

cAMP-abhängige Regulation von Morphogenese
und Virulenz in *Aspergillus fumigatus*

Von dem Fachbereich Biologie

der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Burghard Liebmann

geboren am 02.05.1975 in Dessau

2003

Referent: Prof. Dr. Brakhage

Koreferent: Prof. Dr. Gerlach

Tag der Promotion: 01.12.2003

KURZZUSAMMENFASSUNG

Aspergillus fumigatus ist ein wichtiger opportunistisch humanpathogener Pilz, der in immunsupprimierten Patienten schwerwiegende, lebensbedrohliche Erkrankungen, wie die Invasive Aspergillose hervorrufen kann. In zahlreichen Pilzen reguliert eine konservierte cAMP-Signaltransduktionskaskade morphologische und stoffwechselphysiologische, aber auch virulenzspezifische Prozesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *A. fumigatus* Gene identifiziert und isoliert werden, welche für zwei α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (*gpaA*, *gpaB*), die Adenylatzyklase (*acyA*), die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (*pkaR*) sowie zwei katalytische Untereinheiten der Proteinkinase A (*pkaC1*, *pkaC2*) kodieren. Diese stellen konservierte Komponenten der *A. fumigatus* cAMP-Kaskade dar. Die Deletion der Gene *gpaB*, *acyA* und *pkaC1* führte zu deutlichen Defekten im Wachstum und in der Konidienbildung von *A. fumigatus*. Durch Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität in den Deletionsstämmen wurde nachgewiesen, daß *pkaC1* katalytisch aktiv ist und funktional mit GPAB und ACYA im cAMP-Signalweg zusammenwirkt. Das *pksP*-Gen kodiert in *A. fumigatus* eine Polyketid-Synthase, welche in die Dihydroxynaphthol (DHN)-Melaninbiosynthese involviert ist. Eine *pksP*-Expression ist für die Virulenz von *A. fumigatus* von großer Bedeutung. Die Analyse einer *pksP*-*lacZ*-Fusion in *gpaB*- und *pkaC1*-Deletionsstämmen zeigte, daß die Expression des *pksP*-Gens durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert wird. Weiterhin konnte im Makrophagen-Assay und einem in dieser Arbeit etablierten und optimierten intranasalen Mausinfektionsmodell eine attenuierte Virulenz von Δ *gpaB*-, Δ *acyA*- und Δ *pkaC1*-Mutanten beobachtet werden. Die hier aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, daß die cAMP-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Regulation morphologischer und virulenzspezifischer Prozesse von *A. fumigatus* spielt. Sie stellen damit die Grundlage weiterführender Untersuchungen dar, die zur Identifizierung von Eingangssignalen und Effektoren der cAMP-Kaskade führen könnten, welche die Pathogenitätsmechanismen von *A. fumigatus* steuern.

Der alpha-Aminoadipat-Weg ist ein pilzspezifischer Biosyntheseweg der für den Menschen essentiellen Aminosäure Lysin. Eine *A. fumigatus* Δ *lysF*-Mutante, welche einen Defekt der in diesem Weg involvierten Hoomaconitase trägt, wies eine deutlich reduzierte Virulenz auf. Die *A. fumigatus* Lysinbiosynthese liefert somit einen möglichen Ansatzpunkt einer zu entwickelnden antimykotischen Therapie.

Schlagworte: *Aspergillus fumigatus*, cAMP, Virulenz, Morphogenese

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an important opportunistic fungal pathogen causing a large spectrum of diseases ranging from allergies to invasive aspergillosis which is often life-threatening in immunocompromized patients. cAMP signalling is well conserved in fungi. This regulatory network controls morphological and metabolic processes as well as genes required for virulence. This thesis describes the identification and isolation of several genes encoding conserved elements of the cAMP-signalling network in *A. fumigatus*. These include two α -subunits of heterotrimeric G-proteins (*gpaA*, *gpaB*), the adenylyate cyclase (*acyA*), the regulatory subunit of protein kinase A (*pkaR*) as well as two catalytic subunits of protein kinase A (*pkaC1*, *pkaC2*). Deletion of *gpaB*, *acyA* and *pkaC1* led to drastic growth and sporulation defects. By measuring protein kinase A activity of the mutant strains it was shown that PKAC1 is the predominant PKAC in the cell. It acts together with GPAB and ACYA in the same pathway. The *A. fumigatus pksP* gene encodes a polyketide synthase involved in dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis. Expression of *pksP* is important for virulence of the fungus. Analysis of a *pksP_P-lacZ* gene fusion in Δ *gpaB* and Δ *pkaC1* deletion strains indicated that *pksP* is regulated by cAMP signalling. Moreover, in a macrophage assay drastically increased killing of Δ *gpaB*, Δ *acyA* and Δ *pkaC1* mutant conidia was observed. For determining the pathogenic potential of mutants an intranasal mouse infection model was established and improved. Δ *gpaB*, Δ *acyA* and Δ *pkaC1* mutant strains were almost avirulent when tested in the mouse infection model. The results shown here illustrate that cAMP signal transduction plays an important role in regulation of both morphological and virulence processes of *A. fumigatus*. Based on these results it should be possible to identify both input signals and effectors of the cAMP network, which control pathogenicity of *A. fumigatus*.

The amino acid lysine, which is essential for humans, can be produced by fungi via the alpha-aminoadipate pathway. An *A. fumigatus* Δ *lysF* mutant contains a defect in the homoaconitase enzyme involved in fungal lysine biosynthesis. The virulence of the Δ *lysF* strain was drastically reduced in a mouse infection model, suggesting that LYSF is a potential target for the development of antimycotic compounds.

keywords: *Aspergillus fumigatus*, cAMP, virulence, morphogenesis

INHALT

KURZZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
EINLEITUNG	1
1. Die medizinische Bedeutung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
2. Die cAMP-Signaltransduktionskaskade	4
2.1. Aufbau und Konservierung der cAMP-Signaltransduktionskaskade in Pilzen.....	4
2.2. cAMP-abhängige Regulation von Stoffwechsel und Morphogenese in Pilzen.....	8
2.3. cAMP-abhängige Regulation von Virulenzprozessen in human- und pflanzenpathogenen Pilzen.....	10
3. Die <i>A. fumigatus</i> Virulenzdeterminante PKSP	12
3.1. Dihydroxynaphthol-Melanin Biosynthese in <i>A. fumigatus</i>	12
3.2. Entdeckung und Charakterisierung der Polyketid-Synthase PKSP aus <i>A. fumigatus</i>	14
3.3. Dihydroxynaphthol-Melanin in human- und pflanzenpathogenen Pilzen.....	15
4. Ziele der Arbeit	16
MATERIAL UND METHODEN	17
1. Mikrobiologische Methoden	17
1.1. Bakterienstämme, Pilzstämme und Plasmide.....	17
1.2. Nährmedien.....	19
1.3. Kulturbedingungen.....	20
1.4. Herstellung von Konidien suspensionen.....	20
1.5. Bestimmung spezifischer Wachstumsraten.....	21
1.6. Sporulationsquantifizierung.....	21

2. Molekulargenetische Methoden	21
2.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	21
2.1.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>A. fumigatus</i>	21
2.1.2. Isolierung von RNA aus <i>A. fumigatus</i>	21
2.1.3. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
2.2. Methoden zur Modifikation von DNA.....	22
2.2.1. Enzymatische <i>in vitro</i> Reaktionen.....	22
2.2.2. Amplifikation von DNA mittels PCR.....	22
2.2.3. <i>In vitro</i> -Mutagenese mittels PCR.....	23
2.2.4. DNA-Sequenzierung.....	23
2.3. Elektrophorese von DNA.....	23
2.4. 5' RACE („Rapid Amplification of cDNA Ends“)......	23
2.5. Transformation von <i>A. fumigatus</i>	23
2.6. „Southern blot“-Hybridisierung.....	24
2.7. Durchmusterung einer genomischen Cosmidgenbank von <i>A. fumigatus</i>	25
2.8. Durchmusterung einer cDNA-Expressionsgenbank von <i>A. fumigatus</i>	25
2.9. Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.10. Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	25
3. Proteinchemische Methoden	26
3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
3.2. Herstellung von Protein-Rohextrakten von <i>A. fumigatus</i>	27
3.3. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	27
3.4. Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität.....	27
4. Zytologische Methoden	28
4.1. Zellkernfärbung in Myzelien.....	28
4.2. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	28
5. Immunologische Methoden	28
5.1. Isolierung humaner Monozyten aus „Buffy Coats“.....	28
5.2. Bestimmung der Abtötungsrate von <i>A. fumigatus</i> Konidien durch Makrophagen..	29

5.3.	Isolierung von Immunzellen durch Bronchoalveolarlavage (BAL).....	29
5.4.	Färbung von Immunzellen.....	30
6.	Tierexperimentelle Methoden	30
6.1.	Haltung von Versuchstieren.....	30
6.2.	Immunsuppression von Versuchstieren und Infektion mit <i>A. fumigatus</i> Konidien..	31
6.3.	Organaufarbeitung von Versuchstieren.....	31
7.	Bezugsquellen von Enzymen und Chemikalien	31
ERGEBNISSE		33
1.	Identifizierung und Isolierung von Komponenten der cAMP-Signaltransduktion von <i>A. fumigatus</i>	33
2.	Charakterisierung der isolierten cAMP-Signaltransduktionskomponenten	34
2.1.	Die G α -Untereinheiten GPAA und GPAB.....	34
2.2.	Die Adenylatzyklase ACYA.....	36
2.2.1.	Bestimmung von Transkriptionsstartpunkt und Intronstruktur des <i>acyA</i> -Gens.....	36
2.2.2.	Charakterisierung des <i>acyA</i> -Gens.....	37
2.3.	Die regulatorische Proteinkinase A (PKA)-Untereinheit PKAR.....	38
2.4.	Die katalytischen PKA-Untereinheiten PKAC1 und PKAC2.....	40
2.4.1.	Bestimmung von Transkriptionsstartpunkt und Intronstruktur des <i>pkaC1</i> -Gens....	41
2.4.2.	Charakterisierung der Gene <i>pkaC1</i> und <i>pkaC2</i>	41
3.	Erzeugung und phänotypische Charakterisierung von cAMP-Signaltransduktionsmutanten	44
3.1.	Strategie zur Konstruktion von Gendeletionsstämmen.....	44
3.2.	Deletion des G α -Untereinheit-kodierenden Gens <i>gpaB</i>	45
3.3.	Deletion des Adenylatzyklase-kodierenden Gens <i>acyA</i>	48
3.4.	Deletion des für eine katalytische PKA-Untereinheit kodierenden Gens <i>pkaC1</i>	51
3.5.	Versuche zur Deletion des für die regulatorische PKA-Untereinheit kodierenden Gens <i>pkaR</i>	53
3.5.1.	Konstruktion einer <i>A. fumigatus</i> <i>gpaB</i> -Mutante mit <i>pabaA</i> -Deletion.....	54
3.5.2.	Versuche zur <i>pkaR</i> -Deletion in einem <i>gpaB</i> - / <i>pabaA</i> -Deletionsstamm.....	56

3.6.	Phänotypische Charakterisierung der <i>gpaB</i> -, <i>acyA</i> - und <i>pkaC1</i> - Deletionsstämmen.....	58
4.	Untersuchungen zur Expression und Aktivität der Proteinkinase A.....	63
4.1.	<i>pkaC1</i> -Expressionsstudien unter Verwendung des „grünen Fluoreszenz- proteins“ (<i>egfp</i>).....	63
4.1.1.	Konstruktion eines Plasmidvektors mit <i>pkaC1-egfp</i> -Fusion.....	63
4.1.2.	Mikroskopische Detektion sowie Versuche zur Induktion der <i>pkaC1-egfp</i> - Expression durch cAMP und Stress.....	64
4.2.	Aktivitätsbestimmung der PKA in cAMP-Signaltransduktionsmutanten.....	65
4.3.	Versuche zur <i>pkaC1</i> -Überexpression.....	67
4.3.1.	Untersuchungen zur Regulation der <i>A. fumigatus</i> Alkohol-Dehydrogenase.....	67
4.3.2.	Versuche zur <i>pkaC1</i> -Expression unter Kontrolle des Glycerinaldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase- oder des Isocitrat-Lyase-Promotors.....	69
4.4.	Promotoranalysen der die PKA-Untereinheiten kodierenden Gene <i>pkaR</i> , <i>pkaC1</i> und <i>pkaC2</i> im Bezug auf Stressregulation.....	70
5.	Untersuchungen zur cAMP- und stressabhängigen Regulation der <i>pksP</i>- Virulenzdeterminante.....	71
5.1.	Generation von <i>gpaB</i> - und <i>pkaC1</i> -Deletionsstämmen mit <i>pksP_P-lacZ</i> -Genfusion..	73
5.2.	<i>pksP_P-lacZ</i> -Expression in <i>gpaB</i> - und <i>pkaC1</i> -Deletionsstämmen.....	73
5.3.	Mutagenese von STRE- und SSA3-Elementen im <i>pksP</i> -Promotor.....	75
5.3.1.	Einführung von Mutationen in STRE- und SSA3-Promotorelemente.....	76
5.3.2.	Isolierung von <i>A. fumigatus</i> Stämmen mit Integration der STRE- oder SSA3- mutierten <i>pksP_P-lacZ</i> -Genfusionen.....	76
5.3.3.	Einfluß der STRE- und SSA3-Mutationen auf die <i>pksP_P-lacZ</i> -Expression.....	77
6.	Virulenzstudien von cAMP-Signaltransduktionsmutanten.....	79
6.1.	Bestimmung der Konidien-Abtötungsrate von <i>gpaB</i> - und <i>acyA</i> -Deletions- stämmen im Makrophagen-Test.....	79
6.2.	Etablierung und Optimierung eines intranasalen Mausinfektionsmodells zur Virulenztestung von <i>A. fumigatus</i> -Stämmen.....	80
6.2.1.	Untersuchungen zum Einfluß der Immunsuppression auf Versuchstiere.....	81
6.2.2.	Bestimmung der optimalen <i>A. fumigatus</i> -Konidienmenge zur Infektion von immunsupprimierten Versuchstieren.....	82

6.2.3.	Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion von Versuchstieren mit verschiedenen Mengen an <i>A. fumigatus</i> -Konidien.....	84
6.3.	Virulenztestung von <i>gpaB</i> -, <i>acyA</i> - und <i>pkaC1</i> -Deletionsstämmen im Mausinfektionsmodell.....	85
6.4.	Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion mit cAMP-Signaltransduktionsmutanten.....	87
7.	Virulenzstudien der <i>A. fumigatus</i> Hemoacetonitase-Mutante (Δ<i>lysF</i>) im Mausinfektionsmodell.....	89
7.1.	Virulenztestung eines <i>lysF</i> -Deletionsstammes im Mausinfektionsmodell.....	89
7.2.	Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion mit einem <i>lysF</i> -Deletionsstamm.....	91
	DISKUSSION.....	92
1.	Die Gene <i>gpaA</i> , <i>gpaB</i> , <i>acyA</i> , <i>pkaR</i> , <i>pkaC1</i> und <i>pkaC2</i> kodieren Komponenten der <i>A. fumigatus</i> cAMP-Signaltransduktion.....	92
2.	Die cAMP-Signaltransduktion beeinflusst das Wachstum und die Entwicklung von <i>A. fumigatus</i>	95
3.	Die cAMP-Signaltransduktion reguliert die Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	99
4.	Regulation der <i>pksP</i> -Expression über cAMP und Stress.....	102
5.	cAMP-Signaltransduktion und Melaninbildung.....	105
6.	Interaktion zwischen Pilz und Immunsystem.....	107
7.	Eingangssignale und Effektoren der cAMP-Signaltransduktion.....	109
8.	Der alpha-Aminoacidat-Weg der Lysinbiosynthese als potentielles Ziel einer antimykotischen Therapie.....	112
	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
	LITERATUR.....	117
	ANHANG.....	129
	DANKSAGUNG.....	144
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	145
	LEBENS LAUF.....	146

ABKÜRZUNGEN

A.	<i>Aspergillus</i>	GAP-DH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
A	Adenin		
Abb.	Abbildung	GFP	„Green Fluorescent Protein“
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	h	Stunde
AMM	<i>Aspergillus</i> -Minimalmedium	HPLC	„High Pressure Liquid Chromatography“
Amp	Ampicillin		
As	Aminosäure(n)	Hyg	Hygromycin
β-GAL	β-Galaktosidase	IA	Invasive Aspergillose
bp	Basenpaare	IBMX	1-Isobutyl-3-Methyl-Xanthin
BAL	Bronchoalveolar-Lavage	i.p.	intraperitoneal
BSA	Rinderserumalbumin	i.v.	intravenös
C	Cytosin	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Kan	Kanamycin
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	kbp	Kilobasenpaare
<i>C. trifolii</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i>	kD	Kilodalton
°C	Grad Celsius	l	Liter
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	λ	Phage Lambda
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA	MDM	„Monocyte Derived Macrophage“
CFU	„Colony Forming Unit“	min	Minute
CGD	„Chronic Granulomatous Disease“	<i>M.</i>	<i>Magnaporthe</i>
C-terminal	carboxy-terminal	M	molar
Δ	Deletion	mRNA	„messenger“ RNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	<i>N.</i>	<i>Neurospora</i>
dBcAMP	Dibutyryl-cAMP	neo	Neomycin-Phosphotransferase
DHN	Dihydroxynaphthol	N-terminal	amino-terminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OMP	Orotidin-5'-Monophosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	ORF	offener Leserahmen
DOPA	Dihydroxyphenylalanin	pABA	<i>para</i> -Aminobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol	PBS	„Phosphate Buffered Saline“
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“	PCR	Polymerasekettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PEG	Polyethylenglykol
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	PKA	Proteinkinase A
et al.	und andere	PKI	Proteinkinase A-Inhibitor
5'-FOA	5'-Fluororotsäure	^R	Resistenz
G	Guanin	RACE	„Rapid Amplification of cDNA Ends“
g	Gramm		
g	Erdbeschleunigung	RNA	Ribonukleinsäure

ROS	„Reactive Oxygen Species“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. schenkii</i>	<i>Sporothrix schenkii</i>
STRE	„Stress Response Element“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
THN	Trihydroxynaphthol
THN	Tetrahydroxynaphthol
Tris	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
<i>U.</i>	<i>Ustilago</i>
U	„Unit“ - Enzymeinheit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
<i>W.</i>	<i>Wangiella</i>
WT	Wildtyp
w/v	Masse / Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D- Galaktopyranosid

EINLEITUNG

1. Die medizinische Bedeutung von *Aspergillus fumigatus*

Nicht zuletzt aufgrund der enormen medizinischen Weiterentwicklung hat das Auftreten lebensbedrohlicher, systemischer Aspergillosen in den letzten Jahrzehnten sehr stark zugenommen. Verursacher dieser Erkrankungen sind Pilze der Gattung *Aspergillus*, die hauptsächlich Personen mit stark geschwächtem Immunsystem infizieren. Die jährlich steigenden Zahlen von Organ- und Knochenmarkstransplantationen, die Entwicklung neuer Chemotherapien zur Tumorbehandlung, aber auch die Verbreitung des AIDS-auslösenden HIV-Virus führten zu einer deutlichen Zunahme von Patienten, bei denen die körpereigenen Verteidigungsmechanismen gestört sind. Eine solche Beeinträchtigung stellt den optimalen Nährboden für opportunistisch humanpathogene Erreger dar, zu denen auch *Aspergillus fumigatus* gehört. Für immunkompetente Personen besteht hingegen meist kein Infektionsrisiko. Untersuchungen ergaben, daß jeder Mensch täglich bis zu mehreren hundert der als Verbreitungsformen des Pilzes fungierenden Konidien einatmet, ohne zu erkranken (Chazalet et al. 1998, Hospenthal et al. 1998). Anatomische Barrieren wie das Flimmerepithel oder Endothelzellen sorgen für eine Beseitigung der Konidien („Clearance“) und verhindern so eine Besiedelung der Atemwege (Latgé 1999).

Allerdings stellt der menschliche Organismus nicht den natürlichen Lebensraum von *A. fumigatus* dar. Das angestammte Habitat von *A. fumigatus* ist vielmehr der Boden. Als Saprophyt wächst der Pilz auf organischen Materialien und spielt bei der Degradation von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen eine wichtige Rolle im natürlichen Stoffkreislauf (Latgé 1999). 1863 beschrieb J.B. Georg W. Fresenius zwei *A. fumigatus*-Isolate wie folgt: „Mycelium ästig, sparsam septiert, ungefärbt. Sporentragende Fäden nach oben allmählich keulenförmig verdickt, in ein kugelförmiges ... Köpfchen ausgehend ...“. Weiterhin beschrieb Fresenius eine rauchgraue Färbung bzw. grüne Sporen (Schmidt und Schmidt 1999). Die als „sporentragende Fäden“ bezeichneten Strukturen dienen der generativen Vermehrung von *A. fumigatus* und werden als Konidiophoren (Sporenträger) bezeichnet. Konidiophoren sind aus einer Stammzelle und den Phialiden aufgebaut, wobei

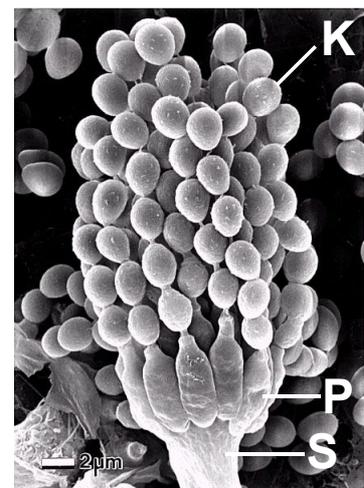


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors von *A. fumigatus*. Konidien (K), Phialiden (P) und die Stammzelle (S) sind markiert (Samson 1999).

letztere am Ende uninukleäre, haploide Konidien (Sporen) abschnüren (Abb. 1). Die Konidien werden vor allem durch Luftströmungen verbreitet und sind deshalb nahezu überall isolierbar. Bis heute konnte kein sexueller Entwicklungszyklus entdeckt werden, weshalb *A. fumigatus* in die künstliche Gruppe der Deuteromycota eingeordnet wird (Samson 1999).

Während der letzten Jahrzehnte wurde *A. fumigatus* der wichtigste über den Luftweg verbreitete pilzliche Krankheitserreger. So werden etwa 90% aller Invasiven Aspergillosen (IA), welche die vorherrschende und schwerwiegendste Form der Aspergillose in immunsupprimierten Patienten ist, durch diesen Keim verursacht (Denning 1998, Latgé 1999). Die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zur Bekämpfung dieser Erkrankung sind eingeschränkt, woraus die hohe Sterblichkeitsrate von 30-98% resultiert (Latgé 1999, Denning 1998). Unbehandelt führt diese Erkrankung in nahezu 100% aller Fälle zum Tod (Denning 1996). Obwohl *A. fumigatus* für deutlich mehr Infektionen verantwortlich ist als andere Vertreter, machen Konidien von *A. fumigatus* überraschenderweise nur einen geringen Anteil der *Aspergillus*-Konidien in der Umwelt aus (Rüchel und Reichard 1999, Brakhage und Langfelder 2002). Im Unterschied zu anderen *Aspergillus*-Arten ist *A. fumigatus* thermotolerant und kann bei Temperaturen bis zu 50 °C wachsen (Rüchel und Reichard 1999). Opportunistische Krankheitserreger zeichnen sich nicht durch speziell entwickelte Pathogenitätsmechanismen oder Virulenzfaktoren aus. Sie besitzen vielmehr oft physiologische Eigenschaften, die sie von verwandten Spezies unterscheiden und ihnen ermöglichen, unter bestimmten Bedingungen einen Wirtsorganismus zu besiedeln, sowie im Extremfall zu dessen Tod beizutragen. *A. fumigatus* Konidien z.B. sind sehr klein (2-3 µm) und können deshalb bis in die Lungenalveolen eingeatmet werden. Diese geringe Konidiengröße ist zwar vorteilhaft für eine Infektion, unterscheidet *A. fumigatus* aber nicht von anderen weniger erfolgreichen oder apathogenen Aspergillen. Andere pathogene Vertreter der Gattung *Aspergillus*, welche allerdings nur gelegentlich zu Erkrankungen führen, sind *A. flavus*, *A. terreus* oder *A. versicolor*. Vor allem *A. flavus* ist als Lebensmittelkeim von Bedeutung, weil er toxische z.T. krebserregende Substanzen wie Aflatoxin synthetisiert (Denning 1987).

Aspergillen sind für eine Reihe allergischer Erkrankungen verantwortlich. Unter anderem können Asthma, eine allergische Alveolitis oder die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) hervorgerufen werden. Weniger häufig treten auch Infektionen der oberen Atemwege (Sinusitis), der Haut (kutane Aspergillose), der Ohren (Otitis) oder Augen (Keratitis) auf (Rüchel und Reichard 1999). In Lungen, bei denen das Gewebe z.B. nach einer überstandenen Tuberkulose vorgeschädigt ist, können die Pilze als sogenanntes Aspergillom wachsen. All diese Krankheitsbilder haben gemeinsam, daß sie Personen betreffen können,

die keine Beeinträchtigung der körpereigenen Immunreaktionen aufweisen. Die Invasive Aspergillose (IA) hingegen betrifft hauptsächlich immunsupprimierte, oft neutropenische Patienten und wird wie schon erwähnt zu etwa 90% durch *A. fumigatus* hervorgerufen (Denning 1998). Zwischen 1987 und 1999 vervierfachte sich die Zahl der IA-Infektionen (Latgé 1999). Zahlreiche Studien besagen, daß schon 1992 die IA für etwa 30% aller Infektionen in Patienten verantwortlich war, welche nach Tumorerkrankungen verstarben (Latgé 1999). Weiterhin wurde angenommen, daß eine IA bei etwa 25 % aller Leukämie-Patienten auftritt, wobei in diesen Fällen die Sterblichkeitsrate selbst bei Behandlung mit 80-90% sehr hoch ist. So gehört die IA auch zu den häufigsten Todesursachen in Leukämiezentren sowie Knochenmarks- und Organtransplantationszentren (Patel und Paya 1997, Salonen und Nikoskelainen 1993). Bei der IA kommt es wie bei anderen Aspergillosen anfangs lediglich zu einem Pilzwachstum innerhalb der Atemwege. Anschließend nimmt die Erkrankung aber einen invasiven Verlauf, welcher zur Infiltrierung von Parenchymenten, der Penetration von anatomischen Barrieren sowie zur Invasion in Blutgefäße mit nachfolgender hämatogener Streuung des Erregers führt (Rüchel und Reichard 1999).

Verschiedenste Erkrankungen, aber auch die Behandlung mit immunsupprimierenden Substanzen, können in einer Senkung der Leukozytenzahlen resultieren. Werden dabei über längere Zeiträume bestimmte Grenzwerte unterschritten, so wird dieser Zustand als chronische Neutropenie bezeichnet. Zu den Leukozyten gehören Zelltypen, wie B- und T-Lymphozyten, aber auch Monozyten, gewebespezifische Makrophagen und die verschiedenen Granulozyten, welche für die angeborene und erworbene Immunität des menschlichen Organismus unerlässlich sind. Neutropenische Patienten stellen die wohl größte Gruppe von Risikopatienten für eine zur IA führende Infektion mit *A. fumigatus* dar. Die chronische granulomatöse Erkrankung (CGD, „Chronic Granulomatous Disease“) ist eine Erbkrankheit, bei der es zu einem Ausreifungsstopp der neutrophilen Granulozyten kommt. Weiterhin kann ein Defekt des Enzyms NADPH-Oxidase vorliegen, weshalb die für die Erregerabwehr wichtigen Sauerstoffradikale nicht mehr oder in unzureichender Menge gebildet werden können. Patienten mit CGD erkranken zu 25-40% an IA (Denning 1998).

Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten bilden nach den anatomischen Barrieren zwei unabhängige Verteidigungslinien gegen eine *A. fumigatus* Infektion (Schneemann und Schaffner 1999). Alveolarmakrophagen phagozytieren eingedrungene Konidien, inhibieren und töten diese ab, was zu einem kompletten Abbau führt. Diese Mechanismen erfolgen unabhängig vom Komplementsystem bzw. erworbenen, adaptativen Immunreaktionen (Schneemann und Schaffner 1999). Lange Zeit wurde angenommen, daß die Makrophagenaktivität

nicht von der Produktion von Sauerstoff- oder Stickstoffintermediaten abhängt. Philippe et al. (2003) hingegen zeigten, daß die Abtötung von *A. fumigatus* Konidien in Maus-Alveolarmakrophagen über reaktive Sauerstoffradikale vermittelt wird. Einige Konidien sind in der Lage, in Makrophagen zu keimen. In diesem Fall gibt es eine zweite Verteidigungslinie, welche durch die neutrophilen Granulozyten gebildet wird. Diese werden nach einer Infektion in der Lunge angelockt und damit aktiv rekrutiert. Mit oxidativen und nicht oxidativen Mechanismen, wie z.B. Defensinen, attackieren sie vor allem Pilzhypen, welche zu groß für eine Phagozytose sind (Schneemann und Schaffner 1999). Der Ausfall dieser Verteidigungslinien, wie er bei neutropenischen Patienten beobachtet wird, stellt demnach ein großes Risiko für die IA-Erkrankung dar.

Zahlreiche mögliche Virulenzfaktoren wurden mit dem Ergebnis untersucht, daß ihr Fehlen keinen oder nur geringen Einfluß auf die Virulenz von *A. fumigatus* hat (Latgé 1999). Dazu zählen unter anderem Enzyme, wie Phospholipasen, Serin- oder Aspartat-Proteasen sowie Katalasen. Diese Enzyme greifen Epithelzellen an, bauen humorale Faktoren wie Komplement oder Antikörper ab bzw. detoxifizieren reaktive Sauerstoffradikale (Birch et al. 1996, Monod et al. 1993, Reichard et al. 2000, Calera et al. 1997). Adhäsine, wie Hydrophobine, scheinen die Interaktion von *A. fumigatus* mit Wirtszellen zu fördern (Bouchara et al. 1995). Sekundärmetabolite wie z.B. Gliotoxin üben anscheinend einen immunsupprimierenden Einfluß aus (Sutton et al. 1994). Eine besondere Rolle in der Pathogenität von *A. fumigatus* scheinen Pigmente und dabei vor allem Melanine zu spielen (zur Übersicht: Langfelder et al. 2003, siehe Einleitung 3.1. und 3.2.). Aufgrund der bis heute gesammelten Daten ist es wahrscheinlich, daß die Virulenz von *A. fumigatus* ein multifaktorieller Prozess ist (Latgé 2001). Statt der Entwicklung wirtsspezifischer Virulenzfaktoren scheinen eher physiologische Eigenschaften für die Pathogenität dieses saprophytisch wachsenden Pilzes wichtig zu sein.

2. Die cAMP-Signaltransduktionskaskade

2.1. Aufbau und Konservierung der cAMP-Signaltransduktionskaskade in Pilzen

Die Erkennung von Umweltsignalen spielt eine essentielle Rolle für alle eukaryontischen Zellen. Viele verschiedene Signale werden an der Zelloberfläche wahrgenommen, mittels transmembraner Rezeptormoleküle übertragen und durch zytoplasmatische Signalwege weitergeleitet, um spezifische Reaktionen wie Genexpressionen, Proteinphosphorylierungen oder Zytoskelettveränderungen zu induzieren. Die cAMP-Signaltransduktion ist einer der wichtig-

sten Signalwege in Pilzen. Das sekundäre Signalmolekül cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) wird dabei als Reaktion auf extrazelluläre Signale gebildet und reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Einzelne Komponenten der cAMP-Signalkaskade konnten in zahlreichen Pilzen identifiziert werden. Daran ist die hohe evolutive Konservierung dieses Prinzips zur Signalweiterleitung erkennbar. In Tabelle 1 sind die bis heute identifizierten cAMP-Signalkomponenten von Pilzen zusammengefaßt, welche wichtige Modellorganismen bzw. humane oder pflanzliche Krankheitserreger darstellen.

Tab. 1: Konservierte cAMP-Signaltransduktionskomponenten aus Pilzen mit Modellcharakter bzw. wichtigen human- und pflanzenpathogenen Pilzen

Organismus	Gen	Genprodukt	Referenz	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>GPR1</i>	Gpa2p gekoppelter Rezeptor	Xue et al. 1998, Yun et al. 1998	
	<i>GPA2</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Nakafuku et al. 1988	
	<i>RAS1</i>	GTP-bindendes Protein	Kataoka et al. 1984, Toda et al. 1985	
	<i>RAS2</i>	GTP-bindendes Protein	Kataoka et al. 1984, Toda et al. 1985	
	<i>CYR1</i>	Adenylatzyklase	Matsumoto et al. 1984, Casperson et al. 1985	
	<i>PDE1</i>	Phosphodiesterase	Nikawa et al. 1987	
	<i>PDE2</i>	Phosphodiesterase	Sass et al. 1986	
	<i>BCY1</i>	regulatorische PKA-Untereinheit	Toda et al. 1987a	
	<i>TPK1</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Toda et al. 1987b	
	<i>TPK2</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Toda et al. 1987b	
	<i>TPK3</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Toda et al. 1987b	
	<i>N. crassa</i>	<i>gna-1, gba1</i>	G-Protein $\alpha_{(i)}$ -Untereinheit	Turner und Borkovich 1993
		<i>gna-2</i>	G-Protein α -Untereinheit	Turner und Borkovich 1993
		<i>gna-3, gba3</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Kays et al. 2000
<i>gnb-1</i>		G-Protein β -Untereinheit	Yang et al. 2002	
<i>cr-1, cyaA</i>		Adenylatzyklase	Kore-eda et al. 1991	
<i>mcb-1</i>		regulatorische PKA-Untereinheit	Bruno et al. 1996	
<i>Nc-ras</i>		GTP-bindendes Protein	Altschuler et al. 1990	
<i>Nc-ras2</i>		GTP-bindendes Protein	Kana-uchi 1997	
<i>A. nidulans</i>	<i>fadA</i>	G-Protein $\alpha_{(i)}$ -Untereinheit	Hicks et al. 1997	
	<i>ganA</i>	G-Protein α -Untereinheit	unveröffentlicht, SWISSPROT: Q9Y7E3	
	<i>ganB</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	unveröffentlicht, SWISSPROT: Q9UVK8	
	<i>sfaD</i>	G-Protein β -Untereinheit	Rosen et al. 1999	
	<i>rasA</i>	GTP-bindendes Protein	Som und Kolaparthi 1994	
	<i>cyaA</i>	Adenylatzyklase	Fillinger et al. 2002	
	<i>pkaA</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Shimizu und Keller 2001	
<i>C. albicans</i>	<i>CAG1</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Sandhu et al. 1992	
	<i>RAS1</i>	GTP-bindendes Protein	Feng et al. 1999	
	<i>CaCDC35</i>	Adenylatzyklase	Rocha et al. 2001	
	<i>TPK1</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Bockmühl et al. 2001	
	<i>TPK2</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Sonneborn et al. 2000	
<i>C. neoformans</i>	<i>GPA1</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Tolkacheva et al. 1994	
	<i>GPB1</i>	G-Protein β -Untereinheit	Wang et al. 2000	
	<i>RAS1</i>	GTP-bindendes Protein	Alspaugh et al. 2000	
	<i>RAS2</i>	GTP-bindendes Protein	Waugh et al. 2002	
	<i>CAC1</i>	Adenylatzyklase	Alspaugh et al. 2002	
	<i>PKR1</i>	regulatorische PKA-Untereinheit	D'Souza et al. 2001	
	<i>PKA1</i>	katalytische PKA-Untereinheit	D'Souza et al. 2001	
	<i>U. maydis</i>	<i>gpa1</i>	G-Protein $\alpha_{(i)}$ -Untereinheit	Regenfelder et al. 1997
<i>gpa2</i>		G-Protein α -Untereinheit	Regenfelder et al. 1997	

Organismus	Gen	Genprodukt	Referenz
<i>U. maydis</i>	<i>gpa3</i>	G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Regenfelder et al. 1997
	<i>gpa4</i>	G-Protein α -Untereinheit	Regenfelder et al. 1997
	<i>ras2</i>	GTP-bindendes Protein	Lee und Kronstad 2002
	<i>uac1</i>	Adenylatzyklase	Gold et al. 1994
	<i>ubc1</i>	regulatorische PKA-Untereinheit	Gold et al. 1994
	<i>adr1</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Dürrenberger et al. 1998
	<i>uka1</i>	katalytische PKA-Untereinheit	Dürrenberger et al. 1998
	<i>M. grisea</i>	<i>PTH11</i>	Transmembranrezeptor
<i>MAGA</i>		G-Protein $\alpha_{(s)}$ -Untereinheit	Liu und Dean 1997
<i>MAGB</i>		G-Protein $\alpha_{(i)}$ -Untereinheit	Liu und Dean 1997
<i>MAGC</i>		G-Protein α -Untereinheit	Liu und Dean 1997
<i>MAC1</i>		Adenylatzyklase	Adachi und Hamer 1998
<i>SUM1</i>		regulatorische PKA-Untereinheit	Adachi und Hamer 1998
<i>CPKA</i>		katalytische PKA-Untereinheit	Mitchell und Dean 1995
<i>CPK2</i>		katalytische PKA-Untereinheit	unveröffentlicht, EMBL: AA021201

Um die cAMP-Signaltransduktionskaskade zu aktivieren, muß zuerst ein Zelloberflächenrezeptor durch Erkennung eines spezifischen Signalmoleküls stimuliert werden. Obwohl solche Rezeptoren auf Aminosäureebene nur geringe Ähnlichkeiten aufweisen, besitzen sie eine konservierte Domänenstruktur. Sie enthalten sieben Bereiche mit hydrophoben Aminosäuren, welche die Zytoplasmamembran durchspannen (Dohlmann et al. 1991). Während der N-terminale Bereich außerhalb der Zelle lokalisiert ist, weist der C-Terminus ins Zytoplasma. Die Bindung des spezifischen Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Das Signal wird dann zu einem heterotrimeren G-Protein weitergeleitet, welches an der inneren Membranseite in Kontakt mit dem Rezeptor tritt. Heterotrimere G-Proteine sind aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit aufgebaut. Der Rezeptorkontakt führt zu einer Affinitäts-Reduzierung der $G\alpha$ -Untereinheit zum gebundenen GDP. Dieses wird daraufhin gegen GTP ausgetauscht. Die $G\alpha$ -Untereinheit ändert dann ihre Konformation und dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Heterodimer ab. In dieser aktivierten Form können $G\alpha$ -Untereinheiten frei im Zytoplasma diffundieren und mit intrazellulären Effektoren interagieren. Allerdings beinhalten sie eine interne GTPase-Aktivität, die eine schnelle Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i katalysiert. Die $G\alpha$ -Untereinheiten befinden sich deshalb nur für eine kurze Zeit im aktivierten Status, so daß die Zelle vor einer kontinuierlichen G-Protein-Signalweiterleitung geschützt ist (zur Übersicht: Gilman 1987). Die Spezifität heterotrimerer G-Proteine wird bei Pilzen hauptsächlich durch ihre α -Untereinheiten bestimmt. Aufgrund ihrer Funktion und Sequenzähnlichkeiten werden sie in drei Hauptgruppen eingeteilt (Bölker 1998). Während die Hauptgruppe I Proteine enthält, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel verringern können, weist Hauptgruppe III Vertreter auf, die zur Erhöhung des cAMP-Spiegels beitragen. Diese Auswirkungen auf den cAMP-Spiegel hängen mit der Fähigkeit der $G\alpha$ -Untereinheiten zusammen, die

cAMP-synthetisierende Enzymaktivität der Adenylatzyklase zu beeinflussen. Demnach werden Mitglieder dieser Hauptgruppen auch als inhibierende ($G\alpha_{(i)}$) bzw. aktivierende ($G\alpha_{(s)}$) $G\alpha$ -Untereinheiten bezeichnet (Bölker 1998). Proteine der Hauptgruppe II haben, sofern sie charakterisiert wurden, keinen Einfluß auf die cAMP-Synthese. Bei manchen Pilzen, z.B. *S. cerevisiae* sind auch Ras-Proteine, bei denen es sich um kleine G-Proteine handelt, in der Lage, Signale weiterzuleiten und auch die Adenylatzyklase-Aktivität zu beeinflussen (Thevelein und de Winde 1999). Die Adenylatzyklase synthetisiert cAMP, welches als sekundäres Signalmolekül hauptsächlich über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (auch Proteinkinase A [PKA]) wirkt. Das PKA-Holoenzym besitzt im nicht aktivierten Zustand eine tetramere Struktur, bestehend aus je zwei regulatorischen und katalytischen Untereinheiten (zur Übersicht: Taylor et al. 1990). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung der PKA durch Bindung von cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten, was in einer darauffolgenden Konformationsänderung und Dissoziation der katalytischen Untereinheiten resultiert. Dementsprechend müssen regulatorische Untereinheiten über cAMP-Bindemotive in ihrer Proteinsequenz verfügen. Diese Nukleotid-bindenden Domänen sind hochkonserviert und bestehen aus zwei „Tandem“-Kopien. Regulatorische PKA-Untereinheiten weisen außerdem eine konservierte „hinge“-Region auf. Dieses Sequenzmotiv ist wichtig für die Bindung der katalytischen PKA-Untereinheiten und ähnelt deren Substratbindestelle, wobei ein Serin-Rest die Autophosphorylierungsstelle der katalytischen Kinase-Aktivität darstellt (Taylor et al. 1990). Regulatorische PKA-Untereinheiten vom Typ II enthalten diesen Serin-Rest. Bei Untereinheiten vom Typ I ist dieser normalerweise durch Alanin oder Glycin ersetzt. Dieser Austausch führt zur Bildung einer sogenannten „Pseudophosphorylierungsstelle“. Innerhalb der „hinge“-Region sind Arginin-Reste für die direkte Proteinerkennung zwischen regulatorischen und katalytischen Untereinheiten von Bedeutung. Die Proteininteraktion zwischen den beiden regulatorischen Untereinheiten des PKA-Holoenzym kommt über den N-terminalen Bereich des Proteins vor der „hinge“-Region zu Stande. Sie besteht auch über die cAMP-Aktivierung hinaus. Während bei Typ I-Untereinheiten zwei Cystein-Reste durch Disulfidbrückenbildung zur Interaktion beitragen, ist bei Typ II-Proteinen der relativ hohe Gehalt an geladenen und polaren Aminosäure-Resten charakteristisch (Taylor et al. 1990). Katalytische PKA-Untereinheiten stellen die letzte konservierte Komponente der cAMP-Signaltransduktion dar. Sie phosphorylieren spezifische Serin- oder Threoninreste von Effektorproteinen, die über konservierte PKA-Bindesequenzen verfügen. Je nach Funktion können die Effektoren nach der Phosphorylierung aktiviert aber auch reprimiert vorliegen. cAMP-abhängige Phosphodiesterasen sind die zellulären Gegenspieler der

Adenylatzyklase-Aktivität. Durch Hydrolyse der zyklischen Bindung überführen sie cAMP zu AMP und schützen die Zelle somit vor konstitutiv aktiver Signalweiterleitung auf Ebene der PKA (Thevelein 1994). Die regulatorischen PKA-Untereinheiten nehmen wieder ihre Ausgangskonformation ein, in der sie eine hohe Affinität zur Bindung der katalytischen Untereinheiten haben. Durch diese Bindung werden die katalytischen Untereinheiten inaktiviert und die PKA-Signalweiterleitung ist beendet (Taylor et al. 1990).

2.2. cAMP-abhängige Regulation von Stoffwechsel und Morphogenese in Pilzen

Die zentrale Aufgabe der cAMP-Signaltransduktion in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist mit dem Erkennen bestimmter Nährstoffquellen verbunden, was in der Regulation unterschiedlicher biologischer Prozesse wie Wachstum, Metabolismus, Stressresistenz oder Übergang zur Meiose bzw. Differenzierung von Pseudohyphen resultiert (zur Übersicht: D'Souza und Heitman 2001, Lengeler et al. 2000, Thevelein und de Winde 1999). Diploide *S. cerevisiae*-Zellen sind in der Lage, in Reaktion auf Stickstoff-Limitierung bzw. bei Vorhandensein fermentierbarer Kohlenstoffquellen den Übergang zur filamentösen Wachstumsform zu vollziehen, was auch als Pseudohyphen-Differenzierung bezeichnet wird. Ras-Proteine und ein an die $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GPA2 gekoppelter Rezeptor spielen bei der Aktivierung der Adenylatzyklase unter den veränderten Nährstoffbedingungen eine wichtige Rolle. Ein weiteres Ras-übermitteltes physiologisches Signal, das zur Erhöhung des cAMP-Spiegels führt, ist die Ansäuerung des intrazellulären Milieus. Zwei Phosphodiesterasen, PDE1 und PDE2, sind in *S. cerevisiae* für die Gegenregulation des cAMP-Spiegels verantwortlich. Dabei zeigt PDE1 eine geringe, PDE2 dagegen eine hohe Bindeaffinität für das Substrat cAMP. Das cAMP-Zielprotein PKA besteht in *S. cerevisiae* aus der regulatorischen Untereinheit BCY1 und einer der drei katalytischen Untereinheiten TPK1, TPK2 oder TPK3. Während TPK2 die Pseudohyphen-Differenzierung aktiviert, zeigen TPK1 und TPK3 negativ regulatorische Effekte. Die verschiedenen PKA-Isoformen scheinen unterschiedliche Zielproteine zu haben. Im Gegensatz zu vielen anderen Pilzen ist die PKA-Aktivität in *S. cerevisiae* für das vegetative Wachstum wichtig (Toda et al. 1987b). Die Pseudohyphen-Differenzierung wird in *S. cerevisiae* durch die cAMP-Kaskade, aber auch durch den MAP-Kinase-Signalweg reguliert. Ein koordiniertes Zusammenwirken wird nicht zuletzt durch die Vernetzung beider Signalwege auf verschiedenen Ebenen realisiert (Kronstad et al. 1998).

Neurospora crassa ist ein weiterer wichtiger Modellorganismus, welcher als heterothallischer Ascomycet definierte asexuelle und sexuelle Lebenszyklen aufweist. Unter reichen Nährstoffbedingungen wächst dieser Pilz mit verzweigten Myzelien, welche aus mehrkernigen

Hyphenzellen bestehen. Vegetativ bildet *N. crassa* Konidiophoren, welche aus Lufthyphen ausdifferenziert werden und mehrkernige Makrokonidien enthalten. Aus dem vegetativ wachsenden Myzel kommt es weiterhin zur Ausdifferenzierung von kleineren, einkernigen Mikrokonidien. Die asexuelle Konidienbildung wird durch Nährstoffmangel, Trockenheit und Licht induziert. Ein Übergang zum sexuellen Entwicklungszyklus wird bei Stickstofflimitierung induziert. cAMP-Signaltransduktionsprozesse spielen in *N. crassa* eine wichtige Rolle in der Regulation dieser morphologischen Vorgänge, wie Konidienbildung und Paarung, aber auch in der Reaktion auf Hitzeschock und oxidativen Stress (zur Übersicht: Lengeler et al. 2000). Zu diesem Schluß kam man durch die Charakterisierung von Mutanten, welche Defekte in $G\alpha$ -Untereinheiten und Ras-Proteinen, der Adenylatzyklase sowie der regulatorischen PKA-Untereinheit aufwiesen.

