

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

**Neue Ansätze für die Diagnostik und die Therapie invasiver  
Schimmelpilzmykosen**

von Annegret Elisabeth Wiedemann

München 2017

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

**Neue Ansätze für die Diagnostik und die Therapie invasiver  
Schimmelpilzmykosen**

von Annegret Elisabeth Wiedemann

aus Coburg

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Angefertigt am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Mentor: Prof. Dr. Frank Ebel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer  
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis  
Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller  
Priv.-Doz. Dr. Johannes Wagener

**Tag der Promotion:**  
11. Februar 2017

*Für meine Familie*

*Ich habe nicht nachgedacht, ich habe experimentiert.*

Wilhelm Röntgen

(1845-1923)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b><i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1	Taxonomie und Bedeutung .....	3
1.2	Lebenszyklus und Habitat von <i>A. fumigatus</i> .....	3
1.3	Bedeutung in der Humanmedizin.....	5
1.4	Bedeutung in der Tiermedizin.....	8
<b>2.</b>	<b><i>Fusarium</i> Spezies .....</b>	<b>11</b>
2.1	Taxonomie und Bedeutung .....	11
2.2	Lebenszyklus und Habitat .....	12
2.3	Bedeutung in der Humanmedizin.....	13
2.4	Bedeutung in der Tiermedizin.....	16
<b>3.</b>	<b>Methoden für die Diagnostik invasiver Aspergillosen und Fusariosen in der Humanmedizin .....</b>	<b>18</b>
<b>4.</b>	<b>Antifungale Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen .....</b>	<b>22</b>
4.1	Aktueller Stand der antifungalen Therapie .....	22
4.2	Der HOG-Signalweg als mögliches Ziel für neue Therapieansätze .....	24
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>28</b>
<b>1.</b>	<b>Publikation 1 .....</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>Publikation 2.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>1.</b>	<b>Der AB135-8-Antikörper und sein Antigen.....</b>	<b>50</b>
1.1	β-Galaktofuranose und seine Bedeutung als Antigenbestandteil.....	50
1.2	Der AB135-8-Antikörper und sein möglicher Nutzen für die Diagnostik.....	54
1.3	Impfstoffentwicklung mithilfe des AB135-8-Antikörpers.....	56
<b>2.</b>	<b>Der HOG-Signalweg als Zielstruktur für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien .....</b>	<b>59</b>
2.1	Der HOG-Signalweg und die antimykotische Wirkungsweise seiner Aktivatoren.....	59

---

2.2	Bedeutung der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für die Behandlung von Infektionen durch Nicht- <i>Aspergillus</i> -Schimmelpilze .....	61
2.3	Der Einfluss HOG-aktivierender Substanzen auf die Diagnostik.....	63
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>86</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ABPA	allergisch-bronchopulmonale Aspergillose
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
ATA	alimentäre toxische Aleukie
CDR	<i>complementary determining region</i>
CT	Computertomographie
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen-binding</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeLV	felines Leukämievirus
FIV	felines Immundefizienzvirus
Gal <sub>f</sub>	Galaktofuranose
Gal <sub>p</sub>	Galaktopyranose
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HOG	<i>high osmolarity glycerol</i>
HHK	Hybrid-Histidin-Kinase
HK	Histidin- Kinase
HPt	<i>histidine-containing phosphotransfer protein</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
IA	invasive Aspergillose
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPA	invasive pulmonale Aspergillose
kDA	Kilodalton
mAB	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
REC	<i>regulator receiver</i>
RR	<i>response regulator</i>
sp.	eine Spezies
spp.	mehrere Spezies

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Morphologie von <i>A. fumigatus</i> .....	4
Abbildung 2: Durch <i>A. fumigatus</i> verursachte Krankheitsbilder.....	5
Abbildung 3: Entwicklung einer invasiven Aspergillose abhängig von der Art der Immunsuppression.....	7
Abbildung 4: Diagramm der Konidienformen von <i>Fusarium</i> spp.....	13
Abbildung 5: Durch <i>Fusarium</i> spp. verursachte Krankheitsbilder im Menschen .....	14
Abbildung 6: Polysaccharidgerüst der Zellwand von <i>A. fumigatus</i> .....	20
Abbildung 7: Übersicht klinisch relevanter Antimykotika und ihre Wirkung auf Aspergillus und <i>Fusarium</i> spp. ....	24
Abbildung 8: Der HOG-Signalweg.....	25
Abbildung 9: Strukturformeln von Pyrrolnitrin, Fludioxonil und Iprodione.....	27
Abbildung 10: Strukturformel von Galf und Galp.....	51
Abbildung 11: Vorkommen von Galf-synthetisierenden Genen im Reich der Pilze....	52
Abbildung 12: Struktur eines IgG-Antikörpers .....	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Zweikomponentensystems.....	59

## I. EINLEITUNG

Schätzungen besagen, dass es ca. 1,5 Millionen Pilzspezies auf dieser Erde gibt (HAWKSWORTH, 2001). Nur einige wenige davon sind auch als Krankheitserreger bekannt. Prinzipiell handelt es sich bei den meisten dieser Pilze um opportunistische Erreger. Das heißt der Erreger nutzt eine bereits vorliegende Abwehrschwäche des Erkrankten aus und es kommt zu oft schweren Infektionen. Bei einem Gesunden werden die Schimmelpilze dagegen schnell vom Immunsystem eliminiert.

Die invasiven Mykosen sind in der Humanmedizin besonders gefürchtet. Sie stellen ein großes Gesundheitsrisiko dar und gehen mit hohen Mortalitätsraten einher. Die Inzidenz dieser Infektionen nimmt stetig zu, da sich die Risikogruppen erweitern. Besonders gefährdet für eine invasive Mykose sind Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantationen, Krebspatienten, Patienten die eine immunsuppressive Therapie erhalten, AIDS-Patienten, Frühchen oder auch Patienten, die sich einer großen Operation unterziehen müssen (NUCCI & MARR, 2005).

Zu den Erregern invasiver Mykosen zählen zum einen Hefen mit den häufigsten Vertretern *Candida* spp. und *Cryptococcus* spp., zum anderen können auch filamentöse Pilze die Ursache sein (ENOCH et al., 2006). Zu den klinisch relevanten filamentösen Pilzen gehören *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. und die Zygomyceten (MARR et al., 2002). Als häufigster Erreger invasiver Schimmelpilzmykosen gilt *Aspergillus*, insbesondere *A. fumigatus* (ENOCH et al., 2006). Beim zweithäufigsten Erreger handelt es sich um *Fusarium*, wobei die klinisch relevantesten *Fusarium* Spezies dem *F. solani*-Komplex, dem *F. oxysporum*-Komplex und dem *Giberella fujikuroi*-Komplex angehören (DIGNANI & ANAISSIE, 2004; NUCCI & ANAISSIE, 2007).

Die Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen stellt die Medizin immer noch vor große Herausforderungen. Dem Kliniker stehen für die Behandlung im Wesentlichen nur drei Klassen von Antimykotika zur Verfügung: Polyene, Azole und Echinocandine. Durch die geringe Vielfalt an Medikamenten kommt es

jedoch immer häufiger zur Ausbildung von Resistenzen (ENOCH et al., 2006). Zudem weisen die verschiedenen Schimmelpilze teilweise sehr unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den vorhandenen Antimykotika auf. Während Echinocandine beispielsweise auf *Aspergillus* spp. fungistatisch wirken, weisen sie in klinisch relevanten Konzentrationen keine Aktivität gegenüber *Fusarium* spp. auf (DENNING, 2003). Deshalb ist der Bedarf für neue Therapieansätze groß. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber den verschiedenen Substanzen, ist aber auch eine genaue Identifizierung des Erregers besonders wichtig, doch nicht immer möglich. Im Falle von *Aspergillus*- und *Fusarium*-Infektionen ist die Differenzierung besonders problematisch, obwohl sie einen erheblichen Einfluss auf die Wahl des Antimykotikums hat. In histologischen Schnitten ist eine Differenzierung unmöglich, da *Aspergillus* und *Fusarium* eine sehr ähnliche Morphologie aufweisen. Dazu kommt, dass die Aussagekraft einer positiven Kultur oft fraglich ist, da sie stark davon abhängig ist, ob die Probe steril entnommen werden konnte (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Darüber hinaus gibt es mit dem Galaktomannan-Assay, eine bereits seit einigen Jahren eingesetzte serologische Nachweismethode für *Aspergillus* spp. In letzter Zeit häufen sich aber auch da die Berichte, dass auch eine *Fusarium*-Infektion zu einem positiven Testergebnis im Assay führen kann (TORTORANO et al., 2012). Mit den bisherigen diagnostischen Mitteln ist eine Unterscheidung zwischen *Fusarium*- und *Aspergillus*-Infektionen somit oft nicht möglich und die Entwicklung spezifischerer Nachweismethoden für diese Schimmelpilze ist daher von großer Bedeutung.

Diese Arbeit hatte zwei Ziele. Zum einen sollten Antikörper gegen Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze hergestellt werden, um mit deren Hilfe neue diagnostische Nachweismethoden zu entwickeln. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf einer Methode für die Differenzierung von durch *Aspergillus* und *Fusarium* ausgelösten invasiven Schimmelpilzmykosen mithilfe spezifischer Antikörper. Im zweiten Teil lag der Fokus auf der Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen. Dabei sollte untersucht werden, ob Substanzen, die den Pilz-spezifischen *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalweg aktivieren, prinzipiell für eine antifungale Therapie geeignet sind.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Aspergillus fumigatus*

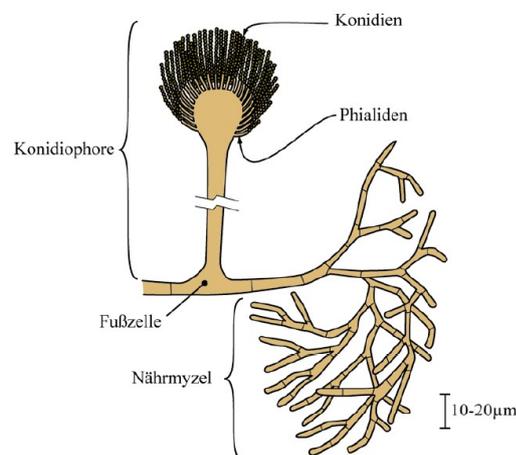
#### 1.1 Taxonomie und Bedeutung

*A. fumigatus* wurde erstmals 1863 vom deutschen Arzt und Botaniker J. B. Georg W. Fresenius beschrieben (SCHMIDT, 1998). Der Name „fumigatus“ stammt vom lateinischen Wort fumus und bedeutet Rauch. Damit wird sowohl auf die durch das enthaltene Melanin rauchgrüne Farbe der Sporen angespielt als auch auf die rauchartige Verbreitung der Sporen durch die Luft. *A. fumigatus* zählt wie alle Pilze zu den Eukaryonten. Diese zeichnen sich im Gegensatz zu den Prokaryonten durch das Vorhandensein eines Zellkerns aus. *A. fumigatus* gehörte lange zu den sogenannten fungi imperfecti, bei denen keine sexuelle Form bekannt ist. Erst 2009 konnten O’Gorman *et al.* diese für *A. fumigatus* nachweisen. Die entsprechende teleomorphe Form wurde *Neosartorya fumigatus* genannt (O’GORMAN *et al.*, 2009). Die Gattung *Aspergillus*, die auch als Gießkannenschimmel bezeichnet wird, besteht aus ca. 200 Arten, von denen einige auch eine wichtige Rolle in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie spielen. *A. terreus* wird beispielsweise für die Produktion des cholesterinsenkenden Medikaments Lovastatin verwendet und *A. oryzae* hilft bei der Fermentation von Sojabohnen und Reis zu Sojasauce und Sake. In der Landwirtschaft wiederum gilt *Aspergillus section flavi* als gefürchteter Erntekontaminant. Er produziert das hoch toxische Aflatoxin, das sowohl kanzerogene als auch immunsupprimierende Eigenschaften besitzt. Die Aufnahme des Toxins durch kontaminiertes Getreide kann zu schwerer Krankheit oder sogar zum Tod führen (DAGENAIS & KELLER, 2009).

#### 1.2 Lebenszyklus und Habitat von *A. fumigatus*

Der Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt mit der Verbreitung von Sporen durch die Luft. Die asexuellen Sporen, auch Konidien genannt, sind 2-3µm groß und beinhalten große Mengen an Trehalose, die es Ihnen ermöglicht, für lange Zeit in der Umwelt zu überdauern (NI & YU, 2007). Die Konidienoberfläche ist von einer „Rodlet-Layer“ umgeben, einer Hülle aus hydrophoben Proteinen. Diese schützt die Sporen zum einen vor schädlichen Umwelteinflüssen, zum

anderen aber auch vor einer Erkennung durch Makrophagen (AIMANIANDA et al., 2009). Treffen die Sporen auf eine Oberfläche, lagern sie sich dieser an und beginnen abhängig von verschiedenen Umweltbedingungen wie z.B. Temperatur, Feuchtigkeit oder pH-Wert mit der Keimung. Zunächst kommt es zur Spaltung von Trehalosepolymeren und deren Umwandlung in Glycerin, wodurch sich der osmotische Druck im Inneren der Sporen erhöht, Wasser einströmt und die Sporen schließlich auf das 3-4-fache ihrer Größe anschwellen (D'ENFERT, 1997). Nach wenigen Stunden bilden sich Keimschläuche, die nach und nach zu einer Hyphe heranwachsen (ROHDE et al., 2002). Hyphen haben einen Durchmesser von 2-4µm und sind durch Septen in einzelne Kompartimente unterteilt. Die Septen besitzen Poren durch die ein Austausch von Zytoplasma möglich wird. Die Hyphenzellwand besteht größtenteils aus den Polysacchariden  $\beta$ -1,3-D-Glucan,  $\beta$ -1,6-D-Glucan, Galaktomannan und Chitin (BERNARD & LATGÉ, 2001). Die Hyphen verzweigen sich anschließend und bilden miteinander ein dichtes Myzel. Bei Luftkontakt kommt es zur Sporulation. Dabei wächst aus einer Fußzelle eine Art Stiel, auch Konidiophor genannt, empor. Die diesem aufgelagerten Flaschenzellen, auch Phialiden genannt, schnüren wiederum die Konidien in Ketten ab. Nach Freisetzung dieser Sporen kann der Zyklus von vorne beginnen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Morphologie von *A. fumigatus***

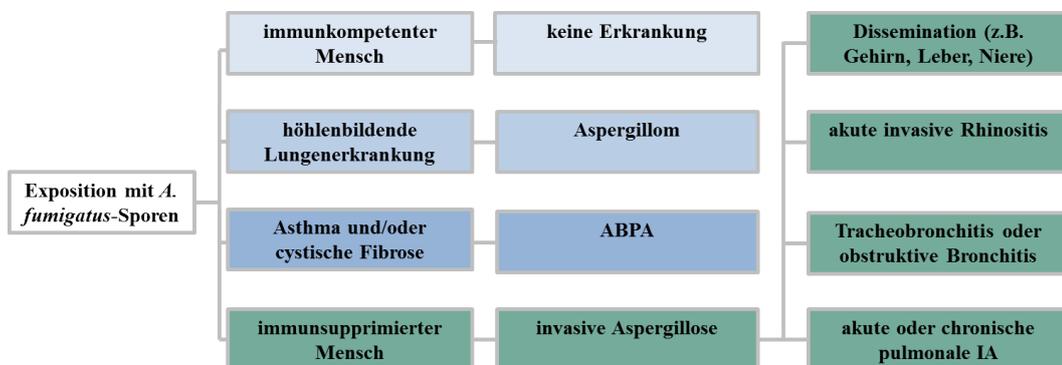
Nach Schwiembacher (SCHWIENBACHER, 2005)

*Aspergillus* ernährt sich ausschließlich heterotroph d.h. er bezieht seine Nährstoffe aus der Zersetzung organischer Substanz im Erdboden. Deshalb spielt er auch eine wichtige Rolle für das Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff in der Umwelt. *A. fumigatus* benötigt aerobe Wachstumsbedingungen und bevorzugt vergleichsweise hohe Temperaturen. Bei Temperaturen von bis zu 55 °C kann

Wachstum beobachtet werden und er überlebt selbst Temperaturen von bis zu 70 °C. Seine bevorzugte Wachstumstemperatur liegt aber bei 37 °C (LATGÉ, 1999).

### 1.3 Bedeutung in der Humanmedizin

Jeder Mensch atmet täglich mehrere hundert Sporen ein. Deshalb nehmen Infektionen meist in der Lunge ihren Ursprung (LATGÉ, 1999). Bei Gesunden werden die eingeatmeten Sporen direkt durch das angeborene Immunsystem eliminiert. Ist das Immunsystem allerdings geschwächt, kann es zu einer Infektion kommen. Man unterscheidet bei den durch *A. fumigatus* ausgelösten Krankheitsbildern in der Humanmedizin prinzipiell zwischen der rein allergischen Form, bei der der Wirt nicht infiziert ist, und der Infektion. Zur rein allergischen Form kommt es durch wiederholte Exposition mit *Aspergillus*-Konidien und -Antigenen und meist führt schon eine Beseitigung der Umweltquelle zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik. Bei der Infektion unterscheidet man invasive und nicht-invasive Formen. Zu den nicht-invasiven Formen zählen die allergisch-bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und das Aspergillom.



**Abbildung 2: Durch *A. fumigatus* verursachte Krankheitsbilder**

Modifiziert nach Beck (BECK, 2014)

Die ABPA stellt eine Hypersensitivitätsreaktion auf *Aspergillus*-Antigene dar, die durch eine oberflächliche Kolonisierung der Lunge mit *A. fumigatus* ausgelöst wird. Die Erkrankung tritt vor allem bei Patienten auf, die unter Asthma oder cystischer Fibrose leiden. Die Prävalenz bei vorliegendem Asthma liegt in den USA bei 1-2 % (SCHWARTZ & GREENBERGER, 1991). Bei der cystischen Fibrose bewegt sie sich laut einer weltweiten Meta-analyse zwischen 3-25 % (MATURU & AGARWAL, 2015). Klinisch zeigt sich die ABPA durch bronchiales Asthma, Thoraxschmerzen, Myalgien und Hämoptysen

(PRZYBILLA & BACHERT, 2000). Für die Diagnose nutzt man die Rosenberg-Patterson-Kriterien, die unter anderem folgendes beinhalten: Vorhandensein von bronchialem Asthma, positive Hautreaktion auf Injektion von *Aspergillus*-Antigenen, erhöhtes Gesamt-IgE, Eosinophilie, IgE- und IgG-Antikörper gegen *Aspergillus*-Antigene, sowie zentrale Bronchiektasien (CHOTIRMALL et al., 2013).

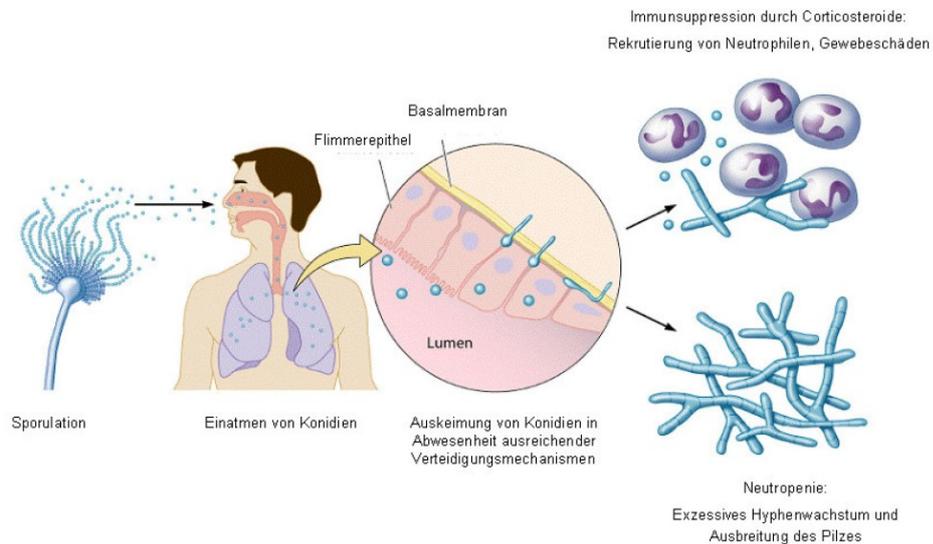
Beim Aspergillom hingegen handelt es sich um einen „Pilzball“, der sich in bereits existierenden Kavernen der Lunge bildet. Die pulmonale Höhlenbildung entsteht zum Beispiel durch eine Tuberkulose, Sarkoidose oder durch andere bullöse Lungenerkrankungen. Bei 10-15 % der Patienten mit höhlenbildenden Lungenerkrankungen kommt es zur Ausbildung eines Aspergilloms (LATGÉ, 1999). Die Veränderungen der Lunge sind in der Computertomographie (CT) oder auf einer Röntgen-Thorax-Aufnahme meist gut sichtbar. Die meisten Patienten sind asymptomatisch. Es kann aber zu lebensbedrohlichen Hämoptysen, durch Invasion von Hyphen in bronchiale Arterien, kommen. Therapeutisch setzt man heutzutage neben der operativen Resektion und Behandlung mit Antimykotika auch auf die CT-gesteuerte Instillation von beispielsweise Amphotericin B direkt in die betroffenen pulmonalen Kavernen. Das führt in manchen Fällen zu einer kompletten Rückbildung des Pilzballs (THOMPSON & PATTERSON, 2008; CHOTIRMALL et al., 2013).

Bei der invasiven Aspergillose (IA) unterscheidet man vier Formen (LATGÉ, 1999):

- Akute oder chronische invasive pulmonale Aspergillose (IPA)
- Tracheobronchitis und chronisch obstruktive Lungenerkrankung
- Akute invasive Rhinitis
- Disseminierte IA mit Gehirn- oder anderer Organbeteiligung

Abhängig von der Art der Immunsuppression kann es zu unterschiedlichen Verläufen einer invasiven Aspergillose kommen. Ist durch vorliegende Neutropenie die Anzahl der Neutrophilen verringert, kommt es nur zu einer geringen Entzündungsreaktion und die Pilze können sich nach Angioinvasion über den Blutkreislauf in andere Organe ausbreiten. Bei Patienten, die aufgrund von Kortikosteroidtherapie immunsupprimiert sind, wird dagegen das

Pilzwachstum durch die Rekrutierung von Neutrophilen begrenzt. Es kommt dabei allerdings zu einer starken Entzündungsreaktion, die mit massiven Gewebeschäden einhergeht und so auf diesem Wege zum Tod führen kann (DAGENAIS & KELLER, 2009).



### Abbildung 3: Entwicklung einer invasiven Aspergillose abhängig von der Art der Immunsuppression

Nach Beck (BECK, 2014)

Die IPA ist die häufigste Form der Aspergillose und trat früher meist 10-14 Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation und bei Vorliegen einer Granulozytopenie auf (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Neuerdings sind allerdings nur ein Drittel der neutropenischen Patienten betroffen, da diese Patientengruppe durch den Einbau von HEPA-Filtern in raumluftechnische Anlagen inzwischen besonders gut geschützt ist (OREN et al., 2001). Klinisch zeigt sich die IPA durch pleuritischen Brustschmerz, Dyspnoe, Hämoptysis, trockenen Husten und Fieber. Die tracheobronchiale Aspergillose ist typischerweise eine Komplikation bei AIDS-Patienten oder Patienten nach Lungentransplantationen. Die Symptome sind mit Husten, Brustschmerz, Fieber und Hämoptysis unspezifisch. Bei der disseminierten Form kommt es über das Blut- oder Lymphsystem zur Ausbreitung des Pilzes in andere Organe, oft auch in das Gehirn. Auch mit angemessener antifungaler Therapie liegen die Mortalitätsraten dann bei über 90 % (THOMPSON & PATTERSON, 2008).

*Aspergillus* zählt außerdem zu den Mykotoxinproduzenten. Mykotoxine sind

sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen, die Tieren aber auch dem Menschen Schaden zufügen können, wenn sie mit der Nahrung aufgenommen werden (NELSON et al., 1994). *A. fumigatus* produziert unter anderem das immunsuppressive Gliotoxin, welches die Immunantwort stört und das Eindringen in das Gewebe erleichtert (FOX et al., 2004). Mykotoxine sind aber nicht Gegenstand dieser Arbeit und werden deshalb nicht ausführlicher behandelt.

#### 1.4 Bedeutung in der Tiermedizin

*Aspergillus*-Spezies können in allen Haussäugetieren und Vögeln sowie in vielen wilden Tieren gefunden werden. Sie verursachen neben Allergien sowohl lokalisierte als auch systemische Aspergillosen. Bei Tieren handelt es sich meist um eine lokale Infektion des Atmungstraktes, die sich zu einer generalisierten Erkrankung weiterentwickeln kann. Aspergillose wird bei Tieren hauptsächlich durch *A. fumigatus* und einige wenige andere Spezies verursacht (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Auch im Tierreich gilt eine eingeschränkte Immunantwort als ein bedeutender Risikofaktor für die Erkrankung an Aspergillose (YAMAUCHI et al., 2011). Gesunde Tiere können aber durch widrige Umweltbedingungen auch betroffen sein. Zum Beispiel können sich bei Reptilien Defizite in der Haltung wie falsche Temperatur und schlechte Ernährung als Stressoren auf das Immunsystem auswirken (MILLER et al., 2004). Bei Vögeln zählen eine zu hohe Ammoniakkonzentration, Mykotoxinexposition sowie falsche Fütterung zu den umweltbedingten Belastungen (HOERR, 2010). Neben Rasse- und Geschlechtsprädispositionen, wie zum Beispiel beim Hund (MORTELLARO et al., 1989), kann auch Tuberkulose als zugrundeliegende Krankheit eine wichtige Rolle spielen (ZMEILI & SOUBANI, 2007). Zu den häufigsten Formen der tierischen Aspergillose zählen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015):

- Lungeninfektionen beim Geflügel und anderen Vögeln
- Mykotischer Abort und mykotische Mastitis bei Rindern
- Luftsackmykose beim Pferd
- Sinonasale Infektionen bei Hund und Katze
- Durch Pneumonie ausgelöste disseminierte Infektionen in Meeressäugtieren

Bei den Vögeln zählt *Aspergillus* zu den häufigsten respiratorischen Pathogenen. Diese Eigenschaft erklärt sich durch bestimmte Charakteristika von Seiten des Wirtes aber auch des Pilzes. Die Anatomie des Atmungstraktes der Vögel, bestehend aus einem Lungen-Luftsacksystem, das wie ein Blasebalg funktioniert, begünstigt durch den erzeugten Luftstrom die Verteilung der Sporen. Auch haben Vögel wenig residente Makrophagen und fast keine mukoziliäre Clearance, was ihre Immunantwort gegenüber Pilzsporen stark schwächt (BROWN et al., 1997). Die Konidien sind wiederum sehr klein, wodurch sie physikalische Barrieren besser überwinden können und was ihnen ein tiefes Eindringen in den Atmungstrakt ermöglicht (KWON-CHUNG & SUGUI, 2013). Prinzipiell sind alle Vögel empfänglich für eine Aspergillose, ob wildlebend oder in Gefangenschaft (ARNE et al., 2011). In der Landwirtschaft, beispielsweise in der Truthahnproduktion, kann Aspergillose zu enormen ökonomischen Verlusten mit einer Sterblichkeit zwischen 4,5 und 90 % führen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Man unterscheidet drei Krankheitsformen bei Vögeln: die akute Aspergillose, die chronische Aspergillose und die Mykotoxikose. Von der akuten Aspergillose als Folge der Inhalation sehr großer Mengen an Sporen sind vor allem junge Vögel betroffen und sie geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Klinische Veränderungen sind hierbei u.a. Anorexie, Lethargie, respiratorische Symptome, Polydipsie/Polyurie und plötzliche Todesfälle. Außerdem gibt es die chronische Aspergillose ausgelöst durch Immunsuppression. Diese tritt eher sporadisch bei älteren Vögeln auf und die vorherrschenden Krankheitsanzeichen sind Aktivitäts- und Gewichtsverlust, Dyspnoe nach Anstrengung und manchmal auch Ataxie oder Opisthotonus, falls das Nervensystem betroffen ist (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Die dritte Krankheitsform ist die Mykotoxikose. *Aspergillus* produziert verschiedene Mykotoxine wie zum Beispiel das Gliotoxin, das das Immunsystem schwächt, oder auch Aflatoxin, das als Auslöser der „Turkey-X-disease“ gilt (BRADBURN et al., 1994; RICHARD et al., 1996). Im Jahre 1960 hat letzteres zu einer tiermedizinischen Krise in Großbritannien geführt, der tausende Truthähne nach Infektion durch kontaminiertes Futter zum Opfer fielen (COLE, 1986).

Bei den Wiederkäuern spielen der mykotische Abort und Euterentzündungen, ausgelöst durch *A. fumigatus*, die größte Rolle (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). *A. fumigatus* gilt als häufiger Kontaminant in Heu und Silage, wodurch es auch

zur Aufnahme von Sporen durch Wiederkäuer kommen kann (COLE et al., 1977). Prinzipiell gelten gesunde Kühe als resistent gegenüber opportunistischen Infektionen. In der frühen Laktation sind sie für diese aber empfänglicher (PUNTENNEY et al., 2003). Die Inzidenz der durch *A. fumigatus* ausgelösten mykotischen Mastitis bei Kühen steigt insgesamt an, aber ein noch größeres Problem stellt sie in der kleinen Wiederkäuerpopulation dar. So wird z.B. bei Milchschaafen von Fällen von *Aspergillus*-Mastitis aufgrund von Antibiotikabehandlung ante partum berichtet (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Zum Abort kommt es meist durch eine Infektion mit *A. fumigatus* im dritten Trimester der Trächtigkeit (KNUDTSON & KIRKBRIDE, 1992). Ihm gehen keine klinischen Veränderungen voran, allerdings wird häufig im Nachhinein eine Plazentaretention beobachtet. Die Prognose für die nächste Trächtigkeit ist allerdings gut.

In Pferden verursacht *Aspergillus* in erster Linie Luftsackentzündungen und Pneumonien. Es handelt sich dabei um lebensbedrohliche Infektionen mit einer Prävalenz zwischen 0,5 und 17 % in Europa (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Dabei gelten Enteritis, Antibiotikagabe über einen langen Zeitraum, Immunsuppression sowie Endokrinopathien und/oder Neoplasien als prädisponierend (HATTEL et al., 1991; CARRASCO et al., 1996). Lungenaspergillose zeigt sich klinisch durch eine relativ milde Symptomatik bestehend aus Tachypnoe, Lungengeräuschen und Fieber (JOHNSON et al., 1999). Die Luftsackmykose verläuft dagegen komplett asymptomatisch solange keine Gefäße oder Nerven betroffen sind. Sollte aber die Arteria carotis interna und/oder externa oder die Arteria maxillaris betroffen sein, kommt es zu plötzlicher Epistaxis, an der 34-60 % der Tiere innerhalb von wenigen Tagen versterben (LANE, 1989). Dringt der Pilz in Nervengewebe ein, leiden die Pferde zudem oft unter Dysphagie einhergehend mit Nasenausfluss, Kehlkopfpeifen, Fazialisparese oder auch Horner-Syndrom. Für die genaue Diagnostik führt man eine Endoskopie durch, bei der man deutlich abgesetzte, gelblich-bräunliche, nekrotische Beläge erkennen kann, die sich typischerweise am dorsalen Teil der medialen Luftsackabteilung befinden. Neben den Luftsackmykosen spielen beim Pferd auch die durch *Aspergillus* spp. ausgelösten Keratomykosen (Hornhautentzündung durch Pilzinfektion) eine relativ große Rolle (BLOMME et al., 1998).

