restriktion mit *FspI* isoliert werden und sollte durch ein doppeltes *crossing over* in den Ausgangsstamm AfS35 über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des *aroB*-Gens integriert werden.

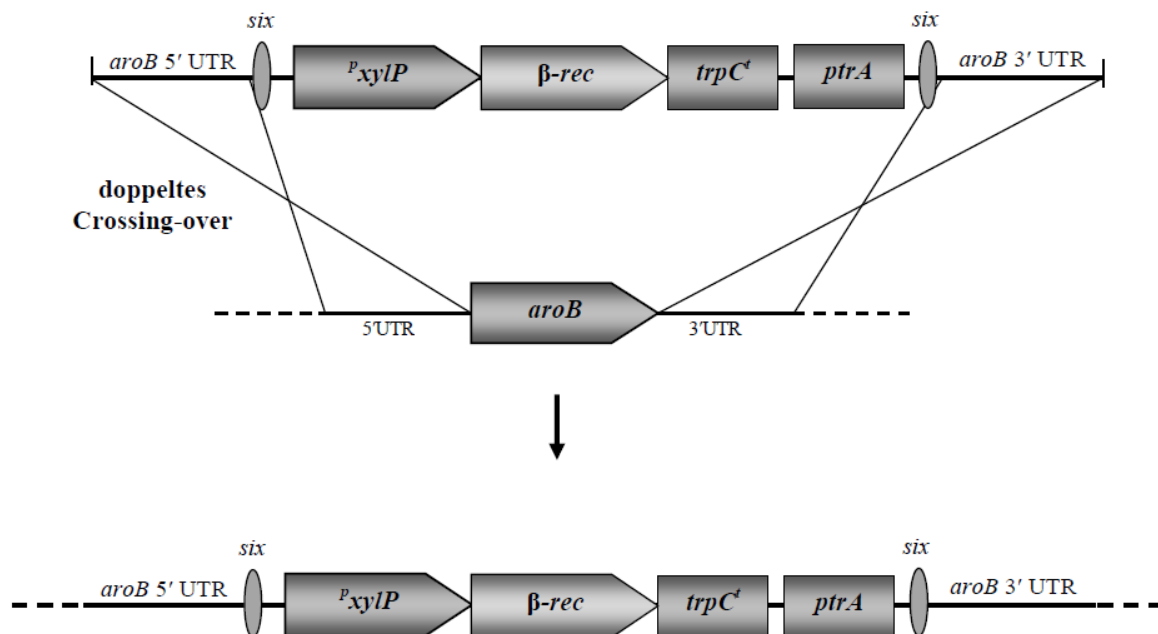


Abbildung 26: Generierung des $\Delta aroB$ -Stammes. Das Plasmid pAB28 wurde mit *FspI* verdaut um die 9,5 kb große *aroB*-Deletionskassette durch ein doppeltes *crossing over* über die 5' und 3' -flankierenden Bereiche des *aroB*-Gens an entsprechender Stelle im Genom von *A. fumigatus* zu integrieren. Die Transkription des β -Rekombinase-kodierenden Gens β -*rec* wird abhängig von der Kohlenstoffquelle durch den Promotor *xyIP* aus *P. crysogenum* reguliert. Das *ptrA*-Gen aus *A. oryzae* dient als Selektionsmarker und führt zu Resistenz gegenüber Pyrithiamin. Die flankierenden *six*-Regionen sind das Ziel der β -Rekombinase, welche bei Anwesenheit von Xylose die *six*-Regionen rekombiniert, sodass der gesamte Markerbereich herausgeschnitten wird und nur einer der *six*-Bereiche übrig bleibt.

Ebenso wie nach Transformation mittels *aroM*-Deletionskassette wurde beobachtet, dass die Transformationen nur eine geringe Ausbeute an Primärtransformanten lieferten, sodass nach sieben unabhängigen Transformationen nur etwa 70 Primärklone erhalten wurden. Während der beiden Vereinzlungsrunden gingen ein Großteil der Klone verloren, da sie nach Verlust des Heterokaryons nicht weiter auf Selektivmedium wachsen konnten. Nach zwei Vereinzlungsrunden blieben nur neun Klone übrig, die durch Southern-Hybridisierung überprüft werden konnten. Abbildung 27 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Hybridisierung nach Southern zweier Kandidaten. Beide Klone zeigten nicht die erwarteten Signale, für

Klon 1 wurde nur jeweils das gleiche Signal wie für den Ausgangsstamm AfS35 erhalten, für Klon 2 war zusätzlich zum erwarteten Signal für einen *aroB*-Deletionsstamm das Signal des Ausgangsstammes zu sehen, was auf ektopische Integration hindeutet.

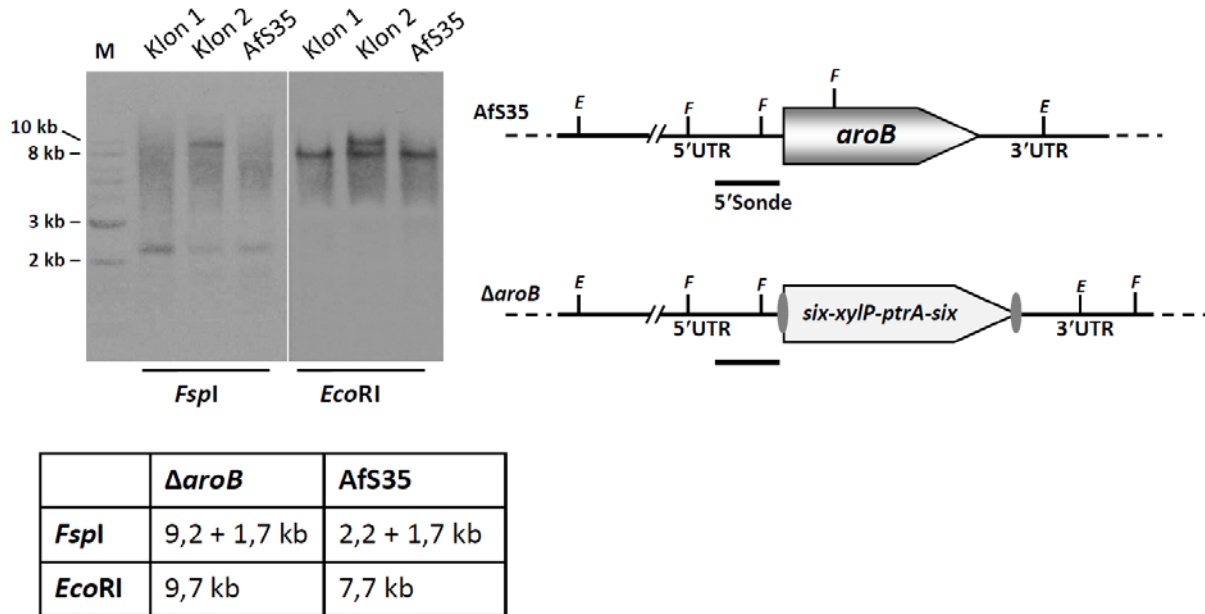


Abbildung 27: Southern-Hybridisierung der vereinzelt erhaltenen Klone nach Transformation von AfS35 mit der *aroB*-Deletionskassette. Links sind die Signale der Southern-Hybridisierung zu sehen, nach Restriktion der genomischen DNA der nach Transformation erhaltenen Klone und dem Ausgangsstamm AfS35 mit *FspI* bzw. *EcoRI* und nach Hybridisieren der verwendeten Sonde. Die entscheidenden Markersignale sind gekennzeichnet und der Marker mit M beschriftet. Die Tabelle darunter zeigt die erwarteten Signale der verschiedenen Stämme nach Verdau mit dem entsprechenden Enzym und nach Anlagerung der Sonde. Rechts ist eine schematische Abbildung des *aroB*-Gens bzw. des genomischen Lokus eines *aroB*-Deletionsstammes zu sehen. Der Bereich in dem die gewählte Sonde für die Southern-Hybridisierung bindet ist eingezeichnet, ebenso wie die Restriktionsstellen von *FspI* (F) und *EcoRI* (E). Bei allen gezeigten Stämmen ist das 1,7 kb große Fragment, dass nach Verdau mit *FspI* erwartet wurde fast nicht zu erkennen, was jedoch nicht relevant ist, da das jeweilige zweite Fragment nach Verdau mit diesem Enzym zu sehen ist. Klon 1 zeigt nur das Signal des Ausgangsstammes, was auf eine partielle Integration des Resistenzmarkers hindeutet. Klon 2 zeigt zusätzlich zum erwarteten Signal eines *aroB*-Deletionsstammes das Signal des Ausgangsstammes, was auf ektopische Integration hindeutet. Die Southern-Hybridisierung belegt daher, dass bei den Klonen 1 und 2 die *aroB*-Deletionskassette nicht homolog integriert wurde.

Bei keinem der neun Klone hatte eine homologe Rekombination der *aroB*-Deletionskassette an entsprechender Stelle im Genom stattgefunden, sodass ausschließlich ektopische Integration der Deletionskassette bzw. partielle Integration der Markerkassette nachgewiesen werden konnte. Daher wurde vermutet, dass auch die Deletion des *aroB*-Gens einen lethalen Effekt für den Pilz hat. Entsprechend wurden alle Primärklone, die nach Transformation von AfS35 mit der *aroB*-Deletionskassette erhalten worden waren, für ein *heterokaryon rescue* verwendet (Abb. 28). Im oberen Teil der Abbildung ist das Wachstum nach Auftropfen der Primärklone auf Minimalmedium mit den für eine *aroB*-Deletion

benötigten Aminosäuren und PABA sowohl mit als auch ohne Selektionsdruck (Pyriithiamin) zu sehen. Im Gegensatz zum Medium ohne Selektionsdruck wuchsen auf Medium mit Pyriithiamin nur sechs der Klone. Es wurden trotzdem von allen Klonen Vereinzelausstriche auf Medium mit angefertigt und insgesamt 20 Klone erhalten, die auf Selektionsdruck Einzelkolonien bildeten. Diese Klone wurden erneut auf Medium mit bzw. ohne Aminosäuren und mit bzw. ohne Selektionsdruck aufgetropft und deren Wachstum beobachtet (Abb. 28).

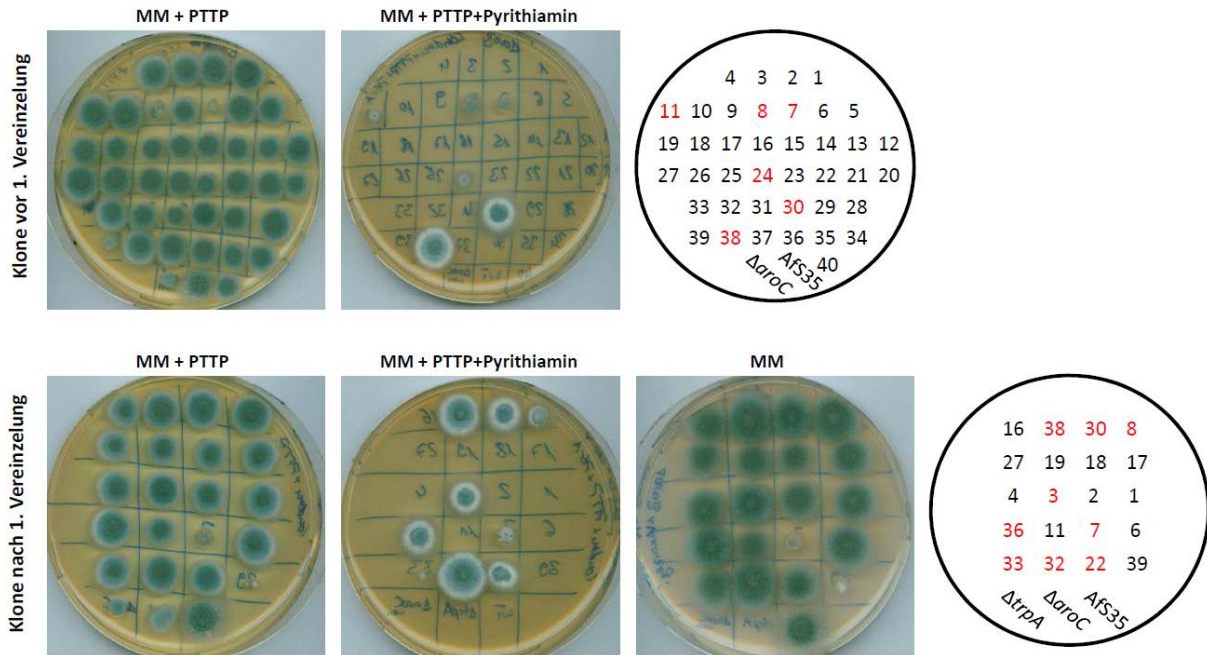


Abbildung 28: Heterokaryon-Rescue der nach Transformation erhaltenen Klone. Im oberen Teil wurden die Klone aufgetropft, die direkt nach Transformation erhalten wurden, hierbei wuchsen nur sechs der insgesamt 40 getesteten Klone auf Selektivmedium (Pyriithiamin). Im unteren Teil wurden jene Klone aufgetropft, die nach der ersten Vereinzelausstrichung erhalten wurden. Insgesamt neun Klone enthielten die Pyriithiamin-Resistenzkassette. MM steht für Minimalmedium, PTPP für Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und PABA, welche für einen erfolgreich generierten *aroB*-Deletionsstamm essentiell sein sollten. In den Pipettierschemata sind die Nummern der aufgetropften Klone und die zur Kontrolle verwendeten Stämme aufgeführt, wobei eine rote Markierung die Klone hervorhebt, welche unter Selektionsdruck auskeimen. Der Wildtyp (Afs35) und die *aroC*- bzw. *trpA*-Deletionsstämme wuchsen nur auf Platten, die kein Pyriithiamin enthielten, da sie keine entsprechende Resistenz besaßen. Die Kontrollstämme $\Delta aroC$ bzw. $\Delta trpA$ konnten aufgrund ihrer jeweiligen Auxotrophie zudem nur auf Medium wachsen, das mit den Aminosäuren supplementiert worden war.

Im unteren Teil der Abbildung 28 ist das Wachstum der Klone nach der ersten Vereinzelausstrichung zu sehen, wobei erneut auffällig war, dass nur neun der 20 Klone auf Selektionsdruck wachsen konnten. Bei diesen Klonen handelte es sich um die bereits über Southern-Hybridisierung untersuchten Kandidaten, die jedoch die Deletionskassette nicht homolog integriert hatten. Zudem konnten alle Klone nach der ersten Vereinzelausstrichung weiterhin auf Minimalmedium ohne die für eine erfolgreich generierte *aroB*-Deletion notwendigen Aminosäuren und PABA wachsen, was ebenfalls zeigt, dass bei diesen Klonen das *aroB*-Gen

noch vorhanden sein musste. Durch das *heterokaryon rescue* konnte folglich gezeigt werden, dass die Deletion von *aroB* in einer Lethalität der *A. fumigatus*-Klone resultierte, was auf ein weiteres essentielles Gen dieses Biosyntheseweges schließen ließ.

Um zu untersuchen, ob komplexe Vollmedien eine geeignete Bedingung für das Wachstum einer *aroB*-Deletion liefert und somit ein Auskeimen der Sporen trotz Verlust des Heterokaryons ermöglicht, wurden die Primärklone auf verschiedene Wachstumsmedien unter Selektionsdruck aufgetropft und deren Wachstum untersucht (Abb. 29).

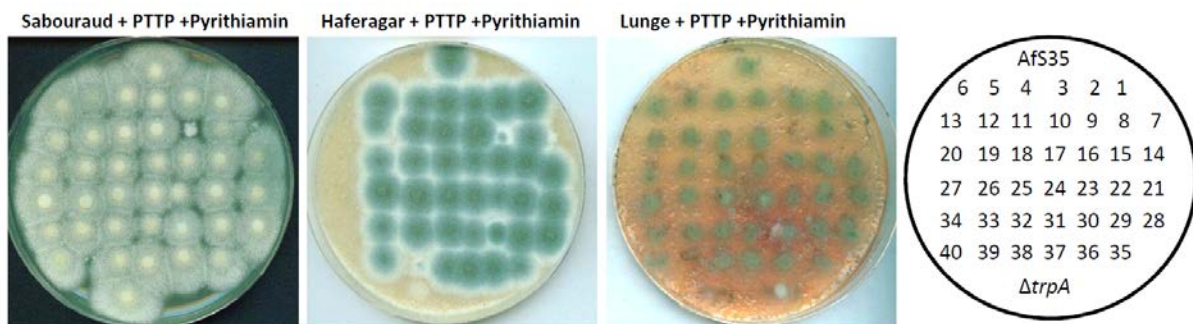


Abbildung 29: Phänotypische Charakterisierung der Primärklone nach Transformation von *A. fumigatus* mit der *aroB*-Deletionskassette. Die verwendeten Vollmedien wurden mit den drei aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) und PABA supplementiert (PTTP) und für die Selektion über die Resistenzkassette eine hohe Konzentration (400 ng/μl) an Pyrithiamin zugesetzt. Trotz der vierfach stärkeren Konzentration an Pyrithiamin konnten alle Klone auskeimen, unabhängig davon, ob sie die Pyrithiamin-Resistenzkassette enthielten oder nicht. Als Kontrolle dienten der Ausgangs- und ein *trpA*-Deletionsstamm, beide enthalten keinen Resistenzmarker gegenüber Pyrithiamin, konnten aber trotzdem auf den entsprechenden Medien wachsen.

Auf Vollmedium erweist sich die gleichzeitige Selektion über den Resistenzmarker jedoch als schwierig, da die Wirkung des verwendeten Antimykotikums stark beeinträchtigt ist. Daher wuchsen auch nach Supplementierung der Vollmedien mit der vierfachen der üblicherweise eingesetzten Pyrithiamin-Konzentration alle Primärklone unabhängig von ihrem Genotyp. Als Kontrolle wurden der Wildtyp- und ein *trpA*-Deletionsstamm (s.u.) verwendet, die beide keine Resistenz gegenüber Pyrithiamin besitzen, aber trotzdem auf den Vollmedien mit hoher Pyrithiamin-Konzentration wachsen konnten. Daher war es nicht möglich, Vollmedium für die Vereinzelausstriche zu verwenden, um gegebenenfalls aus den erhaltenen Primärtransformanten einen *aroB*-Deletionsstamm zu identifizieren.

Für einen weiteren Versuch, eine Mutante zu erhalten, die eine Deletion im *aroB*-Gen aufweist, wurde die Methode der konditionalen Expression *via* Tet-on-System angewendet. Diese Methode, die in anderen mikrobiellen Systemen hinlänglich etabliert ist, wurde für *A. fumigatus* erstmals von 2005 Vogt et al. beschrieben und vor Kurzem in *A. niger* optimiert (Meyer et al., 2011). Im nativen Tet-System bindet bei Abwesenheit von Tetracyclin das

Tetracyclin-Repressor-Protein (TetR) aus *E. coli* an den Tet-Operator (TetO) um die Expression des Tetracyclin-Resistenzgens zu reprimieren. Bei Anwesenheit von Tetracyclin bindet dieses an das Repressor-Protein, was zur Dissoziation von Repressor und Tet-Operator führt, wodurch das Resistenzgen exprimiert werden kann (Hillen und Berens, 1994). Für *C. albicans* wurde ein sogenanntes Tet-off System modifiziert und dabei das Tetracyclin-Repressor-Protein in einen von Tetracyclin abhängigen Transaktivator umfunktioniert, sodass bei Abwesenheit von Tetracyclin ein beliebig nachfolgendes Gen exprimiert wird (Nakayama *et al.*, 2000). Bei Anwesenheit von Tetracyclin dagegen dissoziieren Aktivator und Promotor, folglich wird die Genexpression inhibiert. Dieses System ist geeignet für die Reprimierung von Genen unter Bedingungen, die normalerweise zu deren Expression führen würden. Für einige Fragestellungen ist es jedoch besser ein umgekehrtes System zu verwenden, das die Expression von Genen unter Bedingungen erlaubt, die üblicherweise nicht zu deren Expression führen würde. Im daher abgewandelten Tet-on System bindet ein reverser Tet-Repressor bei Anwesenheit von Tetracyclin an den Operator, sodass bei diesen Bedingungen die Expression des nachfolgenden Gens erfolgt (Gossen *et al.*, 1995; Urlinger *et al.*, 2000).

Es wurde gezeigt, dass dieses System auch in *Aspergillus* funktionell ist (Vogt *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2011) und sich als Strategie eignet, konditionale Mutanten herzustellen, bei denen ein essentielles Gen trotz Deletion unter bestimmten Bedingungen funktionsfähig ist.