Aspergillus nidulans ist einer der am besten untersuchten, filamentös wachsenden Ascomyceten und nahe mit *A. fumigatus* verwandt. Die cAMP-Signaltransduktion reguliert auch in diesem Organismus morphogenetische Prozesse, wie die asexuelle Entwicklung von Konidien. Interessanterweise ist dies mit der Bildung von Sekundärmetaboliten, z.B. Sterigmatocystin verknüpft (zur Übersicht: Calvo et al. 2002). Die G-Protein vermittelte Signalweiterleitung spielt eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen. Eine dominant aktivierte $G\alpha_{(i)}$ -Untereinheit FADA besitzt keine GTPase-Aktivität, so daß gebundenes GTP nicht mehr hydrolysiert werden kann. Diese konstitutive FADA-Aktivierung führt zu reduzierten cAMP-Spiegeln, welche in vegetativem Wachstum mit reduzierter Konidienbildung und verringerter Sterigmatocystin-Biosynthese resultiert (Shimizu und Keller 2001). Eine Inhibierung der cAMP-Kaskade auf Ebene der Adenylatzyklase (CYAA) bzw. der katalytischen PKA-Untereinheit (PKAA) führt ebenfalls zu morphologischen Defekten. Mutanten dieser Komponenten zeigen eine verzögerte Konidienkeimung, was wahrscheinlich auf eine reduzierte Mobilisierung von in Konidien gespeicherten Kohlenstoff-Reserven, wie Trehalose zurückzuführen ist (Fillinger et al. 2002). Adenylatzyklase-Mutanten weisen weiterhin eine deutliche Reduktion der asexuellen Konidienbildung auf (Fillinger et al. 2002). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, daß Mutanten der katalytischen PKA-Untereinheit PKAA eine gesteigerte asexuelle Konidienbildung zeigen (Shimizu und Keller 2001). Eine PKAA-Überexpression hingegen inhibiert die Konidienbildung, aber auch die Synthese von Sterigmatocystin. Die für die Regulation dieser Prozesse zuständigen Transkriptionsfaktoren BRLA bzw. AFLR scheinen demnach durch die PKA negativ reguliert zu werden (Calvo et al. 2002). Auch ein Ras-Protein (RASA) sowie eine $G\beta$ -Untereinheit (SFAD) scheinen in die Signalweiterleitung zur

Regulation der hier beschriebenen morphologischen und sekundärmetabolischen Prozesse involviert zu sein (Som und Kolaparthi 1994, Rosen et al. 1999, Calvo et al. 2002).

2.3. cAMP-abhängige Regulation von Virulenzprozessen in human- und pflanzenpathogenen Pilzen

In der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* stellt die Hyphen-Differenzierung, wie sie schon für *S. cerevisiae* beschrieben wurde, einen wichtigen Virulenzmechanismus dar. Wirtsspezifische Bedingungen, wie Serumkomponenten, N-Acetylglukosamin oder erhöhte Temperaturen steuern den Übergang von der Hefe zur hyphalen Wachstumsform. Erst diese erlaubt *C. albicans* eine Adhäsion und Penetration von humanen Zellen oder Geweben (Sonneborn et al. 2000). Dieses morphologische Umschalten geschieht in Abhängigkeit von der cAMP-Signaltransduktion. So zeigten Mutanten der *C. albicans* Adenylatzyklase, zweier katalytischer PKA-Untereinheiten sowie eines Ras-Proteins Defekte in der Hyphenbildung, welche zu attenuierter Virulenz in Tiermodellen und Makrophagen-Virulenzassays führten (Feng et al. 1999, Sonneborn et al. 2000, Bockmühl et al. 2001, Rocha et al. 2001, Leberer et al. 2001). Einer der im Bezug auf cAMP-Signaltransduktion und Virulenz am besten untersuchten Pilze ist der Basidiomycet *Cryptococcus neoformans*. Dieser kann lebensbedrohliche Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie die Cryptococccen-Meningitis verursachen. Da es sich um einen opportunistisch humanpathogenen Erreger handelt, gibt es bezüglich seiner medizinischen Bedeutung einige Parallelen zu *A. fumigatus*. So stieg die Zahl der *Cryptococcus*-Infektionen als Folge von vermehrt durchgeführten Organtransplantationen, chemotherapeutischen Tumorbehandlungen, Steroidbehandlungen, aber auch durch die Verbreitung des HIV-Virus deutlich an (Mitchell und Perfect 1995). Auch bei *C. neoformans* erfolgt eine Infektion des immunsupprimierten Wirts über die Atemwege. Kleine Hefezellen oder Sporen können bis in die Lungenalveolen vordringen (Lengeler et al. 2000). Von dort aus geht der Erreger in die Blutbahn über und wird systemisch im Körper verteilt, wobei er sich vorwiegend im ZNS ansiedelt. Die Produktion einer Kapsel und eines Dihydroxyphenylalanin (DOPA)-Melanins sind für die Pathogenität von *C. neoformans* besonders wichtig. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß diese Faktoren durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert werden. So wiesen *C. neoformans*-Mutanten der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GPA1, der Adenylatzyklase CAC1 sowie der katalytischen PKA-Untereinheit PKA1 Defekte in Melaninsynthese und Kapselbildung auf, die zu deutlich attenuierter Virulenz führten (Alspaugh et al. 1997, D'Souza et al. 2001). PKR1-Mutanten hingegen sind in der regulatorischen PKA-Untereinheit defekt und verfügen deshalb über eine konstitutiv aktive PKA-Signalweiterleitung. Dement-

sprechend zeigten sie eine stärkere Kapselbildung und erhöhte Virulenz im Vergleich mit Wildtypzellen (D'Souza et al. 2001). Weiterhin ist die Aktivität eines Ras-Proteins für das Wachstum von *C. neoformans* bei 37 °C wichtig und deshalb auch essentiell für die Virulenz des Pilzes (Alspaugh et al. 2000).

Auch wichtige pflanzenpathogene Pilze besitzen cAMP-regulierte Pathogenitätsmechanismen, die eng mit morphologischen Eigenschaften verknüpft sind. Hierzu zählen etwa der Basidiomycet *Ustilago maydis*, welcher Tumoren an Maispflanzen verursacht oder *Magnaporthe grisea*, ein Ascomycet und wichtigster Erreger von Reiskrankheiten. Auch in *U. maydis* ist die cAMP-Signaltransduktion für das Umschalten von hefeartigem auf hyphales Wachstum wichtig (Kahmann et al. 1999). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* führt aber das Abschalten des Signalweges in *U. maydis* zu konstitutiv filamentösem Wachstum. Stämme mit Mutationen in der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GPA3, der Adenylatzyklase UAC1 sowie der katalytischen PKA-Untereinheit ADR1 zeigen diesen Phänotyp (Regenfelder et al. 1997, Gold et al. 1994, Dürrenberger et al. 1998). Für die Virulenz von *U. maydis* ist die Bildung eines stabilen infektiösen, dikaryontischen Myzels notwendig, was die Paarung zweier kompatibler Partnerzellen und die Bildung eines Transkriptionsregulators voraussetzt. Zwei verschiedene Gen-Loci, *a* und *b*, sind für die Paarung von Bedeutung. Der *a*-Locus kodiert Pheromone sowie Pheromon-Rezeptoren und kontrolliert somit die Zell-Zell-Erkennung und Fusion. Der *b*-Locus hingegen kodiert zwei Homeodomänen-Proteine, bE und bW. Diese bilden, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen, den Transkriptionsregulator. GPA3-, UAC1- und ADR1-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, Pheromon-induzierte Signale weiterzuleiten, was in der Transkription der verschiedenen Paarungstyp-Loci *a* und *b* resultieren würde. Deswegen können sie auch kein stabiles, dikaryontisches Myzel produzieren und sind avirulent (zur Übersicht: Kronstad et al. 1998). Weiterhin ist die Aktivität eines Ras-Proteins für Morphogenese, Pheromonantwort und Pathogenität von *U. maydis* wichtig (Lee und Kronstad 2002). Wachstum und Virulenz von *U. maydis* setzen außerdem eine fein regulierte Interaktion von cAMP-Kaskade und MAP-Kinase-Signalweg voraus (Kronstad et al. 1998). Eine pathogene Entwicklung von *M. grisea* erfordert die Bildung eines Appressoriums. Bei diesem handelt es sich um eine spezielle Infektionsstruktur, mit der die Blattoberfläche penetriert wird und die somit invasives Pilzwachstum erlaubt. Die Appressorienbildung wird durch cAMP reguliert. So zeigen *M. grisea* Mutanten der Adenylatzyklase MAC1, der katalytischen PKA-Untereinheit CPKA sowie der $G\alpha_{(i)}$ -Untereinheit MAGB Appressoriendefekte und sind deswegen in ihrer Virulenz attenuiert (Adachi und Hamer 1998, Mitchell und Dean 1995, Liu und Dean 1997). Interessanterweise konnte in *M. grisea* ein Rezeptorprotein PTH11 identifi-

ziert werden, welches für die Erkennung der Blattoberfläche von Reispflanzen wichtig zu sein scheint (DeZwaan et al. 1999). PTH11-Mutanten zeigen ebenfalls Defekte in der Appressorienbildung, so daß eine Verbindung von PTH11 zur cAMP-Kaskade möglich sein könnte. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß in verschiedenen Pilzen eine Reihe morphologischer Prozesse und Pathogenitätsmechanismen durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert werden. Dabei weist das cAMP-Netzwerk einen hohen Grad an Konservierung auf.

3. Die *A. fumigatus* Virulenzdeterminante PKSP

3.1. Dihydroxynaphthol-Melanin Biosynthese in *A. fumigatus*

A. fumigatus bildet grau-grün gefärbte Konidien als asexuelle Verbreitungsformen. Biochemische Analysen deuteten darauf hin, daß das in die Konidienwand eingelagerte farbgebende Pigment ein Dihydroxynaphthol (DHN)-Melanin ist (Wheeler und Klich 1995). Durch Zugabe von Tricyclazol konnte die Aktivität von Reduktasen in der DHN-Melaninbiosynthese von *Colletotrichum lagenarium*, *Alternaria alternata* und *M. grisea* spezifisch inhibiert werden (Wheeler und Bell 1988). Dies war auch in *A. fumigatus* möglich und führte zu der Annahme, daß es sich auch hier um ein DHN-Melanin handelt. Nach Inhibierung einzelner Reaktionsschritte konnten Zwischen- und Nebenprodukte des DHN-Melaninbiosyntheseweges in *Wangiella dermatitidis* durch Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analysen charakterisiert werden (Wheeler und Stipanovic 1985). Diese und ähnliche Untersuchungen in *Verticillium dahliae* (Wheeler 1981, 1982) führten zur Postulierung des Biosyntheseweges (Abb. 2), wie er später auch in *A. fumigatus* bestätigt werden sollte (Langfelder et al. 1998, Tsai et al. 1998). Bei der *A. fumigatus* DHN-Melaninbiosynthese werden fünf Malonyl-CoA-Reste enzymatisch zu einem Heptaketid zusammengelagert, bei dem es sich möglicherweise um Naphthopyron (YWA1) handelt. In weiteren Reaktionen wird dieses zu einem Tetrahydroxynaphthol (THN) umgewandelt und dann schrittweise zur namensgebenden Substanz 1,8-DHN reduziert (zur Übersicht: Langfelder et al. 2003). Die Verknüpfung der fünf Malonyl-CoA-Reste wird im ersten Schritt durch eine Polyketid-Synthase katalysiert. In *A. fumigatus* kodiert ein Gen für dieses Enzym, welches gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen isoliert wurde und deshalb unterschiedliche Bezeichnungen, *pksP* (Langfelder et al. 1998) oder *alb1* (Tsai et al. 1998), trägt. In dieser Arbeit werden die Nomenklaturen *pksP* und PKSP für die Bezeichnung des Polyketid-Synthase kodierenden Gens bzw. des gebildeten Genprodukts genutzt. Polyketid-Synthasen vom Typ I, zu denen auch PKSP gehört, sind modular aufgebaut. Sie beinhalten

konservierte Sequenzmotive wie β -Ketosynthase-, Acyl-Transferase- oder Acyl-Carrier-Domänen sowie ein Zyklase-Motiv vom Claisen-Typ (Hopwood und Sherman 1990, Watanabe et al. 2000).

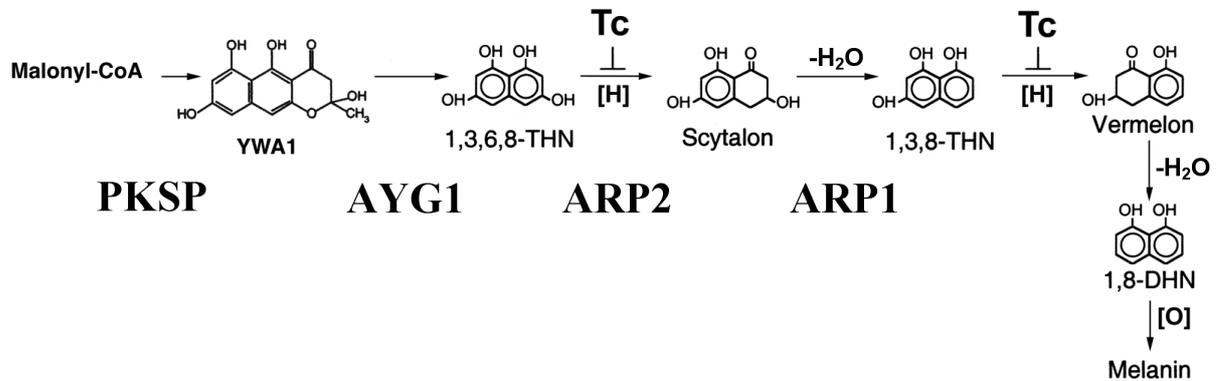


Abb. 2: DHN-Melaninbiosynthese in *A. fumigatus*. Die Zwischenprodukte des Biosyntheseweges sind strukturell dargestellt. Soweit bekannt sind den einzelnen Reaktionsschritten die Bezeichnungen der sie katalysierenden Enzyme zugeordnet. Die mit Tricyclazol hemmbaren Reduktionsreaktionen ([H]) sind mit Tc, Dehydratisierungsreaktionen mit -H₂O gekennzeichnet. Die Reaktionsschritte nach 1,8-Dihydroxynaphthol (1,8-DHN) sind nicht bekannt. Möglicherweise sind dabei Oxidationsreaktionen ([O]) involviert. Weitere Abkürzungen: YWA1 - Naphthopyron, THN - Tetrahydroxynaphthol.

Ein Naphthopyron ist das Produkt der ersten enzymatischen Reaktion des Biosyntheseweges. Dieses konnte bisher nicht biochemisch in *A. fumigatus* nachgewiesen werden (Watanabe et al. 2000). Allerdings kodiert das *A. fumigatus* *ayg1*-Gen ein Enzym, das für die Umwandlung von Naphthopyron in 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthol (1,3,6,8-THN) verantwortlich sein könnte (Tsai et al. 2001). 1,3,6,8-THN wird im folgenden Schritt durch eine spezifische Reduktase zum Scytalon reduziert. Diese Reduktase wird in *A. fumigatus* durch das *arp2*-Gen kodiert (Tsai et al. 1999). Eine Dehydratase (ARP1) katalysiert unter Wasserabspaltung die anschließende Umwandlung von Scytalon zum 1,3,8-Trihydroxynaphthol (1,3,8-THN) (Tsai et al. 1997). Mittels weiterer Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen wird 1,3,8-THN dann über Vermelon zum 1,8-Dihydroxynaphthol (1,8-DHN) umgesetzt. Dabei scheint der zweite Reduktionsschritt durch eine bis heute noch nicht identifizierte 1,3,8-THN-Reduktase katalysiert zu werden, da auch ein *A. fumigatus* *arp2*-Deletionsstamm diese Reaktion durchführen kann (Tsai et al. 1999). Letztlich polymerisiert 1,8-DHN dann zum DHN-Melanin. In diese abschließende Reaktion sind bei *A. fumigatus* möglicherweise eine Laccase oder eine Kupfer-bindende Oxidase involviert, welche von den Genen *abr2* bzw. *abr1* kodiert werden (Tsai et al. 1999). In zahlreichen anderen Pilzen konnten auch Komponenten identifiziert werden, welche die hier beschriebenen Reaktionsschritte katalysieren und die damit zur DHN-Melaninbiosynthese in diesen Organismen beitragen (Langfelder et al. 2003). Interessanterweise sind die Gene *pksP*, *arp1*, *arp2*, *abr1*, *abr2* und *ayg1* bei *A. fumigatus* in einem „Cluster“ organisiert. Eine solche Genorganisation tritt bei Eukaryonten nur in wenigen Fäl-

len auf. Allerdings liegen Gene, welche für Komponenten anderer pilzlicher Sekundärmetabolismus-Prozesse kodieren, auch in „Clustern“ vor. So weisen die Biosynthesegene für pilzliche β -Lactam-Antibiotika ebenfalls eine solche Organisation auf (Brakhage 1998).

3.2. Entdeckung und Charakterisierung der Polyketid-Synthase PKSP aus *A. fumigatus*

Die Identifizierung der *A. fumigatus* Polyketid-Synthase aus dem DHN-Melanin-Biosyntheseweg bzw. des dafür kodierenden Gens erfolgte unabhängig von zwei Gruppen (Langfelder et al. 1998, Tsai et al. 1998). Dabei wurden durch Mutagenese-Ansätze erzeugte Stämme, die keine Pigmentierung der Konidien mehr aufwiesen und deshalb weiß waren, mit einer genomischen *A. fumigatus* Cosmidgenbank transformiert. Dies führte zur Komplementation des Pigmentsynthesedefekts und letztlich zur Isolierung des *pksP*- bzw. *alb1*-Gens sowie weiterer in die Melaninbildung involvierter Komponenten. Die weiß sporulierenden *A. fumigatus* Mutanten waren vor allem aufgrund ihrer deutlich attenuierten Virulenz interessant (Jahn et al. 1997, Tsai et al. 1998). Außerdem wiesen sie eine Veränderung der Konidienoberfläche auf. Während Wildtyp-Konidien eine rauhe, ornamentierte Oberflächenstruktur zeigten, waren die *pksP*- bzw. *alb1*-Mutanten-Konidien glatt (Jahn et al. 1997, Tsai et al. 1998). Nach Komplementation der Mutanten mit dem *pksP*- bzw. *alb1*-Gen bildeten die Stämme wieder grau-grüne, ornamentierte Konidien, die nach Infektion von Versuchstieren die gleiche Virulenz hervorriefen wie Wildtyp-Stämme (Langfelder et al. 1998, Tsai et al. 1998). Dies zeigte, daß der Defekt der Polyketid-Synthase für alle beobachteten Phänotypen verantwortlich war.

Die *A. nidulans* *wA*-Mutante trägt einen Defekt in einer PKSP-homologen Polyketid-Synthase (Mayorga und Timberlake 1992). Konidien dieses Stammes sind zwar ebenfalls weiß, besitzen aber immer noch eine ornamentierte Oberfläche (Jahn et al. 2000). Eine ornamentierte Oberfläche von *A. fumigatus* Wildtyp-Konidien scheint die Bindung von C3-Komplement zu inhibieren (Tsai et al. 1998). Durch die Bindung von Komplementfaktoren werden Antigene für phagozytierende Immunzellen besser erkennbar gemacht. *A. fumigatus* *pksP*- und *A. nidulans* *wA*-Mutanten-Konidien zeigten eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber H_2O_2 als Wildtyp-Konidien beider Pilze (Jahn et al. 2000). In weiteren Untersuchungen wurden Monozyten oder neutrophile Granulozyten zur Sekretion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, „Reactive Oxygen Species“) angeregt und mit Konidien der *A. fumigatus* bzw. *A. nidulans* Mutanten und Wildtypen inkubiert. Zellen, welche ohne Zugabe von Konidien analysiert wurden, produzierten 80-90% mehr ROS als mit Wildtyp-Konidien inkubierte Zellen (Jahn et al. 2000). Dieses Ergebnis deutete bei *A. fumigatus* und bei *A. nidulans* auf eine Funktion des

Sporenpigments in der Detoxifizierung von ROS hin. Im Vergleich mit Ansätzen ohne Konidien stimulierten Konidien der *pksP*- und *wA*-Mutanten sogar die zelluläre ROS-Produktion (Jahn et al. 2000). Es könnte demnach sein, daß DHN-Melanine eine Schutzfunktion gegenüber diesen toxischen Radikalen erfüllen. Diese scheint allerdings nicht von der Konidienoberfläche abzuhängen, da diese bei *A. nidulans wA*-Mutanten noch ornamentiert war (Jahn et al. 2000). Weiterhin werden Konidien der *pksP*-Mutante von Makrophagen effektiver abgetötet als Wildtyp-Konidien (Jahn et al. 2002). Makrophagen, welche *A. fumigatus* Wildtyp-Konidien phagozytiert hatten, zeigten außerdem eine Inhibierung der Phagolysosomenfusion, welche zum Abbau von Pathogenen essentiell ist (Jahn et al. 2002). Dies war bei Ansätzen mit Konidien der *pksP*-Mutante nicht der Fall. Eine Expressionsanalyse mittels des GFP-Reporterproteins verdeutlichte, daß das *pksP*-Gen hauptsächlich in den Phialiden und Konidien von sporulierenden *A. fumigatus*-Kulturen expremiert wird (Langfelder et al. 2001). Aber auch nach Infektion immunsupprimierter Mäuse konnte eine *pksP*-Expression bei der Konidienkeimung beobachtet werden. Die hier dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, daß DHN-Melanin und speziell die Polyketid-Synthase PKSP wichtig für die Virulenz von *A. fumigatus* ist. Dabei scheint die *pksP*-Expression bei der Interaktion von *A. fumigatus* mit Immuneffektorzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine besondere Rolle zu spielen.

3.3. Dihydroxynaphthol-Melanin in human- und pflanzenpathogenen Pilzen

Für eine Reihe von human- und pflanzenpathogenen Pilzen konnte gezeigt werden, daß DHN-Melanin für die Virulenz wichtig ist (zur Übersicht: Langfelder et al. 2003). In den humanpathogenen Pilzen *W. dermatitidis* und *Sporothrix schenckii* ist DHN-Melanin wahrscheinlich für den Schutz von Hyphen und Konidien verantwortlich (Wheeler und Bell 1988, Romero-Martinez et al. 2000). Dabei scheint es in der Lage zu sein, von Immunzellen gebildete ROS zu detoxifizieren und einen Schutz vor Phagozytose zu vermitteln. Defekte in der *W. dermatitidis* Polyketid-Synthase (WdPKS1) resultieren ebenso wie bei *A. fumigatus* in der Bildung weißer Konidien. Im Mausinfektionsmodell wiesen diese Mutanten eine deutlich reduzierte Virulenz auf (Feng et al. 2001). Desweiteren wurden sie effektiver als Wildtyp-Stämme durch humane Granulozyten abgetötet. Die Beobachtung, daß *S. schenckii*-Mutanten mit Melanindefekten effizienter als Wildtyp-Zellen durch humane Monozyten phagozytiert werden (Romero-Martinez et al. 2000), verdeutlicht ebenfalls die Bedeutung des DHN-Melanins bei der Interaktion der pilzlichen Krankheitserreger mit dem menschlichen Immunsystem. In den pflanzenpathogenen Pilzen *M. grisea* und *C. lagenarium* ist DHN-Melanin für die Ausbildung eines Appressoriums wichtig. Mit diesen Strukturen kann die Blattoberfläche

der infizierten Pflanze penetriert werden, so daß ein anschließendes invasives Wachstum des Pilzes im Gewebe ermöglicht wird. Für die Blattpenetration ist die Ausbildung eines hohen Turgordruckes innerhalb des Appressoriums nötig (De Jong et al. 1997). Dieser wird durch eine verstärkte Glyzerolsynthese erzeugt. Erst durch die Einlagerung von DHN-Melanin in die Appressorienzellwand wird eine Barriere aufgebaut, die es den Pilzen erlaubt, Glyzerol in den Zellen zurückzuhalten und gleichzeitig dem hohen Turgordruck zu widerstehen (Howard und Valent 1996). *M. grisea* Mutanten mit Defekten in der DHN-Melaninsynthese sind nicht mehr in der Lage, den zellulären Turgor aufzubauen. Deshalb können sie auch keine Blattoberflächen mehr penetrieren und sind avirulent (Howard und Valent 1996).

4. Ziele der Arbeit

In zahlreichen Pilzen konnte eine Regulation zellulärer Prozesse, wie Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung durch konservierte cAMP-Signaltransduktionskaskaden nachgewiesen werden. Ebenso werden aber auch Virulenzmechanismen, wie z.B. Veränderungen der Wachstumsform oder Melaninbiosynthesen in human- und pflanzenpathogenen Pilzen durch cAMP beeinflusst. Das Ziel dieser Arbeit sollte ein Nachweis der cAMP-Signaltransduktion in dem humanpathogenen Pilz *A. fumigatus* sein. Dabei stand die Untersuchung einer möglichen Verknüpfung von cAMP-Kaskade mit morphologischen und virulenzspezifischen Entwicklungen von *A. fumigatus* im Mittelpunkt. Dies sollte durch die Deletion konservierter Elemente der Kaskade mit anschließender Charakterisierung der Deletionsphänotypen realisiert werden. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die Untersuchung eines möglichen Einflusses der cAMP-Signaltransduktion auf die Virulenz von *A. fumigatus*. Im Vorfeld wurde die Polyketid-Synthase PKSP als Virulenzdeterminante charakterisiert. Um eine mögliche Verknüpfung der DHN-Melaninbiosynthese mit dem cAMP-Signalweg nachzuweisen, sollte die *pksP*-Expression in verschiedenen Deletionsstämmen analysiert werden. Weiterhin war es unerlässlich, die Virulenz der konstruierten Deletionsstämme *in vivo* und *in vitro* zu testen. Die *in vitro*-Analysen wurden mittels eines Makrophagen-Assays durchgeführt. Für die *in vivo*-Studien sollte in dieser Arbeit ein Mausinfektionsmodell etabliert und optimiert werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Bakterienstämme, Pilzstämme und Plasmide

Der Genotyp und die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit konstruierten und eingesetzten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterien- und Pilzstämme.

Stamm	Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10F'	F' (<i>lacI^h</i> , Tn10, Tet ^R), <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacX74</i>), <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
GM2163	F' <i>dam-13::Tn9</i> (Cam ^R), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , (<i>rk m k⁺</i>), <i>leuB6</i> , <i>hisG4</i> , <i>thi-1</i> , <i>araC14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL136</i> , (<i>Str^R</i>), <i>fhuA31</i> , <i>tsx-78</i> , <i>glnV44</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
XL1-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^h</i> ΔM15, Tn10(<i>tet^f</i>)]	Stratagene, Heidelberg
SOLR TM	e14' (<i>mcrA</i>), Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171, <i>sbcC</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>umuC::tn5</i> (kan ^r), <i>uvrC</i> , <i>lac</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , λ ^R [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^h</i> ΔM15] Su ⁻ (nonsuppressing)	Stratagene, Heidelberg
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
ATCC 46645	Wildtyp	ATCC
CEA17	<i>pyrG1</i>	CBS 144-89 (d'Enfert, 1996)
Δ <i>gpaB</i>	<i>gpaB::hph^a</i> ; Δ <i>gpaB</i> , Hyg ^R	diese Arbeit
CEA17Δ <i>gpaB</i>	<i>pyrG1</i> , <i>gpaB::(neo-A.n.pyrG-neo)^b</i> ; Δ <i>gpaB</i>	diese Arbeit
Δ <i>acyA</i>	<i>acyA::hph^a</i> ; Δ <i>acyA</i> , Hyg ^R	diese Arbeit
CEA17Δ <i>acyA</i>	<i>pyrG1</i> , <i>acyA::(neo-A.n.pyrG-neo)^b</i> ; Δ <i>acyA</i>	diese Arbeit
Δ <i>pkaC1</i>	<i>pkaC1::hph^a</i> ; Δ <i>pkaC1</i> , Hyg ^R	diese Arbeit
CEA17Δ <i>pkaC1</i>	<i>pyrG1</i> , <i>pkaC1::(neo-A.n.pyrG-neo)^b</i> ; Δ <i>pkaC1</i>	diese Arbeit
CEA17Δ <i>gpaBpyrG</i>	<i>pyrG1</i> , <i>gpaB::(neo)</i> ; Δ <i>gpaB</i>	diese Arbeit
CEA17Δ <i>pkaC1pyrG</i>	<i>pyrG1</i> , <i>pkaC1::(neo)</i> ; Δ <i>pkaC1</i>	diese Arbeit
CEA17 <i>pksP-lacZ</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_P-lacZ</i> , PyrG ⁺	Gattung, 2001
CEA17Δ <i>gpaBpksP-lacZ</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_P-lacZ</i> , <i>gpaB::(neo)</i> ; Δ <i>gpaB</i> , PyrG ⁺	diese Arbeit
CEA17Δ <i>pkaC1pksP-lacZ1</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_P-lacZ</i> , <i>pkaC1::(neo)</i> ; Δ <i>pkaC1</i> , PyrG ⁺	diese Arbeit
CEA17Δ <i>pkaC1pksP-lacZ2</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_P-lacZ</i> , <i>pkaC1::(neo)</i> ; Δ <i>pkaC1</i> , PyrG ⁺	diese Arbeit
CEA17 <i>pksP</i> ΔSTRE- <i>lacZ</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_PΔSTRE-lacZ</i> , PyrG ⁺ (STRE-Element im <i>pksP</i> -Promotor mutiert)	diese Arbeit
CEA17 <i>pksP</i> ΔSSA3- <i>lacZ</i>	<i>pyrG1::pyrG2</i> , <i>pksP_PΔSSA3-lacZ</i> , PyrG ⁺ (SSA3-Element im <i>pksP</i> -Promotor mutiert)	diese Arbeit
CEA17Δ <i>gpaB</i> Δ <i>pabaA</i>	<i>pyrG1</i> , <i>gpaB::(neo)</i> ; Δ <i>gpaB</i> , <i>pabaA::(neo-A.n.pyrG-neo)^b</i> ; Δ <i>pabaA</i>	diese Arbeit
CEA17Δ <i>gpaB</i> Δ <i>pabaA</i> <i>pyrG</i>	<i>pyrG1</i> , <i>gpaB::(neo)</i> ; Δ <i>gpaB</i> , <i>pabaA::(neo)</i> ; Δ <i>pabaA</i>	diese Arbeit
<i>pkaC1</i> eGFP	<i>pkaC1-egfp</i> , Hyg ^R	diese Arbeit
Δ <i>lysF</i>	<i>lysF::hph^a</i> ; Δ <i>lysF</i> , Hyg ^R (entspricht TWM6)	Mühleisen, 2001
<i>Aspergillus nidulans</i>		
SMI45	<i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>wA3</i> ; <i>veA1</i>	M. Brock, pers. Mitteilung

^a *hph*: *E. coli* Hygromycin B Phosphotransferase Gen

^b *neo*: Tn5 Neomycin Phosphotransferase Gen; *A.n.pyrG*: *Aspergillus niger pyrG* Gen

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Stamm	Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
pUC18	Amp ^R , Klonierungsvektor	Yanisch-Perron et al., 1985
pUC18HincII p123	Amp ^R , <i>HincII</i> -Restriktionsschnittstelle entfernt Amp ^R , <i>egfp</i>	diese Arbeit C. Aichinger/R. Kahmann, pers. Mitteilung
pCDA14 pUChph1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a Amp ^R , Hyg ^R , enthält <i>hph</i> -Gen aus <i>E. coli</i>	d'Enfert, 1996 K. Hübner, pers. Mitteilung
pKL1 pUCGH-pksP1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>pksP</i> -Gen Amp ^R , Hyg ^R , enthält Promotor und 5'-Ende des <i>pksP</i> -Gens fusioniert mit <i>egfp</i> -Gen	Langfelder,2001 Langfelder,2001
pUCpyrG2lacZ	Amp ^R , enthält mutiertes <i>A. fumigatus pyrG</i> -Gen und <i>E. coli lacZ</i> -Gen	Gattung, 2001
pUCpyrG2pksP-lacZ	Amp ^R , enthält mutiertes <i>A. fumigatus pyrG</i> -Gen und 1,37 kbp <i>pksP</i> -Promotor fusioniert mit <i>E. coli lacZ</i> -Gen	Gattung, 2001
cosgpaA1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>gpaA</i> -Gen	diese Arbeit
cosgpaB1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>gpaB</i> -Gen	diese Arbeit
cosacyA1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>acyA</i> -Gen	diese Arbeit
cospkaR1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>pkaR</i> -Gen	diese Arbeit
cospkaC1-1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>pkaC1</i> -Gen	diese Arbeit
cospabaA1	Amp ^R , Hyg ^R , Cosmid, enthält <i>pabaA</i> -Gen	diese Arbeit
pBKS _{pkaC1-1}	Amp ^R , enthält <i>pkaC</i> cDNA-Fragment	diese Arbeit
pTAgpaB1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>gpaB</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pTOPO _{acyA1}	Amp ^R , Kan ^R , enthält katalytisches Zentrum des <i>acyA</i> -Gens sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pTOPO _{pkaRup1}	Amp ^R , Kan ^R , enthält stromaufwärts flankierenden DNA-Bereich des <i>pkaR</i> -Gens	diese Arbeit
pTOPO _{pkaRdown1}	Amp ^R , Kan ^R , enthält stromabwärts flankierenden DNA-Bereich des <i>pkaR</i> -Gens	diese Arbeit
pTApkaC1-1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pkaC1</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pTApabaA1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pabaA</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pUCgpaB1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>gpaB</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pUCgpaBPst1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>gpaB</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche, <i>PstI</i> -Restriktionsschnittstelle im pUC18-Polylinker entfernt	diese Arbeit
pUCacyA1	Amp ^R , Kan ^R , enthält katalytisches Zentrum des <i>acyA</i> -Gens sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pUCpkaRup1	Amp ^R , Kan ^R , enthält stromaufwärts flankierenden DNA-Bereich des <i>pkaR</i> -Gens	diese Arbeit
pUCpkaR1	Amp ^R , Kan ^R , enthält stromaufwärts und stromabwärts flankierende DNA-Bereiche des <i>pkaR</i> -Gens	diese Arbeit
pUCpkaC1-1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pkaC1</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pUCpabaA1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pabaA</i> -Gen sowie dazu flankierende DNA-Bereiche	diese Arbeit
pUCgpaBhph1	Amp ^R , Hyg ^R , <i>gpaB</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCgpaBUra1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a , <i>gpaB</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCHygacyA2	Amp ^R , Hyg ^R , <i>acyA</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCacyAUra1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a , <i>acyA</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCpkaRUra1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a , <i>pkaR</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCpkaC1hph1	Amp ^R , Hyg ^R , <i>pkaC</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCpkaC1Ura1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a , <i>pkaC1</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pUCpabaAUra1	Amp ^R , Kan ^R , (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>) ^a , <i>pabaA</i> -Deletionsvektor	diese Arbeit
pHygeGFP1	Amp ^R , Hyg ^R , <i>egfp</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
pTApkaC1-2	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pkaC1</i> -Promotor und -Gen	diese Arbeit
pHygpkaC1eGFP1	Amp ^R , Hyg ^R , enthält <i>pkaC1</i> -Promotor und -Gen fusioniert mit <i>egfp</i> -Gen	diese Arbeit
pTApkaC1-3	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>pkaC1</i> -Gen ab ATG-Startcodon	diese Arbeit
pTAgpdA1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>A. fumigatus gpdA</i> -Promotor	diese Arbeit
pTApacuDAf1	Amp ^R , Kan ^R , enthält <i>A. fumigatus acuD</i> -Promotor	M. Brock, pers. Mitteilung
pTApksPASTRE1	Amp ^R , enthält 1,37 kbp <i>pksP</i> -Promotor mutiert im STRE-Element	diese Arbeit
pTApksPASSA3-1	Amp ^R , enthält 1,37 kbp <i>pksP</i> -Promotor mutiert im SSA3-Element	diese Arbeit
pUCpyrG2pksPASTRE-lacZ1	Amp ^R , enthält mutiertes <i>A. fumigatus pyrG</i> -Gen und 1,37 kbp <i>pksP</i> -Promotor mutiert im STRE-Element und fusioniert mit <i>E. coli lacZ</i> -Gen	diese Arbeit
pUCpyrG2pksPASSA3-lacZ1	Amp ^R , enthält mutiertes <i>A. fumigatus pyrG</i> -Gen und 1,37 kbp <i>pksP</i> -Promotor mutiert im SSA3-Element und fusioniert mit <i>E. coli lacZ</i> -Gen	diese Arbeit

^a *neo*: Tn5 Neomycin Phosphotransferase Gen; *A.n.pyrG*: *Aspergillus niger pyrG* Gen

1.2. Nährmedien

Die nachfolgend aufgeführten Medien wurden zur Kultivierung der verschiedenen Organismen verwendet. Prozentangaben sind, soweit nicht anders angegeben, w/v-Angaben.

LB-Medium (-Agar):

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; (15 g/l Agar)

NZY-Medium (-Agar):

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 2 g/l MgSO₄; (7 g/l Agarose); pH 7,5

Aspergillus Minimal Medium (AMM) (-Agar):

6 g/l NaNO₃; 1,52 g/l K₂HPO₄; 0,52 g/l KCl; (30 g/l Agar); pH 6,5

Zugabe folgender Lösungen nach dem Autoklavieren: 1 % Glukose; 0,05 % MgSO₄; 1 ml/l Spurenelementelösung

Spurenelementelösung: 1 g/l FeSO₄ · 7 H₂O; 8,8 g/l ZnSO₄ · 7 H₂O; 0,4 g/l CuSO₄ · 5 H₂O; 0,15 g/l MnSO₄ · 4 H₂O; 0,1 g/l NaB₄O₇ · 10 H₂O; 0,05 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O; sterilfiltriert

Malzextraktmedium (-Agar):

20 g/l Malzextrakt; 2 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Glukose; 0,25 g/l NH₄Cl; 0,25 g/l K₂HPO₄; (30 g/l Agar)

Medienzusätze:

Bei Bedarf wurden den entsprechenden Medien folgende Antibiotika, Aminosäuren, Indikatorstoffe und Vitamine zugegeben:

LB-Medium: 80 mg/l X-Gal; 100 mg/l Ampicillin; 50 mg/l Kanamycin; 12,5 mg/l Tetrazyklin; 0,2 % Maltose

Medien für *A. fumigatus*: 0,3 mg/l p-Aminobenzoat; 200 mg/l L-Lysin; 440 mg/l Uracil; 1 g/l 5'-Fluororotsäure

1.3. Kulturbedingungen

E. coli-Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5-10 ml LB-Medium oder in 250 ml Erlenmeyerkolben, die mit 50 ml LB-Medium gefüllt waren, bei 37 °C über Nacht mit 220 U/min geschüttelt.

Für die Gewinnung von chromosomaler DNA, RNA oder Proteinrohextrakten wurden 50 ml Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 10^8 bis $5 \cdot 10^8$ *A. fumigatus* Konidien angeimpft und für 16-24 h bei 37 °C mit 200 U/min geschüttelt. Das Myzel wurde durch Filtergaze filtriert, kurz auf Papiertüchern getrocknet und dann in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung gefrorener Myzelien fand bei -20 °C statt.

Zur mikroskopischen Beobachtung des Wachstums von *A. fumigatus* wurden wenige Konidien auf AMM-Agar inokuliert, der in einer dünnen Schicht auf einem sterilen Objektträger verteilt worden war. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 24 h bei 37 °C in einer Petrischale, die zum Schutz vor Austrocknung des Präparates mit feuchtem Filterpapier ausgelegt wurde. Anschließend wurden einige Tropfen 80 % (v/v) Glycerin auf das Objekt getropft und das Deckglas vorsichtig angedrückt. Zur Herstellung von Präparaten für die Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurden *A. fumigatus* Konidien in 100 µl AMM in 96-well Mikrotiterplatten für 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Myzelien wurden danach auf Objektträger überführt.

1.4. Herstellung von Konidiensuspensionen

Um Konidiensuspensionen von *A. fumigatus* herzustellen, wurden Agarplatten mit Konidien angeimpft und für 3-5 Tage bei 37 °C inkubiert. Sie wurden dann mit 10-15 ml steriler 0,9 % (w/v) NaCl / 2 % (v/v) Tween 80 überschichtet und die Konidien mittels Impföse in der Lösung resuspendiert. Konidien für Makrophagenversuche oder tierexperimentelle Untersuchungen wurden frisch mit steriler 0,9 % (w/v) NaCl / 0,1 % (v/v) Tween 80 geerntet und

anschließend zweimal über Filtergaze filtriert. Nach dem Abschwemmen der Konidien erfolgte eine Mengenbestimmung in der Thomazählkammer und die Verdünnung auf gewünschte Konzentrationsstufen.

1.5. Bestimmung spezifischer Wachstumsraten

Zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate verschiedener *A. fumigatus* Stämme wurden 2,5 µl von Suspensionen, welche $1 \cdot 10^6$ Konidien pro ml enthielten, auf Agarplatten aufgetropft und bei 37 °C inkubiert. Die Durchmesser von wenigstens 10 Kolonien eines Stammes wurden zweimal täglich bis zu 94 h (AMM) und 72 h (Malz) vermessen und im Diagramm gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Dabei entsprachen spezifische Wachstumsraten (Kr) (Trinci, 1971) der Steigung der Graphen zwischen 40 und 72 h nach linearer Regression.

1.6. Sporulationsquantifizierung

50 µl von Konidiensuspensionen, welche $1 \cdot 10^5$ Konidien frisch geernteter und gefilterter Suspensionen enthielten, wurden auf AMM-Agarplatten ausgebracht. Pro Stamm wurden 4 Platten für drei Tage inkubiert und die produzierten Konidien jeder Agarplatte mit 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl / 2 % (v/v) Tween 80 (Merck, Darmstadt) geerntet. Die Suspensionen wurden gefiltert und die Konidienmenge anschließend in der Thomazählkammer bestimmt.

2. Molekulargenetische Methoden

2.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.1.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus *A. fumigatus*

Chromosomale DNA aus *A. fumigatus* wurde nach der Methode von Andrianopoulos und Hynes (1988) präpariert.

2.1.2. Isolierung von RNA aus *A. fumigatus*

Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Total RNA Plant Kit“ (Quiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll für filamentöse Pilze isoliert.

2.1.3. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid- und Cosmid-Schnellpräparationen wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979) durchgeführt. Die Präparation größerer Mengen sehr reiner Plasmid- und Cosmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „EZNA Plasmid Minipräp Kit“ der Firma Peqlab (Erlangen) nach dem Herstellerprotokoll.

2.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese (2.3.) erfolgte deren Reisolierung mittels „Gelextraction Kit“ (Quiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben.

2.2. Methoden zur Modifikation von DNA

2.2.1. Enzymatische *in vitro* Reaktionen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Um Religationen kompatibler Enden zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen geschnittener Plasmidvektor-DNA unter Verwendung von „Shrimp Alkalischer Phosphatase“ (Roche Diagnostics, Mannheim) entfernt. Ligationen kompatibler DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangaben mit dem „Rapid Ligation Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

2.2.2. Amplifikation von DNA mittels PCR

PCR-Reaktionen wurden im Rahmen von Klonierungen und Einführungen von Mutationen (auch 2.2.3.) angewandt. Als Matrize dienten 500 ng chromosomale oder 1 ng Plasmid-DNA. Die 25 oder 50 µl umfassenden Reaktionsansätze beinhalteten neben 25 pmol Oligonukleotiden, je 2 mM jedes Desoxynukleotides, den vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und 1 Unit (U) des Enzyms „Goldstar-Taq-Polymerase“ (Eurogentec, Belgien). Die Durchführung der Reaktionen erfolgte im „Personal-Cycler“ (Biometra, Göttingen). PCR-Reaktionsparameter, wie Temperatur und Dauer der Einzelschritte wurden spezifisch den Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und den Längen der erwarteten Amplifikate angepasst.

2.2.3. *In vitro*-Mutagenese mittels PCR

Zur gezielten Einführung von Mutationen in DNA-Fragmente mittels PCR-Amplifikation wurde die Methode nach Higuchi et al. (1988) eingesetzt.

2.2.4. DNA-Sequenzierung

Doppelsträngige Plasmid-DNA oder PCR-Fragmente wurden nach dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger et al., 1977). Dabei wurden die DNA-Abbruchfragmente unter Verwendung des „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, UK) durch vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs markiert und mit Hilfe des automatischen Sequenzierers „ABI-310“ (Applied Biosystems, UK) analysiert.

2.3. Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 % (w/v)-igen horizontalen Agarosegelen mit 1 · TBE als Laufpuffer (Sambrook et al., 1989). Zur Sichtbarmachung der DNA im UV-Licht wurden die Agarosegele mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Auftragen wurde den Proben 1/6 Volumen eines DNA-Auftragspuffers (MBI Fermentas, Litauen) zugegeben. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit den Größenstandards „100 bp Gene Ruler“ oder „λ Eco130I/MluI“ der Firma MBI Fermentas (Litauen).

2.4. 5' RACE („Rapid Amplification of cDNA Ends“)

Diese Methode wurde zur Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten verschiedener Gene eingesetzt. Dabei kam das „5' RACE System Version 2.0“ (Invitrogen, Niederlande) nach entsprechenden Herstellerangaben zum Einsatz. Die durch das Enzym Reverse Transkriptase synthetisierte, zur mRNA komplementäre cDNA wurde nach Aufreinigung auch als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt, bei denen Intron-Regionen von Genen selektiv amplifiziert und durch nachfolgende Sequenzierung exakt lokalisiert werden konnten.

2.5. Transformation von *A. fumigatus*

Die Herstellung rekombinanter *A. fumigatus* Stämme erfolgte durch Protoplasten-Transformation mit zirkulärer oder linearisierter Plasmid-DNA (modifiziert nach Ballance und Turner, 1985). Myzel von Kulturen, welche über Nacht angezogen worden waren, wurde über Filtergaze filtriert, mit 0,6 M KCl gewaschen und kurz getrocknet. Eine Spatelspitze Myzel wurde in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und in 20 ml 0,6 M KCl / 20

mg/ml Glucanex (Novo Nordisk, Mainz) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine ein- bis zweistündige Inkubation bei 30 °C unter leichtem Schwenken. Nach der Protoplastierung des Myzels wurden die Protoplasten zur Trennung von restlichem Myzel über Filtergaze in Zentrifugenröhrchen filtriert und 10 min bei 4000 U/min im SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge (Heraeus, Hanau) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml 0,6 M KCl / 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde das Pellet in 50 µl 0,6 M KCl / 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, so daß etwa $5 \cdot 10^7$ Protoplasten enthalten waren. Diese wurden mit 1-5 µg DNA sowie 13 µl PEG-Lösung (25 % (w/v) PEG 8000; 50 mM CaCl₂; 10 mM Tris/Cl; pH 7,5) vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml PEG-Lösung und 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml 0,6 M KCl / 50 mM CaCl₂-Lösung. Anschließend wurde der Ansatz auf AMM-Topagar (0,6 M KCl), welcher in Reagenzgläsern bei 55 °C vorinkubiert worden war, verteilt. Nach kurzem Mischen erfolgte das Ausgießen der Ansätze auf AMM-Agarplatten (0,6 M KCl). Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden von den erhaltenen Transformanten Konidien für Verdünnungsausstriche abgenommen.