Bei Hund und Katze ist die sinonasale Mykose die häufigste *Aspergillus*-Infektion. Beim Hund ist sie sogar die zweithäufigste Ursache für Nasenausfluss überhaupt (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Besonders meso- oder doliocephale Hunderassen wie der Deutsche Schäferhund oder Rottweiler sind davon betroffen (SHARMAN & MANSFIELD, 2012). Die Tiere leiden unter Schmerzen am Nasenrücken, Ulzeration am Nasenspiegel und Nasenausfluss (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Bei Katzen gibt es noch die Sonderform der sinoorbitalen Aspergillose, die sich aus der sinonasalen Infektion weiterentwickelt. Diese Form nimmt immer mehr zu, wahrscheinlich aufgrund von virusinduzierter Immunschwäche, und wird am häufigsten durch *A. felis* verursacht. Die Prognose für Katzen mit sinoorbitaler Infektion ist schlecht (BARRS & TALBOT, 2014).

In Meeressäugern gilt die Aspergillose als selten. Es wird aber dennoch immer häufiger davon berichtet (DAGLEISH et al., 2008). Es kann sich sowohl um eine Primärinfektion als auch eine Sekundärinfektion als Folge von chronischen Erkrankungen handeln. Prinzipiell ist sie indikativ für eine Immunschwäche. Bei Walen wurde bereits von Fällen von Lungenaspergillose berichtet, die am häufigsten durch *A. fumigatus* verursacht wurde (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Neben der Lunge können aber auch andere Organe wie das Gehirn oder die Muskulatur befallen werden (DAGLEISH et al., 2008; ABDO et al., 2012).

## 2. *Fusarium* Spezies

### 2.1 Taxonomie und Bedeutung

Die Gattung *Fusarium* zählt wie auch die Gattung *Aspergillus* zur Abteilung der Ascomyceten und wurde erstmals 1809 von Link unter dem Namen *Fusisporium* beschrieben (LINK, 1809). Der Name leitet sich vom lateinischen Wort *fusum*, auf Deutsch Spindel, ab und beschreibt die spindelartige Form der Sporen. Die teleomorphen Formen (sexuell reproduktive Formen) werden größtenteils der Gattung *Gibberella* zugeordnet. Alle heute relevanten taxonomischen Systeme basieren auf der Arbeit von Wollenweber und Reinking (WOLLENWEBER & REINKING, 1935). Diese teilen in ihrem Werk „Die Fusarien“ von 1935 65 Spezies in 16 Sektionen ein, die wiederum 55 Varietäten und 22 Formen enthielten (NELSON et al., 1994). Die Einteilung in Sektionen wird für Gattungen mit einer großen Anzahl von Spezies genutzt, um diese anhand ähnlicher

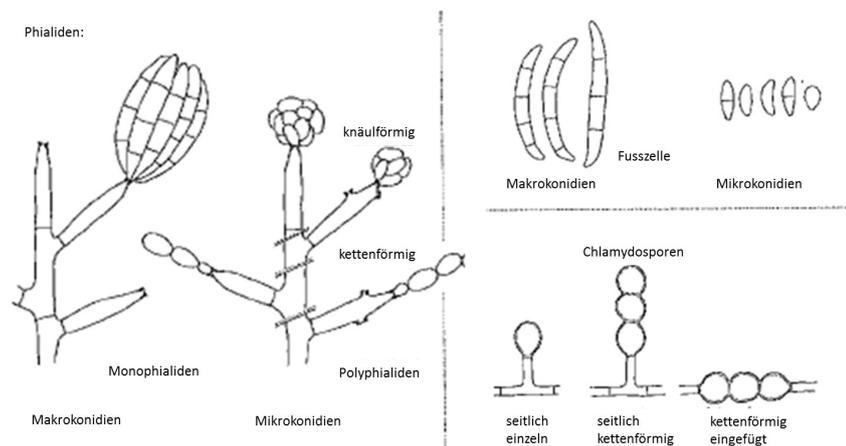
morphologischer Charakteristika gruppieren zu können. Die Klassifizierung erfolgt auch heute noch größtenteils anhand der Morphologie, wobei dies oft als wenig zuverlässig kritisiert wird. Das taxonomische System von Gerlach und Nirenberg (1982) hat die Anzahl von Sektionen beibehalten, wohingegen *Nelson et al.* (1983) ein einfacheres Klassifizierungssystem mit nur 12 Sektionen vorgeschlagen haben (MORETTI, 2009).

Die Gattung *Fusarium* beinhaltet einige der für die Landwirtschaft und den Gartenbau ökonomisch wichtigsten Pflanzenpathogene. Durch sie verursachte Krankheiten (z. B. Kopf- und Knollenfäule des Weizen, *Fusarium*-Welke der Bananen) verursachen weltweit enorme wirtschaftliche Verluste in der Landwirtschaft und haben dadurch eine große ökonomische Bedeutung (SUMMERELL et al., 2010). Einige Arten haben außerdem die Fähigkeit Mykotoxine zu produzieren und stellen somit eine Gefahr für Mensch und Tier dar (NUCCI & ANAISSIE, 2007). Des Weiteren treten immer häufiger pathogene *Fusarium*-Spezies auf, die opportunistische Infektionen beim Menschen verursachen (MUHAMMED et al., 2011).

## 2.2 Lebenszyklus und Habitat

Pilze der Gattung *Fusarium* sind im Boden weit verbreitet und man findet sie auf Pflanzenteilen oder anderen organischen Substraten. Sie kommen in tropischen und gemäßigten Klimazonen vor, können aber auch in der Wüste oder alpinen bzw. arktischen Gegenden überleben. Des Weiteren treten sie gehäuft in fruchtbaren Böden und im Weideland auf, allerdings nur selten im Waldboden. Durch ihre häufige Assoziation mit Wurzeln von Pflanzen bezeichnet man ihre Lebensweise auch als saprophytär bzw. parasitär. Fusarien können sich mittels ihrer Sporen in der Atmosphäre verbreiten (NELSON et al., 1994) und Wind und Regen spielen für die Verbreitung über weite Entfernungen eine wichtige Rolle (OOKA & KOMMEDAHL, 1977). Es gibt drei verschiedene Konidienformen bei Fusarien, wobei nicht alle Spezies alle drei Formen bilden können: Makrokonidien, Mikrokonidien und Chlamydosporen. Die Makrokonidien sind septiert und können aus Mono- oder Polyphialiden im Luftmyzel entstehen, aber auch aus Sporodochia (MORETTI, 2009). Die Mikrokonidien können in ihrer Größe stark variieren. Sie sind meist ellipsoid und haben kein oder nur ein Septum. Die Chlamydosporen stellen wiederum die Überdauerungsform dar (OHARA et al., 2004). Sie haben eine dickere Zellwand und einen hohen

Fettgehalt und können sich in der Mitte oder am Ende einer Hyphe bilden (MORETTI, 2009). Wenn die Sporen auf geeignetes Substrat treffen, kann man bereits nach 2 h ein Anschwellen beobachten. Nach 8 h entstehen Keimschläuche und nach 24 h ist ein dichtes Myzel vorhanden (SEONG et al., 2008). Ein wesentlicher Unterschied zu *Aspergillus* ist die Fähigkeit, auch in infiziertem Gewebe Sporen zu bilden. Dies wurde 1955 von Wolf zum ersten Mal beobachtet. Dieser nahm damals fälschlicherweise an, dass *Fusarium* in zwei morphologischen Formen vorkommt. Eine myzelartige Form, die sich sowohl in festem als auch flüssigem Kulturmedium bildet, und eine hefeartige Form, die sich nur in Flüssigmedium zeigt (LOCKWOOD & CRESCENCIO, 2016). Es handelte sich bei letzterer aber um Konidien. *Fusarium* spp. besitzt hyaline, septierte Hyphen mit einem Durchmesser von 3-8  $\mu\text{m}$ , die sich in spitzem bis rechtem Winkel verzweigen (DIGNANI & ANAISSIE, 2004).



**Abbildung 4: Diagramm der Konidienformen von *Fusarium* spp.**

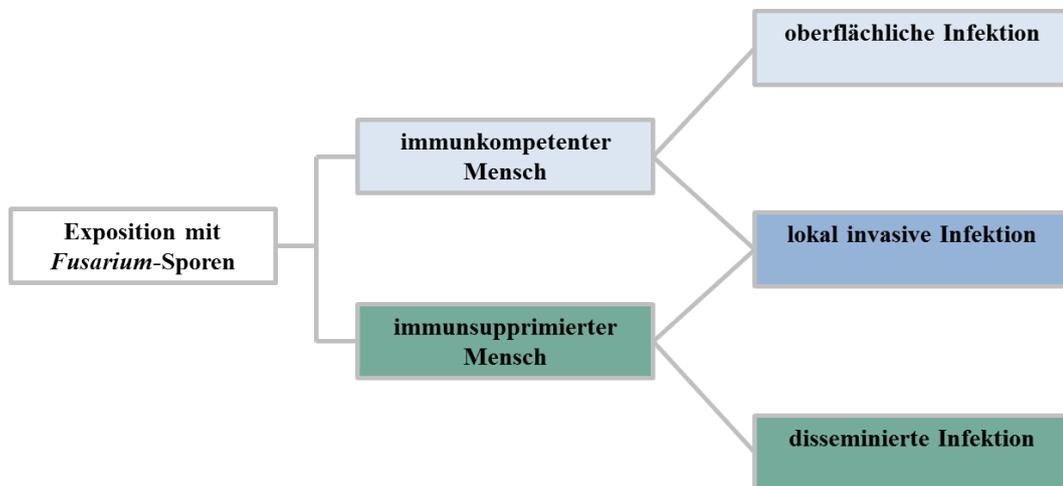
Modifiziert nach de Hoog (DE HOOG et al., 2000)

### 2.3 Bedeutung in der Humanmedizin

*Fusarium*-Infektionen des Menschen können in drei große Gruppen eingeteilt werden (NELSON et al., 1994):

- Fremdkörper-assoziierte *Fusarium*-Infektionen
- Isolierte Organinfektionen
- Disseminierte Multiorganinfektionen

Der Immunstatus des Patienten spielt dabei eine große Rolle. Bei immunkompetenten Patienten kommt es nur zu oberflächlichen oder lokal invasiven Infektionen, bei Immunsupprimierten können lokal invasive aber auch disseminierte Infektionen auftreten. Bei vorliegender Immunsuppression geht die disseminierte Infektion mit einer hohen Mortalitätsrate einher. Beispielsweise liegt bei Empfängern von Stammzellspenden die Überlebensrate 90 Tage nach der Diagnose einer Fusariosis bei nur 13 % (MUHAMMED et al., 2011). Die Infektion erfolgt entweder durch Inhalation der Sporen oder durch Traumata oder Verbrennungen der Haut. Auch über eine gastrointestinale Infektion durch den Verzehr von infiziertem Getreide wird immer wieder spekuliert, doch bisher konnte sie nicht nachgewiesen werden (NELSON et al., 1994).



**Abbildung 5: Durch *Fusarium* spp. verursachte Krankheitsbilder im Menschen**

Zu den Fremdkörper-assoziierten Infektionen zählen die mykotische Keratitis durch mangelnde Kontaktlinsenpflege, die Peritonitis durch Peritonealdialyse oder die Katheter-assoziierte Mykose. Alle drei zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht invasiv sind, dass bei den Patienten keine Neutropenie vorliegt und dass sehr gute Heilungschancen nach Entfernung des infizierten Fremdkörpers und lokaler Therapie bestehen.

Die isolierten Organinfektionen durch *Fusarium* spp. können vielfältige Erscheinungsbilder haben. Sie reichen von Onychomykosen, über *Fusarium*-Keratitis bis hin zu Hautinfektionen. Onychomykosen verlaufen meist asymptomatisch, sollten aber als Ausgangspunkt disseminierter Infektionen in

Betracht gezogen werden (DIGNANI & ANAISSIE, 2004). Zu einer *Fusarium*-Keratitis kann es durch korneale Traumata z.B. durch das Eindringen von Pflanzenteilen oder Erde kommen. Prädispositionen wie eine allergische Konjunktivitis, Gebrauch von hydrophilen Kontaktlinsen oder topische Anwendung von Kortikosteroiden oder Antibiotika begünstigen eine Infektion. Zudem sind primäre und sekundäre Hautinfektionen möglich, indem *Fusarium*-Spezies direkt in Hautstrukturen eindringen oder aber es zur Entstehung eines sekundären Infektionsherdes durch eine Verbreitung mit dem Blutkreislauf kommt. Auch hier spielen neben einer initialen Kolonisierung prädisponierende Faktoren, wie hohe Feuchtigkeit, Traumata, Immunsuppression und Verbrennungen, eine wichtige Rolle. Seltener Organmanifestationen sind Otitis, Knochen- oder Gelenksinfektionen, intranasale Infektionen, Pneumonie und Gehirnabszess (NELSON et al., 1994).

Disseminierte Multiorganinfektionen treten hauptsächlich nach intensiver Chemotherapie oder nach Knochenmarkstransplantationen auf (NELSON et al., 1994). Sie zeigen sich oft durch persistierendes Fieber, welches durch Antibiotika oder Antimykotika nicht beseitigt werden kann. Man geht davon aus, dass die Patienten in den meisten Fällen bereits vor der Einweisung in das Krankenhaus vom Pilz kolonisiert waren und es dann durch die darauffolgende Immunsuppression und Neutropenie zur disseminierten Infektion kommt. Aber auch nosokomiale Übertragungen oder Topfpflanzen als potentielle Infektionsquelle werden diskutiert. Prinzipiell kann jedes Organ von der Infektion betroffen sein. Am häufigsten handelt es sich aber um Hautinfektionen (70-90 %), gefolgt von Infektionen der Lunge und/oder der Nebenhöhlen (70-80 %). Wenn die Lunge involviert ist, leiden die Patienten unter pleuritischen Brustschmerzen, Fieber, Husten und Hämoptysis, also einer ähnlichen Symptomatik wie auch bei der pulmonalen Aspergillose (DIGNANI & ANAISSIE, 2004). Deshalb fällt die Unterscheidung zwischen Aspergillose und Fusariose oft schwer. Der Verdacht auf Fusariose kann sich durch Hautläsionen sowie durch die Isolation des Pilzes aus Blutkulturen erhärten. Für eine Heilung ist es wichtig, die Neutropenie sowie die dieser zugrundeliegende Krankheit unter Kontrolle zu bekommen (NELSON et al., 1994).

Auch *Fusarium* zählt zu den Mykotoxinproduzenten und bei Aufnahme von Fusarientoxinen durch kontaminierte Lebensmittel kann es zum Beispiel zur

alimentären toxischen Aleukie (ATA) beim Menschen kommen (NELSON et al., 1994). Die ATA führt zur Verminderung der Leukozytenanzahl im Blutplasma, Schädigung des Knochenmarkes, Nekrosen der Haut und trat u.a. zum Ende des zweiten Weltkrieges in Russland wegen des Verzehrs von überwintertem Getreide auf (NELSON et al., 1994).

#### 2.4 Bedeutung in der Tiermedizin

In der Tiermedizin sind Infektionen durch *Fusarium* eher die Seltenheit und es gibt nur wenige Fallberichte. Man geht davon aus, dass es, wie beim Menschen auch, nur bei vorliegender Immundefizienz (SUGAHARA et al., 2014) oder nach Trauma (VASCELLARI et al., 2011) zu schweren Infektionen kommen kann.

Beim Hund wurde von Meningoencephalitis (EVANS et al., 2004), Pyelonephritis (DAY & HOLT, 1994), Dermatomykose (KANO et al., 2011), disseminierter Infektion mit Haut- und Nierenlokalisation (KANO et al., 2002) und Onychomykose (NAMITOME et al., 2011) berichtet. Im Falle der Onychomykose und der Pyelonephritis war keine vorliegende Immunschwäche bekannt. Das deckt sich auch mit den Erfahrungen bei Onychomykosen des Menschen, bei denen auch Gesunde von lokalen Infektionen betroffen sein können. In den anderen Fällen gab es eine vorherige immunsuppressive Therapie (KANO et al., 2002; KANO et al., 2011) oder es handelte sich bei dem Patienten um einen deutschen Schäferhund (EVANS et al., 2004). Für diese Rasse ist bekannt, dass eine gewisse Prädisposition für die Entwicklung von disseminierten Mykosen (z.B. der Aspergillose) besteht, da sie unter einem angeborenen IgA-Antikörper-Defizit leiden, der sie empfindlicher gegenüber opportunistischen Infektionen macht (EVANS et al., 2004).

Auch bei der Katze sind Fälle invasiver Fusariose beschrieben worden. Sugahara *et al.* berichten von einer Katze, die unter einer durch *F. proliferatum* ausgelösten granulomatösen Pododermatitis der Zehen litt (SUGAHARA et al., 2014) und Vascellari *et al.* von einer Katze mit pyogranulomatöser Rhinosinusitis (VASCELLARI et al., 2011). Bei beiden Fällen ist weder eine vorangegangene Verabreichung von Glukokortikoiden bekannt, noch konnte eine durch felines Leukämievirus (FeLV) oder felines Immundefizienz-Virus (FIV) ausgelöste Immunschwäche nachgewiesen werden. Bei der Katze mit Rhinosinusitis könnte sich aber eventuell eine vorausgegangene Infektion mit felinem

Rhinotracheitisvirus oder felinem Calicivirus prädisponierend ausgewirkt haben, da dadurch die lokale Immunität der Mukosa geschwächt wird (VASCELLARI et al., 2011).

Bei Pferden werden vor allem zwei durch *Fusarium* ausgelöste Krankheiten beschrieben: die Keratomykose und die Equine Leukoenzephalomalzie. Die Keratomykose wird in den meisten Fällen entweder durch *Aspergillus* spp. oder *Fusarium* spp. verursacht (ANDREW et al., 1998) und sie entsteht durch Inokulation von Pilzmaterial nach Traumata (BRADFORD et al., 2012). Die Equine Leukoenzephalomalzie wird im Zusammenhang mit dem Verzehr von mit *Fusarium*, insbesondere *F. verticilloides* und *F. proliferatum*, kontaminiertem Mais ausgelöst (NELSON et al., 1994). Diese beiden *Fusarium* Spezies produzieren die Mykotoxine Fumonisin B1 and B2. Die Krankheitserscheinungen treten plötzlich auf und sind charakteristisch für Großhirn- oder Stammhirnläsionen, was sich auch mit den histologischen Befunden deckt (RIET-CORREA et al., 2013). Die betroffenen Pferde sind u.a. apathisch, ataktisch, schläfrig, lassen ihre Zunge hängen, zeigen zielloses Kreisen und Probleme beim Rückwärtsrichten (NELSON et al., 1994) und sterben meist innerhalb von 6- 24 h (RIET-CORREA et al., 2013).

Auch Wiederkäuer sind empfänglich für *Fusarium*-Toxine. Der Verzehr von mit *F. solani* infizierten Süßkartoffelknollen in Brasilien und Uruguay führte beispielsweise zum akuten *Respiratory-Distress-Syndrome*. Es handelt sich dabei aber nicht um eine klassische Mykotoxikose, da das Toxin nicht durch den Pilz direkt sondern durch die infizierten Knollen produziert wird (RIET-CORREA et al., 2013). Die Klinik zeigt sich durch Dyspnoe, Husten, vermehrte Speichelproduktion und dilatierte Nasenlöcher. Oft sterben die Tiere nach ca. 3-5 Tagen. Des Weiteren berichteten Elligott *et al.* von einem seltenen Fall einer durch *Fusarium* ausgelösten Keratomykose in einer Holstein Kuh (ELLIGOTT et al., 2006).

Beim Schwein sind keine Fallberichte zu *Fusarium*-Infektionen bekannt. Allerdings sind Schweine sehr empfindlich gegenüber dem Toxin Zearalenon, das durch *F. graminearum* gebildet wird und nach Verzehr von kontaminiertem Getreide Hyperöstrogenismus verursacht. Dieses Toxin wirkt vor allem auf Genitalien und Reproduktionsorgane. Junge Sauen zeigen nach Exposition ein Anschwellen der Vulva sowie der Milchdrüsen, was in ernsten Fällen bis hin zum

vaginalem oder rektalen Prolaps führen kann. Zuchtsauen haben oft einen verlängerten Östrus, männliche Jungtiere leiden unter Feminisierung und ausgewachsene Eber haben eine verminderte Libido. Auch sind Unfruchtbarkeit, verringerte Wurfgröße und schwache Ferkel weitere Anzeichen des Hyperöstrogenismus (NELSON et al., 1994).

Schon bei *Aspergillus* wurde auf mögliche Pilzinfektionen von Meeressäugern hingewiesen und auch bei *Fusarium* gibt es Berichte über beispielsweise mykotische Dermatitis bei Walen (FRASCA et al., 1996) sowie auch einen Bericht über einen Tümmler mit einer durch *F. oxysporum* ausgelösten ZNS-Erkrankung. Dieser Delphin verstarb sehr plötzlich und in der pathologischen Untersuchung fand man Hämorrhagien im rechten Großhirn, Kleinhirn und im rechten Auge. Histopathologisch handelte es sich um eine akute nekrotisierende Meningoenzephalitis mit intraläsionalen Pilzhyphen (STAGGS et al., 2010). Wie es zur Infektion kam, ist in diesem Fall völlig ungeklärt, während bei den Fällen von mykotischer Dermatitis die Tiere zuvor besonderen Stresssituationen wie Stränden oder Transport ausgesetzt waren (FRASCA et al., 1996).

### **3. Methoden für die Diagnostik invasiver Aspergillosen und Fusariosen in der Humanmedizin**

Eine frühe Diagnose invasiver Schimmelpilzmykosen ist ausschlaggebend für die Einleitung der richtigen Therapie und somit für die Verbesserung der Überlebenschancen. Eine Verzögerung kann zum Voranschreiten der Erkrankung führen, so dass eine antimykotische Therapie erfolglos bleibt oder der Patient noch vor Einleitung therapeutische Maßnahmen ver stirbt (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Die Diagnose invasiver Schimmelpilzmykosen im Menschen basiert laut internationaler Richtlinien auf Klinik, Kultur, Histologie und Serologie, sowie den Ergebnissen bildgebender und molekularbiologischer Methoden (DE PAUW & PICAZO, 2008). All diese Methoden besitzen jedoch Vor- und Nachteile.

Die klinischen Veränderungen sind im Falle der invasiven Aspergillose sehr unspezifisch, leidet der Patient unter Neutropenie kann persistierendes Fieber sogar der einzige Hinweis auf eine Schimmelpilzinfektion sein (SHERIF & SEGAL, 2010). Im Falle der Fusariose sind Hautläsionen ein typisches klinisches Merkmal (NUCCI & ANAISSIE, 2007). Ansonsten lässt sich die klinische

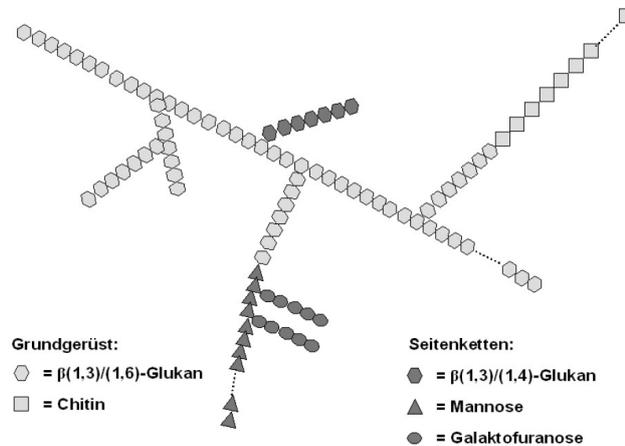
Symptomatik der invasiven Fusariose aber kaum von der der Aspergillose abgrenzen.

Die Kultur ist eine sehr wichtige Methode zur Speziesidentifizierung und auch ausschlaggebend für einen darauffolgenden Resistenztest (HOPE et al., 2005). Allerdings ist ihre diagnostische Aussagekraft stark davon abhängig, ob die Probe steril entnommen wurde. Eine positive Kultur von einer nicht-steril entnommenen Probe ist kein Beweis, da es sich um eine normale Kolonisierung bzw. um eine Kontamination handeln kann (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Allerdings steigt die Aussagekraft einer positiven Kultur mit dem Grad der Immunsuppression des Patienten. Im Falle von *Aspergillus* sind Blutkulturen fast immer negativ (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012), wohingegen bei *Fusarium* die Isolation des Erregers aus dem Blut häufiger gelingt (NELSON et al., 1994). Auch Bronchoalveolarflüssigkeit oder Biopsiematerial kann zur Anzucht des Erregers verwendet werden. Insgesamt ist die Kultur aber zeitintensiv und wenig sensitiv (HOPE et al., 2005).

Die Histologie ist eine gute Nachweismethode für Pilzbefall, doch auch sie bringt Nachteile mit sich. Schon allein die Biopsie ist für die meisten Patienten sehr riskant, da viele von ihnen aufgrund der vorliegenden Neutropenie meist auch thrombozytopenisch sind und deshalb das Risiko für Blutungen nach dem Eingriff besonders hoch ist. Zudem weisen *Aspergillus* und *Fusarium* in der Histologie eine sehr ähnliche Morphologie auf. Beide besitzen schmale, septierte Hyphen, die sich im 45 °-Winkel verzweigen. Eine genaue Differenzierung zum Beispiel anhand der typischen Periodic Acid Schiff Reaktion oder Grocottfärbung ist deshalb unmöglich (NUCCI & ANAISSIE, 2007).

Die serologische Diagnostik spielt im Falle von *Aspergillus*- Infektionen bereits eine große Rolle. Allerdings beschränkt sie sich auf den Antigennachweis, da der Nachweis pilzspezifischer Antikörper aufgrund der Immunsuppression der meisten Patienten eher ungeeignet ist (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Für den diagnostischen Antigennachweis werden die Zellwandpolysaccharide  $\beta$ -1,3-Glucan und Galaktomannan genutzt. Die Myzelzellwand von *A. fumigatus* besteht hauptsächlich aus drei Polysacchariden:  $\beta$ -1,3-Glucan, Chitin und Galaktomannan. Wobei sich das Grundgerüst aus  $\beta$ -1,3-Glucan und Chitin zusammensetzt, mit welchem Seitenketten bestehend aus Galaktomannan und linearem  $\beta$ -1,3/1,4-Glucan verbunden sind (LATGE et al., 2005). Galaktomannan

ist wiederum aus linearem  $\alpha$ -1,2/1,6-Mannan mit kurzen  $\beta$ -1,5-Galaktofuranose-Seitenketten aufgebaut (LATGE et al., 1994).



**Abbildung 6: Polysaccharidgerüst der Zellwand von *A. fumigatus***

Nach Heesemann (HEESEMAN, 2010)

Galaktomannan und  $\beta$ -1,3-D-Glucan sind nicht nur Bestandteile der Zellwand, sondern werden während des Wachstums auch von *Aspergillus* freigesetzt. Sie können schon Tage vor dem Auftreten klinischer Symptome in verschiedenen Körperflüssigkeiten des Patienten wie Blut, BAL-Flüssigkeit oder Liquor nachgewiesen werden (MARR et al., 2004). Für den Nachweis des Galaktomannans steht ein kommerziell erhältlicher Galaktomannan-Assay (*Platelia*<sup>TM</sup> *Aspergillus Galactomannan* EIA) zur Verfügung. Dabei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, bei dem der monoklonale Rattenantikörper EB-A2 an die  $\beta$ -1,5-verknüpften Galaktofuranose-Seitenketten des Galaktomannans bindet. Generell zeigt er eine hohe Sensitivität und Spezifität für die IA. Zu falsch-negativen Ergebnissen kann es jedoch durch vorherige antifungale Therapie kommen. Falsch-positive Ergebnisse können z.B. aufgrund einer  $\beta$ -Lactam-Antibiose oder durch Kreuzreaktivität mit anderen Erregern invasiver Mykosen (*Penicillium marneffe*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) auftreten (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). In den letzten Jahren wurde zudem mehrfach beobachtet, dass der Galaktomannan-Assay auch bei vorliegender invasiver Fusariose ein falsch-positives Ergebnis zeigt, obwohl er eigentlich gerade bei der Differenzierung zwischen Aspergillose und Fusariose von Vorteil sein sollte (NUCCI et al., 2014). Der zweite in der Diagnostik

eingesetzte serologische Test weist  $\beta$ -1,3-Glucan nach.  $\beta$ -1,3-Glucan ist im Gegensatz zu Galaktomannan ein Zellwandbestandteil vieler Pilze, allerdings ist bekannt, dass *Mucor*- und *Cryptococcus*-Spezies kein  $\beta$ -1,3-Glucan bilden. Somit weist ein positives Testergebnis nur eine invasive Mykose nach, ohne dass eine genauere Spezifizierung vorgenommen werden kann (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Allerdings sollte bei nachgewiesener Schimmelpilzinfektion mit positivem  $\beta$ -1,3-Glucan-Assay und negativem Galaktomanannachweis eine Fusariose definitiv in Betracht gezogen werden (MUHAMMED et al., 2011).

Die Computertomographie (CT) ist ein wichtiges Instrument zur frühzeitigen Diagnose einer pulmonalen Infektion im immunsupprimierten Patienten. Ein deutlicher Hinweis auf eine invasive Mykose sind das sogenannte Halo-Zeichen bzw. das umgekehrte Halo-Zeichen. Unter dem Halo-Zeichen versteht man die milchglasartige Trübung um einen nodulären Herd. Das umgekehrte Halo-Zeichen wird wiederum als fokale rundliche milchglasartige Struktur umgeben von einem konsolidierten sichelförmigen bis vollständigen Ring beschrieben (GEORGIADOU et al., 2011). Am häufigsten werden diese Anzeichen im CT-Scan einer pulmonalen Aspergillose oder Mucormycose zugeschrieben, aber sie können auch auf andere Infektionen oder auch z.B. neoplastische Veränderungen hinweisen. Insgesamt gilt die Computertomographie als eine sehr sensitive, aber nicht sehr spezifische Methode (VAN DIEPENINGEN et al., 2015). Interessant ist, dass bei Fusariose dieses Halo-Zeichen bisher nicht beschrieben wurde, allerdings sieht man auch hier Veränderungen wie Knoten oder Massen im CT-Scan (MAROM et al., 2008).