Das Plasmid pJW121 (Johannes Wagner, persönliche Mitteilung), basiert auf diesem regulierbaren Promotorsystem, das unabhängig vom Metabolismus ist und besteht aus zwei Expressionsmodulen. Ein Modul gewährleistet die konstitutive Expression eines Tetracyclin-abhängigen Transaktivators, wobei das andere Modul einen Promotor beinhaltet, der wiederum vom Transaktivator des ersten Moduls abhängig ist und die Expression des zu untersuchenden Gens kontrolliert. Mit Hilfe dieses Plasmids (pJW121) wurde ein Tet-on-*aroB*-Konstrukt hergestellt (Abb. 30). Die 7,3 kb große Tet-on-*aroB*-Kassette wurde mit *HpaI* verdaut und über ein doppeltes *crossing over* in den *A. fumigatus*-Stamm AfS35 integriert. Selektiert wurde auf Platten mit der entsprechenden Resistenz (Pyriminamin) und Doxycyclin, das als Derivat von Tetracyclin dazu führt, dass das *aroB*-Gen der Tet-on-*aroB*-Kassette exprimiert wird. Auf diese Weise konnten *A. fumigatus*-Klone erhalten werden, die bei Anwesenheit von Doxycyclin, durch Binden des reversen Tet-Repressors an den Operator, und daraus resultierender *aroB*-Expression, Wildtyp-Eigenschaften zeigen sollten. Bei Abwesenheit von Doxycyclin hingegen sollte das *aroB*-Gen nicht mehr exprimiert werden und somit der Stamm einer *aroB*-Deletion entsprechen.

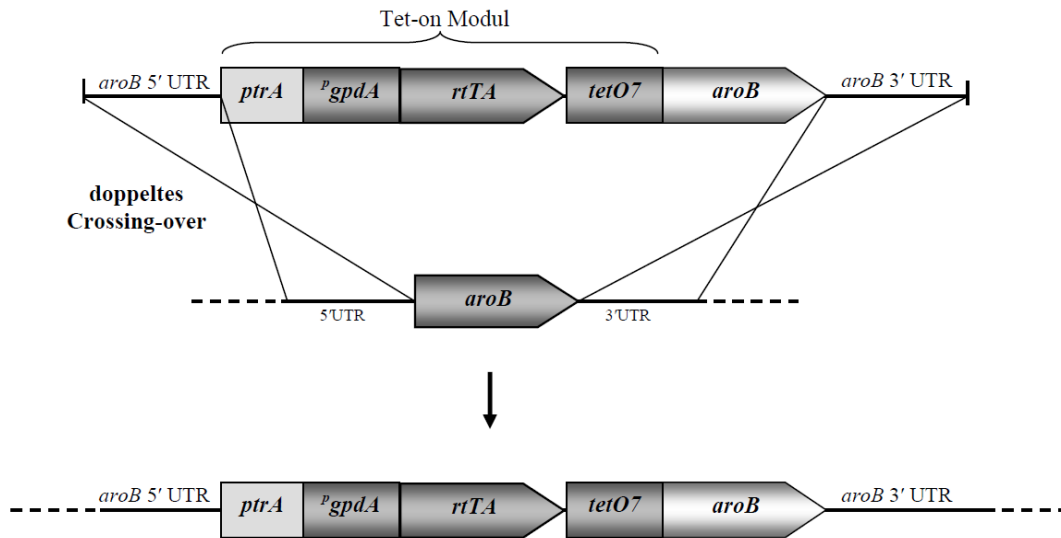


Abbildung 30: Generierung des Tet-on-*aroB*-Stammes. Das Plasmid pAB29 wurde mit *Hind*III verdaut um die 7,3 kb große Tet-on-*aroB*-Kassette durch ein doppeltes *crossing over* über die 5' und 3' -flankierenden Bereiche des *aroB*-Gens an entsprechender Stelle im Genom von *A. fumigatus* zu integrieren.

Die nach zwei Vereinzlungsrunden erhaltenen Klone wurden anschließend *via* Southern-Hybridisierung (Abb. 31) bezüglich der homologen Rekombination des Tet-on-*aroB*-Fragments überprüft.

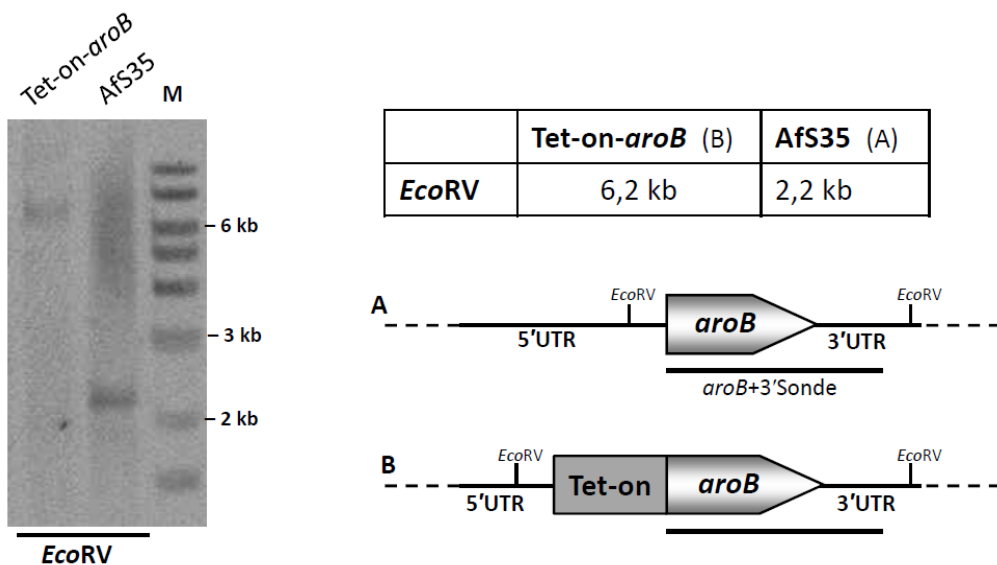


Abbildung 31: Southern Hybridisierung der Tet-on-*aroB* Mutante. Links sind die Signale der Southern-Hybridisierung zu sehen, nach Restriktion der genomischen DNA des Tet-on-*aroB*-Stammes und dem Ausgangsstamm mit *Eco*RV und nach Hybridisieren der verwendeten Sonde. Die entscheidenden Markersignale sind gekennzeichnet und der Marker mit M beschriftet. Die Tabelle rechts oben zeigt die erwarteten Signale der verschiedenen Stämme nach Verdau mit dem entsprechenden Enzym und nach Anlagerung der Sonde. Unter der Tabelle ist eine schematische Abbildung des *aroB*-Gens (A) bzw. des Tet-on-*aroB* Konstruktes (B). Der Bereich in dem die gewählte Sonde für die Southern-Hybridisierung bindet ist eingezeichnet, ebenso wie die Restriktionsstellen von *Eco*RV.

Anhand dieser Southern-Hybridisierung konnte der generierte Tet-on-*aroB*-Stamm validiert und somit für weitere phänotypische Untersuchungen verwendet werden.

Die phänotypischen Untersuchungen in Abbildung 32 zeigen, dass der Tet-on-*aroB*-Stamm auf unterschiedlichen Vollmedien nur wachsen kann, wenn zusätzlich Doxycyclin im Medium vorhanden ist. Auch die Zugabe von PABA (*p*-Aminobenzoesäure) und der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die die Auxotrophie einer Deletion des *aroB*-Gens komplementieren sollten, führten nicht zum Auskeimen der Sporen der Tet-on-*aroB*-Mutante. Das Ergebnis der phänotypischen Untersuchung des Tet-on-*aroB*-Stammes auf verschiedenen Vollmedien zeigt, dass auch unter diesen Bedingungen ein *A. fumigatus*-Stamm, der eine Deletion im *aroB*-Gen aufweist nicht wachsen kann.

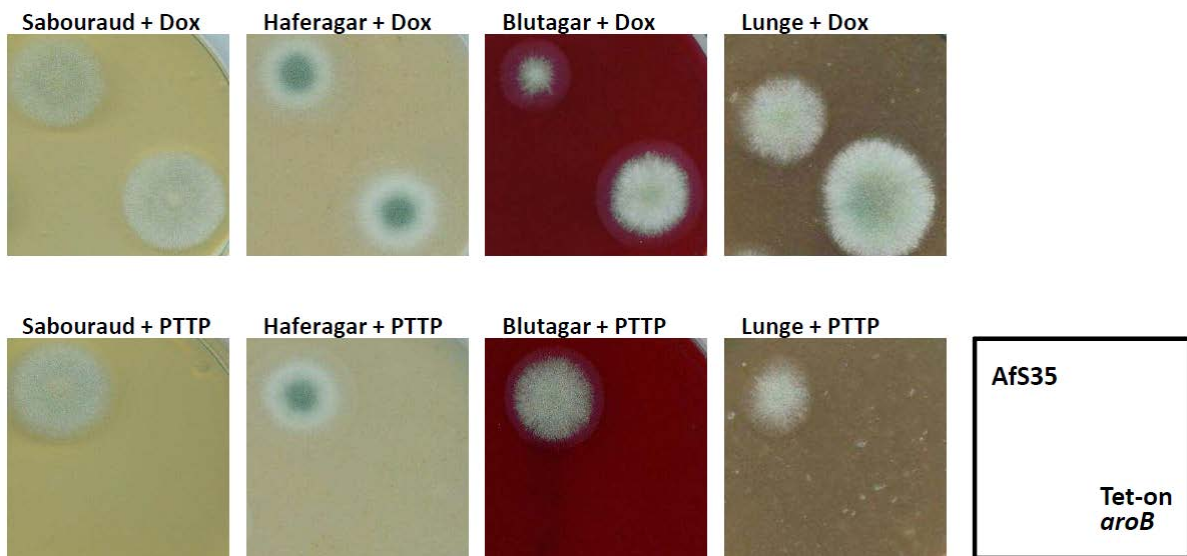


Abbildung 32: Phänotypische Untersuchung der Tet-on-*aroB*-Mutante. In der oberen Reihe sind die unterschiedlichen Vollmedien mit 1µg/ml Doxycyclin (Dox) supplementiert, wohingegen in der unteren Reihe die für eine *aroB*-Deletion benötigten Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) und PABA (*p*-Aminobenzoesäure) dem Medium zugesetzt wurden, was gekennzeichnet ist durch PTTP. Die Position der unterschiedlichen Stämme auf den Platten ist im Schema unten rechts abgebildet; es wurden jeweils 50 Sporen auf die entsprechende Position der Platten aufgetropft. Es ist deutlich zu sehen, dass der Tet-on-*aroB*-Stamm nur auf Vollmedium mit Doxycyclin wachsen kann.

Bei den phänotypischen Untersuchungen fiel auf, dass zum Teil einige Sporen des Tet-on-*aroB*-Stammes auf Medium ohne Doxycyclin auskeimten, jedoch deutlich weniger als beim Ausgangsstamm AfS35. Dies deutete darauf hin, dass bei einigen Sporen der reverse Tet-Repressor permanent an den Operator gebunden war, was nicht mehr über An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin reguliert werden konnte. Daraus resultierte eine permanente Expression von *aroB*. Unterstützt wurde diese Theorie durch die gleichen Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Johannes Wagner, der das Plasmid pJW121 zu Verfügung gestellt hatte (persönliche Mitteilung).

Um herauszufinden, wie hoch der Anteil an Sporen war, deren *aroB*-Expression permanent erfolgte, wurde ihre Keimrate auf Minimalmedium ohne Doxycyclin in verschiedenen Verdünnungsstufen einer zuvor ausgezählten Sporensuspension bestimmt (Abb.33). Es wurden vier unterschiedliche Sporenkonzentrationen (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) ausplattiert und nach Wachstum von zwei Tagen bei 37°C ausgezählt. Zum Vergleich wurde die geringste Sporenkonzentration zusätzlich auf Minimalmedium mit Doxycyclin ausplattiert und ausgezählt, um auszuschließen, dass die Sporen einen weiteren Defekt haben und um das korrekte Einstellen der Sporenkonzentration zu überprüfen.

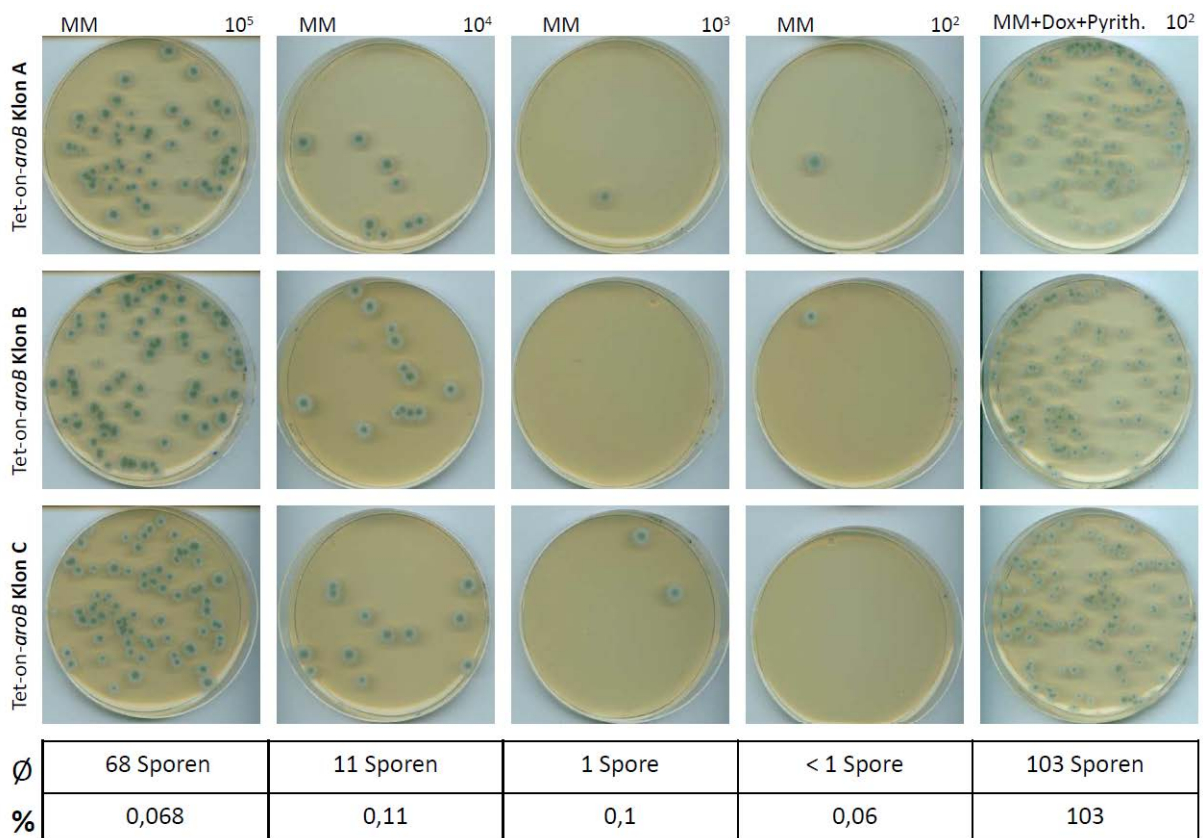


Abbildung 33: Bestimmung der Rate an Sporen die permanent Wildtyp-Signal zeigen. In den drei Reihen wurde von drei unabhängigen Klonen (A, B, C) der Tet-on-*aroB*-Mutante, eine unterschiedliche Anzahl an Sporen ($10^5, 10^4, 10^3, 10^2$) ausplattiert. MM steht für Minimalmedium ohne weitere Zusätze, Dox steht für Doxycyclin, Pyrith. steht für Pyrithiamin. Die Tabelle zeigt den Mittelwert (\bar{x}) der ausgekeimten Sporen der drei unabhängigen Klone und die daraus resultierende Rate (%) an Sporen mit *aroB*-Expression nach Berücksichtigung der ausplattierten Verdünnung. Es ist deutlich zu sehen, dass sich die drei unabhängigen Klone ähnlich verhalten und jeweils weniger als 1% der ausplattierten Sporen auskeimt. Zur Kontrolle sind in der rechten Spalte Platten abgebildet, die mit Doxycyclin und Pyrithiamin supplementiert worden waren, sodass hier alle Sporen auskeimen konnten, die das Tet-on-*aroB*-Konstrukt enthielten. Erwartungsgemäß keimten auf diesen Platten etwa 100% der ausplattierten Sporen aus.

Diese Untersuchungen ergaben, dass weniger als 1% der Sporen permanent auf Medium ohne Doxycyclin wachsen konnten und somit einen Wildtyp-Phänotyp zeigten. Da bei den vorangegangenen phänotypischen Untersuchungen des Tet-on-*aroB*-Stammes jedoch nur ca.

50 Sporen pro Stamm auf die unterschiedlichen Vollmedien aufgetropft worden sind, wurde dieser Effekt als nicht relevant für die beobachteten Ergebnisse eingestuft.

4.2.2 Deletion von *aroC* und *trpA* resultiert in Auxotrophie hinsichtlich der entsprechenden aromatischen Aminosäuren

In einer früheren Arbeit waren bereits zwei *A. fumigatus*-Mutanten hergestellt worden, bei denen die Gene *trpA* (AFUA_1G13090, Anthranilatsynthase) bzw. *aroC* (AFUA_5G13130, Chorismatmutase) deletiert worden waren (Hamer, 2008). Die jeweiligen Deletionskassetten aus den Plasmiden pSK444 (*aroC*-Deletionskonstrukt) bzw. pSK445 (*trpA*-Deletionskonstrukt) wurden durch zweifaches *crossing over* über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des entsprechenden Gens homolog in den Rezipientenstamm AfS35 integriert (Abb. 34).

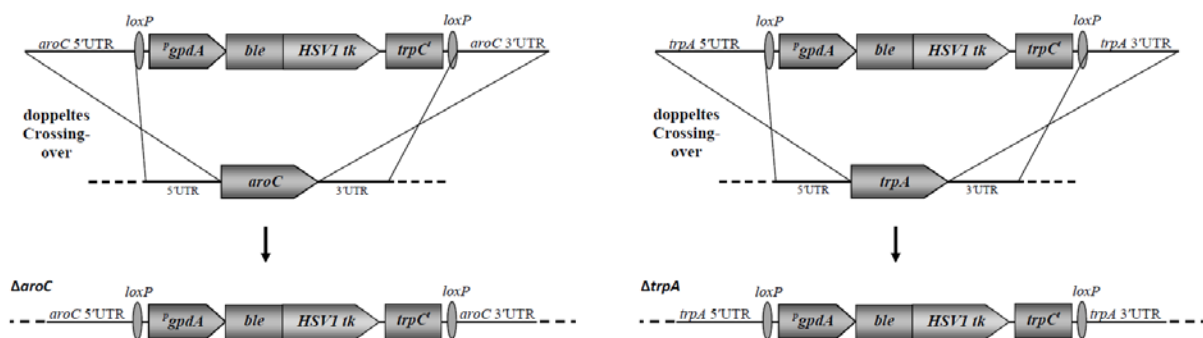


Abbildung 34: Generierung des $\Delta aroC$ - und $\Delta trpA$ -Stammes. Die Deletionskassetten aus den Plasmiden pSK444 und pSK445 wurden durch ein doppeltes *crossing over* über die 5' und 3' -flankierenden Bereiche des *aroC*-Gens (links) bzw. des *trpA*-Gens (rechts) an entsprechender Stelle im Genom von *A. fumigatus* integriert. Die Markerkassette besteht aus dem bakteriellen Phleomycin-Resistenzgen *ble* und dem Gen der Thymidin-Kinase des Herpes-simplex Virus 1 (HSV1 *tk*). Der *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* führt zu konstitutiver Transkription der Markerkassette. Über die flankierenden *loxP*-Regionen kann später der gesamte Markerbereich herausgeschnitten werden, sodass nur einer der *loxP*-Bereiche übrig bleibt (die genaue Vorgehensweise wird im folgenden Text beschrieben).

Um ausschließen zu können, dass die Phänotypen der Deletionen $\Delta aroC$ und $\Delta trpA$ auf der im Stamm enthaltenen Resistenzkassette beruht, wurde sich der Methode bedient, den Resistenzmarker über die vorhandenen *loxP*-Regionen mit Hilfe der *Cre*-Rekombinase zu entfernen (Krappmann *et al.*, 2005). Hierbei ist entscheidend, dass die Deletionskassette sich aus einem dominanten Resistenzmarker, in diesem Fall Phleomycin (*ble*), kombiniert mit einer Thymidin-Kinase (*tk*) aus dem Herpes simplex Virus Typ 1, welche zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Antimetaboliten 5-Fluor-2-Desoxyuridin (FUDR) führt, zusammensetzt. Konstitutive Expression dieses Markermoduls wird gewährleistet durch den *gpdA*-Promotor und den *trpC*-Terminator, wobei dieses Markermodul von zwei invertierten

Sequenzwiederholungen, sog. *loxP*-Regionen, flankiert wird (Abb. 35). Nach Transformation des Deletionsstammes mit dem autonom replizierenden Plasmid pSK215 dienen die *loxP*-Bereiche als Akzeptorstellen für die auf diesem Plasmid codierte *Cre*-Rekombinase, wodurch das gesamte Markermodul zwischen den *loxP*-Regionen aus dem genetischen Locus durch Rekombination herausgeschnitten wird. Da die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *niaD*-Promotors exprimiert wird, ist Nitrat als Stickstoffquelle notwendig, zusätzlich werden Plasmid-tragende Transformanten in Gegenwart von Pyrithiamin selektiert. Einzelkolonien, bei denen die *loxP*-Regionen erfolgreich rekombiniert wurden, zeigen daraufhin keine erhöhte Sensitivität für FUDR und können somit identifiziert werden. Nach erneutem Ausstreichen der Klone auf Medium ohne Pyrithiamin geht das autonom replizierende Plasmid pSK215 und damit auch die *ptrA*-Resistenz verloren, sodass eine Deletionsmutante ohne zusätzliche Resistenz erhalten wird. Der Vorteil hierbei ist, dass man auf diese Weise mehrere Mutationen in den gleichen Stamm einfügen und bei jeder Transformationsrunde den gleichen genetischen Selektionsmarker verwenden kann, der anschließend für erneute Transformationen zur Verfügung steht.