2.6. „Southern blot“-Hybridisierung

Mit Restriktionsendonukleasen gespaltene chromosomale DNA wurde elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente wurden nach der Methode von Southern (1975) denaturiert und durch einen Kapillarblot mit 20 x SSC-Puffer (Sambrook et al., 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung. Für die anschließende Hybridisierung wurden DNA-Fragmente, welche durch PCR oder Restriktion erhalten worden waren, unter Verwendung des „ECL Random Prime Labelling Kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) mit Fluoreszein-11-dUTP markiert. Die Inkubation der Membranen mit den markierten DNA-Sonden erfolgte bei 60 °C über Nacht. Die Fluoreszein-markierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Fluoreszein-Antikörpern detektiert. Die Zusammensetzung von Puffern für Hybridisierung, Waschen, Antikörperbehandlung und Detektion sowie die Dauer der einzelnen Anwendungen erfolgte nach Herstellerangaben (ECL System, Amersham Biosciences, Freiburg).

2.7. Durchmusterung einer genomischen Cosmidgenbank von *A. fumigatus*

Zur Isolierung chromosomaler DNA-Fragmente, welche gesuchte Gensequenzen enthielten, wurden *E. coli*-Zellen einer Cosmidgenbank (Gehring, 1997) in einer Dichte von etwa 1000 Kolonien pro Platte (LB-Agar, 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der folgenden Inkubation bei 4 °C für 1 h wurden die Kolonien auf Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg) überführt. Die Lyse der Zellen und die DNA-Denaturierung erfolgte durch Inkubation der Membranen auf mit 0,5 M NaOH getränktem Filterpapier für 5 min. Zur Neutralisierung wurden die Membranen dann auf 0,5 M Tris/Cl (pH 7,0) und abschließend auf 0,5 M Tris/Cl (pH 7,0) / 1,5 M NaCl für jeweils 5 min inkubiert. Nach Fixierung der DNA durch UV-Bestrahlung wurden die Membranen in Hybridisierungsreaktionen mit DNA-Sonden eingesetzt (siehe 2.6.).

2.8. Durchmusterung einer cDNA-Expressionsgenbank von *A. fumigatus*

Zur Isolierung von cDNA-Fragmenten bestimmter Gene wurde eine käufliche *A. fumigatus* Uni-ZAP Expressionsbank (Stratagene, Heidelberg) durchmustert. Diese besteht aus rekombinanten λ-Phagen, die eine Integration von cDNA in deren Genom aufweisen. Die Bestimmung des Phagentiters, der Transfer der Phagen auf Nylonmembranen (Amersham Biosciences, Freiburg), Phagenvermehrung sowie Plasmidisolierung erfolgten nach Herstellerangaben. Hybridisierungsreaktionen mit DNA-Sonden fanden wie unter 2.6. und 2.7. beschrieben statt.

2.9. Transformation von *E. coli*

E. coli GM2163- oder *E. coli* TOP10F[']-Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode mit Plasmid-DNA transformiert (Sambrook et al., 1989).

2.10. Liste der verwendeten Oligonukleotide

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')
AAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIHGGGIHGGGIIG
UAP	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTGACTAGTAC
PGalphaA1deg	CGGGATCCGGXGCXGGXGARWSXGGXAA
PGalphaA2deg	CGGGATCCAATCARTGDATCCAYTT
PGalphaB1deg	MAXATGGGXCARYTXWSXATHCA
PGalphaB2deg	GCRTTXKKXARDATXGTYTCYTT
PAC1deg	ACXGARGGXGAYGCXTTYATG
PAC2deg	AYXGGXCCRWARDARTCCAT
PPKA1deg	GGXGAYTAYTTYTAYGTXTXGA
PPKA2deg	XARXGCXARYTCXCRTTRWARDTCXCC
PPKAC1deg	ACXYTXGGXACXGGXWSXTTYGG
Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')

PPKAC2deg	TARTCXGGXGTXCCRCAXARXGT
PpabaA1	CGGGGCGCGGAGGATATGG
PpabaA2	AACTCTGCCGTGGTGTTCGC
PGalphaB17	GACTCGAGGGAACGTTTCATGAGG
PGalphaB18	GGCCTCGAGGTAAGATATGGAGG
PAC6	TGACCACGTTGGAACAAGC
PAC19	TGTTCTCGAGAATAGGCGC
PAC21	GGGTTTCGCGGTCTTGAAGG
PAC22	TTGGTTGGGATTTAGCTGC
PAC24	AGTACGTTCCACATCGAGG
PAC29	GCGCTTTAATGCCATTACC
PAC32	GATCACTTCAAAGCCCGCG
PAC34	ATACAACACAGTCATGCCG
PPKA6	TGCCAATACCATCGGGGCC
PPKA17EcoRI	AAGAATCCGTGAACCAATCGC
PPKA3	CGATGTCTACATCAACCCC
PPKA18	TTTGGGGATGAGATGGGC
PPKAC4	ATTGTGTTTCGACTGCACC
PPKAC12	TGAAGACGTAGATAGGGTCGA
PPKAC17	TGGTGTTTTTCTCGCCCCCT
PPKAC24	TCTCGTAGATCTTGACGG
PPKAC27	GTCCTTTCTTGCAAGACG
PPKAC31BamHI	GGATCCGTAGGGTCTATCTAGAGAGG
PPKAC32BamHI	ATTGGATCCGAAGTCTGGGAAAAGATGG
PPKAC29BamHI	GGATCCTTAGGAGGTCTCTTGAAG
PPKAC30	TGGACAAGCACGATCTTCC
PGPDA1BamHI	TTAACATGGATCCGATGTAGG
PGPDA3BamHI	GGATCCCATTGTGTAGATTCGTCT
PpabaA9KpnINotI	GCTCCGGTACCGGCGGCCGCGCGG
PpabaA10KpnINotI	CGGTACCAGCGGCCGCGTACAATGCGG
PpksP1BamHI	CTCAAGGGGCACGGGGATCCCACCAATGAG
PpksP2BamHI	GTGCATGGAAGGATCCTTCGATGAACG
PpksPSTREmut1	GCAGTATTACTGTGCGTACTTCCACGG
PpksPSTREmut2	CCGTGGAAGTACGCACAGTAATACTGC
PpksPSSA3mut1	GGAAGTCTAGGACACGTCTAGAGACCAGCG
PpksPSSA3mut2	CGCTGGTCTCTAGACGTGTCCTAGACTTCC

3. Proteinchemische Methoden

3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Zum Erstellen einer Eichgeraden wurden 1; 2; 2,5; 3; 4 und 5 µg BSA pro 100 µl H₂O gelöst. Nach Zugabe von 900 µl Bradford-Reagenz (Sigma, München) und Mischen erfolgte die Inkubation der Proben im Dunkeln für 15 min, bevor die Absorption bei 595 nm photometrisch ermittelt wurde. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration von *A. fumigatus* Proteinextrakten, wurden diese 1:100 verdünnt. 20, 30 bzw. 50 µl dieser Verdünnung wurden mit destilliertem H₂O ad 100 µl aufgefüllt, mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt und genau wie die Proben für die Eichgerade behandelt. Mittels der Eichgeraden und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors wurde dann die Proteinkonzentration der Proteinextrakte berechnet.

3.2. Herstellung von Protein-Rohextrakten von *A. fumigatus*

Gefrorenes Myzel von *A. fumigatus* (1.3.) wurde unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben. Das feine Myzelpulver wurde mit Proteinextraktionspuffer für β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmungen (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 mM KCl; 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 2,7 ml/l β -Mercaptoethanol; pH 7,0) oder PKA-Aktivitätsbestimmungen (25 mM Tris/Cl; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; pH 7,4) versetzt und vermischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentierung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation mit $30000 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min. Der Überstand enthielt die Fraktion der löslichen Proteine von *A. fumigatus*.

3.3. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Als Substrat für die Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität wurde o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid verwendet. Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte nach van Gorcom et al. (1986) unter Verwendung von 200 μl *A. fumigatus* Protein-Rohextrakt im Ansatz.

3.4. Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität

Mittels des „PepTag Assay“ (Promega, Mannheim) erfolgte die nicht-radioaktive Bestimmung der PKA-Aktivität in *A. fumigatus* Protein-Rohextrakten. Dabei wird ein Peptid, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und welches über die Konsensus-Sequenz der PKA-Phosphorylierungsstelle verfügt, als Phosphatgruppenakzeptor genutzt. Die Übertragung der Phosphatgruppen führt zur negativen Ladung des Peptids und damit zu einem veränderten Laufverhalten im Agarosegel. Die Durchführung des „Assays“ erfolgte nach Herstellerangaben. Protein-Rohextrakte wurden auf 3 mg/ml verdünnt. Davon kamen 10 μl in der Reaktion zum Einsatz. Eine Aktivierung der PKA erfolgte durch Zugabe von 1 μM cAMP zum Ansatz. PKA-Inhibierungsansätze wurden mit 0,5 μg Proteinkinase A Inhibitor-Peptid (PKI) (Promega, Mannheim) versetzt. Die Visualisierung der fluoreszierenden Peptide im Agarosegel erfolgte durch UV-Bestrahlung. Nach anschließender Gelelution wurde die Menge an phosphoryliertem Peptid durch spektrophotometrische Messung der Fluoreszenz bei 570 nm bestimmt.

4. Zytologische Methoden

4.1. Zellkernfärbung in Myzelien

A. fumigatus Myzelien wurden wie unter 1.3. beschrieben in 96-well Mikrotiterplatten angezogen. Etwa 10 µl Kultur wurden auf einen Objektträger überführt, mit 10 µl Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (1 µg/ml) überschichtet und 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. DAPI führt zur spezifischen Anfärbung von Zellkernen, da es in AT-reiche DNA-Regionen interkaliert.

4.2. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica, Bensheim) durchgeführt.

5. Immunologische Methoden

5.1. Isolierung humaner Monozyten aus „Buffy Coats“

Die Isolierung humaner Monozyten erfolgte aus „Buffy Coats“, welche durch die Blutspendezentrale des Klinikums der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz bereitgestellt wurden. Diese gingen aus Blutspenden hervor und enthielten die Gesamtpopulation an Leukozyten nach Abtrennung des Serums und eines Großteils der Erythrozyten. Etwa 40 ml dieser Lösung wurden mit 12,5 ml PBS (Nunc, Wiesbaden) vermischt. Anschließend wurden damit 12,5 ml Ficoll-Lösung (Biocoll Separating Solution, Dichte 1-077, Biochrom KG, Berlin) in 50 ml Greinerröhrchen überschichtet. Dann erfolgte die Zentrifugation der Ansätze für 30 min mit $400 \cdot g$ bei RT. Nach Beendigung wurden aus 2 Ansätzen jeweils 2 ml der Monozytenhaltigen Grenzschicht, welche als weißer Ring sichtbar war, vorsichtig abgenommen und mit 40 ml PBS vermischt. Nach Zentrifugation für 8 min mit $200 \cdot g$ bei RT erfolgte die Abnahme des Überstandes und die Resuspendierung des Pellets in 8 ml PBS. Jeweils 4 ml des resuspendierten Pellets wurden dann mit 8 ml einer Percoll-Lösung gemischt und für 30 min mit 2000 U/min bei 20 °C in der Sorvall-Zentrifuge (Heraeus, Hanau) unter Verwendung des SS34-Rotors zentrifugiert. Zur Herstellung der Percoll-Lösung (pH 7,2) wurden 30 ml Percoll (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 5 ml 10 · HBSS-Puffer (80 g/l NaCl; 4 g/l KCl; 0,6 g/l KH_2PO_4 ; 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,6 g/l Na_2HPO_4 ; 1,4 g/l CaCl_2 ; 1 g/l Glukose) versetzt. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 25 ml PBS aufgenommen

und wiederum für 8 min mit $200 \cdot g$ bei RT zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Monozyten in 10 ml „Minimal Essential Medium“ (MEM, Biochrom KG, Berlin). Dann wurde die Monozytendichte durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und nach wiederholter Zentrifugation wurden die Zellen in einer Dichte von $2 \cdot 10^6/ml$ in MEM aufgenommen, welches 10 % (v/v) humanes Serum, 2,5 ng/ml GM-CSF (Essex Pharma, München) sowie 0,5 ng γ -Interferon (Gammaferon 50, Bioferon GmbH, Laupheim) enthielt. Anschließend erfolgte die Portionierung der Suspension zu je 1 ml/well in 24-well Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden). Die Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen fand während der Kultivierung für 4-6 Tage bei $37^\circ C$ unter 5 % (v/v) CO_2 statt und war unter anderem an der Bildung von pseudopodienartigen Zellausläufern erkennbar. Ein Wechsel des Mediums erfolgte in dreitägigem Abstand.

5.2. Bestimmung der Abtötungsrate von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen

Die Bestimmung der Abtötungsrate von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen fand nach der von Jahn et al. (1998) beschriebenen Methode statt. Dabei wurden $2 \cdot 10^6$ Makrophagen pro well mit $2 \cdot 10^5$ *A. fumigatus* Konidien für 15-17 h bei $37^\circ C$ unter 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Makrophagen unter Verwendung von Streptolysin O kombiniert mit mechanischer (Ultraschall) und enzymatischer (RNase, DNase, Proteinase K) Behandlung. Abschließend wurden 50 μl der 1:200 verdünnten Lysate auf Sabouraud-Agarplatten (Merck, Darmstadt) oder Malzextrakt-Agarplatten ausplattiert. Nach über Nacht-Inkubation bei $37^\circ C$ erfolgte die Ermittlung des prozentualen Anteils der Kolonie-bildenden Einheiten („Colony Forming Units“, CFU) von Konidien, welche mit Makrophagen inkubiert worden waren, im Vergleich zu Kontrollansätzen. Als Kontrolle dienten Ansätze, bei denen die Makrophagen direkt nach Phagozytose der Konidien (etwa 1 h) lysiert wurden. Die hierbei bestimmte CFU wurde 100 % gleichgesetzt.

5.3. Isolierung von Immunzellen durch Bronchoalveolarlavage (BAL)

Zur Isolierung von Immunzellen, wie Alveolarmakrophagen, Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten aus den Lungen von Versuchstieren wurde eine Bronchoalveolarlavage (BAL) durchgeführt. Dazu wurde nach Präparation der Versuchstiere ein i.v.-Katheter (Abbott GmbH, Wiesbaden) in die Trachea eingeführt und die Lunge zweimal mit 0,9 ml PBS (Nunc, Wiesbaden) gespült. Die BAL wurde in 5 ml Falconröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) gesammelt und anschließend 10 min mit 1200 U/min bei $4^\circ C$ (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Hämolysepuffer (8,29 g/l NH_4Cl ; $37^\circ C$

mg/l Na₂EDTA; 0,839 g/l NaHCO₃; pH 7,3) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS und wiederholter Zentrifugation für 10 min mit 1200 U/min bei 4 °C wurde das Pellet in 0,5 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Coulter-Act-Analysengerät (Coulter Cooperation, Miami, Florida, USA) bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min mit 1200 U/min bei 4 °C erfolgte die Resuspendierung der Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ /ml PBS. Von dieser Suspension wurden 100 µl mittels Cytospin3-Zentrifuge (Shandon Scientific LTD, UK) mit 500 U/min für 5 min auf Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden anschließend kurz getrocknet und dann gefärbt.

5.4. Färbung von Immunzellen

Um die durch die BAL isolierten und auf Objektträgern fixierten Zellen unterscheiden zu können, wurden diese spezifisch angefärbt. Die getrockneten Präparate wurden 3-5 min in May-Grünwald-Lösung (Sigma, München) inkubiert und anschließend kurz mit destilliertem Wasser gespült. Dann erfolgte eine Färbung für 20 min in 1 : 10 verdünnter Giemsa-Lösung (Sigma, München) mit darauffolgender gründlicher Spülung in destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Objektträger für etwa 15 min getrocknet und die unterschiedlichen Zelltypen bei 100-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgezählt.

6. Tierexperimentelle Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche fanden in Zusammenarbeit mit der Abteilung „Immunologie und Allergologie“ am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover statt.

6.1. Haltung von Versuchstieren

Die Virulenztestung von *A. fumigatus* Stämmen erfolgte im Mausinfektionsmodell unter Verwendung weiblicher Tiere des BALB/c-Mausstammes (7-8 Wochen bei Lieferung, Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln), welche in Gruppen von 5-10 Tieren gehalten wurden. Zum Schutz der Tiere vor bakteriellen Infektionen wurde dem Trinkwasser 0,5 mg/ml Tetrazyklin (Sigma, München) zugesetzt. Das Gewicht der Versuchstiere, welches täglich erfaßt wurde, betrug bei Behandlungsbeginn 18-20 g. Nach der Infektion mit *A. fumigatus* Konidien erfolgte mehrmals täglich eine Vitalitätskontrolle der Versuchstiere.

6.2. Immunsuppression von Versuchstieren und Infektion mit *A. fumigatus* Konidien

Um eine Erkrankung der Versuchstiere nach Infektion mit *A. fumigatus* Konidien zu induzieren, wurde eine Immunsuppression durchgeführt. Dazu erfolgte an den Tagen -4, -1, 2, 5, 8 und 11 vor und nach dem Infektionstag 0 die intraperitoneale (i.p.) Applikation der Substanz Cyclophosphamid (Sigma, München) in einer Konzentration von 150 mg/kg Körpergewicht. Am Tag -1 wurde zusätzlich mit 200 mg/kg Cortisonacetat (Sigma, München), welches subkutan unter das Rückenfell injiziert wurde, immunsupprimiert. Die Lösung beider Chemikalien erfolgte in PBS (Nunc, Wiesbaden). Am Tag 0 wurden die Versuchstiere durch i.p.-Applikation von 200 µl 1 % (v/v) Ketamin (WDTeG, Garbsen) / 0,02 % (v/v) Rompun (Bayer, Leverkusen) betäubt. 25 µl *A. fumigatus* Suspension wurden langsam direkt auf die Nasenlöcher betäubter Tiere pipettiert, so daß die intranasale Aufnahme des Erregers inhalativ erfolgen konnte. Die *A. fumigatus* Suspensionen waren frisch geerntet und enthielten gewünschte Mengen an Konidien (siehe auch 1.4.). Kranke und moribunde Tiere wurden durch i.p.-Injektion von 200 µl 3,2 % (v/v) Narcoren (Rhone Merieux, Laupheim) getötet und anschließend präparativ aufgearbeitet.

6.3. Organaufarbeitung von Versuchstieren

Zur Reisolierung und zum Nachweis von *A. fumigatus* wurden Lungen und Nieren erkrankter und gesunder Versuchstiere präpariert und gewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS (Nunc, Wiesbaden) und die mechanische Zerkleinerung des Gewebes in „Lysing MatrixD“-Röhrchen (Q-Biogene, Heidelberg). Diese enthalten kleine Plastikugeln, welche nach 30 s Schütteln mit Geschwindigkeitsstufe 5 im „Fastprep“-Gerät (Q-Biogene, Heidelberg) das Gewebe homogenisierten. Danach erfolgte eine Doppelbestimmung der CFU durch Ausplattieren von je 50 µl Homogenat auf zwei Malzextrakt-Agarplatten, über Nacht-Inkubation der Platten bei 37 °C und Auszählen der gebildeten *A. fumigatus* Kolonien. Alternativ konnten die Homogenate mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert werden.

7. Bezugsquellen von Enzymen und Chemikalien

Enzyme zur Restriktion, Modifikation und Sequenzierung von DNA oder für andere Anwendungen stammten von einer der folgenden Firmen: Eurogentec (Seraing, Belgien), New England Biolabs (Frankfurt a. M.), Applied Biosystems (UK) und Novo Nordisk (Mainz). Fein-

chemikalien stammten von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Applichem (Gehrden). Kits und DNA-Größenmarker wurden von folgenden Herstellern bezogen: Peqlab (Erlangen), Quiagen (Hilden), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Roche Diagnostics (Mannheim), Stratagene (Heidelberg), MBI-Fermentas (Vilnius, Litauen) und Amersham Biosciences (Freiburg). Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

ERGEBNISSE

1. Identifizierung und Isolierung von Komponenten der cAMP-Signaltransduktion von *A. fumigatus*

Zum Nachweis der cAMP-Signaltransduktion in *A. fumigatus* sollten verschiedene konservierte Komponenten isoliert werden, welche funktionell in diese Kaskade involviert sind. Dabei handelte es sich um Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, um die Adenylatzyklase sowie um Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA). Zu diesem Zweck wurden die Aminosäure (As)-Sequenzen bekannter homologer Proteine aus anderen Pilzen verglichen und aus hochkonservierten Bereichen degenerierte Oligonukleotid-Sequenzen abgeleitet. In PCR-Ansätzen erfolgte die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente unter Verwendung dieser Oligonukleotide und chromosomaler DNA von *A. fumigatus* als Matrize. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend sequenziert, und durch Vergleich der daraus abgeleiteten As-Sequenzen mit den bekannten pilzlichen Proteinen konnte die Identität der gesuchten Genfragmente zweifelsfrei bestimmt werden. Mittels dieses Ansatzes wurden Genfragmente zweier G α -Untereinheiten (*gpaA* und *gpaB*), der Adenylatzyklase (*acyA*) sowie der regulatorischen (*pkaR*) und einer katalytischen Untereinheit (*pkaC1*) der PKA isoliert. Eine Zusammenstellung der Gene, der für ihre Amplifizierung genutzten Oligonukleotidpaare sowie der daraus resultierenden PCR-Produktlängen ist in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Isolierte cAMP-Signaltransduktionskomponenten, verwendete Oligonukleotide und PCR-Produkte.

Komponente	Genbezeichnung	Oligonukleotide	PCR-Produktlänge
G α -Untereinheit	<i>gpaA</i>	PGalphaA1deg/PgalphA2deg	602 bp
G α -Untereinheit	<i>gpaB</i>	PGalphaB1deg/PgalphB2deg	655 bp
Adenylatzyklase	<i>acyA</i>	PAC1deg/PAC2deg	254 bp
regulatorische PKA-Untereinheit	<i>pkaR</i>	PPKA1deg/PPKA2deg	504 bp
katalytische PKA-Untereinheit	<i>pkaC1</i>	PPKAC1deg/PPKAC2deg	535 bp

Nach der Aufklärung ihrer Identität wurden die amplifizierten Genfragmente als Sonden zur Durchmusterung einer genomischen *A. fumigatus* Cosmid-Genbank (Gehring, 1997) genutzt. Dabei konnten entsprechende Cosmide isoliert werden, wobei die Bezeichnung der Cosmide mit *cosgpaA1*, *cosgpaB1*, *cosacyA1*, *cospkaR1* und *cospkaC1* der Nomenklatur der isolierten Genfragmente folgte. Die Vervollständigung der Offenen Leserahmen (ORF) der identifizierten Gene erfolgte durch doppelsträngiges Sequenzieren der entsprechenden Cosmid-DNA unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide, welche von erhaltener DNA-Sequenz schrittweise abgeleitet wurden („Primer Walking“).

Durch die fortschreitende Vervollständigung von Projekten zur Genomsequenzierung war *A. fumigatus* gegen Ende dieser Arbeit auch bioinformatischen Methoden zur Identifizierung von Genen zugänglich. So führte die Suche nach weiteren Komponenten der cAMP-Signaltransduktion zur Identifizierung eines ORF, der eine zweite katalytische Untereinheit der PKA kodierte. Die abgeleitete As-Sequenz des *pkaC1*-Gens wurde dabei als Sonde zur Durchmusterung der *A. fumigatus* Genomsequenz (www.tigr.org) genutzt. Die Bezeichnung des so identifizierten Gens erfolgte mit *pkaC2*.

Die DNA- und abgeleiteten As-Sequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Gene wurden in EMBL- und SWISSPROT-Datenbanken mit folgenden Nummern hinterlegt: *gpaA* - AJ276276, Q8J132; *gpaB* - AJ277436, Q8TFX6; *acyA* - AJ276703, Q8J131; *pkaR* - AJ277652, Q96UX3; *pkaC1* - AJ297841, Q8J129; *pkaC2* - AJ575357.

2. Charakterisierung der isolierten cAMP-Signaltransduktionskomponenten

2.1. Die G α -Untereinheiten GPAA und GPAB

Durch Sequenzierung des Cosmids *cosgpaA1* wurde ein ORF identifiziert, der die α -Untereinheit GPAA eines heterotrimeren G-Proteins kodiert. Er besteht aus 1244 bp und wird durch drei Intronen, welche 65, 59 und 85 bp lang sind, unterbrochen. Das davon abgeleitete Protein setzt sich aus 353 As-Resten zusammen, was eine kalkulierte molekulare Masse von 41 kDa ergibt. Eine Darstellung der DNA-Sequenz des *gpaA*-Gens mit abgeleiteter As-Sequenz ist im Anhang A zu sehen. Wie aus Abb. 3A ersichtlich wird, zeigt GPAA einen sehr hohen Ähnlichkeitsgrad mit Homologen aus anderen Pilzen (Prozent identischer As-Reste: *A. nidulans* FADA, 98%; *M. grisea* GBA1, 94%; *N. crassa* GBA1, 93%). Das wichtigste GPAA-Sequenzmotiv ist im N-Terminus (As-Reste 35-53) zu finden. Es handelt sich um einen sogenannten „P-loop“, welcher für die Bindung von GTP oder GDP verantwortlich ist. Die Aktivierung eines G-Proteins nach Kontakt mit einem Transmembranrezeptor führt zur Verringerung der Bindungsaffinität für GDP und zur Beladung der G α -Untereinheit mit GTP. Daraufhin kommt es zur Dissoziation des trimeren Komplexes und zur Freisetzung der α -Untereinheiten. Eine interne GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit katalysiert die zügige Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i. Dieser Mechanismus ist dafür verantwortlich, daß das

Protein nur für eine kurze Zeit aktiviert ist und schützt somit die Zelle vor kontinuierlicher Signalweiterleitung (Gilman 1987).

GPAAA.f.	MGCCGMSTED	KEGKARNEE	IENQLKRD	KMMORNE	IKMLLLGAGE	SGKSTILKQ	MKLIHEGG	60	
FADAA.n.	MGCCGMSTED	KEGKARNEE	IENQLKRD	KMMORNE	IKMLLLGAGE	SGKSTILKQ	MKLIHEGG	60	
GBA1M.g.	MGCCGMSTED	KEGKARNEE	IENQLKRD	RLOORNE	IKMLLLGAGE	SGKSTILKQ	MKLIHEGG	60	
GBA1N.c.	MGCCGMSTED	KEGKARNEE	IENQLKRD	MOORNE	IKMLLLGAGE	SGKSTILKQ	MKLIHEGG	60	
GPAAA.f.	YSRDERESFKEII	YSNTVQSMRV	ILEAMESLEL	PLEDAR	NEYHVQ	TIFMOPAQ	IEGDSLP	120	
FADAA.n.	YSRDERESFKEII	YSNTVQSMRV	ILEAMESLEL	PLEDAR	NEYHVQ	TIFMOPAQ	IEGDSLP	120	
GBA1M.g.	YSRDERESFKEII	YSNTVQSMRV	ILEAMESLEL	PLEDOR	MEYHVQ	TIFMOPAQ	IEGDVLP	120	
GBA1N.c.	YSRDGAESFKEII	YSNTVQSMRV	ILEAMESLEL	PLADOR	VEYHVQ	TIFMOPAQ	IEGDVLP	120	
GPAAA.f.	PEVGNATIGALWRD	TGVQECFKRS	REYQLNDSAK	YYFDAD	DRIAQ	PDYLP	TDQDVLRSRVK	180	
FADAA.n.	SEVGNATIALWQD	AGVQECFKRS	REYQLNDSAK	YYFDST	ERIAQ	SDYLP	TDQDVLRSRVK	180	
GBA1M.g.	PEVGNATIGALWKR	DGVQECFKRS	REYQLNDSAR	YYFDN	LARIA	APDYMP	NDQDVLRSRVK	180	
GBA1N.c.	PEVGNATIGALWRD	AGVQSCFKRS	REYQLNDSAR	YYFDN	LARIA	APDYMP	NDQDVLRSRVK	180	
GPAAA.f.	TTGITETETTF	IIGDLTYRM	FVGGQR	SERKKWI	HCFENV	TTLFLV	AISEYDQLLFEDET	240	
FADAA.n.	TTGITETETTF	IIGDLTYRM	FVGGQR	SERKKWI	HCFENV	TTLFLV	AISEYDQLLFEDET	240	
GBA1M.g.	TTGITETETTF	IIGDLTYRM	FVGGQR	SERKKWI	HCFENV	TTLFLV	AISEYDQLLFEDET	240	
GBA1N.c.	TTGITETETTF	IIGDLTYRM	FVGGQR	SERKKWI	HCFENV	TTLFLV	AISEYDQLLFEDET	240	
GPAAA.f.	NRMQEALTLFDSI	CNSRWFV	KTSIILFL	NKIDRF	KEKLPV	SPMKNY	FPDYEGGADYAAAC	300	
FADAA.n.	NRMQEALTLFDSI	CNSRWFV	KTSIILFL	NKIDRF	KEKLPV	SPMKNY	FPDYEGGADYAAAC	300	
GBA1M.g.	NRMQEALTLFDSI	CNSRWFV	KTSIILFL	NKIDRF	KEKLPV	SPMKNY	FPDYEGGADYAAAC	300	
GBA1N.c.	NRMQEALTLFDSI	CNSRWFV	KTSIILFL	NKIDRF	KEKLPV	SPMKNY	FPDYEGGADYAAAC	300	
GPAAA.f.	DYILNRFVSLNQAE	QKQIYTHFT	CATDTTQ	IRFVMAAV	NDII	IQENLR	LRCGLI	353	
FADAA.n.	DYILNRFVSLNQAE	QKQIYTHFT	CATDTTQ	IRFVMAAV	NDII	IQENLR	LRCGLI	353	
GBA1M.g.	DYILNRFVSLNQHE	TQKQIYTHFT	CATDTTQ	IRFVMAAV	NDII	IQENLR	LRCGLI	353	
GBA1N.c.	DYILNRFVSLNQHE	TQKQIYTHFT	CATDTTQ	IRFVMAAV	NDII	IQENLR	LRCGLI	353	
GPABA.f.	MGSCFSTES	PGDAEQKRS	QAIDRR	LEEDSR	RLRRECK	ILLGSGES	SGKSTIVKQMKI	59	
GANBA.n.	MGSCFSS	SAGDVEQKRS	QAIDRK	LEEDSR	RLRRECK	ILLGSGES	SGKSTIVKQMKI	59	
SGP1S.s.	MGACMSS	NVEDTEQR	KRSQRIDK	LEEDSR	RLRRECK	ILLGSGES	SGKSTIVKQMKI	59	
GBA3N.c.	MGACMSK	NDEETEQR	KRSQKIDR	LEEDSR	KLRLRRECK	ILLGSGES	SGKSTIVKQMKI	59	
GPABA.f.	QNGYTVVEELALYRL	TVYKNLLD	CAKALIGAV	HOFNLO	PTS	PKVREF	IEFLSEYNI	119	
GANBA.n.	QNGYTVVEELALYRL	TVYKNLLE	CAKALIGAV	HOFNLE	PTS	OKVND	IEFLANENI	119	
SGP1S.s.	QNGYTVDEELALYRL	TVYKNLLD	CAKALV	GAMROME	I	EP	NPANKEYGS	118	
GBA3N.c.	LKGYSDDEELYRPT	VYKNLLE	CAKAVVNA	MHOFD	IQ	PADPSL	RPVVEFLQENMEG	119	
GPABA.f.	NIPLDPRIGD	AVTYLW	NDPCT	STALEH	QNEFF	YLMD	SAPYFFEEAKRIA	179	
GANBA.n.	NIPLDPAVGD	AITIYI	W	NDPCT	STALER	QNEFF	YLMD	SAPYFFEEAKRIT	179
SGP1S.s.	HTPLNPRV	GTAVAS	W	DK	SMERLL	ARQSE	FFYLMD	SAPYFFEEAGRIA	178
GBA3N.c.	GQSIDPKVGT	AIQALW	NDPAKE	QLMERQ	TEFF	YLMD	SAPYFFTEV	MRIVAE	179
GPABA.f.	RARTKTTGI	YETRF	TMGQLSI	HMFVGG	QR	SERKKWI	HCFENV	TSIIFCV	239
GANBA.n.	RARTKTTGI	YETRF	TMGQLSI	HMFVGG	QR	SERKKWI	HCFENV	TSIIFCV	239
SGP1S.s.	RARTKTTGI	YETRF	TMGQLSI	HMFVGG	QR	SERKKWI	HCFENV	TSIIFCV	238
GBA3N.c.	RARTKTTGI	YETRF	TMGQLSI	HMFVGG	QR	SERKKWI	HCFENV	TSIIFCV	239
GPABA.f.	EESNQNR	MMESLV	LVFDSV	VNSRWF	MRTSII	ILFLNK	VDLFR	OKLPR	299
GANBA.n.	EESNQNR	MMESLV	LVFDSV	VNSRWF	MRTSII	ILFLNK	VDLFR	OKLPR	299
SGP1S.s.	EESNQNR	MMESLV	LVFDSV	VNSRWF	MRTSII	ILFLNK	VDLFR	OKLGR	298
GBA3N.c.	EESNQNR	MMESLV	LVFDSV	VNSRWF	MRTSII	ILFLNK	VDLFR	OKLGR	299
GPABA.f.	VNRAAKYLL	WRFNQV	NRAHLN	LYPHLT	QATDT	SNIRL	VFAAVKET	ILQNAL	356
GANBA.n.	VNRAAKYLL	WRFNQV	NRAHLN	LYPHLT	QATDT	SNIRL	VFAAVKET	ILQNAL	356
SGP1S.s.	VNRAAKYLL	WRFNQV	NRAHLN	LYPHLT	QATDT	SNIRL	VFAAVKET	ILQNAL	355
GBA3N.c.	VNRAAKYLL	WRFNQV	NRAHLN	LYPHLT	QATDT	SNIRL	VFAAVKET	ILQNAL	356

Abb. 3: Aminosäure-Sequenzvergleich der in *A. fumigatus* identifizierten $G\alpha$ -Untereinheiten mit homologen pilzlichen Proteinen. Aminosäuren, welche wenigstens in drei Proteinen identisch sind, wurden schwarz unterlegt. **A** GPAAA.f.; *A. fumigatus* $G\alpha$ -Untereinheit GPAA (AJ276276, Q8J132); FADAA.n., *A. nidulans* (Q00743); GBA1M.g., *M. grisea* (O13315); GBA1N.c., *N. crassa* (Q05425); **B** GPABA.f., *A. fumigatus* $G\alpha$ -Untereinheit GPAB (AJ277436, Q8TFX6); GANBA.n., *A. nidulans* (Q9UVK8); SGP1S.s., *Sclerotinia sclerotiorum* (O94216); GBA3N.c., *N. crassa* (Q9HFW7).

Die Sequenzierung von Cosmid cosgpaB1 führte zur Vervollständigung des *gpaB*-ORF, welcher für eine weitere G-Protein α -Untereinheit kodiert. Der ORF besteht aus 1394 bp und wird durch fünf Intronen unterbrochen, welche 79, 56, 63, 56 und 69 bp lang sind. Das abgeleitete Protein setzt sich demnach aus 356 As zusammen, was einer errechneten molekularen Masse von 41 kDa entsprechen würde. DNA- und abgeleitete As-Sequenz des *gpaB*-Gens

sind im Anhang B dargestellt. GPAB zeigt 94%, 84% und 78% identische As verglichen mit *A. nidulans* GANB, *Sclerotinia sclerotiorum* SGP1 bzw. *N. crassa* GBA3 (Abb. 3B). Im Vergleich mit den $G\alpha$ -Untereinheiten GPA1 aus *C. neoformans* und GPA3 aus *U. maydis* zeigt GPAB 69% bzw. 67% Identität. Für GPA1 und GPA3 wurde nachgewiesen, daß sie in Virulenzprozesse der entsprechenden Pilze involviert sind, was einen interessanten Ansatzpunkt für Untersuchungen zum Einfluß der cAMP-Signaltransduktion auf die Pathogenität von *A. fumigatus* darstellte. Das für $G\alpha$ -Untereinheiten charakteristische „P-loop“-Sequenzmotiv konnte bei GPAB zwischen den As-Resten 38-56 identifiziert werden.

Interessanterweise weisen die Sequenzen beider identifizierter *A. fumigatus* $G\alpha$ -Untereinheiten, GPAA und GPAB, nur einen Grad der Ähnlichkeit von 49% identischer As auf. Dies ist wahrscheinlich auf ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen Untergruppen von $G\alpha$ -Untereinheiten zurückzuführen. Die Funktion von $G\alpha$ -Untereinheiten besteht in der Weiterleitung eines Signals an die Adenylatzyklase, welche dadurch sowohl aktiviert als auch inhibiert werden kann. Dies führt letztlich zu gesteigerter oder verringerter Synthese des Signalmoleküls cAMP. Nach ihrer Fähigkeit, die Adenylatzyklase-Aktivität zu modulieren, gehören Homologe von GPAA zur inhibierenden Untergruppe ($G_{(i)}\alpha$), während Homologe von GPAB der stimulierenden $G\alpha$ -Protein Untergruppe ($G_{(s)}\alpha$) zugeordnet werden können (Bölker 1998).

2.2. Die Adenylatzyklase ACYA

Der vollständige ORF des Adenylatzyklase-kodierenden Gens *acyA* konnte auf dem Cosmid cosacyA1 identifiziert werden. Da sowohl das Start-Codon als auch die Intronpositionen des *acyA*-Gens durch Sequenzvergleiche nicht eindeutig identifizierbar waren, wurden diese durch 5' RACE bzw. durch die Sequenzierung von auf cDNA basierenden PCR-Produkten bestimmt.

2.2.1. Bestimmung von Transkriptionsstartpunkt und Intronstruktur des *acyA*-Gens

Der Transkriptionsstartpunkt des *acyA*-Gens wurde durch 5' RACE („Rapid Amplification of cDNA Ends“) bestimmt. Der *acyA*-spezifische Primer PAC24 wurde genutzt, um in der primären Polymerisationsreaktion durch die Reverse Transkriptase einen cDNA-Strang zu erzeugen, der bis zum 5'-Ende der *acyA*-mRNA reichte. Durch das Enzym „Terminale Transferase“ konnte an diesen cDNA-Einzelstrang eine poly-C-Sequenz synthetisiert werden. Die synthetisierte und anschließend aufgereinigte poly-C-cDNA wurde dann in eine PCR-Reaktionen unter Verwendung des genspezifischen Oligonukleotids PAC21 und des poly-G-Oligonukleotids AAP eingesetzt. Produkte dieser Reaktion dienten als Matrize für eine „ne-

sted“-PCR mit den Oligonukleotiden UAP und PAC22, welche zur Amplifizierung des 5'-Endes der *acyA*-cDNA führte. Das erhaltene DNA-Fragment wurde sequenziert und ein Thymin als letzte Base vor der poly-C-Sequenz identifiziert. Dieses liegt 54 bp vor dem vermuteten *acyA*-Startcodon.

Die Bestimmung der *acyA*-Intronpositionen erfolgte durch Sequenzierung von PCR-Produkten, welche unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotidpaare (PAC19/PAC32, PAC34/PAC22, PAC6/PAC24) und *acyA*-cDNA als Matrize amplifiziert wurden. Durch Vergleich der dabei erhaltenen DNA-Sequenzen mit der genomischen *cosacyA1*-DNA-Sequenz konnten drei Intronen mit einer Größe von 300, 102 und 93 bp zweifelsfrei identifiziert werden.

2.2.2. Charakterisierung des *acyA*-Gens

Nach der Sequenzierung des Cosmids *cosacyA1* sowie der *acyA*-Intron- bzw. Transkriptionsstartpunktbestimmung konnte der entsprechende *acyA*-ORF analysiert werden. Er setzt sich aus 6849 bp zusammen, welche für ein Protein mit 2117 As-Resten kodieren, was einer molekularen Masse von 234 kDa entspricht. Eine Darstellung der DNA-Sequenz mit den entsprechenden As ist im Anhang C zu sehen. Mit 73%, 46% und 46 % identischen As-Resten zeigte das ACYA-Protein die größte Ähnlichkeit zu den Adenylatzyklasen CYAA aus *A. nidulans*, CYAA aus *N. crassa* bzw. MAC1 aus *M. grisea*. Durch Computeranalysen konnten wichtige Sequenzmotive in der ACYA As-Sequenz identifiziert werden. Diese beinhalteten eine Adenylat- / Guanylatzyklase-Domäne (As-Reste 1708-1845), welche das katalytische Zentrum des Enzyms darstellt. Hier erfolgt die Bindung und Umsetzung des für die cAMP-Synthese erforderlichen Substrates ATP. Weiterhin konnte ein Proteinphosphatase 2C-Sequenzmotiv identifiziert werden, welches aus zwei konservierten Bereichen, Box 1 (As-Reste 1369-1463) und Box 2 (As-Reste 1492-1650), besteht. Dieses Motiv könnte auf eine Interaktion der Adenylatzyklase mit phosphorylierten, die cAMP-Synthese modulierenden Proteinen hindeuten. Während dieser Interaktion wäre eine Dephosphorylierung des interagierenden Proteins durch die Proteinphosphatase 2C-Aktivität der Adenylatzyklase möglich, welche dann wieder zur Inhibierung des Proteins führen würde. Im N-Terminus des ACYA-Proteins wurde eine Ras-assoziierte Domäne (As-Reste 580-671) ermittelt. Solche Sequenzmotive sind charakteristisch für Ras-GTP-Effektorproteine. Allgemein deuten sie aber auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen der Adenylatzyklase und Proteinen, welche ihre Aktivität modulieren, hin. Dabei könnte es sich auch um α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine handeln. Bis

auf wenige Bereiche zeigen die Sequenzen von Adenylatzyklasen nur geringe Ähnlichkeiten. Die höchste Konservierung ist im Bereich des katalytischen Zentrums zu finden. Der in Abb. 4 dargestellte Sequenzvergleich dieser Region des ACYA-Proteins mit den entsprechenden Regionen anderer Pilz-Adenylatzyklasen belegt dies. Auf das katalytische Zentrum beschränkt zeigt ACYA 96%, 67% und 69% Identität verglichen mit *A. nidulans* CYAA, *N. crassa* CYAA und *M. grisea* MAC1.

ACYA A. f.	A	I	F	T	D	I	K	K	S	T	S	L	W	E	T	C	P	D	A	M	R	S	A	T	Q	I	H	N	D	I	L	R	R	Q	L	G	I	I	G	G	E	V	K	T	E	G	D	A	F	M	V	A	F	S	T	T	A	1768
CYAA A. n.	A	I	F	T	D	I	K	S	T	S	L	W	E	T	C	P	D	A	M	R	S	A	T	Q	I	H	N	D	I	L	R	R	Q	L	G	I	I	G	G	E	V	K	T	E	G	D	A	F	M	V	A	F	S	T	T	A	1790	
CYAA N. c.	S	I	V	F	T	D	I	K	N	S	T	L	W	E	N	T	P	E	A	M	R	L	A	T	K	L	H	N	E	V	M	R	R	Q	L	R	M	I	G	G	E	V	K	T	E	G	D	A	F	M	V	S	F	P	T	A	S	1951
MAC1 M. g.	A	I	V	F	T	D	I	K	N	S	T	L	W	E	N	T	P	E	A	M	R	S	A	T	R	L	H	N	E	M	M	R	R	Q	L	R	R	I	G	G	E	V	K	T	E	G	D	A	F	M	V	S	F	P	T	A	S	1831
ACYA A. f.	A	L	L	W	C	F	N	C	Q	T	Q	L	L	E	A	E	W	P	E	I	L	E	Q	P	C	Q	V	Q	Y	D	M	E	N	N	I	F	R	G	L	S	V	R	M	G	I	H	W	G	E	P	V	C	E	K	D	P	V	1828
CYAA A. n.	A	L	L	W	C	F	N	C	Q	T	Q	L	L	E	A	E	W	P	E	I	L	E	Q	P	C	Q	V	Q	Y	D	M	E	N	N	I	F	R	G	L	S	V	R	M	G	I	H	W	G	E	P	V	C	E	K	D	P	V	1850
CYAA N. c.	A	L	L	W	C	F	A	V	O	M	K	L	L	T	V	D	W	P	E	V	L	S	N	S	C	O	P	I	Y	D	R	N	N	I	F	R	G	L	S	V	R	M	G	I	H	W	G	E	P	L	A	E	R	D	P	V	2011	
MAC1 M. g.	A	L	L	W	C	F	A	V	Q	L	L	E	V	N	W	P	S	E	M	L	N	S	L	S	C	K	P	T	V	D	K	N	Q	V	I	F	K	G	L	S	V	R	M	G	I	H	W	G	E	P	L	C	E	P	D	P	V	1891
ACYA A. f.	T	N	R	M	D	Y	F	G	P	M	V	N	R	A	S	R	I	S	1845																																							
CYAA A. n.	T	N	R	M	D	Y	F	G	P	M	V	N	R	A	S	R	I	S	1868																																							
CYAA N. c.	T	R	R	M	D	Y	G	P	M	V	N	K	A	S	R	I	S	2029																																								
MAC1 M. g.	T	R	R	M	D	Y	G	P	M	V	N	K	A	S	R	I	S	1910																																								

Abb. 4: Aminosäure-Sequenzvergleich des katalytischen Zentrums der in *A. fumigatus* identifizierten Adenylatzyklase mit homologen pilzlichen Proteinen. Aminosäuren, welche wenigstens in drei Proteinen identisch sind, wurden schwarz unterlegt. ACYAA.f., *A. fumigatus* Adenylatzyklase (AJ276703, Q8J131) katalytisches Zentrum; CYAA A.n., *A. nidulans* (Q8NJJ8); CYAA N.c., *N. crassa* (Q01631); MAC1M.g., *M. grisea* (Q13328).