Molekularmethoden, wie die PCR, zur Detektion von *Aspergillus* DNA-Fragmenten sind dank ihrer hohen Sensitivität und ihrer Schnelligkeit ein vielversprechendes Werkzeug. Die PCR bietet auch die Möglichkeit zur Speziesidentifizierung, wodurch wiederum Hinweise auf Resistenzen möglich sind (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Ein großes Problem stellt aber die mangelnde Standardisierung der PCR-Protokolle dar, was zu inhomogenen Untersuchungsergebnissen der jeweiligen Labors führt und die Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen erschwert (TUON, 2007). Durch ihre hohe Sensitivität ist auch das Risiko für falsch-positive Ergebnisse sehr hoch, zumal man durch die PCR nur schwer zwischen Kolonisierung und Krankheit unterscheiden kann (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Trotzdem kann sie schon

jetzt als zusätzlicher Test eine gute Ergänzung des Spektrums diagnostischer Methoden bieten. Auch für *Fusarium* wurde eine PCR entwickelt. Sie nutzt die ITS- Sequenz zwischen 18S rDNA und 28S rDNA oder andere gut konservierte Sequenzen (MUHAMMED et al., 2011). Wenn verfügbar wird die PCR-Technik zur Bestätigung der Diagnose empfohlen (VAN DIEPENINGEN et al., 2015).

Insgesamt ist es mit den bisherigen diagnostischen Möglichkeiten oft nicht möglich zwischen einer *Fusarium*- und einer *Aspergillus*-Infektion zu unterscheiden. Da dies aber aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber den vorhandenen Antimykotika einen erheblichen Einfluss auf die Wahl der Therapie hat, herrscht ein großer Bedarf für die Entwicklung neuer *Fusarium*- und *Aspergillus*-spezifischer Nachweisverfahren.

## **4. Antifungale Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen**

### **4.1 Aktueller Stand der antifungalen Therapie**

Bei Verdacht auf Aspergillose oder Fusariose sollte mit der Behandlung sofort begonnen werden, um ein Fortschreiten der Krankheit während der teilweise langwierigen Diagnostik zu verhindern (SALES MDA, 2009). Lange war Amphotericin B das antifungale Medikament der Wahl bei invasiver Aspergillose. Es zählt zu den Polyenen und führt durch Bindung an Ergosterol zur Bildung von Ionenkanälen in der Zellmembran des Pilzes. Dadurch erhöht sich die Permeabilität und es kommt schließlich zum Zelltod (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Fast alle *Aspergillus*-Isolate sind empfindlich gegenüber Amphotericin B, nur *A. terreus*, der nach *A. fumigatus* als zweithäufigster Krankheitserreger innerhalb der Gattung *Aspergillus* gilt, ist resistent (HACHEM et al., 2004). Renale Toxizität ist aber als Nebenwirkung bei fast 30% der mit Amphotericin B behandelten Patienten beschrieben (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Deswegen wurden neue auf Lipiden basierende Amphotericin-B-Zubereitungen entwickelt, die aber in höheren Dosen verabreicht werden müssen als das ursprüngliche Präparat, um denselben Effekt zu erreichen (ZMEILI & SOUBANI, 2007). Eine neuere Produktklasse mit Wirkung gegen Aspergillose sind die Triazole z.B. Voriconazol, Itraconazol und Posaconazol. Sie blockieren die Ergosterolsynthese durch Inhibition des Cytochrom P450 Enzyms, wodurch wiederum das Wachstum gehemmt wird und es in der Folge zum Zelltod des Pilzes kommt (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Azole wirken aber auch

auf das humane P450 Enzym und können so zu hepatischen Nebenwirkungen führen. Voriconazol gilt heutzutage als empfohlenes Ersttherapeutikum für die meisten Patienten mit invasiver Aspergillose, da diese besser darauf ansprechen als auf Amphotericin B und somit die Überlebenschancen verbessert werden. Eine neue Klasse von Therapeutika stellen die Echinocandine mit Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin dar. Sie inhibieren die  $\beta$ -1,3-D-Glucan-Synthese und wirken auf *A. fumigatus* fungistatisch (THOMPSON & PATTERSON, 2008).  $\beta$ -1,3-D-Glucan ist ein wichtiger Zellwandbestandteil vieler Pilze. Gerade bei Patienten mit einer Resistenz gegenüber Standardantimykotika oder beim Auftreten von starken Nebenwirkungen, sind Echinocandine eine gute Option. Auch wird oft bei refraktöser IPA über eine Kombinationstherapie von Echinocandinen mit anderen Therapeutika nachgedacht, da Echinocandine die Zellwand attackieren und nicht wie die anderen Therapeutika die Zellmembran. Aufgrund der Kombination von Therapeutika mit unterschiedlichen Zielstrukturen ist zu erwarten, dass eine effizientere Bekämpfung des Pilzes stattfindet. Es gibt über ein solches Vorgehen allerdings noch nicht genügend prospektive Studien. *In-vitro*-Daten und einzelne Fallberichte sehen aber vielversprechend aus (ZMEILI & SOUBANI, 2007). *Fusarium* Spezies zeigen keine *in-vitro*-Sensitivität gegenüber Echinocandinen und zählen zu den Antimykotikaresistentesten Pilzen überhaupt (DIGNANI & ANAISSIE, 2004). Hochdosiertes liposomales Amphotericin B ist eines der Antimykotika, das bei der Therapie der Fusariose angewendet werden. Generell hat aber auch Voriconazol sowohl eine *in-vitro* als auch *in-vivo*-Aktivität gegen *Fusarium* und ist zusammen mit Posaconazol von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die *salvage therapy* der Fusariose zugelassen (MUHAMMED et al., 2011). Da die Behandlung der Neutropenie eine zentrale Rolle für das Überleben bei einer Fusariose spielt, kann das Immunsystem zum Beispiel auch mit G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) oder Granulozyten-Transfusionen gestärkt werden (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008; MUHAMMED et al., 2011). In einer Studie von Horn et al. lag die Überlebensrate bei Fusariose nach 90 Tagen bei 44 %, was eine deutliche Verbesserung zu vorangegangenen Studien aus dem Jahr 2003 darstellt (HORN et al., 2014). Die Autoren gehen davon aus, dass dies an der Verfügbarkeit der Triazole liegt. Auch bei der Behandlung der Fusariose wird teilweise auf eine Kombinationstherapie, zum Beispiel von Voriconazol und

Amphotericin B, gesetzt (HORN et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass die Möglichkeiten einer antifungalen Therapie durch die geringe Anzahl an Therapeutika stark eingeschränkt sind. Des Weiteren traten in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen auf. Es ist bekannt, dass der lang anhaltende Gebrauch antimikrobieller Substanzen zur Selektion resistenter Klone führen kann. Im Falle der Azole kann sowohl der extensive Gebrauch dieser Substanzklasse in der Landwirtschaft als auch die prophylaktische Behandlung von Hochrisikopatienten zur Resistenzbildung beitragen (AZEVEDO et al., 2015). Außerdem führt der prophylaktische Einsatz auch zu einer Zunahme von Infektionen durch Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze (NUCCI & MARR, 2005). Der Bedarf für neue Strategien bezüglich antifungaler Therapie steigt deshalb dramatisch an.

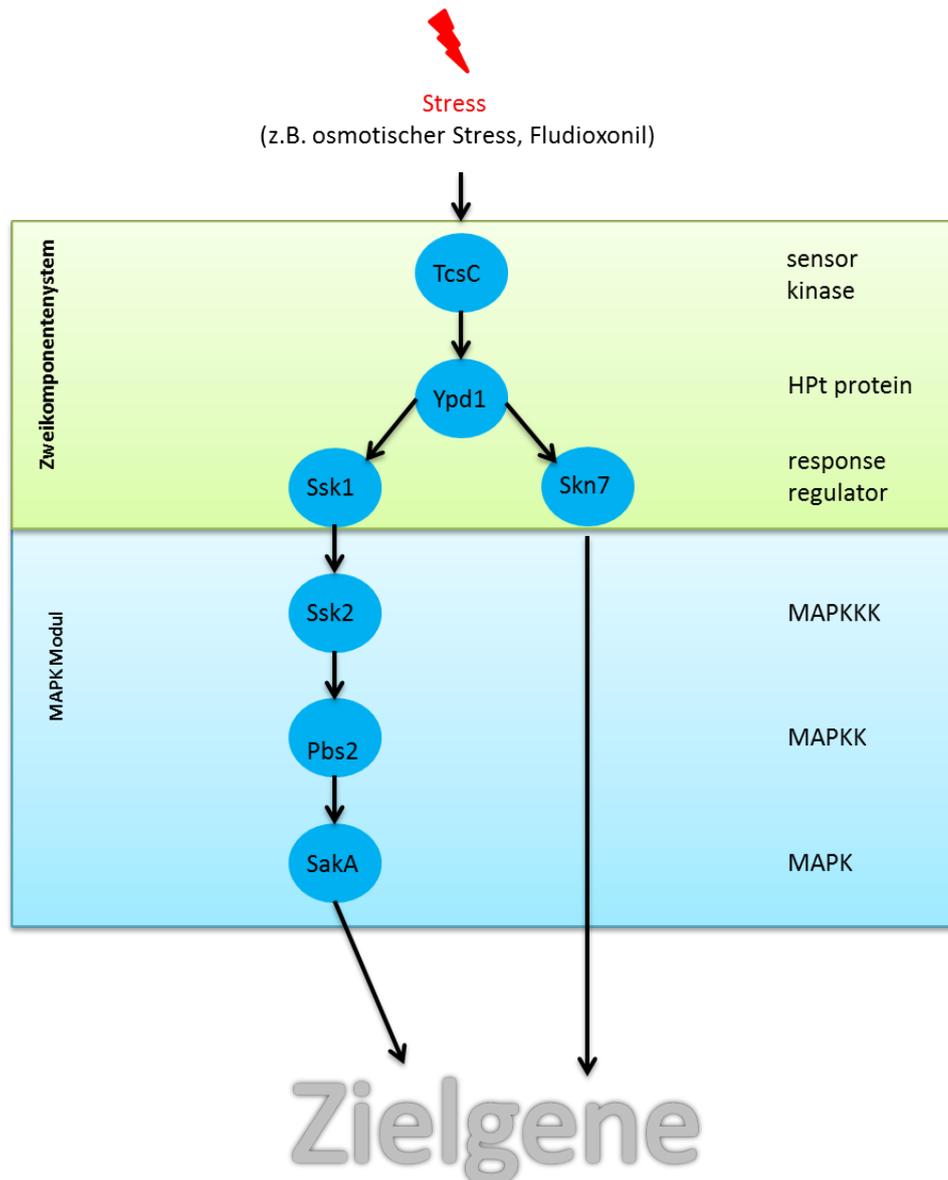
Produktklasse	Vetreter	Wirkmechanismus	Wirkung	Sensitivität <i>Aspergillus</i>	Sensitivität <i>Fusarium</i>
Polyene	liposomales Amphotericin B	Bindung an Ergosterol, Zellpermeabilität erhöht	fungizid	Alle bis auf <i>A. terreus</i> sensitiv	sensitiv
Triazole	Voriconazol Itraconazol Posaconazol	Blockade des Cytochrom P450 Enzyms	fungizid	sensitiv	sensitiv
Echinocandine	Caspofungin Micafungin Anidulafungin	Inhibition der $\beta$ - 1,3-Glucan- Synthese	fungistatisch	sensitiv	resistent

**Abbildung 7: Übersicht klinisch relevanter Antimykotika und ihre Wirkung auf *Aspergillus* und *Fusarium* spp.**

#### 4.2 Der HOG-Signalweg als mögliches Ziel für neue Therapieansätze

Um sich im Körper des Menschen verbreiten zu können, muss der Pilz sich den verschiedensten Umweltbedingungen anpassen können. Dafür muss er in der Lage sein, Signale aus seiner Umwelt zu registrieren und vor allem auch darauf zu reagieren. Es gibt dabei verschiedene Signalkaskaden, die der Stresswahrnehmung

dienen (BAHN et al., 2007). Eine davon ist der sogenannte *High Osmolarity Glycerol*- (HOG) Signalweg. Der HOG-Signalweg wurde durch seine zentrale Rolle im Wasserhaushalt von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und ist für die Aufrechterhaltung des Wassergleichgewichts unter hyper- und hypoosmotischen Bedingungen verantwortlich (BAHN, 2008). Er besteht mit dem Zweikomponentensystem und dem MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Modul aus zwei Stufen.



**Abbildung 8: Der HOG-Signalweg von *A. fumigatus***

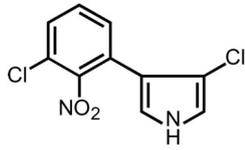
Modifiziert nach Bahn (BAHN et al., 2007), Hpt Protein= *histidine-containing phosphotransfer protein*, MAPK= Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MAPKK= Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, MAPKKK= Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase

Stresssignale werden zunächst durch die Sensor Kinase, eine Histidin Kinase (HK) namens TcsC, wahrgenommen, welche daraufhin autophosphoryliert wird und danach wiederum das Ypd1 Phosphotransfer-Protein (HPt) phosphoryliert. Dieses transferiert den Phosphatrest anschließend auf zwei *Response* Regulatoren. Ssk1 aktiviert daraufhin über das MAPK-Modul die MAPK SakA, welche in den Zellkern transloziert und dort zur Expression von Genen zur Stressbekämpfung führt (BAHN, 2008). Der zweite *response regulator* namens Skn7 kann als Transkriptionsfaktor bei Aktivierung direkt auf die Genexpression einwirken (VARGAS-PEREZ et al., 2007). Zu den möglichen Auslösern bzw. Stressoren zählen zum Beispiel hohe Temperaturen, oxidativer Stress, UV-Licht und osmotische Druckveränderungen, die auch namensgebend sind (BAHN et al., 2007). Es gibt Substanzen, die den HOG-Signalweg aktivieren können und den Pilz durch die Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts schädigen. Unter ihrem Einfluss kommt es in einem feuchten Milieu zum Einstrom von Wasser, weshalb der Pilz anschwillt und am Ende sogar platzen kann (OKADA et al., 2005). In der Landwirtschaft werden Substanzen mit diesem Wirkmechanismus bereits gegen verschiedene Pflanzenpathogene erfolgreich eingesetzt (OKADA et al., 2005). Zweikomponentensignalwege existieren nur in Prokaryonten, Pflanzen und niederen Eukaryonten, aber nicht in Säugetierzellen, weshalb bei Inhibition des Signalweges das Risiko für eine Toxizität im Menschen geringer ist. Auch spielen sie eine wichtige Rolle für die Virulenz vieler Pilze (SHOR & CHAUHAN, 2015). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Zwei-Komponenten-Signalübertragungswege eine ideale Zielstruktur für die Entwicklung neuer antifungaler Therapien darstellen.

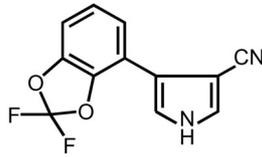
Fludioxonil und Iprodione zählen unter den HOG-aktivierenden Substanzen zu den besonders interessanten Kandidaten. Bei Fludioxonil handelt es sich um ein Phenylpyroll-Fungizid, das chemisch vom durch *Pseudomonas*-Spezies produzierten Antibiotikum Pyrrolnitrin abgeleitet wurde (OKADA et al., 2005). Iprodione zählt dagegen zu den Dicarboximiden besitzt aber ein ähnliches antifungales Spektrum und induziert dieselben morphologischen Veränderungen wie die Phenylpyrrolderivate. Beide werden in der Landwirtschaft bereits großflächig angewendet und zum Beispiel bei der Bekämpfung von *Botrytis cinerea*, dem Verursacher der Grauschimmelfäule im Weinbau, von *Monilinia* spp., dem Verursacher der Fruchtfäule bei Steinfrüchten, oder von *Sclerotinia* spp.

im Rapsanbau eingesetzt (FUJIMURA et al., 2000).

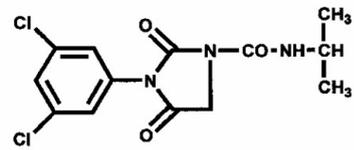
Mit ihrem breiten Wirkspektrum bei Pflanzenpathogenen und dem HOG-Signalweg als Zielstruktur sind sie auch vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer humanmedizinischer Antimykotika.



Pyrrolnitrin



Fludioxonil



Iprodione

**Abbildung 9: Strukturformeln von Pyrrolnitrin, Fludioxonil und Iprodione**

Nach Okada (OKADA et al., 2005) und Ochiai (OCHIAI et al., 2002)

### III. PUBLIKATIONEN

#### 1. Publikation 1

Wiedemann, A., *et al.*

Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species.

Int. J. Med. Microbiol. (2016)

Zusammenfassung:

*Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. sind die zwei häufigsten Erreger invasiver Schimmelpilzinfektionen. Da sie unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den verschiedenen Antimykotika aufweisen, ist eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Erregern von hohem therapeutischem Nutzen. Dies ist aber mit den momentan zur Verfügung stehenden diagnostischen Mitteln nicht möglich. Für die Diagnose invasiver Pilzinfektionen spielt der Nachweis von Kohlenhydratantigenen eine große Rolle. Galaktomannan ist ein wichtiger Zellwandbestandteil von *Aspergillus* spp. und besteht zum großen Teil aus Galaktofuranose-Einheiten. Dieses Kohlenhydratantigen wird bei *Aspergillus*-Infektionen bereits zum diagnostischen Nachweis genutzt. Wir konnten zeigen, dass auch *Fusarium* spp. dieses Antigen auf der Oberfläche tragen, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als *Aspergillus* spp.. Durch den AB135-8-Antikörper konnten wir außerdem ein zweites Galaktofuranose-haltiges *Fusarium*-Antigen identifizieren, welches in großen Mengen auf der Oberfläche der Hyphen und im Kulturüberstand von *Fusarium* spp. vorkommt, in *Aspergillus* spp. dagegen wiederum nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Mit dem AB135-8-Antikörper sowie einem *Aspergillus*-Galaktomannan-Antikörper konnten wir eine Methode zur immunhistologischen Differenzierung einer *Fusarium*- und *Aspergillus*-Infektion entwickeln. Des Weiteren stellt das Antigen eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung eines *Fusarium*-spezifischen serologischen Tests dar.



## Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species



Annegret Wiedemann<sup>a,b</sup>, Tamara Katharina Kakoschke<sup>b</sup>, Cornelia Speth<sup>c</sup>, Günter Rambach<sup>c</sup>, Christian Ensinger<sup>d</sup>, Henrik Elvang Jensen<sup>e</sup>, Frank Ebel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU, Munich, Germany

<sup>b</sup> Max-Von-Pettenkofer-Institute, LMU, Munich, Germany

<sup>c</sup> Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

<sup>d</sup> Institute of Pathology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

<sup>e</sup> Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 April 2016

Received in revised form 2 May 2016

Accepted 8 May 2016

#### Keywords:

Fusarium  
Galactomannan  
Galactofuranose  
Monoclonal antibody  
Immunohistology  
Fungal diagnostics

### ABSTRACT

Detection of carbohydrate antigens is an important means for diagnosis of invasive fungal infections. For diagnosis of systemic *Aspergillus* infections, galactomannan is commonly used, the core antigenic structure of which consists of chains of several galactofuranose moieties. In this study, we provide evidence that *Fusarium* produces at least two distinct galactofuranose antigens: Smaller amounts of galactomannan and larger quantities of a novel antigen recognized by the monoclonal antibody AB135-8. In *A. fumigatus*, only minor amounts of the AB135-8 antigen are found in supernatants and in the apical regions of hyphae. A galactofuranose-deficient *A. fumigatus* mutant lacks the AB135-8 antigen, which strongly suggests that galactofuranose is an essential constituent of this antigen. Using a combination of AB135-8 and a galactomannan-specific antibody, we were able to unambiguously differentiate *A. fumigatus* and *Fusarium* hyphae in immunohistology. Moreover, since *Fusarium* releases the AB135-8 antigen, it appears to be a promising target antigen for a serological detection of *Fusarium* infections.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Diagnostics of invasive fungal infections currently relies on culture, histology and/or detection of circulating cell wall carbohydrates (De Pauw et al., 2008). Two major antigens of filamentous fungi are of particular importance and can be detected by serological assays:  $\beta$ -D-glucan and galactomannan.  $\beta$ -D-glucan is a major cell wall component of many fungal pathogens and a positive  $\beta$ -D-glucan assay is therefore not indicative for a specific pathogen. Galactomannan is commonly used for diagnosis of invasive aspergillosis, since it is only produced by certain fungal pathogens, e.g. *Aspergillus* and *Penicillium* (Swanink et al., 1997).

*Fusarium* is an important fungal pathogen in particular in plants, but also in vertebrates. In humans, the most pathogenic species belong to the *F. solani*, *F. oxysporum* or *Gibberella fujikuroi* com-

plex, and from the latter, *F. verticilloides* and *F. proliferatum* are of particular clinical importance (Nucci and Anaissie, 2007). For an efficient therapy, it is important to accurately differentiate *Fusarium* and *Aspergillus*, since both differ in their sensitivity to commonly used anti-fungals (Alastruey-Izquierdo et al., 2008). However, an unambiguous identification is hampered by a similar hyphal morphology (Morrison, 2002) and the fact that the  $\beta$ -D-glucan assay is positive for both pathogens. The galactomannan assay (PLATELIA *Aspergillus* EIA) and its key component, the monoclonal antibody EB-A2, were originally reported to discriminate between *Aspergillus* and *Fusarium* (Swanink et al., 1997; Stynen et al., 1992; Cummings et al., 2007). In recent times, *Fusarium* infections with a positive galactomannan test have been reported (Mikulska et al., 2012; Tortorano et al., 2012; Horn et al., 2014; Kebabci et al., 2014; Nucci et al., 2014) and in one study, galactomannan was additionally found in *Fusarium* culture supernatants (Tortorano et al., 2012). This implies that the PLATELIA *Aspergillus* EIA is not always able to discriminate between *Aspergillus* and *Fusarium* infections.

\* Corresponding author at: Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU, Munich, Germany.

E-mail address: [frank.ebel@lmu.de](mailto:frank.ebel@lmu.de) (F. Ebel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002>

1438-4221/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Fungal galactomannan contains galactofuranose (GalF) as a characteristic constituent and the monoclonal antibody EB-A2 was shown to recognize chains of at least four  $\beta$ -1,5-linked GalF moieties present in *Aspergillus* cell wall polysaccharides, glycoproteins and certain glycolipids (Stylen et al., 1992; Tefsen et al., 2012). Generation of GalF-containing structures requires synthesis and subsequent transport of UDP-bound GalF into the Golgi apparatus and finally incorporation of GalF into distinct glycostructures by a panel of UDP-galactofuranosyl-transferases (Tefsen et al., 2012). In *A. fumigatus*, the first step is mediated by the UDP-GalF mutase G1fA (Schmalhorst et al., 2008), while G1fB is the UDP-GalF transporter (Engel et al., 2009). Several types of GalF linkages exist in *A. fumigatus* (Bahia et al., 1997), but from the corresponding UDP-galactofuranosyl-transferases only one has been identified so far (Komachi et al., 2013).

In this study, we were able to detect galactomannan in supernatants of several *Fusarium* species, and using the novel monoclonal antibody AB135-8 we have identified a distinct GalF-dependent antigen of unknown structure. This new antigen is strongly expressed by all *Fusarium* species tested, whereas *A. fumigatus* hyphae produce it in only minor amounts. In combination with a galactomannan-specific antibody, AB135-8 turned out to be a valuable tool for the immunohistological diagnosis of mould infections.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains

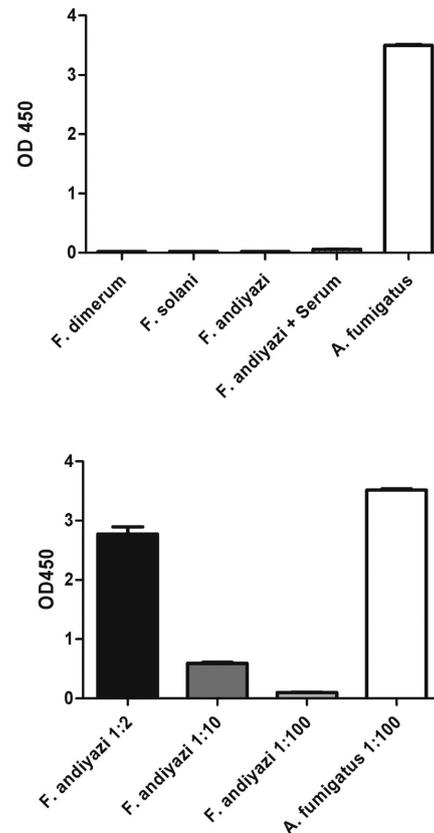
The following strains were used in this study: *F. oxysporum* (DSM 62316), *F. solani* (CBS 131394), *F. dimerum* (NRZ Sch63), *F. proliferatum* (NRZ 2311), *F. andiyazi* (CBS 134430), *F. graminearum* (strain 8/1) (Miedaner et al., 2000), *A. fumigatus* ATCC46645 and its GFP-expressing derivative (Meier et al., 2003), *A. fumigatus* D141,  $\Delta$ g1fA mutant and the corresponding complemented strain (Schmalhorst et al., 2008), *A. niger* (DSM 737), *A. nidulans* (FGSC A26), *A. terreus* (SBUG844), *Mucor circinelloides* (CBS 277.49), *Lichtheimia corymbifera* (ATCC 46771), *Rhizopus oryzae* (DSM 1185), *Scedosporium minutisporum* (strain 01-0564), *S. boydii* (strain 01-0715), *S. aurantiacum* (strain 07-0433), *S. apiospermum* (strain 08-0118.01), *Microsporum canis* (VMT 1046) and *Trichophyton interdigitale* (VMT 761).

### 2.2. Fungal cultures and isolation of conidia

For isolation of conidia, *A. fumigatus* was grown on AMM (*Aspergillus* Minimal Medium) agar in tissue culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Conidia were harvested using glass beads and sterile water. For *Fusarium*, 100 ml of Sabouraud broth were inoculated with  $1.5 \times 10^4$  conidia. After 3 d incubation at 30 °C and 140 rpm, the culture was harvested by centrifugation. *Mucorales* were grown on supplementary minimal medium (SUP) agar (10 g glucose, 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 g yeast extract and 15 g agar ad 1L). All other fungi were grown on Sabouraud agar. Conidia were harvested using buffer containing 0.9% NaCl and 0.001% Tween 20. Conidia suspensions were passed through two layers of Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany) to remove larger fungal fragments and the spore concentration was subsequently determined using a Neubauer chamber.

### 2.3. Sequence analysis

Protein sequences from *A. fumigatus* Af293 were obtained from the *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspgd.org/>). Genome searches for *Fusarium* and *Mucorales* were performed

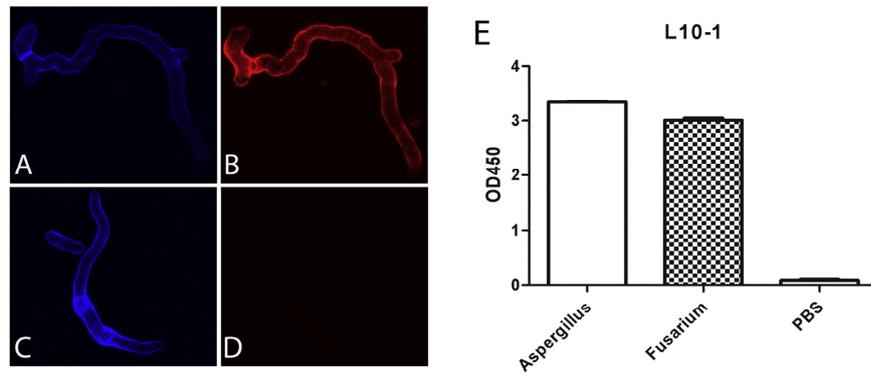


**Fig. 1.** Detection of galactomannan in culture supernatants of *Fusarium* ssp. and *A. fumigatus*. Cell-free supernatants were harvested after growth in Sabouraud medium (where indicated supplemented with 3% human serum). Samples were diluted in coating buffer (Panel A: 1:100; Panel B: as indicated). The galactomannan content was measured using the PLATELIA *Aspergillus* EIA.

using the *Fusarium* Comparative Database at the Broad Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html)) and the Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-fungal.pl>), respectively. Alignments were generated using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

### 2.4. Monoclonal antibodies

AB135-8 was identified and cloned from a pool of hybridoma cells obtained after immunization of Balb/c mice with killed *A. fumigatus* germ tubes. The immunoglobulin subclass was determined using the Pierce Rapid Antibody Isotyping Kits (ThermoScientific, Dreieich, Germany). Hybridoma cells were grown in Opti-MEM medium (Life Technologies) supplemented with 5% fetal calf serum. IgM antibodies were purified from culture supernatants using the Pierce IgM Purification Kit (ThermoScientific) according to the instructions of the vendor. The galactomannan-specific monoclonal antibody EB-A2 was initially described by Stylen et al. (1992).



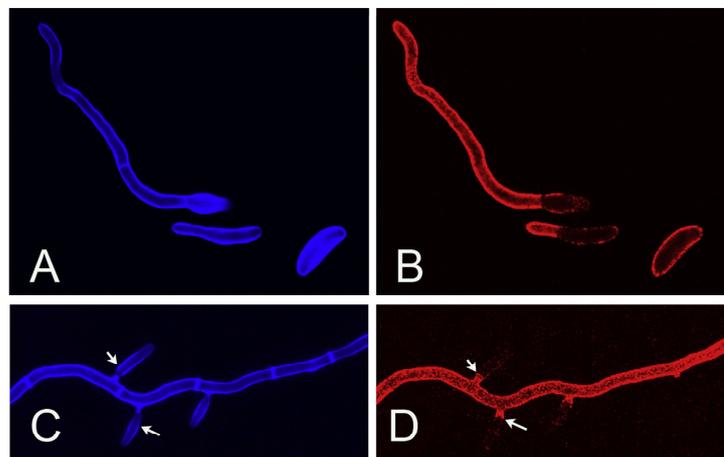
**Fig. 2.** Panels A to D: Monoclonal antibody L10-1 recognizes *A. fumigatus* (panel B), but not *F. oxysporum* hyphae (panel D) in immunofluorescence. A and C show corresponding Calcofluor white stainings. Panel E: Purified L10-1 was coated on the surface of an ELISA plate, blocked and incubated with undiluted culture supernatants of *A. fumigatus* and *F. oxysporum* as well as PBS as negative control. Plates were subsequently developed using peroxidase-labelled EB-A2 antibody.