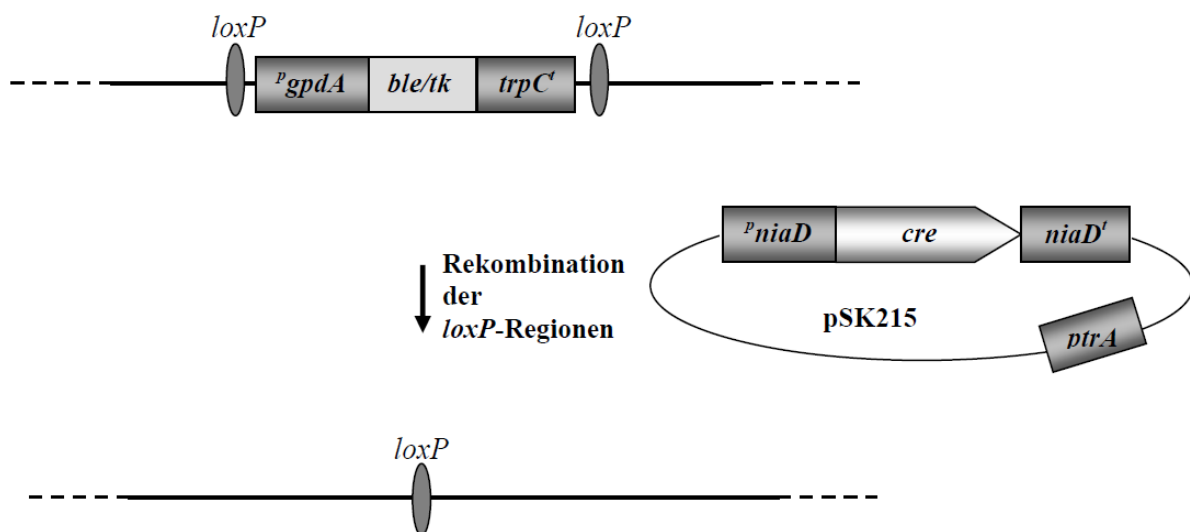


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Exzision des Resistenzmarkers (nach Krappmann *et al.*, 2005) Die *loxP*-Regionen dienen der *Cre*-Rekombinase des autonom replizierenden Plasmids pSK215 als Akzeptorstellen, wodurch der gesamte Bereich zwischen den beiden *loxP*-Bereichen herausgeschnitten wird.

Auf diese Weise wurde der Phleomycinresistenzmarker aus den beiden Deletionsstämmen AfS57 ($\Delta aroC$) und AfS58 ($\Delta trpA$) entfernt und die daraus resultierenden Stämme mit AfB31 (*aroC::loxP*) und AfB29 (*trpA::loxP*) bezeichnet.

Basierend auf den ursprünglichen Deletionsstämmen AfS57 ($\Delta aroC$) und AfS58 ($\Delta trpA$) wurden entsprechende Komplementationsstämmen generiert. Um hierbei den Schritt der

Marker-Exzision zu umgehen, aber trotzdem zwischen Wildtyp und Komplementation unterscheiden zu können, wurden Komplementationskonstrukte hergestellt, die jeweils eine Punktmutation in der 5'-Region des entsprechenden Gens enthielten, welche zum Verlust einer Restriktionsschnittstelle führten. Durch Verdau des generierten Plasmids pAB23 mit *HpaI* konnte die 5,4 kb große *trpA*-Komplementationskassette ausgeschnitten und über ein doppeltes *crossing over* über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche homolog in den *trpA*-Deletionsstamm AfS58 integriert werden. Entsprechend wurde die *aroC*-Komplementationskassette über Verdau mit *EcoRI* aus dem Plasmid pAB24 herausgeschnitten und ebenfalls homolog über ein doppeltes *crossing over* in den *aroC*-Deletionsstamm integriert.

Die daraus resultierenden Komplementationsstämme entsprachen, bis auf die entsprechende Punktmutation, in ihrem Genotyp dem Ausgangsstamm und wurden mit AfB32 (*caroC**) und AfB30 (*ctrpA**) bezeichnet.

Alle hergestellten Stämme wurden mittels Southern-Hybridisierung überprüft. Hierfür wurden Enzyme gewählt, die ein geeignetes Restriktionsmuster ergaben, so dass nach Hybridisierung mit einer im 3'-Bereich bindenden Sonde klar zwischen Deletionsstamm, Deletionsstamm mit recyceltem Marker und dem entsprechenden Komplementationsstamm im Vergleich zum Ausgangsstamm unterschieden werden konnte. Als Ausgangsstamm diente für alle hergestellten Mutanten der aromatischen Aminosäure Biosynthese der *A. fumigatus*-Stamm AfS35 (Krappmann *et al.*, 2006). In Abbildung 36 ist das Ergebnis der Southern-Hybridisierung der *trpA*-Mutantenstämme bzw. der *aroC*-Mutantenstämme und eine Übersicht der zu erwartenden Signale nach Restriktion der entsprechenden Enzyme und Anlagerung der gewählten Sonden zu sehen. Die Signale der Southern-Hybridisierung der $\Delta trpA$ - und $\Delta aroC$ -Mutantenstämme zeigten die erwarteten Größen, sodass die erfolgreiche homologe Rekombination bzw. die anschließende Exzision des Markers validiert werden konnte.

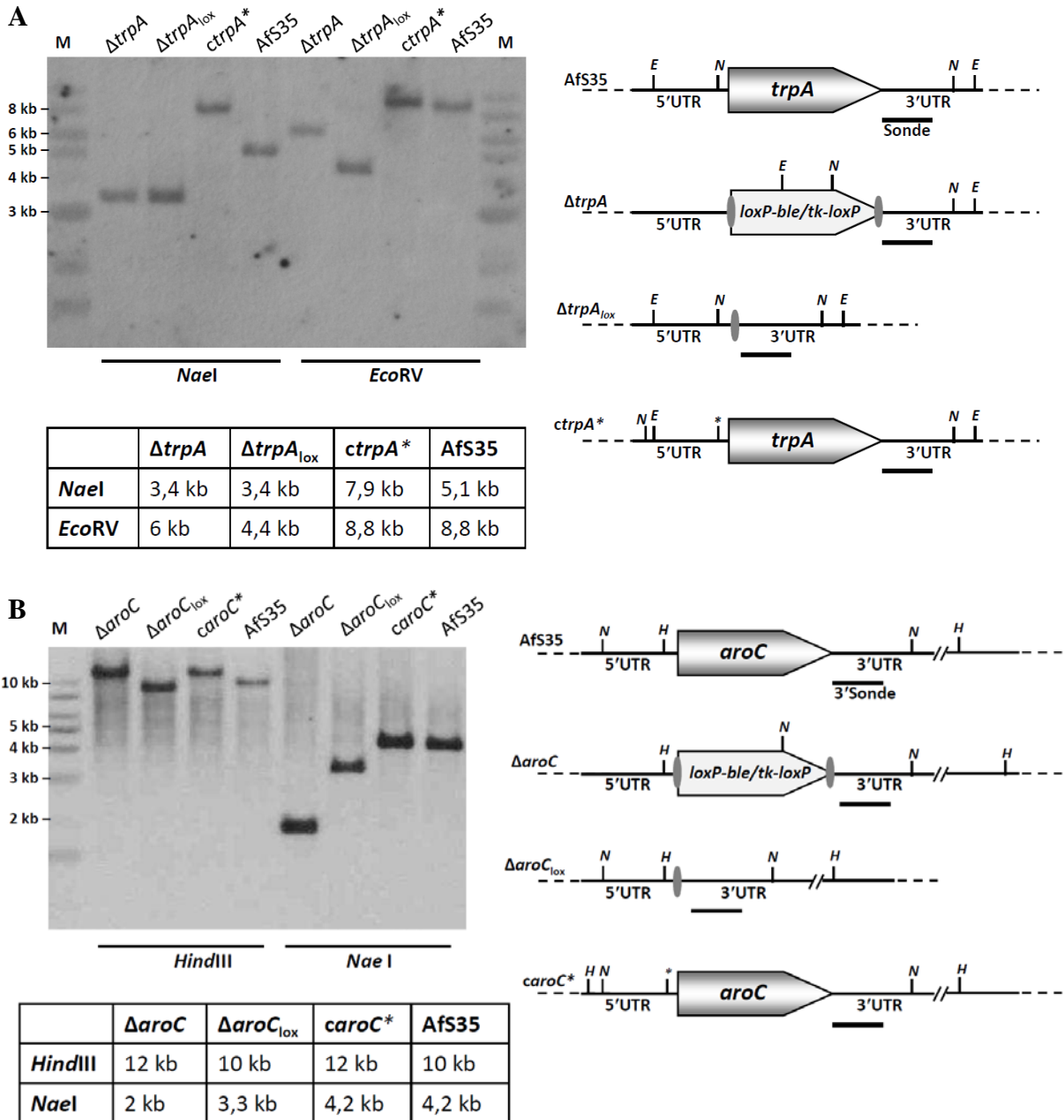


Abbildung 36: Southern-Hybridisierung der *trpA*- und *aroC*-Mutantenstämme. **A:** *trpA*-Mutantenstämme. **B:** *aroC*-Mutantenstämme. Jeweils links ist das Ergebnis der Southern-Hybridisierung zu sehen, nach Restriktion der genomischen DNA der drei Mutantenstämme und dem Ausgangsstamm AfS35 mit den jeweils verwendeten Enzymen und nach Hybridisieren der Sonde die im 3'UTR bindet. Die entscheidenden Markersignale sind gekennzeichnet und der Marker mit M beschriftet. Die Tabelle darunter zeigt die erwarteten Signale der verschiedenen Stämme nach Verdau mit dem entsprechenden Enzym und nach Anlagerung der Sonde. Rechts ist eine schematische Abbildung der unterschiedlichen Stämme zu sehen, wobei die *loxP*-Regionen als graue Ellipse dargestellt sind. Die Schnittstellen der verwendeten Enzyme *EcoRV*(E), *HindIII* (H) und *NaeI* (N), ebenso wie der Bereich, in dem die gewählte Sonde für die Southern-Hybridisierung bindet, sind eingezeichnet.

Die zuvor genotypisch überprüften Stämme wurden nun hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. In Abbildung 37 sind die entscheidenden Wachstumsunterschiede auf den getesteten Medien zu sehen. Wie erwartet, zeigte der $\Delta aroC$ -Stamm auf Minimalmedium erst nach Supplementierung der zwei Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin Wachstum, sodass

seine aufgrund der Deletion erwartete Auxotrophie bestätigt werden konnte. Durch Supplementierung von Prephenat, der letzten gemeinsamen Vorstufe des Phenylalanin/Thyrosin-Biosynthese-Zweiges, konnte der Phänotyp des $\Delta aroC$ -Stammes nicht aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Der $\Delta trpA$ -Stamm wuchs ausschließlich auf Minimalmedium, das die Aminosäure Tryptophan bzw. eine ihrer Vorstufen (Anthranilat) enthielt. Die entsprechenden Komplementationsstämme *caroC** und *ctrpA** konnten erwartungsgemäß den Phänotyp der Deletionen aufheben und zeigten ähnliches Wachstum wie der verwendete Ausgangsstamm AfS35. Auf Minimalmedium, das als einzige Stickstoffquelle BSA enthielt, wuchsen nur die Komplementationsstämme und der Ausgangsstamm, erst nach Zugabe der für die Deletionen benötigten Aminosäuren zeigten auch diese Stämme Wachstum. Auf Medium mit Pepton bzw. Pepton und BSA als alleinige Stickstoffquellen konnte der *trpA*-Deletionsstamm im Gegensatz zum *aroC*-Deletionsstamm zumindest Luftmyzel bilden, wobei es jedoch nicht zur Bildung von Sporen kam. Nach Supplementierung dieser Medien mit den entsprechenden Aminosäuren war es beiden Deletionsstämmen möglich, sowohl Myzel als auch Sporen zu bilden.

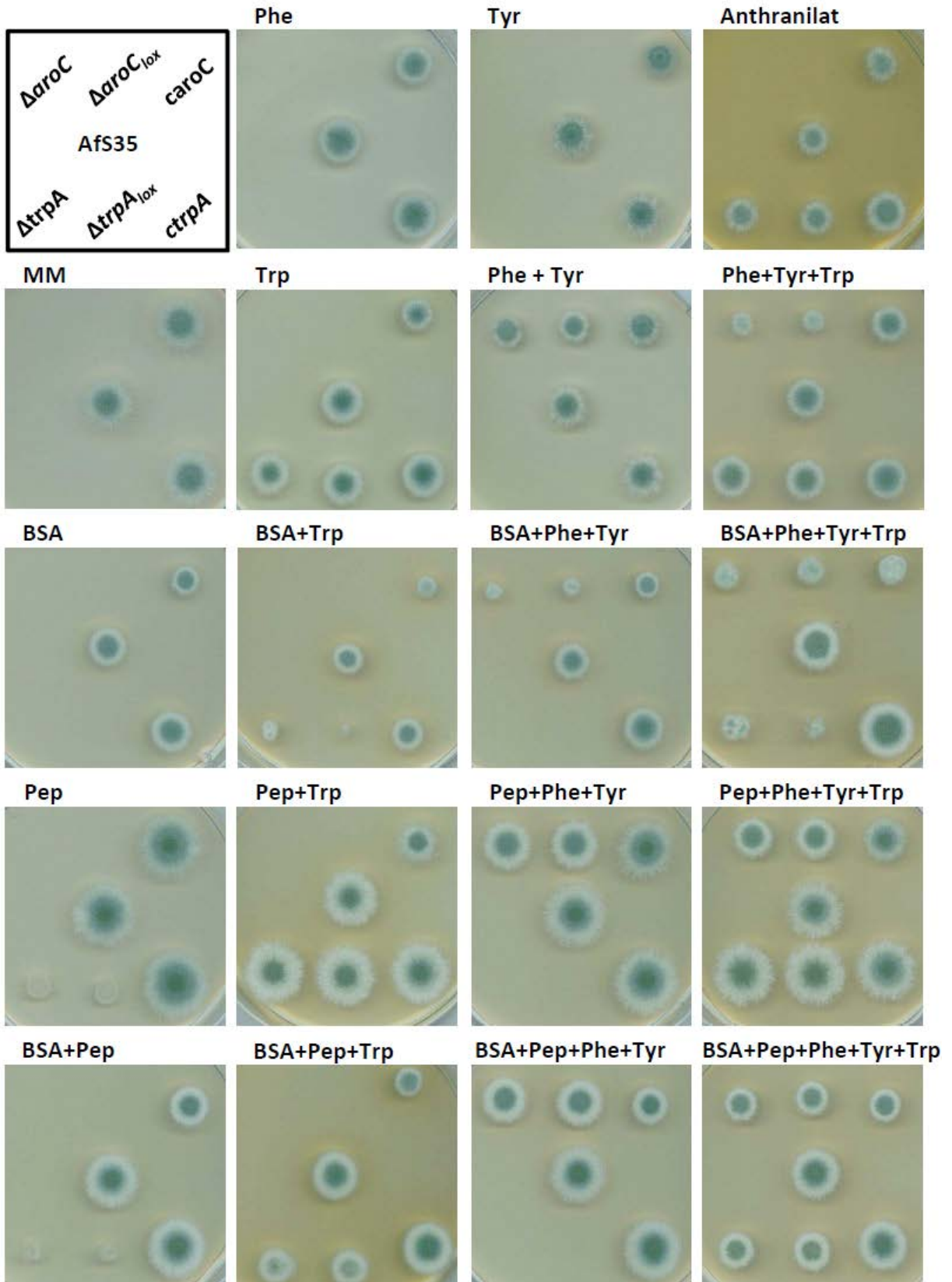


Abbildung 37: Phänotypische Untersuchung auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Supplementen. In den oberen zwei Reihen ist Minimalmedium mit den entsprechenden Aminosäuren (Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp)) bzw. der Vorstufe Anthranilat zu sehen. In der dritten Reihe ist Rinderserumalbumin (BSA) als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden, zusätzlich wurde teilweise mit den für die Deletionen benötigten Aminosäuren supplementiert. In der vierten Reihe ist Pepton (Pep) als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden, auch hier wurde teilweise mit den entsprechenden Aminosäuren supplementiert. In der fünften Reihe wurden BSA und Pepton als Stickstoffquellen verwendet und die entsprechend beschrifteten Aminosäuren supplementiert. Die Position der unterschiedlichen Stämme auf den Platten ist im Schema oben links abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, dass die Stämme *caroC** und *trpA** den Phänotyp ihrer jeweiligen Deletion aufheben. Die *aroC*-Deletionsstämme ($\Delta aroC$ und $\Delta aroC_{lox}$) hingegen zeigen nur auf Medien Wachstum, bei denen die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin hinzugegeben wurden. Die *trpA*-Deletionsstämme ($\Delta trpA$ und $\Delta trpA_{lox}$) wachsen auf Medium mit Tryptophan, zeigen allerdings auch auf Medium mit Pepton als einziger Stickstoffquelle und ohne Tryptophan ein verzögertes Wachstum, das durch Supplementierung von Tryptophan fast aufgehoben wird. Auf Platten mit BSA und Pepton wachsen alle Deletionsstämme, sofern die benötigten Aminosäuren supplementiert sind, jedoch etwas schlechter als der Ausgangsstamm AfS35.

Nachdem die $\Delta aroC$ - und $\Delta trpA$ -Mutantenstämme hinsichtlich ihrer Auxotrophien auf verschiedenen Minimalmedien überprüft worden waren, wurden sie auch auf unterschiedlichen komplexen Vollmedien phänotypisch untersucht. Da sich die Deletionsstämme, bei denen der Resistenzmarker entfernt worden war, phänotypisch nicht von den Deletionsstämmen mit Marker unterschieden, sind im Folgenden für die phänotypische Untersuchung der Stämme auf verschiedenen Vollmedien nur die Deletionsstämme ohne Marker ($aroC_{lox}$ bzw. $trpA_{lox}$) gezeigt (Abb. 38). Auf Sabouraud-Medium bildeten die Komplementationsstämme und der Ausgangsstamm AfS35 Myzel, jedoch kaum Sporen. Der $\Delta aroC$ -Stamm zeigte kein Wachstum, der $\Delta trpA$ -Stamm nur ganz geringes Wachstum, das allerdings nicht vergleichbar war mit dem des rekonstituierten Stammes. Nach Supplementierung der drei Aminosäuren zeigte auch der *trpA*-Deletionsstamm ein ähnliches Wachstum wie der Komplementationsstamm, der $\Delta aroC$ -Stamm war jedoch nicht in der Lage auszukeimen. Auf Haferflockenagar keimten die rekonstituierten Stämme und der Ausgangsstamm aus und bildeten Sporen, der *trpA*-Deletionsstamm bildete Myzel nur in sehr begrenztem Umfang, der $\Delta aroC$ -Stamm konnte nicht auskeimen. Auch auf diesem Medium war nach Zugabe der aromatischen Aminosäuren das Wachstum des *trpA*-Deletionsstammes vergleichbar mit dem des Rekonstitutionsstammes, der $\Delta aroC$ -Stamm zeigte dagegen leicht vermindertes Wachstum, konnte aber trotzdem Sporen bilden. Auf Agarplatten, die zermörserte Schweinelunge enthielten, konnten erneut nur die rekonstituierten Stämme und der Ausgangsstamm Sporen bilden. Auch eine Zugabe der aromatischen Aminosäuren zeigte kaum Sporenbildung der beiden Deletionsstämme. Auf Blutagarplatten sporulierten alle generierten Stämme, wobei der *aroC*-Deletionsstamm ein etwas geringeres Ausmaß an Wachstum zeigte und der $\Delta trpA$ -Stamm hauptsächlich im Zentrum der Kolonie Sporen bildete.