2.3. Die regulatorische Proteinkinase A (PKA)-Untereinheit PKAR

Der ORF, welcher die regulatorische PKA-Untereinheit PKAR kodiert, ist 1242 bp lang und wird nicht durch Intronen unterbrochen. Er konnte durch Sequenzierung des Cosmids *cospkaR1* vervollständigt werden. Das *pkaR*-Gen kodiert für ein Protein, bestehend aus 413 As mit einer errechneten molekularen Masse von 45 kDa. Im Anhang D ist die Sequenz des *pkaR*-Gens mit abgeleiteter As-Sequenz dargestellt. Das PKAR-Protein ist zu 77%, 58% und 56% mit den Homologen KAPR aus *A. nidulans*, KAPR aus *N. crassa* bzw. SUM1 aus *M. grisea* identisch. Abb. 5 zeigt einen Sequenzvergleich von PKAR mit diesen Proteinen.

Das PKA-Holoenzym besitzt in nicht aktiviertem Zustand eine tetramere Struktur, bestehend aus je zwei regulatorischen und katalytischen Untereinheiten (Taylor et al. 1990). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung der PKA durch Bindung von cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten, was in einer darauffolgenden Konformationsänderung und Dissoziation der katalytischen Untereinheiten resultiert (Modell siehe Abb. 6). Dementsprechend müssen regulatorische Untereinheiten über cAMP-Bindemotive in ihrer Proteinsequenz verfügen. Diese Nukleotid-bindenden Domänen sind hochkonserviert und bestehen aus zwei „Tandem“-Kopien, welche in der PKAR-Sequenz zwischen den As-Resten 162-291 sowie 294-403 identifiziert werden konnten. Das PKAR-Protein weist außerdem die konservierte „hinge“-Region auf (As-Reste 119-128) (Abb. 6). Dieses 10 As-Reste

umfassende Sequenzmotiv ist wichtig für die Bindung der katalytischen PKA-Untereinheiten. Es ähnelt der Substratbindestelle der katalytischen Untereinheiten, wobei ein Serin-Rest an Position 122 des PKAR-Proteins die Autophosphorylierungsstelle der katalytischen Kinase-Aktivität darstellt. Das Vorhandensein dieses Serins charakterisiert PKAR als Typ II regulatorische Untereinheit. In Untereinheiten vom Typ I ist dieses Serin normalerweise durch einen Alanin- oder Glycin-Rest ersetzt, welche dann eine sogenannte „Pseudophosphorylierungsstelle“ bilden (Taylor et al. 1990). Weiterhin sind innerhalb der PKAR-„hinge“-Region zwei Arginin-Reste an den Positionen 119 und 120 für die direkte Proteinerkennung zwischen regulatorischen und katalytischen Untereinheiten von Bedeutung.

PKARA.f.	~~MADSS	SFP	ET	..	MPFLKVSTKDDKISPIQKIS	EEEE	EVTSP	TDPTFRSAHSGATAPT	58			
KAPRA.n.	~~~MSNY	SHSSN	..	MPFLKVSTKEDKPFSSFKIA	DEEY	EVTSP	TDATFRASKNADNSAG	55				
KAPRN.c.	MSSTGFT	SPFGN	.ANPFGS	..	SGRSESGPMHRLV	ED	NDTITSPTTPHFGVKNA	APA	56			
SUM1M.g.	MSASGFT	SPFGANS	NPFGS	PEERRGVAGSI	QPVLE	EE	ADGIGSEPTISFK	SPG	53		
PKARA.f.	AGNS	NDNGSN	GGEGIQFNRP	DAGFGQSGEGEHVEPP	GGARPTAAANQ	GF	PNNYA	118				
KAPRA.n.	GNNPLES	GR.AG	SGDGRFRGRDP	FGNFQGAEGQDESSID	PNGRFRPTGGPDH	GF	PNNYA	114				
KAPRN.c.	FWN	GGG	DAPSDMPVR	RQPD	DFPAHYN	83				
SUM1M.g.	FRAP	GGGDANS	GPPSSRP	QNP	DTFAQYN	84				
PKARA.f.	LGRRTSVSAESL	NPTSAG	SDSWTPPC	HPKTEE	OLSRLKTA	VSNMFLF	SHLDD	DFRTVLD	178			
KAPRA.n.	LGRRTSVSAESL	NPTSAG	SDSWTPPS	HPKSE	EQLARLKT	AVSNMFLF	SHLDD	DFRTVLD	174			
KAPRN.c.	LGRRTSVSAESL	KPVT	DNNDNWS	PPVHPKTA	EQLERLKKA	ISGNFLF	NHLEDD	QSAQVLG	143			
SUM1M.g.	FARRTSVSAESL	KPIADSY	DNWT	PFPHPKSA	EQLDRLLKKA	ISGNFLF	NHLEDD	QSAQILG	144			
PKARA.f.	ALVEKPI	PAKDIKVIS	QGDAGDYFY	IVENG	HFDVYI	NPAGS	VQPPDGI	GNKVS	ITIGPGG	238		
KAPRA.n.	ALVEKPI	PAKDIKVIS	QGDAGDYFY	IVENG	HFDVYI	NPAGS	VQPPDGI	GNKVS	ITIGPGG	234		
KAPRN.c.	ALVEKPT	PAKGLKVIT	QGDAGDYFY	VVEKGR	FEVY	VN	STGALQ	PPDGMG	QKVGELI	EAGG	203	
SUM1M.g.	ALVEKPT	PAKDIKVIV	QGDAGDYFY	VVEKGR	FEVY	VN	STGALQ	PPDGMG	QKVGELI	EAGG	204	
PKARA.f.	SFGELALMYNAPRAATI	IVSADPKS	TLWALDRIT	FRILLMDS	AF	ORRRMYE	AFLEEVPLLS	298				
KAPRA.n.	SFGELALMYNAPRAATI	IVSADPKS	TLWALDRIT	FRILLMDS	AF	ORRRMYE	AFLEEVPLLS	294				
KAPRN.c.	SFGELALMYNAPRAAT	IVSADPKS	TLWALDRIT	FRILLMES	TF	ORRRMYE	AFLEEVPLK	263				
SUM1M.g.	SFGELALMYNAPRAAT	IVSADPKS	TLWALDRIT	FRILLMES	TF	ORRRMYE	AFLEEVPLLS	264				
PKARA.f.	SLKPYERA	KIADALDAI	KYPAGST	ITEEG	PGDAFY	LLS	GEAEAF	KKDVEG	PVKS	YRRG	358	
KAPRA.n.	SLKPYERA	KIADALDTI	KYPAGEY	TIKEG	DPGDAFY	LLS	GEAEAF	MEQVEE	PVKS	YKRG	354	
KAPRN.c.	TLTPYER	KIADALESQ	KYPAGHEI	ILLEG	DPGHSF	LL	EAGEAA	AFKR	NDSP	VKNYKKG	323	
SUM1M.g.	TLTAYER	KIADAL	ETQ	KYPAGT	VVILKEG	DPGEDF	YLLECG	EAEAF	KAS	IDQP	VKLYKKG	324
PKARA.f.	DFFGELALLDD	KPRAASV	VAKTDV	KVARLGRD	GFKRLL	GGPVED	IMRRAE	YS...A	410		
KAPRA.n.	DFFGELALLDD	KPRAASV	RAKTEV	KVAKLGRD	GFKRLL	GGPVEN	IMRRE	YS...S	406		
KAPRN.c.	DFFGELALLND	APRAASV	ISQTEV	KVARLGN	AFORLL	GGPIE	SILRR	RY...VE	AEV	379		
SUM1M.g.	DFFGELALLND	APRAASV	VSKTEV	KVAALG	KSAF	ORLL	GGPVE	PI	MRRT	RYDAI	KTGVEEM	384
PKARA.f.	KPS	PS~	415									
KAPRA.n.	RP	STAT	412									
KAPRN.c.	DPL	QVS	385									
SUM1M.g.	DPL	QAA	390									

Abb. 5: Aminosäure-Sequenzvergleich der in *A. fumigatus* identifizierten regulatorischen PKA-Untereinheit mit homologen pilzlichen Proteinen. Aminosäuren, welche wenigstens in drei Proteinen identisch sind, wurden schwarz unterlegt. PKARA.f., *A. fumigatus* regulatorische PKA-Untereinheit (AJ277652, Q96UX3); KAPRA.n., *A. nidulans* (O59922); KAPRN.c., *N. crassa* (Q01386); SUM1M.g., *M. grisea* (AAC34140).

Die Proteininteraktion zwischen den beiden regulatorischen Untereinheiten des PKA-Holoenzym, welche auch über die cAMP-Aktivierung hinaus besteht, kommt über den N-terminalen Bereich des Proteins vor der „hinge“-Region zu Stande (Abb. 6). Dieser umfaßt bei PKAR 118 As-Reste. Während bei Typ I-Untereinheiten zwei Cystein-Reste durch Disulfidbrückenbildung zur Interaktion beitragen, ist bei Typ II-Proteinen, zu denen auch PKAR gehört, der relativ hohe Gehalt an geladenen und polaren As-Resten charakteristisch (Taylor et al. 1990). PKAR weist im N-Terminus 6% basische, 14% saure und 33% polare As auf, was zusammen 53% der N-terminalen As entspricht.

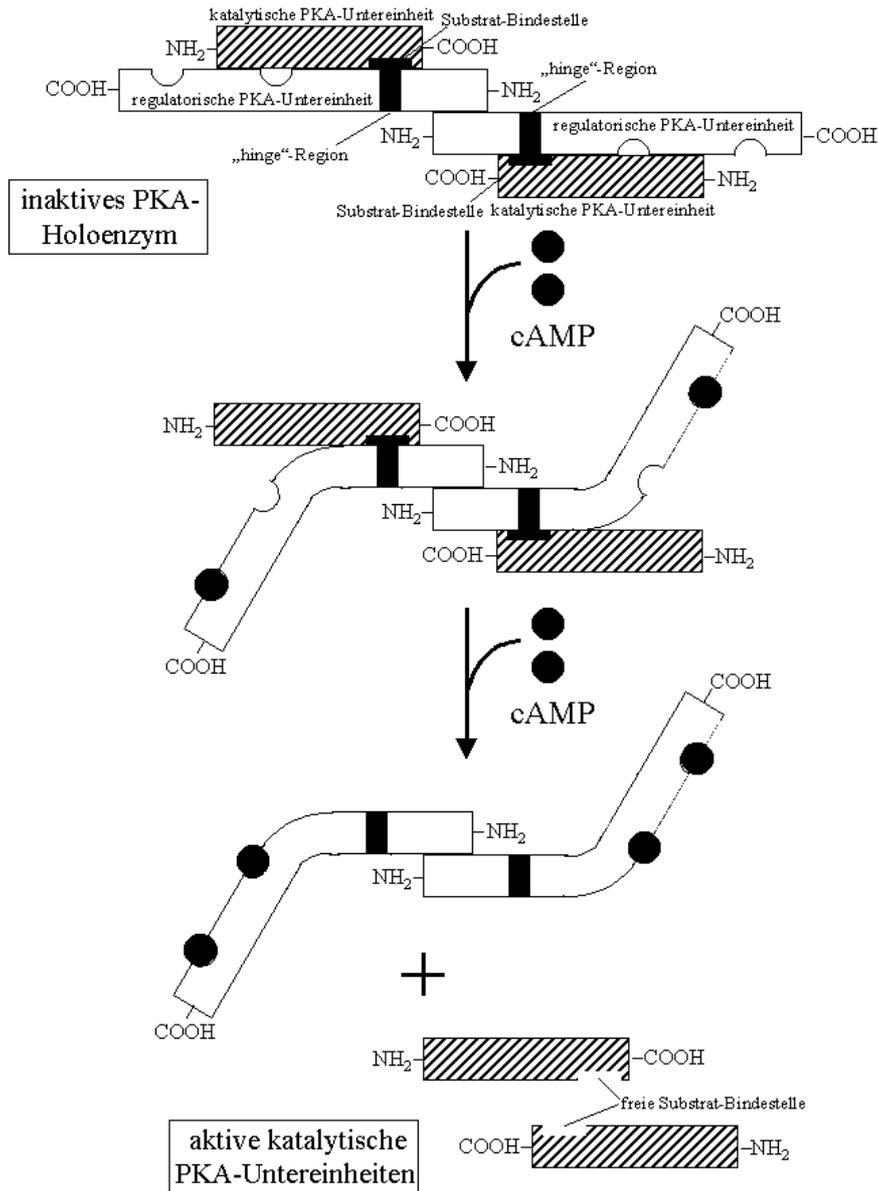


Abb. 6: Modell der PKA-Aktivierung (modifiziert nach Taylor et al. 1990).

2.4. Die katalytischen PKA-Untereinheiten PKAC1 und PKAC2

Der vollständige ORF des *pkaC1*-Gens, welches für eine katalytische Untereinheit der PKA kodiert, konnte auf dem Cosmid *cospkaC1-1* identifiziert werden. Da sowohl das Start-Codon als auch die Intronpositionen des *pkaC1*-Gens durch Sequenzvergleiche nicht eindeutig identifizierbar waren, wurden diese durch 5' RACE bzw. durch die Sequenzierung von mit cDNA als Matrize generierten PCR-Produkten bestimmt. Das Gen einer zweiten katalytischen PKA-Untereinheit, *pkaC2*, konnte bei der Durchmusterung der *A. fumigatus* Genomsequenz

(www.tigr.org) unter Verwendung der abgeleiteten PKAC1-As-Sequenz als Sonde identifiziert werden.

2.4.1. Bestimmung von Transkriptionsstartpunkt und Intronstruktur des *pkaC1*-Gens

Die Bestimmung der *pkaC1*-Intronpositionen erfolgte durch Isolierung des Plasmids pBKSpkaC1-1 aus einer cDNA-Expressionsbibliothek. Nach Sequenzierung der Plasmid-DNA und Vergleich der dabei erhaltenen Sequenzen mit der genomischen *cospkaC1-1* DNA-Sequenz konnten drei Intronen mit einer Größe von 65, 53 und 60 bp zweifelsfrei identifiziert werden. Der isolierte cDNA-Plasmidklon enthielt ein 5'-verkürztes cDNA-Fragment, weshalb der Transkriptionsstartpunkt des *pkaC1*-Gens mittels 5' RACE bestimmt wurde. Der *pkaC1*-spezifische Primer PPKAC27 wurde genutzt, um die cDNA-Erststrangsynthese durchzuführen. Nach dem Transfer der poly-C-Sequenz an die cDNA und deren Aufreinigung erfolgte eine PCR-Reaktion unter Verwendung des genspezifischen Oligonukleotids PPKAC24 und des AAP-Oligonukleotids. Produkte dieser Reaktion dienten dann als Matrize für die „nested“-PCR mit den Oligonukleotiden UAP und PPKAC4, welche zur Amplifizierung des 5'-Endes der *pkaC1*-cDNA führte. Das erhaltene DNA-Fragment wurde sequenziert und ein Adenosin als letztes Nukleotid vor der poly-C-Sequenz identifiziert. Dieses liegt 136 bp vor dem vermuteten *pkaC1*-Startcodon. Da in der genomischen *pkaC1*-Sequenz sechs Cytosin-Reste folgen, konnte nicht bestimmt werden, ob diese von der *pkaC1*-mRNA abstammten oder dem angefügten poly-C-Anteil zuzuordnen waren. Folglich blieb offen, welche dieser sieben Basen den exakten Transkriptionsstartpunkt darstellte. In der im Anhang E dargestellten *pkaC1*-Sequenz wurde der Adenin-Rest als Transkriptionsstartpunkt postuliert.

2.4.2. Charakterisierung der Gene *pkaC1* und *pkaC2*

Nach der Sequenzierung des Cosmids *cospkaC1* sowie der *pkaC1*-Intron- bzw. Transkriptionsstartpunktbestimmung konnte der entsprechende *pkaC1*-ORF ermittelt werden. Er besteht aus 1687 bp DNA-Sequenz, welche für ein Protein bestehend aus 502 As-Resten mit einer molekularen Masse von 57 kDa kodieren. Eine Darstellung der *pkaC1*-Sequenz mit abgeleiteten As ist im Anhang E zu sehen. Die As-Sequenz von PKAC1 zeigt signifikante Ähnlichkeiten mit anderen katalytischen PKA-Untereinheiten aus Pilzen (*A. nidulans* PKAC, 76%; *A. niger* PKAC, 76%; *M. grisea*, CPKA, 64%). Der Sequenzvergleich von PKAC1 mit diesen homologen Proteinen ist in Abb. 7A dargestellt. Eine konservierte Proteinkinase-Domäne, welche charakteristisch für alle eukaryontischen Proteinkinasen ist, konnte für PKAC1 zwischen den As 191 und 446 identifiziert werden.

PKAC1A.f.	MPILGGLLKKRRRKD.SHTLSKETESSSPAAAQ.TQTSFNASADHDH...HYQHYDQ	52
PKAC A.nig.	MSLGGGLLKKRRRKD.SQTLSEKELAGSAQFI...QTSFNAAEDHNN...HNNHQHSHH	51
PKAC A.nid.	MPILGGLLKKRRRKD.SQDLSEKELQAGSTTIGHT.TTSPIAAEDSQSQQHGHGGHFF	57
CPKA M.g.	MSLGC.LKKRRRRLGNNDNMSQFASPVTPLAAQSFQAOQVLGAPSAINNHGHGGHFF	59
PKAC1A.f.	THFH.....QHSASSNFSNNS.....ATPSAA...QHRSNDNPNRSGTD	91
PKAC A.nig.	LFTH.....HEQDQATNSGS.....AANTPE...QEQDSVFPQSNRSGAE	90
PKAC A.nid.	FHN.....HENHQSNNSAN.....SANSQN...SHAAKHQFDQSSATS	96
CPKA M.g.	LVPQPGYSVGTEVQAQAPQMSISQQQQQAFAPFHTPSFGTIDEQQSLPSISLMLNPAV	119
PKAC1A.f.	OKSEGO.TASMGFAVT.Q.....PHSTHNPRLHHLQOQQOQQOQQOQQOQQOQQOQQOQQ	142
PKAC A.nig.	KSDDGO.VASMGSAVT.Q.....ASESAHHTSGLP.....QP	120
PKAC A.nid.	QPSDDGO.TASMGSPAQ.Q.....PSSTHNSNG.....H	124
CPKA M.g.	QQQNSQPSNEQPSQSQSQSQSQSQSQFELLESSEHGNDQSQQQNFQVQQIQSQDAMDIOFS	179
PKAC1A.f.	QSHTSRLLNHLHPSHHASQAASTEGRHANSSQANQTEARITTKGKYSIDDETLQRTLGTGSE	202
PKAC A.nig.	NANAASIQNLINPSQQGGMHSASSGHTQSHHAGRSDAITTKGKYSIDDESILQRTLGTGSE	180
PKAC A.nid.	HSNAASLHNLHPSQQ.....NTPOVSRAEITTKGKYSIDDEALQRTLGTGSE	172
CPKA M.g.	QVQDQSHSQQAQQAQHPQHVVQHVVNHAAHQGSQDQQTAVTKGKYSIDDEILLRVLGTGSE	239
PKAC1A.f.	GRVHLVQSKHNRHYAVKVLKKAQVVKMKQVEHTNDRRMLNRVRHPLITLWGTWQAR	262
PKAC A.nig.	GRVHLVQSKHNRHYAVKVLKKAQVVKMKQIEHTNDRRMLNRVRHPLITLWGTWQSR	240
PKAC A.nid.	GRVHLVQSKHNRHYAVKVLKKAQVVKMKQIEHTNDRRMLNRVRHPLITLWGTWQAR	232
CPKA M.g.	GRVHLVQSKHNRHYAVKVLKKAQVVKMKQVEHTNDRRMLNRLGVEKNEPLITLWGTWQCR	299
PKAC1A.f.	NLYVMVDFVEGGELFSLLRKSKRFPNPVAKFYAAEVTALALEYLHSQLIYRDLKPENLLL	322
PKAC A.nig.	NLYVMVDFVEGGELFSLLRKSKRFPNPVAKFYAAEVTALALEYLHTONLIYRDLKPENLLL	300
PKAC A.nid.	NLYVMVDFVEGGELFSLLRKSKRFPNPVAKFYAAEVTALALEYLHSLNLIYRDLKPENLLL	292
CPKA M.g.	NLYVMVDFVEGGELFSLLRKSKRFPNPVAKFYAAEVTALALEYLHAKNLIYRDLKPENLLL	359
PKAC1A.f.	DRHGHLKLTDFGFAKEVDFITWTLICGTFDYLAPEVVSKGYNKSVDWWSLGILIFEMLCG	382
PKAC A.nig.	DRHGHLKLTDFGFAKEVDFITWTLICGTFDYLAPEVVSKGYNKSVDWWSLGILIFEMLCG	360
PKAC A.nid.	DRHGHLKLTDFGFAKEVDFITWTLICGTFDYLAPEVVSKGYNKSVDWWSLGILIFEMLCG	352
CPKA M.g.	DRHGHLKLTDFGFAKRVDFITWTLICGTFDYLAPEVVSKGYNKSVDWWSLGILIFEMLCG	419
PKAC1A.f.	FTEPFDWSDGSPVKIYENILRGRVKYPPYLHPDAVDLLSOLITADLTRKLGNLHGGSDDVKN	442
PKAC A.nig.	FTEPFDWSDGSPVKIYENILRGRVKYPPYLHPDAVDLLSOLITADLTRKLGNLHGGSDDVKN	420
PKAC A.nid.	FTEPFDWSDGSPVKIYENILRGRVKYPPYLHPDAVDLLSOLITADLTRKLGNLHGGSDDVKN	412
CPKA M.g.	YEPFDWSDGSPMKIYENILRGRVKYPPYLHPDAVDLLSOLITADLTRKLGNLHGGSDDVKN	479
PKAC1A.f.	HPWEAEVWDRRLARKDIDAPYVPEIRGGQGDASQYDRYEETE QYGCQEDVHGHLFDE	502
PKAC A.nig.	HPWEAEVWDRRLARKDIDAPYVPEIRGGQGDASQYDRYEETE QYGMAGEDPHGHLFDE	480
PKAC A.nid.	HPWEAEVWDRRLARKDIDAPYVPEIRGGQGDASQYDRYEETE QYGCAGEDPHGHLFDE	472
CPKA M.g.	HPWEAEVWDRRLARKDIDAPYVPEIRGGQGDASQYDRYEETE QYGTGHDEYGNLFEDE	539

A

PKAC2A.f.	MEATGKNEPSTHSEIFSSPESRGVDLELEDVQKREKQMVESFRPEHQRSVNPFFLKRDL	59
CPK2 M.g.	MAAALHSSGMIEMVGVPRSTSYENGSGNSSLTAGHGSVNDGSRTERNALQGDLS	58
UKA1 U.m.	MTIEDIVDTLSVELLGACASHVSRPLMPSLASRSGPPASSSDERTSSSSTEKVAKSVG	59
PKAC2A.f.	EERQIGIS.TEITLCVNDFTLTKLTCGTFARVWIAKFKDET.IRDNVYALKVLEKADV	116
CPK2 M.g.	DAASAQSO.NRKLQLSDEKKVRIPLCTGTFARVCHVEPSEFQNETEENKVFALKLEKSEV	117
UKA1 U.m.	SASPDRSSPWRPYALSDEEVEITLCTGTFARVLEKLRD.VADRSAYFALKVAKTDE	118
PKAC2A.f.	IKLKVQEHVNERKALAAVAHPFITLILASFSDQSLYMLLDYCFGGELFSLYLRARRF	176
CPK2 M.g.	VKLVQIDHVEHERALLADVSEFPFTNMASFSDHDFLYLVLDYVEGGEFSLYLRKRRF	177
UKA1 U.m.	IKLKVQESHINSERCHITKVD.HPELVNMIASEQDSKNCMMMEYVFGGELFSLYLRARRF	177
PKAC2A.f.	NETTSREYAAEITLTHEYLHVEG.IVYRDLKPENLLDADGHIKLVDFGFAKQINDR..	233
CPK2 M.g.	DEDMARFYAAEIVLVLEYLHQAQDGVAYRDLKPENLLDGCCHIKLVDFGFAKRLGGRD	237
UKA1 U.m.	SADVARYFYSTLVLAEYLYHSNKV.IVYRDLKPENLLDSSNGYVITDFGFAEVEDR..	233
PKAC2A.f.ETITLCCTEYLAEVEIHSNGHLAVDQWALGILLIYEFIVGQPPFDQPMR	286
CPK2 M.g.	GDNSGTQETITLCCTEYLAEVEIHKNGHETAVDQWALGILLIYEFIVGQPPFDQPMR	297
UKA1 U.m.ETITLCCTEYLAEVEITQCSGHLAVDQWALGILLIYEFIVGQPPFDQPMR	285
PKAC2A.f.	VEQIVEGRLEFP..ENMSPAQNIISCLCKTNPSERLGHISGGSRVKAHFFFEIDWD	344
CPK2 M.g.	YKQIVEKEVVEFPDEISEVADITLQECTVDRSRELGNISGGAARVKEHFFFEQVDWEA	357
UKA1 U.m.	YKHLLAGLWVFP..EEDPLSRDLTSSLLDADRSELGNLREGANDVKNHEVHGVWKA	343
PKAC2A.f.	IFHRRMKGFITPRVDH.PADGNEEDM...DVDVKQALYVDDMKKYEAFESDF	396
CPK2 M.g.	IYSRFFPGFLPEPIRYGDAQCFDI...EEDVY.KDPVDEMAQKYDHYQDF	408
UKA1 U.m.	IQEGILLPEIPEYLRGSDSNESEKPEAREFSAMEGLYGADSGHDLADLEPDE	398

B

Abb. 7: Aminosäure-Sequenzvergleich der in *A. fumigatus* identifizierten katalytischen PKA-Untereinheiten mit homologen pilzlichen Proteinen. Aminosäuren, welche wenigstens in drei (A) bzw. zwei (B) Proteinen identisch sind, wurden schwarz unterlegt. A PKAC1A.f., *A. fumigatus* katalytische PKA-Untereinheit 1 (Q8J129, AJ297841); PKACA.nig., *A. niger* (P87077); PKACA.nid., *A. nidulans* (Q9P472); CPKAM.g., *M. grisea* (Q01143); B PKAC2A.f., *A. fumigatus* katalytische PKA-Untereinheit 2 (AJ575357); CPK2M.g., *M. grisea* (AA021201); UKA1U.m., *U. maydis* (AF025290).

Der in der *A. fumigatus* Genomdatenbank (www.tigr.org) identifizierte ORF, welcher für eine zweite katalytische PKA-Untereinheit (PKAC2) kodiert, besteht aus 1441 bp. Er wird durch drei Intronen mit einer Länge von 65, 70 und 115 bp unterbrochen. Das *pkaC2*-kodierte Protein setzt sich aus 396 As zusammen und hat demzufolge eine errechnete molekulare Masse von 45 kDa. Die Sequenz des *pkaC2*-Gens mit abgeleiteter As-Sequenz ist im Anhang F dargestellt. PKAC2 zeigt 51% und 44% identische As verglichen mit katalytischen PKA-Untereinheiten aus *M. grisea* (CPK2) bzw. *U. maydis* (UKA1). In Abb. 7B ist ein Sequenzvergleich dieser Proteine mit PKAC2 dargestellt. Die Proteinkinase-Domäne konnte zwischen den As 76 und 337 identifiziert werden.

Interessanterweise zeigen beide identifizierten katalytischen PKA-Untereinheiten aus *A. fumigatus*, PKAC1 und PKAC2, untereinander nur 33% Identität. Dieses Ergebnis ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß beide Proteine verschiedenen Untergruppen angehören und unterschiedliche Funktionen im Organismus zu erfüllen haben. Trotzdem konnten wichtige Sequenzmotive, welche für katalytische PKA-Untereinheiten charakteristisch sind (Knighton et al. 1991), in beiden Proteinsequenzen identifiziert werden. Diese beinhalten das RDLKPEN-Sequenzmotiv der katalytischen Schleife (PKAC1: As 314-320; PKAC2: As 204-210) und die DFGFAK As-Abfolge (PKAC1: As 333-338; PKAC2: As 223-228), welche in die Mg²⁺-Bindung involviert ist. In katalytischen PKA-Untereinheiten ebenfalls konserviert sind die Nukleotid-Bindestelle GTGSFG (PKAC1: As 198-203) und drei As-Reste, welche für die Assoziation zwischen katalytischen und regulatorischen Untereinheiten wichtig sind (PKAC1: H235, W344, L346). Während PKAC1 diese Signaturen aufweist, zeigt PKAC2 nicht die Konsensus-Sequenz der Nukleotid-Bindestelle (GTGTFA, As 83-88). Weiterhin enthält PKAC2 auch nur zwei der drei konservierten Reste für eine Interaktion der PKA-Untereinheiten (H124, L238). Interessanterweise ist der dritte konservierte As-Rest (PKAC1: W344) im PKAC2-Protein gegen ein Tyrosin ausgetauscht (Y236). Da Tyrosin aber strukturelle Ähnlichkeit zu Tryptophan aufweist, erfüllt es möglicherweise dieselbe Funktion. Der gleiche As-Austausch tritt auch bei den PKA-Isoformen TPK1 und TPK3 aus *S. cerevisiae* auf, welche ebenfalls aktiv sind. Beide katalytischen PKA-Untereinheiten aus *A. fumigatus*, PKAC1 and PKAC2, enthalten einen As-Rest, welcher autophosphoryliert werden kann (PKAC1: T345; PKAC2: T237) sowie identische oder homologe Reste, welche für die Erkennung der Konsensus-Phosphorylierungssequenz des Substrates erforderlich sind. Die As-Reste L346, P350, L353 (PKAC1) und L238, P242, L245 (PKAC2) binden den hydrophoben Rest an der + 1 Position relativ zur Phosphorylierungsstelle des Substratproteins. Die Reste E319, E378 (PKAC1) sowie E209, E270 (PKAC2) binden den Arginin-Rest an der – 2 Posi-

tion, und die Reste E275 (PKAC1) sowie E165 (PKAC2) binden den Arginin-Rest an der – 3 Position.

Ein interessantes zusätzliches Merkmal von PKAC1 ist eine Glutamin-reiche Region (As-Reste 122-143), welche aus 21 Glutamin-Resten besteht, die nur durch ein Prolin unterbrochen werden. Glutamin-reiche Sequenzabfolgen können für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sein. Sie treten auch in anderen Proteinkinasen aus höheren und niederen Pilzen auf (Haribabu und Dottin 1991; Buhr et al. 1996; Sonneborn et al. 2000).

3. Erzeugung und phänotypische Charakterisierung von cAMP-Signaltransduktionsmutanten

3.1. Strategie zur Konstruktion von Gendeletionsstämmen

Zur Erzeugung von Gendeletionsstämmen wurden Plasmidvektoren konstruiert, welche spezifische Selektionsmarkergene enthielten. Die Selektionsmarker wurden beidseitig von DNA-Bereichen flankiert, welche an die jeweils zu deletierenden Gene angrenzen. Entsprechende Zielgene wurden durch doppeltes „Crossing over“ zwischen den flankierenden Sequenzen der Plasmidvektoren und den entsprechenden DNA-Regionen des chromosomalen Genlocus ersetzt. Durch die Nutzung unterschiedlicher Selektionsmarker konnten Gene der cAMP-Signaltransduktionskaskade in Wildtyp-Stämmen mit verschiedenem genetischen Hintergrund deletiert werden.

Als Selektionsmarker kam das Hygromycin B-Resistenzgen *hph* aus *E. coli* zum Einsatz. Nach Integration ins Genom sensitiver *A. fumigatus* Stämme und Expression führt es zur Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin B. Da in dieser Arbeit ein Tierinfektionsmodell unter Verwendung des *A. fumigatus*-Wildtyps ATCC46645 etabliert und optimiert wurde (siehe Ergebnisse 6.2.), sollten cAMP-Signaltransduktionsmutanten konstruiert werden, die neben der Deletion den gleichen genetischen Hintergrund wie der verwendete Wildtyp aufwiesen. Deswegen wurde der Stamm ATCC46645, welcher keine Auxotrophien aufweist, mit dem *hph*-Marker transformiert und anschließend resistente Transformanten selektioniert.

Der zweite Selektionsmarker, der in dieser Arbeit genutzt wurde, war der sogenannte Ura-Blaster (d'Enfert 1996). Er beinhaltet neben zwei sequenzidentischen Neomycin-Phosphotransferase-Genen (*neo*), welche Kanamycin-Resistenz während der Klonierungsschritte in *E. coli* vermitteln, das *pyrG*-Gen aus *A. niger*. *pyrG* kodiert für eine Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase (OMP-Decarboxylase), welche in die Uracil-Biosynthese in-

volviert ist (Weidner et al. 1998). Der in dieser Arbeit verwendete Uracil-auxotrophe Stamm CEA17 weist eine Punktmutation in der den N-Terminus kodierenden Sequenz des *pyrG*-Gens auf. Eine Integration des Ura-Blasters ins Genom des Stammes CEA17 komplementiert diesen wieder zur Uracil-Prototrophie. Der Vorteil des Ura-Blasters liegt in seiner Wiederverwendbarkeit als Selektionsmarker. Durch Zugabe des Pyrimidinanalogons 5'-Fluororotsäure (5'-FOA) zum Wachstumsmedium kann auf eine homologe Rekombination zwischen beiden *neo*-Genen selektioniert werden, welche zur Deletion des *pyrG*-Gens und einer *neo*-Kopie führt. 5'-FOA wird von der OMP-Decarboxylase als Substrat erkannt und zu einem toxischen Endprodukt umgesetzt. Nur Stämme, die durch homologe Rekombination den Ura-Blaster wieder deletiert vorliegen haben, können demnach auf Medium mit 5'-FOA wachsen, da sie diese Umsetzung nicht durchführen können. Zusätzlich mußte dem Medium aber Uracil zur Komplementation der wiederentstandenen Auxotrophie zugesetzt werden. Die in dieser Arbeit dargestellte Erzeugung von cAMP-Signaltransduktionsmutanten mit dem Ura-Blaster war wichtig, um nacheinander mehrere Gene in einem Stamm unter Verwendung des gleichen Selektionsmarkers inaktivieren zu können (siehe Ergebnisse 3.5.). Weiterhin sollten in bestimmte Gendeletionsstämme Fusionen eines potentiellen cAMP-Effektorgens mit dem *lacZ*-Reporter gen eingebracht werden, um den Einfluß der cAMP-Signaltransduktion auf die Genexpression zu untersuchen (siehe Ergebnisse 5.1.). Da bei der DNA-Integration wiederum auf Komplementation der *pyrG*-Mutation und damit Uracil-Prototrophie selektioniert werden sollte, war die Entfernbarekeit des Ura-Blasters aus dem Genom der Gendeletionsstämme eine wichtige Voraussetzung.

3.2. Deletion des $G\alpha$ -Untereinheit-kodierenden Gens *gpaB*

Sequenzvergleiche zeigten, daß beide in *A. fumigatus* identifizierten $G\alpha$ -Untereinheiten unterschiedlichen Gruppen angehören. Die Einteilung erfolgt nach der Fähigkeit, die cAMP-Synthese-Aktivität der Adenylatzyklase beeinflussen zu können. GPAA konnte der Gruppe der inhibierenden, und GPAB der Gruppe der aktivierenden $G\alpha$ -Untereinheiten zugeordnet werden. Interessanterweise gehören zur aktivierenden Gruppe auch Proteine, für die über den Einfluß auf die cAMP-Signaltransduktion hinaus auch eine Beteiligung an Virulenzprozessen der entsprechenden Pilze gezeigt werden konnte. Es handelt sich dabei um die $G\alpha$ -Untereinheiten GPA1 und GPA3 aus *C. neoformans* bzw. *U. maydis*. Um zu untersuchen, ob Virulenzprozesse auch in *A. fumigatus* durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert werden, wurde demzufolge das $G\alpha$ -Untereinheit-kodierende Gen *gpaB* gewählt, um es zu deletieren und anschließend den daraus resultierenden Phänotyp zu charakterisieren.

Zur gezielten Deletion des *gpaB*-Gens wurden zwei Deletionsplasmide, pUCgpaBhph1 und pUCgpaBUra1 (Abb. 8A, B), konstruiert. Diese enthielten verschiedene Selektionsmarker, die Hygromycin B-Resistenzkassette bzw. den Ura-Blaster, welche beidseitig von an *gpaB* angrenzenden DNA-Sequenzen flankiert waren. Das Zielgen wurde durch doppeltes „Crossing over“ zwischen den flankierenden Sequenzen der Deletionsplasmide und den entsprechenden DNA-Regionen des chromosomalen Genlocus ersetzt. Durch die Nutzung unterschiedlicher Selektionsmarker konnte das *gpaB*-Gen in verschiedenen Wildtyp-Stämmen deletiert werden.

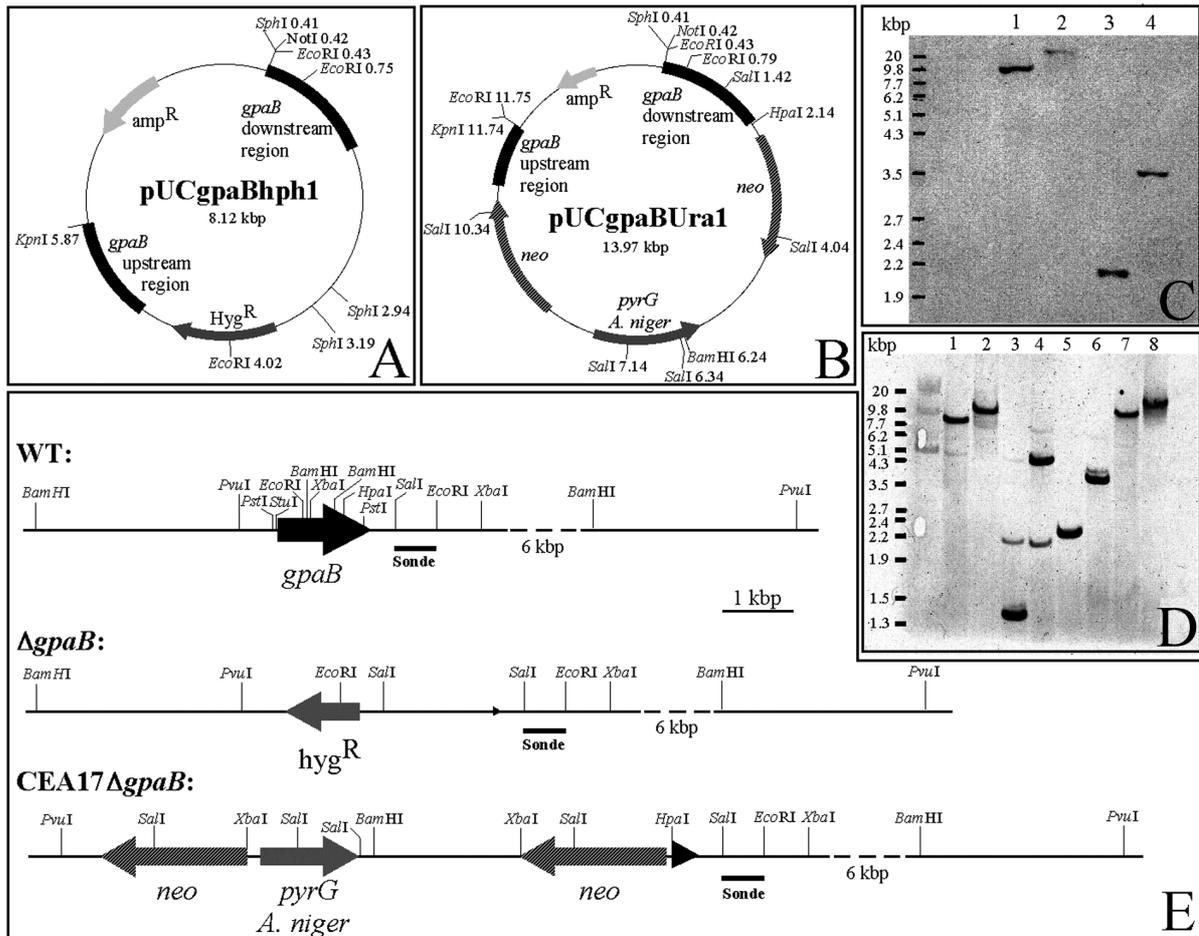


Abb. 8: Deletion des α -Untereinheit-kodierenden Gens *gpaB*. **A** Schematische Karte des *gpaB*-Deletionsvektors pUCgpaBhph1. **B** Schematische Karte des *gpaB*-Deletionsvektors pUCgpaBUra1. **C** „Southern blot“-Analyse des *gpaB*-Deletionsstammes $\Delta gpaB$. Chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes ATCC46645 (Spuren 1 und 3) und des Stammes $\Delta gpaB$ (Spuren 2 und 4) wurde mit *Bam*HI (Spuren 1 und 2) und *Eco*RI (Spuren 3 und 4) verdaut. Ein 600 bp *Eco*RI/*Sal*I DNA-Fragment des Plasmids pUCgpaBUra1 wurde als Sonde genutzt. **D** „Southern blot“-Analyse des *gpaB*-Deletionsstammes CEA17 $\Delta gpaB$. Chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes CEA17*pksP-lacZ* (Spuren 1, 3, 5, 7) und des Stammes CEA17 $\Delta gpaB$ (Spuren 2, 4, 6, 8) wurde mit *Bam*HI (Spuren 1 und 2), *Bam*HI/*Eco*RI (Spuren 3 und 4), *Xba*I (Spuren 5 und 6) und *Pvu*I (Spuren 7 und 8) geschnitten. **E** Schematische Darstellung des chromosomalen *gpaB*-Locus vom Wildtyp und von Deletionsmutanten. Restriktionsschnittstellen und die Position, an der die Sonde hybridisiert, sind markiert. Abkürzungen: *amp*^R, Ampicillin Resistenz-Gen; *hyg*^R, Hygromycin B Resistenz-Gen; *pyrG*, Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase-Gen aus *A. niger*; *neo*, Neomycin Phosphotransferase-Gen.

Zur Konstruktion der Deletionsplasmide wurde ein *gpaB* enthaltendes DNA-Fragment mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide PgalphaB17 / PgalphaB18 und des Cosmids cosgpaB1 als Matrize amplifiziert. Das 3,9 kbp große PCR-Produkt wurde dann in den Vektor pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert und anschließend aus dem so konstruierten Plasmid pTA_{gpaB}1 reisoliert. Dazu erfolgte eine Restriktion mit *KpnI/SphI* und die Umklonierung in den Vektor pUC18. Durch *XhoI*-Restriktion und Religation des dabei entstandenen Plasmids pUC_{gpaB}1 konnte die *PstI*-Schnittstelle der pUC18-Klonierungsstelle entfernt werden. Das entstandene Plasmid wurde mit pUC_{gpaB}Pst⁻¹ bezeichnet. Das Ersetzen des *gpaB*-Gens erfolgte dann durch *PstI*-Restriktion und anschließende Ligation mit einem 3,1 kbp *NsiI*-Fragment, welches dem Plasmid pUCGH-pksPI (Langfelder et al. 2001) entstammte und das Hygromycin B-Resistenzgen *hph* kodiert. Das so konstruierte Deletionsplasmid wurde mit pUC_{gpaB}hph1 bezeichnet (Abb. 8A). Es enthielt das *hph*-Selektionsmarker gen sowie etwa 1 kbp stromaufwärts und etwa 1,4 kbp stromabwärts flankierende DNA-Sequenz des *gpaB*-Gens.

Ein zweites, mit pUC_{gpaB}Ura1 bezeichnetes Deletionsplasmid (Abb. 8B) wurde durch *StuI/HpaI*-Restriktion des Vektors pUC_{gpaB}1 und anschließender Ligation mit einem den Ura-Blaster enthaltenden 8,6 kbp *HpaI*-Fragment aus dem Plasmid pCDA14 (d'Enfert 1996) konstruiert. pUC_{gpaB}Ura1 enthielt neben dem Selektionsmarker etwa 1 kbp stromaufwärts und etwa 1,7 kbp stromabwärts flankierende DNA-Sequenz der zu deletierenden *gpaB*-Region.

Zur Konstruktion von *gpaB*-Deletionsstämmen wurden die *A. fumigatus* Wildtyp-Stämme ATCC46645 und CEA17 mit linearen Fragmenten der *gpaB*-Deletionsplasmide transformiert. Die Verwendung linearer DNA-Fragmente führt zur Erhöhung homologer Doppel-, „Crossing over“-Ereignisse und verhindert die ektopische Integration zirkulärer Plasmid-DNA über homologes Einzel-, „Crossing over“.

Bei der Transformation des Stammes ATCC46645 kam ein 5,5 kbp *HindIII*-Fragment des Plasmids pUC_{gpaB}hph1 zum Einsatz. Es konnten 75 Hygromycin B-resistente Transformanten isoliert werden, von denen 19 durch „Southern blot“-Analysen getestet wurden. Dies führte zur Isolierung von zwei Transformanten, welche die erwartete Gendeletion aufwiesen. Einer dieser Transformanten wurde mit $\Delta gpaB$ bezeichnet und für weitere Studien genutzt.

Ein 10,5 kbp *EcoRI*-Fragment des Plasmids pUC_{gpaB}Ura1 wurde für die Transformation des Uracil-auxotrophen *A. fumigatus*-Stammes CEA17 genutzt. Es konnten 77 Uracil-prototrophe Transformanten isoliert werden, von denen acht in „Southern blot“-Analysen getestet wurden. Vier der getesteten Transformanten zeigten die *gpaB*-Gendeletion, wobei einer dieser Stämme

eine zusätzliche ektopische Integration des *EcoRI*-DNA-Fragments aufwies. Einer der Transformanten, welcher das für die Gendeletion charakteristische Hybridisierungsmuster des *gpaB*-Locus zeigte, wurde mit CEA17 Δ *gpaB* bezeichnet und für weitere Studien verwendet. In den Abb. 8C und 8D sind die Ergebnisse der „Southern blot“-Analysen beider *gpaB*-Deletionsstämme dargestellt. Eine schematische Darstellung des chromosomalen *gpaB*-Locus vor und nach der Gendeletion ist in Abb. 8E zu sehen. Bei einzelner Integration eines linearisierten Plasmid-Fragments über homologes doppeltes „Crossing over“ sind bei den Deletionsstämmen Banden voraussagbarer Größe zu detektieren, während Banden, welche den Wildtyp-*gpaB*-Locus charakterisieren, nicht mehr nachzuweisen sein sollten. Im Stamm Δ *gpaB* konnten nach Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen Banden detektiert werden, welche dem *gpaB*-Deletionsereignis entsprachen (Abb. 8C, Spuren 2, 4), wobei die Wildtyp-Banden (Abb. 8C, Spuren 1, 3) verschwanden. Auch im Stamm CEA17 Δ *gpaB* waren die charakteristischen Wildtyp-Banden (Abb. 8D, Spuren 1, 3, 5 und 7) nicht mehr nachzuweisen. Stattdessen konnten Banden, welche die *gpaB*-Deletion kennzeichnen, detektiert werden (Abb. 8D, Spuren 2, 4, 6 und 8). Der Stamm Δ *gpaB* wies die Deletion einer Region auf, welche die As 1-338 des GPAB-Proteins sowie 55 bp der 5' nicht translatierten DNA-Sequenz kodiert. Im Stamm CEA17 Δ *gpaB* war die DNA-Sequenz für die As 1-244 des Proteins und 41 bp der 5' nicht translatierten Region deletiert.