### 2.5. ELISA assays

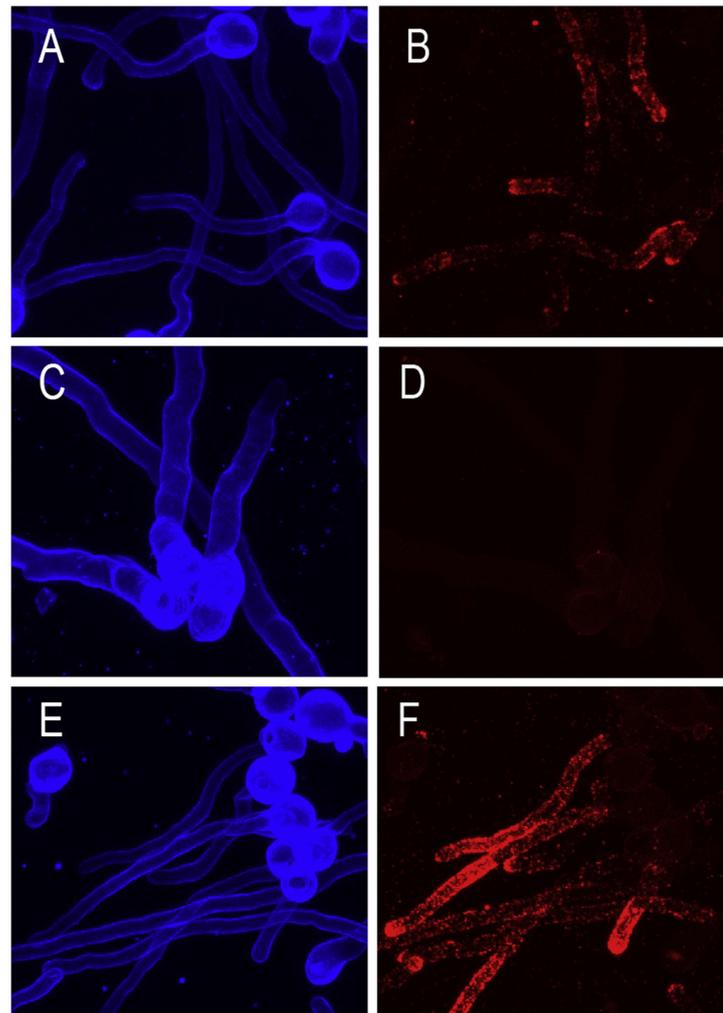
The PLATELIA Aspergillus EIA was performed according to the instructions of the vendor (BIORAD, Marnes-la-Coquette, France). In other ELISA assays the peroxidase-labelled antibody EB-A2 was used as outlined in the instructions of the Aspergillus EIA. For generation of *A. fumigatus* supernatant (SD-Asp) 200 ml of SD medium (Yeast Nitrogen Base 0.34/l, ammonium sulphate 1 g/l, glucose 1 g/l) were inoculated with  $1 \times 10^8$  resting conidia of *A. fumigatus* strain ATCC46645. For the different *Fusarium* strains, 100 ml Sabouraud medium were inoculated with  $1.5 \times 10^4$  conidia. After 4 days incubation at 37 °C with shaking (140 rpm, Certomat-R, B. Braun, Melsungen, Germany) supernatants were harvested by centrifugation, passed through a 0.2 µm filter and stored in aliquots at –20 °C. Samples were diluted in coating buffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH10) as specified and 100 µl were added per well of the ELISA test

plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) and the plates were incubated for 2 h at 37 °C. Plates were washed five times with TBS supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T). For blocking of unspecific binding sites, plates were incubated for 1 h at 37 °C with 200 µl/well of 0.1% BSA in TBS-T. Peroxidase-labelled anti mouse IgM antibodies (Dianova, Hamburg, Germany) were used at a final dilution of 1:2000. For washing, plates were incubated five times with 200 µl per well TBS-T. Plates were developed using TMB substrate and Stop solution (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) and the optical density at 450 nm was determined using a Tecan Sunrise Reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

For antigen capture ELISA, purified antibodies (1 mg/ml) were diluted 1:500 in coating buffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH10). 100 µl of this solution were added per well and the ELISA test plates were incubated for 2 h at 37 °C. Plates were washed five times with 200 µl TBS-T per well. Blocking of unspecific binding sites, incubation with



**Fig. 3.** Monoclonal antibody AB135-8 recognizes *Fusarium* hyphae and macroconidia. Hyphae of *F. andyazi* were grown in Sabouraud medium. After fixation, samples were stained with calcofluor white (panels A and C) and AB135-8 (panels B and D). All panels show projections of several optical planes. Arrows in C and D indicate AB135-8-labelled cup-like structures connecting microconidia and hyphae.



**Fig. 4.** Labelling of *A. fumigatus* hyphae by AB135-8 depends on galactofuranose (Gal<sub>f</sub>). Hyphae of the  $\Delta galfA$  mutant (panels C and D), the corresponding wild type strain D141 (panels A and B) and the complemented mutant (panels E and F) were stained with AB135-8 (panels B, D and F) and calcofluor white (panels A–E). Note that AB135-8 does not recognize hyphae of the  $\Delta galfA$  mutant, which lacks Gal<sub>f</sub>.

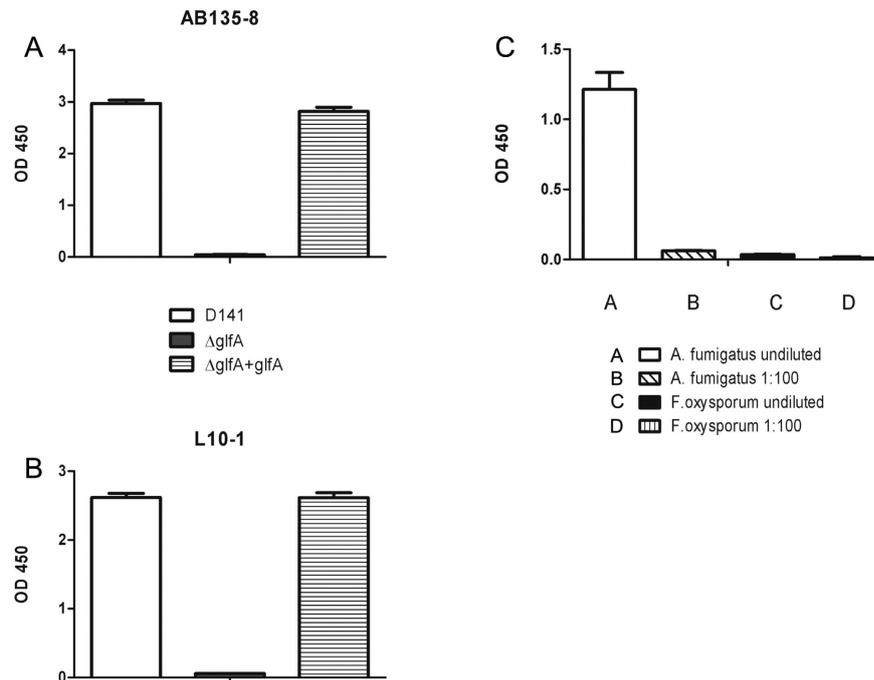
peroxidase-labelled EB-A2 and development were performed as described above.

#### 2.6. Periodate oxidation

Periodate oxidation was essentially done as described by Thornton (2008). ELISA test plates (Greiner Bio-one) were coated with 100  $\mu$ l *A. fumigatus* supernatant diluted 1:100 in coating buffer for 2 h at 37 °C. After one washing-step with 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), 100  $\mu$ l of 80 mM periodate in sodium acetate buffer were added and incubated overnight at 4 °C. Controls were incubated with the buffer only. The ELISA assay was performed as described above.

#### 2.7. Immunofluorescence

Hyphae were grown on glass cover slips in AMM or Sabouraud medium. *Aspergillus* hyphae stick to the glass surface. For all other fungi, cover slips with weakly attached hyphae were dried overnight at 50 °C. Samples were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS for 5 min, washed and subsequently incubated with monoclonal antibodies L10-1 or AB135-8 in a moistened chamber for 30 min at 37 °C. The cover slips were subsequently washed three times with PBS. Suitable secondary antibodies labelled with either Cy3 or Alexa 488 were obtained from Dianova (Hamburg, Germany). For direct staining, purified IgM antibodies were dialyzed against PBS and labelled using the Dylight 488 or the Dylight 550 microscale



**Fig. 5.** Culture supernatants of the *A. fumigatus*  $\Delta$ gIfA mutant contain neither galactomannan nor the AB135-8 antigen. Cell-free culture supernatants were obtained after growth of the *A. fumigatus*  $\Delta$ gIfA mutant, the corresponding parental (D141) and complemented strains in Sabouraud medium. Supernatants were coated at a dilution of 1:10 on ELISA plates and reacted in parallel experiments with AB135-8 (panel A) and L10-1 (panel B). Panel C shows a capture ELISA experiment in which AB135-8 was coated on the ELISA plate. After incubation with the indicated fungal culture supernatants, the ELISA was developed using peroxidase-labelled EB-A2 antibody. All experiments were performed in triplicates. Error bars are indicated.

antibody labelling kits (ThermoScientific). To stain the cell wall, samples were incubated with 1 mg/ml Calcofluor white (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) for one minute at RT. All samples were finally mounted using Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and analysed using a Leica SP-5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### 2.8. Infection experiments

Experiments were conducted using 7-week-old female Balb/c mice (Charles River Laboratory, Wilmington, USA). Mice were treated in accordance with the guidelines of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes" and the Austrian law. Animal experiments were approved by the ethics committee of the Austrian Federal Ministry of Science and Research (BMWF). Mice were fed with normal mouse chow and water *ad libitum*. The mice were infected intravenously with  $4 \times 10^6$  colony forming units of either *A. fumigatus*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* or *F. dimerum*.

### 2.9. Processing and staining of histological samples

Organs were dissected at death, collected in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin; to visualize fungal elements, sections of 6  $\mu$ m were stained with Grocott by routine histological techniques for pathological analysis.

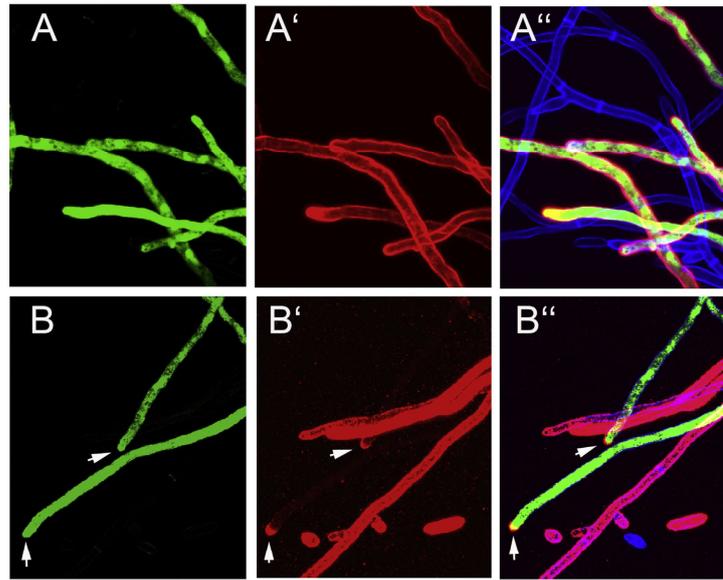
For deparaffinization, slides were washed twice in xylene, 100% ethanol and 95% ethanol. After single washing steps in 80% ethanol, 70% ethanol and 50% ethanol, samples were finally washed another two times in H<sub>2</sub>O. Each washing step lasted 5 min. For immunostaining the slides were placed in a moistened chamber and 100  $\mu$ l blocking buffer (10% goat serum in PBS) was added to each section. The closed chamber was incubated for 1 h at room temperature. Slides were then washed three times (5 min each) in PBS. Labeled antibodies (1 mg/ml) were added at a dilution of 1:50 in PBS and incubated overnight at 4 °C.

For indirect immunofluorescence, samples were blocked as described above and then incubated overnight with the primary antibody. After washing, the sample was incubated for 1 h with a Cy3-labelled secondary antibody. Fungal elements were additionally stained with Blankofluor (0.4 mg/ml for 1 min). Slides were washed three times in PBS and mounted using Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Samples were analysed using a Leica SP-5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

## 3. Results

### 3.1. *Fusarium* species harbour genes that are required for galactomannan synthesis

Galf synthesis in *A. fumigatus* requires the UDP-galactopyranose mutase GIfA and the UDP-Galf transporter GIfB. Using BlastP, we identified GIfA and GIfB homologs in *F. graminearum*, *F. oxysporum*



**Fig. 6.** Double-labelling of a mixture of hyphae of *A. fumigatus* ATCC46645-GFP and *F. proliferatum* strain NRZ 2311 using L10-1 and AB135-8. GFP fluorescence of *A. fumigatus* ATCC46645-GFP is shown in panels A and B. Staining with L10-1 or AB135-8 are shown in red in panels A' and B', respectively. Corresponding calcofluor white staining are depicted in the overlays shown in A'' and B''. All micrographs are projections of several optical planes. Tips of *A. fumigatus* hyphae are indicated by arrows. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

and *F. verticilloides*. *Fusarium* usually harbours several GlfA and GlfB homologs. Only *F. graminearum* (strain PH-1) possesses one GlfA homolog (Suppl. Table S1 in the online version at DOI: [10.1016/j.ijmm.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002)). Remarkably, those proteins showing the highest homology to GlfA and GlfB are encoded by neighbouring genes, which resembles the situation for glfA and glfB in *A. fumigatus*. Thus, *Fusarium* species have the genetic capacity to produce and transport UDP-Galf.

### 3.2. Detection of galf antigen in fusarium culture supernatants

Initially galactomannan was thought not to be present in *Fusarium*, but several infections with positive galactomannan antigen tests have been reported in recent years, e.g. a fatal breakthrough infection caused by *F. andiyazi* (Kebabci et al., 2014). Supernatants of this clinical isolate and strains representing another four *Fusarium* species were analysed for galactomannan. At a dilution of 1:100 galactomannan was not detectable for *F. dimerum*, *F. solani*, *F. andiyazi*, *F. proliferatum* and *F. oxysporum*, whereas *A. fumigatus* supernatant was strongly positive (Fig. 1A and data not shown). However, undiluted supernatants of *F. andiyazi* and other *Fusarium* species were clearly positive (Fig. 1B and data not shown) demonstrating that *Fusarium* releases minor amounts of galactomannan during in vitro growth. Human serum has been reported to trigger an enhanced release of galactomannan in *A. fumigatus* (Bahia et al., 1997). However, supplementation of Sabouraud medium with 3% human serum had no positive impact on the amount of galactomannan in supernatants of *F. andiyazi* (Fig. 1A).

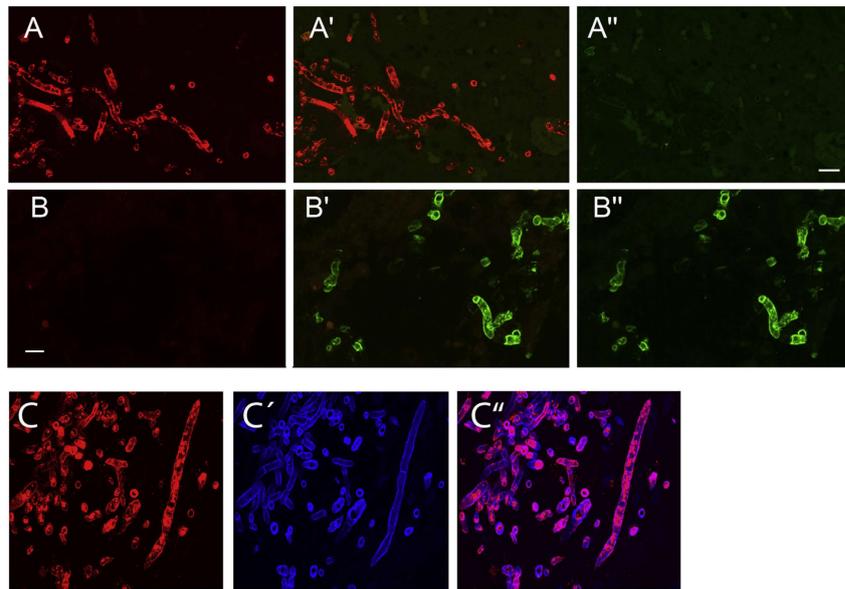
We have recently raised and characterized a murine galactomannan-specific monoclonal antibody designated L10-1 (Heesemann et al., 2011). This antibody was used for immunofluorescence, since the peroxidase-labelled EB-A2 turned out to be not

suitable for this application. L10-1 stained *A. fumigatus* hyphae in a homogenous fashion, but showed no reactivity with *F. dimerum*, *F. solani*, *F. andiyazi* or *F. oxysporum* hyphae (Fig. 2A–D and data not shown). The somehow discrepant results obtained for *Fusarium* in immunofluorescence and ELISA prompted us to test whether L10-1 is able to bind soluble galactomannan from *Fusarium* culture supernatants. To this end, ELISA wells were coated with purified L10-1, incubated with undiluted *Fusarium* and *Aspergillus* supernatants and finally developed with peroxidase-coupled EB-A2. Positive signals were obtained for both, *A. fumigatus* and *F. oxysporum* supernatants (Fig. 2E) demonstrating that L10-1 is able to bind *Fusarium*-derived galactomannan.

### 3.3. Monoclonal antibody recognizing a novel galactofuranose antigen

In this study, we have generated a novel hybridoma, designated AB135, which was initially identified by its weak reactivity with *A. fumigatus* germ tubes and hyphae. A similar pattern was also obtained for *A. nidulans*, *A. niger* and *A. terreus* (data not shown). Strikingly, AB135 showed a much stronger reactivity with *Fusarium* hyphae. After cloning, the resulting monoclonal antibody AB135-8 uniformly labelled hyphae of all five *Fusarium* species tested. Macroconidia were also recognized, but the staining was often patchy (Fig. 3B), whereas microconidia were not recognized except for small cup-like structures at their base (Fig. 3D, arrows).

The AB135-8 antigen is not sensitive to protease K digestion (data not shown) and AB135-8 belongs to the IgM subclass, which suggests specificity for a carbohydrate antigen. If so, the AB135-8 antigen should be sensitive to periodate treatment. To test this, we coated culture supernatants of *F. oxysporum* and *A. fumigatus* on ELISA plates and treated them with periodate. Subsequent analysis



**Fig. 7.** Staining of histological sections. Sections from the liver of a mouse infected with *A. fumigatus* (A to A'') and from the ear of a mouse infected with *F. solani* (B to B'') were stained with a mixture of L10-1-DyLight550 and AB135-8-DyLight488. A and B: L10-1-DyLight550. A' and B': AB135-8-DyLight488. A'' and B'': Overlays of both channels. Note that both antibodies exclusively recognize hyphae of one fungal species. Bars in A'' and B'' represent 5  $\mu\text{m}$  and 3  $\mu\text{m}$ , respectively. Panel C to C'': A section from a human patient suffering from fusariosis was stained with AB135-8 (in red) and Blankofluor (C and C', respectively). The corresponding overlay is shown in C''. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by ELISA with the different monoclonal antibodies showed that the galactomannan antigen recognized by EB-A2 and L10-1 was completely eliminated, whereas the AB135-8 antigen was only partially destroyed by periodate treatment (Supplementary Fig. S1 in the online version at DOI: [10.1016/j.ijmm.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002)).

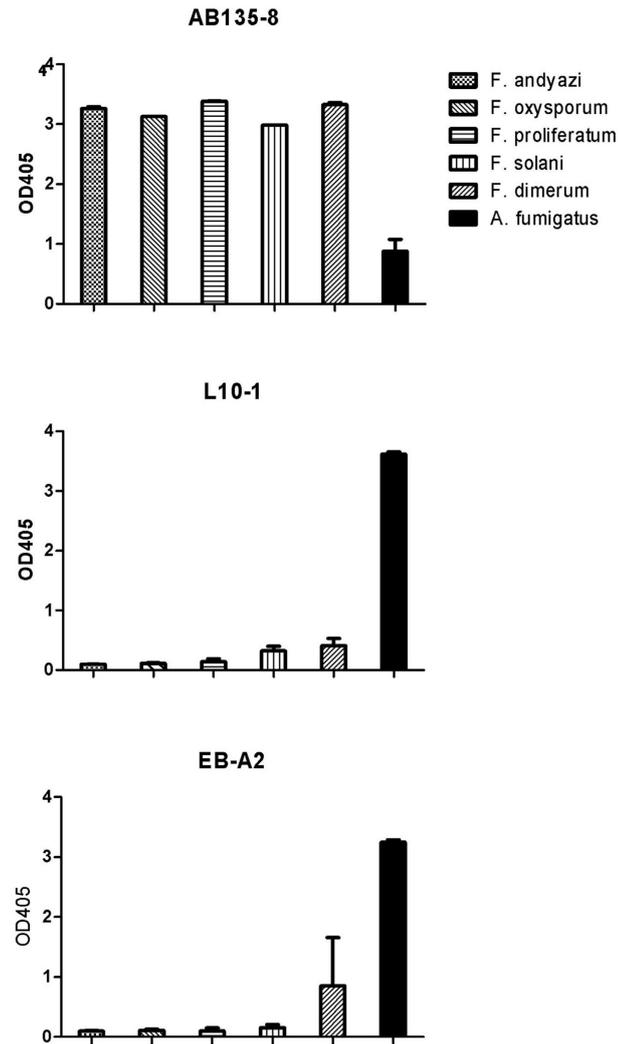
In immunofluorescence, binding of AB135-8 to *A. fumigatus* hyphae was weak and usually focussed to the apical region of hyphae (Fig. 4B). No staining was observed for an *A. fumigatus*  $\Delta\text{glfA}$  mutant, which lacks galactofuranose (Fig. 4D), whereas hyphae of the complemented strain were again recognized (Fig. 4F). These results could either indicate that *Galf* is an essential part of the AB135-8 epitope or, alternatively that the AB135-8 antigen is anchored to the cell wall in a galactomannan-dependent manner. To distinguish these two possibilities, we have analysed culture supernatants of the *A. fumigatus*  $\Delta\text{glfA}$  mutant and the corresponding control strains. Both, galactomannan and the AB135-8 antigen were found in supernatants of the parental and the complemented strain, but not in those of the  $\Delta\text{glfA}$  mutant (Fig. 5A and B, respectively). This finding strongly suggests that *Galf* is an essential part of the AB135-8 antigen.

We next analysed whether the AB135-8 antigen resides on the same molecules as galactomannan. To this end, we used a capture ELISA with AB135-8 coated on the plate and peroxidase-labelled EB-A2 for detection. Undiluted *A. fumigatus* culture supernatants gave strong signals, whereas supernatants diluted 1:100 were negative. For *F. oxysporum*, even undiluted culture supernatants gave no significant signals (Fig. 5C). This suggests that in *Aspergillus* supernatants the two distinct *Galf* antigens recognized by AB135-8 and EB-A2 exist on the same molecule, whereas in *Fusarium* supernatants both antigens are apparently localized on distinct molecules.

In the *Mucorales*, another important group of fungal pathogens, galactomannan is not found in supernatants (Swanink et al., 1997; Cummings et al., 2007). In line with these data, we found no homologs of *GlfA* and *GlfB* in several *Mucorales* genomes (data not shown) and in immunofluorescence, both AB135-8 and L10-1 did not recognize hyphae of *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera* and *Rhizopus oryzae* (data not shown). Negative results in immunofluorescence were also obtained with different *Scedosporium* species (data not shown). Hyphae of the dermatophytes *Microsporum canis* and *Trichophyton interdigitale* were not recognized by L10-1 (data not shown), although *GlfA* and *GlfB* homologs exist in corresponding genomes. For both species, we observed a staining with AB135-8 that was largely focussed on the surface of conidial bodies from which germ tubes had already emerged (Suppl. Fig. S2 in the online version at DOI: [10.1016/j.ijmm.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002) and data not shown).

#### 3.4. Antibodies against galactofuranose antigens distinguish *Aspergillus* and *Fusarium* hyphae in histological samples

*Fusarium* hyphae are difficult to distinguish from *Aspergillus* hyphae by light microscopy due to their similar morphology. We therefore tested the ability of L10-1 and AB135-8 to differentiate hyphae of *A. fumigatus* and *F. oxysporum* in immunofluorescence. To this end, hyphae of *A. fumigatus* expressing cytosolic GFP and *F. oxysporum* were grown as a mixed culture. All hyphae were visualized using Calcofluor white (Fig. 6A'' and B''). L10-1 labelled *A. fumigatus* hyphae (Fig. 6A-A''), but showed no reactivity with *Fusarium*. In contrast, AB135-8 strongly labelled *Fusarium* hyphae and showed only a weak staining of *A. fumigatus* hyphae that was restricted to small dot-like structures at the apical tips (Fig. 6B-B'').



**Fig. 8.** Detection of galactomannan and AB135-8 antigen in culture supernatants. Cell-free supernatants of the indicated *Fusarium* species were coated to ELISA plates at a dilution of 1:10. Plates were blocked and the wells were incubated with AB135-8, L10-1 or EB-A2 as indicated. Wells were developed using peroxidase-labelled anti-mouse IgM antibodies. These experiments were performed in triplicates. Error bars are indicated.

In the next step, we covalently labelled L10-1 with DyLight550 (in red) and AB135-8 with DyLight488 (in green). Staining of a mixture of hyphae with these directly labelled antibodies also led to a clear discrimination of *A. fumigatus* and *F. oxysporum* hyphae grown in vitro (data not shown).

Specific antibodies are valuable tools for immunohistology. To verify whether AB135-8 works in histology, we have analysed samples from mice infected with *Fusarium* spp. and *A. fumigatus*. After treatment with a mixture of the two directly labelled antibodies both pathogens could be differentiated. AB135-8 detected *F. solani* hyphae (Fig. 7B<sup>''</sup>), but showed no significant reactivity with *A. fumi-*

*gatus* (Fig. 7A<sup>''</sup>), whereas L10-1 recognized *A. fumigatus* hyphae (Fig. 7A), but showed no binding to those of *F. solani* (Fig. 7B). Similar results were obtained with tissue samples infected with *F. proliferatum* and *F. oxysporum* (data not shown). We additionally stained a histological sample derived from a human patient infected with *F. proliferatum*. As shown in Fig. 7C, AB135-8 strongly decorated all hyphal elements indicating that it is also suitable to detect *Fusarium* hyphae in human samples.

Diagnostics of fungal infections largely depend on the serological detection of fungal antigens, such as  $\beta$ -1,3-glucan or galactomannan. So far, a specific serological test for *Fusarium* is

not available, which prompted us to explore whether the AB135-8 is released during fungal growth. We therefore analysed culture supernatants of *A. fumigatus* and five *Fusarium* species with L10-1, EB-A2 and AB135-8. Supernatants were coated at a dilution of 1:10 to ELISA plates. As shown in Fig. 8, AB135-8 clearly recognized supernatants of all five *Fusarium* species, whereas only weak signals were obtained with *A. fumigatus*. EB-A2 and L10-1 showed the opposite pattern, being strongly positive for *A. fumigatus* whereas no or only very weak signals were obtained with *Fusarium* supernatants. At higher antigen dilutions L10-1 and EB-A2 gave comparably strong positive reactions, but only with *Aspergillus*, whereas AB135-8 was strongly positive with *Fusarium*, but negative with *Aspergillus* supernatants (data not shown). This demonstrates that the AB135-8 antigen is released by *Fusarium* hyphae.

#### 4. Discussion

*Fusarium* causes an emerging pathogen causing a broad spectrum of infections in immunocompromised and immunocompetent individuals that are often refractory to treatment (Nucci and Anaissie, 2007; Muhammed et al., 2011). Despite this clinical relevance, neither specific antibodies nor serological assays are available for the detection of *Fusarium* infections. Detection of secreted antigens is an important tool for diagnostics of invasive fungal infections (De Pauw et al., 2008). *Fusarium* produces  $\beta$ -1,3-glucan, but detection of this antigen lacks species-specificity, since it is produced by many fungal pathogens. Nucci and Anaissie (2007) proposed that a positive  $\beta$ -1,3-glucan assay in combination with a negative galactomannan assay in a high-risk patient is highly suggestive of fusariosis. This was based on studies demonstrating that galactomannan is not produced by *Fusarium* (Swanink et al., 1997; Stynen et al., 1992; Cummings et al., 2007). However several recent reports of fusariosis patients with positive galactomannan assays challenged this concept (Mikulska et al., 2012; Tortorano et al., 2012; Horn et al., 2014; Kebabci et al., 2014; Nucci et al., 2014). We have addressed this issue and found that *Fusarium* harbours genes that are required for production of galactofuranose, the antigenic and fungal-specific component of galactomannan. Moreover, we demonstrate that galactomannan is detectable in *Fusarium* culture supernatants, although in quantities that are substantially lower than in *A. fumigatus*, thereby confirming data of Tortorano et al. (2012). Our data imply that *Fusarium* can produce galactomannan in amounts that are diagnostically relevant. Subtle differences in the individual fusariosis patients may determine whether galactomannan levels become diagnostically apparent or not. Taken together, our and previously published data imply that the galactomannan assay is not suitable to detect or exclude a *Fusarium* infection.

In this study, we used a commercial assay based on the antibody EB-A2 to detect galactomannan in culture supernatants. For immunofluorescence, we used the galactomannan-specific antibody L10-1 that recognizes *A. fumigatus* hyphae (Heesemann et al., 2011), but showed no reactivity with several *Fusarium* species. The divergent results obtained for *Fusarium* in ELISA and immunofluorescence could reflect subtle differences in the specificities of L10-1 and EB-A2. However, both antibodies were able to cooperate in a capture ELISA format. Thus, although L10-1 failed to stain *Fusarium* hyphae, it is clearly able to detect galactomannan in *Fusarium* culture supernatants. Possible explanations for the negative results in immunofluorescence are that the galactomannan antigen is buried in deeper parts of the cell wall of mature hyphae, where it is no longer accessible for antibodies, or that the antigen is not efficiently anchored in the *Fusarium* cell wall.

We have raised a set of antibodies against *A. fumigatus*. One of them, designated AB135-8, showed only weak reactivity with *Aspergillus* hyphae, but a much stronger binding to *Fusarium* hyphae. ELISA experiments with supernatants of *A. fumigatus* and several *Fusarium* species revealed distinct specificities for L10-1 and AB135-8. AB135-8 showing strong reactivity with *Fusarium*, but only weak reactivity with *Aspergillus*, whereas the pattern is the opposite for L10-1, which allows an unambiguous differentiation of both pathogens.

A carbohydrate nature of the AB135-8 antigen is already suggested by the IgM subclass of the antibody and further corroborated by the resistance of the antigen to protease treatment and its sensitivity to periodate oxidation. Interestingly, galactomannan is much more sensitive to periodate treatment than the AB135-8 antigen demonstrating that these are similar, but distinct glycostructures.

In *A. fumigatus*, the AB135-8 antigen is detectable by immunofluorescence and ELISA, whereas the  $\Delta$ glfA mutant is negative in both assays. This strongly suggests that AB135-8 recognizes a novel Galf-containing antigen. Only limited information is available on *Fusarium* Galf-containing extracellular polysaccharides, but the structures identified so far contained 1,6- or 1,2,6-linked Galf moieties (Siddiqui and Adams, 1961; Miyazaki and Naoi, 1975; Ahrazem et al., 2000) and clearly differ from the 1,5-linked Galf chains found in *A. fumigatus* (Latgé et al., 1994).