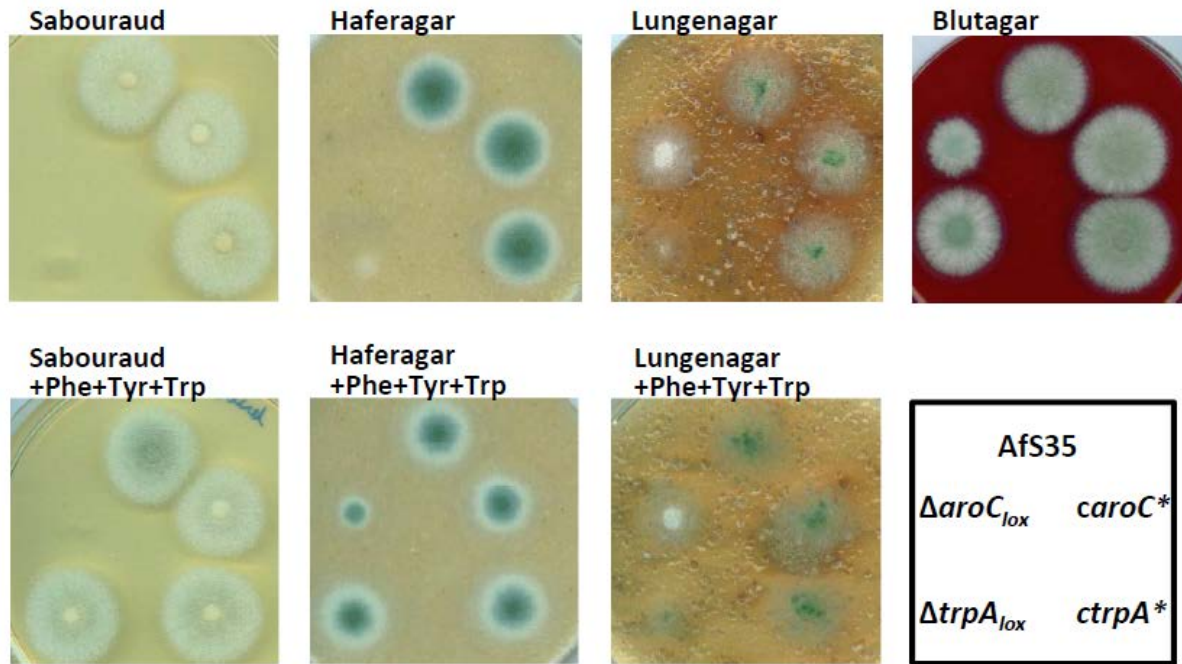


Abbildung 38: Phänotypische Untersuchung auf unterschiedlichen Vollmedien. In der oberen Reihe sind die verschiedenen Vollmedien zu sehen, wohingegen in der unteren Reihe die für die Deletionen benötigten Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) supplementiert wurden (mit Ausnahme der Blutplatte). Die Position der unterschiedlichen Stämme auf den Platten ist im Schema unten rechts abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, dass das Wachstum der beiden Komplementationsstämme *caroC** und *ctrpA** sich nicht von dem des Ausgangsstammes (AfS35) unterscheidet. Der *aroC*-Deletionsstamm ($\Delta aroC_{10x}$) hingegen zeigte auf allen Medien ein deutliches Wachstumsdefizit, die Wachstumsverzögerung des *trpA*-Deletionsstammes hingegen konnte durch Supplementierung der drei Aminosäuren mehr oder weniger aufgehoben werden.

Die Beobachtung, dass der *aroC*-Deletionsstamm auf Lungen- und Blutagar ein deutlich vermindertes Wachstum im Vergleich zu den anderen Stämmen aufweist, machte diesen Stamm zu einem interessanten und vielversprechenden Kandidaten für Virulenzstudien im Mausmodell.

4.2.3 Der *aroC*-Deletionsstamm zeigt einen Wachstumsdefekt in Flüssigmedium

Beim Herstellen von Flüssigkulturen der beiden Deletionsstämme fiel auf, dass nach Inokulation mit Sporen des *aroC*-Deletionsstammes im Vergleich zu den anderen Stämmen fast kein Myzel gebildet wurde, obwohl Phenylalanin und Tyrosin dem Medium ausreichend zugefügt waren, sodass Nährstoffmangel ausgeschlossen werden konnte. Daher sollte die Keimrate der Sporen des *aroC*-Deletionsstammes im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht werden. Von beiden Stämmen wurden jeweils 2000 Sporen in 500 μ l Flüssigmedium angeimpft und 16 Stunden bei Raumtemperatur zum Anschwellen der Sporen inkubiert. Anschließend wurde das Auskeimen der Sporen bei 37°C im Live-Imaging-Mikroskop beobachtet (Abb. 39). Hierbei war auffällig, dass die Sporen des *aroC*-

Deletionsstammes im Gegensatz zu denen des Ausgangsstammes AfS35 während der 16-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur nicht angeschwollen waren. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der Ausgangsstamm bereits nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C Keimschläuche bildete, die nach 45 bzw. 60 Minuten deutlich gewachsen waren, wohingegen die Sporen des *aroC*-Deletionsstammes unverändert aussahen.

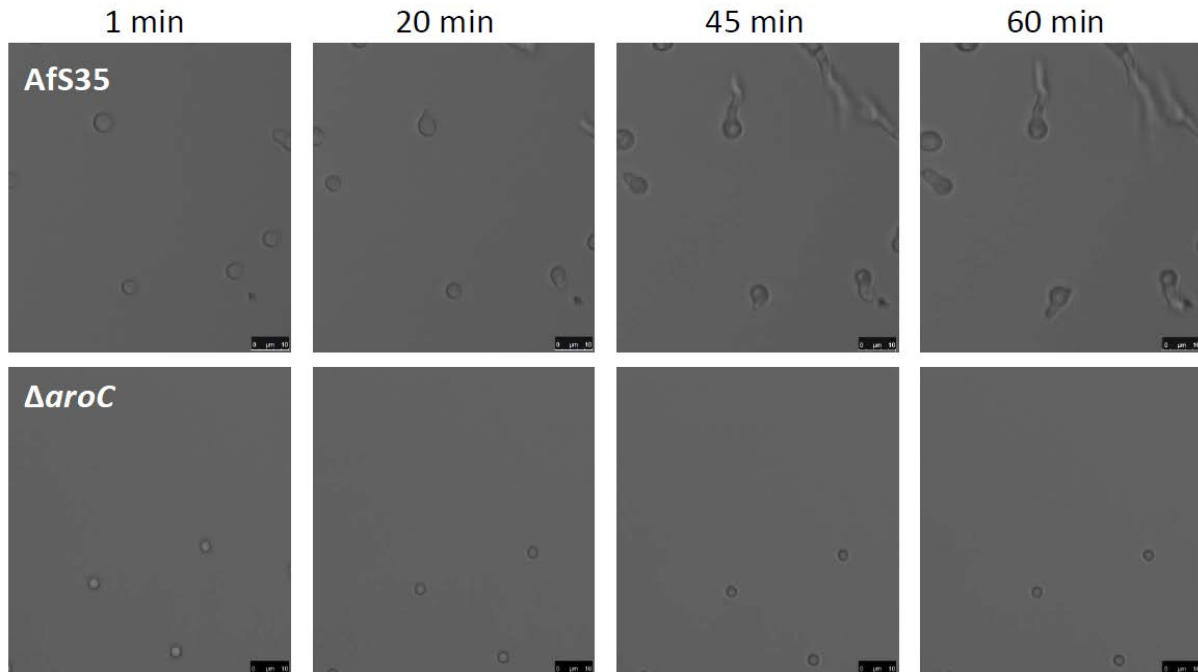


Abbildung 39: Live-Imaging-Mikroskopie nach 16-stündiger Inkubation der Sporen bei Raumtemperatur. Oben sind die angeschwollenen Sporen des Ausgangsstammes AfS35 zu sehen, darunter die nicht angeschwollenen Sporen des *aroC*-Deletionsstammes. Die Zeitpunkte geben die Inkubationsdauer der vorinkubierten Sporen bei 37°C an. Der schwarze Balken unten rechts im jeweiligen Bild kennzeichnet die Größe von 10 µm.

Um die Keimrate der Sporen der unterschiedlichen Stämme miteinander zu vergleichen, wurden erneut 2000 Sporen des jeweiligen Stammes in 500 µl Flüssigmedium angeimpft und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert, bis bei der Wildtyp-Probe deutlich Myzelbildung zu sehen war. In Abbildung 40 sind die Aufnahmen der unterschiedlichen Stämme zu sehen, wobei der Ausgangsstamm AfS35 stark verzweigtes Myzel gebildet hatte. Die Komplementationsstämme *caroC** und *ctrpA** zeigten ebenfalls verzweigtes Myzel, wohingegen der *aroC*-Deletionsstamm einen deutlichen Defekt in der Myzelbildung aufweist. Es ist zu sehen, dass die meisten Sporen dieses Stammes zwar Keimschläuche bilden, diese aber deutlich kürzer sind als beim Komplementationsstamm *caroC** und zudem keinerlei Verzweigung aufweisen, wie es üblicherweise bei Myzelbildung zu sehen ist. Bei der Probe des *trpA*-Deletionsstammes waren einige wenige Sporen zu sehen, deren Keimschläuche

deutlich verzögert ausgebildet wurden, jedoch wurde hier größtenteils verzweigtes Myzel beobachtet, das vergleichbar war mit dem des rekonstituierten Stammes *ctrpA**.

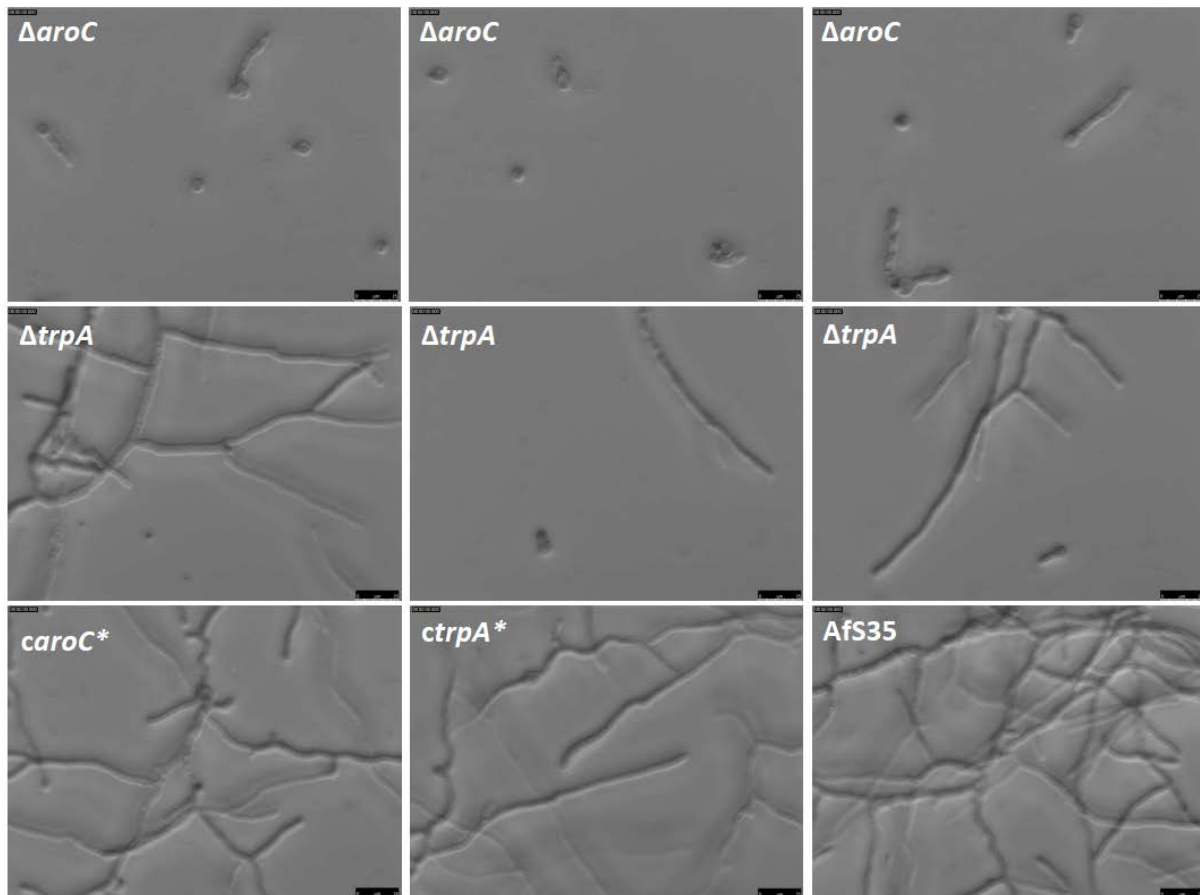


Abbildung 40: Mikroskopie nach 18-stündiger Inkubation der Sporen bei 37°C. Zu sehen sind die Aufnahmen im Lichtmikroskop (Differential-Interferenz-Kontrast) nach Inkubation der Sporen unterschiedlicher *aroC*- und *trpA*-Mutantenstämme für 18 Stunden bei 37°C. In der oberen Reihe sind drei Ausschnitte der Probe mit Sporen des *aroC*-Deletionsstammes (Δ *aroC*) zu sehen, darunter drei Ausschnitte der Probe des *trpA*-Deletionsstammes (Δ *trpA*). Unten ist jeweils ein Ausschnitt der Proben mit den rekonstituierten Stämmen (*caroC** bzw. *ctrpA**) und dem Ausgangsstamm AfS35 zum Vergleich abgebildet. Die Sporen des *aroC*-Deletionsstammes zeigen im Vergleich zu den anderen Stämmen einen deutlichen Defekt in der Myzelbildung.

Mit Hilfe dreier unabhängiger Untersuchungen der Sporen-Keimrate *via* Live-Imaging-Mikroskopie konnte die Keimrate des *aroC*-Deletionsstammes und des rekonstituierten Stammes im Vergleich zu der des Ausgangsstammes AfS35 bestimmt werden (Abb. 41). Das Balkendiagramm der Sporen-Keimrate zeigt, dass insgesamt nur etwa 50% der Sporen des Ausgangsstammes (AfS35) und des rekonstituierten Stammes (*caroC**) nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C auskeimten. Die Rate an auskeimenden Sporen des *aroC*-Deletionsstammes, von denen nur etwa 30% auskeimten, war noch niedriger. Dieses Ergebnis verdeutlicht zunächst, dass ohnehin nicht alle Sporen der verwendeten Suspensionen keimfähig sind, wobei die Differenz zwischen Sporen-Keimrate von AfS35 zum *aroC*-Deletionsstamm nicht so gravierend erscheint, wie es anhand der fast vollständigen

Abwesenheit von Myzel in der Flüssigkultur zu erwarten war. Dieser Effekt scheint jedoch in der geringen Größe der Keimschläuche und dem Fehlen von verzweigtem Myzel begründet zu sein, wie es anhand der mikroskopischen Aufnahmen (in Abb. 40) beobachtet wurde.

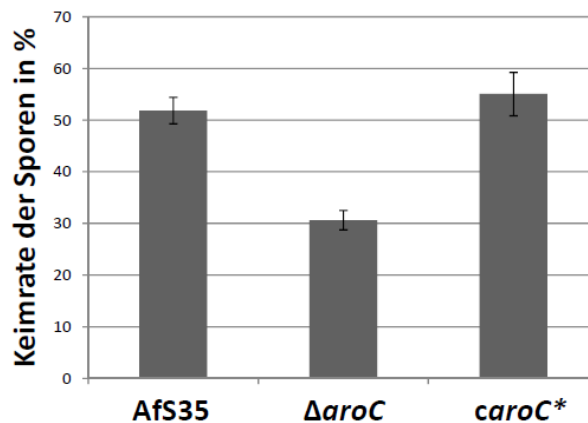


Abbildung 41: Sporen-Keimrate der unterschiedlichen Stämme. Anhand von drei unabhängigen Auswertungen mittels Mikroskopie wurde die Keimrate der Sporen des *aroC*-Deletionsstammes ($\Delta aroC$), des rekonstituierten Stammes (*caroC**) und des Ausgangsstammes bestimmt (Afs35). Von den Sporen des Ausgangsstammes und des Komplementationsstammes keimten nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C nur etwa 50% aus, wohingegen die Rate an auskeimenden Sporen des *aroC*-Deletionsstammes mit 30% noch niedriger lag.

4.2.4 Ein *A. fumigatus*-Stamm mit einer $\Delta trpA$; $\Delta aroC$ -Doppeldelation ist nicht lebensfähig

In Abschnitt 4.2.1 wurden bereits mehrere Versuche beschrieben, einen *A. fumigatus*-Stamm herzustellen, der eine Deletion im Shikimatsyntheseweg aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von zwei unterschiedlichen Genen des Shikimatweges zur Lethalität des Pilzes führt, was darauf hindeutet, dass dieser Biosyntheseweg essentiell für *A. fumigatus* ist. In Abschnitt 4.2.2 konnte jedoch gezeigt werden, dass es möglich war, Deletionsstämme zu generieren, die Deletionen in einem der nachfolgenden Äste des Shikimat-Syntheseweges aufweisen. Durch Deletion des Gens *trpA*, welches im Tryptophan-Zweig für die Anthranilat-Synthase codiert, die das durch den Shikimat-Weg synthetisierte Chorismat zu Anthranilat umsetzt, konnte ein *A. fumigatus-trpA*-Deletionsstamm generiert werden, der erwartungsgemäß auxotroph für Tryptophan war. Deletion des Gens *aroC*, welches im Phenylalanin/Tyrosin-Zweig für eine Chorismatmutase codiert, die Chorismat zu Prephenat umwandelt, führte zum *aroC*-Deletionsstamm, der auxotroph für die Endprodukte (Phenylalanin und Tyrosin) dieses Biosynthese-Zweiges war. Wäre es nun möglich, anhand der bisher generierten Deletionsstämme der zwei Äste in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, einen Deletionsstamm herzustellen, der Deletionen in beiden Zweigen aufweist, müsste dieser auxotroph für alle drei aromatischen Aminosäuren sein.

Durch zweifaches *crossing over* über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche sollte die *aroC*-Deletionskassette homolog in den *trpA::loxP*-Stamm integriert werden, was zu einem Doppeldeletionsstamm $\Delta trpA;\Delta aroC$ führen sollte. Genau wie bei den Versuchen einen *aroM*- bzw. *aroB*-Deletionsstamm herzustellen, fiel hierbei erneut auf, dass nur sehr wenige Klone nach der Transformation erhalten wurden, von denen zudem nach erfolgter Vereinzlung auf Selektivmedium kaum Klone verblieben. Insgesamt wurden Klone von 17 unabhängigen Transformationen untersucht, von denen insgesamt etwa 120 Primärklone erhalten wurden. Nach der zweiten Vereinzlung auf Selektivmedium blieben insgesamt nur sieben Klone übrig, bei denen sich nach Southern-Hybridisierung allerdings herausstellte, dass bei ihnen eine ektopische Integration der Deletionskassette erfolgt war, und es sich nicht um $\Delta trpA$ -Stämme mit zusätzlicher Deletion im *aroC*-Lokus handelte. In Abbildung 42 ist exemplarisch das Ergebnis der Southern-Hybridisierung zu sehen, bei der zwei der sieben Klone im Vergleich zum *aroC*-Deletionsstamm und dem ursprünglichen Ausgangsstamm AfS35 abgebildet sind.

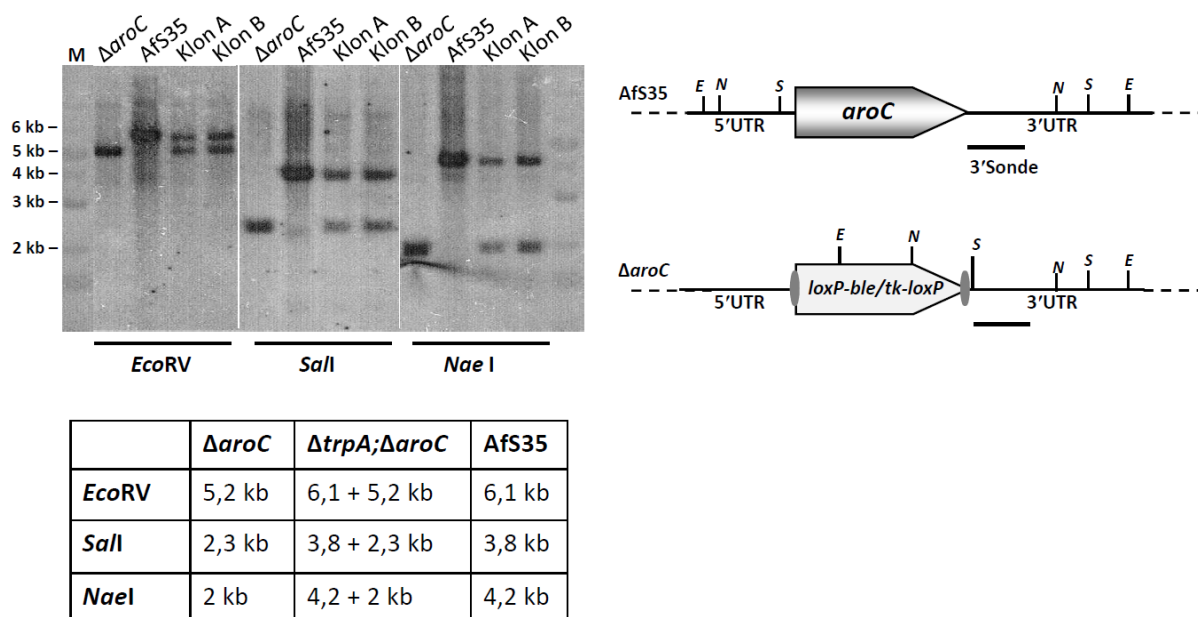


Abbildung 42: Southern-Hybridisierung der vereinzelt Klone nach Transformation des *trpA*-Deletionsstammes mit der *aroC*-Deletionskassette. Links sind die Signale der Southern-Hybridisierung zu sehen, nach Restriktion der genomischen DNA der unterschiedlichen Stämme mit *EcoRV*, *Sall* bzw. *NaeI* und nach Hybridisieren der verwendeten Sonde. Die entscheidenden Markersignale sind gekennzeichnet und der Marker mit M beschriftet. Die Tabelle darunter zeigt die erwarteten Signale der verschiedenen Stämme nach Verdau mit dem entsprechenden Enzym und nach Anlagerung der Sonde. Rechts ist eine schematische Abbildung des *aroC*-Gens bzw. des genomischen Lokus eines *aroC*-Deletionsstammes. Der Bereich in dem die gewählte Sonde für die Southern-Hybridisierung bindet ist eingezeichnet, ebenso wie die Restriktionsstellen von *EcoRV* (E), *Sall* (S) und *NaeI* (N). Der *aroC*-Deletionsstamm ($\Delta aroC$) und der ursprüngliche Ausgangsstamm AfS35 wurden als Vergleich verwendet. Die nach Transformation des *trpA*-Deletionsstammes mit der *aroC*-Deletionskassette erhaltenen Klone sind mit Klon A und Klon B bezeichnet. Beide getesteten Klone zeigen sowohl das Signal des Ausgangsstammes, als auch das des *aroC*-Deletionsstammes, was zeigt, dass die Integration der *aroC*-Deletionskassette nicht-homolog erfolgt war.