3.3. Deletion des Adenylatzyklase-kodierenden Gens *acyA*

Die Adenylatzyklase ACYA stellt die Schlüsselkomponente des cAMP-Signaltransduktionsweges dar. Da in keinem Pilz bisher mehrere Adenylatzyklasen kodierenden Gene nachgewiesen wurden, sollte die Inaktivierung dieser Komponente durch fehlende cAMP-Produktion zur Unterbrechung der Signalweiterleitung führen. Um diesen Nachweis für *A. fumigatus* durchzuführen, sollte das Adenylatzyklase-kodierende Gen *acyA* deletiert werden. Da es mit etwa 7 kbp relativ groß und deswegen schwer komplett zu deletieren war, wurde das katalytische Zentrum als wichtigste funktionelle Domäne für eine Deletion ausgewählt.

Wie schon für die Deletion des *gpaB*-Gens wurden auch zur *acyA*-Deletion zwei verschiedene Vektoren, pUCHygacyA2 und pUCacyAUra1 (Abb. 9A, B), konstruiert, wobei ein Plasmid die Hygromycin B-Resistenzkassette und das zweite den Ura-Blaster als Selektionsmarker enthielt. Die DNA-Region, welche das katalytische ACYA-Zentrum und flankierende Bereiche kodiert, wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden PAC24 / PAC29 und DNA des Cosmids cosacyA1 als Matrize amplifiziert und anschließend in den pCR2.1-

TOPO-Vektor (TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert. Aus dem so konstruierten Plasmid pTOPOacyA1 wurde das PCR-Fragment durch *EcoRI*-Restriktion reisoliert und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Dabei entstand das Plasmid pUCacyA1. Die DNA-Sequenz, welche das katalytische Zentrum kodiert, wurde durch *NsiI/NcoI*-Restriktion des Vektors pUCacyA1 entfernt. Abschließend wurde ein 2 kbp *NsiI/BspHI* DNA-Fragment, welches aus Plasmid pUCGH-pksPI (Langfelder et al. 2001) erhalten wurde und das vollständige *hph*-Gen kodiert, mit den *NsiI*- und *NcoI*-Restriktionsschnittstellen von pUCacyA1 ligiert. Das so konstruierte Plasmid pUCHyacyA2 (Abb. 9A) enthält das *hph*-Gen als Selektionsmarker flankiert von etwa 2,1 kbp 5'- und etwa 1 kbp 3'-DNA-Sequenz des katalytischen Zentrums.

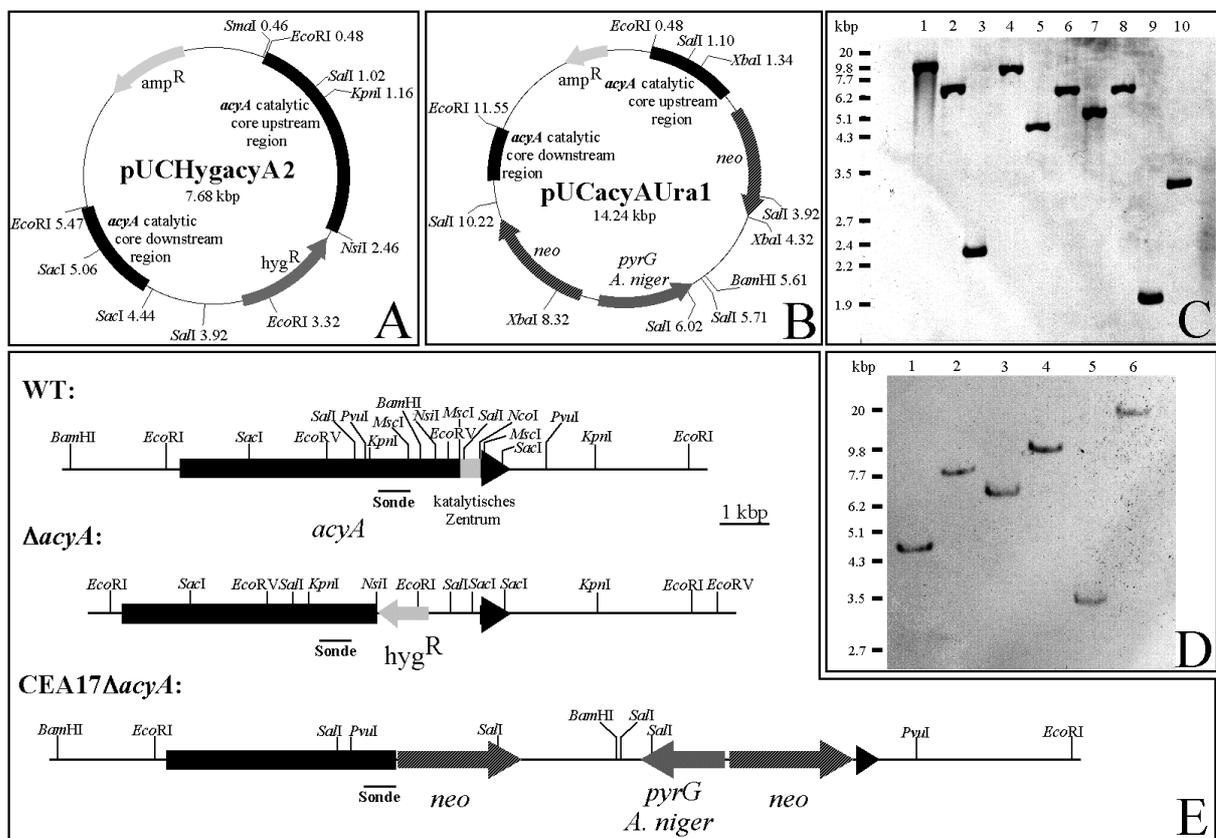


Abb. 9: Deletion des Adenylatzyklase-kodierenden Gens *acyA*. **A** Schematische Karte des *acyA*-Deletionsvektors pUCHyacyA2. **B** Schematische Karte des *acyA*-Deletionsvektors pUCacyAUra1. **C** „Southern blot“-Analyse des *acyA*-Deletionsstammes Δ *acyA*. Chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes ATCC46645 (Spuren 1, 3, 5, 7, 9) und des Stammes Δ *acyA* (Spuren 2, 4, 6, 8, 10) wurde mit *EcoRI* (Spuren 1 und 2), *EcoRV* (Spuren 3 und 4), *KpnI* (Spuren 5 und 6), *SacI* (Spuren 7 und 8) und *SalI* (Spuren 9 und 10) verdaut. Ein 700 bp *acyA*-PCR-Fragment wurde als Sonde genutzt. **D** „Southern blot“-Analyse des *acyA*-Deletionsstammes CEA17 Δ *acyA*. Chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes CEA17*pksP-lacZ* (Spuren 1, 3, 5) und des Stammes CEA17 Δ *acyA* (Spuren 2, 4, 6) wurde mit *BamHI/EcoRI* (Spuren 1 und 2), *BamHI* (Spuren 3 und 4) und *PvuII* (Spuren 5 und 6) geschnitten. **E** Schematische Darstellung des chromosomalen *acyA*-Locus vom Wildtyp und von Deletionsmutanten. In den Stämmen Δ *acyA* und CEA17 Δ *acyA* wurden *acyA*-Genbereiche deletiert, welche das katalytische Zentrum kodieren. Restriktionsschnittstellen und die Position, an der die Sonde hybridisiert, sind markiert. Abkürzungen: *amp*^R, Ampicillin Resistenz-Gen; *hyg*^R, Hygromycin B Resistenz-Gen; *pyrG*, Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase-Gen aus *A. niger*; *neo*, Neomycin Phosphotransferase-Gen.

Zur Konstruktion des zweiten Deletionsvektors pUCacyAUra1 (Abb. 9B) wurde Plasmid pUCacyA1 mit *MscI* geschnitten und letztlich mit einem den Ura-Blaster kodierenden 8,6 kbp *HpaI*-Fragment aus Plasmid pCDA14 (d'Enfert 1996) ligiert. Das Plasmid pUCacyAUra1 enthält neben dem Ura-Blaster als Selektionsmarker etwa 1,6 kbp stromaufwärts und 0,9 kbp stromabwärts flankierende DNA-Sequenz der zu deletierenden *acyA*-Region.

Für die Transformation des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 wurde das Plasmid pUCHygacyA2 durch *SmaI*-Restriktion linearisiert. Es konnten 50 Hygromycin B-resistente Transformanten isoliert werden, von denen acht in „Southern blot“-Analysen getestet wurden. Zwei der getesteten Transformanten wiesen die erwartete *acyA*-Gendeletion auf, wobei einer der beiden Transformanten eine zusätzliche ektopische Integration des Gendeletionsvektors zeigte. Die zweite Transformante zeigte das für die Gendeletion charakteristische Hybridisierungsmuster. Dieser Stamm wurde mit Δ *acyA* bezeichnet und für weitere Studien genutzt.

Bei der Transformation des Uracil-auxotrophen Stammes CEA17 kam ein etwa 11,1 kbp *EcoRI*-Fragment des Plasmids pUCacyAUra1 zum Einsatz. 100 Uracil-prototrophe Transformanten konnten isoliert werden. Von den durch „Southern blot“-Analysen getesteten acht Transformanten zeigten sieben die *acyA*-Gendeletion. Während von diesen sieben Transformanten drei das erwartete Hybridisierungsmuster aufwiesen, waren in vier Stämmen weitere Banden aufgrund von zusätzlicher ektopischer DNA-Integration zu detektieren. Eine der den gewünschten Genotyp aufweisenden Transformanten wurde ausgewählt und mit CEA17 Δ *acyA* bezeichnet.

Abb. 9C und 9D zeigen die Ergebnisse der „Southern blot“-Analyse beider ausgewählter *acyA*-Deletionsstämme. Zum Vergleich ist eine schematische Darstellung des *acyA*-Locus vom Wildtyp und den Deletionsstämmen in Abb. 9E gezeigt. Im Δ *acyA*-Stamm verschwanden die für den intakten *acyA*-Locus charakteristischen Banden (Abb. 9C). Stattdessen waren Banden von 6.5 kbp (Spur 2), 8.5 kbp (Spur 4), 6 kbp (Spur 6), 6 kbp (Spur 8) und 3 kbp (Spur 10), welche auf einen Genaustausch hindeuteten, sichtbar (Abb. 9C). Auch im Stamm CEA17 Δ *acyA* konnten nach Restriktion mit drei verschiedenen Enzymen Banden detektiert werden, welche dem *acyA*-Deletionsereignis entsprachen (Abb. 9D, Spuren 2, 4 und 6), wobei die den Wildtyp-*acyA*-Locus kennzeichnenden Banden (Abb. 9D, Spuren 1, 3 und 5) nicht mehr zu detektieren waren. In den Stämmen Δ *acyA* und CEA17 Δ *acyA* wurden die DNA-Regionen deletiert, welche für die As 1584-1845 bzw. 1407-1851 der Adenylatzyklase kodieren und das katalytische Zentrum des Enzyms umfassen.

3.4. Deletion des für eine katalytische PKA-Untereinheit kodierenden Gens *pkaC1*

Die Existenz mehrerer Isoformen der katalytischen PKA-Untereinheit wurde für verschiedene Pilze wie *S. cerevisiae*, *C. albicans* oder *U. maydis* beschrieben (Toda et al. 1987b, Bockmühl et al. 2001, Dürrenberger et al. 1998). Trotzdem trägt in den meisten Fällen nur eine katalytische Untereinheit zur zellulären PKA-Aktivität bei. In *A. fumigatus* konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei Gene, welche für katalytische PKA-Untereinheiten kodieren, nachgewiesen werden. Sequenzvergleiche implizierten, daß PKAC1 das homologe Protein der aktiven PKA-Untereinheiten anderer Pilze ist. Desweiteren deutete die PKAC2-Nukleotidbindestelle, welche nicht der Konsensussequenz entspricht, darauf hin, daß dieses Protein möglicherweise nicht aktiv sein könnte. Alle funktionell charakterisierten katalytischen PKA-Untereinheiten aus Pilzen weisen dieses charakteristische Sequenzmotiv auf, weil die ATP-Bindung eine wichtige Voraussetzung für die Aktivität dieser Proteine darstellt. Um zu untersuchen, welchen Einfluß eine Inaktivierung der PKA auf Morphogenese und Virulenz von *A. fumigatus* hat, wurde deshalb das *pkaC1*-Gen für eine Deletion ausgewählt.

Auch die *pkaC1*-Deletion sollte unter Verwendung zweier Selektionsmarker durchgeführt werden. Um die *pkaC1*-Deletionsvektoren pUCpkaC1hph1 und pUCpkaC1Ura1 (Abb. 10A, B) zu konstruieren, wurde ein 3,24 kbp PCR-Produkt unter Verwendung der Oligonukleotide PPKAC12 / PPKAC17 und DNA des Cosmids cospkaC1-1 als Matrize amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert und dabei Plasmid pTApkaC1-1 erhalten. Das PCR-Fragment wurde durch *HindIII/XbaI*-Restriktion aus pTApkaC1-1 reisoliert und in pUC18, welcher ebenfalls mit *HindIII/XbaI* geschnitten war, subkloniert. Dabei entstand Plasmid pUCpkaC1-1. Das Deletionsplasmid pUCpkaChph1 (Abb. 10A) beinhaltet das Hygromycin B-Resistenzgen *hph*. Dieses wurde durch *BamHI/EcoRV*-Restriktion als 2,7 kbp-Fragment aus dem Plasmid pUCHph1 (K. Hübner, pers. Mitteilung) ausgeschnitten und in die *BclI/MscI*-Restriktionschnittstelle des Vektors pUCpkaC1-1 ligiert. Neben dem Selektionsmarker enthielt pUCpkaC1hph1 etwa 1,4 kbp stromaufwärts und etwa 0,9 kbp stromabwärts flankierende DNA-Sequenz des zu deletierenden *pkaC1*-Bereichs, welcher die Proteinkinase-Domäne enthielt. Für die Konstruktion eines zweiten *pkaC1*-Deletionsplasmids wurde wiederum der Ura-Blaster als Selektionsmarker genutzt. Ein 8,6 kbp, den Ura-Blaster enthaltendes *HpaI*-Fragment wurde aus Plasmid pCDA14 (d'Enfert 1996) isoliert und in den *NruI/MscI*-geschnittenen Vektor pUCpkaC1-1 ligiert. Das so erhaltene Deletionsplasmid pUCpkaCUra1 (Abb. 10B) enthielt neben dem Selektionsmarker etwa 1,7 kbp 5'- und etwa 0,9 kbp 3'-flankierende DNA-Sequenz einer *pkaC1*-Region, welche große Teile der Proteinkinase-Domäne kodiert.

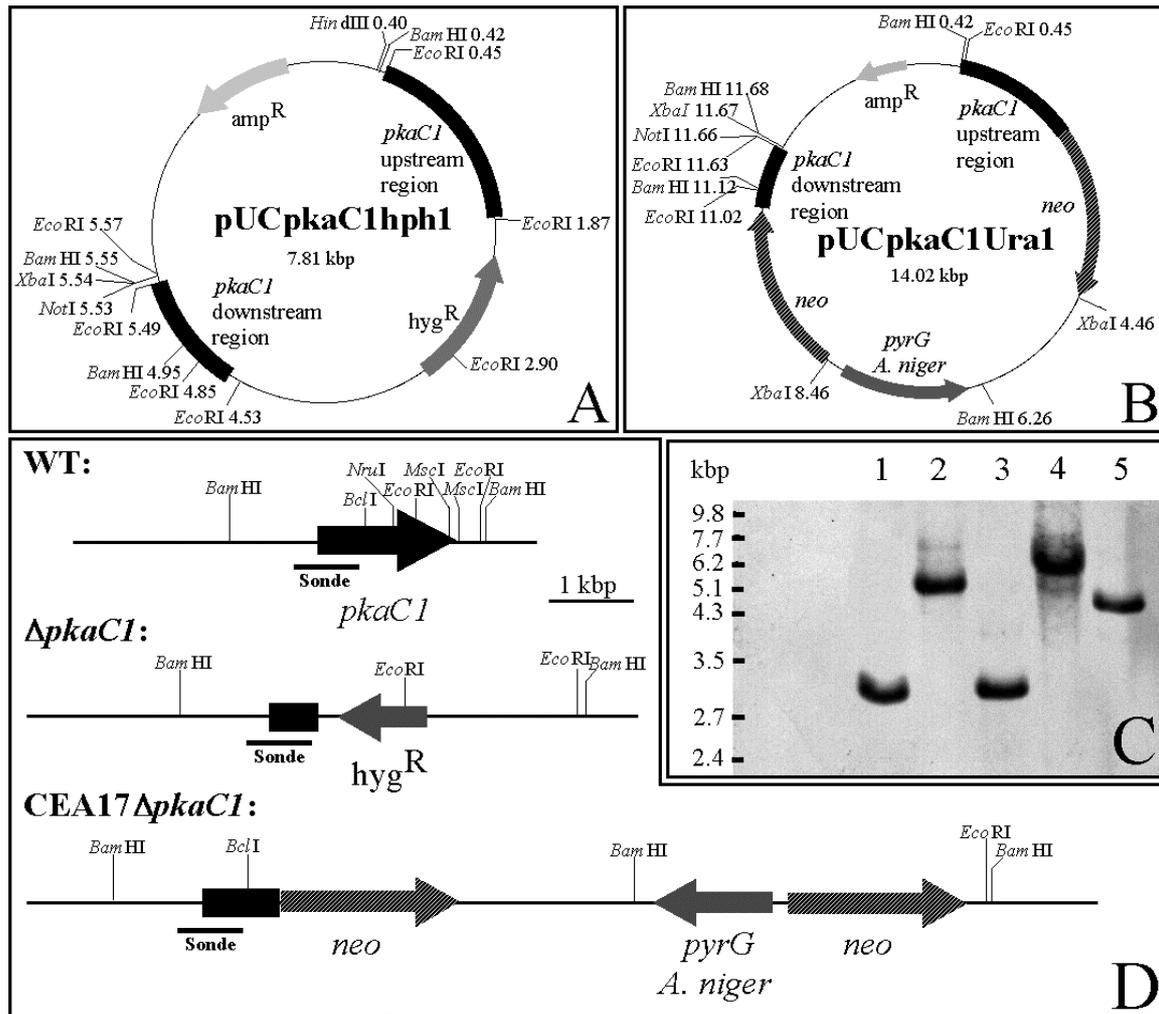


Abb. 10: Deletion des Gens *pkaC1*, welches für eine katalytische PKA-Untereinheit kodiert.

A Schematische Karte des *pkaC1*-Deletionsvektors pUCpkaC1hph1. **B** Schematische Karte des *pkaC1*-Deletionsvektors pUCpkaC1Ura1. **C** „Southern blot“-Analyse der *pkaC1*-Deletionsstämme. Chromosomale DNA der Wildtyp-Stämme ATCC46645 (Spur 1) und CEA17*pksP-lacZ* (Spur 3) sowie der Mutantenstämme $\Delta pkaC1$ (Spur 2), CEA17 $\Delta pkaC1$ (Spur 4) und CEA17 $\Delta pkaC1pksP-lacZ1$ (Spur 5) wurde mit *Bam*HI verdaut. Ein 830 bp *pkaC1*-PCR-Fragment wurde als Sonde genutzt. Die unterschiedliche Größe der Banden in Spur 2 ($\Delta pkaC1$) und Spur 4 (CEA17 $\Delta pkaC1$) ist auf die Verwendung verschiedener Kassetten (*hph* und *Ura*-Blaster) für die *pkaC1*-Gendeletion zurückzuführen. Stamm CEA17 $\Delta pkaC1pksP-lacZ1$ (Spur 5) resultierte aus einer Rekombination, in welcher der *Ura*-Blaster durch Selektion auf 5'-FOA-haltigem Medium entfernt wurde. Dabei verblieb nur eine Kopie des *neo*-Gens am *pkaC1*-Genlocus, woraus die geringere Größe der *pkaC1*-Deletionsbande verglichen mit Stamm CEA17 $\Delta pkaC1$ (Spur 4) resultierte. **D** Schematische Darstellung des chromosomalen *pkaC1*-Locus vom Wildtyp und von Deletionsmutanten. Restriktionsschnittstellen und die Position, an der die Sonde hybridisiert, sind markiert. Abkürzungen: *amp*^R, Ampicillin Resistenz-Gen; *hyg*^R, Hygromycin B Resistenz-Gen; *pyrG*, Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase-Gen aus *A. niger*; *neo*, Neomycin Phosphotransferase-Gen.

Für die Transformation des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 und des Uracil-auxotrophen Stammes CEA17 wurden lineare DNA-Fragmente der *pkaC1*-Deletionsvektoren pUCpkaChph1 bzw. pUCpkaCUra1 hergestellt. Dabei wurde pUCpkaC1hph1 mit *Hind*II/*Xba*I geschnitten, wodurch ein 5,0 kbp Fragment entstand. Die Linearisierung von pUCpkaCUra1 erfolgte durch Restriktion an einer einzelnen *Not*I-Schnittstelle. Nach Transformation des Stammes ATCC46645 konnten 50 Hygromycin B-resistente Transformanten isoliert

werden. Von diesen wurden zehn durch „Southern blot“-Analysen getestet, was in der Identifizierung von vier *pkaC1*-Deletionsstämmen resultierte. Davon enthielten drei Transformanten zusätzliche ektopische DNA-Integrationen des Deletionsvektors. Der verbleibende Stamm zeigte ausschließlich das Hybridisierungsmuster, welches charakteristisch für die *pkaC1*-Deletion ist. Er wurde mit $\Delta pkaC1$ bezeichnet und für weitere Studien genutzt. Nach Transformation von Stamm CEA17 mit dem linearisierten pUCpkaCUra1-Fragment wurden 14 Uracil-prototrophe Transformanten isoliert, welche alle durch „Southern blot“-Analysen getestet wurden. Fünf dieser Transformanten zeigten eine *pkaC1*-Deletion, wobei lediglich zwei ausschließlich das erwartete Hybridisierungsmuster des deletierten *pkaC1*-Locus und damit keine ektopische DNA-Integration aufwiesen. Einer dieser als richtig identifizierten Stämme wurde ausgewählt und mit CEA17 $\Delta pkaC1$ bezeichnet. Abb. 10C zeigt das Ergebnis der „Southern blot“-Analysen der beiden *pkaC1*-Deletionsmutanten $\Delta pkaC1$ (Spur 2) und CEA17 $\Delta pkaC1$ (Spur 4) und der entsprechenden Wildtyp-Stämme (Spur 1 und 3). Dem *pkaC1*-Gen der Mutanten $\Delta pkaC1$ und CEA17 $\Delta pkaC1$ fehlt der DNA-Bereich, welcher für die As 252-502 bzw. 336-502 des PKAC1-Proteins kodiert, sowie jeweils 58 bp der 3'-nicht translatierten DNA-Region (Abb. 10D).

3.5. Versuche zur Deletion des für die regulatorische PKA-Untereinheit kodierenden Gens *pkaR*

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß der PKA auf die Morphogenese und Virulenz von *A. fumigatus* zu untersuchen, stellte die Deletion des *pkaR*-Gens dar, welches für die regulatorische Untereinheit der PKA in *A. fumigatus* kodiert. Regulatorische PKA-Untereinheiten binden in nicht aktiviertem Zustand die katalytischen Untereinheiten. Eine Aktivierung durch Bindung von cAMP-Molekülen an das PKAR-Protein bedingt eine Konformationsänderung, was die Dissoziation der dann katalytisch aktiven Untereinheiten zur Folge hat (Taylor et al. 1990). Unabhängig vom cAMP-Spiegel sollte das Fehlen regulatorischer PKA-Untereinheiten demnach zu konstitutiver PKA-Aktivität und Signalweiterleitung führen. Die *pkaR*-Deletion bot weiterhin eine Gelegenheit zu epistatischen Analysen des cAMP-Signaltransduktionsweges und seiner Komponenten in *A. fumigatus*. Dabei sollten Phänotypen rezessiver Mutationen, welche im Signalweg vor PKAR gelegene Komponenten wie z.B. GPAB betreffen, komplementierbar sein. Deshalb wurde ein *gpaB*-Deletionsstamm gewählt, um das *pkaR*-Gen zu inaktivieren.

Beispiele human- und pflanzenpathogener Pilze zeigen, daß eine PKA-Aktivierung aufgrund eines erhöhten cAMP-Spiegels oder Deletion der regulatorischen PKA-Untereinheit zur In-

duktion von Virulenzprozessen führt (zur Übersicht: D'Souza und Heitman 2001). Wäre dies auch bei *A. fumigatus* der Fall, so würde die *pkaR*-Deletion zur Konstruktion von Stämmen führen, die eventuell über erhöhte Virulenzpotentiale verfügen. Um dies zu vermeiden, sollte in die zu transformierende *gpaB*-Mutante vor der *pkaR*-Deletion eine zusätzliche Mutation in einem essentiellen Biosynthesegen eingeführt werden. Dadurch wäre ein Wachstum von Transformanten nur unter Zugabe einer dann nicht mehr selbst synthetisierbaren Substanz möglich. Als Ziel dieser Mutation wurde das *pabaA*-Gen gewählt, welches die *para*-Aminobenzoesäure (pABA)-Synthase aus *A. fumigatus* kodiert. Dieses Enzym katalysiert einen späten Schritt der Synthese des essentiellen Kofaktors Folat. Brown et al. (2000) konnten zeigen, daß die *pabaA*-Deletion für *A. fumigatus* letal ist und *pabaA*-Mutanten nicht mehr in Lage sind, in Versuchstieren eine Erkrankung hervorzurufen.

3.5.1. Konstruktion einer *A. fumigatus gpaB*-Mutante mit *pabaA*-Deletion

Mit dem Gendeletionsvektor pUCpabaAUra1 (Abb. 11A) sollte das *pabaA*-Gen vollständig deletiert werden. Für die Konstruktion des Plasmids war es nötig, die Sequenz möglichst großer flankierender DNA-Bereiche des *pabaA*-Genlocus zu kennen, welche nicht in Datenbanken zugänglich waren. Deshalb wurde unter Verwendung einer *pabaA*-spezifischen DNA-Sonde das Cosmid *cospabaA1* aus einer genomischen *A. fumigatus* Genbank (Gehring 1997) isoliert. Durch Sequenzierung der Cosmid-DNA konnten jeweils etwa 2 kbp DNA-Sequenz im 5'- und 3'-Bereich des *pabaA*-Locus identifiziert werden.

Zur Konstruktion des *pabaA*-Deletionsvektors wurde ein 5,2 kbp PCR-Fragment unter Verwendung der Oligonukleotide PpabaA9KpnINotI / PpabaA10KpnINotI und *cospabaA1*-DNA als Matrize amplifiziert. Dieses wurde in den pCR2.1-Vektor ligiert und durch *KpnI*-Restriktion aus dem so erhaltenen Plasmid pTApabaA1 reisoliert. Anschließend erfolgte die Subklonierung des Fragments in den ebenfalls mit *KpnI* linearisierten Vektor pUC18HincII, bei dem die einzelne *HincII*-Restriktionsschnittstelle des Polylinkers durch *HincII/SmaI*-Restriktion und Religation entfernt worden war. Aus dem so konstruierten Plasmid pUCpabaA1 wurde die PABAA-kodierende DNA-Region durch *HincII*-Restriktion ausgeschnitten und durch das den Ura-Blaster enthaltende 8,6 kbp *HpaI*-Fragment aus dem Vektor pCDA14 (d'Enfert 1996) ersetzt. Das Deletionsplasmid pUCpabaAUra1 (Abb. 11A) enthielt neben dem Ura-Blaster als Selektionsmarker etwa 2,1 kbp 5'- und etwa 0,6 kbp 3'-flankierende *pabaA*-DNA-Bereiche. Durch *NotI*-Restriktion des Deletionsvektors konnte ein etwa 11,3 kbp Fragment für die Transformation erhalten werden.

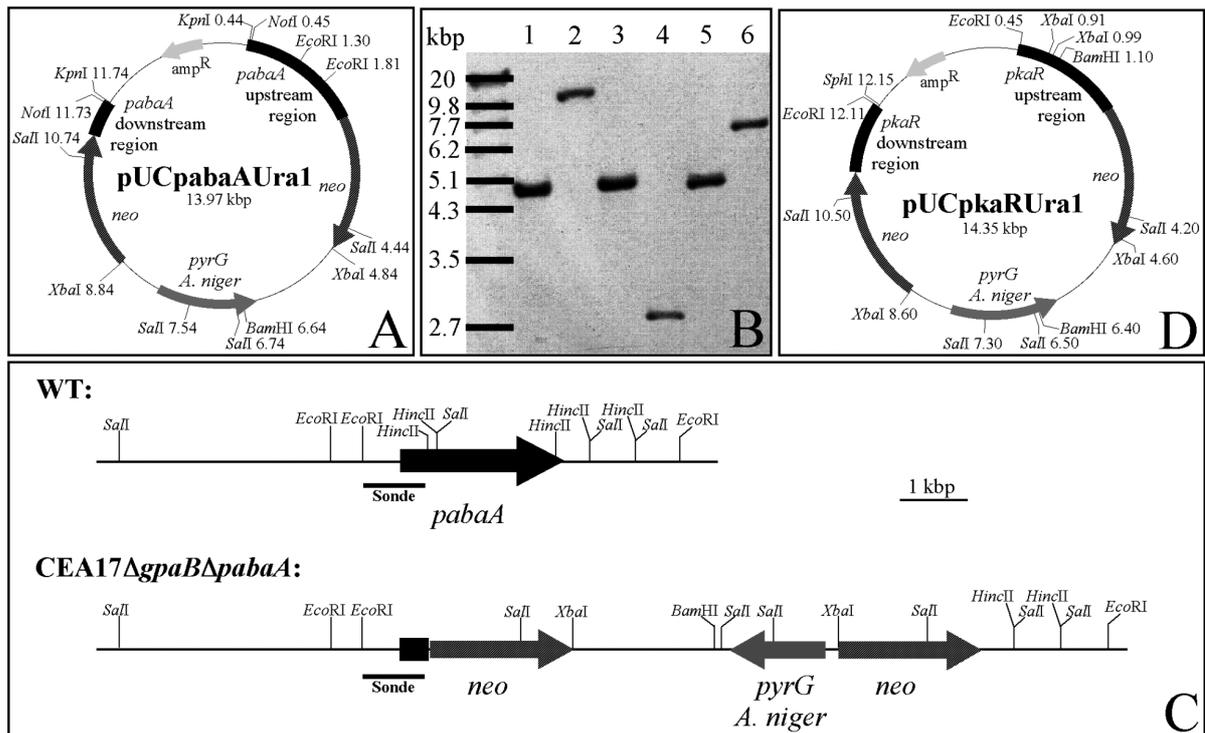


Abb. 11: Deletion des pABA-Synthase-kodierenden Gens *pabaA* in einem *gpaB*-Deletionsstamm und Versuche zur Deletion des *pkaR*-Gens, welches die regulatorische PKA-Untereinheit kodiert. A Schematische Karte des *pabaA*-Deletionsvektors pUCpabaAUra1. **B** „Southern blot“-Analyse des *gpaB*-/*pabaA*-Deletionsstammes CEA17Δ*gpaB*Δ*pabaA*. Chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes CEA17*pksP-lacZ* (Spuren 1, 3, 5) und des Stammes CEA17Δ*gpaB*Δ*pabaA* (Spuren 2, 4, 6) wurde mit *EcoRI* (Spuren 1 und 2), *EcoRI/XbaI* (Spuren 3 und 4) und *SaII* (Spuren 5 und 6) verdaut. Ein 1 kbp *pabaA*-PCR-Fragment wurde als Sonde genutzt. **C** Schematische Karte des *pkaR*-Deletionsvektors pUCpkaRUra1. **D** Schematische Darstellung des chromosomalen *pabaA*-Locus vom Wildtyp und von der Deletionsmutante. Restriktionsschnittstellen und der Bereich, an den die Sonde hybridisiert, sind markiert. Abkürzungen: *amp^R*, Ampicillin Resistenz-Gen; *pyrG*, Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase-Gen aus *A. niger*; *neo*, Neomycin Phosphotransferase-Gen.

Die Verwendung des Ura-Blasters als Selektionsmarker für eine Transformation machte es notwendig, einen Uracil-auxotrophen *gpaB*-Deletionsstamm zu konstruieren. Dazu wurden Konidien des Stammes CEA17Δ*gpaB* auf AMM-Agarplatten ausgebracht, welche zusätzlich 5'-Fluororotsäure und Uracil enthielten. So konnten Kolonien selektioniert werden, die durch homologe Rekombination den Ura-Blaster, welcher als Selektionsmarker zur Deletion des *gpaB*-Gens genutzt worden war, wieder aus dem Genom entfernt hatten (siehe auch Ergebnisse 3.1.). Zehn Einzelkolonien dieses Selektionsschrittes wurden durch „Southern blot“-Analysen getestet, wobei alle das erwartete Hybridisierungsmuster aufwiesen, was auf die Entfernung des *pyrG*-Gens und einer *neo*-Kopie aus dem deletierten *gpaB*-Genlocus hindeutete (Daten nicht gezeigt). Einer dieser Stämme wurde mit CEA17Δ*gpaBpyrG* bezeichnet und mit dem linearisierten pUCpabaAUra1-Deletionsvektor transformiert. 55 Uracil-prototrophe Transformanten konnten isoliert werden. Nur eine Transformante zeigte eine pABA-Auxotrophie, was auf die Deletion des *pabaA*-Genlocus hinwies. Diese geringe Ausbeute an

pabaA-Deletionsstämmen könnte auf eine schlechte homologe Rekombinationsrate des Deletionsvektors am *pabaA*-Locus zurückzuführen sein, weil das Plasmid mit etwa 0,6 kbp nur einen relativ kurzen 3'-flankierenden *pabaA*-DNA-Bereich aufwies. Der isolierte pABA-auxotrophe Stamm wurde mit CEA17 Δ *gpaB* Δ *pabaA* bezeichnet und durch „Southern blot“-Analysen überprüft. Das Ergebnis dieser Überprüfung ist in Abb. 11B dargestellt. Zum Vergleich ist der *pabaA*-Genlocus im intakten Zustand und nach der Gendeletion in Abb. 11D schematisch gezeigt. Die charakteristischen Wildtyp-Banden (Abb. 11B, Spuren 1, 3, und 5) waren im Stamm CEA17 Δ *gpaB* Δ *pabaA* nicht mehr nachzuweisen. Stattdessen konnten Banden, welche die *pabaA*-Deletion kennzeichnen, detektiert werden (Abb. 11D, Spuren 2, 4, und 6). Der Stamm CEA17 Δ *gpaB* Δ *pabaA* wies die Deletion einer Region auf, welche die As 147-824 des PABAA-Proteins sowie 457 bp der 3' nicht translatierten DNA-Sequenz kodiert (Abb. 11D).

3.5.2. Versuche zur *pkaR*-Deletion in einem *gpaB*- / *pabaA*-Deletionsstamm

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Sporulationsdefekt des *gpaB*-Deletionsstammes durch Zugabe von cAMP komplementierbar war (siehe Ergebnisse 3.6.). Ein reduzierter cAMP-Spiegel und eine dadurch verringerte PKA-Aktivität scheint demnach für den Phänotyp der *gpaB*-Mutante verantwortlich zu sein. Durch konstitutive Aktivierung der PKA mittels Deletion des *pkaR*-Gens im *gpaB*-Deletionsstamm sollte das Zusammenwirken von GPAB und der PKA im cAMP-Signaltransduktionsweg von *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Eine *pkaR*-Deletion, verbunden mit kontinuierlich freien und aktiven katalytischen PKA-Untereinheiten würde dann die Situation einer zellulären Erhöhung des cAMP-Spiegels widerspiegeln. Der *gpaB*-Deletionsphänotyp sollte auf diese Weise auch genetisch komplementierbar sein.

Zur Deletion des *pkaR*-Gens wurde der Vektor pUCpkaRUra1 (Abb. 11C) konstruiert. Unter Verwendung der Oligonukleotide PPKA6 / PPKA17EcoRI und PPKA3 / PPKA18 wurden 2,5 kbp bzw. 1,7 kbp PCR-Fragmente, welche entweder den 5'- oder 3'-flankierenden *pkaR*-DNA-Bereich enthielten, amplifiziert und anschließend in den pCR2.1-TOPO-Vektor (TOPO-TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert. Dabei wurden die Plasmide pTOPOpkaRup1 und pTOPOpkaRdown1 konstruiert. Die *E. coli*-Transformation von Ansätzen, bei denen das gesamte *pkaR*-Gen mit flankierenden Bereichen in den pCR2.1-TOPO-Vektor ligiert worden war, führte nicht zur Isolierung von Transformanten. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß *E. coli*-Zellen das PKAR-Protein aufgrund fehlender *pkaR*-Intronsequenzen exprimieren und dies zur Deregulation von Signaltransduktionsprozessen in *E. coli* und damit

Letalität von Transformanten führt. Das *pkaR*-Gen besitzt weiterhin 11 CCC-Codone, welche für die As Prolin kodieren. Dieses Codon wird in *E. coli* nur extrem selten verwendet. Es ist daher denkbar, daß es bei einer Translation der *pkaR*-mRNA aufgrund fehlender CCC-spezifischer tRNA-Moleküle zur Blockierung von Ribosomen kommt, wodurch auch essentielle zelluläre Funktionen gehemmt werden würden. Nach *EcoRI/SacI*-Restriktion wurde das den 5'-*pkaR*-Bereich kodierende Fragment aus pTOPOpkaRup1 in den ebenfalls *EcoRI/SacI* geschnittenen Vektor pUC18 subkloniert, wobei Plasmid pUCpkaRup1 entstand. Dieses wurde anschließend mit *SacI/SphI* linearisiert und mit dem 3'-*pkaR*-Fragment, welches aus Plasmid pTOPOpkaRdown1 durch *SacI/SphI*-Restriktion erhalten wurde, ligiert. Abschließend diente das so konstruierte Plasmid pUCpkaR1 nach *SmaI/PshAI*-Restriktion zur Aufnahme des Ura-Blaster-Fragments, welches wiederum durch *HpaI*-Restriktion aus dem Vektor pCDA14 (d'Enfert 1996) isoliert wurde. Der komplette *pkaR*-Deletionsvektor pUCpkaRUra1 (Abb. 11C) enthielt neben dem Ura-Blaster als Selektionsmarker etwa 1,9 kbp 5'- und etwa 1,2 kbp 3'-flankierende DNA-Bereiche der zu deletierenden *pkaR*-Region. Ein 11,7 kbp *EcoRI*-Fragment des Plasmids pUCpkaRUra1 diente zur Transformation eines *gpaB*-Deletionsstammes, der zusätzlich eine Deletion des *pabaA*-Gens aufwies.

Im Stamm CEA17Δ*gpaB*Δ*pabaA* erfolgte die Deletion des *pabaA*-Gens unter Verwendung des Ura-Blasters als Selektionsmarker (siehe Ergebnisse 3.5.1.). Da für eine *pkaR*-Deletion aber der gleiche Selektionsmarker genutzt werden sollte, wurde zunächst auf die Entfernung des Ura-Blasters aus der *gpaB*-/*pabaA*-Mutante durch Plattierung von Konidien auf 5'-FOA- und Uracil-haltigen Agarplatten selektioniert. 36 5'-FOA-resistente Kolonien konnten isoliert werden, von denen vier durch „Southern Blot“-Analysen getestet wurden. Alle vier Stämme zeigten das für die Entfernung des Ura-Blasters aus dem deletierten *pabaA*-Locus charakteristische Hybridisierungsmuster (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Stamm wurde mit CEA17Δ*gpaB*Δ*pabaA*pyrG bezeichnet und in Transformationsversuche zur *pkaR*-Deletion mit dem pUCpkaRUra1-Fragment eingesetzt. Es wurden nacheinander drei Transformationsansätze durchgeführte, die in der Isolierung von 76, 150 bzw. 90 Uracil-prototrophen Transformanten resultierten. Durch PCR-Nachweise unter Verwendung *pkaR*-spezifischer Oligonukleotide und chromosomaler DNA als Matrize bzw. „Southern Blot“-Analysen wurden die erhaltenen Transformanten getestet. Dabei konnten bei allen Stämmen PCR-Produkte amplifiziert werden, die auf einen intakten *pkaR*-Genlocus hindeuteten. Auch zeigte in „Southern blot“-Analysen kein Stamm das für die *pkaR*-Deletion charakteristische Hybridisierungsmuster. Die Komplementation der Uracil-Auxotrophie wurde demnach nur durch ektopische Integrationen des Deletionsvektors erreicht. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein,

daß die *pkaR*-Deletion für *A. fumigatus* letal ist. Allerdings konnten die Gene regulatorischer PKA-Untereinheiten in anderen Pilzen, wie *C. neoformans* oder *A. niger* deletiert werden, ohne daß dies letale Folgen für den Organismus hatte (D'Souza et al. 2001, Staudohar et al. 2002). Die *A. niger pkaR*-Deletion resultierte allerdings in sehr reduziertem Wachstum auf Agarplatten, fehlender Sporenbildung sowie apolarem Wachstum in Schüttelkulturen (Staudohar et al. 2002).

3.6. Phänotypische Charakterisierung der *gpaB*-, *acyA*- und *pkaC1*-Deletionsstämme

Nach der Deletion verschiedener Komponenten der cAMP-Signaltransduktion in *A. fumigatus* erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Deletionsstämme im Bezug auf Wachstum und Sporulation. Dazu wurde das Myzelwachstum mikroskopisch bzw. durch Bestimmung spezifischer Wachstumsraten von Kolonien auf Agarplatten analysiert. Die Analyse der Sporulation erfolgte unter anderem durch Quantifizierung der gebildeten Konidien auf Agarplatten.

Die Deletion des *gpaB*-Gens resultierte in Phänotypen, welche morphologisch keine drastischen Veränderungen aufwiesen. Makroskopische und mikroskopische Beobachtungen ergaben, daß beide *gpaB*-Deletionsstämme, $\Delta gpaB$ und CEA17 $\Delta gpaB$, nach 24 h auf AMM-Agar keine Wachstumsreduktion im Vergleich mit den entsprechenden Wildtypen zeigten (Abb. 12; 13C, D). Weiterhin wurde die Wachstumsrate der Stämme durch das Vermessen der Koloniedurchmesser auf Agarplatten während der Inkubation bei 37 °C bestimmt. Die spezifischen Wachstumsraten von *gpaB*-Deletions- und Wildtyp-Stämmen waren auf Minimal- und Malzextraktmedium vergleichbar (Abb. 14A, B; Tab. 6). Für beide *gpaB*-Deletionsstämme war allerdings eine reduzierte Konidienbildung auf AMM-Agarplatten zu beobachten (Abb. 12). Verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Stämmen war die gebildete Konidienmenge von Stamm $\Delta gpaB$ um 85 %, die von Stamm CEA17 $\Delta gpaB$ um 55 % reduziert (Tab. 7). Eine komplette Suppression der *gpaB*-Deletionsphänotypen konnte durch Zugabe von 10 mM Dibutyryl-cAMP (dBcAMP) zu den Agarplatten erreicht werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis deutet auf eine Funktion von GPAB als Komponente des cAMP-Signaltransduktionsweges und als Aktivator der cAMP-Synthese durch die Adenylatzyklase hin.

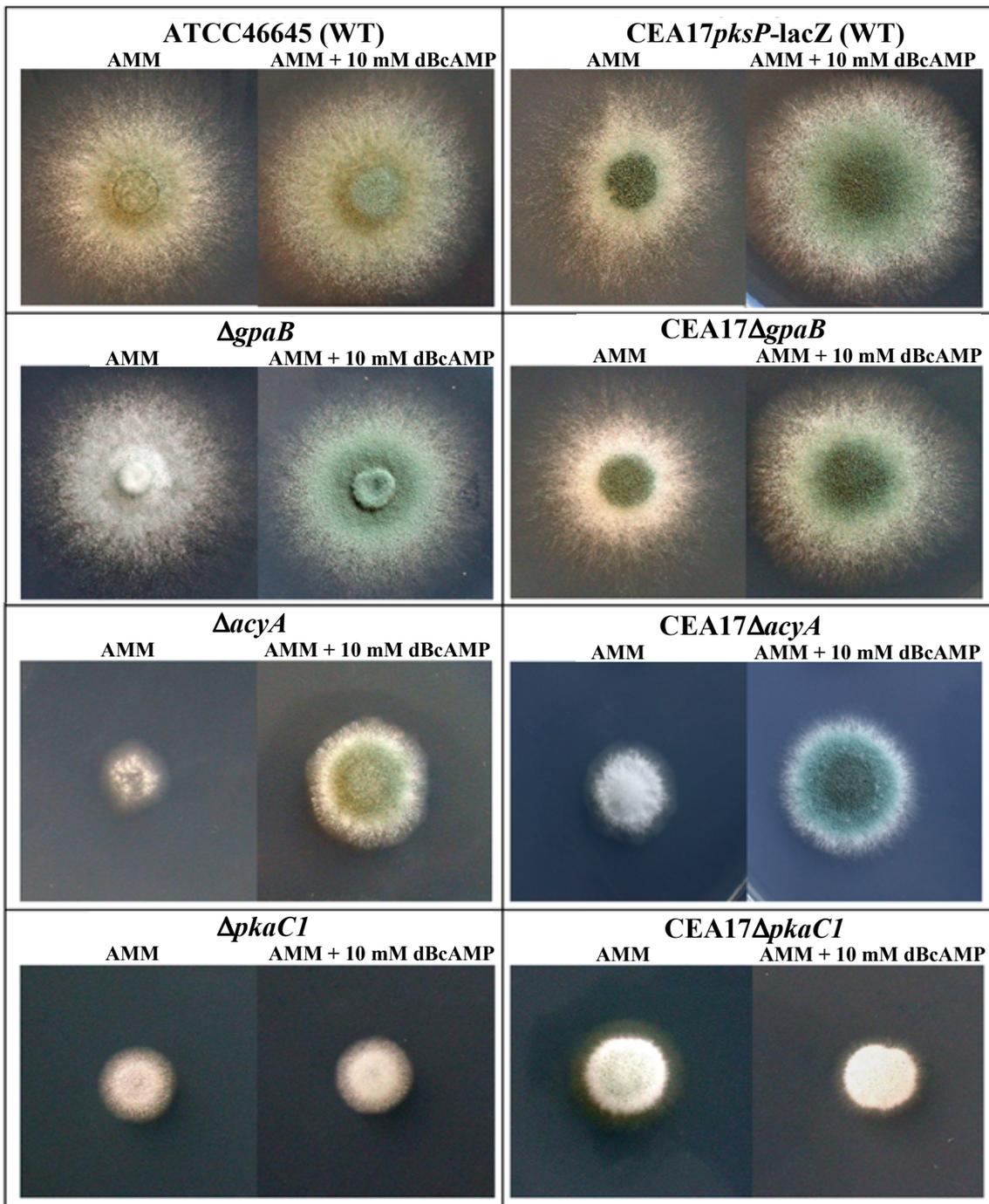


Abb. 12: Wachstum und Sporulation von *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten auf Agarplatten. Die Wildtyp-Stämme ATCC46645 und CEA17*pksP-lacZ* sowie die Deletionsstämme $\Delta gpaB$, CEA17 $\Delta gpaB$, $\Delta acyA$, CEA17 $\Delta acyA$, $\Delta pkaC1$ und CEA17 $\Delta pkaC1$ wurden auf AMM-Agarplatten punktinokuliert und für 72 h bei 37 °C inkubiert. Zur Komplementation der Deletionsphänotypen wurden den Agarplatten 10 mM dBcAMP zugegeben.