There are two explanations for the differential binding of AB135-8 and L10-1 to *Aspergillus* and *Fusarium*: The two Galf-antigens are produced either in genus-specific amounts or in a mutually exclusive pattern. In the latter case, weak signals would be due to cross-reactivities. Using a capture ELISA format, we found that Galf-antigens can be detected using a combination of AB135-8 and EB-A2, but only in *Aspergillus*, not in *Fusarium* supernatants. Since AB135-8, when bound to the plate, bound the antigen, one would expect larger quantities of the AB135-8 antigen to be captured from *Fusarium* than from *Aspergillus* supernatants. We nevertheless obtained negative results for *Fusarium* suggesting that *Fusarium* releases galactomannan and the AB135-8 antigen on distinct molecules. These results furthermore demonstrate that at least EB-A2 shows no cross-reactivity with the novel antigen recognized by AB135-8.

In histopathology it is difficult to distinguish fungal pathogens by their morphological characteristics. *Fusarium* and *Aspergillus* both grow as septate and hyaline hyphae with similar branching angles and specific tools are therefore required for an unambiguous differentiation. In a mixture of *Fusarium* and *Aspergillus* hyphae, L10-1 exclusively recognized *Aspergillus*, whereas AB135-8 strongly labelled *Fusarium*, but showed only a weak staining of *Aspergillus* hyphae. The weak staining of distal parts of *A. fumigatus* hyphae by the antibody suggests that the AB135-8 antigen is either shielded by additional cell wall material or is only transiently associated with the cell wall.

We have recently shown that L10-1 recognizes *A. fumigatus* hyphae in histological samples of infected human patients (Heesemann et al., 2011). In this study, we stained histological samples from infected mice with L10-1 and AB135-8. Both L10-1 and AB135-8 were highly specific for *Aspergillus* and *Fusarium* hyphae, respectively. We observed no cross-reactivity of AB135-8 with *A. fumigatus* hyphae as in the mixed *in vitro* cultures suggesting that the growth conditions during infection further reduce the production of the AB135-8 antigen in *Aspergillus*. In samples from a human fusariosis patient, *F. proliferatum* hyphae were also strongly recognized by AB135-8. Thus, the combination of L10-1 and AB135-8 allows differentiation of *Fusarium* and *Aspergillus* in immunohistology. The specificity of this method is further underlined by the following findings: *Mucorales* and *Scedosporium* lack homologs of G1fA and G1fB and their hyphae are not recognized by AB135-8 and L10-1. Dermatophytes possess G1fA and G1fB homologs, but galac-

tomannan from *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* was shown to contain no poly-Galf chains (Ikuta et al., 1997) and accordingly, we observed no reactivity of L10-1 with *T. mentagrophytes* and *M. canis*. For AB135-8 we observed a staining in immunofluorescence that was largely restricted to the conidial surface of both fungi, which again demonstrates that L10-1 and AB135-8 recognize distinct antigens.

In conclusion, the data obtained in this study suggests that two distinct forms of Galf antigens exist in *Aspergillus* and *Fusarium*. These antigens can be detected and differentiated using the monoclonal antibodies AB135-8 and L10-1. AB135-8 turned out to be a valuable tool for detection of *Fusarium* in immunofluorescence and immunohistology. Since the AB135-8 antigen was also found in culture supernatants, it represents a promising target for a *Fusarium*-specific serological assay.

#### Acknowledgments

We thank Françoise Routier (Hanover) for the  $\Delta$ glfA mutant and helpful suggestions and Kirsten Niebuhr-Ebel for critical reading of the manuscript. Strains were kindly provided by Kathrin Tintelnot (Berlin), Axel Hamprecht (Cologne) and Andrea Peano (Turin). We also thank Michaela Lackner (Innsbruck). This work was supported by a grant of the Bayerische Forschungsförderung zu FE as part of the FORPROTECT network and by the Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung. CS and GR were supported by the Austrian National Bank (Project 15352) and by the Austrian Science Fund (FWF Project P26117-B20).

#### References

- Ahrazem, O., Gomez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabe, M., Leal, J.A., 2000. An acidic water-soluble cell wall polysaccharide: a chemotaxonomic marker for *Fusarium* and *Gibberella*. *Mycol. Res.* 104, 603–610.
- Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Monzón, A., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J.L., 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 805–809.
- Bahia, M.C., Vieira, R.P., Mulloy, B., Hartmann, R., Bergter, E.B., 1997. The structures of polysaccharides and glycolipids of *Aspergillus fumigatus* grown in the presence of human serum. *Mycopathologia* 137, 17–25.
- Cummings, J.R., Jamison, G.R., Boudreaux, J.W., Howles, M.J., Walsh, T.J., Hayden, R.T., 2007. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 113–115.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., et al., 2008. European organization for research and treatment of Cancer/Invasive fungal infections cooperative group; national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1813–1821.
- Engel, J., Schmalhorst, P.S., Dörk-Bousset, T., Ferrières, V., Routier, F.H., 2009. A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 284, 33859–33868.
- Heesemann, L., Kotz, A., Echtenacher, B., Broniszewska, M., Routier, F., Hoffmann, P., Ebel, F., 2011. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.*
- Horn, D.L., Freifeld, A.G., Schuster, M.G., Azie, N.E., Franks, B., Kauffman, C.A., 2014. Treatment and outcomes of invasive fusariosis: review of 65 cases from the PATH Alliance registry. *Mycoses* 57, 652–658.
- Ikuta, K., Shibata, N., Blake, J.S., Dahl, M.V., Nelson, R.D., Hisamichi, K., Kobayashi, H., Suzuki, S., Okawa, Y., 1997. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* 323, 297–305.
- Kebabci, N., van Diepeningen, A.D., Ener, B., Ersal, T., Meijer, M., Al-Hatmi, A.M., Ozkocaman, V., Ursavaş, A., Cetinoglu, E.D., Akalin, H., 2014. Fatal breakthrough infection with *Fusarium andiyazi*: new multi-resistant aetiological agent cross-reacting with *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Mycoses* 57, 249–255.
- Komachi, Y., Hatakeyama, S., Motomatsu, H., Futagami, T., Kizjakina, K., Sobrado, P., Ekino, K., Takegawa, K., Goto, M., Nomura, Y., Oka, T., 2013. GfsA encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 90, 1054–1073.
- Latgé, J.P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszkeski, J.M., Parra, E., Bouchara, J.P., Fournet, B., 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62, 5424–5433.
- Meier, A., Kirschning, C.J., Nikolau, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F., 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell. Microbiol.* 5, 561–570.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Schilling, A.G., 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzl. Pathol.* 107, 124–134.
- Mikulska, M., Furfaro, E., Del Bono, V., Gualandi, F., Raiola, A.M., Molinari, M.P., Critti, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Bacigalupo, A., Viscoli, C., 2012. Galactomannan testing might be useful for early diagnosis of fusariosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 367–369.
- Miyazaki, T., Naoi, Y., 1975. Chemical structures of main extracellular polysaccharides of *Alternaria solani* and *Fusarium solani*. Studies on fungal polysaccharides. XVIII. *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1752–1758.
- Morrison, C.J., 2002. Laboratory diagnosis of fungal infection in the intensive care Unit—North American perspective. In: Barnes, A., Warnock, D.W. (Eds.), *Fungal Infection in the Intensive Care Unit*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Muhammed, M., Coleman, J.J., Carneiro, H.A., Mylonakis, E., 2011. The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2, 91–96.
- Nucci, M., Anaissie, E., 2007. Fusarium infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695–704.
- Nucci, M., Carlesse, F., Cappellano, P., Varon, A.G., Seber, A., Garnica, M., Nouér, S.A., Colombo, A.L., 2014. Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing. *PLoS One* 9, e87784.
- Schmalhorst, P.S., Krappmann, S., Verweij, W., Rohde, M., Müller, M., Braus, G.H., Contreras, R., Braun, A., Bakker, H., Routier, F.H., 2008. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 7, 1268–1277.
- Siddiqui, I.R., Adams, G.A., 1961. An extracellular polysaccharide from *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Can. J. Chem.* 39, 1683–1694.
- Stynen, D., Sarfati, J., Coris, A., Prévost, M.C., Lesourd, M., Kamphuis, H., Darras, V., Latgé, J.P., 1992. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect. Immun.* 60, 2237–2245.
- Swanink, C.M., Meis, J.F., Rijs, A.J., Donnelly, J.P., Verweij, P.E., 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 257–260.
- Telsen, B., Ram, A.F., van Die, I., Routier, F.H., 2012. Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology* 22, 456–469.
- Thornton, C.R., 2008. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1095–1105.
- Tortorano, A.M., Esposto, M.C., Prigitano, A., Grancini, A., Ossi, C., Cavanna, C., Cascio, G.L., 2012. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1051–1053.

## 2. Publikation 2

Wiedemann, A., *et al.*

Agents activating the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat human pathogenic molds.

Int. J. Med. Microbiol. (2016)

### Zusammenfassung:

Für die Therapie invasiver Mykosen stehen mit den Polyenen, Azolen und Echinocandinen nur drei Klassen von Antimykotika zur Verfügung. Die verschiedenen Schimmelpilze weisen sehr unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den verschiedenen Substanzen auf, außerdem kommt es in den letzten Jahren vermehrt zum Auftreten von Resistenzen. Deswegen haben wir untersucht, ob Substanzen, die die TcsC Sensorkinase des Pilz-spezifischen *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalwegs aktivieren, für eine antifungale Therapie geeignet sind. Fludioxonil und Iprodione aktivieren diesen Signalweg und zeigten in unseren Tests eine klare antifungale Wirkung nicht nur auf *Aspergillus*, sondern auch auf die klinisch relevanten Genera *Lichtheimia* spp., *Rhizopus* spp. und *Scedosporium* spp.. Nur *A. terreus* zeigte sich resistent gegenüber Fludioxonil obwohl dieser Stamm sensitiv gegenüber Iprodione war und auch die Fähigkeit besitzt sich hyperosmotischen Bedingungen anzupassen. Außerdem war das *A. terreus tcsC* Gen dazu in der Lage eine *A. fumigatus*  $\Delta tcsC$  Mutante wieder zu komplementieren und so auch die Sensitivität gegenüber Fludioxonil wieder herzustellen. Dies deutet daraufhin, dass die Resistenz von *A. terreus* gegenüber Fludioxonil unabhängig von der TcsC Kinase ist. Die genaue Wirkung von Fludioxonil und Iprodione haben wir beispielhaft für *A. fumigatus* untersucht und herausgefunden, dass diese Substanzen auf vielfältigen zellbiologischen Wegen dem Pilz Schaden zufügen. Durch diesen Stress reagiert der Pilz u.a. mit einer Umstrukturierung der Zellwand, die mit einer massiven Galaktomannan-Freisetzung einhergeht. Diese induzierte Freisetzung des Galaktomannan-Antigens könnte die Diagnostik im frühen Infektionsstadium deutlich verbessern. HOG-aktivierende Substanzen mit ihrem Zielprotein, das in Säugetieren nicht existiert, zeigten sich als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Antimykotika zur Bekämpfung von Schimmelpilzinfektionen.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijmm](http://www.elsevier.com/locate/ijmm)

## Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds



Annegret Wiedemann<sup>a,1</sup>, Anja Spadinger<sup>a,1</sup>, Axel Löwe<sup>b</sup>, Allison Seeger<sup>b</sup>,  
Frank Ebel<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

<sup>b</sup> Max-von-Pettenkofer-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

<sup>c</sup> German Center for Infection Research (DZIF), Munich, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 July 2016

Received in revised form 7 September 2016

Accepted 26 September 2016

#### Keywords:

Antifungals  
HOG pathway  
Type III hybrid histidine kinase  
TcsC  
Fludioxonil  
Hyperosmotic stress  
*Aspergillus fumigatus*  
*Aspergillus terreus*  
Mucorales  
*Scedosporium*

### ABSTRACT

Treatment of invasive fungal infections often fails due to the limited number of therapeutic options. In this study, we have analyzed the impact of agents activating the High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway on molds that cause infections in humans and livestock. We found that agents like fludioxonil and iprodione, have a clear anti-fungal activity against pathogenic *Aspergillus*, *Lichtheimia*, *Rhizopus* and *Scedosporium* species. Only *A. terreus* turned out to be resistant to fludioxonil, even though it is sensitive to iprodione and able to adapt to hyperosmotic conditions. Moreover, the *A. terreus tcsC* gene can fully complement an *A. fumigatus ΔtcsC* mutant, thereby also restoring its sensitivity to fludioxonil. The particular phenotype of *A. terreus* is therefore likely to be independent of its TcsC kinase. In a second part of this study, we further explored the impact of fludioxonil using *A. fumigatus* as a model organism. When applied in concentrations of 1–2 μg/ml, fludioxonil causes an immediate growth arrest and, after longer exposure, a quantitative killing. Hyphae respond to fludioxonil by the formation of new septa and closure of nearly all septal pores. Mitosis occurs in all compartments and is accompanied by a re-localization of the NimA kinase to the cytoplasm. In the swollen compartments, the massive extension of the cell wall triggers a substantial reorganization resulting in an enhanced incorporation of chitin and, most strikingly, a massive loss of galactomannan. Hence, HOG-activating agents have dramatic cell biological consequences and may represent a valuable, future element in the armory that can be used to combat mold infections.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Invasive fungal infections represent a major threat for severely immunocompromised patients and are often associated with high mortality rates. Currently, *Aspergillus fumigatus* is the most common and important pathogenic mold, but infections by non-*Aspergillus* species are also increasing (Douglas et al., 2016) and some of these pathogens are even more difficult to treat than *Aspergillus* infections (Cortez et al., 2008). The spectrum of antimycotic agents that are in clinical use for invasive mycoses is small and consists essentially of polyenes, azoles and echinocandines. Azoles are most widely used, but the development of resistance to some

of these drugs has been reported for *A. fumigatus* (Azevedo et al., 2015), which underlines the need to develop new approaches in anti-fungal therapy.

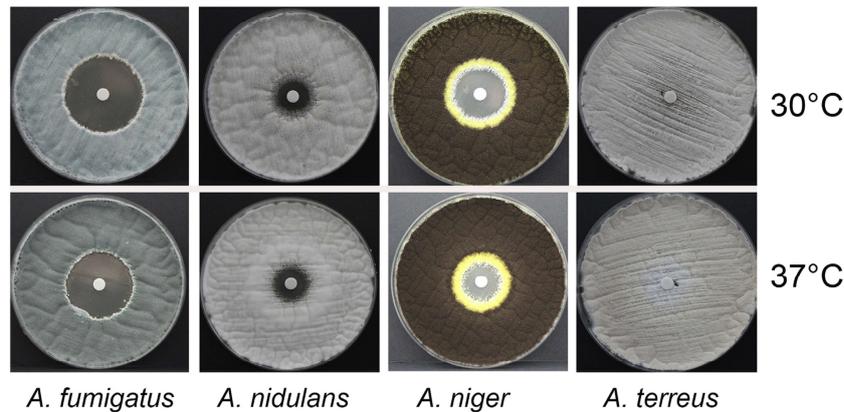
Anti-fungal agents are not only used in human and veterinary medicine, but to a much larger extent in agriculture. Some of the agents used in the field attack fungi by harnessing the so-called High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway (Kojima et al., 2004). This signalling cascade normally enables fungi to thrive under hyperosmotic conditions (Bahn, 2008). However, a pharmacological activation of the HOG pathway, e.g. by fludioxonil, causes a dramatic osmotic imbalance and consequently a massive influx of water (Okada et al., 2005). The use of HOG-activating agents therefore requires a humid environment, which limits their use in agriculture.

In bacteria, sensing and processing of stress signals largely relies on two-component systems that consist of a sensor histidine kinase and a response regulator. In filamentous fungi, hybrid histidine kinases (HHK) integrate both functions in a single polypeptide and

\* Corresponding author at: Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

E-mail address: [frank.ebel@lmu.de](mailto:frank.ebel@lmu.de) (F. Ebel).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.



**Fig. 1.** Impact of fludioxonil on the growth of different *Aspergillus* species. The following strains have been analyzed in this agar diffusion assay: *A. fumigatus* D141, *A. nidulans* A26, *A. niger* DSM737 and *A. terreus* NIH 2624.  $10^6$  conidia of each strain were homogeneously spread on the surface of two Sabouraud plates. Paper disks containing 10 µg fludioxonil were placed in the centre of the plates. Pictures show plates after incubation for 2 days at either 30 °C or 37 °C.

transfer the phosphoryl group intramolecularly from a histidine to an aspartate residue (Shor and Chauhan, 2015). While their primary function is adaptation to high osmotic stress, group III HHK have also been shown to contribute to the virulence of several fungi (Bahn, 2008; Defosse et al., 2015). The sensing module of group III HHK consists of several HAMP domains (present in Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases), which control the activity of the C-terminal kinase module (Defosse et al., 2015). Remarkably, group III HHK are not found in vertebrates (Shor and Chauhan, 2015), which makes them an attractive therapeutic target.

We have recently shown that the dramatic impact of HOG-activating agents, like fludioxonil, on *A. fumigatus* is mediated by the type III HHK TcsC (McCormick et al., 2012). In the current study we have investigated the impact of fludioxonil on *A. fumigatus* in more detail and furthermore analyzed the impact of the HOG-activating agents fludioxonil and iprodione on other major pathogenic molds.

## 2. Result

Fludioxonil inhibits growth of *A. nidulans* and *A. fumigatus* (Hagiwara et al., 2007; McCormick et al., 2012). Using a disk-diffusion assay we confirmed this and observed similar effects for *A. niger* and *A. flavus* (Fig. 1 and data not shown). *A. fumigatus* showed the highest sensitivity, whereas *A. terreus* strain NIH2624 was not inhibited at all (Fig. 1). Further testing of NIH2624 and two additional *A. terreus* strains on plates with paper disks containing 1, 10 and 100 µg fludioxonil revealed that *A. terreus* has a natural resistance to this agent (Suppl. Fig. S1A–C in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). Nevertheless, we observed a partial growth inhibition around fludioxonil-containing disks, but only at early time points, when the mycelial growth was still sparse (Suppl. Fig. S1D in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>).

Fludioxonil damages susceptible fungi by activation of a type III HHK. In *A. fumigatus* this kinase is called TcsC (Afu2g03560) and contains 6 HAMP domains. The TcsC homolog of *A. terreus* in the data base (Q0C9V0/ATEG.09534) contains only four HAMP domains and lacks the C-terminal receiver domain, which represents an essential element of type III HHKs (Suppl. Fig. S2 in the

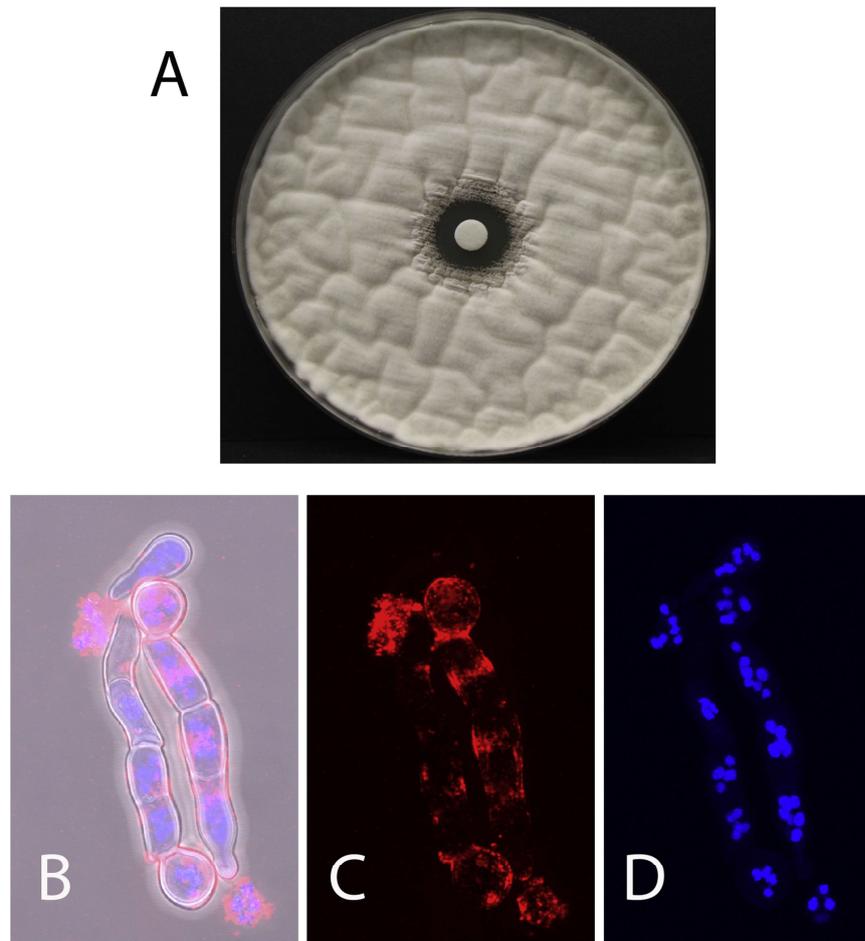
online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). This truncation could explain the striking fludioxonil resistance of *A. terreus*, but should also result in an inability to cope with hyperosmotic stress. However, *A. terreus* grows normally on plates containing 1.2 M sorbitol (Suppl. Fig. S3 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>) and in liquid culture it was able to tolerate even higher NaCl concentrations than *A. fumigatus* (2.5 M versus 2 M, data not shown). Even more striking, *A. terreus* is clearly sensitive to iprodione (Fig. 2A) and when treated with iprodione shows the characteristic phenotypes induced by HOG-activating agents, such as cellular swelling, elevated numbers of nuclei and tip lysis (Fig. 2B and D). This suggested that *A. terreus* possesses a functional TcsC protein. A closer inspection of the *A. terreus* tcsC gene in the data base (supercontig:CADRE:1.15:139557:141148:1) revealed that it is incomplete and contains a stretch of nucleotides that has not been defined yet. This prompted us to re-sequence the tcsC gene of strain NIH 2624 (accession number: IIE995413). It turned out that *A. terreus* TcsC is highly homologous to *A. fumigatus* TcsC (91.2% identity) and contains all domains typically found in a type III HHK (Suppl. Fig. S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). When expressed in an *A. fumigatus*  $\Delta$ tcsC mutant, *A. terreus* tcsC allowed growth under hyperosmotic conditions and conferred sensitivity for fludioxonil and iprodione (Fig. 3), i.e. it fully complemented the mutant phenotype.

The sensitivity of different *Aspergillus* species to fludioxonil and iprodione prompted us to extend our analysis to other pathogenic molds. Disk diffusion assays revealed that growth of the *Mucorales* species *Lichtheimia corymbifera* and *Rhizopus oryzae* is inhibited by both agents (Fig. 4). *Scedosporium minutisporum* is also sensitive to both agents, but the inhibition zone observed for fludioxonil was strikingly larger than for any other mold tested (Fig. 4). This high sensitivity to fludioxonil was also observed for *S. prolificans*, *S. aurantiacum* and *Pseudallescheria boydii* (data not shown).

We next searched the genomes of all species tested in Figs. 1 and 4 for TcsC homologs using BlastP. In case that a genome sequence was not available, we analyzed a closely related species. All these genomes contained one protein with high homology to TcsC (Table 1). The most striking differences were observed for the

644

A. Wiedemann et al. / International Journal of Medical Microbiology 306 (2016) 642–651



**Fig. 2.** Impact of iprodione on *A. terreus*. Panel A shows a disk diffusion assay with *A. terreus* strain NIH 2624 and a disk containing 125 µg iprodione. Panel B to D show *A. terreus* germlings treated with 25 µg/ml iprodione for 9 h. An immunofluorescence analysis using the galactomannan-specific antibody L10-1 and a DAPI staining are shown in C and D, respectively. Panel B shows an overlay of C, D and a bright field image.

**Table 1**

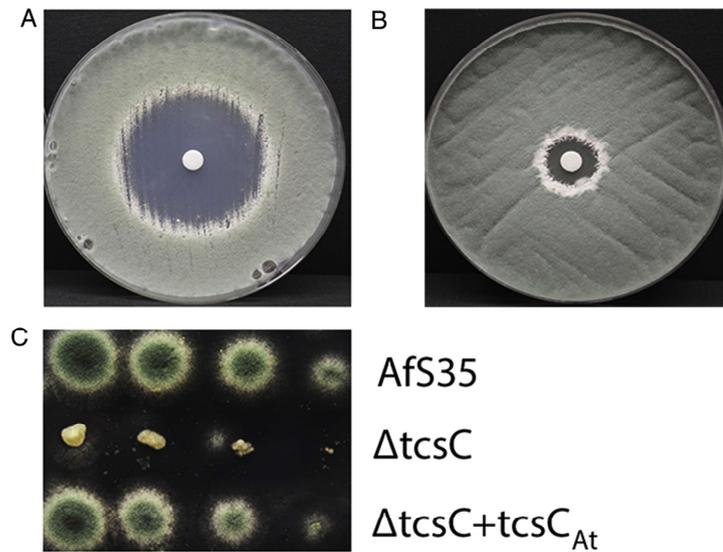
TcsC homologous proteins in molds showing sensitivity to fludioxonil and/or iprodione. The number of HAMP domains was predicted using the SMART algorithm. The percentage of identical amino acids to *A. fumigatus* TcsC was determined using MUSCLE.

Species	Accession number	Number of HAMP domains	Number of amino acids	Identity in%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Afu2g03560	6	1337	100.0
<i>Aspergillus terreus</i>	CCM66045	6	1348	91.2
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOXb.17386	6	1293	68.9
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CDH49117	11	1681	51.2
<i>Rhizopus irregularis</i>	ESA18659.1	9	1555	53.4
<i>Mucor circinelloides</i>	HMPREF1544_08225	7	1141	54.9
<i>Scedosporium apiospermum</i>	KEZ44374	6	1288	67.1

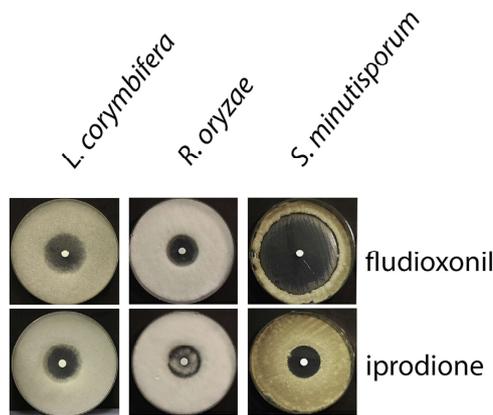
N-terminal sensing modules that, according to the SMART algorithm, contained 6 to 11 HAMP domains.

In the following experiments, we used *A. fumigatus* as a model organism to study the impact of fludioxonil in more detail. At

the beginning of this study, it was already known that fludioxonil causes a massive swelling of hyphal cells, which may eventually culminate in lysis (McCormick et al., 2012). To analyze whether such a treatment finally results in a quantitative killing, we culti-



**Fig. 3.** Expression of the *A. terreus tcsC* in an *A. fumigatus*  $\Delta tcsC$  mutant. Expression of *A. terreus tcsC* ( $tcsC_{At}$ ) restored sensitivity to fludioxonil and iprodione (panels A and B, respectively). Disks contained 5  $\mu\text{g}$  fludioxonil and 125  $\mu\text{g}$  iprodione. Panel C shows a drop dilution assay on an AMM plate containing 1.2 M sorbitol. Afs35 is the parental strain of the  $\Delta tcsC$  mutant.



**Fig. 4.** Impact of fludioxonil (5  $\mu\text{g}$  per disk) and iprodione (125  $\mu\text{g}$  per disk) on growth of *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus oryzae* and *Scedosporium minutisporum*. Plates were incubated at 30 °C.

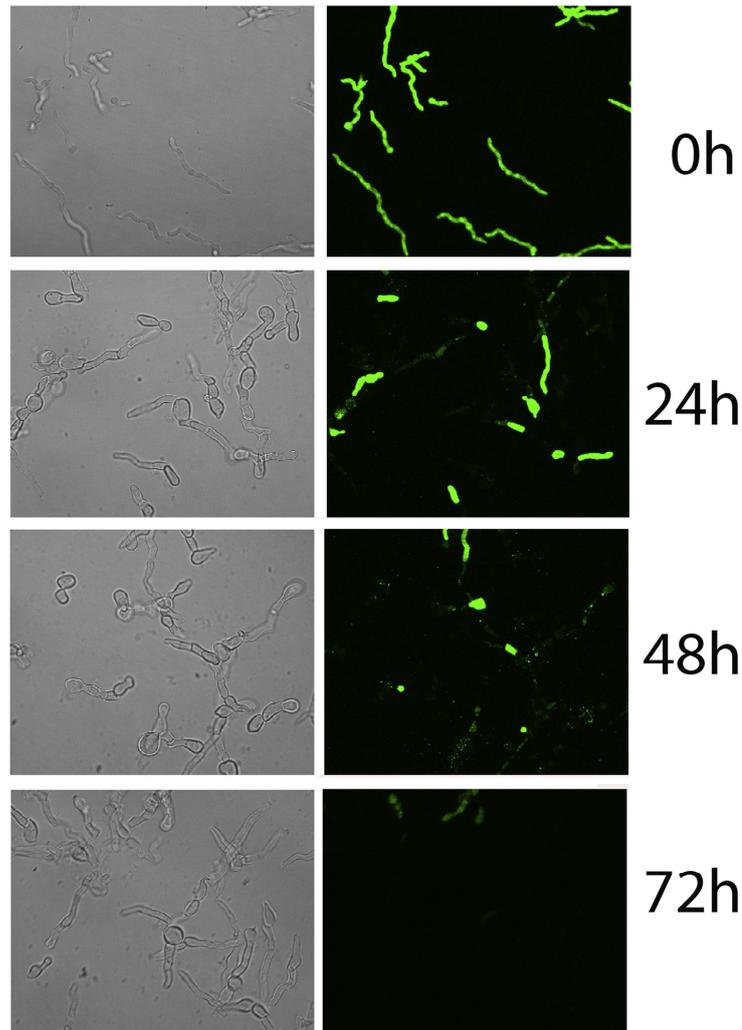
vated *A. fumigatus* in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fludioxonil for several days. To directly visualize lysis, we used a strain expressing cytosolic GFP. After 72 h, most hyphal compartments were completely lysed and the weak GFP signals found in few compartments indicate substantial membrane damage (Fig. 5). This demonstrates that fludioxonil treatment can result in a quantitative lysis of *A. fumigatus* hyphae, at least under *in vitro* conditions.