Die Signale des Ausgangsstammes nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen und nach Hybridisieren der Sonde entsprechen hierbei den erwarteten Signalen des *trpA*-Deletionsstammes, da dieser im Bereich des *aroC*-Gens keine Mutation aufweist. Für einen *trpA*-Deletionsstamm, bei dem die *aroC*-Deletionskassette homolog rekombiniert wurde, werden die gleichen Signale wie für den Δ *aroC*-Stamm erwartet. Beide Klone (A und B), die nach Transformation des *trpA*-Deletionsstammes mit der *aroC*-Deletionskassette erhalten wurden, zeigen jedoch sowohl das Signal des *aroC*-Deletionsstammes, als auch das des Ausgangsstammes AfS35. Dies belegt eine ektopische Integration der *aroC*-Deletionskassette in den *trpA*-Deletionsstamm.

Daher wurde vermutet, dass auch die Doppeldeletion Δ *trpA*; Δ *aroC* lethale Auswirkung auf den Pilz hat. Dies wurde mit Hilfe des *heterokaryon rescue* untersucht (Daten nicht gezeigt), welches bestätigte, dass eine gleichzeitige Deletion beider Gene *trpA* und *aroC* zu keinem lebensfähigen Isolat führt.

4.2.5 Die Virulenz der *aroC*- und *trpA*-Deletionsstämme ist im Tiermodell attenuiert

Um die Rolle der Biosynthese aromatischer Aminosäuren für die Virulenz von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden die generierten Mutantenstämme Δ *aroC* und Δ *trpA* in zwei verschiedenen Tiermodellen getestet. Zunächst wurden beide Mutanten- und Komplementationsstämme im Tiermodell der Wachsmottenlarve *Galleria melonella* untersucht. Als Kontrolle dienten der virulente Δ *akuA*-Ausgangsstamm (AfS35) und eine avirulente Δ *paba*-Mutante (Krappmann *et al.*, 2005). Für die technische Kontrolle wurde einer Gruppe der Larven nur Saline-Rifampicin injiziert und eine zweite Gruppe blieb gänzlich unbehandelt. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 Larven, wohingegen alle anderen Stämme in 15 Larven getestet wurden. Die Larven wurden mit $3 \cdot 10^6$ bzw. $5 \cdot 10^6$ frischen Sporen in Saline mit Rifampicin (10 μ g/ml) infiziert und ihre Überlebensrate dokumentiert. In Abbildung 43 ist zu sehen, dass sieben Tage nach der Infektion keine Tiere überlebten, die mit dem virulenten Ausgangsstamm bzw. den Komplementationsstämmen *ctrpA** und *caroC** infiziert worden waren. Mindestens 90% der mit der Δ *paba*-Mutante infizierten Larven waren nach sieben Tagen noch am Leben, ebenso wie die der technischen Kontrollen. Injektion von $3 \cdot 10^6$ Sporen des Deletionsstammes Δ *trpA* resultierte in Überleben von mehr als 90% der Tiere, wobei die gleiche Menge an injizierten Sporen des Δ *aroC*-Deletionsstammes zu einer Überlebensrate von knapp 30% führte. Injektion von $5 \cdot 10^6$ Sporen beider Deletionsstämme resultierte in deutlich weniger überlebenden Larven als durch den avirulente Kontrollstamm.

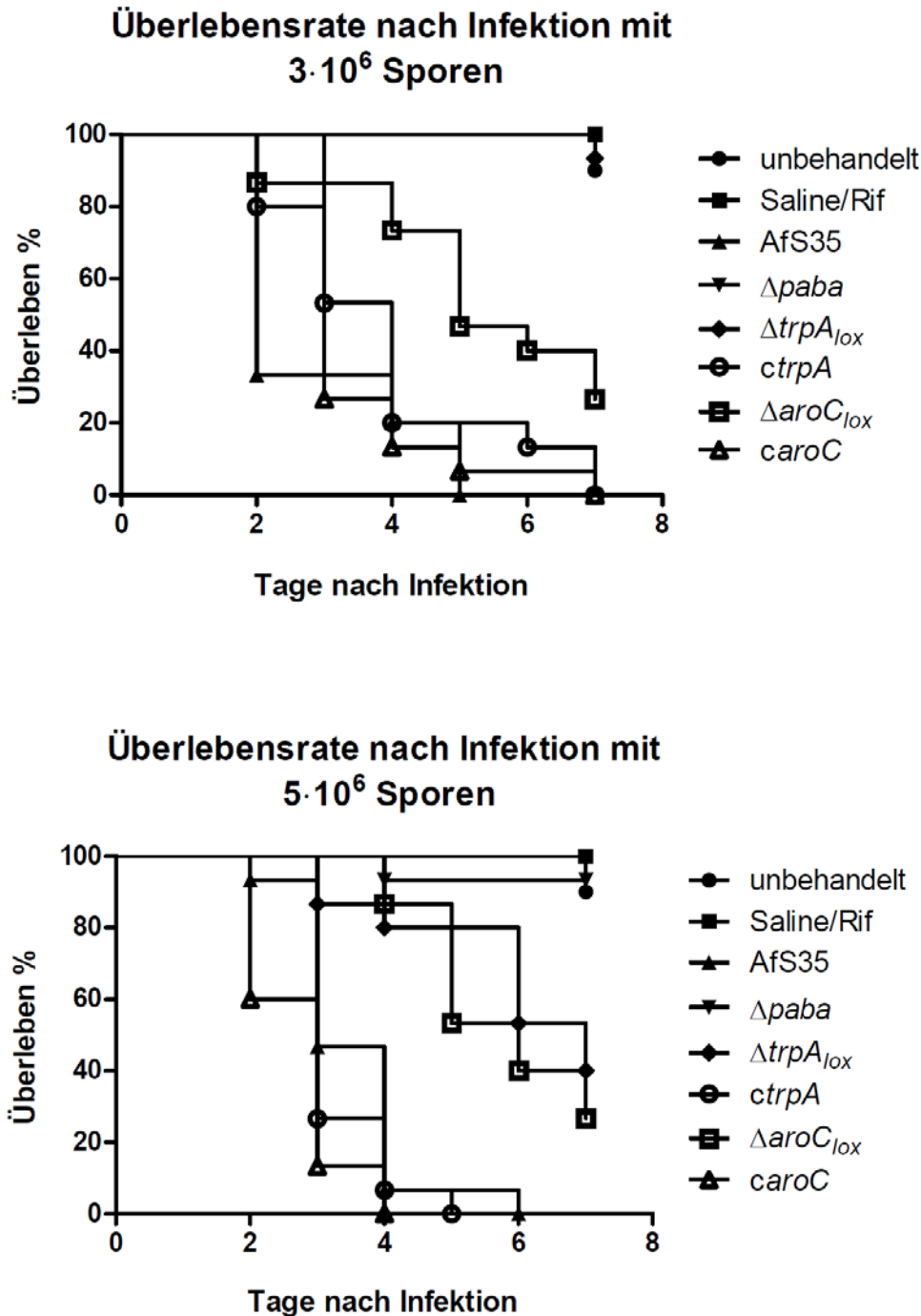


Abbildung 43: Virulenzmodell der Wachsmottenlarve *Galleria melonella*. Zu sehen sind zwei graphische Darstellungen der Überlebensrate der infizierten Larven zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Infektion. In der oberen Darstellung wurden die Tiere zum Zeitpunkt 0 mit $3 \cdot 10^6$ Sporen infiziert. Sieben Tage nach der Infektion gab es keine überlebenden Tiere die mit den Komplementationsstämmen *caroC* und *ctrpA* bzw. mit dem Ausgangsstamm infiziert worden waren. Im Gegensatz dazu überlebten knapp 30% der Tiere die mit dem *aroC*-Deletionsstamm infiziert worden waren, wohingegen über 90% der mit dem *trpA*-Deletionsstamm infizierten Larven überlebten. Die Kontrollgruppen (unbehandelte, mit Saline und Rifampizin, bzw. mit dem avirulenten Stamm $\Delta paba$ infizierten Tiere) überlebten zu mindestens 90%. In der unteren Darstellung wurden die Larven mit $5 \cdot 10^6$ Sporen infiziert. Hier ist die gleiche Tendenz wie bei Infektion mit $3 \cdot 10^6$ zu sehen, wobei die höhere Sporenkonzentration zu einer geringeren Überlebensrate der Tiere führt die mit dem *trpA*-Deletionsstamm infiziert worden sind.

Durch statistische Auswertung dieser Daten wurde die jeweilige durchschnittliche Überlebenszeit der infizierten Tiere bestimmt (Tabelle 4). Diese ist definiert als Zeitpunkt zu dem 50% der Testgruppe gestorben ist und die andere Hälfte noch lebt. So ergab sich für die Larven, die mit $5 \cdot 10^6$ Sporen des *trpA*-Deletionsstamm infiziert worden waren eine durchschnittliche Überlebenszeit von sieben Tagen und für den *aroC*-Deletionsstamm von sechs Tagen. Im Gegensatz dazu überlebten die mit $5 \cdot 10^6$ Sporen der Komplementationsstämme und des Ausgangsstammes AfS35 im Durchschnitt nur drei Tage.

Tabelle 4: Durchschnittliche Überlebenszeit der infizierten Larven

Infektion	AfS35	<i>Δpaba</i>	<i>ΔtrpA</i>	<i>ctrpA</i>	<i>ΔaroC</i>	<i>caroC</i>
$3 \cdot 10^6$ Sporen	2 Tage	unbestimmt	unbestimmt	4 Tage	5 Tage	3 Tage
$5 \cdot 10^6$ Sporen	3 Tage	unbestimmt	7 Tage	3 Tage	6 Tage	3 Tage

Nach Infektion der Larven mit $3 \cdot 10^6$ Sporen des *trpA*-Deletionsstammes konnte wie für die Kontrollstämme aufgrund der geringen Sterberate keine durchschnittliche Überlebenszeit berechnet werden. Dagegen ergab sich für den *aroC*-Deletionsstamm eine mittlere Überlebenszeit von fünf Tagen und für den Komplementationsstamm von drei Tagen. Larven, die mit $3 \cdot 10^6$ Sporen des *trpA*-Komplementationsstammes infiziert worden waren überlebten durchschnittlich vier Tage, nach Infektion mit dem Ausgangsstamm AfS35 nur zwei Tage.

Die Ergebnisse des Virulenzmodells der Wachsmottenlarve zeigen, dass die Deletionsstämme *ΔaroC* und *ΔtrpA* in diesem Modell attenuiert sind, was jedoch noch keine Rückschlüsse auf die Virulenz im Menschen erlaubt.

5. DISKUSSION

Als Saprophyt ist der ubiquitäre, opportunistisch humanpathogene Pilz *A. fumigatus* darauf angewiesen, proteinhaltige Substanzen aufzuspüren und abzubauen, um die benötigten Nährstoffe zu generieren. Hierbei spielt vor allem proteolytische Aktivität eine entscheidende Rolle, wobei jedoch sehr wenig über die Regulation von Expression und Sekretion der Proteasen durch *A. fumigatus* bekannt ist. Für das Homologon des erst kürzlich identifizierten Regulators für Proteasen PrtT in *A. niger* konnte auch in *A. fumigatus* eine regulierende Funktion hinsichtlich der sekretierten proteolytischen Aktivität festgestellt werden. Die Untersuchungen des *prtT*-Deletionsstammes in einem leukopenischen Mausmodell der pulmonalen Aspergillose ergaben, dass die Virulenz dieses Stammes jedoch nicht attenuiert ist, was zeigt, dass *prtT* nicht für die Pathogenität von *A. fumigatus* hinsichtlich dieses Mausmodells verantwortlich ist.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren auf die Virulenz von *A. fumigatus* untersucht werden. Da der Mensch, im Gegensatz zu Pilzen, keine Gene für Biosynthesewege der aromatischen Aminosäuren besitzt, könnten diese Synthesewege von therapeutischem Nutzen für die Behandlung von Aspergillosen sein. In dieser Arbeit konnten mehrere essentielle Gene des Shikimat-Synthesewegs identifiziert werden, deren Deletion lethale Auswirkung auf *A. fumigatus* hat. Die Untersuchung zweier Stämme, die Deletionen in Genen aufwiesen, die notwendig für die Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin bzw. Tryptophan sind, ergab eine deutlich attenuierte Virulenz in zwei Tiermodellen der Aspergillose. Dies zeigt die Notwendigkeit der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren für das Überleben von *A. fumigatus* und verdeutlicht, dass ein Eingriff in diesen Syntheseweg ein mögliches Ziel für die antimykotische Therapie darstellt.

5.1 PrtT hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *Aspergillus fumigatus*

Obwohl seit einigen Jahren die Pathogenität des ubiquitären Saprophyten *A. fumigatus* intensiv untersucht wird, konnten bisher nur wenige typische Virulenzfaktoren identifiziert werden. Um herauszufinden, ob sekretierte proteolytische Aktivitäten zu dessen Virulenz beitragen, wurde ein konservierter Regulator der Expression von extrazellulären Proteasen, PrtT, untersucht. Durch die Charakterisierung eines Deletionsstammes konnte gezeigt werden, dass PrtT für die Transkription einiger Gene benötigt wird, die für sekretierte Proteasen kodieren, und die es *A. fumigatus* ermöglichen auch proteinhaltige Substrate zu verwenden. Dennoch scheint die Abwesenheit von PrtT, und damit das Fehlen der Regulation von extrazellulären Proteasen, nicht die Virulenz von *A. fumigatus* zu beeinflussen. Zudem geben

die Ergebnisse der PrtT-abhängigen Expression der extrazellulären proteolytischen Aktivität einen Einblick in die Ernährungsweise von saprophytischen Pilzen. Aufgrund der Analyse des automatisch annotierten *prtT*-Gens wurde eine ungewöhnlich lange *leader*-Sequenz identifiziert, die der kodierenden Region vorangeht. Diagnostische PCRs dieses Bereiches zeigten, dass er eine Länge von mindestens 690 Nukleotiden aufweist. Obwohl die automatische Annotierung dieser Region ein Intron von 386 Nukleotiden zuschrieb, konnte durch die diagnostischen PCRs jegliches Splicen in diesem Bereich ausgeschlossen, und damit die Abwesenheit eines Introns bestätigt werden. Eine vergleichbare Situation wurde bereits für das *prtT*-Orthologe in *A. niger* beschrieben, wo die *leader*-Sequenz stromaufwärts des translationellen Startkodons 800 Nukleotide umfasste (Punt *et al.*, 2008). Solche Abschnitte kommen häufig in Transkripten vor, deren Expression durch post-transkriptionelle Mechanismen moduliert werden, wie zum Beispiel translationelle Regulation durch kleine uORFs (upstream open reading frames), wie sie unter anderem von *GCN4* in *S. cerevisiae* bekannt ist (Hinnebusch, 1984, 1997). Sequenzanalyse der *leader*-Region des *prtT*-Transkripts ergab diverse AUG-Triplets, gefolgt von Stopkodons *in frame*, was einen Hinweis für eine mögliche Regulation der *prtT*-Expression durch den eIF2 α -Kinase Signalweg liefert (Wek *et al.*, 2006). Während dieses Mechanismus führt Nährstoffmangel zu einer Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryotischen translationellen Initiations Faktors eIF2. Dadurch wird die inhibierende Funktion der uORFs in der mRNA *leader*-Region aufgehoben, was zur Translation der kodierenden Sequenz führt. Hiermit übereinstimmend ist die Tatsache, dass sich die Menge des *prtT*-Transkriptes nach einem Wechsel von Ammonium, als primärer Stickstoffquelle, zu BSA nicht drastisch verändert, obwohl unter diesen Bedingungen die extrazellulären Proteasen reichlich exprimiert werden. Trotzdem dürfen zusätzliche regulatorische Mechanismen nicht außer Acht gelassen werden, die ebenfalls die PrtT-Aktivität modulieren könnten, wie zum Beispiel Phosphorylierung oder regulierte Translokation.

Die Beobachtung, dass die Expression der extrazellulären proteolytischen Aktivität durch Anwesenheit von Ammonium unterdrückt wird, geht auf den Einfluss des regulatorischen Systems der Stickstoff-Katabolit-Repression zurück, die durch den GATA-artigen Transkriptionsfaktor AreA reguliert wird (Caddick *et al.*, 1994; Wilson und Arst, 1998). Die Regulation der Expression durch PrtT scheint jedoch spezifischer zu sein, da sie auf die Transkription ausgewählter sekretierten Proteasen wirkt, wobei sich für Alp, Mep und Pep die stärksten Effekte ergeben. Die Tatsache, dass dies Zielgene der PrtT-gerichteten Regulation sind, konnte durch den Phänotyp der *prtT*-Deletion gezeigt werden: da der Abbau von Protein

als einziger Stickstoffquelle beträchtlich gemindert war, reduzierte sich das Wachstum der Mutante auf diesem Substrat deutlich. Einige andere Protease-kodierenden Gene scheinen dagegen nicht durch PrtT reguliert zu werden, wie durch die unveränderte Expression von *dppV* oder *sedB* gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Nir Osherov (Sharon *et al.*, 2009) zeigen übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass die Expression einiger durch *A. fumigatus* sekretierten Proteasen durch Deletion von *prtT* deutlich reduziert wird. Diese Arbeitsgruppe konnte von insgesamt 40 Proteasegenen, die im Wildtypstamm exprimiert werden, sechs sekretierte Proteasen identifizieren, die durch *prtT* beeinflusst werden. Dazu gehörten, genau wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Serinprotease Alp1, eine Metalloprotease Mep, eine Dipeptidyl-Protease DppIV und zusätzlich eine Serin-Carboxypeptidase CpdS (AFUA_6G00310) und zwei bisher uncharakterisierte Proteasen AFUA_2G17330 (extrazelluläre Serin-Carboxypeptidase) und AFUA_7G06220 (Serinprotease). Auch die basalen Level der Protease-Expression scheinen in der Mutante noch vorhanden zu sein, was durch die geringen Transkriptlevel des Dipeptidyl-peptidase kodierenden Gens *dppIV* in der *prtT*-Mutante und durch den limitierten, aber deutlichen Abbau von Protein nach längerer Inkubation dieses Stammes in BSA-Medium bekräftigt wird (vgl. Abb. 14). Dies mag auch auf die Aktivität einer oder mehrerer spezifischen Endoproteasen zurückzuführen sein, die in geringen Mengen exprimiert oder an die pilzliche Zellwand gebunden sein könnten. In weiteren, zukünftigen Studien sollte das PrtT-gerichtete Transkriptom und das assoziierte Proteom oder Sekretom untersucht werden, um das regulatorische Spektrum von PrtT genauer zu charakterisieren.

Eines der wesentlichen Ergebnisse dieser Studie ist die Tatsache, dass ein *prtT*-Deletionsstamm im leukopenischen Mausmodell der pulmonalen Aspergillose ebenso virulent ist wie der ursprüngliche Wildtyp-Stamm. Zudem zeigen die beobachteten Phänotypen des Deletionsstammes deutlich, dass PrtT am extrazellulären Proteinabbau beteiligt ist und somit vermutlich zur saprophytischen Lebensweise von *A. fumigatus* beiträgt, auch wenn PrtT nicht essentiell für die Pathogenität im verwendeten Tiermodell zu sein scheint. Das in dieser Arbeit angewandte Mausmodell der Aspergillose eignet sich für die Untersuchung des Wachstums oder der Fitness einer *A. fumigatus*-Mutante direkt am Infektionsort. Hierbei werden Mäuse verwendet, deren Immunsystem keine phagozytierenden Zellen bildet. Dieses Standardmodell wurde nicht genutzt, um Sterberaten innerhalb der Gruppen der infizierten Tiere zu verfolgen, sondern vielmehr um anhand der pulmonalen Pilzbelastung Rückschlüsse auf Fitness und Virulenz zu ziehen, da sich mit diesem Modell auch geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen verdeutlichen lassen. Die Ergebnisse der entsprechenden

quantitativen PCRs zeigen, dass die Virulenz des *prtT*-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp nicht abgeschwächt ist, was auch durch den Gewichtsverlust der infizierten Tiere während des Versuchszeitraums unterstützt wird. Da die Expression der extrazellulären Proteasen durch PrtT möglicherweise nicht umfassend reguliert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch sekretierte Proteasen, die in ihrer Expression nicht von PrtT beeinflusst werden, während der Aspergillose zur Substrataufnahme oder Invasion beitragen. Darüber hinaus ist es möglich, dass extrazelluläre Proteasen bei der Interaktion mit der primären Immunantwort involviert sind, ein Aspekt, der in einem alternativen Tiermodell (Spikes *et al.*, 2008) untersucht werden müsste.