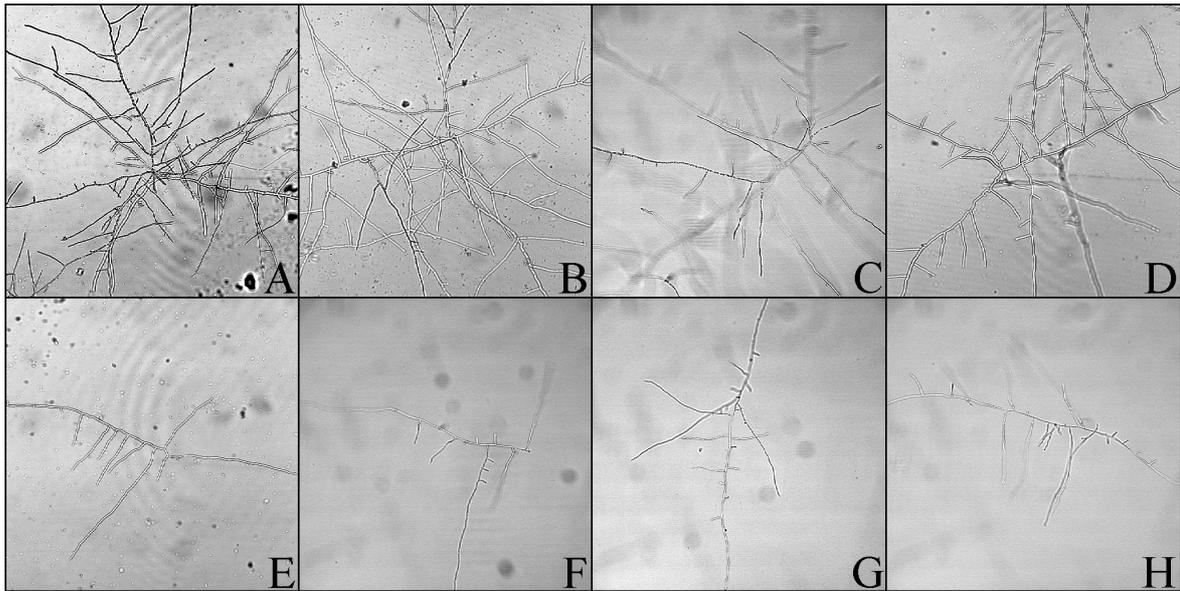


Abb. 13: Myzelwachstum von *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten. Konidien der Wildtyp-Stämme ATCC46645 (A) und CEA17*pksP-lacZ* (B) sowie der Deletionsstämme Δ *gpaB* (C), CEA17 Δ *gpaB* (D), Δ *acyA* (E), CEA17 Δ *acyA* (F), Δ *pkaC1* (G) und CEA17 Δ *pkaC1* (H) wurden auf AMM-Agar, welcher in einer dünnen Schicht auf Objektträgern verteilt worden war, inokuliert. Nach 24 h Wachstum bei 37 °C wurde das Wachstum mikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung dokumentiert.

Die Wachstumsversuche der Adenylatzyklase-Mutanten auf Agarplatten zeigten, daß die Deletion des *acyA*-Gens Wachstumsrate und Sporulation von *A. fumigatus* stark beeinflusste (Abb. 12). Mikroskopische Untersuchungen ergaben, daß nach 24 h Inkubation auf AMM-Agar beide Deletionsstämme, Δ *acyA* und CEA17 Δ *acyA*, verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Stämmen nur wenige Hyphen produziert hatten (Abb. 13E, F). Weiterhin war die spezifische Wachstumsrate auf AMM- und Malzextrakt-Agarplatten beim Stamm Δ *acyA* im Vergleich zum Wildtyp ATCC46645 um 67% bzw. 69% deutlich verringert (Abb. 14C, D; Tab. 6). Stamm CEA17 Δ *acyA* zeigte ebenfalls 63% bzw. 61% Wachstumsreduktion auf beiden Medien verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm CEA17*pksP-lacZ* (Abb. 14C, D; Tab. 6). Beide *A. fumigatus* Wildtyp-Stämme produzierten nach zwei- bis dreitägiger Inkubation auf AMM-Agarplatten signifikante Konidienmengen. Im Gegensatz dazu bildete Stamm Δ *acyA* makroskopisch betrachtet keine Konidien (Abb. 12). Weitere mikroskopische Analysen zeigten, daß Kolonien der Mutante Δ *acyA* nur wenige Konidiophoren ausbildeten, welche nur sehr geringe Konidienmengen enthielten. Diese waren in einem Ansatz zur Sporulationsquantifizierung nicht detektierbar (Tab. 7). Auch für den Adenylatzyklase-Deletionsstamm CEA17 Δ *acyA* konnte eine Reduktion der gebildeten Konidien um 99% im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp nachgewiesen werden (Tab. 7). Die Zugabe von 10 mM dBcAMP zu den Agarplatten stellte den Wildtyp-Phänotyp der Stämme Δ *acyA* und CEA17 Δ *acyA* größtenteils wieder her (Abb. 12). Dieses Ergebnis verdeutlichte, daß der Man-

gel an cAMP für die beobachteten Deletionsphänotypen verantwortlich war. Weiterhin war es ein Indiz dafür, daß die cAMP-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Sporulation von *A. fumigatus* spielt. Eine Supplementation des Mediums mit 10 mM cAMP konnte die *acyA*-Deletionsphänotypen nur teilweise komplementieren. Der Grund dafür könnte in einer schlechteren zellulären Aufnahme von cAMP im Vergleich zu dBcAMP gelegen haben. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon bei anderen Pilzen gemacht (Bahn und Sundstrom 2001).

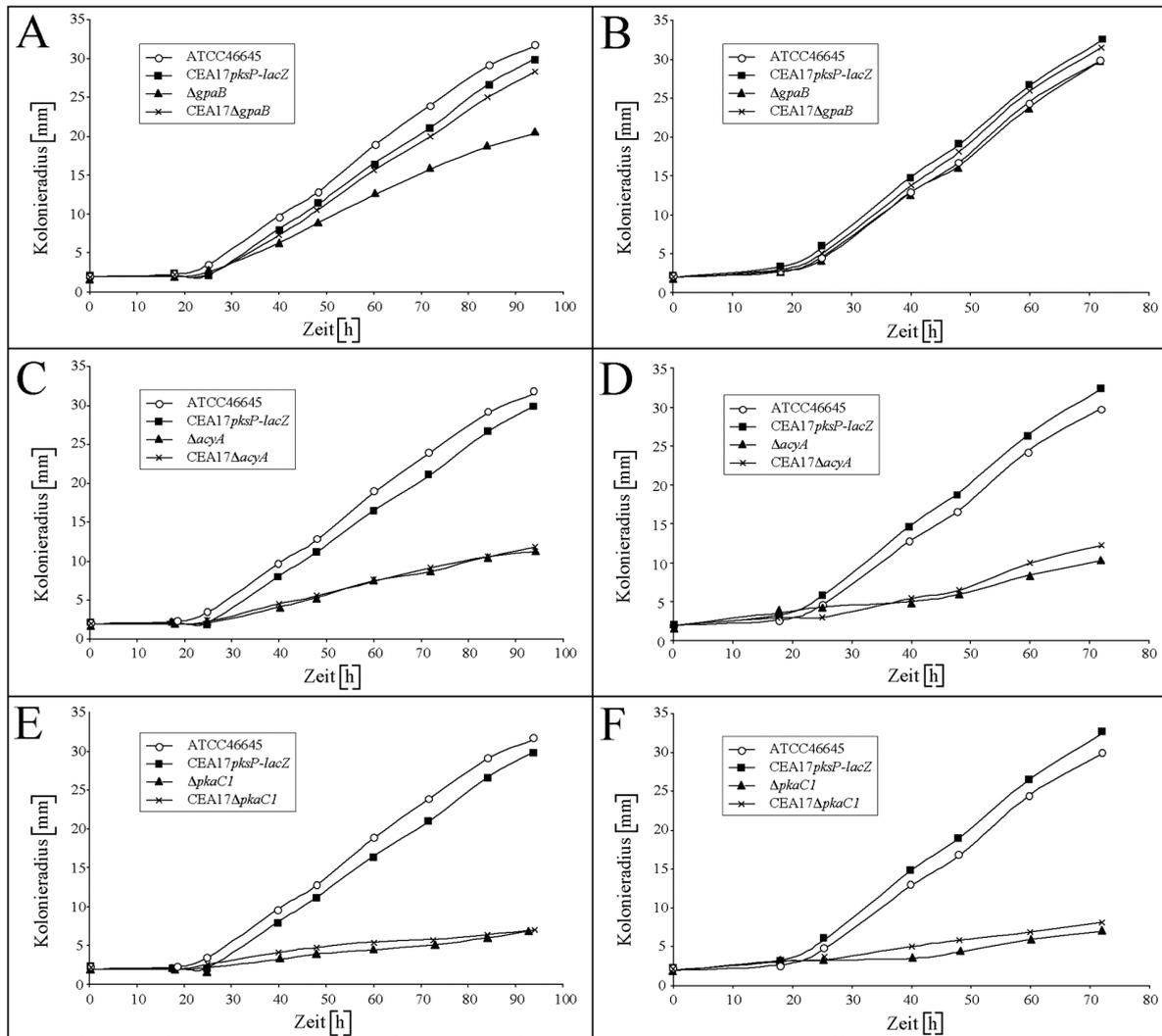


Abb. 14: Wachstumsbestimmung von *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten. Nach Punktinkulturation von Konidien wurde der Radius wachsender Kolonien auf AMM- (A, C, E) und Malzextrakt-Agarplatten (B, D, F) bestimmt. Dabei wurden die Wildtyp-Stämme ATCC46645 und CEA17*pksP-lacZ* mit den angegebenen *gpaB*- (A, B), *acyA*- (C, D) und *pkaC1*-Deletionsstämmen (E, F) verglichen. Die für jeden Stamm ermittelten Daten stellten den Mittelwert von mindestens 10 unabhängig gewachsenen Kolonien dar. Die Standardabweichungen lagen im Bereich von 0,2 bis 0,8 mm.

Tab. 6: Spezifische Wachstumsraten (K_r) von *A. fumigatus* Wildtyp- und Deletionsstämmen auf verschiedenen Agarmedien.

Stamm	Kr AMM [$\text{mm} \times \text{h}^{-1}$]	Kr Malzextrakt [$\text{mm} \times \text{h}^{-1}$]
ATCC 46645 (WT)	0,45	0,54
$\Delta gpaB$	0,35	0,54
$\Delta acyA$	0,15	0,17
$\Delta pkaCI$	0,05	0,10
CEA17 <i>pksP-lacZ</i> (WT)	0,41	0,56
CEA17 $\Delta gpaB$	0,40	0,57
CEA17 $\Delta acyA$	0,15	0,22
CEA17 $\Delta pkaCI$	0,05	0,11

Tab. 7: Konidienbildung von *A. fumigatus* Wildtyp- und Deletionsstämmen.

Stamm	Konidiendichte (Konidien pro ml Suspension)
ATCC 46645 (WT)	$5,68 \pm 0,41 \times 10^8$
$\Delta gpaB$	$8,40 \pm 2,23 \times 10^7$
$\Delta acyA$	0
$\Delta pkaCI$	$6,08 \pm 2,47 \times 10^7$
CEA17 <i>pksP-lacZ</i> (WT)	$5,61 \pm 0,94 \times 10^8$
CEA17 $\Delta gpaB$	$2,52 \pm 0,32 \times 10^8$
CEA17 $\Delta acyA$	$3,03 \pm 0,25 \times 10^6$
CEA17 $\Delta pkaCI$	$3,23 \pm 0,60 \times 10^7$

Das Wachstum der *pkaCI*-Deletionsstämme $\Delta pkaCI$ und CEA17 $\Delta pkaCI$ auf Agarplatten zeigte, daß auch die *pkaCI*-Deletion Wachstumsrate und Sporulation von *A. fumigatus* stark beeinflusste (Abb. 12). Die beobachteten Phänotypen waren denen der *A. fumigatus* Adenylatzyklase-Mutanten $\Delta acyA$ und CEA17 $\Delta acyA$ sehr ähnlich. Mikroskopische Untersuchungen verdeutlichten, daß beide *pkaCI*-Mutanten nach 24 h auf AMM-Agar nur wenige Hyphen gebildet hatten (Abb. 13G, H). Verglichen mit dem Wildtyp-Stamm ATCC46645 war die spezifische Wachstumsrate der Mutante $\Delta pkaCI$ auf AMM- und Malzextrakt-Agarplatten um 90% bzw. 81% reduziert (Abb. 14E, F; Tab. 6). Stamm CEA17 $\Delta pkaCI$ zeigte eine 88%- bzw. 80%-ige Wachstumsreduktion verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm (Abb. 14E, F; Tab. 6). Weiterhin ergab die makroskopische Betrachtung von Kolonien, daß beide *pkaCI*-Deletionstämme signifikant reduzierte Konidienmengen produzierten (Abb. 12). Versuche zur Sporulationsquantifizierung verdeutlichten, daß die Anzahl der durch die Wildtyp-Stämme produzierten Konidien bei den Deletionsstämmen $\Delta pkaCI$ und CEA17 $\Delta pkaCI$ um 89% bzw. 94% reduziert waren (Tab. 7). Eine Suppression der Phänotypen, wie sie nach Zugabe von 10 mM dBcAMP zu den Agarplatten bei $\Delta gpaB$ - und $\Delta acyA$ -Mutanten beobachtet wurde, war für *pkaCI*-Deletionsstämme, wie erwartet, nicht möglich (Abb. 12). Dieses Ergebnis verdeutlichte, daß PKAC1 im cAMP-Signaltransduktionsweg nach der Adenylatzyklase funktionell aktiv ist. Weiterhin war es ein Hinweis darauf, daß PKAC1 unter den gewählten Bedingungen wenigstens für den größten Teil der zellulären PKA-Aktivität verantwortlich ist, da eine Erhöhung des cAMP-Spiegels auch zur konstitutiven Aktivierung anderer katalyti-

scher PKA-Untereinheiten führen sollte, welche dann möglicherweise den Pänotyp komplementieren könnten. Dieses Ergebnis impliziert auch, daß die zweite in *A. fumigatus* identifizierte, durch das *pkaC2*-Gen kodierte, katalytische PKA-Untereinheit keine Rolle bei der Regulation von Wachstum und Sporulation spielt.

4. Untersuchungen zur Expression und Aktivität der Proteinkinase A

4.1. *pkaC1*-Expressionsstudien unter Verwendung des „grünen Fluoreszenzproteins“ (*egfp*)

Ein Nachweis der Expression und Lokalisierung des PKAC1-Proteins auf zellulärer Ebene erfolgte unter Verwendung des „grün fluoreszierenden Proteins“ (GFP) als Reportersystem. Das *gfp*-Gen wurde ursprünglich aus der marinen Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert und als Hilfsmittel für Genexpressions- und Proteinlokalisierungsstudien in verschiedenen Modellorganismen etabliert (Chalfie et al. 1994, Tsien 1998). Die Nutzung von GFP als Reporter ist gegenüber anderen Systemen sehr vorteilhaft, da es nach Anregung mit blauem oder UV-Licht leicht fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren ist. In den hier dargestellten Versuchen wurde das EGFP („Enhanced GFP“; Anregungsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum: 509 nm) verwendet, welches eine Variante des ursprünglichen GFP darstellt. Durch Basensubstitutionen wurden die „codon usage“ für höhere Pflanzen optimiert bzw. Aminosäuren der chromophoren Gruppe verändert, was zu stärkerer Fluoreszenz führte (Sheen et al. 1995).

4.1.1. Konstruktion eines Plasmidvektors mit *pkaC1-egfp*-Fusion

Als Ausgangsplasmid eines *pkaC1-egfp*-Fusionskonstruktes diente das Plasmid p123 (Aichinger und Kahmann, pers. Mitteilung), welches neben dem *egfp*-Gen den in Pilzen konstitutiv aktiven *otef*-Promotor kodiert. Dieser wurde mittels *Bam*HI/*Hind*III-Restriktion ausgeschnitten und durch ein *Bam*HI/*Hind*III-Fragment aus dem Plasmid pUCHph1 (K. Hübner, pers. Mitteilung) ersetzt, welches das *hph*-Gen als Selektionsmarker enthielt. Das so erhaltene Plasmid wurde mit pHygeGFP1 bezeichnet. Um die *pkaC1-egfp*-Genfusion zu konstruieren, erfolgte die PCR-Amplifikation eines 2,71 kbp großen Produktes unter Verwendung der Oligonukleotide PPKAC31*Bam*HI / PPKAC32*Bam*HI und DNA des Cosmids *cospkaC1* als Matrize. Dieses PCR-Fragment kodiert neben dem *pkaC1*-Gen etwa 1,01 kbp der 5'-*pkaC1*-Promotorsequenz. Es wurde in den pCR2.1-Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert und so Plasmid pTApkaC2 erhalten. Eine Überprüfung der fehlerfreien Amplifikation

des klonierten DNA-Fragments erfolgte durch DNA-Sequenzierung. Mittels *Bam*HI-Restriktion wurde das Fragment aus Plasmid pTApkaC2 reisoliert und in den *Bam*HI-linearisierten Vektor pHygeGFP1 ligiert. Sequenzanalysen bestätigten, daß das fertige Plasmid pHygpkaC1eGFP1 (Abb. 15) eine Fusion von *pkaC1* im korrekten Leserahmen mit dem *egfp*-Gen aufwies. Für eine anschließende Transformation des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 wurde zirkuläre Plasmid-DNA benutzt.

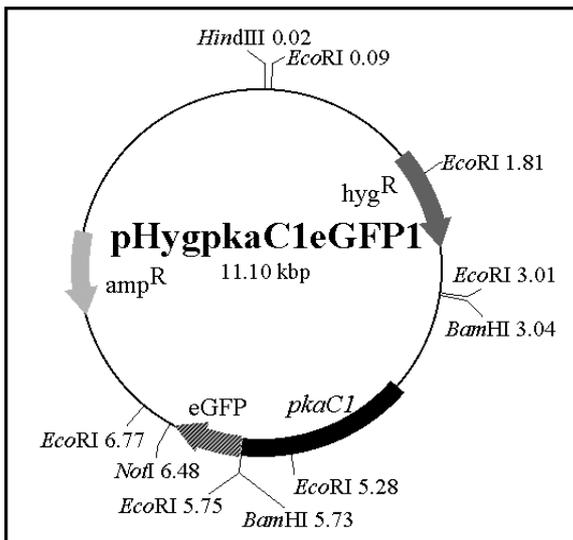


Abb. 15: Schematische Karte des Plasmids pHygpkaC1eGFP1. Das Plasmid trägt eine Fusion des *A. fumigatus pkaC1*-Gens mit dem Reporter-gen *egfp*. Hygromycin B-Resistenz wurde als Selektionsmarker in *A. fumigatus* verwendet. Abkürzungen: amp^R, Ampicillin Resistenz-Gen; hyg^R, Hygromycin B Resistenz-Gen.

4.1.2. Mikroskopische Detektion sowie Versuche zur Induktion der *pkaC1-egfp*-Expression durch cAMP und Stress

Nach Transformation des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 mit Plasmid pHygpkaC1eGFP1 wurden Hygromycin B-resistente Transformanten, welche eine Expression der EGFP-Fluoreszenz zeigten, isoliert. Die Abbildungen 16A bis 16D zeigen jeweils eine Durchlichtaufnahme, Zellkernfärbung mittels Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und die GFP-Fluoreszenz eines repräsentativen, mit *pkaC1eGFP* bezeichneten Stammes bzw. des Wildtyp-Stammes ATCC46645. Der Stamm *pkaC1eGFP* wies nach Anregung deutliche zytoplasmatisch lokalisierte Fluoreszenz auf (Abb. 16A). Im Vergleich dazu zeigte der Wildtyp nur schwache Hintergrundfluoreszenz (Abb. 16A). Durch Zugabe von 10 mM dBcAMP oder 5 mM des intrazellulären Phosphodiesterase-Hemmers 1-Isobutyl-3-Methyl-Xanthin (IBMX) zum Medium, konnte die Fluoreszenz weder gesteigert noch reprimiert werden (Abb. 16B, C). Sie war weiterhin nur auf das Zytoplasma beschränkt detektierbar (Abb. 16B, C). Demnach hat ein durch direkte Supplementierung oder durch Hemmung der cAMP-hydrolysierenden Enzymaktivität gesteigerter cAMP-Spiegel keinen Einfluß auf die Expression des *pkaC1*-Gens bzw. die Lokalisierung des PKAC1-Proteins. Durch Zugabe von 3 mM

H₂O₂ zum Medium sollten Stressbedingungen simuliert werden. Auch diese Behandlung führte nicht zu Veränderungen der Fluoreszenzintensität oder -lokalisierung im *pkaCeGFP*-Stamm (Abb. 16D). Die hier dargestellten Ergebnisse deuteten auf eine ausschließlich zytosolische Lokalisierung der katalytischen PKA-Untereinheit PKAC1 unter den getesteten Bedingungen hin.

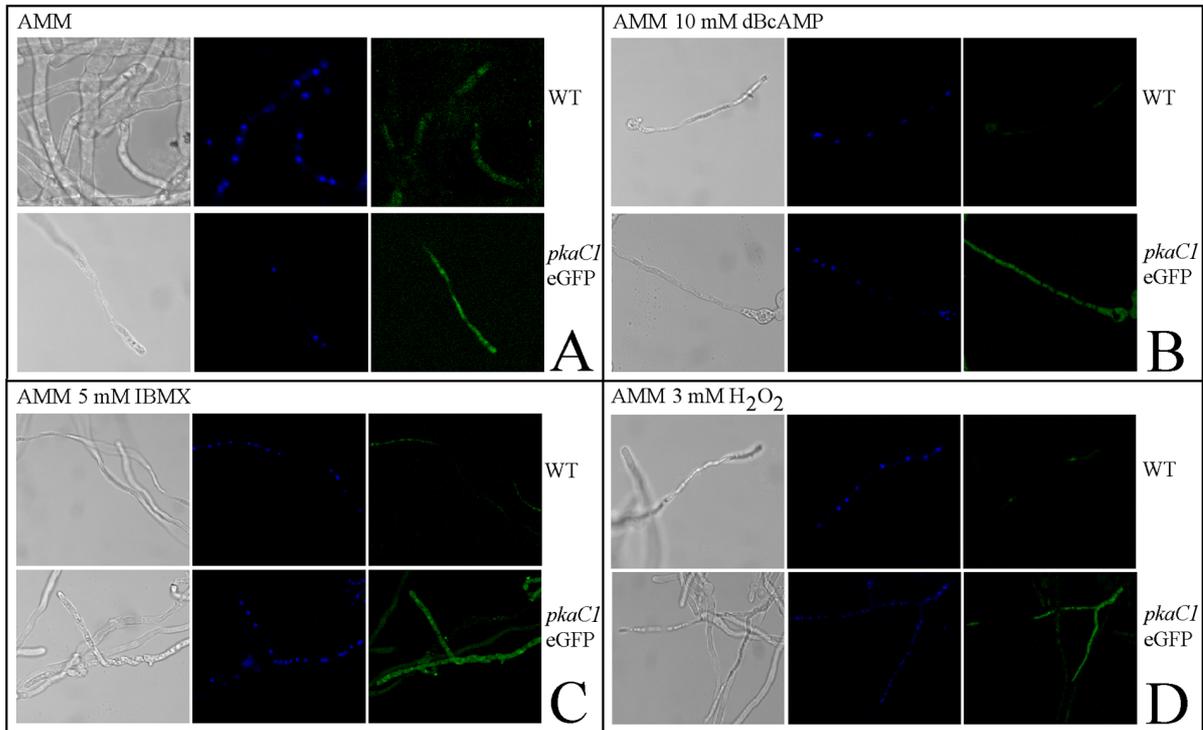


Abb. 16: Expression der *pkaCl-egfp*-Genfusion und Lokalisierung des Fusionsproteins. Die *pkaCl-egfp*-Expression wurde im Stamm *pkaCl-eGFP* analysiert, welcher wie der Wildtyp ATCC46645 für 12 h bei 37 °C in AMM (A) oder AMM supplementiert mit 10 mM dBcAMP (B), 5 mM IBMX (C) sowie 3 mM H₂O₂ (D) angezogen worden war. Nach DAPI-Färbung wurden die Proben mittels Lichtmikroskopie (linke Abbildungen) oder Fluoreszenzmikroskopie (mittlere und rechte Abbildungen) mit 200-facher Vergrößerung betrachtet und dokumentiert. Abkürzung: WT, Wildtyp.

4.2. Aktivitätsbestimmung der PKA in cAMP-Signaltransduktionsmutanten

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Detektion der *pkaCl*-Expression sollte die zelluläre PKA-Aktivität verschiedener *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten bestimmt werden. Dazu wurden Zellextrakte der Wildtyp-Stämme ATCC46645 und CEA17*pksP-lacZ*, beider *pkaCl*-Deletionsstämme, $\Delta pkaCl$ und CEA17 $\Delta pkaCl$, sowie der *gpaB*- und *acyA*-Mutanten, CEA17 $\Delta gpaB$ bzw. $\Delta acyA$, hergestellt und anschließend analysiert. Die Abbildungen 17A und 17B zeigen die Auftrennung der Ansätze zur PKA-Aktivitätsbestimmung im Agarosegel bzw. die errechnete spezifische PKA-Aktivität nach Elution des phosphorylierten Substratpeptids aus dem Agarosegel und spektrophotometrischer Quantifizierung.

In beiden Wildtypen war eine cAMP-abhängige PKA-Aktivität detektierbar (Abb. 17A, Spuren 2 und 12; Abb. 17B). Eine Aktivierung mit 5 μ M cAMP führte zu einem signifikanten

Anstieg der PKA-Aktivität in den Proteinextrakten beider Wildtyp-Stämme (Abb. 17A, Spuren 3 und 13; Abb. 17B). Nach Zugabe eines PKA-spezifischen Proteinkinase-Inhibitors (PKI) konnte keine Aktivität mehr gemessen werden (Abb. 17A, Spuren 4 und 14; Abb. 17B). Dieses Ergebnis bestätigte die Spezifität des Nachweises. In den $\Delta pkaC1$ -Deletionsstämmen $\Delta pkaC1$ und $CEA17\Delta pkaC1$ konnte unter keiner der getesteten Bedingungen PKA-Aktivität detektiert werden (Abb. 17A, Spuren 5-7 und 15-17; Abb. 17B). Dieses Ergebnis zeigte deutlich, daß das *pkaC1*-Gen eine katalytische PKA-Untereinheit kodiert, welche die vorherrschende Form des Enzyms unter den getesteten Bedingungen darstellt.

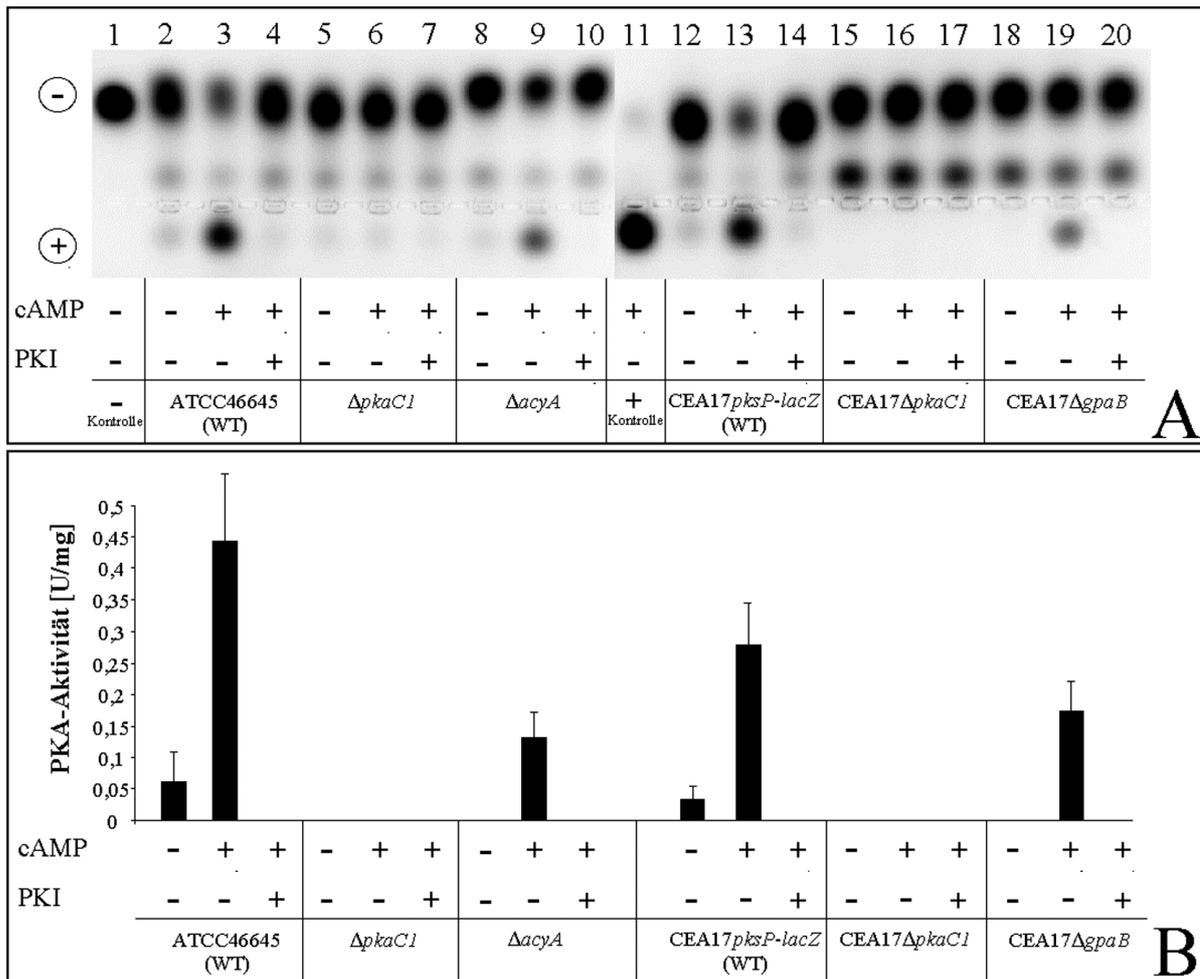


Abb. 17: PKA-Aktivität in *A. fumigatus* Wildtyp-Stämmen und cAMP-Signaltransduktionsmutanten. Die PKA-Enzymaktivität wurde im Proteinrohextrakt der Wildtyp-Stämme ATCC46645 und CEA17*pksP-lacZ* sowie der Deletionsstämmen $\Delta pkaC1$, CEA17 $\Delta pkaC1$, $\Delta acyA$ und CEA17 $\Delta gpaB$ durch Gelelektrophorese (phosphoryliertes Substrat wandert Richtung Anode) analysiert (A) und durch spektrophotometrische Vermessung des in A gezeigten phosphorylierten Substrats quantifiziert (B). Abkürzungen: WT, Wildtyp; PKI, PKA-Inhibitor.

Interessanterweise konnte ohne cAMP-Aktivierung weder in der Adenylatzyklase-Mutante, $\Delta acyA$, noch im Deletionsstamm der $G\alpha$ -Untereinheit GPAB, CEA17 $\Delta gpaB$, PKA-Aktivität detektiert werden (Abb. 17A, Spuren 8 und 18; Abb. 17B). Die Zugabe von 5 μ M cAMP führte bei beiden Stämmen zu signifikanten PKA-Aktivitäten (Abb. 17A, Spuren 9 und 19;

Abb. 17B), welche allerdings geringer als die Aktivitäten der Wildtyp-Proteinrohextrakte waren. Diese Ergebnisse verdeutlichten, daß die zelluläre PKAC1-Aktivität von cAMP abhängt, welches in der $\Delta acyA$ -Mutante gar nicht und in der $\Delta gpaB$ -Mutante nur in reduzierter Menge verfügbar ist. Weiterhin bestätigten diese Ergebnisse die Annahme, daß die $G\alpha$ -Untereinheit GPAB in die cAMP-Signaltransduktion über die Modulierung der cAMP-synthetisierenden Adenylatzyklase-Aktivität involviert ist. Im PKA-Aktivitätsassay waren zwei in Richtung Kathode wandernde, nicht phosphorylierte Peptid-Fractionen zu erkennen, wobei die schwächer fluoreszierende Fraktion nur in den Ansätzen mit Proteinrohextrakten von Wildtypstämmen oder Mutanten (Abb. 17A, Spuren 2 bis 10 und 12 bis 20), aber nicht in den Kontrollen ohne Proteinrohextrakt (Abb. 17A, Spuren 1 und 11) auftrat. PKA-unabhängige, unspezifische Interaktionen von anderen Rohextrakt-Proteinen mit den fluoreszierenden Substratpeptiden könnten zu deren langsameren Laufverhalten und damit zum Auftreten der zweiten nicht phosphorylierten Peptid-Fraktion im Agarosegel geführt haben.

4.3. Versuche zur *pkaC1*-Überexpression

Zur weiteren Untersuchung der katalytischen PKA-Untereinheit PKAC1, zur genetischen Komplementation verschiedener cAMP-Signaltransduktionsmutanten bzw. zu Epistasie-Studien der Komponenten des cAMP-Signalweges sollte versucht werden, das PKAC1-Protein in *A. fumigatus* zu überproduzieren. Um die Genexpression regulieren, d.h. an- und abschalten zu können, kommt in einigen Pilzen der Alkohol-Dehydrogenase (ADH)-Promotor zum Einsatz. Für eine relativ starke konstitutive Expression von Genen wird z.B. der Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) genutzt. Prinzipiell werden die Gene der zu exprimierenden Proteine unter Kontrolle solcher Promotoren gebracht, wobei dann der endogene Promotor keine Rolle bei der Expression spielt. Das *pkaC1*-Gen sollte hier unter Kontrolle verschiedener regulierbarer und konstitutiv aktiver Promotoren in *A. fumigatus*-Stämmen exprimiert werden.

4.3.1. Untersuchungen zur Regulation der *A. fumigatus* Alkohol-Dehydrogenase

Das *alcA*-Gen kodiert eine über die Kohlenstoff-Quelle regulierte ADH aus *A. nidulans*. Unter Verwendung der vom *alcA*-Gen abgeleiteten As-Sequenz als Sonde, konnte in der *A. fumigatus*-Genomdatenbank (www.tigr.org) ein ORF identifiziert werden, welcher hohe Identitäten mit pilzlichen ADH aufwies (nicht gezeigt). Um nachzuweisen, ob *A. fumigatus* über eine regulierbare ADH-Aktivität verfügt, wurde der *A. fumigatus* Wildtyp-Stamm ATCC46645 in AMM angezogen, dem entweder 50 mM Glycerin, 50 mM Acetat oder 1 % (w/v) Glukose als

einzigste Kohlenstoff-Quelle zugesetzt worden war. Als Kontrolle wurde der *A. nidulans*-Stamm SMI45 (M. Brock, pers. Mitteilung) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Weist der Organismus eine regulierbare ADH auf, so reprimiert Glukose als Kohlenstoff-Quelle deren Aktivität. Eine Induktion der ADH-Aktivität erfolgt bei Wachstum mit Kohlenstoff-Quellen wie Glycerin, Acetat oder Laktat. Durch Zugabe des ADH-Substratanalogons Allylalkohol (1,5 mM) zu den Wachstumsansätzen wurde getestet, ob die Stämme ADH-Aktivität zeigen. Wird Allylalkohol umgesetzt, so entsteht Acrolein, welches für die Zellen toxisch ist. Wachstum bedeutete demnach, daß die ADH reprimiert wurde, während fehlendes Wachstum auf ADH-Aktivität hindeutete. Der *A. nidulans*-Stamm SMI45 und der *A. fumigatus* Wildtyp wuchsen ohne Allylalkohol-Zugabe auf allen angebotenen Kohlenstoff-Quellen (Abb. 18A-F).

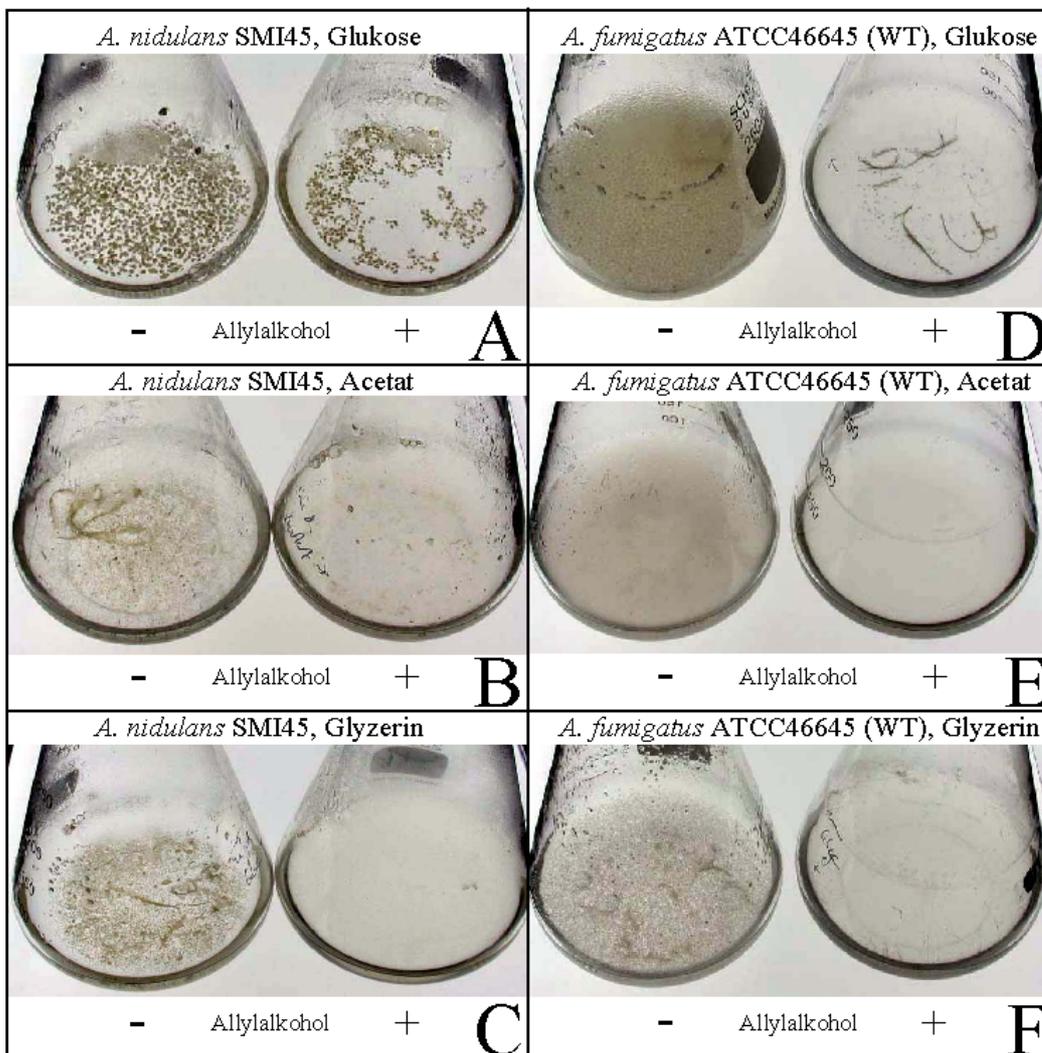


Abb. 18: Die Regulierbarkeit der *A. fumigatus* Alkohol-Dehydrogenase. Der *A. nidulans* Kontrollstamm SMI45 (A, B, C) sowie der *A. fumigatus* Wildtyp ATCC46645 (D, E, F) wurden für 24 h bei 37 °C angezogen. Als Kohlenstoff-Quelle wurden jeweils zwei Ansätzen 1 % (w/v) Glukose (A, E), 50 mM Acetat (B, E) oder 50 mM Glycerin (C, F) zugegeben. Jeweils einer dieser beiden Ansätze wurde zusätzlich mit 1,5 mM Allylalkohol supplementiert, welches bei Expression der Alkohol-Dehydrogenase zu einem toxischen Produkt umgesetzt wird. Abkürzung: WT, Wildtyp.

Nach Supplementierung des Mediums mit Allylalkohol wuchs der *A. nidulans* Stamm SMI45 nur noch auf Glukose (Abb. 18A), da er über eine regulierte ADH-Aktivität verfügt und Glukose die ADH-Expression reprimierte. Auf Glycerin und Acetat war hingegen aufgrund der ADH-Induktion und des Allylalkohol-Umatzes kein Wachstum zu verzeichnen (Abb. 18B, C). Im Gegensatz dazu wuchs der *A. fumigatus* Wildtyp nach Zugabe von Allylalkohol weder auf den nicht fermentierbaren Kohlenstoff-Quellen Glycerin und Acetat, noch auf Glukose (Abb. 18D-F). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß die *A. fumigatus* ADH-Aktivität nicht reprimierbar war. Deshalb kam der Promotor der identifizierten *A. fumigatus*-ADH nicht für die Überexpressionsversuche von *pkaC1* in Frage. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis steht die Beobachtung, daß die regulierte Induktion von Genexpressionen über den *A. nidulans alcA*-Promotor heterolog in *A. fumigatus*-Stämmen funktionierte (G. May, pers. Mitteilung). Möglicherweise beinhaltet dieser regulatorische Promotorelemente, welche beim *A. fumigatus* ADH-Promotor fehlen und über die eine Repression bei Wachstum auf Glukose möglich ist.

4.3.2. Versuche zur *pkaC1*-Expression unter Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- oder des Isocitrat-Lyase-Promotors

Eine Möglichkeit zur konstitutiven Expression von Proteinen stellt die Verwendung des Promotors der GAP-DH dar. Dieses Enzym katalysiert eine Teilreaktion der Glykolyse, bei der Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglyzerat umgesetzt wird. Die Expression des die GAP-DH-kodierenden Gens erfolgt immer auf basalem Niveau. Durch die Nutzung des *acuD*-Promotors aus *A. fumigatus* sollte ein weiterer Versuch zur *pkaC1*-Expression unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors unternommen werden. Das *acuD*-Gen kodiert die Isocitrat-Lyase aus *A. fumigatus*, welche wichtige Intermediärprodukte des Trikarbonsäurezyklus bereitstellt. Das Enzym spaltet Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat, welches unter Einbindung von Acetyl-CoA durch die Malat-Synthase zu Malat umgesetzt werden kann. Die Induktion der Isocitrat-Lyase erfolgt unter anderem durch Wachstum auf Acetat oder Propionat, weshalb der endogene *acuD*-Promotor zur regulierten Expression von Proteinen genutzt werden kann (M. Brock, pers. Mitteilung).

Ein GAP-DH kodierendes Gen konnte in der *A. fumigatus* Genomsequenz (www.tigr.org) unter Verwendung des *gpdA*-Gens aus *A. nidulans* als Sonde identifiziert werden. Die abgeleitete As-Sequenz zeigte sehr hohe Identitäten zu anderen pilzlichen Homologen (nicht gezeigt). Zur Konstruktion eines Vektors, welcher das *pkaC1*-Gen unter Kontrolle des *A. fumigatus gpdA*-Promotors beinhaltete, wurden entsprechende Fragmente in PCR-Reaktionen hergestellt. Während die Amplifikation des *pkaC1*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotide

PPKAC29BamHI / PPKAC30 und DNA des Cosmids *cospkaC1-1* als Matrize erfolgte, wurde ein etwa 0,9 kbp *gpdA*-Promotorfragment mittels chromosomaler DNA und den Oligonukleotiden PGPDA1BamHI / PGPDA3BamHI synthetisiert. Beide Fragmente wurden in den pCR2.1-Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert und ihre korrekte Amplifikation durch Sequenzierung der entstandenen Plasmide pTApkaC1-3 bzw. pTAGpdA1 überprüft. Das *gpdA*- und ein etwa 1 kbp großes *acuD*-Promotorfragment aus *A. fumigatus* wurden durch *Bam*HI-Restriktion aus den Plasmiden pTAGpdA1 bzw. pTApacuDAf1 (M. Brock, persönl. Mitteilung) reisoliert. Der Vektor pTApkaC1-3 wurde durch *Bam*HI-Restriktion linearisiert, um die *gpdA*- und *acuD*-Promotorfragmente im richtigen Leserahmen mit dem *pkaC1*-Gen zu ligieren. *E. coli*-Transformationsversuche mit diesen Ligationsansätzen führten nicht zur Isolierung von Transformanten. Das erste Exon des *pkaC1*-Gens ist mit 852 bp relativ groß und kodiert für ein potentiell Peptid von 284 As. Möglicherweise ist dieses Peptid, wenn es unter Kontrolle von *gpdA*- oder *acuD*-Promotor auch in *E. coli* exprimierbar ist, für die Zellen toxisch. Weiterhin enthält das entsprechende *pkaC1*-DNA-Fragment acht CCC-Codone, welche für die As Prolin kodieren, aber nicht der *E. coli* „Codon usage“ entsprechen und daher zur Blockierung der Ribosomen während der Translation führen könnten (siehe auch Ergebnisse 3.5.2.). Ein weiterer Beleg für diese Erklärung war, daß *E. coli*-Stämme, welche Plasmide oder Cosmide mit dem *pkaC1*-Gen unter Kontrolle des endogenen *pkaC1*-Promotors enthielten, schlecht wuchsen (nicht gezeigt). Die Vektor-DNA war dann auch nur in relativ geringer Kopienzahl in den Zellen enthalten. Möglicherweise führt der endogene *pkaC1*-Promotor nur zu schwacher Expression des *pkaC1*-Gens in *E. coli*, was zur Herunterregulierung der Kopienzahl und schlechtem Wachstum führte, wohingegen eine stärkere *pkaC1*-Expression über den *gpdA*- oder *acuD*-Promotor für die Zellen letal war.