Time lapsed microscopy revealed that the earliest response of *A. fumigatus* hyphae to fludioxonil is an immediate halt of the hyphal elongation (Fig. 6). This growth arrest clearly precedes the swelling and lasts as long as fludioxonil is present (Fig. 6 and data

not shown). To analyze whether this growth inhibition reflects a disorganization of the whole cellular machinery, we treated an *A. fumigatus* strain in which mitochondria are labelled by targeted GFP expression. After treatment with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fludioxonil for 8 h, hyphae were analyzed by live cell imaging. Video S1 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005> demonstrates that the dramatically swollen compartments retained a dynamic mitochondrial network until lysis.

We have previously reported that fludioxonil triggers an increase in the number of nuclei per compartment (McCormick et al., 2012). To visualize nuclei in *A. fumigatus*, we constructed a strain expressing a GFP fused to the C-terminal 156 amino acids of the StuA protein (Afu2g07900). As previously described for *A. nidulans* (Suelmann et al., 1997), this fusion protein accumulates in the nucleus during interphase, but translocates to the cytoplasm during mitosis (data not shown). Live cell imaging of an *A. fumigatus* strain expressing GFP-StuA<sub>NLS</sub> demonstrated that early after addition of fludioxonil, the nuclei were arranged in a regular pattern along the central hyphal axis (data not shown), but this orderly pattern dissolved after 90 min (Video S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). In normal hyphae, mitosis is tightly controlled and restricted to the apical compartments (Shen et al., 2014), but in fludioxonil-treated hyphae, mitosis occurred in all compartments (Video S2 and data not shown in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>).

*A. fumigatus* hyphae treated with fludioxonil for 6 h or longer contain increased numbers of nuclei and possess more septa than normal. Septum formation is a tightly controlled process and linked to mitosis. It was shown in *A. nidulans* that before mitosis occurs, apical compartments transiently close their septal pores to disconnect themselves from the rest of the hypha. This is accompanied by a re-localization of the kinase NimA from the septal pore to the nuclei (Shen et al., 2014). When expressed in *A. fumigatus* hyphae, NimA-GFP was found in patches in the central part of the septal cross wall (Fig. 7B). In fludioxonil-treated hyphae this distinct

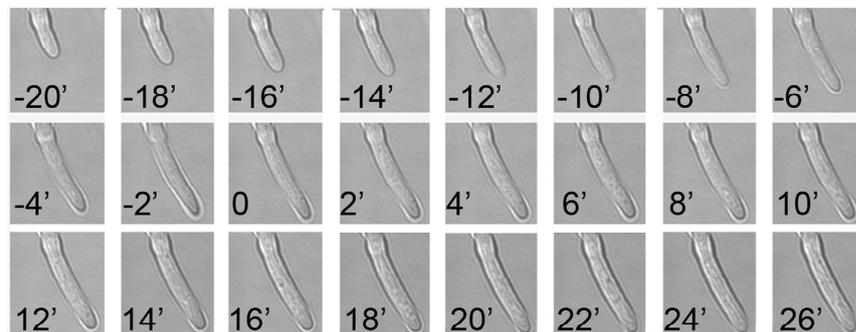


**Fig. 5.** Fludioxonil treatment leads to a quantitative lysis. *A. fumigatus* hyphae expressing cytosolic GFP were treated with fludioxonil (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for up to 72 h. At time point zero, all hyphae showed a strong and homogenous GFP fluorescence. After 72 h, only weak fluorescence was still detectable in few compartments. Bright field images show the characteristic swelling and damage of hyphae due to fludioxonil treatment.

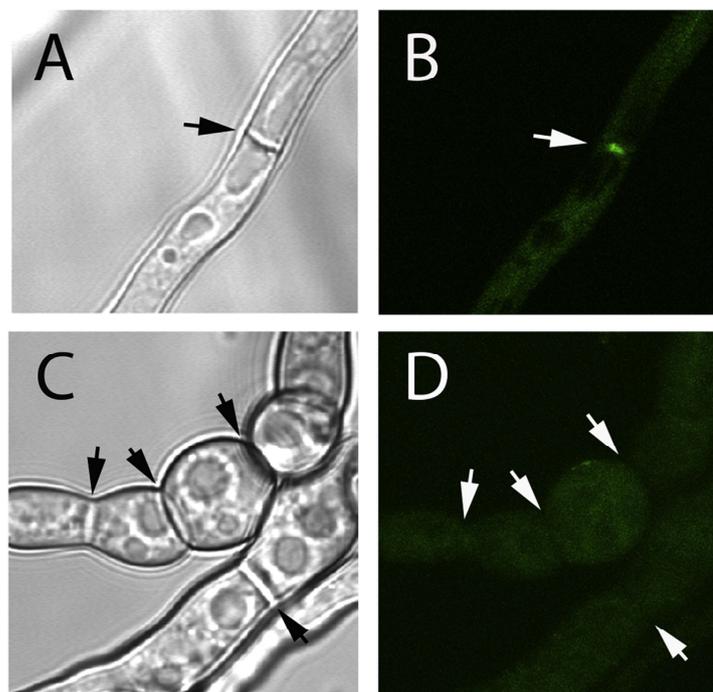
localization of NimA-GFP was no longer detectable (Fig. 7D), which suggests that these septal pores have been closed. FRAP analysis of an *A. fumigatus* strain expressing cytosolic GFP confirmed this: After 6 h of fludioxonil treatment 24 out of 25 septa were closed, whereas in control hyphae 21 out of 25 septa were open.

The fungal cell wall is a highly dynamic entity that responds to different types of stress often by a structural reorganization (Dichtl et al., 2016). The swelling induced by fludioxonil applies a physical stress to the cell wall. To investigate the consequences, we analyzed *A. fumigatus* hyphae treated with 1  $\mu\text{g/ml}$  fludioxonil for 10 h. Calcofluor white staining revealed that the chitin levels

in fludioxonil-treated hyphae are clearly higher than in the corresponding controls (Suppl. Fig. S4 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). A parallel staining for galactomannan revealed an even more striking effect: In normal hyphae, galactomannan is homogeneously distributed over the surface (Fig. 8, 0 h), but 6 h after addition of fludioxonil, only weak galactomannan-specific signals were left and their distribution on the hyphal surface changed to a speckled pattern (Fig. 8). At this time, many small, galactomannan-positive spots appeared as a kind of halo around the hyphae (Fig. 8, 6–10 h) suggesting that swollen, fludioxonil-treated hyphae shed large quantities of their galac-



**Fig. 6.** Fludioxonil induces an immediate growth arrest in *A. fumigatus* hyphae. The tip of a representative hypha is followed by live cell microscopy. Images were taken every two minutes before and after addition of 1  $\mu\text{g/ml}$  fludioxonil (time point 0). Note that the hyphal growth stops immediately and remains in an arrested state until the end of the experiment.

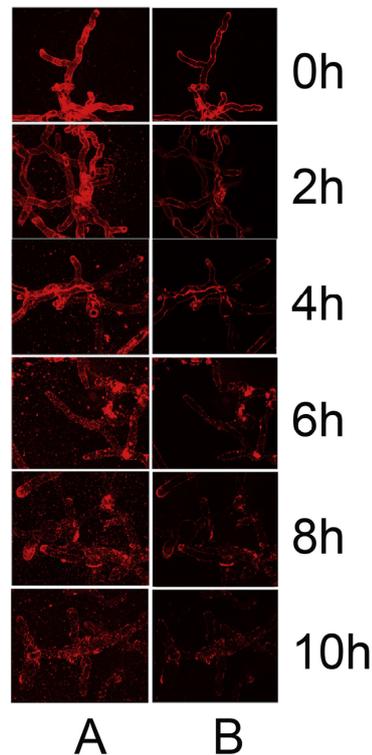


**Fig. 7.** Localisation of NimA-GFP. Fluorescence micrographs of control hyphae and hyphae treated with 1  $\mu\text{g/ml}$  fludioxonil for 8 h are shown in panel B and D, respectively. The corresponding bright field images are depicted in A and C. The positions of septa are indicated by arrows.

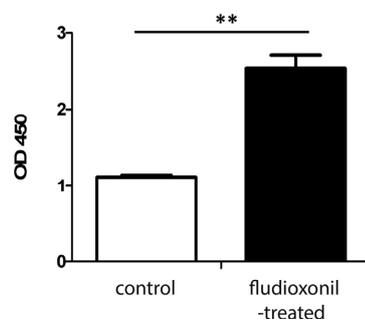
tomannan antigen. To investigate this further, we quantified the amounts of galactomannan in culture supernatants. Fig. 9 shows that fludioxonil-treatment indeed results in an increased release of galactomannan. This shedding of galactomannan in response to fludioxonil or iprodione is not specific for *A. fumigatus*, but was also observed with other *Aspergillus* species including *A. terreus* treated with iprodione (Fig. 2C and data not shown).

### 3. Discussion

The outcome of invasive fungal infections is often poor, due to suboptimal diagnostics, limited therapeutic options, increasing resistance to azoles and breakthrough infections caused by intrinsically resistant fungi (Kontoyiannis and Lewis, 2014; Shor and Chauhan, 2015). New therapeutic options are therefore clearly



**Fig. 8.** Fludioxonil treatment results in a loss of surface accessible galactomannan. Hyphae of *A. fumigatus* were treated with fludioxonil (1 µg/ml) for the times indicated. Galactomannan was subsequently stained using monoclonal antibody L10-1. Column A shows maximum projections of confocal stacks, column B shows corresponding single optical planes.



**Fig. 9.** Release of galactomannan induced by fludioxonil. Hyphae of *A. fumigatus* strain D141 were grown overnight at 30 °C. Three wells were treated with 2 µg/ml fludioxonil. The supernatants of the controls were harvested at time point zero, whereas the other supernatants were collected 24 h after addition of fludioxonil. Standard deviations are indicated. \*\*: p-value = 0.001.

required and should ideally be safe, efficient and suitable for treatment of a broad range of fungal pathogens.

Substances that activate the HOG-pathway are known for some time, but so far their use is limited to the treatment of certain fungal infections in plants. These agents target type III HHK, which are found in many fungi including molds (Defosse et al., 2015). The absence of homologous proteins in humans and other mammals and the fact that biochemically diverse agents, like fludioxonil and iprodione, activate type III HHK, should facilitate an identification of compounds that lack severe side effects (Shor and Chauhan, 2015). In light of the actual problems in antifungal therapy, HOG-activating agents are therefore an interesting option that is worth being considered.

The sole type III HHKs of *A. nidulans* and *A. fumigatus* have been designated NikA and TcsC, respectively and deletions of the corresponding genes resulted in complete resistance to fludioxonil and iprodione (Hagiwara et al., 2007, 2013; McCormick et al., 2012). In this study, we show that fludioxonil has a similar antifungal effect on *A. niger*, *A. oryzae* and *A. flavus*, but not on *A. terreus*. The striking resistance of *A. terreus* is of clinical importance, since *A. terreus* is the second most relevant pathogen of the genus *Aspergillus* and often shows a poor response to common antifungal therapies (Pastor and Guarro, 2014). The data base entry of the TcsC protein of *A. terreus* suggested a truncated protein, but re-sequencing of the corresponding gene revealed a gene that is likely to encode a fully functional type III HHK. This was corroborated by two facts: (i) *A. terreus* can well adapt to high osmotic conditions and (ii) iprodione treatment causes the same phenotype as in *A. fumigatus*. Based on these data we assumed that the TcsC kinase of *A. terreus* is functional and in order to test this, we expressed the *A. terreus* gene in an *A. fumigatus*  $\Delta tcsC$  mutant. The resulting strain regained its ability to grow under high osmotic conditions and showed sensitivity to iprodione and fludioxonil, a phenotype that clearly differs from the fludioxonil resistance of the *A. terreus* wild type. This may be due to the fact that *A. terreus* *tcsC* is expressed in *A. fumigatus* using the relatively strong *gpdA* promoter. However, other differences between *A. terreus* and *A. fumigatus* may exist and be responsible for the different sensitivity to fludioxonil, for example a reduced uptake or a faster efflux of fludioxonil in *A. terreus*. In this context it is remarkable that *A. terreus* showed a limited sensitivity to fludioxonil, but only in the initial growth phase. This transient inhibition points to an adaptation process that can result in full resistance, e.g. by the activation of efflux pumps. The fact that iprodione inhibits growth and causes lysis of *A. terreus* hyphae indicates that the resistance mechanism operating in this organism is able to neutralize fludioxonil, but not iprodione. This may be due to biochemical differences between both compounds. The sensitivity of *A. terreus* to iprodione demonstrates that activation of type III HHK is a strategy that can, in principle, also be employed to combat *A. terreus*.

Fludioxonil and/or iprodione have been shown to be active against *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* (Ochiai et al., 2001; Hagiwara et al., 2007) as well as plant-pathogens like *Fusarium oxysporum* (Rispaill and Di Pietro, 2010). Similar effects have been reported for the human pathogens *Candida albicans* (Ochiai et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (Kojima et al., 2006) and *A. fumigatus* (McCormick et al., 2012). Non-*Aspergillus* molds, like *Lichtheimia*, *Rhizopus*, *Fusarium* and *Scedosporium*, are emerging pathogens with an increasing clinical relevance (Douglas et al., 2016). In this study, we demonstrate that *Lichtheimia*, *Rhizopus* and *Scedosporium* are also sensitive to fludioxonil and iprodione. For all *Scedosporium* strains tested, fludioxonil treatment resulted in unusually large inhibition zones. This is remarkable, since the rare, but severe infections caused by these pathogens are particularly difficult to treat. Thus, HOG-activating agents show antifungal activity against a broad spectrum of pathogenic molds, which often pose a challenge for therapy.

It has been known for some time that agents that activate type III HHKs cause a dramatic swelling due to a dysregulation of the internal osmotic pressure (Okada et al., 2005). In *A. fumigatus*, the resulting swollen compartments contain unusually large numbers of nuclei (McCormick et al., 2010) indicating that HOG-activating agents have an impact on several aspects of the fungal biology. In this study, we used *A. fumigatus* as a model organism to further investigate the cell biological consequences of the fludioxonil-mediated activation of TcsC. In normal hyphae, nuclei are positioned in a regular array along the central hyphal axis, but after fludioxonil treatment, this order becomes distorted and the nuclei form clusters and move within the cytosol. In normal hyphae, mitosis is restricted to the apical compartments and takes place only if a critical volume has been reached (Fiddy and Trinci, 1976). After fludioxonil treatment, mitosis took place in all hyphal compartments and this was accompanied by a closure of most septal pores. Consistently, we found that in fludioxonil-treated hyphae, the NimA protein is, no longer found at the septum during interphase, where this kinase is normally positioned to keep the septal pore open (Shen et al., 2014). Apparently, the tight control mechanisms that govern mitosis in normal hyphae no longer operate in fludioxonil-treated cells. However, septation and mitosis are still coupled, since mitosis was regularly followed by the formation of a new septum leading to the highly fragmented, swollen hyphae that are characteristically found after fludioxonil-treatment. In these hyphae, most septal pores are closed, resulting in compartments that are no longer controlled by mechanisms normally maintaining a coordinated hyphal organization.

Strikingly, fludioxonil or iprodione cause an immediate growth arrest that clearly precedes the cellular swelling and depends on TcsC. The resulting paralyzed hyphae remain viable and show normal mitochondrial dynamics until lysis. Thus, agents that activate TcsC have an immediate fungistatic effect. Moreover, after longer exposure they are also able to cause a nearly complete lysis. In the few compartments that retained their GFP fluorescence, the signals were much weaker than in control hyphae, indicating that these cells were also damaged. It will be interesting to test whether the remaining swollen cells are more prone to an attack by the host immune system.

A pharmacological activation of type III HHK triggers the HOG pathway, which in turn activates enzymes that produce glycerol and thereby increase the internal osmotic pressure. This results in an influx of water, a cellular swelling and consequently an expansion of the cell wall. Yeasts and fungi usually respond to such a mechanical stress with an enhanced incorporation of chitin into their cell wall (Popolo et al., 1997; Ram et al., 2004). Calcofluor white staining of fludioxonil-treated *A. fumigatus* hyphae provided evidence for such an enhanced chitin incorporation. Unexpectedly, we also observed a simultaneous release of galactomannan. Interestingly, we have recently observed a similar phenotype for an *A. fumigatus* *fls1* mutant lacking the major cell wall component  $\beta$ -1,3 glucan (Dichtl et al., 2015). HOG-activating agents and the absence of  $\beta$ -1,3 glucan both weaken the cell wall and result in frequent lysis. In this situation, shedding of galactomannan may somehow stabilize the expanded cell wall and thereby provide an advantage for the fungus. Hence, our data demonstrate that activators of type III HHK represent an attractive therapeutic option to combat mold infections and may also be instrumental to establish a more sensitive galactomannan-based diagnostics of *Aspergillus* infections.

#### 4. Material and methods

##### 4.1. Media and strains

The following strains were used in this study: *A. fumigatus* wild type strain D141, *A. niger* DSM 737, *A. nidulans* FGSC A26,

the *A. terreus* strains NIH2624, SBUG844 and T9 (kindly provided by Matthias Brock (Nottingham) and Cornelia Lass-Flörl (Innsbruck)), *Lichtheimia corymbifera* (ATCC 46771), *Rhizopus oryzae* (DSM 1185), *Pseudoallescheria boydii* (strain 01-0715), *Scedosporium minutisporum* (strain 01-0564), *S. aurantiacum* (strain 07-0433), *S. apiospermum* (strain 08-0118.01) and *S. prolificans* (strain 95-1482/D361) (kindly provided by Kathrin Tintelnot (Berlin) and Kerstin Voigt (Jena)). The  $\Delta$ tcsC mutant, the parental strain AFS35, the corresponding complemented strain and the *A. fumigatus* strains expressing cytosolic GFP and GFP with a mitochondrial targeting sequence (mitoGFP) have been described previously (McCormick et al., 2010, 2012).

For isolation of conidia, *A. fumigatus* was grown on Aspergillus Minimal Medium (AMM) agar in tissue culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Conidia were harvested using glass beads and sterile water. All other fungi were grown on Sabouraud agar. Conidial suspensions were passed through two layers of Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany) to remove debris and larger fungal fragments and the spore concentration was determined using a Neubauer chamber.

##### 4.2. Sequence analysis

Sequence alignments were performed using MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>). Protein domains were predicted using SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Localization of proteins was analyzed using WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>). The genome data base of *Aspergillus terreus* was analyzed at [http://fungi.ensembl.org/Aspergillus\\_terreus/Info/Index](http://fungi.ensembl.org/Aspergillus_terreus/Info/Index).

##### 4.3. Disk diffusion assay

The desired number of conidia was homogeneously spread on a Sabouraud plate on which one or more paper disks were placed containing the indicated amounts of fludioxonil or iprodione (dissolved in either ethanol or DMSO). Plates were incubated at the indicated temperature until a clear inhibition zone became visible.

##### 4.4. Expression of the GFP fusion proteins

We used WoLF PSORT to predict the minimal C-terminal motif of StuA (Afu2g07900) that is able to target GFP to the nucleus. This motif was identified as the C-terminal 156 amino acids of StuA. The corresponding fragment was amplified from chromosomal DNA using the Q5 High Fidelity Polymerase (New England Biolabs) and the primers GFP-StuA-FOR (GATGCCTACACCTACACCA) and GFP-StuA-REV (TCATCGACGACGAGGCAT). The resulting blunt-end fragment was subsequently cloned into the EcoRV site of pSK379sGFP. To generate a NimA-GFP fusion, the *nimA* gene (Afu6g02670) was amplified from chromosomal DNA of *A. fumigatus* strain D141 using the Q5 High Fidelity Polymerase and the primer combination NimA-FOR (ATGGCAATTGCTTTGCTGAGG) and NimA-REV (TCCCTGAAGTTTCGAATGACCT). The resulting blunt-end fragment was subsequently cloned into the *PmeI* site of pSK379sGFP. The resulting plasmids were verified by sequencing and then used for transformation of protoplasts of *A. fumigatus* strain AFS35.

##### 4.5. Expression of the *A. terreus* *tcsC* gene in an *A. fumigatus* $\Delta$ tcsC mutant

The *tcsC* gene was amplified from chromosomal DNA of *A. terreus* NIH2624 using the Q5 High Fidelity Polymerase

and the primer combination At-tcsC-FOR (ATGGCTGGCGCGGAC-GAAACGCTCGCG) and At-tcsC-REV (TTAGCGGAAGGGCGTGTG-CGGTTTACCCTCT). The PCR product was then cloned into the *PmeI* site of pSK379 (kindly provided by Sven Krappmann, Erlangen). The resulting plasmid was verified by sequencing and then used for transformation of protoplasts of *A. fumigatus* strain AFS35. The chromosomal *tcsC* gene of the resulting strain was subsequently deleted as described previously (McCormick et al., 2012).

#### 4.6. Immunofluorescence and live cell imaging

Hyphae were grown on glass cover slips in AMM. Samples were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS for 5 min, washed and subsequently incubated with the galactomannan-specific monoclonal antibody L10-1 (Heesemann et al., 2011) for 30 min at 37°. Cover slips were then washed three times with PBS and subsequently incubated with a Cy3-labelled anti-mouse antibody (Dianova, Hamburg, Germany). To stain the cell wall for chitin, samples were incubated for 1 min with 1 mg/ml Calcofluor white (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) at RT. All samples were finally mounted with medium with or without DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were taken using a Leica SP-5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For live cell imaging, conidia were inoculated in 8-well ibidi-chambers or 60  $\mu$ -dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) containing AMM. Germ tubes were generated by overnight incubation at 30° C. Fungi were then further grown at 37° C to the desired length and samples were analyzed using a Leica SP-5 microscope equipped with an environmental chamber adjusted to 37° C (Leica Microsystems). For live cell imaging, HOG-activating agents were always dissolved in ethanol.

#### 4.7. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Hyphae of the AFS35 strain expressing cytosolic GFP were grown overnight at 30° C in 60  $\mu$ -dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Germany). The resulting short hyphae were treated for 8 h with fludioxonil (2  $\mu$ g/ml). A central region in the swollen compartments was then bleached using an excitation wave length of 488 nm until the whole compartment completely lost its fluorescence. If neighbouring compartments retained their fluorescence, the respective septum was classified as closed; a loss of fluorescence in a neighbouring compartment indicated an open septum.

#### 4.8. Detection of galactomannan in culture supernatants

Wells of a 24 well plate containing 1 ml AMM each were inoculated with  $1.3 \times 10^5$  conidia of *A. fumigatus* strain D141 and grown overnight at 30° C. On the next day (time point zero) three wells were supplemented with 2  $\mu$ g/ml fludioxonil and further incubated for another 24 h at 37° C. Supernatants of these wells and of three control wells (taken at time point zero) were analyzed for galactomannan in a sandwich ELISA as described previously (Wiedemann et al., 2016). In brief, the galactomannan-specific monoclonal antibody L10-1 was coated to the surface of an ELISA well (Greiner bio-one high binding plate, Frickenhausen, Germany) and the EB-A2 conjugate from the Aspergillus Platelia Kit (BIORAD, Marnes-la-Coquette, France) was used for detection. The statistical significance was analyzed using an unpaired Student's *t*-test (<http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/t-test>).

#### Acknowledgements

We thank Kirsten Niebuhr-Ebel for critical reading of the manuscript. Strains were kindly provided by Mathias Brock (Uni-

versity of Nottingham), Cornelia Lass-Flörl (Medical University of Innsbruck), Kathrin Tintelnot (Robert-Koch-Institute, Berlin) and Kerstin Voigt (University of Jena). This work was supported by the German Center for Infection Research (DZIF) and a grant of the Brigitte und Wolfram Gedek Stiftung.

#### References

- Azevedo, M.M., Faria-Ramos, I., Cruz, L.C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., 2015. Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7463–7468.
- Bahn, Y.S., 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot. Cell* 7, 2017–2036.
- Cortez, K.J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottlitz, S., Walsh, T.J., 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 157–197.
- Defosse, T.A., Sharma, A., Mondal, A.K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., Papon, N., 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 95, 914–924.
- Dichtl, K., Samantaray, S., Amanianda, V., Zhu, Z., Prévost, M.C., Latgé, J.P., Ebel, F., Wagener, J., 2015. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall  $\beta$ -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol. Microbiol.* 95, 458–471.
- Dichtl, K., Samantaray, S., Wagener, J., 2016. Cell wall integrity signaling in human pathogenic fungi. *Cell. Microbiol.* 18, 1228–1238.
- Douglas, A.P., Chen, S.C., Slavin, M.A., 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 00027–36, pii: S1198-743X.
- Fiddy, C., Trinci, A.P., 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 97, 169–184.
- Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, T., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Mizuno, T., 2007. Characterization of the NtkA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 844–847.
- Hagiwara, D., Takahashi-Nakaguchi, A., Toyotome, T., Yoshimi, A., Abe, K., Kamei, K., Gono, T., Kawamoto, S., 2013. NtkA/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 8, e80881.
- Heesemann, L., Kotz, A., Echtenacher, B., Broniszewska, M., Routier, F., Hoffmann, P., Ebel, F., 2011. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 523–530.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., Okuno, T., 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53, 1785–1796.
- Kojima, K., Bahn, Y.S., Heitman, J., 2006. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 152, 591–604.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., 2014. Treatment: principles for the management of mold infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, pii: a019737.
- McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 12, 928–936.
- McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2012. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7, e38262.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I., 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag. Sci.* 57, 437–442.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Yamada-Okabe, H., Yamaguchi, I., 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2209–2215.
- Okada, A., Banno, S., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., Fujimura, M., 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *J. Pest. Sci.* 30, 378–383.
- Pastor, F.J., Guarro, J., 2014. Treatment: of *Aspergillus terreus* infections: a clinical problem not yet resolved. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 281–289.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., Vai, M., 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *gpp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 463–469.
- Ram, A.F., Arentshorst, M., Damveld, R.A., vanKuyk, P.A., Klis, F.M., van den Hondel, C.A., 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology* 150, 3315–3326.

- Rispail, N., Di Pietro, A., 2010. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 11, 395–407.
- Shen, K.F., Osmani, A.H., Govindaraghavan, M., Osmani, S.A., 2014. Mitotic regulation of fungal cell-to-cell connectivity through septal pores involves the NIMA kinase. *Mol. Biol. Cell* 25, 763–775.
- Shor, E., Chauhan, N., 2015. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog.* 11, e1004632.
- Suelmann, R., Sievers, N., Fischer, R., 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25, 757–769.
- Wiedemann, A., Kakoschke, T.K., Speth, C., Rambach, G., Ensinger, C., Jensen, H.E., Ebel, F., 2016. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 381–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002>.

## IV. DISKUSSION

Im Jahr 1953 wurde das erste Mal von einem immunsupprimierten Patienten mit invasiver Aspergillose berichtet (RANKIN, 1953). Dies traf zusammen mit der Einführung von Kortikosteroiden und cytotoxischen Chemotherapeutika in die medizinische Praxis und auch heute gilt der medizinische Fortschritt und das sich durch ihn erweiternde Spektrum an Patienten mit geschwächtem Immunsystem als ein wesentlicher Grund für die Zunahme invasiver Mykosen (LIN et al., 2001). Schimmelpilze werden deshalb zu den *emerging pathogens* gezählt (NUCCI & MARR, 2005). Die Mortalität ist weiterhin sehr hoch und liegt in Bereichen zwischen 50-90 % (KOUSHA et al., 2011). Zu dieser hohen Todesrate kommt es durch Defizite sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie. Zum einen fehlen sichere Tests für die schnelle und genaue Differenzierung von Schimmelpilzen. Zum anderen sind nur wenige Antimykotika auf dem Markt, die noch dazu z.T. eine sehr unterschiedliche und eingeschränkte Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Schimmelpilzen aufweisen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurden monoklonale Antikörper gegen Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze hergestellt. Dadurch konnte der AB135-8 Antikörper generiert werden, dessen Antigen eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung eines *Fusarium* spezifischen serologischen Assays darstellt. Im zweiten Teil wurden Substanzen, wie Fludioxonil und Iprodione, die den HOG Signalweg aktivieren, dahingehend untersucht, ob sie der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen Schimmelpilzinfektionen dienen können.

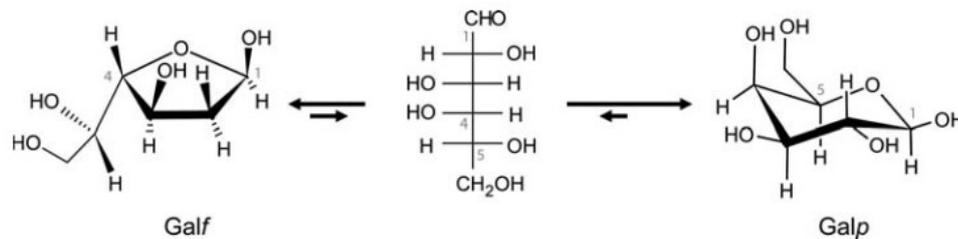
### 1. Der AB135-8-Antikörper und sein Antigen

#### 1.1 $\beta$ -Galaktofuranose und seine Bedeutung als Antigenbestandteil

Die pilzliche Zellwand stellt ca. 20 % der Trockenmasse des Pilzes dar (FRANCOIS, 2006). Sie spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Zellteilung und schützt vor mechanischen oder physikalisch-chemischen Einflüssen (FRANCOIS, 2006). Bei Pilzen sind drei Polysaccharide in der Zellwand vorherrschend: Mannose (Mannan/Mannoproteine), Glukose ( $\beta$ -1,3/1,6-Glukan) und N-Acetylgalactosamine (Chitin) (FRANCOIS, 2006). Bei

*Aspergillus* spielt noch ein viertes Polysaccharid eine wichtige Rolle, das Galaktomannan, das sich aus  $\alpha$ -1,2/1,6-Mannan und kurzen  $\beta$ -1,5-Galaktofuranose-Seitenketten zusammensetzt (LATGÉ et al., 1994).

Als Galaktofuranose (Galf) bezeichnet man die Furanoseform der Galaktose und mit  $\alpha$  oder  $\beta$  wird die Stellung der Hydroxygruppe an C1 bezeichnet. Sie unterscheidet sich von der Pyranoseform der Galaktose (Galp), die im Gegensatz zum Fünfring der Furanose einen Sechsring enthält (TEFSEN et al., 2012).