Die Virulenztests im verwendeten Mausmodell zeigten keine verminderte Virulenz der *prtT*-Mutante, ein Ergebnis, das durch zwei weitere Mausmodelle der invasiven Aspergillose von der Arbeitsgruppe von Nir Osherov (Sharon *et al.*, 2009) unterstützt werden konnte. Hierbei wurde ein neutropenisches Modell (Immunsuppression durch Kortisonacetat und Cyclophosphamid) und ein Modell ohne Neutropenie (Immunsuppression durch Kortisonacetat) verwendet und die Mäuse mit einer geringen Sporenkonzentration infiziert (Cyclophosphamid-Modell: $2,5 \cdot 10^5$ Sporen, bzw. Kortisonacetat-Modell: $5 \cdot 10^5$ Sporen). Die Sterberate der Mäuse wurde über 30 Tage beobachtet, wobei kein signifikanter Unterschied der Virulenz eines *prtT*-Disruptionsstammes im Vergleich zum Wildtypstamm zu sehen war.

Zusammenfassend gleichen diese Ergebnisse denen anderer Deletionsmutanten bzgl. diverser Proteasen (Monod *et al.*, 1993; Jaton-Ogay *et al.*, 1994; Reichard *et al.*, 1997), was eine entscheidende Rolle der extrazellulären Proteasen für die invasive pulmonare Aspergillose unwahrscheinlich erscheinen lässt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise Zellwand-gebundene Proteasen eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese zukommt.

Ergänzend zu den Daten dieser Arbeit fand die Arbeitsgruppe von Nir Osherov (Sharon *et al.*, 2009) heraus, dass Kultur-Überstände eines *prtT*-Disruptionsstammes zu reduzierter Cytotoxizität (ca. 90%) gegenüber Lungenepithelzellen führt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach längerer Inkubation (24 Stunden) die Cytotoxizität erneut anstieg, was vermuten ließ, dass auch andere sekretierte Proteasen und Faktoren an diesen Prozessen involviert sind. Auch wurde die hämolytische Aktivität der Kultur-Überstände untersucht. Hier wurde gezeigt, dass Überstände des *prtT*-Disruptionsstammes zu zehnfach reduzierter Hämolyse von Erythrozyten führt.

Auffällig ist, dass das *prtT*-Gen im Genom der weniger virulenten Spezies *A. nidulans* nicht vorkommt. Die Menge an extrazellulärer proteolytischer Aktivität eines *A. nidulans*-Wildtyps ist ähnlich der des *prtT*-Deletionsstammes von *A. fumigatus* (eigene, unpublizierte Daten), was zeigt, dass *A. nidulans* keine alternativen Wege des Proteinabbaus entwickelt hat. Dies lässt wiederum vermuten, dass der Verlust von *prtT* in *A. nidulans* evolutionär ein eher kürzliches Ereignis ist und dass das Fehlen von *prtT* in *A. nidulans* die Virulenz dieser Spezies beeinträchtigt hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Theorie jedoch nicht, und da die Virulenz von *Aspergillus* von vielen Faktoren abhängig ist, kann angenommen werden, dass weitere Modifikationen für den Unterschied zwischen dem Saprophyten *A. nidulans* und dem Pathogen *A. fumigatus* verantwortlich sind.

5.2 Die PrtT-Expression wird durch eIF2 α -Kinasen beeinflusst

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Fragestellung hinsichtlich der Regulation der PrtT-Expression in *A. fumigatus*. Hierzu lieferten vorangegangene Ergebnisse Hinweise dafür, dass der langen *leader*-Sequenz stromaufwärts der PrtT-kodierenden Region eine regulatorische Funktion zukommt. Daher wurde zunächst der entsprechende Bereich in einen Hefe-Testsystem untersucht. Die Auswertung des sog. 5' TRU (*translationally regulative 5'UTR*) (Rachfall *et al.*, 2009; Rachfall *et al.*, 2011) erfolgte durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität unter der Kontrolle der *prtT*-5'UTR. Unter Aminosäuremangel wurde eine dereprimierte *lacZ*-Expression im Vergleich zu Nichtmangelbedingung beobachtet, was auf eine regulatorische Funktion der 5'UTR und somit auf eine post-transkriptionelle Regulation des *prtT* durch seine *leader*-Sequenz hindeutet. In Hefe ist keine derartige Regulation anhand der 5'UTR der *GCN4*-mRNA bereits intensiv untersucht worden (Hinnebusch, 1984, 1997; Hinnebusch und Natarajan, 2002; Hinnebusch, 2005). Aminosäuremangel führt hierbei zu einer verstärkten Translation des kodierenden Bereichs auf der *GCN4*-mRNA, wohingegen sich Nichtmangel-Bedingungen reprimierend auf dessen Translation auswirken.

Die Analyse der im Verlauf der Arbeiten hergestellten *^pprtT-gfp*-Reporterstämme unterstützte die Annahme, dass der langen 5'UTR des *prtT*-Gens regulatorische Funktion zukommt. Zwei der Reporterstämme enthielten eine zusätzliche Deletion in Genen, die für eIF2 α -Sensorkinasen, CpcC bzw. IkbB, kodieren, bei einem weiteren Reporterstamm waren beide Gene deletiert, und ein Kontrollstamm enthielt nur das *^pprtT-gfp*-Reporterkonstrukt. Dadurch konnte die Auswirkung des Fehlens einer oder beider Sensorkinasen auf die Expression von PrtT untersucht werden. In diesem Fall war es entscheidend, dass die *prtT*-

5'UTR die Expression des *gfp*-Gens regulierte, sodass zusätzlich der Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf die 5'UTR des *prtT*-Gens untersucht werden konnte. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die Menge des exprimierten GFP der Menge des exprimierten PrtT im Wildtyp entspricht und somit Rückschlüsse auf die Regulation durch die *prtT*-leader-Sequenz erlaubt.

Die Funktionalität des GFP-Reporters der vier Stämme konnte durch Fluoreszenzmikroskopie validiert werden, wobei zudem der Einfluss einer primären Stickstoffquelle im Vergleich zu einer sekundären Stickstoffquelle im Medium beobachtet werden konnte. Nach Auskeimen der Sporen in Medium mit Ammonium als primärer Stickstoffquelle war lediglich eine schwache Fluoreszenz zu sehen, wohingegen nach Wachstum in Medium mit BSA als einziger, aber sekundärer Stickstoffquelle eine deutlich stärkere Fluoreszenz erkennbar war. Dies ließ auf eine Regulation der *gfp*-Expression durch die 5'UTR des *prtT* schließen, da im ersten Teil der vorliegenden Arbeit bereits der induzierende Einfluss von BSA als einziger Stickstoffquelle auf die Sekretion von proteolytischer Aktivität, welche durch PrtT reguliert wird, beobachtet worden war. Zusätzlich scheint die Stickstoff-Katabolit-Repression einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *prtT* bei Anwesenheit einer primären Stickstoffquelle zu haben. Die Stickstoff-Katabolit-Repression basiert auf der negativen Regulation von Genen, die für den Stickstoff-Katabolismus benötigt werden, sofern keine primären Stickstoffquellen (Ammonium, Glutamin, Glutamat) zur Verfügung stehen. Sind ausschließlich sekundäre Stickstoffquellen (Nitrat, Nitrit, Purine, Aminosäuren, Proteine) vorhanden, werden spezifische katabolische Enzyme synthetisiert. Die Expression von Genen dieser Enzyme wird reguliert durch spezielle GATA-Transkriptionsfaktoren wie z. B. AreA in *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990), NIT-2 in *N. crassa* (Stewart und Vollmer, 1986; Fu und Marzluf, 1987) und Gln3p in *S. cerevisiae* (Minehart und Magasanik, 1991), die somit eine Stickstoff-Katabolit-Derepression bewirken. Steht eine primäre Stickstoffquelle in ausreichender Menge zur Verfügung, wird die Transkription der für die katabolischen Enzyme kodierenden Gene, reprimiert. Dieses komplexe System, an dem diverse Komponenten spezifischer Signalwege beteiligt sind, scheint auch die Expression von *prtT* zu beeinflussen.

Ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus auf translationeller Ebene ist von *GCN4* in *S. cerevisiae* (Hinnebusch, 1984) bzw. *cpcA* in *A. nidulans* und *A. fumigatus* (Hoffmann *et al.*, 2001; Sasse *et al.*, 2008) bekannt. Dieses Regulationssystem, das in filamentösen Pilzen als *Cross-Pathway Control* bezeichnet wird, beruht auf zwei kleinen uORFs, die der eigentlichen kodierenden Region auf der mRNA vorangehen. Unter Nicht-

Mangelbedingungen führt die Transkription von *cpcA* durch Initiation der Translation an den uORFs zu reprimierter Translation des *cpcA*-Transkriptes. Bei Aminosäuremangel hingegen wird durch Aktivierung der eIF2 α -Sensorkinase CpcC die Menge an ternären Komplexen, welche für die Initiation der Translation benötigt werden, reduziert, was zur Folge hat, dass vermehrt die Initiation der Translation am eigentlichen *cpcA*-Startcodon erfolgt. Daher findet unter diesen Bedingungen zwar insgesamt die Translationsinitiation seltener statt, die Expression von *cpcA* wird jedoch deutlich verstärkt. In *A. fumigatus* wurde eine weitere Sensorkinase (IfkB) identifiziert (Sasse *et al.*, 2008), deren genaue zelluläre Funktion jedoch bislang nicht hinreichend bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass sie, genau wie CpcC, eIF2 α phosphoryliert, von welchen Bedingungen dies jedoch abhängig ist, bleibt ungeklärt.

Die vermutete translationelle Regulation der *prrT*-Expression durch die Sensorkinasen CpcC bzw. IfkB sollte mit den konstruierten ^p*prrT-gfp*-Reporterstämmen untersucht werden. Anhand von Western-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer der zwei Sensorkinasen, CpcC bzw. IfkB, ausreichend für die volle *gfp*-Expression ist, vermittelt durch die 5'UTR von *prrT*. Zudem war zu beobachten, dass bereits nach zweistündiger Inkubation der Reporterstämmen in BSA-haltigem Medium die Menge an gebildetem GFP im Vergleich zur Inkubation auf Medium mit Ammonium deutlich zunahm, wobei dieser Effekt bei dem Reporterstamm mit beiden deletierten Sensorkinasen nicht zu sehen war. Das Fehlen beider Sensorkinasen scheint also auf translationeller Ebene einen Effekt auf die Regulation von *prrT* zu haben.

Die Regulation der *prrT*-Expression auf transkriptioneller Ebene wurde durch quantitative RT-PCR untersucht, die Ergebnisse dieser Experimente sind jedoch eher kritisch zu beurteilen. Eine Auswertung der Daten lieferte im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse, sodass eine eindeutige Aussage zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Zudem konnten nur die Ergebnisse zweier biologischer Replikate miteinander verglichen werden, sodass es für eine genaue Bewertung der Ergebnisse unerlässlich ist, Messungen mit weiteren biologischen Replikaten mit einzubeziehen. Bei der vermuteten Regulation der 5'UTR von *prrT* via eIF2 α -Kinase-Signaltransduktion wäre zu erwarten gewesen, dass im Gegensatz zur beobachteten induzierten Expression bei Anwesenheit von BSA als Stickstoffquelle, auf transkriptioneller Ebene keine Unterschiede in den vorhandenen Transkriptlevels bei Inkubation in Ammonium bzw. BSA als Stickstoffquelle auftreten. Darüber hinaus unterscheiden sich die Mengen der *prrT*-Transkripte deutlich von denen der *gfp*-Transkripte. Da aufgrund der Konstruktion der Reporterstämmen das *prrT*-Gen ausschließlich durch einen 2 kb großen Bereich seiner 5'UTR reguliert wird, das *gfp* jedoch

durch die gesamte stromaufwärts gelegene UTR, wäre es möglich, dass außerhalb der für das *priT*-Gen untersuchten 5'UTR weitere regulatorische Bereiche liegen, wodurch eine unterschiedliche Regulation des *priT* bzw. *gfp* der Reporterstämme stattfindet und damit unterschiedliche Mengen an jeweiligem Transkript zu beobachten waren. Ebenso wäre es möglich, dass zusätzlich zur Regulation über den eIF2 α -Kinase-Signalweg, der ausschließlich translationell erfolgt, auch Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, die auf transkriptioneller Ebene wirken, wie z. B. die oben erwähnte Stickstoff-Katabolit-Repression, oder Autoregulationsmechanismen, bei denen das gebildete Protein am Promotor des für ihn codierenden Gens bindet und somit eine regulatorische Funktion auf seine Transkription hat. Positive Autoregulation ist zum Beispiel bekannt von *cpcA* in *A. nidulans*, wobei das gebildete Protein an spezielle Cross-Pathway Control Response Element (CPRE)-Sequenzen in der Promotorregion des Gens bindet, was zu einer Verstärkung der Transkriptionsrate an *cpcA* führt (Hoffmann *et al.*, 2001).

Zusammengenommen liefern die vorliegenden Daten Hinweise auf unterschiedliche Regulationsmechanismen; einerseits translationell, ähnlich wie bei *GCN4* in Hefe, andererseits transkriptionell über die Stickstoff-Katabolit-Repression und möglicherweise weitere Mechanismen.

5.3 Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren ist ein möglicher Angriffspunkt gegen *A. fumigatus*

Pilze sind ebenso wie Bakterien und Pflanzen prototroph für Aminosäuren, sie sind also in der Lage, alle benötigten proteinogenen Aminosäuren selbst zu synthetisieren (Haslam, 1974; Bentley, 1990). Darüber hinaus besitzen sie mannigfaltige Aufnahmesysteme für Aminosäuren, über die sie selbige aus der Umgebung aufnehmen und in die Zelle transportieren können. Eine der Grundvoraussetzungen für das Überleben saprophytischer Pilze ist, dass sie in der Lage sind, sich den Bedingungen ihrer Umgebung anzupassen. Sind nicht genügend Nährstoffe wie Aminosäuren in der Umgebung vorhanden, wird deren Biosynthese aktiviert um diesen Mangel auszugleichen. Sind jedoch Aminosäuren in ausreichender Menge frei zugänglich, werden sie über spezielle Transporter aufgenommen und deren Produktion innerhalb der Zelle reduziert (Singh *et al.*, 2010).

In vorangegangenen Studien wurde bereits herausgefunden, dass der Verlust unterschiedlicher Gene der Aminosäurebiosynthese zu Stämmen mit attenuierter Virulenz führen kann (Sandhu *et al.*, 1976; D'Enfert *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2000; Liebmann *et al.*, 2004; Rhodes, 2006; Schobel *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass in menschlichen Zellen die

de novo-Biosynthese aromatischer Aminosäuren nicht stattfindet, eröffnet die Möglichkeit einer Generierung von antimykotischen Substanzen die den Shikimatweg inhibieren. Diese Überlegung wird unterstützt durch die bereits erfolgreiche Verwendung des Herbizids „Glyphosat“, das in den Shikimatweg von Pflanzen eingreift, wodurch diese keine aromatischen Aminosäuren bilden können und zugrunde gehen. Sollte sich mindestens ein Gen des Shikimatwegs in *A. fumigatus* als essentiell für dessen Überleben herausstellen, wäre dies ein möglicher Angriffspunkt für eine Therapie gegen Aspergillose.

Die Untersuchungen der Gene *aroC* und *trpA*, die Enzyme für die Umsetzung von Chorismat zu den entsprechenden Vorstufen von Phenylalanin und Tyrosin bzw. Tryptophan kodieren, ergaben, dass deren jeweilige Deletion zu einem lebensfähigen, aber auxotrophen *A. fumigatus*-Stamm führt. Werden den jeweiligen Mutanten nicht die benötigten Aminosäuren angeboten, können deren Sporen nicht auskeimen. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass die Deletion beider Gene, *aroC* und *trpA*, nicht zu einem lebensfähigen *A. fumigatus*-Klon führt, was auf die Notwendigkeit der Funktionalität mindestens eines der Genprodukte hinweist. Interessant waren hierbei vor allem vorläufige Daten aus Tierversuchen, in denen sich beide Deletionsmutanten - Δ *aroC* und Δ *trpA* - im neutropenischen Mausmodell der pulmonaren Aspergillose als vollständig attenuiert bzw. avirulent herausstellten (pers. Mitteilung S. Krappmann). Für den Δ *aroC*-Stamm konnte darüber hinaus eine starke Attenuierung im Modell der systemischen Infektion neutropenischer Mäuse festgestellt werden. Derartige Virulenztests in geeigneten murinen Tiermodellen bedürfen jedoch noch weiterer Kontrollversuche, um die Avirulenz Phenylalanin/Tyrosin- bzw. Tryptophan-auxotropher *A. fumigatus*-Stämme zu untermauern.

Als weiterer interessanter Aspekt wurde herausgefunden, dass ein *aroC*-Deletionsstamm in supplementiertem Flüssigmedium äußerst schlecht auskeimt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im Vergleich zu Wachstum auf Festmedium, wobei vor allem asexuelle Sporulation stattfindet, sich das Wachstum in Flüssigmedium auf Hyphenwachstum beschränkt und daher je nach Umgebungszustand unterschiedliche Gene exprimiert werden. Ebenso ist es denkbar, dass unterschiedliche Nährstoffaufnahme-systeme je nach Umgebungszustand exprimiert werden und der *aroC*-Deletionsstamm dementsprechend in Flüssigkultur nicht ausreichend supplementiert werden kann. Auffällig war auch, dass sowohl Sporen des *aroC*- als auch des *trpA*-Deletionsstamms in flüssigem Vollmedium (nach Supplementierung mit den entsprechenden Aminosäuren) schlecht auskeimen konnten, wohingegen der *trpA*-Deletionsstamm in flüssigem Minimalmedium (nach Supplementierung mit Tryptophan) normales Wachstum zeigte. Hierbei wäre ein möglicher Einfluss in der primären

Stickstoffquelle Nitrat zu sehen, die im Minimalmedium vorhanden ist. Im Gegensatz dazu sind in Vollmedium Pepton/Trypton und Hefeextrakt als Stickstoffquellen vorhanden, die normalerweise gut verwendet werden, was auch durch die Tatsache begründet ist, dass Pepton bereits vorverdaut und damit für die Zelle leicht zugänglich ist. In dem Fall der auxotrophen Mutanten mussten jedoch die jeweiligen Aminosäuren zugegeben werden, was voraussetzt, dass diese benötigten Aminosäuren nicht als Stickstoffquelle verwendet werden dürfen, da der Zelle ansonsten nicht genügend entsprechender Aminosäure für weitere Biosynthesewege zur Verfügung steht. Werden im Gegensatz dazu die Deletionsstämme in Minimalmedium kultiviert, sind sowohl primäre Kohlen- als auch Stickstoffquellen vorhanden und bei Zugabe der benötigten Aminosäuren können diese über spezielle Transporter (Stuart *et al.*, 1988; Jorgensen *et al.*, 1998; Margolis-Clark *et al.*, 2001; Apostolaki *et al.*, 2009) direkt in die Zelle aufgenommen werden.

Der Shikimatweg stellt als Ziel zur Inhibierung des Wachstums von Pilzen einen einzigartigen Biosyntheseweg dar. Einige der Reaktionen dieses Synthesewegs sind einzigartig in der Natur, wie z. B. die sechste Reaktion dieses Weges, die durch eine EPSP-Synthase katalysiert wird und ein Transfer der intakten Enolpyruvyl-Untereinheit von Phosphoenolpyruvat zu Shikimat-3-Phosphat stattfindet (Macheroux *et al.*, 1999). Das einzige weitere Beispiel dieser Art von Reaktion ist aus der Zellwand-Biosynthese in Bakterien bekannt, katalysiert durch die UDP-*N*-Acetylglukosamin-Enolpyruvyl-Transferase (Rogers *et al.*, 1980). Diese beiden Enzyme sind das Ziel des Breitband-Herbizids „Glyphosat“ (Steinrucken und Amrhein, 1980) bzw. des Antibiotikums Fosfomycin (Kahan *et al.*, 1974). Interessanterweise werden die fünf Schritte der Umwandlung von DAHP zu EPSP, im Gegensatz zu Bakterien, bei *S. cerevisiae* durch ein pentafunktionelles Enzym (*ARO1*) katalysiert. Das entsprechende Enzym anderer Ascomyceten scheint ebenfalls multifunktionell zu sein, wie z. B. in *Schizosaccharomyces pombe* (Nakanishi und Yamamoto, 1984) und *A. nidulans* (Charles *et al.*, 1986) gezeigt werden konnte. Für *N. crassa* wurde ein entsprechendes dimeres Enzym identifiziert, das aus zwei identischen pentafunktionellen Polypeptiden besteht (Giles *et al.*, 1967; Lambert *et al.*, 1985; Coggins und Boocock, 1986).