4.4. Promotoranalysen der die PKA-Untereinheiten kodierenden Gene *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2* im Bezug auf Stressregulation

Um Hinweise für eine mögliche stressinduzierte Expression der PKA in *A. fumigatus* zu erhalten, wurden die DNA-Sequenzen von Promotoren der die PKA-Untereinheiten kodierenden Gene *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2* analysiert. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, daß Promotoren von Genen, welche in die zelluläre Antwort auf multiple Stressbedingungen involviert sind, bestimmte konservierte Sequenzelemente enthalten (Treger et al. 1998, Moskvina et al. 1998). Dabei handelt es sich unter anderem um „Stress Response Elemente“ (STRE), welche schon als einzelne Kopie die Stressantwort vermitteln können, meistens aber in zwei oder mehreren Kopien auftreten und dann additiv wirken (Treger et al. 1998). STRE-

Elemente weisen die Nukleotidabfolge 5'-CCCCT-3' oder komplementär 5'-AGGGG-3' als Konsensus-Sequenz auf. Im Promotor des *pkaR*-Gens konnten acht solcher Sequenz-Motive an den Nukleotidpositionen -236, -366, -684, -678, -709, -734, -799 und -818 relativ zum vermuteten Translationsstartpunkt identifiziert werden (siehe Anhang D). Der *pkaC1*-Promotor weist fünf STRE-Elemente an den Positionen -88, -122, -249, -254 und -172 auf (siehe Anhang E). Das *pkaC2*-Gen hingegen zeigt nur eine konservierte STRE-Sequenz im Promotor an Position -617 (siehe Anhang F). Das gehäufte Auftreten von STRE-Elementen in den *pkaR*- und *pkaC1*-Promotoren deutet möglicherweise auf eine Transkriptionsregulation der entsprechenden Gene unter Stressbedingungen hin.

5. Untersuchungen zur cAMP- und stressabhängigen Regulation der *pksP*-Virulenzdeterminante

Das *A. fumigatus pksP*-Gen kodiert eine Polyketid-Synthase, welche für die DHN-Melaninbiosynthese wichtig ist. Das Enzym wird entwicklungsabhängig vor allem während der Sporulation (Tsai et al. 1998, Tsai et al. 1999), aber auch während der Germination der Konidien in der Lunge immunsupprimierter Mäuse (Langfelder et al. 2001) exprimiert. Tierexperimente zeigten, daß eine *pksP*-Mutante eine deutlich verringerte Virulenz aufweist (Jahn et al. 1997, Tsai et al. 1998). Deswegen war es von Interesse, die Regulation dieser *pksP*-Virulenzdeterminante zu untersuchen. Die cAMP-abhängige Expression eines DOPA-Melanins als Virulenzfaktor konnte auch schon in dem Basidiomyceten *C. neoformans* nachgewiesen werden (Alspaugh et al. 1997, D'Souza et al. 2001). In dieser Arbeit sollte die Regulation der *pksP*-Expression in *A. fumigatus gpaB*- und *pkaC1*-Deletionsstämmen und durch Promotor-Mutationsanalysen untersucht werden. Dazu erfolgte die Quantifizierung der *pksP*-Expression unter Einsatz des β -Galaktosidase-Reportersystems. S. Gattung (2001) konstruierte das Plasmid pUCpyrG2pksP-lacZ, welches eine translationale *pksP*-*lacZ*-Fusion enthält (Abb. 19A). Dabei wurde ein etwa 1,3 kbp DNA-Fragment, das den 5'-Bereich und die ersten 38 As von PKSP kodiert, an das β -Galaktosidase-kodierende *lacZ*-Gen aus *E. coli* fusioniert. Das Plasmid pUCpyrG2pksP-lacZ enthält weiterhin das *pyrG*-Gen aus *A. fumigatus* als Selektionsmarker, in das im N-Terminus-kodierenden Bereich eine Mutation eingefügt wurde (Gattung 2001). Mit diesem Vektor wurde der Uracil-auxotrophe Stamm CEA17 (d'Enfert 1996) transformiert, auf Uracil-prototrophe Transformanten selektioniert und so der Stamm CEA17*pksP-lacZ* isoliert, welcher eine durch den *pksP*-Promotor kontrollierte β -

Galaktosidase-Aktivität im genetischen Wildtyp-Hintergrund zeigt. Da das chromosomale *pyrG* im Stamm CEA17 eine Mutation im C-Terminus-kodierenden Bereich aufweist, kann es nur zur Komplementation der Auxotrophie kommen, wenn das Plasmid pUCpyrG2pksP-lacZ exakt am chromosomalen *pyrG*-Locus integriert (Abb. 19D). Das einfache „Crossing over“-Ereignis, das zur homologen Integration des zirkulären Plasmids in den chromosomalen *pyrG*-Locus führt, muß demnach in der DNA-Region zwischen den beiden Mutationen erfolgen. Aufgrund dieser zielgerichteten Integration können durch ektopische Plasmidintegrationen hervorgerufene Positionseffekte vermieden werden.

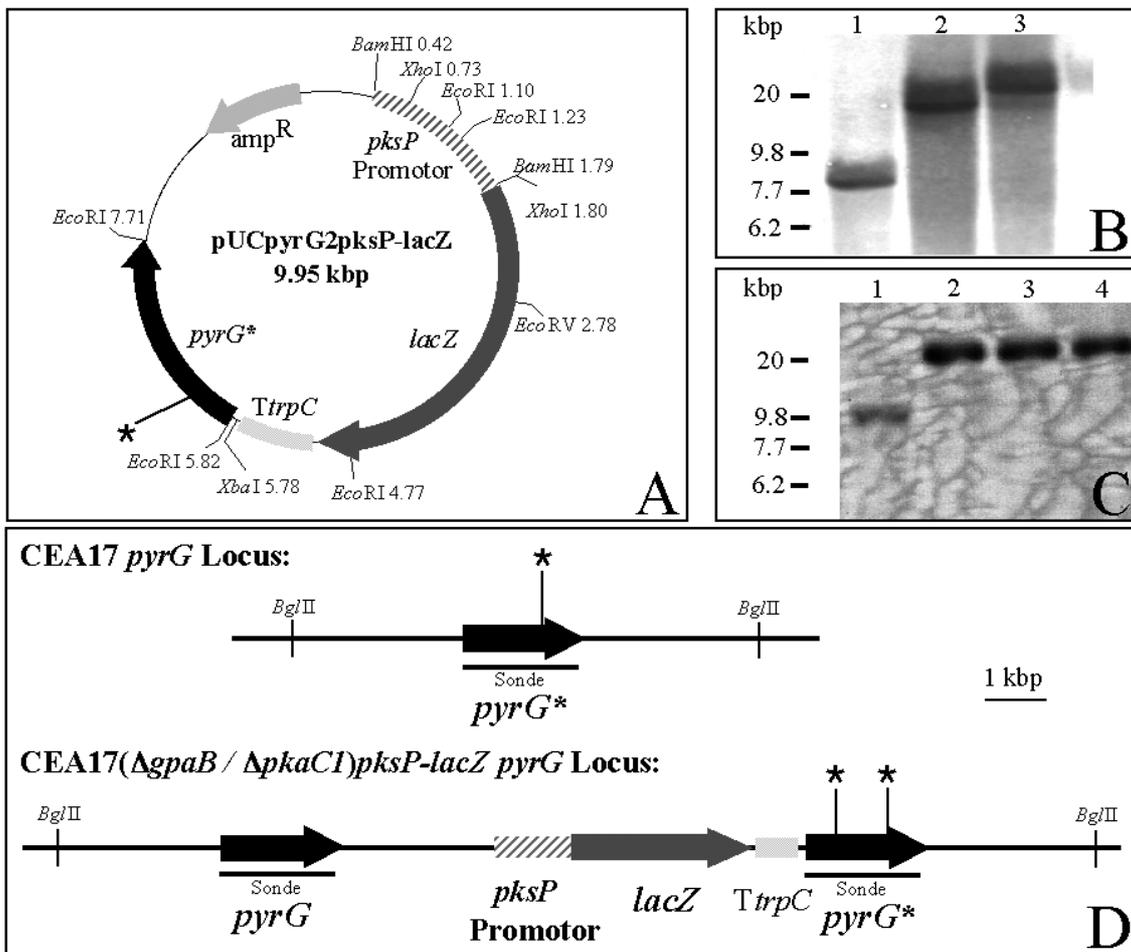


Abb. 19: Konstruktion von *A. fumigatus*-Stämmen mit einer Einzelintegration der *pksP-lacZ* Genfusion am chromosomalen *pyrG*-Locus. **A** Schematische Karte des Plasmids pUCpyrG2pksP-lacZ, welches die *pksP-lacZ* Genfusion kodiert. **B** „Southern blot“-Analyse der *A. fumigatus*-Stämme CEA17*pksP-lacZ* und CEA17*ΔgpaBpksP-lacZ* (*ΔgpaB*). Chromosomale DNA der Wildtyp-Stämme ATCC46645 (Spur 1) und CEA17*pksP-lacZ* (Spur 2) sowie der *ΔgpaB*-Mutante CEA17*ΔgpaBpksP-lacZ* (Spur 3) wurde mit *Bgl*II verdaut. Ein 1,9 kbp *Eco*RI-DNA-Fragment des Plasmids pUCpyrG2pksP-lacZ wurde als Sonde genutzt. **C** „Southern Blot“-Analyse der *A. fumigatus*-Stämme CEA17*pksP-lacZ*, CEA17*ΔpkaC1pksP-lacZ1* (*ΔpkaC1-1*) und CEA17*ΔpkaC1pksP-lacZ2* (*ΔpkaC1-2*). Chromosomale DNA der Wildtyp-Stämme ATCC46645 (Spur 1) und CEA17*pksP-lacZ* (Spur 2) sowie der *pkaC1*-Deletionsstämme CEA17*ΔpkaC1pksP-lacZ1* (Spur 3) und CEA17*ΔpkaC1pksP-lacZ2* (Spur 4) wurde mit *Bgl*II geschnitten. **D** Schematische Darstellung des chromosomalen *pyrG*-Locus vom Wildtyp sowie der Stämme, welche die *pksP-lacZ* Genfusion tragen. Restriktionsschnittstellen und die Positionen, an denen die Sonde hybridisiert, sind markiert. Sterne kennzeichnen Mutationen. Abkürzungen: *amp^R*, Ampicillin Resistenz-Gen; *pyrG*, Orotidine-5'-Monophosphat Decarboxylase-Gen aus *A. fumigatus*; *pksP*, Polyketid-Synthasegen aus *A. fumigatus*; *TrpC*, Terminationssequenz des *A. nidulans trpC*-Gens.

5.1. Generation von *gpaB*- und *pkaC1*-Deletionsstämmen mit *pksP_p-lacZ*-Genfusion

In den Stämmen CEA17 Δ *gpaB* und CEA17 Δ *pkaC* wurden die Gendeletionen unter Verwendung des Ura-Blasters durchgeführt (siehe Ergebnisse 3.2. und 3.4.). Dieser beinhaltete das *pyrG*-Gen aus *A. niger* als Selektionsmarker. Um die *pksP_p-lacZ*-Fusion einbringen und dabei wiederum auf Uracil-Prototrophie selektionieren zu können, mußte der Ura-Blaster erst aus dem Genom der entsprechenden Stämme entfernt werden. Durch Selektion auf 5'-FOA-haltigen Agarplatten konnte dabei Stamm CEA17 Δ *gpaBpyrG* isoliert werden (siehe Ergebnisse 3.5.1.). Die Ausplattierung von Konidien des Stammes CEA17 Δ *pkaC* auf Agarplatten, denen 5'-FOA zugesetzt wurde, führte zur Isolierung einer Uracil-auxotrophen Transformante, welche mit CEA17 Δ *pkaCpyrG* bezeichnet wurde. Diese zeigte das erwartete Hybridisierungsmuster, was auf die Entfernung des *pyrG*-Gens und einer *neo*-Kopie aus dem deletierten *pkaC1*-Genlocus hindeutete (Daten nicht gezeigt).

Nach Transformation des Stammes CEA17 Δ *gpaBpyrG* mit dem Plasmid pUCpyrG2*pksP-lacZ* (Abb. 19A) und Selektion auf Uracil-Prototrophie konnten 130 Transformanten isoliert werden, von denen 17 in „Southern blot“-Analysen getestet wurden. Nur ein Stamm, welcher mit CEA17 Δ *gpaBpksP-lacZ* bezeichnet wurde, zeigte das erwartete Hybridisierungsmuster. Die für den Wildtyp-*pyrG*-Locus charakteristische 8 kbp Bande (Abb. 19B, Spur 1) war verschwunden. Stattdessen konnte sowohl im Stamm CEA17 Δ *gpaBpksP-lacZ* (Abb. 19B, Spur 3) als auch im Stamm CEA17*pksP-lacZ* (Abb. 19B, Spur 2) eine 18 kbp Bande detektiert werden, welche auf die Integration des Plasmids am *pyrG*-Genlocus zurückzuführen war (Abb. 19D). Die Transformation des Stammes CEA17 Δ *pkaCpyrG* resultierte in der Isolierung von 100 Transformanten. Von den 17 in „Southern blot“-Analysen getesteten Stämmen zeigten zwei das erwartete Hybridisierungsmuster. Aufgrund der Plasmidintegration war in beiden Transformanten (Abb. 19C, Spur 3 und 4) und im Stamm CEA17*pksP-lacZ* (Abb. 19C, Spur 2) das im Vergleich zum unveränderten Wildtyp-*pyrG*-Locus (Abb. 19C, Spur 1) deutlich größere, etwa 18 kbp umfassende Fragment zu detektieren. Die Transformanten wurden mit CEA17 Δ *pkaCpksP-lacZ1* und CEA17 Δ *pkaCpksP-lacZ2* bezeichnet.

5.2. *pksP_p-lacZ*-Expression in *gpaB*- und *pkaC1*-Deletionsstämmen

Die Expression der *pksP_p-lacZ* Genfusion wurde im Stamm CEA17*pksP-lacZ* (Wildtyp), im *gpaB*-Deletionsstamm CEA17 Δ *gpaBpksP-lacZ* sowie in beiden *pkaC1*-Deletionsstämmen, CEA17 Δ *pkaC1pksP-lacZ1* und CEA17 Δ *pkaC1pksP-lacZ2*, bestimmt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Nach 24 h Kultivierung war ein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp-Stamm zu beobachten. Während die *gpaB*-Mutante

50% der für den Wildtyp-Stamm bestimmten β -GAL-Aktivität zeigte (Abb. 20A), wiesen die *pkaCI*-Deletionsstämme CEA17 Δ *pkaCI**pksP-lacZ*1 und CEA17 Δ *pkaCI**pksP-lacZ*2 70% bzw. 60% der *pksP*-*lacZ*-Expression des Wildtyp-Stammes auf (Abb. 20A). Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Regulation der *pksP*-Genexpression durch die cAMP-Signaltransduktion hin.

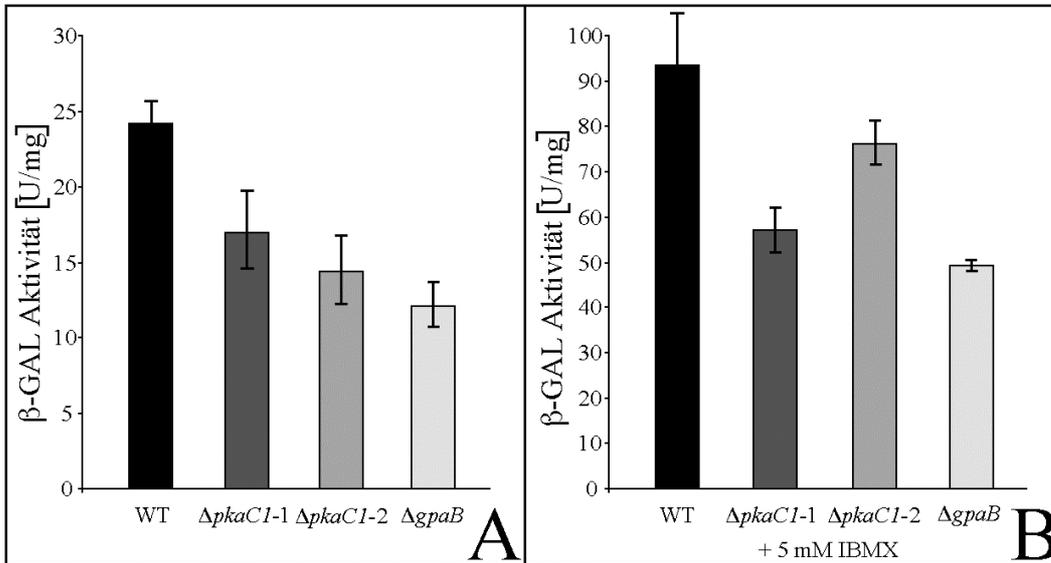


Abb. 20: Expression einer *pksP*-*lacZ* Genfusion in *A. fumigatus* *gpaB*- und Δ *pkaCI*-Deletionsstämmen. A Spezifische β -GAL-Aktivität der Stämme nach Wachstum bei 37 °C für 24 h in AMM. B Spezifische β -GAL-Aktivität der Stämme nach Wachstum bei 37 °C für 24 h in AMM supplementiert mit 5 mM IBMX. Die für jeden Stamm und jede Bedingung ermittelten Daten stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängig gewachsenen Kulturen dar. Abkürzungen: WT, Wildtyp-Stamm CEA17*pksP-lacZ*; Δ *pkaCI*-1, CEA17 Δ *pkaCI**pksP-lacZ*1; Δ *pkaCI*-2, CEA17 Δ *pkaCI**pksP-lacZ*2; Δ *gpaB*, CEA17 Δ *gpaB* *pksP-lacZ*.

In weiteren Ansätzen wurden die Stämme mit IBMX angezogen, welches als Phosphodiesterase-Inhibitor zu erhöhten zellulären cAMP-Spiegeln führen sollte. Im Wildtyp-Stamm CEA17*pksP-lacZ* und im *gpaB*-Deletionsstamm CEA17 Δ *gpaB**pksP-lacZ* konnte dadurch die *pksP*-*lacZ*-Expression etwa vierfach gesteigert werden (Abb. 20B). Überraschenderweise führte die Supplementierung mit IBMX auch zu vier- bis fünffach gesteigerten Expressionen der *pksP*-*lacZ*-Fusion in beiden *pkaCI*-Deletionsstämmen (Abb. 20B). Dieses Ergebnis widerspricht der Theorie, daß IBMX nur zu gesteigerten zellulären cAMP-Konzentrationen führt und deshalb keinen Einfluß auf einen *pkaCI*-Deletionsstamm haben sollte, weil dieser Stamm keine PKA als Zielprotein für die cAMP-Signalweiterleitung besitzt. Eher ist aufgrund der dargestellten Ergebnisse davon auszugehen, daß IBMX unspezifisch auch auf andere Zielproteine wirkt oder zu einer unspezifischen Stressantwort führt, welche in die Aktivierung der *pksP*-Expression mündet.

5.3. Mutagenese von STRE- und SSA3-Elementen im *pksP*-Promotor

In DNA-Sequenzanalysen des *pksP*-Promotors konnten neben anderen regulatorischen Bindestellen zwei Sequenzen identifiziert werden, die auf eine mögliche Regulation der *pksP*-Expression durch Stress und cAMP hindeuteten (Langfelder 2001, Abb. 21A). Dabei handelte es sich um ein STRE-Element (siehe auch Ergebnisse 4.4.) und ein SSA3-Element. SSA3-Elemente vermitteln die cAMP-abhängige Transkriptionsregulation des *SSA3*-Gens in *S. cerevisiae*, welches ein HSP70-Hitzeschockprotein kodiert (Boorstein und Craig 1990). Durch die Einführung von Punktmutationen in die STRE- und SSA3-Promotorelemente (siehe Abb. 21C, D) sollte untersucht werden, ob diese regulatorischen Sequenzen einen Einfluß auf die *pksP*-Expression ausüben.

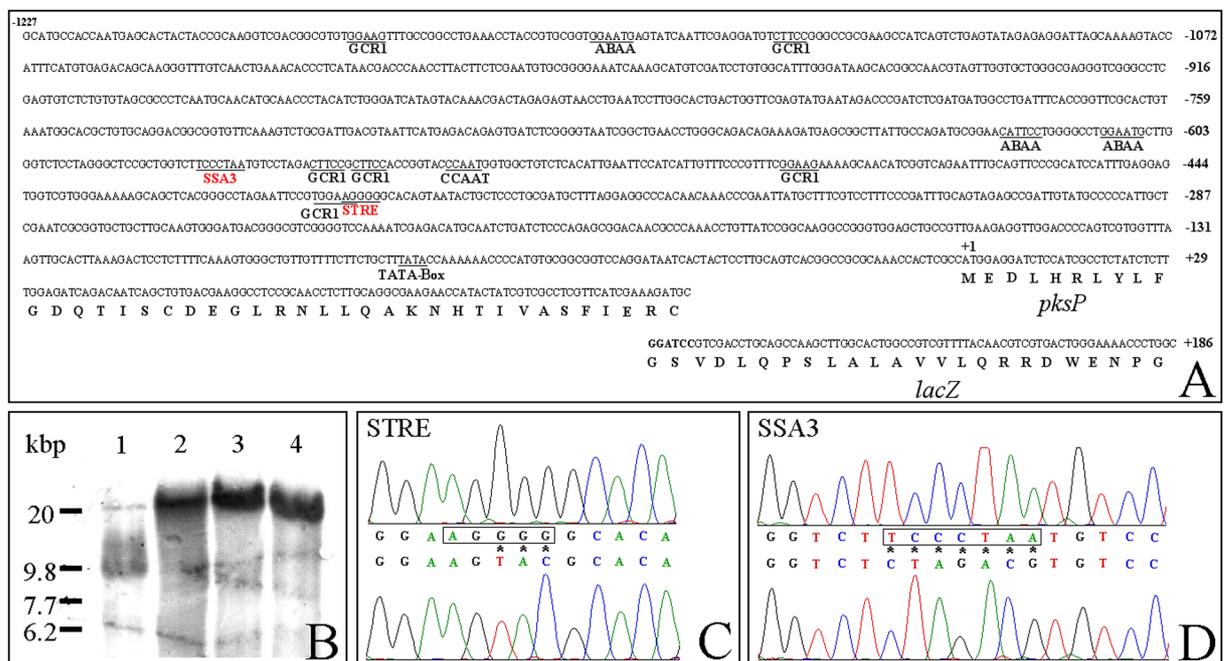


Abb. 21: Mutagenese potentiell regulatorischer Bindestellen im Promotor des *A. fumigatus pksP*-Gens.

A Darstellung der *pksP*-Promotorsequenz und des Überganges der *pksP-lacZ*-Fusion. Mögliche regulatorische DNA-Sequenzen im *pksP*-Promotor, welche den Konsensus-Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren entsprechen, sind unterstrichen und in Schwarz beschriftet. Die in dieser Arbeit mutierten regulatorischen Sequenzen sind unterstrichen und rot gekennzeichnet. Abkürzungen: STRE, potentielle „Stress Response Element“-Bindestelle; SSA3, potentielle cAMP-abhängige Bindestelle; ABAA, potentielle Bindestelle für „Abacus A“-Homologe; GCR1, potentielle Bindestelle für „Glycolysis Regulator Protein 1“-Homologe; CCAAT, potentielle Bindestelle für AnCF-Homologe; *pksP*, Polyketid-Synthasegen aus *A. fumigatus*; *lacZ*, β -Galaktosidasegen aus *E. coli*. **B** „Southern blot“-Analyse der *A. fumigatus*-Stämme CEA17*pksP-lacZ* (WT), CEA17*pksP* Δ STRE-*lacZ* (Δ STRE) und CEA17*pksP* Δ SSA3-*lacZ* (Δ SSA3). Chromosomale DNA der Wildtyp-Stämme ATCC46645 (Spur 1) und CEA17*pksP-lacZ* (Spur 2) sowie der Mutanten CEA17*pksP* Δ STRE-*lacZ* (Spur 3) und CEA17*pksP* Δ SSA3-*lacZ* wurde mit *Bgl*III verdaut. Ein 1,9 kbp *Ec*oRI-DNA-Fragment des Plasmids pUCpyrG2*pksP-lacZ* wurde als Sonde genutzt (siehe auch Abb. 18D). **C** und **D** Sequenzierung von PCR-Produkten zur Kontrolle der Δ STRE- und Δ SSA3-Mutationen im *pksP*-Promotoranteil der *pksP-lacZ*-Fusion der Stämme CEA17*pksP* Δ STRE-*lacZ* (**C**) und CEA17*pksP* Δ SSA3-*lacZ* (**D**). Die Originalsequenz ist eingerahmt dargestellt. Basensubstitutionen, welche zur Mutation eingeführt wurden, sind mit Sternchen gekennzeichnet.

5.3.1. Einführung von Mutationen in STRE- und SSA3-Promotorelemente

Die STRE- und SSA3-Promotorelemente wurden nach der Methode von Higuchi et al. (1988) im mit dem *lacZ*-Gen fusionierten *pksP*-Promotorfragment mutiert. Zur Mutagenese des STRE-Elements wurden mit den Oligonukleotiden PpksP1BamHI / PpksPSTREmut1 bzw. PpksP2BamHI / PpksPSTREmut2 und jeweils DNA des Cosmids pKL1 (Langfelder 2001) als Matrize, PCR-Produkte erzeugt, die im Bereich der Sequenz des STRE-Elements überlappten. Beide PCR-Produkte wurden gemischt, denaturiert und anschließend wieder abgekühlt. Dies führte auch zur Hybridisierung von Strängen beider PCR-Reaktionen, welche in der überlappenden STRE-Sequenz komplementär waren. Die nicht komplementären Einzelstrang-Regionen dieser Hybride wurden dann mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt. Durch eine abschließende PCR-Reaktion mit den flankierend bindenden Oligonukleotiden PpksP1BamHI / PpksP2BamHI konnte das neu synthetisierte Fragment amplifiziert werden. Anschließend wurde es in den pCR2.1-Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Niederlande) ligiert. Durch Sequenzierung des so konstruierten Plasmids pTApksP Δ STRE1 erfolgte die Überprüfung der eingebrachten Mutationen bzw. der fehlerfreien Amplifikation des restlichen *pksP*-Promotorfragments. Nach *Bam*HI-Restriktion von pTApksP Δ STRE1 wurde das mutierte *pksP*-Promotorfragment in den ebenfalls *Bam*HI geschnittenen Vektor pUCpyrG2*lacZ* (Gattung 2001) ligiert. Dabei entstand Plasmid pUCpyrG2pksP Δ STRE-*lacZ*1, mit dem der Uracil-auxotrophe Stamm CEA17 transformiert werden sollte. Analog wurden Basensubstitutionen in das SSA3-Element eingeführt. Hierfür wurden die Oligonukleotide PpksPSSA3mut1 und PpksPSSA3mut2 anstelle von PpksPSTREmut1 und PpksPSTREmut2 verwendet. Auch hier erfolgte eine Überprüfung des *pksP*-Promotorfragments durch Sequenzierung des Plasmids pTApksP Δ SSA3. Das für die Transformation von CEA17 genutzte Plasmid wurde mit pUCpyrG2pksP Δ SSA3-*lacZ*1 bezeichnet.

5.3.2. Isolierung von *A. fumigatus* Stämmen mit Integration der STRE- oder SSA3-mutierten *pksP*-*lacZ*-Genfusionen

Nach Transformation des Uracil-auxotrophen Stammes CEA17 mit den Plasmiden pUCpyrG2pksP Δ STRE-*lacZ*1 und pUCpyrG2pksP Δ SSA3-*lacZ*1 wurden Uracil-prototrophe Transformanten isoliert. Jeweils 20 Transformanten wurden in „Southern blot“-Analysen überprüft, wobei ein Stamm jeder Transformation das erwartete Hybridisierungsmuster zeigte. Die für den Wildtyp-*pyrG*-Locus charakteristische 8 kbp Bande (Abb. 21B, Spur 1) war verschwunden. Stattdessen konnte in den mit CEA17pksP Δ STRE-*lacZ* (Abb. 21B, Spur 3) und CEA17pksP Δ SSA3-*lacZ* (Abb. 21B, Spur 4) bezeichneten Transformanten eine 18 kbp Bande

detektiert werden, welche auf die Integration der Plasmide am *pyrG*-Genlocus zurückzuführen war. Eine weitere Überprüfung der Transformanten erfolgte durch Amplifikation von PCR-Produkten mittels der Oligonukleotide PpksP-Prom.mutSeq / PlacZ und chromosomaler DNA als Matrize. Zum einen konnte dadurch festgestellt werden, ob die Plasmide mit *pksP_P-lacZ*-Fusion integriert waren, da ein Oligonukleotid am *pksP*-Fragment und das zweite am *lacZ*-Fragment der Fusion hybridisierte. Weiterhin wurden die erhaltenen PCR-Produkte sequenziert und dabei das Vorhandensein der Mutation überprüft. Dabei konnte für die Stämme CEA17*pksP*ΔSTRE-*lacZ* und CEA17*pksP*ΔSSA3-*lacZ* die Präsenz der STRE- bzw. SSA3-Mutation nachgewiesen werden (Abb. 21C, D).

5.3.3. Einfluß der STRE- und SSA3-Mutationen auf die *pksP_P-lacZ*-Expression

Um zu untersuchen, ob die Mutationen der STRE- und SSA3-Elemente zu Veränderungen in der Expression der *pksP_P-lacZ*-Fusion führten, wurden die β -Galaktosidase-Aktivitäten in Proteinextrakten der Stämme CEA17*pksP*ΔSTRE-*lacZ* und CEA17*pksP*ΔSSA3-*lacZ* mit denen des Stammes CEA17*pksP-lacZ* verglichen, welcher als Wildtyp das *lacZ*-Gen unter Kontrolle eines nicht mutierten *pksP*-Promotors exprimiert. Die nach Anzucht in AMM-Medium ermittelte Grundexpression des *pksP*-Gens ist im Stamm CEA17*pksP*ΔSTRE-*lacZ* im Vergleich zur Wildtyp-Expression signifikant um 25 bis 53% erhöht (Abb. 22A, B, D). Dies könnte auf eine STRE-vermittelte Repression der *pksP*-Expression unter diesen Bedingungen hindeuten. Stamm CEA17*pksP*ΔSSA3-*lacZ* zeigt im Vergleich zum Wildtyp CEA17*pksP-lacZ* keine ausgeprägte Erhöhung der *pksP*-Expression (Abb. 22). Eine Supplementierung mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX führte in allen untersuchten Stämmen zu einer etwa drei- bis vierfachen Expressionssteigerung der *pksP_P-lacZ*-Fusion (Abb. 22A). Dies könnte einerseits ein Hinweis darauf sein, daß die mutierten Promotorelemente, vor allem das SSA3-Element, nicht in eine cAMP-abhängige *pksP*-Regulation involviert sind, da man dann eine IBMX/cAMP-unabhängige *pksP*-Expression im Mutantenstamm erwarten sollte. Andererseits verstärkt dieses Ergebnis aber die Annahme, daß IBMX auch unspezifisch wirkt und dadurch möglicherweise zu einer Stressantwort führt, welche in die Aktivierung der *pksP*-Expression münden könnte (siehe auch Ergebnisse 5.2.). An einer derartigen Stressantwort wären allerdings die hier untersuchten *cis*-Elemente nicht beteiligt.

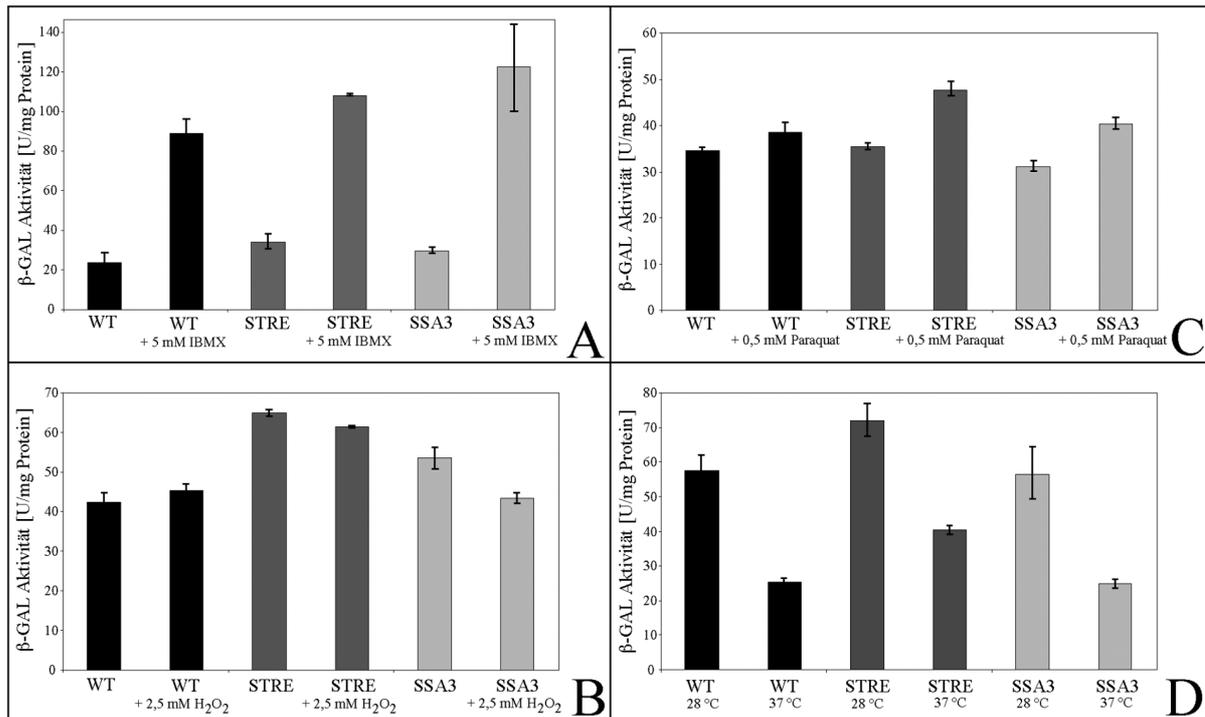


Abb. 22: Expression von *pksP_P-lacZ*- sowie *pksP_PΔSTRE-lacZ*- und *pksP_PΔSSA3-lacZ*-Genfusionen in *A. fumigatus*. A - C Spezifische β-GAL-Aktivität der Stämme nach Wachstum für 24 h bei 37 °C in AMM ohne und mit Supplementation von 5 mM IBMX (A), 2,5 mM H₂O₂ (B) oder 0,5 mM Paraquat (C). D Spezifische β-GAL-Aktivität der Stämme nach Wachstum in AMM für 24 h bei 28 °C mit anschließender Inkubation für weitere 8 h bei 28 °C oder 37 °C. Die für jeden Stamm und jede Bedingung ermittelten Daten stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängig gewachsenen Kulturen dar. Abkürzungen: WT, Wildtyp-Stamm CEA17*pksP-lacZ*; STRE, CEA17*pksPΔSTRE-lacZ*; SSA3, CEA17*pksPΔSSA3-lacZ*.

Eine mögliche stressabhängige *pksP*-Regulation über die STRE- und SSA3-Promotorelemente wurde nach Induktion von entsprechenden Bedingungen untersucht. Zum einen wurden den Medien mit H₂O₂ und Paraquat Substanzen zugesetzt, die zur Sauerstoffradikal (ROS, „Reactive Oxygen Species“) -Bildung führen. Weder H₂O₂- noch Paraquat-Zugabe führten im Stamm CEA17*pksP-lacZ* zu einer Veränderung der *pksP*-Expression (Abb. 22B, C). ROS-Stress, wie er durch diese Substanzen unter den gewählten Bedingungen vermittelt wird, scheint demnach im Wildtyp-Hintergrund keinen Einfluß auf die *pksP*-Expression zu haben. Bei den Promotor-Mutantenstämmen führte die H₂O₂-Supplementation verglichen mit Ansätzen ohne H₂O₂ zu einer relativ geringen Reduktion der *pksP*-Expression (Abb. 22B; ΔSTRE: Reduktion um 5%, ΔSSA3: 19%). Die Supplementation mit Paraquat hingegen resultierte bei beiden Stämmen, CEA17*pksPΔSTRE-lacZ* und CEA17*pksPΔSSA3-lacZ*, in etwa 30%-iger Expressionssteigerung (Abb. 22C). Dieses mit Paraquat erzielte Ergebnis könnte auch auf einen reprimierenden Effekt der STRE- und SSA3-Promotorelemente bei der *pksP*-Regulation hindeuten. Erst durch Mutation der Elemente konnte eine leichte Steigerung der *pksP*-Expression mit ROS-Stress erzielt werden. Andere Mechanismen, wel-

che die *pksP*-Expression möglicherweise aktivieren, scheinen unter den gewählten Bedingungen nicht von Bedeutung zu sein.

Auch die Induktion von Temperaturstress, wie er durch das Umsetzen von Kulturen auf 37 °C nach Vorkultur bei 28 °C induziert wurde, führte nicht zu einer Induktion der *pksP*-Expression in den untersuchten Stämmen (Abb. 22D). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß Wachstum bei 28 °C, unabhängig von einer STRE- oder SSA3-Mutation, generell zu erhöhten Expressionsraten führte (Abb. 22D; WT: Erhöhung um 56%, Δ STRE: 44%, Δ SSA3: 56%). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß das *pksP*-Gen bei 28 °C stärker expremiert wird als unter artifiziellen Laborbedingungen (37 °C).

In *S. cerevisiae* führen verschiedene Stressbedingungen zur Expressionsaktivierung bestimmter Gene durch Bindung der Transkriptionsfaktoren MSN2 und MSN4 an STRE-Elemente (Martinez-Pastor et al 1996). Die hier dargestellten Ergebnisse liefern keinen Hinweis auf einen ähnlichen Mechanismus bei der *A. fumigatus pksP*-Regulation. Eine Mutation des STRE-Elements führt nicht zu verringerter Expression. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß Stresssituationen, welche auftreten könnten, wenn *A. fumigatus* als Erreger in einen Wirtsorganismus gelangt, im hier dargestellten System unter den gewählten Bedingungen keine Induktion der Virulenzdeterminante *pksP* zur Folge hatten. Weiterhin scheinen die Mutationen der STRE- und SSA3-Promotorelemente nur geringen Einfluß auf die *pksP*-Expression zu haben.

6. Virulenzstudien von cAMP-Signaltransduktionsmutanten

6.1. Bestimmung der Konidien-Abtötungsrate von *gpaB*- und *acyA*-Deletionsstämmen im Makrophagen-Test

Makrophagen sind als „Fresszellen“ im Körper Teil der Immunabwehr gegen *A. fumigatus*. Nach Aufnahme der Konidien in die Lunge gehören sie zu den Immunzellen, welche als erste Kontakt mit dem Erreger haben. Eine Virulenztestung von *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten erfolgte deshalb mittels Bestimmung der Konidienabtötungsrate durch Makrophagen. Um mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mutantenstämmen im Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegen intrazelluläre Aktivitäten der Makrophagen zu untersuchen, wurde die Überlebensrate von Konidien nach Aufnahme in MDMs („Monocyte Derived Macrophages“) quantifiziert. Konidien der *gpaB*-Deletionsmutante CEA17 Δ *gpaB* wurden mit MDMs für 15-17 h koinkubiert, was in einer Abtötungsrate von 71% (Abb. 23)

resultierte. Im Gegensatz dazu wurden während der gleichen Inkubationszeit nur 26% der Konidien des entsprechenden Wildtyp-Stammes CEA17*pksP-lacZ* abgetötet (Abb. 23). Die 15- bis 17-stündige Inkubation von Konidien der Adenylatzyklase-Mutante Δ *acyA* mit MDMs resultierte nicht in der Abtötung der Konidien (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise führte die verzögerte Germination des Stammes Δ *acyA* (siehe auch Ergebnisse 3.6.) dazu, daß alle Konidien reisoliert werden konnten. Deswegen wurde die Inkubationszeit der Δ *acyA*-Konidien um 24 h auf insgesamt 39 h erhöht, was in einer Abtötungsrate von 73% resultierte (Abb. 23). Dies war deutlich höher als die für entsprechende Wildtyp-Konidien des Stammes ATCC46645 gemessene Abtötungsrate von 22% (Abb. 23). Die hier dargestellten Resultate deuten darauf hin, daß die cAMP-Signaltransduktion wichtig für das Überleben von Konidien in Makrophagen ist. Möglicherweise war die cAMP-abhängige, verringerte Expression von Effektorgenen, wie der *pksP*-Virulenzdeterminante (siehe auch Ergebnisse 5.2.), für die verminderte Resistenz von *gpaB*- und *acyA*-Mutantenkonidien gegen die Abtötung durch Makrophagen mitverantwortlich. Die Testung einer *pkaCI*-Deletionsmutante im Makrophagen-Assay war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da die beschriebenen Versuche innerhalb einer zeitlich begrenzten Kooperation stattfanden und zu diesem Zeitpunkt noch keine *pkaCI*-Mutante verfügbar war.

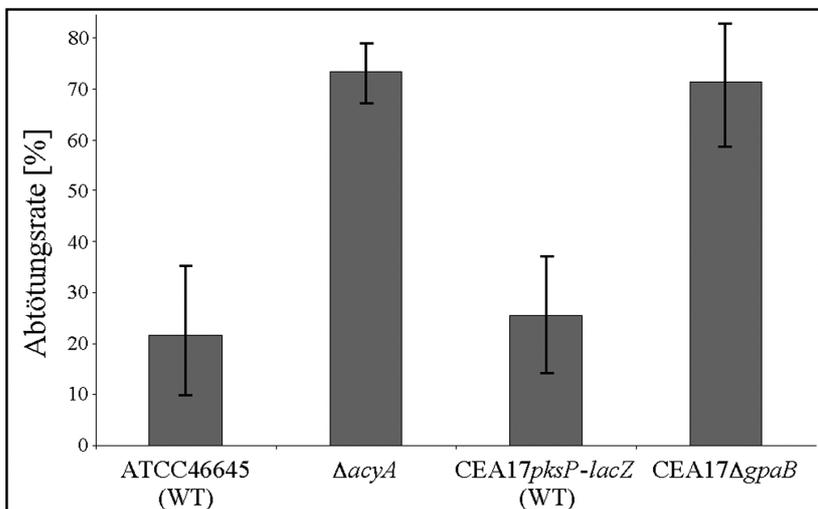


Abb. 23: Abtötungsrate von *A. fumigatus* Konidien durch MDMs („Monocyte Derived Macrophages“). Für jeden Stamm wurde die Abtötungsrate in wenigstens sechs unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Zahl der Konidien, welche durch MDMs abgetötet wurden, sind prozentual dargestellt. Dabei wurden die für unmittelbar vor der Zellyse phagozytierte Konidien bestimmten CFU 100% gesetzt.

6.2. Etablierung und Optimierung eines intranasalen Mausinfektionsmodells zur Virulenztestung von *A. fumigatus*-Stämmen

Der Einfluß der cAMP-Signaltransduktion auf die Virulenz von *A. fumigatus* sollte auch durch Testung von *gpaB*-, *acyA*- und *pkaCI*-Deletionsstämmen in einem *in vivo*-Modell untersucht werden. Dazu war es erforderlich, ein bereits bestehendes intranasales Mausinfekti-

onsmodell (Smith et al. 1994) unter Verwendung des BALB/c-Mausstammes zu etablieren und zu optimieren. Gegenüber der intravenösen (i.v.) Applikationsmethode hat das intranasale Modell den Vorteil, daß die Konidien der zu testenden *A. fumigatus*-Stämme über die Atemwege appliziert werden, was dem natürlichen Eintrittsweg des Erregers in den Organismus entspricht. An einer invasiven pulmonalen Aspergillose erkrankten ausschließlich Patienten, die über ein aus verschiedenen Gründen geschwächtes Immunsystem verfügen. Durch die Applikation immunsupprimierender Substanzen sollte diese Schwächung des Immunsystems auch im Mausinfektionsmodell durchgeführt werden, um eine Erkrankung nach Infektion mit *A. fumigatus* etablieren zu können. Ein wichtiger Parameter ist das Verhältnis zwischen Immunsuppression und Infektionsdosis. Deswegen sollten die Auswirkungen verschieden starker Immunsuppression und unterschiedlicher Konidienmengen bei der Infektion getestet werden.

6.2.1. Untersuchungen zum Einfluß der Immunsuppression auf Versuchstiere

Um einen optimalen Infektionsverlauf zu gewährleisten, war es wichtig, eine Immunsuppressionsdosis zu ermitteln, bei der die Ausbildung einer Erkrankung nach Infektion möglich ist, welche aber noch nicht die Überlebensfähigkeit der Versuchstiere ohne Infektion beeinträchtigte. Neben der einmaligen Applikation einer konstanten Dosis an Cortisonacetat am Tag -1 (=1 Tag vor Infektion), wurde die Immunsuppression durch mehrmalige Gabe der Substanz Cyclophosphamid erreicht. Cyclophosphamid wurde an den Tagen -4, -1, 2, 5, 8 und 11 vor und nach dem Infektionstag (Tag 0) verabreicht. Dabei erfolgte die Testung von 50 mg, 100 mg und 150 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht in verschiedenen Versuchstiergruppen. Als Parameter für den Einfluß dieser variierenden Immunsuppression wurde das Körpergewicht der Versuchstiere ermittelt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zusammensetzung der Bronchoalveolarlavage (BAL) der Versuchstiere.

Die regelmäßige Applikation von 150 mg/kg Cyclophosphamid führte bei 40% der Versuchstiere zu so starken Beeinträchtigungen, daß diese eingeschláfert werden mußten (Abb. 24A). Bei Verabreichung der Dosen 50 und 100 mg/kg überlebten alle Versuchstiere den Beobachtungszeitraum (Abb. 24A). Bei einem Anfangsgewicht von etwa 16-19 g hatte die Immunsuppression immer eine Gewichtsabnahme der Mäuse zur Folge. Während diese bei den Dosen 50 und 100 mg/kg mit durchschnittlich 15 bzw. 14 g zum Versuchsende nicht so stark ausfiel, zeigten die Tiere, welche mit 150 mg/kg Cyclophosphamid immunsupprimiert worden waren, mit durchschnittlich 12 g eine deutlichere Gewichtsreduktion (Abb. 24B). Die BAL-Gesamtzellzahl der mit 100 und 150 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppen lag

etwa 25% bzw. 60% über derjenigen, welche für die 50 mg/kg immunsupprimierten Tiere bestimmt wurde (Abb. 24C). Diese ermittelten Werte stellten aber im Vergleich zu BAL-Gesamtzellzahlen, wie sie für infizierte Tiere in späteren Versuchen bestimmt wurden (siehe Ergebnisse 6.2.3., 6.4., 7.2.) nur ein Grundniveau dar. In allen drei Gruppen bestand die BAL zu etwa 99% aus Makrophagen (Abb. 24D). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß es aufgrund der Immunsuppression nicht zu einer Immunantwort in den Versuchstieren gekommen war, die sich in einem Ansteigen von neutrophilen Granulozyten oder Lymphozyten geäußert hätte. Weiterhin ließ die hohe Überlebensrate und die fehlende Immunantwort Rückschlüsse auf ausgebliebene mögliche Sekundärinfektionen zu.