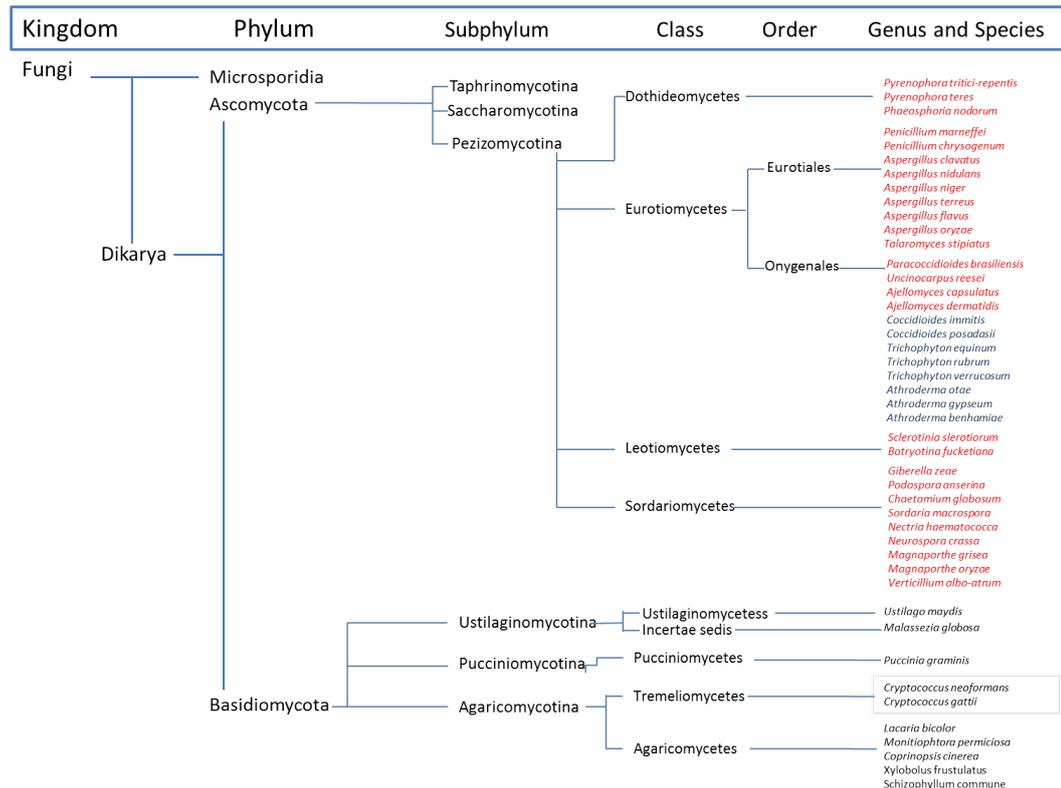


### Abbildung 10: Strukturformel von Galf und Galp

In wässrigen Lösungen besteht ein Gleichgewicht zwischen den cyclischen Formen der Galaktose sowie der linearen Form der Galaktose. Anhand der Pfeile sieht man, dass die Galp-Form vorherrschend ist. Die C-Atome sind mit Nummern markiert. Modifiziert nach (TEFSEN et al., 2012)

In Säugetieren kommt Galaktose ausschließlich als Galp vor, wohingegen sie in Mikroorganismen wie z.B. bestimmten Protozoen, Bakterien und Pilzen in beiden Formen vorliegen kann (CHLUBNOVÁ et al., 2010). Galf hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da es bei mehreren pathogenen Erregern eine wichtige Rolle spielt. In *Mycobacterium tuberculosis* ist Galf Bestandteil der Zellwand und dessen Synthese ist essentiell für das Überleben der Mykobakterien (RICHARDS & LOWARY, 2009). Bei *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* enthalten Lipopolysaccharide  $\beta$ -Galf-Antigene. Außerdem findet sich Galf in den Glykokonjugaten des Erregers der Chagas Krankheit, *Trypanosoma cruzi* (RICHARDS & LOWARY, 2009). Bei *Leishmania major* ist zudem bekannt, dass Stämme, die Galf enthalten, weniger virulent sind als andere, da Galf als immunogenes Antigen die Immunantwort verstärkt (RICHARDS & LOWARY, 2009). Galf ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus* spp. sondern vieler Pilze und auch in von diesen sekretierten bzw. freigesetzten Molekülen vorhanden (TEFSEN et al., 2012). Prinzipiell ähneln sich

die Polysaccharidstrukturen unter den Pilzen, sie zeigen aber auch Spezies-spezifische Unterschiede. Alle Pilze, die der Gruppe der Pezizomycotina aus dem Stamm der Ascomyceten angehören, besitzen prinzipiell die für die Galf-Synthese und den Transport wichtigen Gene. In vielen Pilzen konnte man Galf aber auch direkt nachweisen, darunter auch in Basidiomyceten wie *Cryptococcus neoformans* (TEFSEN et al., 2012).



**Abbildung 11: Vorkommen von Galf-synthetisierenden Genen im Reich der Pilze**

Die Galf-synthetisierenden Gene, *glfA* und *glfB*, sind in den verschiedenen Pilzen entweder benachbart (rot), liegen nahe beieinander (blau) oder sind auf den Chromosomen deutlich voneinander entfernt (schwarz), modifiziert nach Tefsen (TEFSEN et al., 2012)

Dass Galf nicht nur Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus* ist, sondern auch während der Infektion freigesetzt wird, macht man sich diagnostisch zu Nutze. Mithilfe des Rattenantikörpers EB-A2 aus dem kommerziell erhältlichen Platelia-EIA kann man die  $\beta$ -1,5-verknüpften Galaktofuranose-Seitenketten des Galaktomannans in Patienten mit IA nachweisen (MARR et al., 2004). Galf spielt

somit bereits eine wichtige Rolle als Antigen in der serologischen *Aspergillus*-Diagnostik.

Galf ist nach unseren Ergebnissen auch ein Teil des AB135-8-Antigens von *Fusarium*. Den ersten Hinweis in diese Richtung gab uns die IgM-Subklasse des AB135-8-Antikörpers, denn diese Immunglobulinklasse erkennt vorzugsweise Zuckerantigene. Zudem ist das AB135-8-Antigen resistent gegenüber einer Proteinase-K-Verdau, weshalb ein Protein als zugrundeliegendes Antigen ausgeschlossen werden konnte. Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Antigen um eine Polysaccharidstruktur handelt, wurden die Hyphen einer Perjodatbehandlung unterzogen, welche die Oxidation von Zuckerstrukturen bewirkt. Die Perjodatbehandlung konnte das AB135-8-Antigen zerstören, was stark in Richtung eines Kohlenhydratantigens wies. Kohlenhydratantigene bestehen meist aus mehreren Zuckern und der essentielle Teil der Antigenstruktur entsteht durch die unterschiedliche Zusammensetzung und die verschiedenen Bindungstypen der Zucker miteinander. Der AB135-8 zeigt neben *Fusarium* auch eine schwache Reaktivität mit *A. fumigatus* sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im ELISA, diese fehlt aber bei einer *A. fumigatus* Mutante, die kein Galf enthält. Galf muss somit ein wichtiger Bestandteil des AB135-8-Antigens sein. Eine Analyse mit BLASTp zeigte zudem, dass *Fusarium* auch die für die Synthese und den Transport von Galf benötigten Gene besitzt (WIEDEMANN et al., 2016). Bisher gibt es nur wenige Informationen über extrazelluläre Polysaccharide von *Fusarium*, die Galf enthalten. Die bisher identifizierten Strukturen enthielten 1,6- oder 1,2,6-verbundene Galf-Reste (SIDDIQUI & ADAMS, 1961; MIYAZAKI & NAOI, 1975; AHRAZEM et al., 2000) und unterscheiden sich somit vom Galaktomannan aus *Aspergillus*, das sich aus 1,5-Galf-Ketten zusammensetzt (LATGE et al., 1994). Da Galf aber auch Bestandteil der Zellwand vieler Pilze ist, bestand das Risiko, dass der AB135-8-Antikörper neben *Aspergillus* auch Reaktionen mit anderen Pilzen zeigt. Wir haben diesen Antikörper deshalb auf verschiedenen Pilzen getestet. Pilze der Ordnung Mucorales und der Gattung *Scedosporium* treten in den letzten Jahren vermehrt als Erreger invasiver Mykosen auf. Wir konnten zeigen, dass sie weder die Gene für die Synthese und den Transport von Galf besitzen, noch dass es zu einer Kreuzreaktion mit unserem Antikörper kommt (WIEDEMANN et al., 2016). Allerdings konnten wir eine Kreuzreaktion des AB135-8 mit dem Dermatophyt

*T. mentagrophytes* feststellen. Bei diesem Dermatophyt beschränkte sich das Färbemuster aber vor allem auf die Sporenoberfläche und unterscheidet sich damit von dem für *Fusarium* gefundenen, bei dem die gesamte Hyphe und die Mikrokonidien gefärbt werden (WIEDEMANN et al., 2016). Prinzipiell decken sich unsere Ergebnisse der Kreuzreaktivität mit denen von Tefsen *et al.* über das Vorkommen von Genen für die Synthese und den Transport von Galf in anderen Pilzen (TEFSEN et al., 2012). Wir konnten zeigen, dass *Aspergillus* und *Fusarium*, aber auch Dermatophyten, wie *Trichophyton* spp., Galf auf ihrer Oberfläche tragen. Die Verbreitung von Galf und die Verknüpfung der Galf-Monomere scheinen allerdings doch bei unterschiedlichen Pilzen verschieden zu sein. Ein solcher Unterschied kann sich auch wie im Falle von *Aspergillus* und *Fusarium* nur in einer quantitativen Verteilung der verschiedenen Galf-Formen widerspiegeln, denn die von uns gezeigten Kreuzreaktionen mit *Fusarium* im *Aspergillus* EIA und von *Aspergillus* mit dem AB135-8 zeigen, dass beide Galf-Formen bei beiden Pilzen vorkommen und auch freigesetzt werden. Eine Galf-Form scheint aber jeweils charakteristisch und vorherrschend zu sein (WIEDEMANN et al., 2016). Deshalb eignen sich Galf-haltige Antigene bzw. die diese erkennenden Antikörper als Werkzeug für die Diagnostik.

## **1.2 Der AB135-8-Antikörper und sein möglicher Nutzen für die Diagnostik**

*Fusarium* verursacht ein breites Spektrum von Infektionen in immunsupprimierten Patienten und bleibt aufgrund von Resistenzen oft schwer zu behandeln ((NUCCI & ANAISSIE, 2007). Des Weiteren ist die Differenzierung zwischen *Aspergillus* und *Fusarium* aufgrund ähnlicher morphologischer Eigenschaften und möglicher Kreuzreaktionen von *Fusarium* im eigentlich *Aspergillus* spezifischen Platelia-EIA erschwert. Die genaue Identifizierung des Pilzes kann aber auf die Wahl eines geeigneten Therapeutikums einen erheblichen Einfluss haben, da sie teils sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Antimykotika aufweisen (BOUTATI & ANAISSIE, 1997; TINTELNOT, 2013; KEBABCI et al., 2014). Für *Fusarium* sind bislang keine spezifischen Antikörper oder serologische Nachweismethoden verfügbar. Wir konnten zeigen, dass der von uns hergestellte monoklonale Antikörper AB135-8 eine schwache Reaktivität mit *Aspergillus*-Hyphen besitzt, aber eine wesentlich stärkere Bindung an *Fusarium* besteht. Mithilfe dieses Antikörpers und des bereits früher generierten

L10-1-Antikörpers, der *Aspergillus*-Galaktomannan erkennt, besteht dadurch die Möglichkeit in histopathologischen Schnitten zwischen einer *Fusarium*- oder einer *Aspergillus*-Infektion zu unterscheiden (WIEDEMANN et al., 2016). Da die Gewinnung von histopathologischem Material durch Biopsie bei den meist schwerkranken Patienten mit einigen Risiken verbunden ist, wäre es wünschenswert zusätzlich einen serologischen Assay zum Nachweis einer Fusariose zur Hand zu haben (NUCCI & ANAISSIE, 2007). Dies scheint auch prinzipiell möglich, da das AB135-8-Antigen in Kulturüberständen von *Fusarium* nachgewiesen werden konnte und somit davon ausgegangen werden kann, dass es beim Wachstum des Pilzes abgegeben wird (WIEDEMANN et al., 2016). Es ist prinzipiell von Vorteil für einen serologischen Assay, dass es sich bei dem Antigen um einen Zucker und nicht um ein Protein handelt, da diese länger stabil bleiben und auch thermotoleranter sind (HEESEMAN, 2010). Damit der AB135-8 im Capture-ELISA sowohl als Fänger- als auch als Detektionsantikörper eingesetzt werden kann, muss es sich um ein repetitives Antigen handeln. Wir konnten durch verschiedene Filtrationsschritte nachweisen, dass sich das AB135-8-Antigen in den Molekulargewichtsbereichen von 10-100 kDa befindet (eigene bisher unpublizierte Daten), was bei einem Zucker für ein repetitives Antigen spricht. Wir haben deshalb den AB135-8-Antikörper mit *horseradish-peroxidase* (HRP) markiert und anschließend erste Tests im Capture-ELISA-Format durchgeführt. Mit dem AB135-8 sowohl als Capture- als auch als Detektionsantikörper gelang es, das Antigen im Kulturüberstand von *Fusarium* nachzuweisen (eigene unpublizierte Daten). Weitere Untersuchungen vor allem mit Blutproben von *Fusarium*-Patienten müssen für eine endgültige Einschätzung der diagnostischen Anwendbarkeit aber noch folgen. Zudem konnten wir inzwischen noch einen weiteren Antikörper mit ähnlicher Spezifität wie der des AB135-8 generieren. Dies gibt uns die Möglichkeit, unterschiedliche Antikörper als Fänger- und Detektionsantikörper einzusetzen, was zu einer Signalverbesserung führen könnte. Für *Aspergillus* ist bereits ein serologischer Assay (*Platelia-Aspergillus*-EIA von Bio-Rad) kommerziell erhältlich (THORNTON, 2008). Dieser kann das Galaktomannan von *Aspergillus* spp. im Blut, Liquor oder auch BAL-Flüssigkeit von Patienten nachweisen. Er zeigt eine relativ hohe Spezifität und Sensitivität (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Leider wurde trotzdem in den letzten Jahren immer wieder festgestellt, dass es im Falle einer Fusariose zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann (TORTORANO et

al., 2012). Da nicht alle Fusariosen Galaktomannan positiv sind, könnte ein *Fusarium*-spezifischer ELISA eine wichtige Lücke in der Diagnostik schließen, da mithilfe dieser beiden ELISA zwischen einer Fusariose und einer Aspergillose unterschieden werden könnte. Das Problem der mangelnden Differenzierbarkeit könnte damit gelöst werden. Zudem würde ein serologischer Assay viel schneller zu einem Ergebnis führen als zum Beispiel die Kultur oder die histologische Untersuchung. Durch eine schnellere Diagnostik könnte auch die Therapie früher eingeleitet werden, wodurch sich die Heilungschancen verbessern würden.

### 1.3 Impfstoffentwicklung mithilfe des AB135-8-Antikörpers

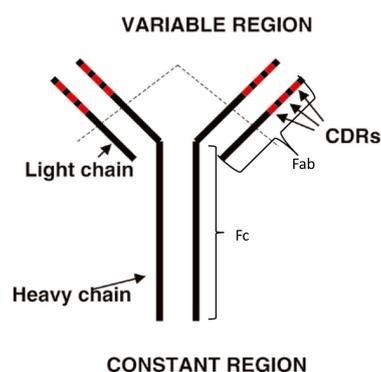
Heutzutage ist man sich der medizinischen Bedrohung durch Pilze sehr bewusst. Da die Therapiemöglichkeiten begrenzt sind und sie die Inzidenz und Letalität der Infektion bisher nicht in ausreichendem Maße verringern können, wurde das Interesse an der Suche nach Impfungen für humanpathogene Pilze wiederbelebt (CASSONE, 2008). Prinzipiell wird bei Impfungen zwischen einer passiven und einer aktiven Immunisierung unterschieden. Bei der aktiven Immunisierung wird dem Körper ein Antigen präsentiert, woraufhin es zu einer aktiven Immunantwort kommt, die Tage bis Wochen benötigt, um sich zu entwickeln, dann aber lange anhält (BAXTER, 2007). Bei der passiven Immunisierung werden dem Körper Antikörper gegen einen Erreger zugeführt. Sie wirkt sofort, hält aber nur wenige Wochen bis Monate an (BAXTER, 2007). Lange Zeit herrschte die Meinung, dass bei den typischerweise stark immunsupprimierten Patienten, die an einer invasiven Mykose leiden, eine protektive Antikörperreaktion durch Impfung nicht zu erreichen ist. Dromer *et al.* konnten aber schon 1987 mit ihrem in Mausexperimenten protektivem monoklonalem Antikörper gegen ein *Cryptococcus-neoformans*-Polysaccharid den Grundstein für die Suche nach Vakzinen gegen Pilzinfektionen legen (CASADEVALL & PIROFSKI, 2007). Torsosantucci *et al.* berichteten, dass die Immunisierung von Nagern mit  $\beta$ -1,3-Glucan gebunden an einen Proteincarrier die Tiere vor einer Infektion mit *Candida albicans* und *A. fumigatus* schützen konnte. Weiterhin konnten sie zeigen, dass der gegen das  $\beta$ -1,3-Glucan-Konjugat gerichtete monoklonale IgG-Antikörper 2G8 im Stande ist, eine Infektion mit *C. albicans*, *A. fumigatus* und *Cryptococcus neoformans* zu verhindern (TOROSANTUCCI *et al.*, 2005). Es gibt allerdings Hinweise, dass die Ig-Subklasse eine wichtige Rolle spielt, denn ein  $\beta$ -1,3-Glucan-spezifischer IgM mAB (1E12), der dieselbe Antigenbindungsstelle

wie der 2G8 besaß, war nicht protektiv und konnte auch pilzliches Wachstum nicht verhindern (TOROSANTUCCI et al., 2009). Heesemann *et al.* haben diese Ergebnisse insofern bestätigt, dass der von ihnen generierte Galaktomannan-IgM-Antikörper L10, der in dieser Arbeit auch zur Differenzierung zwischen *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. genutzt wurde, sich in einem Maus-Infektionsmodell auch als nicht-protektiv erwiesen hat (HEESEMAN et al., 2011). Diese Hypothese wird außerdem durch Ergebnisse von Gazendam *et al.* unterstützt, die gezeigt haben, dass die Fc $\gamma$ -Rezeptorbindungsstellen für IgG-Antikörper eine ausschlaggebende Rolle für die Protektivität spielen. Denn nur eine Opsonierung durch IgG-Antikörper scheint Neutrophilen die Möglichkeit zu bieten, *A. fumigatus*-Hyphen zu erkennen und das Abtöten der Hyphe einzuleiten (GAZENDAM et al., 2016). Dies bedeutet, dass Oberflächenantigene besonders geeignete Zielstrukturen für Antikörper darstellen. Der AB135-8-Antikörper erkennt sowohl ein Oberflächenantigen als auch ein sekretiertes Antigen von *Fusarium* und erfüllt somit die Voraussetzung für Versuche in Richtung aktiver oder auch passiver Immunisierung (WIEDEMANN et al., 2016). Allerdings gehört der AB135-8 der IgM-Subklasse an, weshalb nach dem derzeitigen Wissensstand nicht von einer Protektivität dieses monoklonalen Antikörpers ausgegangen werden kann.

Um aktiv impfen zu können und eine protektive Antikörperreaktion gegen das AB135-8-Antigen provozieren zu können, muss das Antigen prinzipiell noch genauer charakterisiert und vor allem aufgereinigt werden. Nach bisherigen Ergebnissen handelt es sich bei dem Antigen um ein Polysaccharid. Polysaccharide eignen sich aber nur begrenzt für eine Immunisierung, da sie nur eine B-Zell-Aktivierung stimulieren (JANEWAY et al.). Durch diese werden hauptsächlich IgM-Antikörper gebildet, die nur eine geringe Halbwertszeit besitzen und somit auch nicht dauerhaft protektiv sind (GOLDBLATT, 2000). Dieses Problem lässt sich durch die Entwicklung eines Konjugatimpfstoffes lösen, bei dem die Polysaccharide an Proteinträgermoleküle gekoppelt werden (TOROSANTUCCI et al., 2005). Im Gegensatz zu Polysacchariden reagiert der Körper bei Proteinantigenen mit einer starken T-Zell-Antwort und die T-Zellen schütten wichtige Cytokine aus. Mithilfe dieser Cytokine wird u.a. auch der Prozess des Klassenswechsels eingeleitet, wodurch IgG-Antikörper gebildet werden können, die dieselbe Spezifität wie die ursprünglichen IgM-Antikörper

besitzen (JANEWAY et al.). Die IgG-Moleküle helfen ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (GOLDBLATT, 2000). Durch Kombination von Polysaccharid mit einem Trägerprotein, könnte das Problem der mangelnden Immunogenität bzw. der auf IgM beschränkten Immunantwort gelöst werden.

Eine zweite Möglichkeit wäre die passive Immunisierung mit dem AB135-8-Antikörper. Immunsupprimierte Patienten mit dem Risiko der Exposition könnten prophylaktisch behandelt werden oder die Antikörper könnten während einer Infektion therapeutisch eingesetzt werden. Allerdings handelt es sich beim AB135-8-Antikörper um einen IgM-Antikörper, was die Anwendbarkeit bei der passiven Immunisierung stark einschränkt. IgM-Antikörper sind zwar bekannt dafür, dass sie C1q, den Aktivator des klassischen Weges des Komplementsystems, binden und dadurch den Kampf gegen eine Infektion unterstützen können (KOJOUHAROVA et al., 2010). Die Komplementantwort selbst kann filamentöse Pilze aber nicht schädigen. Die kürzlich publizierten Daten von Gazendam et al. zeigen, dass der  $Fc_{\gamma}$ -Rezeptor essentiell für die Aktivität von Neutrophilen ist (GAZENDAM et al., 2016). Da IgM-Moleküle mit diesem Rezeptor nicht interagieren können, ist von einer geringeren Protektivität auszugehen. Inzwischen gäbe es die Möglichkeit dieses Problem zu umgehen. Die Spezifität eines Antikörpers wird durch die *complementary determining region* (CDR) bestimmt, die sich in der *variable region* auf dem Fab-Teil befindet (IRANI et al., 2015).



**Abbildung 12: Struktur eines IgG-Antikörpers**

Fc= Fragment crystallisable, Fab= Fragment antigen-binding, modifiziert nach Isaacs (ISAACS, 2009)

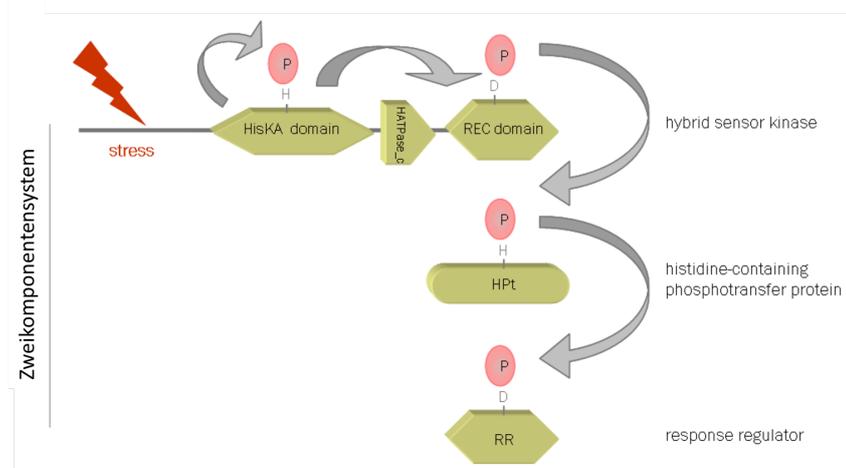
Wenn man die Aminosäuresequenz der CDR kennt, kann man rekombinante Moleküle herstellen, die neben der gewünschten CDR auch noch eine  $Fc_{\gamma}$ -

Bindungsstelle besitzen. Die Opsonierung des Pilzes mit solchen rekombinanten Antikörpermolekülen, könnte dann zu einer Erkennung durch Neutrophile und einer effizienten Bekämpfung des Erregers führen.

## 2. Der HOG-Signalweg als Zielstruktur für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien

### 2.1 Der HOG-Signalweg und die antimykotische Wirkungsweise seiner Aktivatoren

Der HOG-Signalweg dient der Stresswahrnehmung und besteht aus einem Zweikomponentensystem und einem MAPK-Modul (BAHN, 2008). Im Zweikomponentensystem kommt es zunächst zur Autophosphorylierung eines bestimmten Histidinrests der Histidin-Kinase-Domäne (*HisKA domain*). Anschließend wird das Phosphat auf den Aspartatrest in der *regulator-receiver*-Domäne (*REC domain*) der Histidin-Kinase (HK) übertragen (BAHN, 2008). Die Histidin-Kinase-Domäne und die REC-Domäne bilden somit die charakteristischen Elemente einer Hybrid-Histidin-Kinase (HHK). Eine Besonderheit der filamentösen Pilze besteht darin, dass hier im Gegensatz zu den Bakterien beide Elemente auf einem Polypeptid vereint sind (SHOR & CHAUHAN, 2015). Von der REC-Domäne gelangt das Phosphat anschließend zu einem Histidinrest in der *histidine-containing phosphotransfer receiver* Domäne (HPT), um schließlich auf einen Aspartat-Rest des *response regulators* (RR) übertragen zu werden (BAHN, 2008).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Zweikomponentensystems**

Modifiziert nach McCormick (MCCORMICK, 2012)

Zweikomponentensysteme spielen eine wichtige Rolle für die pilzliche Pathogenität, weshalb sie als Zielstruktur für die Entwicklung neuer antimykotischer Therapiekonzepte großes Interesse geweckt haben (SHOR & CHAUHAN, 2015). Insbesondere das Histidin-Kinase-Protein steht als mögliche Zielstruktur im Mittelpunkt des Interesses, aber auch die HPT-Domäne sowie der RR stellen vielversprechende Ansatzpunkte dar, da auch sie in Säugetieren nicht vorkommen (FASSLER & WEST, 2013). Zu den HOG-aktivierenden Substanzen zählen u.a. Fludioxonil, ein Phenylpyrrolderivat, und Iprodione aus der Gruppe der Dicarboximide (FUJIMURA et al., 2000). Diese werden beide bereits als Pflanzenschutzmittel in der Landwirtschaft eingesetzt (YANG et al., 2011). McCormick *et al.* konnten zeigen, dass der antifungale Effekt dieser HOG-aktivierenden Substanzen auf *A. fumigatus* durch die HHK TcsC vermittelt wird, da eine *tcsC*-Deletionsmutante resistent gegenüber Fludioxonil und Iprodione ist (MCCORMICK et al., 2012). Zudem zeigte diese Arbeit, dass beide Substanzen das Wachstum von Keimlingen und Hyphen blockieren können, ohne dabei die Auskeimung von Konidien zu verhindern (MCCORMICK et al., 2012). Ruhende Konidien können sich also nicht der antifungalen Wirkung entziehen, um im Anschluss an die Therapie doch noch auszukeimen. Wir konnten zudem zeigen, dass der Wachstumsstop nach Fludioxonil-Zugabe sofort eintritt (siehe Publikation 2, WIEDEMANN et al.). Fludioxonil hat somit eindeutig fungistatische Eigenschaften. Bei der andauernden Inkubation mit Fludioxonil kommt es zudem zu dramatischen phänotypischen Veränderungen. Die Hyphen schwellen stark an und der Pilz reagiert mit verstärkter Septenbildung und dem Verschluss der Septumporen. Zusätzlich werden auch die Mitose steuernden Kontrollmechanismen durch Fludioxonil aufgehoben und es kommt zur Akkumulation von Zellkernen in der pilzlichen Zelle. Wird allerdings Fludioxonil aus der Umgebung des Pilzes entfernt, stellt sich anschließend wieder ein normales Wachstum ein (MCCORMICK et al., 2012). Mithilfe eines *A. fumigatus*-Stammes, der zytosolisches GFP exprimiert, konnten wir zeigen, dass es nach 72 h unter Fludioxonil-Einfluss zu einer fast alle Hyphen erfassenden Lyse kommt. Auch die wenigen überlebenden Kompartimente haben zu diesem Zeitpunkt bereits eindeutig Schaden genommen, was sich in schwachen GFP Signalen widerspiegelt (siehe Publikation 2, WIEDEMANN et al.). Prinzipiell kann somit von einer fungiziden Wirkung der HOG-aktivierenden Substanzen ausgegangen werden, welche für ein antimykotisches Therapeutikum auch von

Vorteil ist. Ob die starke Schädigung der Hyphen zudem eine Bekämpfung durch das Immunsystem erleichtert und den Pilz angreifbarer macht, sollte in zukünftigen Versuchen noch gezeigt werden. Fludioxonil und Iprodione sind biochemisch betrachtet deutlich unterschiedliche Substanzen und doch aktivieren sie denselben Signalweg. Deshalb wird vermutet, dass es noch weitere Substanzen mit dem gleichen Wirkmechanismus gibt, was nach dem Screening von Substanzbibliotheken helfen sollte, eine Verbindung mit möglichst geringen Nebenwirkungen zu identifizieren. Diese Screenings können durch zwei neu entwickelte Werkzeuge vereinfacht werden. Bei dem einen handelt es sich um einen Antikörper der Phosphohistidin erkennt und bei dem anderen um eine fluoreszierende Sonde, die Histidinphosphorylierungen durch Histidinkinasen *in vitro* nachweisen kann (SHOR & CHAUHAN, 2015). Damit ist der Grundstein für effiziente Screenings nach HOG-aktivierenden Substanzen für den antimykotischen Einsatz im Mensch und Tier gelegt.

## **2.2 Bedeutung der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für die Behandlung von Infektionen durch Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze**

Die Inzidenz invasiver Mykosen nimmt weltweit zu und man sagt schon jetzt, dass genauso viele Menschen an den zehn wichtigsten invasiven Pilzkrankheiten sterben wie an Tuberkulose oder auch Malaria (BROWN et al., 2012). Neben *Aspergillus* treten in den letzten Jahren vermehrt die Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilze als Erreger invasiver Mykosen auf, die aufgrund von Resistenzen gegenüber den gängigen Antimykotika noch schwerer zu behandeln sind. Zu ihnen zählen neben Vertretern der Gattung *Fusarium* und Mucorales auch *Scedosporium* spp. (DOUGLAS et al., 2016).

*Rhizopus oryzae* ist weltweit der häufigste Erreger der Mucormykose aus der Gruppe der Mucorales, dicht gefolgt vom Genus *Lichtheimia* (SCHWARTZE & JACOBSEN, 2014). Die Mucormykose schreitet meist sehr schnell voran und die Sterblichkeitsrate ist mit 70-100 % extrem hoch (PFALLER & DIEKEMA, 2004). Eine Besonderheit bei den Mucorales liegt zudem darin, dass sie nicht nur als opportunistische Erreger im Falle einer Immunschwäche auftreten, sondern auch zu tödlichen Infektionen bei deutlich immunkompetenteren Personen, wie z.B. Diabetes-mellitus-Patienten führen können (RODEN et al., 2005). Die therapeutischen Möglichkeiten sind im Falle einer Mucormykose stark

eingeschränkt. Da diese Pathogene nur teilweise sensitiv gegenüber Azolen sind, ist Amphotericin B das Mittel der Wahl (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2010). Darüber hinaus kann ein chirurgisches Debridement die Heilungschancen verbessern, besonders wenn dieses vor der Ausbreitung der Infektion im Körper geschieht (RILEY et al., 2016). Des Weiteren sollte natürlich versucht werden, die zugrundeliegende Erkrankung in Griff zu bekommen (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2010). Somit wären gerade bei der rapide verlaufenden Mucormykose neue Therapeutika mit geringeren Nebenwirkungen und höherer Effektivität für eine Verbesserung der Heilungschancen dringend erforderlich.