Bei dem Versuch eine *aroM*-Deletionsmutante von *A. fumigatus* herzustellen, wurde herausgefunden, dass die Deletion dieses Gens lethale Auswirkung auf den Pilz hat bzw. keine erfolgreiche Supplementierung mit allen drei aromatischen Aminosäuren stattfinden kann. Interessanterweise ist in *S. cerevisiae* eine entsprechende Deletionsmutante lebensfähig (Lucchini *et al.*, 1978), vorausgesetzt ihr werden die entsprechenden Aminosäuren im

Medium zugefügt. Das zeigt deutlich, dass bei der *aroM*-Deletionsmutante von *S. cerevisiae* eine ausreichende Supplementierung durch die aromatischen Aminosäuren möglich ist, jedoch nicht im Falle der *aroM*-Deletionsmutante in *A. fumigatus*.

Die Chorismatsynthese katalysiert den siebten Schritt des Shikimat-Syntheseweges, die Umwandlung von 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat zu Chorismat, die letzte gemeinsame Vorstufe in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren von Bakterien, Pilzen und Pflanzen (Bentley, 1990). Dieses Enzym ist biochemisch gesehen sehr ungewöhnlich und es benötigt für die seltene 1,4-*trans*-Eliminierung die reduzierte Form von FMN (FMN_{red}) als Kofaktor (Henstrand *et al.*, 1995). Es wurde festgestellt, dass der reduzierte Kofaktor in Bakterien, Pflanzen und Pilzen auf verschiedene Arten zugänglich gemacht wird. Die Chorismatsynthese von Pilzen besitzt eine zweite enzymatische Aktivität, die es dem Organismus ermöglicht FMN auf Kosten von NADPH zu reduzieren, im Gegensatz zu Pflanzen und Bakterien, die auf reduziertes FMN aus der Umgebung angewiesen sind (Macheroux *et al.*, 1999). So wurde im Gegensatz zum monofunktionellen Enzym in Pflanzen und Bakterien für *N. crassa* und *S. cerevisiae* eine bifunktionelle Chorismatsynthese mit intrinsischer Flavin-Reduktase gefunden (Gaertner und Cole, 1973; White *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1991; Henstrand *et al.*, 1995; Quevillon-Cheruel *et al.*, 2004) (Abb. 44).

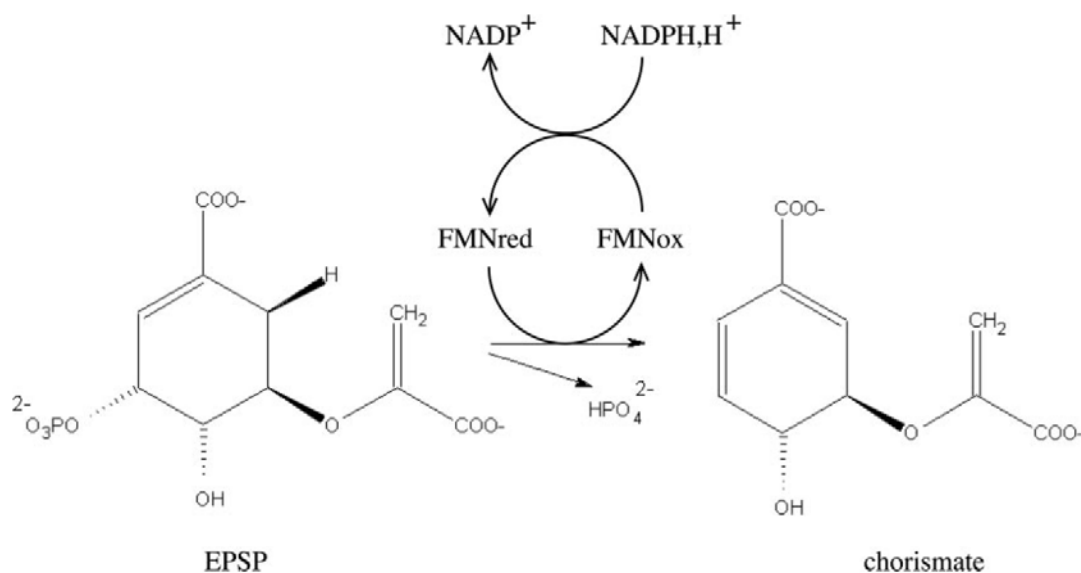


Abbildung 44 Schema der Umwandlung von EPSP zu Chorismat, katalysiert durch die bifunktionelle Chorismatsynthase. Im Gegensatz zum monofunktionellen Enzym aus Bakterien und Pflanzen, besitzt die bifunktionelle Chorismatsynthase eine Flavin-Reduktase Aktivität (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2004)

Die Chorismatsynthese in Hefe konnte erfolgreich deletiert werden (Burke *et al.*, 2000), daher scheint die Deletion des bifunktionellen Enzyms nicht unweigerlich in Lethalität des Organismus zu resultieren, wie es in dieser Arbeit für *A. fumigatus* beobachtet wurde. Interessanterweise wurde die Chorismatsynthese von *N. crassa* nicht direkt deletiert, sondern entweder durch Punktmutationen inhibiert oder im heterologen System untersucht. Hierbei erfolgte eine Komplementierung des Phänotyps der Chorismatsynthese-Deletion in *E. coli* (Henstrand *et al.*, 1995). Auch die Chorismatsynthese des opportunistisch phytopathogenen Pilzes *Verticillium longisporum* wurde im heterologen System durch Komplementierung der *ARO2*-Deletion in *S. cerevisiae* untersucht (Burke *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2010). Daher ist nicht geklärt, ob eine Deletion der Chorismatsynthese in der Unterklasse Pezizomycotina generell zur Lethalität führt.

Die Tatsache, dass der reduzierte Kofaktor FMN für den Aro2p/AroB-vermittelten Reaktionsschritt unbedingt erforderlich ist, bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antimykotika. Auch können Substratanaloga der Enzyme des Shikimat-Syntheseweges diesen blockieren, wobei einige dieser Analoga nicht direkt das entsprechende Enzym inhibieren, sondern nach Konversion zu Substratanaloga nachfolgender Enzyme deren Aktivität inhibieren (Roberts *et al.*, 2002). Zum Beispiel sind (6S)-6-Fluoroshikimat und (6R)-6-Fluoroshikimat Substrate der Shikimatkinase in *E. coli* und werden zu (6S)-6-Fluoro-EPSP und (6R)-6-Fluoro-EPSP konvertiert. (6R)-6-Fluoro-EPSP wirkt inhibierend auf die Chorismatsynthese, wohingegen (6S)-6-Fluoro-EPSP durch die Chorismatsynthese zu 6-Fluorochorismat umgewandelt wird (Ramjee *et al.*, 1992), welches anschließend die Synthese von *p*-Aminobenzoessäure inhibiert (Davies *et al.*, 1994; Bornemann *et al.*, 1995). Dagegen wurde festgestellt, dass sowohl (6S)-6-Fluoroshikimat als auch (6R)-6-Fluoroshikimat die Chorismatsynthese von *N. crassa* inhibieren (Balasubramanian *et al.*, 1991), indem sie vermutlich die Flavinreduktase der bifunktionellen Chorismatsynthese in *N. crassa* beeinträchtigen (Roberts *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass auch eine Inhibierung anderer Enzyme des Shikimat-Syntheseweges ein mögliches Ziel für die Entwicklung von antimykotischen Therapien darstellt.

Ebenso wie die Deletion von *aroM* war die Deletion des Chorismatsynthese-kodierenden Gens *aroB* in *A. fumigatus* nicht möglich und deutete auf ein weiteres essentielles Gen in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren hin. Um das essentielle *aroB*-Gen trotzdem untersuchen zu können, wurde die Methode des Tet-on-Systems verwendet. Dieses System basiert auf dem Operon der Tetracyclin-Resistenz aus *E. coli* und ist für *S. cerevisiae* und *C. albicans* hinreichend etabliert (Park und Morschhäuser, 2005). Es wurde gezeigt, dass dieses

System auch für *A. fumigatus* funktionell ist (Vogt *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2011) und sich für die Generierung von Mutanten eignet, bei denen ein essentielles Gen phänotypisch charakterisiert werden soll. Im Verlauf der Arbeiten stellte sich heraus, dass anscheinend unter nicht-induzierenden Bedingungen, in Abwesenheit von Doxycyclin, bei einigen Sporen der reverse Tet-Repressor an den Operator binden kann, um die *aroB*-Transkription zu induzieren, sodass es trotz fehlendem Doxycyclin zur Expression von *aroB* und damit zum Auskeimen weniger Sporen kam. Hierfür wurde eine Rate im Promillebereich ermittelt. Daher wäre für Untersuchungen eines konditionalen Expressionsstammes mit Hilfe des Tet-Promotors das Tet-off System besser geeignet, da hierbei bei Anwesenheit von Doxycyclin der Phänotyp einer Deletion erzeugt würde. Zudem scheint bei dem in dieser Arbeit verwendeten System ein weiteres Problem zu sein, dass die Sporen für die Expression des *aroB* Gens zunächst auf Doxycyclin-haltigem Medium angezogen werden müssen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie geringe Mengen an Doxycyclin speichern, die dann ausreichend sind, um auf Medium ohne Doxycyclin auszukeimen.

Insgesamt deuten die gescheiterten Deletionsversuche zweier Gene des Prä-Chorismatwegs (*aroM* und *aroB*) und die nicht mögliche Doppeldeletionsmutante $\Delta trpA; \Delta aroC$ auf essentielle Genprodukte in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren von *A. fumigatus* hin. Dies macht die Enzyme des Shikimat-Synthesewegs und die der davon abzweigenden Äste der Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zu einem vielversprechenden Ziel antimykotischer Substanzen.

Insgesamt ging es in dieser Arbeit um die nähere Untersuchung von Wachstumssubstraten von *A. fumigatus*. Als saprotropher Organismus hat sich dieser Pilz seiner ökologischen Nische ausgezeichnet angepasst, besitzt jedoch die Fähigkeit einen immunsupprimierten Wirt zu befallen und die benötigten Nährstoffe für sein Wachstum innerhalb des Wirts zu erschließen. Dabei wird vermutet, dass die Lunge von Säugern als Substrat dient, weshalb in dieser Arbeit deren Verwertung bzw. Zusammensetzung untersucht wurde. Hierbei galt es herauszufinden, ob die Lunge genügend Nährstoffe bietet, um unter anderem auxotrophe *A. fumigatus*-Stämme ausreichend zu supplementieren.

Die PrtT-Studie zeigt eine hohe Redundanz bezüglich saprotropher Eigenschaften und dementsprechend auch für die Virulenz. Die enorme Anzahl der unterschiedlichsten Proteasen erschwert die Identifizierung von spezifischen Schlüsselfaktoren und Angriffspunkten.

Im Gegensatz dazu scheinen grundlegende Biosynthesewege, die keine derartige Redundanz aufweisen besser geeignet zu sein, vorausgesetzt sie unterscheiden sich

hinreichend von den Synthesewegen des Wirts. Hierbei wurde die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als vielversprechend bewertet, da ein entsprechender Syntheseweg im Menschen fehlt. Erste Untersuchungen bestätigten die Notwendigkeit dieser Synthesewege für *A. fumigatus*, trotzdem sind weitere Experimente unerlässlich, um zu überprüfen, ob sich eines der beteiligten Enzyme als Ziel für antimykotische Substanzen eignet.

6. REFERENZEN

- Aarskog, N. K. and C. A. Vedeler** (2000). Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* **107**: 494-498.
- Abad, A., J. Victoria Fernandez-Molina, J. Bikandi, A. Ramirez, J. Margareto, J. Sendino, F. Luis Hernando, J. Ponton, J. Garaizar and A. Rementeria** (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**: 155-182.
- Ahsan, N., D. G. Lee, K. W. Lee, I. Alam, S. H. Lee, J. D. Bahk and B. H. Lee** (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiol Biochem* **46**: 1062-1070.
- Apostolaki, A., Z. Erpapazoglou, L. Harispe, M. Billini, P. Kafasla, D. Kizis, M. A. Penalva, C. Scazzocchio and V. Sophianopoulou** (2009). AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot Cell* **8**: 339-352.
- Balasubramanian, S., G. Davies, J. Coggins and C. Abell** (1991). Inhibition of chorismate synthase by (6R)- and (6S)-fluoro-5-enolpyruvyl shikimate. *J Am Chem Soc* **113**: 8945-8946.
- Beaumont, F.** (1988). Clinical manifestations of pulmonary *Aspergillus* infections. *Mykosen Suppl* **2**: 15-20.
- Beauvais, A., M. Monod, J. P. Debeaupuis, M. Diaquin, H. Kobayashi and J. P. Latgé** (1997). Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **272**: 6238-6244.
- Beauvais, A., M. Monod, J. Wyniger, J. P. Debeaupuis, E. Grouzmann, N. Brakch, J. Svab, A. G. Hovanessian and J. P. Latgé** (1997). Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect Immun* **65**: 3042-3047.
- Behnsen, J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage and P. F. Zipfel** (2008). The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect Immun* **76**: 820-827.
- Bennett, J. W. and L. L. Lasure** (1991). Growth media: More gene manipulation in fungi. San Diego: Academic Press Inc.
- Bentley, R.** (1990). The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 307-384.
- Berg, C. M. and E. D. Garber** (1962). A genetic analysis of color mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Genetics* **47**: 1139-1146.
- Bornemann, S., M. K. Ramjee, S. Balasubramanian, C. Abell, J. R. Coggins, D. J. Lowe and R. N. Thorneley** (1995). *Escherichia coli* chorismate synthase catalyzes the conversion of (6S)-6-fluoro-5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate to 6-fluorochorismate. Implications for the enzyme mechanism and the antimicrobial action of (6S)-6-fluoroshikimate. *J Biol Chem* **270**: 22811-22815.
- Bouchara, J. P., G. Larcher, F. Joubaud, P. Penn, G. Tronchin and D. Chabasse** (1993). Extracellular fibrinolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**: 81-91.

- Bouchara, J. P., G. Tronchin, G. Larcher and D. Chabasse** (1995). The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **3**: 327-330.
- Bowman, J. C., G. K. Abruzzo, J. W. Anderson, A. M. Flattery, C. J. Gill, V. B. Pikounis, D. M. Schmatz, P. A. Liberator and C. M. Douglas** (2001). Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3474-3481.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brakhage, A. A. and B. Liebmann** (2005). *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S75-82.
- Braus, G., R. Pries, K. Düvel and O. Valerius** (2004). Molecular biology of fungal amino acid biosynthesis regulation. Springer, Heidelberg.
- Braus, G. H.** (1991). Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol Rev* **55**: 349-370.
- Broderick, L. S., D. J. Conces, Jr., R. D. Tarver, C. A. Bergmann and M. A. Bisesi** (1996). Pulmonary aspergillosis: a spectrum of disease. *Crit Rev Diagn Imaging* **37**: 491-531.
- Brown, J. S., A. Aufauvre-Brown, J. Brown, J. M. Jennings, H. Arst, Jr. and D. W. Holden** (2000). Signature-tagged and directed mutagenesis identify PABA synthetase as essential for *Aspergillus fumigatus* pathogenicity. *Mol Microbiol* **36**: 1371-1380.
- Burke, D., D. Dawson and T. Stearns** (2000). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Caddick, M. X., D. Peters and A. Platt** (1994). Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 169-177.
- Calera, J. A., S. Paris, M. Monod, A. J. Hamilton, J. P. Debeaupuis, M. Diaquin, R. Lopez-Medrano, F. Leal and J. P. Latgé** (1997). Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **65**: 4718-4724.
- Casadevall, A.** (2005). Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet Biol* **42**: 98-106.
- Casadevall, A.** (2006). Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbes Infect* **1**: 359-364.
- Cerdeira, A. L. and S. O. Duke** (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J Environ Qual* **35**: 1633-1658.
- Charles, I. G., J. W. Keyte, W. J. Brammar, M. Smith and A. R. Hawkins** (1986). The isolation and nucleotide sequence of the complex AROM locus of *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **14**: 2201-2213.
- Chavira, R., Jr., T. J. Burnett and J. H. Hageman** (1984). Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* **136**: 446-450.
- Chazalet, V., J. P. Debeaupuis, J. Sarfati, J. Lortholary, P. Ribaud, P. Shah, M. Cornet, H. Vu Thien, E. Gluckman, G. Brucker and J. P. Latgé** (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* **36**: 1494-1500.
- Cheung, A. L., P. Ying and V. A. Fischetti** (1991). A method to detect proteinase activity using unprocessed X-ray films. *Anal Biochem* **193**: 20-23.
- Coggins, J. R. and M. R. Boocock** (1986). The *arom* multifunctional enzyme. In D.G Hardie and J. R Coggins, *Multidomain proteins, structure and evolution*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Cotter, G., S. Doyle and K. Kavanagh** (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 163-169.
- D'Enfert, C., M. Diaquin, A. Delit, N. Wuscher, J. P. Debeaupuis, M. Huerre and J. P. Latgé** (1996). Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **64**: 4401-4405.
- Dagenais, T. R. and N. P. Keller** (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **22**: 447-465.
- Davies, G. M., K. J. Barrett-Bee, D. A. Jude, M. Lehan, W. W. Nichols, P. E. Pinder, J. L. Thain, W. J. Watkins and R. G. Wilson** (1994). (6S)-6-fluoroshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 403-406.
- De Beule, K.** (1996). Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *Int J Antimicrob Agents* **6**: 175-181.
- de Mendonca, J. D., F. Ely, M. S. Palma, J. Frazzon, L. A. Basso and D. S. Santos** (2007). Functional characterization by genetic complementation of *aroB*-encoded dehydroquinase synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its heterologous expression and purification. *J Bacteriol* **189**: 6246-6252.
- de Vries, R. P. and J. Visser** (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 497-522.
- Denning, D. W., S. E. Follansbee, M. Scolaro, S. Norris, H. Edelstein and D. A. Stevens** (1991). Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **324**: 654-662.
- Denning, D. W., K. Venkateswarlu, K. L. Oakley, M. J. Anderson, N. J. Manning, D. A. Stevens, D. W. Warnock and S. L. Kelly** (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1364-1368.
- Denning, D. W., P. N. Ward, L. E. Fenelon and E. W. Benbow** (1992). Lack of vessel wall elastolysis in human invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **60**: 5153-5156.
- Diaz Vivancos, P., S. P. Driscoll, C. A. Bulman, L. Ying, K. Emami, A. Treumann, C. Mauve, G. Noctor and C. H. Foyer** (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiol*.
- Dixon, D. M. and T. J. Walsh** (1992). Human pathogenesis. *Biotechnology* **23**: 249-267.
- Duke, S. O. and S. B. Powles** (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* **64**: 319-325.
- Duncan, K., R. M. Edwards and J. R. Coggins** (1987). The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. *Biochem J* **246**: 375-386.
- Dyer, P. S., M. Paoletti and D. B. Archer** (2003). Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**: 2301-2303.
- Eichner, R. D., M. Al Salami, P. R. Wood and A. Müllbacher** (1986). The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int J Immunopharmacol* **8**: 789-797.
- Fleck, C. B., F. Schobel and M. Brock** (2011). Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* **301**: 400-407.
- Fu, Y. H. and G. A. Marzluf** (1987). Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **7**: 1691-1696.
- Gaertner, F. H. and K. W. Cole** (1973). Properties of chorismate synthase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **248**: 4602-4609.
- Gifford, A. H., J. R. Klippenstein and M. M. Moore** (2002). Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **70**: 19-26.

- Giles, N. H., M. E. Case, C. W. Partridge and S. I. Ahmed** (1967). A gene cluster in *Neurospora crassa* coding for an aggregate of five aromatic synthetic enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A **58**: 1453-1460.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen and H. Bujard** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science **268**: 1766-1769.
- Greenberger, P. A., J. L. Liotta and M. Roberts** (1989). The effects of age on isotypic antibody responses to *Aspergillus fumigatus*: implications regarding in vitro measurements. J Lab Clin Med **114**: 278-284.
- Haines, J.** (1995). *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. Biocycle **6**: 32-35.
- Hamer, S.** (2008). The biosynthesis of aromatic amino acids in *Aspergillus fumigatus*. University of Applied Sciences Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach.
- Hartmann, T., M. Dümig, B. M. Jaber, E. Szewczyk, P. Olbermann, J. Morschhäuser and S. Krappmann** (2010). Validation of a self-excising marker in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* by employing the beta-rec/six site-specific recombination system. Appl Environ Microbiol **76**: 6313-6317.
- Haslam, E.** (1974). The shikimate pathway, Butterworths, London.
- Hawkins, A. R., H. K. Lamb, J. D. Moore, I. G. Charles and C. F. Roberts** (1993). The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects. J Gen Microbiol **139**: 2891-2899.
- Hearn, V. M. and D. W. Mackenzie** (1980). Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. Mykosen **23**: 549-562.
- Hensel, M., H. N. Arst, Jr., A. Aufauvre-Brown and D. W. Holden** (1998). The role of the *Aspergillus fumigatus* *areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis. Mol Gen Genet **258**: 553-557.
- Henstrand, J. M., N. Amrhein and J. Schmid** (1995). Cloning and characterization of a heterologously expressed bifunctional chorismate synthase/flavin reductase from *Neurospora crassa*. J Biol Chem **270**: 20447-20452.
- Herrmann, K. M.** (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell **7**: 907-919.
- Hillen, W. and C. Berens** (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. Annu Rev Microbiol **48**: 345-369.
- Hinnebusch, A. G.** (1984). Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A **81**: 6442-6446.
- Hinnebusch, A. G.** (1997). Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. J Biol Chem **272**: 21661-21664.
- Hinnebusch, A. G.** (2005). Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. Annu Rev Microbiol **59**: 407-450.
- Hinnebusch, A. G. and K. Natarajan** (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. Eukaryot Cell **1**: 22-32.
- Hoffmann, B., O. Valerius, M. Andermann and G. H. Braus** (2001). Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell **12**: 2846-2857.
- Hohl, T. M. and M. Feldmesser** (2007). *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. Eukaryot Cell **6**: 1953-1963.
- Ibrahim-Granet, O., M. Dubourdeau, J. P. Latgé, P. Ave, M. Huerre, A. A. Brakhage and M. Brock** (2008). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. Cell Microbiol **10**: 134-148.

- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jaton-Ogay, K., S. Paris, M. Huerre, M. Quadroni, R. Falchetto, G. Togni, J. P. Latgé and M. Monod** (1994). Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **14**: 917-928.
- Jaton-Ogay, K., M. Suter, R. Cramer, R. Falchetto, A. Fatih and M. Monod** (1992). Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 163-168.
- Jiang, N., N. S. Tan, B. Ho, and J. L. Ding** (2007). Azocoll protease activity assay. *Nat. Protoc.*: doi:10.1038/nprot.2007.1484.
- Jones, D. G., U. Reusser and G. H. Braus** (1991). Molecular cloning, characterization and analysis of the regulation of the *ARO2* gene, encoding chorismate synthase, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **5**: 2143-2152.
- Jorgensen, M. U., M. B. Bruun, T. Didion and M. C. Kielland-Brandt** (1998). Mutations in five loci affecting *GAP1*-independent uptake of neutral amino acids in yeast. *Yeast* **14**: 103-114.
- Kahan, F. M., J. S. Kahan, P. J. Cassidy and H. Kropp** (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* **235**: 364-386.
- Kaiser, L., T. Huguenin, P. D. Lew, B. Chapuis and D. Pittet** (1998). Invasive aspergillosis. Clinical features of 35 proven cases at a single institution. *Medicine (Baltimore)* **77**: 188-194.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**: 103-110.
- Katz, M. E., K. A. Gray and B. F. Cheetham** (2006). The *Aspergillus nidulans xprG* (*phoG*) gene encodes a putative transcriptional activator involved in the response to nutrient limitation. *Fungal Genet Biol* **43**: 190-199.
- Katz, M. E., A. Masoumi, S. R. Burrows, C. G. Shirtliff and B. F. Cheetham** (2000). The *Aspergillus nidulans xprF* gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics* **156**: 1559-1571.
- Kavanagh, K. and E. P. Reeves** (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 101-112.
- Kemper, C. A., J. S. Hostetler, S. E. Follansbee, P. Ruane, D. Covington, S. S. Leong, S. C. Deresinski and D. A. Stevens** (1993). Ulcerative and plaque-like tracheobronchitis due to infection with *Aspergillus* in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* **17**: 344-352.
- Kogan, T. V., J. Jadoun, L. Mittelman, K. Hirschberg and N. Osherov** (2004). Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J Infect Dis* **189**: 1965-1973.
- Kolar, M., P. J. Punt, C. A. van den Hondel and H. Schwab** (1988). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene* **62**: 127-134.
- Kothary, M. H., T. Chase, Jr. and J. D. Macmillan** (1984). Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* **43**: 320-325.
- Krappmann, S., O. Bayram and G. H. Braus** (2005). Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryot Cell* **4**: 1298-1307.
- Krappmann, S., E. M. Bignell, U. Reichard, T. Rogers, K. Haynes and G. H. Braus** (2004). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA contributes significantly to the virulence of this fungal pathogen. *Mol Microbiol* **52**: 785-799.

- Krappmann, S. and G. H. Braus** (2005). Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S31-40.
- Krappmann, S., N. Jung, B. Medic, S. Busch, R. A. Prade and G. H. Braus** (2006). The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol Microbiol* **61**: 76-88.
- Krappmann, S., W. N. Lipscomb and G. H. Braus** (2000). Coevolution of transcriptional and allosteric regulation at the chorismate metabolic branch point of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13585-13590.
- Krappmann, S., C. Sasse and G. H. Braus** (2006). Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell* **5**: 212-215.
- Kudla, B., M. X. Caddick, T. Langdon, N. M. Martinez-Rossi, C. F. Bennett, S. Sibley, R. W. Davies and H. N. Arst, Jr.** (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J* **9**: 1355-1364.
- Kwon-Chung, K. J. and J. A. Sugui** (2009). What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Med Mycol* **47 Suppl 1**: S97-103.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambert, J. M., M. R. Boocock and J. R. Coggins** (1985). The 3-dehydroquinate synthase activity of the pentafunctional arom enzyme complex of *Neurospora crassa* is Zn²⁺-dependent. *Biochem J* **226**: 817-829.
- Latgé, J. P.** (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**: 310-350.
- Lehrer, R. I. and R. G. Jan** (1970). Interaction of *Aspergillus fumigatus* spores with human leukocytes and serum. *Infect Immun* **1**: 345-350.
- Liebmann, B., T. W. Mühleisen, M. Müller, M. Hecht, G. Weidner, A. Braun, M. Brock and A. A. Brakhage** (2004). Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. *Arch Microbiol* **181**: 378-383.
- Lin, S. J., J. Schranz and S. M. Teutsch** (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**: 358-366.
- Lucchini, G., A. Biraghi, M. L. Carbone, A. de Scrilli and G. E. Magni** (1978). Effect of mutation in the aromatic amino acid pathway on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **136**: 55-62.
- Mabey, J. E., M. J. Anderson, P. F. Giles, C. J. Miller, T. K. Attwood, N. W. Paton, E. Bornberg-Bauer, G. D. Robson, S. G. Oliver and D. W. Denning** (2004). CADRE: the Central *Aspergillus* Data REpository. *Nucleic Acids Res* **32**: D401-405.
- Macheroux, P., J. Schmid, N. Amrhein and A. Schaller** (1999). A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* **207**: 325-334.
- Maerker, C., M. Rohde, A. A. Brakhage and M. Brock** (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS J* **272**: 3615-3630.
- Mandel, M. and A. Higa** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Margolis-Clark, E., I. Hunt, S. Espinosa and B. J. Bowman** (2001). Identification of the gene at the *pmg* locus, encoding system II, the general amino acid transporter in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **33**: 127-135.
- Markaryan, A., I. Morozova, H. Yu and P. E. Kolattukudy** (1994). Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and

- immunolectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect Immun* **62**: 2149-2157.
- Marr, K. A., F. Crippa, W. Leisenring, M. Hoyle, M. Boeckh, S. A. Balajee, W. G. Nichols, B. Musher and L. Corey** (2004). Itraconazole versus fluconazole for prevention of fungal infections in patients receiving allogeneic stem cell transplants. *Blood* **103**: 1527-1533.
- Marr, K. A., T. Patterson and D. Denning** (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am* **16**: 875-894, vi.
- Mattern, I. E., J. M. van Noort, P. van den Berg, D. B. Archer, I. N. Roberts and C. A. van den Hondel** (1992). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol Gen Genet* **234**: 332-336.
- McCormick, A., J. Loeffler and F. Ebel** (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* **12**: 1535-1543.
- Meri, T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Wurznner, J. Hellwage, S. Meri and P. F. Zipfel** (2002). The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* **70**: 5185-5192.
- Meyer, V., F. Wanka, J. van Gent, M. Arentshorst, C. A. van den Hondel and A. F. Ram** (2011). Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2975-2983.
- Minehart, P. L. and B. Magasanik** (1991). Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **11**: 6216-6228.
- Monod, M., K. Jatton-Ogay and U. Reichard** (1999). *Aspergillus fumigatus*-secreted proteases as antigenic molecules and virulence factors. *Contrib Microbiol* **2**: 182-192.
- Monod, M., O. Jousson and U. Reichard** (2009). *Aspergillus fumigatus* secreted proteases. ASM Press, Washington, DC.
- Monod, M., S. Paris, J. Sarfati, K. Jatton-Ogay, P. Ave and J. P. Latgé** (1993). Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 39-46.
- Moutaouakil, M., M. Monod, M. C. Prevost, J. P. Bouchara, S. Paris and J. P. Latgé** (1993). Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* in vitro and in vivo. *J Med Microbiol* **39**: 393-399.
- Müllbacher, A. and R. D. Eichner** (1984). Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 3835-3837.
- Murali, P. S., V. P. Kurup, N. K. Bansal, J. N. Fink and P. A. Greenberger** (1998). IgE down regulation and cytokine induction by *Aspergillus* antigens in human allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Lab Clin Med* **131**: 228-235.
- Mylonakis, E., T. F. Barlam, T. Flanigan and J. D. Rich** (1998). Pulmonary aspergillosis and invasive disease in AIDS: review of 342 cases. *Chest* **114**: 251-262.
- Nakanishi, N. and M. Yamamoto** (1984). Analysis of the structure and transcription of the *aro3* cluster gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **195**: 164-169.
- Nakayama, H., T. Mio, S. Nagahashi, M. Kokado, M. Arisawa and Y. Aoki** (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 6712-6719.
- Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D. B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulson, R. Davies, P. S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, T. V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J. L. Garcia, M. J. Garcia, A. Goble, G. H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphray, J. Jimenez, N. Keller, H. Khouri,**

- K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafon, J. P. Latgé, W. Li, A. Lord, C. Lu, W. H. Majoros, G. S. May, B. L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O'Neil, I. Paulsen, M. A. Penalva, M. Perteu, C. Price, B. L. Pritchard, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, N. Rawlins, M. A. Rajandream, U. Reichard, H. Renauld, G. D. Robson, S. Rodriguez de Cordoba, J. M. Rodriguez-Pena, C. M. Ronning, S. Rutter, S. L. Salzberg, M. Sanchez, J. C. Sanchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekaiia, G. Turner, C. R. Vazquez de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J. H. Yu, C. Fraser, J. E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell and D. W. Denning (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**: 1151-1156.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller and P. S. Dyer (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**: 471-474.
- Oliver, B. G., J. C. Panepinto, D. S. Askeu and J. C. Rhodes (2002). cAMP alteration of growth rate of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* is carbon-source dependent. *Microbiology* **148**: 2627-2633.
- Osmani, A. H., B. R. Oakley and S. A. Osmani (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc* **1**: 2517-2526.
- Panepinto, J. C., B. G. Oliver, J. R. Fortwendel, D. L. Smith, D. S. Askeu and J. C. Rhodes (2003). Deletion of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding the Ras-related protein RhbA reduces virulence in a model of Invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **71**: 2819-2826.
- Paoletti, M., C. Rydholm, E. U. Schwier, M. J. Anderson, G. Szakacs, F. Lutzoni, J. P. Debeaupuis, J. P. Latgé, D. W. Denning and P. S. Dyer (2005). Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* **15**: 1242-1248.
- Paris, S., D. Wysong, J. P. Debeaupuis, K. Shibuya, B. Philippe, R. D. Diamond and J. P. Latgé (2003). Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **71**: 3551-3562.
- Park, Y. N. and J. Morschhäuser (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1328-1342.
- Patterson, K. and M. E. Strek (2010). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc* **7**: 237-244.
- Patterson, R., P. A. Greenberger, J. M. Halwig, J. L. Liotta and M. Roberts (1986). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Natural history and classification of early disease by serologic and roentgenographic studies. *Arch Intern Med* **146**: 916-918.
- Patterson, R., P. A. Greenberger, R. C. Radin and M. Roberts (1982). Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann Intern Med* **96**: 286-291.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pitt, J. I. and R. A. Samson (2007). Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Stud Mycol* **59**: 67-70.
- Pöggeler, S. (2002). Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **42**: 153-160.
- Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latgé and J. W. Taylor (2005). Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* **59**: 1886-1899.

- Punt, P. J., F. H. Schuren, J. Lehmbeck, T. Christensen, C. Hjort and C. A. van den Hondel** (2008). Characterization of the *Aspergillus niger prtT*, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. *Fungal Genet Biol* **45**: 1591-1599.
- Punt, P. J. and C. A. van den Hondel** (1992). Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol* **216**: 447-457.
- Quevillon-Cheruel, S., N. Leulliot, P. Meyer, M. Graille, M. Bremang, K. Blondeau, I. Sorel, A. Poupon, J. Janin and H. van Tilbeurgh** (2004). Crystal structure of the bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 619-625.
- Rachfall, N., I. Heinemeyer, B. Morgenstern, O. Valerius and G. H. Braus** (2011). 5'TRU: identification and analysis of translationally regulative 5'untranslated regions in amino acid starved yeast cells. *Mol Cell Proteomics* **10**: M110 003350.
- Rachfall, N., I. Heinemeyer and O. Valerius** (2009). 5'-TRUE: Die wahre Translation? *Biospektrum* **2**: 169-171.
- Ramjee, M., S. Balasubramanian and C. Abell** (1992). Reaction of (6R)-6-F-EPSP with recombinant *Escherichia coli* chorismate synthase generates a stable flavin mononucleotide semiquinone radical. *J Am Chem Soc* **114**: 3151-3153.
- Reichard, U., S. Buttner, H. Eiffert, F. Staib and R. Ruchel** (1990). Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol* **33**: 243-251.
- Reichard, U., H. Eiffert and R. Ruchel** (1994). Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* **32**: 427-436.
- Reichard, U., B. Lechenne, A. R. Asif, F. Streit, E. Grouzmann, O. Jousson and M. Monod** (2006). Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1739-1748.
- Reichard, U., M. Monod, F. Odds and R. Ruchel** (1997). Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* **35**: 189-196.
- Reichard, U., M. Monod and R. Ruchel** (1995). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 69-74.
- Rhodes, J. C.** (2006). *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol* **44 Suppl 1**: S77-81.
- Ribaud, P., H. Esperou-Bourdeau, A. Devergie and E. Gluckman** (1994). [Invasive aspergillosis and bone marrow allograft]. *Pathol Biol (Paris)* **42**: 652-655.
- Richards, T. A., J. B. Dacks, S. A. Campbell, J. L. Blanchard, P. G. Foster, R. McLeod and C. W. Roberts** (2006). Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryot Cell* **5**: 1517-1531.
- Roberts, C. W., F. Roberts, R. E. Lyons, M. J. Kirisits, E. J. Mui, J. Finnerty, J. J. Johnson, D. J. Ferguson, J. R. Coggins, T. Krell, G. H. Coombs, W. K. Milhous, D. E. Kyle, S. Tzipori, J. Barnwell, J. B. Dame, J. Carlton and R. McLeod** (2002). The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis* **185 Suppl 1**: S25-36.
- Rogers, H., M. Perkins and J. Ward** (1980). *Microbial cell walls and membranes*, Chapman & Hall, London.
- Sachs, M. S.** (1996). *General and cross-pathway controls of amino acid biosynthesis*. R. Brambl und G.A. Marzluf, Heidelberg, Springer Verlag.

- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Samson, R. A.** (1999). The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib Microbiol* **2**: 5-20.
- Sandhu, D. K., R. S. Sandhu, Z. U. Khan and V. N. Damodaran** (1976). Conditional virulence of a p-aminobenzoic acid-requiring mutant of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **13**: 527-532.
- Sasse, C., E. M. Bignell, M. Hasenberg, K. Haynes, M. Gunzer, G. H. Braus and S. Krappmann** (2008). Basal expression of the *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA is sufficient to support pulmonary aspergillosis. *Fungal Genet Biol* **45**: 693-704.
- Schobel, F., I. D. Jacobsen and M. Brock** (2010). Evaluation of lysine biosynthesis as an antifungal drug target: biochemical characterization of *Aspergillus fumigatus* homocitrate synthase and virulence studies. *Eukaryot Cell* **9**: 878-893.
- Sharon, H., S. Hagag and N. Osherov** (2009). Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **77**: 4051-4060.
- Sheppard, D. C., K. A. Marr, D. N. Fredricks, L. Y. Chiang, T. Doedt and S. G. Filler** (2006). Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* **12**: 376-380.
- Sherman, F., G. R. Fink and J. B. and Hicks** (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Singh, S., S. A. Braus-Stromeier, C. Timpner, V. T. Tran, G. Lohaus, M. Reusche, J. Knufer, T. Teichmann, A. von Tiedemann and G. H. Braus** (2010). Silencing of *Vlaro2* for chorismate synthase revealed that the phytopathogen *Verticillium longisporum* induces the cross-pathway control in the xylem. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1961-1976.
- Smith, J. M., C. M. Tang, S. Van Noorden and D. W. Holden** (1994). Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **62**: 5247-5254.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spikes, S., R. Xu, C. K. Nguyen, G. Chamilos, D. P. Kontoyiannis, R. H. Jacobson, D. E. Ejzykowicz, L. Y. Chiang, S. G. Filler and G. S. May** (2008). Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis* **197**: 479-486.
- Stanzani, M., E. Orciuolo, R. Lewis, D. P. Kontoyiannis, S. L. Martins, L. S. St John and K. V. Komanduri** (2005). *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* **105**: 2258-2265.
- Steinrucken, H. C. and N. Amrhein** (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **94**: 1207-1212.
- Stewart, V. and S. J. Vollmer** (1986). Molecular cloning of *nit-2*, a regulatory gene required for nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Gene* **46**: 291-295.
- Stuart, W. D., K. Koo and S. J. Vollmer** (1988). Cloning of *mtr*, an amino acid transport gene of *Neurospora crassa*. *Genome* **30**: 198-203.
- Szewczyk, E. and S. Krappmann** (2010). Conserved regulators of mating are essential for *Aspergillus fumigatus* cleistothecium formation. *Eukaryot Cell* **9**: 774-783.

- Szewczyk, E., T. Nayak, C. E. Oakley, H. Edgerton, Y. Xiong, N. Taheri-Talesh, S. A. Osmani and B. R. Oakley** (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**: 3111-3120.
- Tang, C. M., J. Cohen, T. Krausz, S. Van Noorden and D. W. Holden** (1993). The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **61**: 1650-1656.
- Tekaia, F. and J. P. Latgé** (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol* **8**: 385-392.
- Tesfaigzi, J., W. Smith-Harrison and D. M. Carlson** (1994). A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* **17**: 268-269.
- Thau, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J. P. Latgé and S. Paris** (1994). rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **62**: 4380-4388.
- Thevelein, J. M. and J. H. de Winde** (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**: 904-918.
- Tsai, H. F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler and K. J. Kwon-Chung** (1998). The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* **180**: 3031-3038.
- Tzin, V. and G. Galili** (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* **3**: 956-972.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. Leunissen** (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**: W71-74.
- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard and W. Hillen** (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7963-7968.
- Varga, J.** (2003). Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **149**: 816-819.
- Vogeser, M., A. Haas, D. Aust and G. Ruckdeschel** (1997). Postmortem analysis of invasive aspergillosis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**: 1-6.
- Vogl, G., I. Lesiak, D. B. Jensen, S. Perkhofer, R. Eck, C. Speth, C. Lass-Flörl, P. F. Zipfel, A. M. Blom, M. P. Dierich and R. Würzner** (2008). Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol Immunol* **45**: 1485-1493.
- Vogt, K., R. Bhabhra, J. C. Rhodes and D. S. Askew** (2005). Doxycycline-regulated gene expression in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiol* **5**: 1.
- Wallace, J. M., R. Lim, B. L. Browdy, P. C. Hopewell, J. Glassroth, M. J. Rosen, L. B. Reichman and P. A. Kvale** (1998). Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Chest* **114**: 131-137.
- Weinberger, M., I. Elattar, D. Marshall, S. M. Steinberg, R. L. Redner, N. S. Young and P. A. Pizzo** (1992). Patterns of infection in patients with aplastic anemia and the emergence of *Aspergillus* as a major cause of death. *Medicine (Baltimore)* **71**: 24-43.
- Wek, R. C.** (1994). eIF-2 kinases: regulators of general and gene-specific translation initiation. *Trends Biochem Sci* **19**: 491-496.
- Wek, R. C., H. Y. Jiang and T. G. Anthony** (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**: 7-11.
- Wesenberg, D., I. Kyriakides and S. N. Agathos** (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* **22**: 161-187.

- Wessels, J. G. H.** (1993). Wall growth, protein excretion, and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* **123**: 397-413.
- White, P. J., G. Millar and J. R. Coggins** (1988). The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa*. *Biochem J* **251**: 313-322.
- Wilson, R. A. and H. N. Arst, Jr.** (1998). Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "streetwise" GATA family of transcription factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 586-596.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael and M. W. Graham** (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Yamada, A., T. Kataoka and K. Nagai** (2000). The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* **71**: 27-32.
- Youngchim, S., R. Morris-Jones, R. J. Hay and A. J. Hamilton** (2004). Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* **53**: 175-181.
- Zaborske, J. M., X. Wu, R. C. Wek and T. Pan** (2010). Selective control of amino acid metabolism by the GCN2 eIF2 kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem* **11**: 29.

PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Bergmann A, Hartmann T, Cairns T, Bignell EM, Krappmann S. (2009).
A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infect Immun.* 77:4041-50.

AFFIDAVIT

(EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Untersuchungen zur Verwertung proteinhaltiger Substrate als mögliche
Virulenzdeterminante des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*“

eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 29.09.2011