*Scedosporium* spp. werden auch der Gruppe der *emerging pathogens* zugerechnet und zu den relevantesten klinischen Vertretern zählen *S. apiospermum* und *S. prolificans* (CORTEZ et al., 2008). *Scedosporium* verursacht ein breites Spektrum an Infektionen. Hierzu zählen das Mycetom, als Folge von Traumata bei denen Pilzsporen in die Wunde eingebracht werden, sowie disseminierte Infektionen mit Sterblichkeitsraten von über 75 % bei immunsupprimierten Patienten (LOPES et al., 2010; THORNTON et al., 2015). Zudem hat sich unter anderem beim Tsunami 2004 gezeigt, dass *Scedosporium* bei Unfällen mit Beinahe-Ertrinken auch bei immunkompetenten Opfern fatale ZNS-Infektionen und Pneumonien durch Aspiration von kontaminiertem Wasser auslösen kann (THORNTON, 2009). *Scedosporium* ist resistent gegenüber traditionellen Antimykotika, wie beispielsweise Amphotericin B. Die neueren Triazole scheinen zusammen mit einer chirurgischen Intervention der bisher vielversprechendste Ansatz für die Therapie zu sein (CORTEZ et al., 2008; LOPES et al., 2010), aber neue antifungale Wirkstoffe sind auch hier dringend notwendig.

Wir konnten mithilfe von Plattendiffusionstests zeigen, dass *Lichtheimia* und *Rhizopus* als wichtige Vertreter der Mucorales, aber auch *Scedosporium* spp. sensitiv gegenüber Fludioxonil und Iprodione sind (siehe Publikation 2, WIEDEMANN et al.). Bei *Scedosporium* konnten wir sogar einen besonders großen Hemmhof für Fludioxonil beobachten, was für eine besonders starke Empfindlichkeit spricht. Deshalb vermuteten wir, dass der HOG-Signalweg auch in diesen Pilzen vorkommt und konnten durch anschließende Genomanalysen mittels BLASTp Proteine identifizieren, die sich zum TcsC in *A. fumigatus* homolog verhalten. Zudem gibt es bereits Berichte, dass sich Fludioxonil und Iprodione wirksam gegenüber *Fusarium oxysporum* (RISPAIL & DI PIETRO,

2010), *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* (OCHIAI et al., 2001; HAGIWARA et al., 2007), *Candida albicans* (OCHIAI et al., 2002) und *Cryptococcus neoformans* (KOJIMA et al., 2006) gezeigt haben. HOG-aktivierende Substanzen scheinen also ein breites Spektrum von Pilzinfektionen therapeutisch abdecken zu können und gerade im Falle der Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze, die oft mit den vorhandenen Antimykotika nur schwer behandelbar sind, könnten sie so zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie führen.

Der nächste Schritt würde darin bestehen, die Wirksamkeit von Fludioxonil und Iprodione in Infektionssystemen zu untersuchen. Wir haben aber bereits Hinweise, dass Fludioxonil an Proteine wie z.B. Albumin bindet und dann nicht mehr aktiv ist (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Frank Ebel). Das limitiert den Fludioxonil-Einsatz im Infektionsmodell. Deshalb muss zunächst nach Substanzen mit besserer *in-vivo*-Eignung gesucht werden.

### **2.3 Der Einfluss HOG-aktivierender Substanzen auf die Diagnostik**

Bei *Aspergillus*-Infektionen spielt der Nachweis des Zellwandpolysaccharids Galaktomannan eine wichtige Rolle in der serologischen Diagnostik. Der Galaktomannanachweis erfolgt mit Hilfe des monoklonalen Rattenantikörpers EB-A2, der an die  $\beta$ -1,5-verknüpften Galaktofuranose-Seitenketten des Galaktomannans bindet (STYNEN et al., 1992). Galaktomannan wird während des Wachstums von *Aspergillus* freigesetzt und kann in Blut, Liquor und BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Wir konnten beobachten, dass es unter Fludioxonileinfluss zu strukturellen Veränderungen in der Zellwand von *A. fumigatus* kommt. Zum einen reagiert der Pilz mit einem verstärkten Einbau von Chitin, aber auch die Galaktomannanverteilung ändert sich drastisch. Galaktomannan ist normalerweise gleichmäßig über die Hyphenoberfläche verteilt, aber nach Co-Inkubation mit Fludioxonil war deutlich weniger Galaktomannan auf der Oberfläche detektierbar. Stattdessen zeigte sich ein gesprenkeltes Muster auf den Hyphen und rund um die Hyphen gab es Galaktomannan-positive Halobereiche (siehe Publikation 2, WIEDEMANN et al.). Der Pilz schien das Galaktomannan unter Einwirkung von Fludioxonil vermehrt freizusetzen. Diese Hypothese konnte auch bestätigt werden, indem wir die Galaktomannanmenge im Kulturüberstand mittels ELISA vor und nach Fludioxonil-Einsatz gemessen haben und das Signal nach Fludioxonilbehandlung

deutlich stärker war. Dieser Effekt ist nicht auf *A. fumigatus* beschränkt, sondern konnte auch bei anderen *Aspergillus*-Spezies festgestellt werden. Fludioxonil ist somit durch seinen fungiziden Effekt nicht nur therapeutisch interessant, sondern könnte auch Vorteile für die Diagnostik mit sich bringen. Sowohl ein prophylaktischer Einsatz als auch ein Einsatz bei Verdacht auf eine invasive Mykose wäre denkbar. Durch den Einsatz könnten zum Beispiel invasive Aspergillosen, die bis zu diesem Zeitpunkt beim Galaktomannan-Assay noch im nicht detektierbaren Bereich lagen, durch die plötzliche und massenhafte Freisetzung von Galaktomannan diagnostiziert werden. So könnten *Aspergillus*-wirksame-Antimykotika gezielter und vor allem früher eingesetzt werden, wodurch sich die Überlebenschancen des Patienten deutlich erhöhen würden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Inzidenz invasiver Mykosen nimmt weltweit zu und schon jetzt sterben genauso viele Menschen an den zehn häufigsten invasiven Pilzkrankheiten wie an Tuberkulose oder auch Malaria. Besonders gefährdet für eine invasive Mykose sind Patienten nach Organ- und Stammzelltransplantationen sowie Patienten, die unter dem Einfluss Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva stehen, aber auch AIDS-Patienten haben ein erhöhtes Risiko zu erkranken. Als häufigster Erreger invasiver Schimmelpilzmykosen gilt immer noch *Aspergillus*, insbesondere *A. fumigatus*. Die Nicht-*Aspergillus*-Schimmelpilze, wie *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. und verschiedene Zygomyceten, sind aber von zunehmender Bedeutung. Die für invasive Mykosen typischen hohen Mortalitätsraten kommen durch Probleme sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie zustande. Zum einen fehlen sichere und schnelle Nachweisverfahren insbesondere für die Differenzierung von Schimmelpilzen. Zum anderen gibt es nur wenige Antimykotika, gegenüber denen die verschiedenen Pilze noch dazu sehr unterschiedliche Sensitivitäten aufweisen. Der Bedarf für bessere Diagnostika zur genauen Differenzierung sowie neuen therapeutischen Strategien ist deshalb sehr hoch. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Antikörper gegen Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilze hergestellt, um neue diagnostische Nachweismethoden zu entwickeln. Ein Ziel war es, eine Methode zu entwickeln, um zwischen einer *Aspergillus*- und einer *Fusarium*-Infektion differenzieren zu können. Dies ist bisher schwierig, da sich die beiden Pilze u.a. aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie in histopathologischen Schnitten oft nicht eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Zudem ist auch die Aussagekraft einer positiven Kultur oft fraglich und es kann zu Kreuzreaktionen im Galaktomannan-Assay kommen, der ursprünglich als *Aspergillus*-spezifisch galt. In dieser Arbeit konnte der AB135-8-Antikörper generiert werden, bei dem es sich um einen monoklonalen IgM-Antikörper handelt, der ein *Fusarium*-Glykoantigen erkennt, das sowohl auf der Oberfläche des Pilzes vorhanden ist als auch in dessen Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Da dieser Antikörper *in vitro* auch eine schwache Reaktion mit *Aspergillus* zeigte, konnten wir mithilfe einer *A. fumigatus*-Mutante, die keine Galaktofuranose bilden kann, zeigen, dass es sich bei dem AB135-8-Antigen um ein Galaktofuranose-haltiges-Antigen handelt.

Durch Kombination dieses Antikörpers und eines *Aspergillus*-spezifischen Antikörpers konnten wir eine Methode zur histopathologischen Unterscheidung von *Aspergillus*- und *Fusarium*-Infektionen etablieren. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass das AB135-8-Antigen auch im Kulturüberstand vorhanden ist, was die Möglichkeit bietet, einen Sandwich-ELISA für den serologischen Nachweis zu entwickeln, wodurch eine frühzeitige Diagnostik ermöglicht würde. Um neue antifungale Therapiestrategien zu finden, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob Substanzen, die den Pilz-spezifischen *High-Osmolarity-Glycerol* (HOG) Signalweg aktivieren, einen geeigneten Ansatz bieten. Der HOG-Signalweg dient der Stresswahrnehmung des Pilzes und hilft u.a. bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts. Fludioxonil und Iprodione aktivieren diesen Signalweg und zeigten in unseren Tests eine klare antifungale Wirkung nicht nur auf *Aspergillus*, sondern auch auf *Lichtheimia*, *Rhizopus* und *Scedosporium*. Diese spielen als *emerging pathogens* eine immer größere Rolle bei invasiven Mykosen und sind aufgrund von Resistenzen gegenüber vielen Antimykotika noch schwerer zu behandeln als *Aspergillus*. Die genaue Wirkung von Fludioxonil und Iprodione haben wir beispielhaft für *A. fumigatus* untersucht und herausgefunden, dass diese Substanzen zunächst zu einem sofortigen Wachstumsstopp führen und dass bei andauernder Exposition der größte Teil der Hyphen auch abgetötet wird. Es kommt bei Fludioxonilzugabe zum Anschwellen der Hyphen, woraufhin der Pilz mit Septenbildung und Verschluss der septalen Poren reagiert. Außerdem werden die Kontrollmechanismen der Mitose durch Fludioxonil ausgeschaltet und es kommt zur Akkumulation von Zellkernen. Auf den durch diese verschiedenen Prozesse ausgelösten Stress reagiert der Pilz u.a. mit einer Umstrukturierung der Zellwand, die mit einer massiven Galaktomannan-Freisetzung einhergeht. Diese induzierte Freisetzung des Galaktomannan-Antigens könnte die Diagnostik im frühen Infektionsstadium deutlich verbessern. HOG-aktivierende Substanzen zeigten sich durch ihre vielfältige zellbiologische Wirkungsweise und ein Zielprotein, das in Säugetieren nicht existiert, als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Antimykotika zur Bekämpfung von Schimmelpilzinfektionen.

## VI. SUMMARY

The incidence of invasive fungal diseases is increasing worldwide and there are already as many people dying of the top ten of invasive mycoses as of tuberculosis and malaria. Patients undergoing solid-organ or stem cell transplantation, patients under the influence of chemo- or immunosuppressive therapy and patients with AIDS are at high risk of developing invasive fungal diseases. *Aspergillus*, especially *A. fumigatus*, is still the most common mold causing invasive fungal infections, but infections caused by non-*Aspergillus*-molds such as *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. and different Zygomycetes are on the rise. The characteristically high mortality rates of invasive mycoses are due to shortcomings in the fields of diagnostics and therapy. On the one hand safe and fast methods for the detection and especially for the differentiation of molds are missing. On the other hand not many antifungal agents exist on the market and they also show variable efficacies against the different fungi. Thus, the need for improved diagnostics for differentiation of fungal pathogens as well as new antifungal strategies to combat fungal infections is high. In the first part of this work antibodies against non-*Aspergillus*-molds were generated to develop new diagnostic methods. We were in particular interested to find a method for the differentiation between an *Aspergillus* and a *Fusarium* infection. This still remains a problem, because both fungi have a similar histological morphology, which makes it nearly impossible to discriminate between the two in histology. Moreover the value of a positive culture is controversial and cross-reactions in the originally *Aspergillus* specific thought of galactomannan assay have been reported. In this work we generated the AB135-8 antibody, a monoclonal antibody that recognizes a *Fusarium* glycoantigen present on the hyphal surface but also released in the culture supernatant. This antibody showed also a weak reactivity with *A. fumigatus in-vitro*, but no reactivity with an *A. fumigatus* mutant lacking galactofuranose. This strongly suggests, that galactofuranose is an important component of the AB135-8 antigen. By using a combination of this antibody and another *Aspergillus* specific antibody, we established a method to differentiate between *Aspergillus* and *Fusarium* in histopathological samples. Moreover we could show that the AB135-8 antigen is present in culture supernatants, and thus could be a promising target for a

*Fusarium*-specific serological assay, which would enable an earlier detection of *Fusarium* infections. The second part of this work concentrated on the development of a new antifungal strategy, particularly on the question whether substances activating the fungal specific high osmolarity glycerol (HOG) pathway are a means to combat invasive mycoses. In fungi, the HOG pathway plays an important role for stress sensing and helps amongst others maintaining the osmotic balance. Fludioxonil and Iprodione are activating this pathway and showed in our tests antifungal effects not just on *Aspergillus*, but also on *Lichtheimia*, *Rhizopus* and *Scedosporium*. These fungi are emerging pathogens causing invasive fungal diseases of increasing importance and are due to their variable resistance to most antifungal agents even more challenging to treat. We have examined the impact of Fludioxonil and Iprodione on *A. fumigatus* as a model organism and found out that they are first of all inducing an immediate growth arrest, which was followed by a quantitative killing of hyphae. After addition of Fludioxonil, hyphae started to swell and the fungi reacted with an enhanced septum formation and closure of septal pores. Furthermore the control mechanisms of mitosis were disabled by Fludioxonil and nuclei accumulated in the cells. The fungi reacted to the enhanced stress by restructuring their cell wall, which provokes a massive release of galactomannan. This induced galactomannan release could improve the diagnostics at an early stage of infection. HOG activating agents showed a high negative impact on the cell biology and act on a target protein that does not exist in mammals. Thus they are promising candidates for the development of new antifungals to combat mold infections.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdo W, Kawachi T, Sakai H, Fukushi H, Kano R, Shibahara T, Shirouzu H, Kakizoe Y, Tuji H, Yanai T. Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 211-8.

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

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

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 805-9.

Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Walther G, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of human-pathogenic species of *Lichtheimia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3058-60.

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

Arne P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Femenia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *Int J Microbiol* 2011; 2011: 746356.

Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 7463-8.

Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 57-69.

Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 2017-36.

Barrs VR, Talbot JJ. Feline aspergillosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44: 51-73.

Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med (Lond)* 2007; 57: 552-6.

Beck J (2014) Woronin-Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphen-Septum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses pathogenen Schimmelpilzes

Bernard M, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 2001; 39 Suppl 1: 9-17.

Blomme E, Piero FD, La Perle K, Wilkins P. Aspergillosis in horses: a review. *Equine Veterinary Education* 1998; 10: 86-93.

Boutati EI, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 1997; 90: 999-1008.

Bradburn N, Coker RD, Blunden G. The aetiology of turkey 'X'disease. *Phytochemistry* 1994; 35: 817.

Bradford KA, Allison RW, Love BC. What is your diagnosis? Corneal scraping from an ulcerative lesion in a Quarter horse. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 601-2.

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

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

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

Casadevall A, Pirofski LA. Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma. *Infect Immun* 2007; 75: 5074-8.

Cassone A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 114-24.

Chlubnová I, Filipp D, Spiwok V, Dvořáková H, Daniellou R, Nugier-Chauvin C, Králová B, Ferrières V. Enzymatic synthesis of oligo-d-galactofuranosides and l-arabinofuranosides: from molecular dynamics to immunological assays. *Organic & biomolecular chemistry* 2010; 8: 2092-102.

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

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

Cole RJ. Etiology of turkey "X" disease in retrospect: a case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin research* 1986; 2: 3-7.

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottlilil S, Walsh TJ. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 157-97.

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

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 447-65.

Dagleish MP, Foster G, Howie FE, Reid RJ, Barley J. Fatal mycotic encephalitis caused by *Aspergillus fumigatus* in a northern bottlenose whale (*Hyperoodon ampullatus*). *Vet Rec* 2008; 163: 602-4.

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

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras M (2000) Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

de Pauw BE, Picazo JJ. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 2: S167-71.

Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362: 1142-51.

Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 Suppl 1: 67-75.

Douglas AP, Chen SC, Slavin MA. Emerging infections caused by non-*Aspergillus filamentous* fungi. *Clin Microbiol Infect* 2016;

Elligott CR, Wilkie DA, Kuonen VJ, Bras ID, Neihaus A. Primary *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis in a Holstein cow. *Vet Ophthalmol* 2006; 9: 175-8.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55: 809-18.

Evans J, Levesque D, de Lahunta A, Jensen HE. Intracranial fusariosis: a novel cause of fungal meningoencephalitis in a dog. *Vet Pathol* 2004; 41: 510-4.

Fassler JS, West AH. Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways. *Eukaryot Cell* 2013; 12: 1052-60.

Fox M, Gray G, Kavanagh K, Lewis C, Doyle S. Detection of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins: immunogen synthesis and immunoassay development. *J Microbiol Methods* 2004; 56: 221-30.

Francois JM. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nat Protoc* 2006; 1: 2995-3000.

Frasca S, Jr., Dunn JL, Cooke JC, Buck JD. Mycotic dermatitis in an Atlantic white-sided dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbor seals. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 727-9.

Fujimura M, Ochiai N, Ichiishi A, Usami R, Horikoshi K, Yamaguchi I. Fungicide resistance and osmotic stress sensitivity in *os* mutants of *Neurospora crassa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2000; 67: 125-33.

Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, Hoogenboezem M, van den Berg JM, Prins JM, Vitkov L, van de Veerdonk FL, van den Berg TK, Roos D, Kuijpers TW. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J Immunol* 2016; 196: 1272-83.

Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 1144-55.

Goldblatt D. Conjugate vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 1-3.

Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, Afif C, Cooksley C, Bodey GP, Chatzinikolaou I, Perego C, Kantarjian HM, Raad, II. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2004; 101: 1594-600.

Hagiwara D, Matsubayashi Y, Marui J, Furukawa K, Yamashino T, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Mizuno T. Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 844-7.

Hattel A, Drake T, Anderholm B, McAllister E. Pulmonary aspergillosis associated with acute enteritis in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 589-90.

Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 2001; 105: 1422-32.

Heesemann L (2010) Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Moleküle des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*. lmu

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

Hoerr FJ. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis* 2010; 54: 2-15.

Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-22.

Horn DL, Freifeld AG, Schuster MG, Azie NE, Franks B, Kauffman CA. Treatment and outcomes of invasive fusariosis: review of 65 cases from the PATH Alliance((R)) registry. *Mycoses* 2014; 57: 652-8.

Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* 2015; 67: 171-82.

Isaacs JD. Antibody engineering to develop new antirheumatic therapies. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 225.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M *Immunologie*, 5. Auflage, 2002. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Johnson P, Moore L, Mrad D, Turk J, Wilson D. Sudden death of two horses associated with pulmonary aspergillosis. *Vet Rec* 1999; 145: 16-20.

Kano R, Okayama T, Hamamoto M, Nagata T, Ohno K, Tsujimoto H, Nakayama H, Doi K, Fujiwara K, Hasegawa A. Isolation of *Fusarium solani* from a dog: identification by molecular analysis. *Med Mycol* 2002; 40: 435-7.

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

Kebabci N, van Diepeningen AD, Ener B, Ersal T, Meijer M, Al-Hatmi AM, Ozkocaman V, Ursavas A, Cetinoglu ED, Akalin H. Fatal breakthrough infection with *Fusarium andiyazi*: new multi-resistant aetiological agent cross-reacting with *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay. *Mycoses* 2014; 57: 249-55.

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

Kojima K, Bahn YS, Heitman J. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2006; 152: 591-604.

Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol* 2010; 47: 2154-60.

Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 2011; 20: 156-74.

Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003743.

Lane J. The management of guttural pouch mycosis. *Equine Vet J* 1989; 21: 321-4.

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

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

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

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-50.

Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358-66.

Link HF (1809) *Observationes in ordinibus plantarum naturalium: Dissertatio Ima complectens anandarum ordinibus epiphytas, mucedines gastrorum et fungos*

Lockwood MB, Crescencio JC. Adventitious sporulation in *Fusarium*: The yeast that were not. *IDCases* 2016; 3: 5-7.

Lopes LC, Rollin-Pinheiro R, Guimarães AJ, Bittencourt VC, Martinez LR, Koba W, Farias SE, Nosanchuk JD, Barreto-Bergter E. Monoclonal antibodies against peptidorhamnomannans of *Scedosporium apiospermum* enhance the pathogenicity of the fungus. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e853.

Marom EM, Holmes AM, Bruzzi JF, Truong MT, O'Sullivan PJ, Kontoyiannis DP. Imaging of pulmonary fusariosis in patients with hematologic malignancies. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: 1605-9.

Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 909-17.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190: 641-9.

Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 1765-78.

McCormick A (2012) Studies on the release of neutrophil extracellular traps and IFN- $\gamma$  as part of the innate immune response to *Aspergillus fumigatus* and on the fungal stress response via the hybrid sensor kinase TcsC. *Imu*

McCormick A, Jacobsen ID, Broniszewska M, Beck J, Heesemann J, Ebel F. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012; 7: e38262.

Miller DL, Radi ZA, Stiver SL, Thornhill TD. Cutaneous and pulmonary mycosis in green anacondas (*Eunectes murinus*). *J Zoo Wildl Med* 2004; 35: 557-61.

Miyazaki T, Naoi Y. Chemical structures of main extracellular polysaccharides of *Alternaria solani* and *Fusarium solani*. *Studies on fungal polysaccharides. XVIII. Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1975; 23: 1752-8.

Moretti AN. Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 2009: 7-13.

Mortellaro CM, Franca PD, Caretta G. *Aspergillus fumigatus*, the causative agent of infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses* 1989; 32: 327-35.

Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2011; 2: 91-6.

Namitome K, Kano R, Sekiguchi M, Iwasaki T, Kaneshima T, Nishifuji K. Isolation of *Fusarium* sp. from a claw of a dog with onychomycosis. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 965-9.

Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 479-504.

Ni M, Yu JH. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2007; 2: e970.

Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 521-6.

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 695-704.

Nucci M, Carlesse F, Cappellano P, Varon AG, Seber A, Garnica M, Nouer SA, Colombo AL. Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing. *PLoS One* 2014; 9: e87784.

O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457: 471-4.

Ochiai N, Fujimura M, Motoyama T, Ichiishi A, Usami R, Horikoshi K, Yamaguchi I. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci* 2001; 57: 437-42.

Ochiai N, Fujimura M, Oshima M, Motoyama T, Ichiishi A, Yamada-Okabe H, Yamaguchi I. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2209-15.

Ohara T, Inoue I, Namiki F, Kunoh H, Tsuge T. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* 2004; 166: 113-24.

Okada A, Banno S, Ichiishi A, Kimura M, Yamaguchi I, Fujimura M. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science* 2005; 30: 378-83.

Ooka J, Kommedahl T. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* 1977; 67: 1023-6.

Oren I, Haddad N, Finkelstein R, Rowe JM. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *American journal of hematology* 2001; 66: 257-62.

Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; 125: S14-24.

Pfaller M, Diekema D. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4419-31.

Przybilla B, Bachert C (2000) *Praktische allergologische Diagnostik*. Steinkopff, Darmstadt. XIII, 377 S. :

Puntenney SB, Wang Y, Forsberg NE (2003) Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome. Southwest Nutrition & Management Conference, Pheonix, University of Arizona, Department of Animal Science, Tuscon. 49-63

Rankin NE. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *Br Med J* 1953; 1: 918-9.

Richard JL, Dvorak TJ, Ross PF. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* 1996; 134: 167-70.

Richards MR, Lowary TL. Chemistry and Biology of Galactofuranose-Containing Polysaccharides. *ChemBioChem* 2009; 10: 1920-38.

Riet-Correa F, Rivero R, Odriozola E, Adrien Mde L, Medeiros RM, Schild AL. Mycotoxicoses of ruminants and horses. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25: 692-708.

Riley TT, Muzny CA, Swiatlo E, Legendre DP. Breaking the Mold: A Review of Mucormycosis and Current Pharmacological Treatment Options. *Ann Pharmacother* 2016;

Rispail N, Di Pietro A. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* 2010; 11: 395-407.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 634-53.

Rohde M, Schwienbacher M, Nikolaus T, Heesemann J, Ebel F. Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS microbiology letters* 2002; 206: 99-105.

Sales Mda P. Chapter 5--Aspergillosis: from diagnosis to treatment. *J Bras Pneumol* 2009; 35: 1238-44.

Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 1998; 41: 89-91.

Schwartz HJ, Greenberger PA. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 138-42.

Schwartz VU, Jacobsen ID. Mucormycoses caused by *Lichtheimia* species. *Mycoses* 2014; 57 Suppl 3: 73-8.

Schwienbacher MA (2005) Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden. Technische Universität München

Seong KY, Zhao X, Xu JR, Guldener U, Kistler HC. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* 2008; 45: 389-99.

Seyedmousavi S, Guillot J, Arne P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Med Mycol* 2015; 53: 765-97.

Sharman MJ, Mansfield CS. Sinonasal aspergillosis in dogs: a review. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 434-44.

Sherif R, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 242-50.

Shor E, Chauhan N. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004632.

Siddiqui IR, Adams GA. AN EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *GIBBERELLA FUJIKUROI* (*FUSARIUM MONILIFORME*). *Canadian Journal of Chemistry* 1961; 39: 1683-94.

Staggs L, St Leger J, Bossart G, Townsend FI, Jr., Hicks C, Rinaldi M. A novel case of *Fusarium oxysporum* infection in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 2010; 41: 287-90.

Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latge JP. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect Immun* 1992; 60: 2237-45.

Sugahara G, Kiuchi A, Usui R, Usui R, Mineshige T, Kamiie J, Shirota K. Granulomatous pododermatitis in the digits caused by *Fusarium proliferatum* in a cat. *J Vet Med Sci* 2014; 76: 435-8.

Summerell BA, Laurence MH, Liew EC, Leslie JF. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 2010; 44: 3-13.

Tefsen B, Ram AF, van Die I, Routier FH. Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology* 2012; 22: 456-69.

Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 103-10.

Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1095-105.

Thornton CR. Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16: 756-64.

Thornton CR, Ryder LS, Le Cocq K, Soanes DM. Identifying the emerging human pathogen *Scedosporium prolificans* by using a species-specific monoclonal antibody that binds to the melanin biosynthetic enzyme tetrahydroxynaphthalene reductase. *Environmental microbiology* 2015; 17: 1023-38.

Tintelnot K. [Differential diagnosis for detection of hyphae in tissue]. *Pathologie* 2013; 34: 503-10.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 2005; 202: 597-606.

Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* 2009; 4: e5392.

Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C, Cascio GL. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1051-3.

Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 89-94.

van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TA, Waalwijk C. Diagnosis of Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Curr Fungal Infect Rep* 2015; 9: 135-43.

Vargas-Perez I, Sanchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J. Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 1570-83.

Vascellari M, Carminato A, Danesi P, Carniel M, Granato A, Stocco N, Mutinelli F. Pathology in practice. Severe, chronic, pyogranulomatous rhinosinusitis with necrosis and fungal septate hyphae consistent with *Fusarium* spp infection. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 449-51.

Wiedemann A, Kakoschke TK, Speth C, Rambach G, Ensinger C, Jensen HE, Ebel F. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *Int J Med Microbiol* 2016;

Wollenweber HW, Reinking OA (1935) Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. P. Parey

Yamauchi H, Takai Y, Yamasaki H, Fukuda R. Thoracic mass in a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol* 2011; 48: E1-5.

Yang C, Hamel C, Vujanovic V, Gan Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* 2011; 2011

Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Qjm* 2007; 100: 317-34.

## VIII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel nicht nur für die intensive Betreuung und entgegengebrachte Geduld herzlich bedanken, sondern auch dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, an diesem interessanten Thema mitzuarbeiten und in die Welt der Pilze einzutauchen. Seine handgemalten Zeichnungen zur Veranschaulichung komplexer Zusammenhänge, seine Freude an der Forschung und sein immenses Fachwissen waren eine wahre Inspiration für mich.

Auch meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Straubinger möchte ich für seine Unterstützung und die freundliche Aufnahme an seinem Institut herzlich danken. Es hat Spaß gemacht Teil ihres Teams zu sein.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem gesamten Süßstückle-Fanclub einschließlich Dr. Johannes Wagener und unserer herzallerliebsten TA Emilia Sieger vom Max von Pettenkofer-Institut. Ihr habt mir die Arbeit im wahrsten Sinne des Wortes versüßt und mein Wissen nicht nur in Bezug auf die witzigsten Youtube-Videos immens erweitert. Ein besonderer Dank gilt Berna, die jeden Dienstag mit mir beim Sport Wind und Wetter getrotzt hat und auch Tamara für die tolle Teamarbeit und den regen Antikörperaustausch im *Frank Express*. Ich werde euch alle sehr vermissen.

Mein Dank gilt außerdem meiner Laborpartnerin Anja Spadinger für die tolle Zeit und Christoph Kleinemeier für seine technische Unterstützung. Unser kleines heimeliges Mykologielabor in der Tiermedizin inklusive Antenne Bayern Radioentertainment wird mir sehr fehlen. Ich möchte mich auch bei der gesamten AG RKS für das nette Arbeitsklima bedanken und ganz besonders bei Shari, Tini, Marjolaine, Astrid und Anna. Die gemeinsamen Mittagessen waren stets ein Fest.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Gedek und der Gedek-Stiftung bedanken, dass sie mir im Rahmen meiner Doktorarbeit die Teilnahme am *2nd International Veterinary Mycology Course* in Turin ermöglicht haben. Es war eine tolle und lehrreiche Erfahrung.

Auch meinen Paten Willi und Raimund, die mich auf meinem Lebensweg immer liebevoll begleiten und unterstützen, gebührt ein großes Dankeschön.

Der größte Dank aber gilt meiner Familie. Papa, du hast mir immer ermöglicht, meinen Weg zu gehen und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt. Nikola und Jakob ihr

seid die besten Geschwister der Welt und meine großen Vorbilder. Danke für eure Liebe und euren bedingungslosen Rückhalt. Liebe Mama, ich verdanke dir neben so vielem auch mein Durchhaltevermögen ohne das ich heute nicht da wäre, wo ich jetzt bin. Im Herzen trage ich dich immer bei mir.

...thank you, Chris, for always believing in me. You're my life!