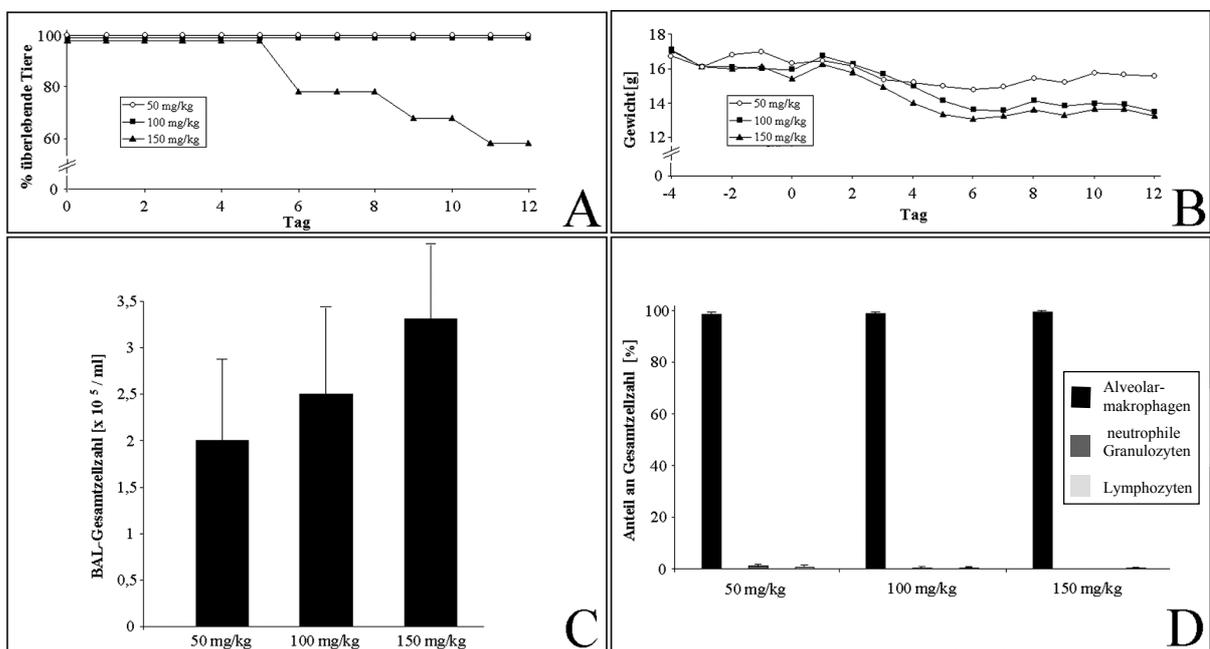


Abb. 24: Auswirkungen verschiedener Immunsuppressionsmengen auf Versuchstiere. A und B Überlebensrate (A) und Gewichtsverlauf (B) von BALB/c-Mäusen unter Immunsuppression mit 50, 100 oder 150 mg/kg Cyclophosphamid. C BAL-Gesamtzellzahlen nach Immunsuppression mit 50, 100 oder 150 mg/kg Cyclophosphamid. D Prozentuale BAL-Zusammensetzung bestehend aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nach Immunsuppression mit 50, 100 oder 150 mg/kg Cyclophosphamid.

6.2.2. Bestimmung der optimalen *A. fumigatus*-Konidienmenge zur Infektion von immunsupprimierten Versuchstieren

Mit 50 bzw. 100 mg/kg Cyclophosphamid behandelte Versuchstiere zeigten weniger starke Beeinträchtigungen während des Beobachtungszeitraumes. Deswegen erfolgte die Bestimmung der optimalen *A. fumigatus* Infektionsdosis mit Mäusen, welche unter Immunsuppression mit diesen Konzentrationen standen. Unterschiedliche Konidienmengen (10^4 , $5 \cdot 10^4$, 10^5 und $5 \cdot 10^5$) des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 wurden intranasal appliziert und das Überleben der Versuchstiere über einen Zeitraum von 13 Tagen erfaßt. Dabei zeigte sich,

daß in der Gruppe, welche mit 50 mg/kg Cyclophosphamid immunsupprimiert worden war, lediglich die höchste Infektionsdosis von $5 \cdot 10^5$ Konidien zu 20% erkrankten Tieren führte (Abb. 25A). Bei Infektion mit allen anderen Konidienmengen konnte in dieser Gruppe keine Erkrankung induziert werden (Abb. 25A). Dieses Ergebnis verdeutlichte, daß das Immunsystem der Versuchstiere aufgrund einer zu schwachen Suppression stark genug war, um die eingesetzten Konidienmengen von *A. fumigatus* effektiv zu eliminieren.

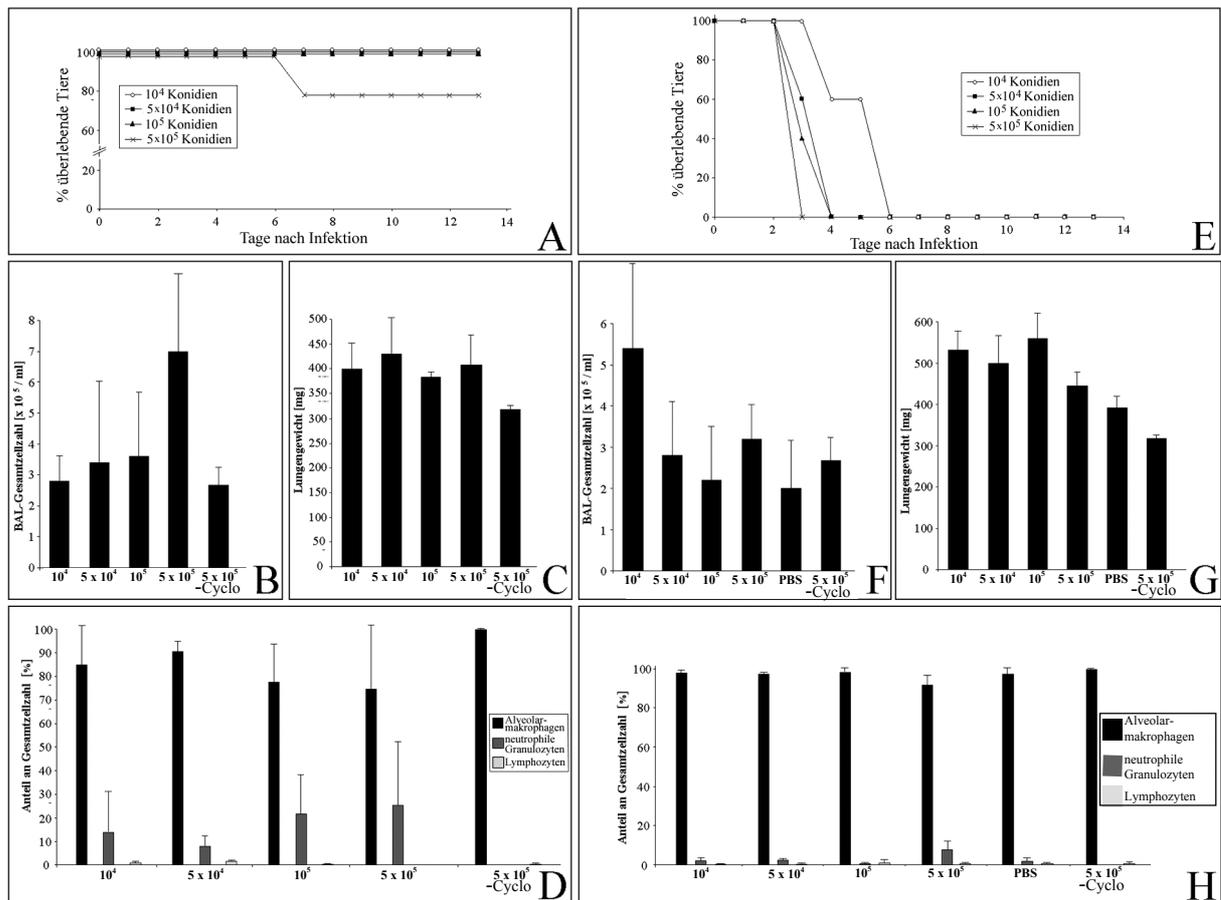


Abb. 25: Überlebensrate und immunologische Parameter nach Infektion immunsupprimierter Versuchstiere mit verschiedenen *A. fumigatus* Konidienmengen. A und E Überlebensrate von BALB/c-Mäusen, welche mit 50 mg/kg (A) oder 100 mg/kg (E) Cyclophosphamid immunsupprimiert und mit den angegebenen Konidienmengen des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 infiziert wurden. B und F BAL-Gesamtzellzahlen nach Immunsuppression mit 50 mg/kg (B) oder 100 mg/kg (F) Cyclophosphamid sowie Infektion mit *A. fumigatus*. C und G Lungengewichte nach Immunsuppression mit 50 mg/kg (C) oder 100 mg/kg (G) Cyclophosphamid und Infektion. D und H Prozentuale BAL-Zusammensetzung bestehend aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nach Infektion der mit 50 mg/kg (D) oder 100 mg/kg (H) Cyclophosphamid immunsupprimierten Mäuse. Erläuterungen zu Kontrollgruppen: -Cyclo., keine Immunsuppression, aber Infektion mit den angegebenen Wildtyp-Konidienmengen; PBS, Immunsuppression mit den angegebenen Mengen, aber keine Infektion, statt Konidien suspension PBS-Puffer appliziert.

Im Gegensatz dazu lieferte die Infektion von 100 mg/kg immunsupprimierten Mäusen ein völlig anderes Resultat. Kein Versuchstier überlebte die Infektion mit den verschiedenen Konidienmengen (Abb. 25E). Während die Infektionsdosen $5 \cdot 10^4$, 10^5 und $5 \cdot 10^5$ zwischen Tag 2 und 4 zur Erkrankung führten, war bei 10^4 Konidien ein eher moderater Erkrankungsverlauf

zwischen Tag 3 und 6 zu beobachten (Abb. 25E). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine Infektionsdosis von 10^4 Konidien bei einer Immunsuppression mit 100 mg/kg Cyclophosphamid als optimales Verhältnis für weitere Versuche angenommen.

6.2.3. Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion von Versuchstieren mit verschiedenen Mengen an *A. fumigatus*-Konidien

Die Auswertung der BAL-Gesamtzellzahl in der Gruppe der 50 mg/kg immunsupprimierten Tiere zeigte, daß nur eine Infektionsdosis von $5 \cdot 10^5$ Konidien zu einer signifikanten Zellzahlerhöhung führte (Abb. 25B). Diese war im Vergleich zu den Zellzahlen anderer Infektionsdosen etwa verdoppelt, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß eine Immunantwort induziert wurde. Eine Analyse der BAL-Zusammensetzung hingegen verdeutlichte, daß mit allen Infektionsdosen eine Immunantwort hervorgerufen werden konnte. So stieg der Anteil neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu nicht immunsupprimierten Kontrolltieren (0%) auf 14% (10^4), 8% ($5 \cdot 10^4$), 22% (10^5) und 25% ($5 \cdot 10^5$) bei entsprechender Reduzierung des Makrophagenanteils (Abb. 25D). Lymphozyten machten jeweils nur etwa 1% der BAL-Zellen aus.

In der Gruppe der mit 100 mg/kg immunsupprimierten Tiere war nur mit einer Infektionsdosis von 10^4 Konidien eine signifikante, etwa zweifache Steigerung der BAL-Zellzahl im Vergleich zu den anderen Konidienmengen zu verzeichnen (Abb. 25F). Der Grund für etwa gleich hohe BAL-Zellzahlwerte der Infektionsdosen $5 \cdot 10^4$, 10^5 und $5 \cdot 10^5$ im Vergleich zu den Kontrollen (1. Kontrolle: 100 mg/kg Cyclophosphamid, keine Konidien; 2. Kontrolle: keine Immunsuppression, $5 \cdot 10^5$ Konidien) könnte hier im kurzen Zeitraum zwischen Infektion und Erkrankung liegen. Die relativ starke Immunsuppression kombiniert mit hohen Infektionsdosen führte zu sehr schnellen Erkrankungen, währenddessen das Immunsystem möglicherweise noch nicht adäquat reagieren konnte. Diese Annahme spiegelt sich auch in der BAL-Zusammensetzung der Versuchstiere wider (Abb. 25H). Der Granulozytenanteil stieg im Vergleich zu den nicht immunsupprimierten Tieren (0%) nur geringfügig auf 3% ($5 \cdot 10^4$), 1% (10^5) und 8% ($5 \cdot 10^5$). Interessanterweise konnten bei einer Infektionsdosis von 10^4 Konidien auch nur 2% neutrophile Granulozyten in der BAL nachgewiesen werden (Abb. 25H). Dies legte die Schlußfolgerung nahe, daß es zu einem Anstieg der Granulozytenpopulation erst zwischen Tag 6 und 13 nach Infektion kam, da die mit 50 mg/kg immunsupprimierten Versuchstiere diesen Zeitraum überlebten und in der BAL dieser Tiere höhere Granulozytenzahlen bestimmt werden konnten. Der Lymphozytenanteil der BAL lag auch bei den Tieren mit 100 mg/kg Immunsuppression bei 1% (Abb. 25H).

Als weiterer Parameter für eine Infektion wurde das Lungengewicht der Versuchstiere ermittelt. Das Organgewicht von Tieren, welche mit 50 mg/kg Cyclophosphamid immunsupprimiert worden waren, war im Vergleich zu demjenigen nicht immunsupprimierter Tiere um 26% (10^4), 35% ($5 \cdot 10^4$), 21% (10^5) und 28% ($5 \cdot 10^5$) gesteigert (Abb. 25C). Das Lungengewicht der 100 mg/kg immunsupprimierten Tiere hingegen stieg deutlich um 67% (10^4), 57% ($5 \cdot 10^4$), 76% (10^5) und 40% ($5 \cdot 10^5$) (Abb. 25G). Dieses Ergebnis verdeutlichte, daß erst bei stärkerer Immunsuppression Wachstum von *A. fumigatus* im Versuchstier möglich war. Das Lungengewicht von Kontrolltieren, welche mit 100 mg/kg Cyclophosphamid immunsupprimiert, aber nicht infiziert worden waren (Abb. 25G), lag etwa im Bereich der mit 50 mg/kg behandelten und infizierten Tiere (Abb. 25C). Daraus war zu schließen, daß allein die Immunsuppression, wahrscheinlich durch Flüssigkeitsaufnahme, schon zur Steigerung des Organgewichts beitrug.

6.3. Virulenztestung von *gpaB*-, *acyA*- und *pkaCI*-Deletionsstämmen im Mausinfektionsmodell

Um eine mögliche Funktion der cAMP-Signaltransduktion für die Pathogenität von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden *gpaB*-, *acyA*- und *pkaCI*-Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell auf ihre Virulenz getestet. Versuchstiere, deren Immunsuppression mit 100 mg/kg Cyclophosphamid erfolgte, wurden intranasal mit $5 \cdot 10^3$ und 10^4 Konidien des *A. fumigatus* Wildtyp ATCC46645 oder der Mutanten $\Delta gpaB$, CEA17 $\Delta acyA$ bzw. $\Delta pkaCI$ infiziert. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 15 Tage. In der mit Wildtyp-Konidien infizierten Gruppe lag die Sterblichkeit nach neun Tagen unabhängig von der Infektionsdosis bei 90% (Abb. 26A, B, C). Im Gegensatz dazu war die Sterblichkeit deutlich auf 30% bzw. 20% reduziert, wenn Versuchstiere mit Konidien des Stammes $\Delta gpaB$ infiziert wurden (Abb. 26A). 100 bzw. 90% der Mäuse überlebten, wenn die Infektion mit $5 \cdot 10^3$ bzw. 10^4 Konidien der Adenylatzyklase-Mutante CEA17 $\Delta acyA$ erfolgte (Abb. 26B). Infektionen mit dem *pkaCI*-Deletionsstamm $\Delta pkaCI$ resultierten ebenfalls in drastisch reduzierter Sterblichkeit von 10% und 0% bei Applikation von $5 \cdot 10^3$ bzw. 10^4 Konidien (Abb. 26C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Deletion von Komponenten der *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktion zu drastisch reduzierter Virulenz führt. Die getesteten Stämme waren teilweise fast avirulent.

Aus den Lungen von 15 der 18 Tiere, welche nach Infektion mit Wildtyp-Konidien erkrankten, konnte *A. fumigatus* reisoliert werden. Nach Ausplattierung der Lungenhomogenate wurden CFU von 168 ± 101 Kolonien pro g Gewebe bestimmt. In den Lungenhomogenaten der beiden, die Wildtyp-Infektion überlebenden Mäuse konnten keine *A. fumigatus* Kolonien de-

tektiert werden. Die Überprüfung der Lungen von Versuchstieren, welche nach Infektion mit der *gpaB*-Mutante gestorben waren, resultierte in der Reisolierung von *A. fumigatus* in einer Menge von 245 ± 215 CFU/g. Interessanterweise waren auch die Lungen von fünf überlebenden Tieren, welche mit dem Stamm $\Delta gpaB$ infiziert worden waren, mit 503 ± 345 CFU/g kolonisiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die *A. fumigatus gpaB*-Mutante in einigen Fällen in der Lage war, in den Lungen immunsupprimierter Mäuse auszukeimen. Danach schien der Pilz aber ohne invasives Wachstum in der Lunge zu persistieren, denn die betroffenen Tiere zeigten keine offensichtlichen Krankheitssymptome.

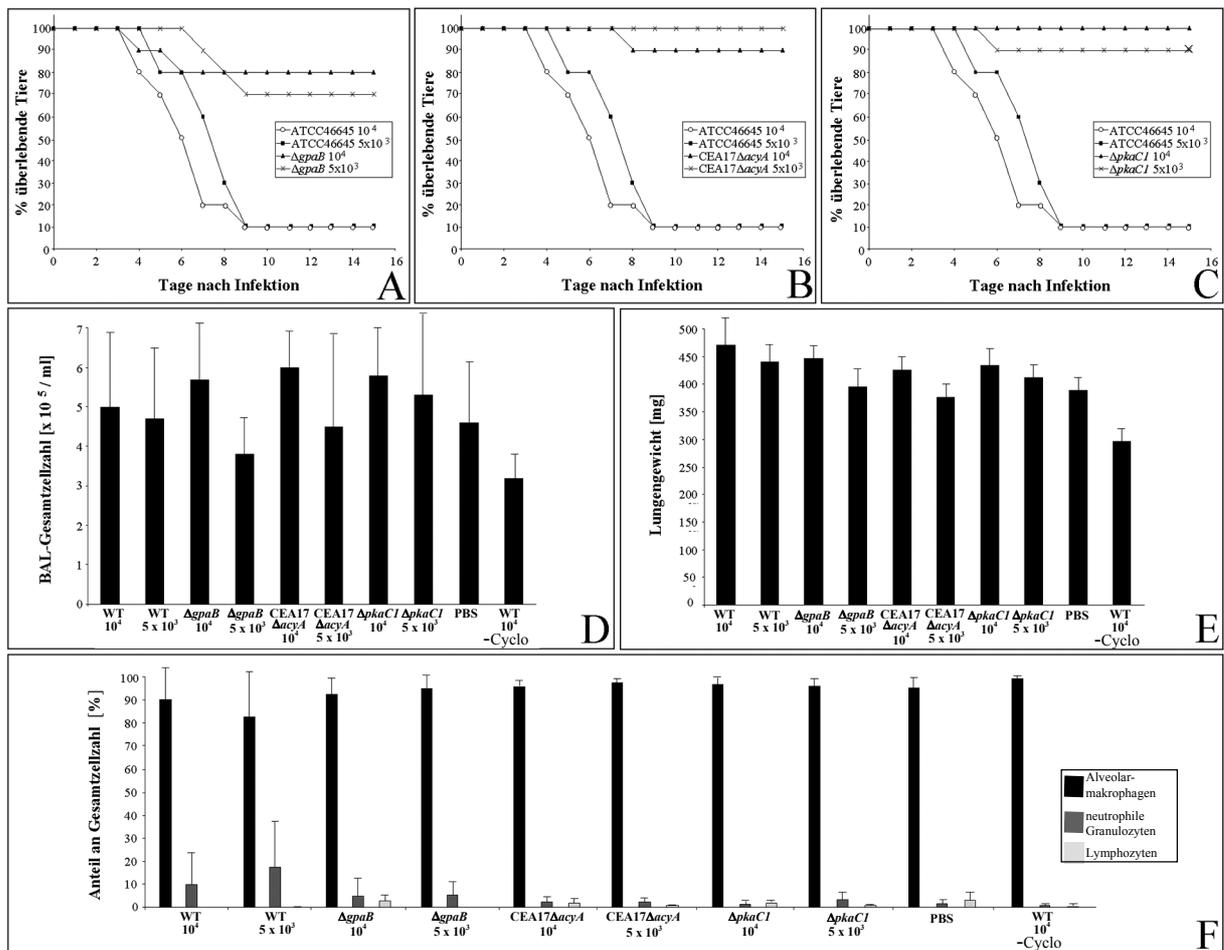


Abb. 26: Überlebensrate und immunologische Parameter nach Infektion immunsupprimierter Versuchstiere mit *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten. A - C Überlebensrate von BALB/c-Mäusen nach Infektion mit $5 \cdot 10^3$ und 10^4 Konidien des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 (A, B, C) sowie der Deletionsstämmen $\Delta gpaB$ (A), CEA17 $\Delta acyA$ (B) und $\Delta pkaC1$ (C). D BAL-Gesamtzellzahlen nach Infektion mit dem *A. fumigatus* Wildtyp-Stamm ATCC46645 sowie *gpaB*-, *acyA*- oder *pkaC1*-Deletionsstämmen. E Lungengewichte nach Infektion. F Prozentuale BAL-Zusammensetzung bestehend aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nach Infektion mit cAMP-Signaltransduktionsmutanten. Erläuterungen zu Kontrollgruppen: -Cyclo., keine Immunsuppression, aber Infektion mit den angegebenen Wildtyp-Konidienmengen; PBS, Immunsuppression mit den angegebenen Mengen, aber keine Infektion, statt Konidien-suspension PBS-Puffer appliziert.

Aus den Lungenhomogenaten von drei Mäusen, welche die Infektion mit Konidien der *acyA*-Mutante überlebt hatten, konnte der entsprechende Pilz-Stamm in einer relativ geringen Men-

ge von 84 ± 27 CFU/g reisoliert werden. Die Lungen von Mäusen, welche mit Konidien der *pkaCI*-Mutante infiziert wurden, waren nicht mit *A. fumigatus* kolonisiert. Möglicherweise konnten der *acyA*- und der *pkaCI*-Deletionsstamm gar nicht oder nur sehr schlecht in den Lungen immunsupprimierter Versuchstiere keimen oder sie wurden sehr effizient abgetötet. Die betroffenen Tiere zeigten auch hier keine Krankheitssymptome.

Die verminderte Virulenz der *acyA*- und *pkaCI*-Deletionsstämme sollte im Zusammenhang mit ihrem schlechten Wachstum betrachtet werden. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß das Überleben von Mäusen, welche mit diesen Mutanten infiziert worden waren, auf eine verzögerte Keimung oder die reduzierte Wachstumsrate der Stämme zurückzuführen war. Ähnliche Beobachtungen wurden für Adenylatzyklase- und PKA-Mutanten in *M. grisea*, *C. neoformans* und *U. maydis* gemacht (Adachi und Hamer 1998, D'Souza et al. 2001, Dürrenberger et al. 1998). Die *A. fumigatus* Virulenzdeterminante *pksP* wird durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert und eine verringerte *pksP*-Expression, wie sie hier in der *pkaCI*-Mutante gezeigt wurde (siehe Ergebnisse 5.2.), könnte für eine bessere Abtötung im Tiermodell verantwortlich sein. Auch die *gpaB*-Mutante zeigte eine reduzierte *pksP*-Expression (siehe Ergebnisse 5.2.). Aber im Gegensatz zum *pkaCI*-Deletionsstamm wies diese keine Wachstumsverzögerung auf (siehe Ergebnisse 3.6.). Trotzdem war die Virulenz des Stammes $\Delta gpaB$, wie hier gezeigt, deutlich attenuiert.

6.4. Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion mit cAMP-Signaltransduktionsmutanten

Im Vergleich zu vorhergehenden Versuchen (siehe Ergebnisse 6.2.1. und 6.2.3.) war die BAL-Gesamtzellzahl der immunsupprimierten, aber nicht mit Konidien infizierten Kontrollgruppe in diesem Versuchsansatz um etwa 50% gestiegen (Abb. 26D). Auch der Anteil neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten in der BAL dieser Tiere stieg auf etwa 2% bzw. 3% (Abb. 26F). Die beobachteten Zellzahlsteigerungen in dieser Gruppe waren möglicherweise auf Stimulierungen des Immunsystems zurückzuführen, welche sekundär erfolgt sein könnten. Durch die Plattierung der Lungenhomogenate konnte eine Infektion mit *A. fumigatus* aber ausgeschlossen werden. Die immunologischen Parameter der mit Mutanten- oder Wildtyp-Konidien infizierten Mäuse wurden deshalb mit denen der Kontrollgruppe verglichen, welche nicht immunsupprimierte, mit 10^4 Wildtyp-Konidien infizierte Tiere umfaßte. Die Zellzahl in der BAL der mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Wildtyp-Konidien infizierten Versuchstiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 56% bzw. 47% gestiegen (Abb. 26D). Mäuse, welche mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Konidien der cAMP-Signaltransduktionsmutanten infiziert worden waren, wiesen eben-

falls gesteigerte BAL-Zellzahlen auf ($\Delta gpaB$: 78% und 20%, CEA17 $\Delta acyA$: 88% und 41%, $\Delta pkaC1$: 81% und 66%; Abb. 26D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch nach Infektion mit den Deletionsstämmen eine Immunantwort induziert werden konnte. Die Zusammensetzung der BAL hingegen wies signifikante Unterschiede auf. Während bei den mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Wildtyp-Konidien infizierten Versuchstieren eine Steigerung des Granulozytenanteils auf 10% bzw. 17% zu beobachten war, zeigten die mit Mutanten-Konidien infizierten Mäuse deutlich geringere Granulozytenzahlen (Abb. 26F). Die Immunantwort auf Infektion mit den Deletionsstämmen fiel demnach deutlich schwächer aus bzw. war zum Zeitpunkt der Organaufarbeitung schon wieder beendet. Der Stamm $\Delta gpaB$ wies dosisunabhängig mit jeweils 5% im Vergleich zu den Mutanten CEA17 $\Delta acyA$ (2% und 2%) und $\Delta pkaC1$ (1% und 3%) den höchsten BAL-Granulozytenanteil auf (Abb. 26F). Möglicherweise ist dieses Ergebnis in dem zwar deutlich attenuierten, aber noch vorhandenen Virulenzpotential des $gpaB$ -Deletionsstammes begründet, wohingegen die Stämme CEA17 $\Delta acyA$ und $\Delta pkaC1$ fast avirulent waren. Selbst die beim Stamm $\Delta gpaB$ beobachtete Persistenz in der Lunge der Versuchstiere, führte nicht zu einer vergleichbar hohen Granulozytenzahl wie nach Wildtyp-Infektion. Nach Infektion mit Konidien der Deletionstämmen stieg der Lymphozytenanteil im Vergleich zum Wildtyp (<1%) nur geringfügig ($\Delta gpaB$: 3% und <1%, CEA17 $\Delta acyA$: 2% und 1%, $\Delta pkaC1$: 2% und 1%; Abb. 26F).

Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß der Granulozytenanteil in der BAL möglicherweise mit der Virulenz von *A. fumigatus*-Stämmen korreliert. Der Makrophagenanteil der BAL lag bei den Kontrollgruppen, d.h. immunsupprimierten Tieren ohne Infektion bzw. nicht immunsupprimierten, aber infizierten Tieren, normalerweise bei nahezu 100%. Der Lymphozytenanteil hingegen ließ keine deutliche Korrelation zum unterschiedlich hohen Virulenzpotential der verwendeten Stämme erkennen.

Das Lungengewicht der Kontrollgruppe immunsupprimierter, aber nicht infizierter Tiere lag auch in diesem Versuchsansatz etwa 30% über dem der nicht immunsupprimierten Gruppe, was wiederum für einen Einfluß der Immunsuppression auf das Organgewicht sprach (Abb. 26E, siehe Ergebnisse 6.2.3.). Nach Infektion mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Wildtyp-Konidien war im Vergleich zur immunsupprimierten, nicht infizierten Kontrollgruppe eine Steigerung des Lungengewichts um 20% bzw. 13% zu verzeichnen (Abb. 26E). Die Infektion mit 10^4 Konidien aller getesteten Mutantenstämmen resultierte in einem geringen Anstieg des Organgewichts ($\Delta gpaB$: 15%, CEA17 $\Delta acyA$: 10%, $\Delta pkaC1$: 12%) (Abb. 26E). Diese Ergebnisse sprechen für die Beeinflussung des Organgewichts durch die Virulenz eines Stammes, da die Infektionsdosis von $5 \cdot 10^3$ Konidien nur beim Wildtyp-Stamm, nicht aber bei den Mutanten-

stämmen zu einer Steigerung führte. In geringerem Maß schien das Lungengewicht von der Infektionsdosis abhängig zu sein, auch wenn wie bei den Stämmen CEA17 Δ *acyA* und Δ *pkaC1* nach Infektion mit 10^4 Konidien keine oder nur sehr wenige Pilzkolonien aus den Organhomogenaten reisoliert werden konnten.

7. Virulenzstudien der *A. fumigatus* Homoaconitase-Mutante (Δ *lysF*) im Mausinfektionsmodell

Während Bakterien die Aminosäure Lysin über den *meso*-Diaminopimelinsäureweg synthetisieren (Umbarger 1978), erfolgt dies in Pilzen mittels des alpha-Amino adipat-Weges (Bhattacharjee 1992). In filamentösen Pilzen ist die Lysin-Biosynthese mit dem Penicillin- bzw. Cephalosporin-Biosyntheseweg verbunden. Das namensgebende Zwischenprodukt der Lysin-Biosynthese alpha-Amino adipat stellt eine von drei Vorläuferaminosäuren dieser Synthesen dar (Litzka et al. 1999). Die Aminosäure Lysin kann vom menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert werden und ist deshalb essentieller Nahrungsbestandteil. Aufgrund der Tatsache, daß es sich beim alpha-Amino adipat-Weg um einen pilzspezifischen Lysin-Biosyntheseweg handelt, könnten Komponenten der Lysin-Biosynthese in humanpathogenen Pilzen mögliche Angriffspunkte einer antimykotischen Therapie darstellen.

Das *lysF*-Gen aus *A. fumigatus* kodiert für die Homoaconitase und eine Deletion führt zur Lysin-Auxotrophie (Mühleisen 2001). Die Lysin-Auxotrophie des Stammes Δ *lysF* (entspricht TWM6, Mühleisen 2001), welcher eine Deletion des *lysF*-Gens mittels des Hygromycin B-Resistenzmarkers *hph* aufweist, konnte durch Zugabe von L-Lysin und alpha-Amino adipat zum Medium komplementiert werden (Mühleisen 2001).

Um zu untersuchen, ob die *A. fumigatus* Homoaconitase als Ziel antimykotischer Behandlungen in Betracht kommt, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Virulenz des *lysF*-Deletionsstammes im Mausinfektionsmodell analysiert werden. Weiterhin wurde die Immunreaktion der infizierten Versuchstiere nach Infektion durch die Erfassung immunologischer Parameter untersucht.

7.1. Virulenztestung eines *lysF*-Deletionsstammes im Mausinfektionsmodell

Die Versuchstiere wurden mit einer Cyclophosphamid-Konzentration von 100 mg/kg immunsupprimiert und intranasal mit $5 \cdot 10^3$ und 10^4 Konidien des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 oder des *lysF*-Deletionsstammes Δ *lysF* infiziert. Der Beobachtungszeitraum er-

streckte sich über 15 Tage. In der mit Wildtyp-Konidien infizierten Gruppe lag die Sterblichkeit nach 9 Tagen unabhängig von der Infektionsdosis bei 90% (Abb. 27A, siehe Ergebnisse 6.3.). Im Gegensatz dazu war die Sterblichkeit drastisch auf 10% bzw. 0% reduziert, wenn Versuchstiere mit Konidien des Stammes $\Delta lysF$ infiziert wurden (Abb. 27A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die *lysF*-Deletion zu deutlich reduzierter Virulenz führte. Der getestete Stamm war fast avirulent. Interessanterweise konnte aus den Lungen von sechs Tieren, welche die Infektion mit dem Stamm $\Delta lysF$ überlebt hatten, *A. fumigatus* in einer Menge von 215 ± 173 CFU/g reisoliert werden. Nach Infektion mit Wildtyp-Konidien wurden in den Lungenhomogenaten von 15 der 18 Tiere 168 ± 101 CFU/g bestimmt (siehe Ergebnisse 6.3.).

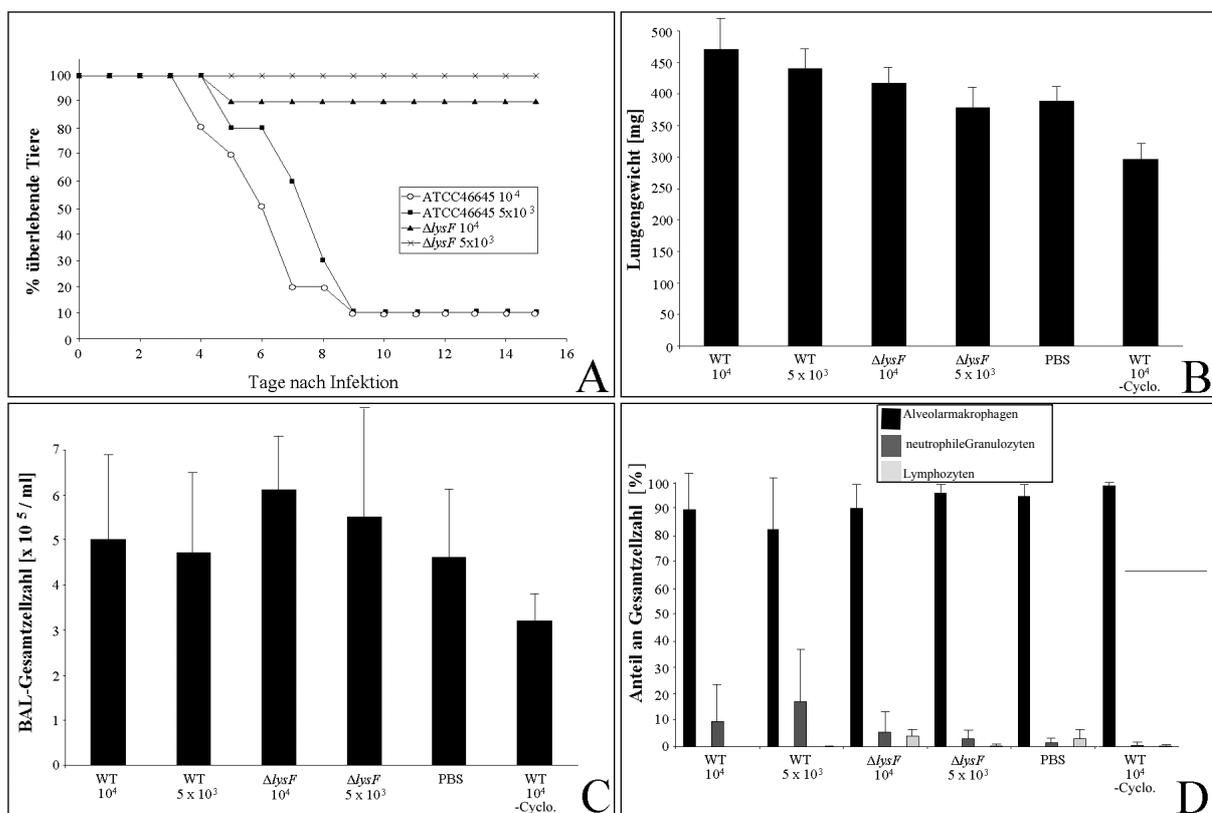


Abb. 27: Überlebensrate und immunologische Parameter nach Infektion immunsupprimierter Versuchstiere mit Konidien eines *A. fumigatus lysF*-Deletionsstammes. **A** Überlebensrate von BALB/c-Mäusen nach Infektion mit $5 \cdot 10^3$ und 10^4 Konidien des *A. fumigatus* Wildtyp-Stammes ATCC46645 oder des Deletionsstammes $\Delta lysF$. **B** Lungengewichte nach Infektion. **C** BAL-Gesamtzellzahlen nach Infektion mit dem *A. fumigatus* Wildtyp ATCC46645 bzw. dem *lysF*-Deletionsstamm. **D** Prozentuale BAL-Zusammensetzung bestehend aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nach Infektion mit dem Wildtyp ATCC46645 oder Stamm $\Delta lysF$. Erläuterungen zu Kontrollgruppen: -Cyclo., keine Immunsuppression, aber Infektion mit den angegebenen Wildtyp-Konidienmengen; PBS, Immunsuppression mit den angegebenen Mengen, aber keine Infektion, statt Konidiensuspension PBS-Puffer appliziert.

Diese Resultate implizieren, daß die *A. fumigatus lysF*-Mutante in einigen Fällen in der Lage war, in den Lungen immunsupprimierter Mäuse auszukeimen. Da der Stamm die für den Proteinaufbau essentielle Aminosäure Lysin nicht mehr selbst synthetisieren konnte, ist anzunehmen, daß durch Proteinase-Aktivität aus dem Lungengewebe freigesetztes Lysin für das

Pilzwachstum genutzt wurde. Weiterhin ist es möglich, daß das nach Anzucht auf Lysin-haltigen Agarplatten endogen in den Konidien vorhandene Lysin die Konidienkeimung erlaubte. Diese möglicherweise geringen Mengen Lysin schienen aber nicht für ein invasives Wachstum in der Lunge auszureichen, da die betroffenen Tiere keine offensichtlichen Krankheitssymptome zeigten.

Das Lungengewicht von Versuchstieren, welche mit 10^4 Konidien der *lysF*-Mutante infiziert worden waren, stieg mit 8% nur geringfügig gegenüber dem der Kontrollgruppe immunsupprimierter, nicht infizierter Mäuse (Abb. 27B). Mit $5 \cdot 10^3$ $\Delta lysF$ -Konidien infizierte Tiere wiesen keine Erhöhung des Lungengewichtes auf (Abb. 27B). Diese Ergebnisse belegten, daß nur sehr reduziertes Myzelwachstum stattfand, wenn es überhaupt zur Keimung der $\Delta lysF$ -Konidien gekommen sein sollte.

7.2. Bestimmung immunologischer Parameter nach Infektion mit einem *lysF*-Deletionsstamm

Die BAL-Gesamtzellzahl der mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Wildtyp-Konidien infizierten Versuchstiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht immunsupprimierter, mit 10^4 Wildtyp-Konidien infizierter Mäuse um 56% bzw. 47% gestiegen (Abb. 27C, siehe Ergebnisse 6.4.). Mäuse, welche mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ Konidien der *lysF*-Mutante infiziert worden waren, wiesen ebenfalls Erhöhungen der BAL-Gesamtzellzahlen um 91% bzw. 72% auf (Abb. 27C). Der Granulozytenanteil der BAL war im Vergleich zum Wildtyp (10^4 : 10%, $5 \cdot 10^3$: 17%) in Mäusen, welche mit Stamm $\Delta lysF$ infiziert wurden, deutlich reduziert (Abb. 27D). So enthielt die BAL von mit 10^4 und $5 \cdot 10^3$ $\Delta lysF$ -Konidien infizierten Tieren etwa 6% bzw. 3% neutrophile Granulozyten. Die Immunreaktion auf eine Infektion mit dem fast avirulenten *lysF*-Deletionsstamm war demnach schwächer bzw. schneller beendet, verglichen mit der Reaktion auf eine Wildtyp-Infektion. Der Lymphozytenanteil in der BAL stieg im Vergleich zum Wildtyp (<1%) nur geringfügig nach $\Delta lysF$ -Infektion (10^4 : 3%, $5 \cdot 10^3$: 1%; Abb. 27D).

DISKUSSION

Die cAMP-Signaltransduktion ist ein in eukaryontischen Zellen konserviertes Prinzip zur Signalweiterleitung von der Zellmembran in den Zellkern. Durch Expression entsprechender Genprodukte können Zellen dann spezifisch auf veränderte externe Bedingungen reagieren. In Pilzen spielt der cAMP-Signalweg sowohl bei der Regulation von Stoffwechselprozessen als auch bei der Steuerung von Wachstum und Entwicklung eine Rolle. Interessanterweise werden aber auch Virulenzprozesse in human- und pflanzenpathogenen Pilzen durch cAMP reguliert (zur Übersicht: Lengeler et al. 2000, D'Souza und Heitman 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten sechs konservierte potentielle Komponenten der *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktion identifiziert und charakterisiert werden. Es handelte sich dabei um zwei $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (GPAA und GPAB), die Adenylatzyklase (ACYA) sowie die regulatorische Untereinheit (PKAR) und zwei katalytische Untereinheiten (PKAC1 und PKAC2) der Proteinkinase A (PKA). Durch Deletion einzelner Gene sollte die Beteiligung der Elemente an der cAMP-Signaltransduktion sowie der Einfluß des cAMP-Signalweges auf Wachstum, Entwicklung und Virulenz von *A. fumigatus* untersucht werden.

1. Die Gene *gpaA*, *gpaB*, *acyA*, *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2* kodieren Komponenten der *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktion

In Sequenzvergleichen zeigten die von den Genen *gpaA*, *gpaB*, *acyA*, *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2* abgeleiteten As-Sequenzen hohe Identitäten mit homologen Proteinen aus anderen Pilzen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, daß der cAMP-Signaltransduktionsweg auch in *A. fumigatus* hochkonserviert ist. Weiterhin wiesen alle in dieser Arbeit identifizierten Komponenten für ihre Funktionen wichtige, charakteristische Sequenzmotive auf. Ein Modell des *A. fumigatus* cAMP-Signalweges mit Position und Funktionsweise der identifizierten Komponenten ist in Abb. 28 dargestellt.

In dieser Arbeit konnten zwei $G\alpha$ -Untereinheiten, GPAA und GPAB, identifiziert werden, die untereinander geringere Sequenzidentitäten zeigten als im Vergleich mit $G\alpha$ -Untereinheiten aus anderen Pilzen. Dies führt zu der Frage, ob sie unterschiedliche Funktionen in *A. fumigatus* erfüllen. $G\alpha$ -Untereinheiten werden nach ihrer Fähigkeit, die Aktivität der cAMP synthetisierenden Adenylatzyklase zu modulieren, in verschiedene Gruppen unterteilt. So aktiviert die Gruppe der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheiten die Adenylatzyklase, während $G\alpha_{(i)}$ -Untereinheiten eine inhibierende Funktion auf das Enzym ausüben (Bölker et al. 1998). Aus Sequenzvergleichen konnte abgeleitet werden, daß GPAA der inhibierenden, GPAB hingegen der aktivierenden

Untergruppe angehört, da beide jeweils hohe Identitäten nur im Vergleich mit einer der beiden Gruppen aufwiesen. In *A. nidulans*, *M. grisea* und *U. maydis* konnten bisher mehr als zwei G α -Untereinheiten identifiziert werden (Liu und Dean 1997, Regenfelder et al. 1997, siehe Tab. 1). Eine gezielte Durchmusterung der Genomsequenz würde möglicherweise auch für *A. fumigatus* zur Identifizierung weiterer G α -Untereinheiten führen. Die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins führt nach Dissoziation der α -Untereinheiten auch zur Bildung von $\beta\gamma$ -Heterodimeren (Abb. 28). In *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *C. neoformans* sowie *A. nidulans* konnte gezeigt werden, daß G $\beta\gamma$ -Komplexe auch die Aktivität der Adenylatzyklase modulieren können bzw. Funktionen in Signaltransduktionsprozessen erfüllen, die Glukose-Stoffwechsel, Wachstum und Entwicklung regulieren (Rosen et al. 1999, Welton und Hoffman 2000, Landry et al. 2000, Wang et al. 2000, Lengeler et al. 2000). Die Suche nach G β - und G γ -Untereinheiten in der Genomsequenz bzw. ihre anschließende Isolierung und Charakterisierung würde weitere Einblicke in die G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung von *A. fumigatus* ermöglichen.

Ein Vergleich der *A. fumigatus acyA*-Sequenz mit der *A. fumigatus* Genomsequenz (www.tigr.org) verdeutlichte die Existenz nur eines einzigen Adenylatzyklase-kodierenden Gens (*acyA*). Demnach scheint nur ACYA für die Synthese des intrazellulären Botenstoffes cAMP verantwortlich zu sein. Auch für die regulatorische PKA-Untereinheit konnte auf diese Weise nur ein Gen identifiziert werden. Es kann deshalb angenommen werden, daß lediglich PKAR als regulatorische Untereinheit Bestandteil des PKA-Holoenzym ist. Ein Sequenzvergleich belegte, daß das in dieser Arbeit beschriebene *pkaR*-Gen mit einem ebenfalls als *pkaR* bezeichneten Gen identisch ist (Rhodes et al. 2001). Die Autoren isolierten das *pkaR*-Gen in „Differential Display“-Ansätzen von *A. fumigatus*-Kulturen, wobei sie nachwiesen, daß die *pkaR*-Expression erhöht war, wenn *A. fumigatus* zusammen mit Endothelzellen im Vergleich zu Ansätzen ohne Zellkontakt inkubiert wurde (Rhodes et al. 2001). Ein weiteres Indiz für die Universalität von *acyA* und *pkaR* ist die Tatsache, daß bis heute in keinem Pilz mehrere verschiedene homologe Genkopien bzw. entsprechende Enzyme detektiert werden konnten. Anders verhält es sich mit den katalytischen Untereinheiten der PKA. In dieser Arbeit konnten zwei katalytische PKA-Untereinheiten, PKAC1 und PKAC2, in *A. fumigatus* identifiziert werden. Sequenzvergleiche zeigten, daß das hier beschriebene *pkaC1*-Gen mit einem Gen identisch ist, das mit *pkaC* bezeichnet und dessen Isolierung von Oliver et al. (2001) publiziert wurde. *pkaC* kodiert eine katalytische PKA-Untereinheit bestehend aus 490 AAs mit einer molekularen Masse von 56 kDa. Im Gegensatz zu *pkaC* kodiert das hier beschriebene *pkaC1*-Gen für ein Protein mit 502 AAs und einer berechneten molekularen Masse von 57 kDa. Diese

Differenz könnte auf 12 zusätzliche Glutamin-Reste im N-Terminus von PKAC1 zurückzuführen sein, deren Existenz durch wiederholtes Sequenzieren von genomischer DNA und cDNA in dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

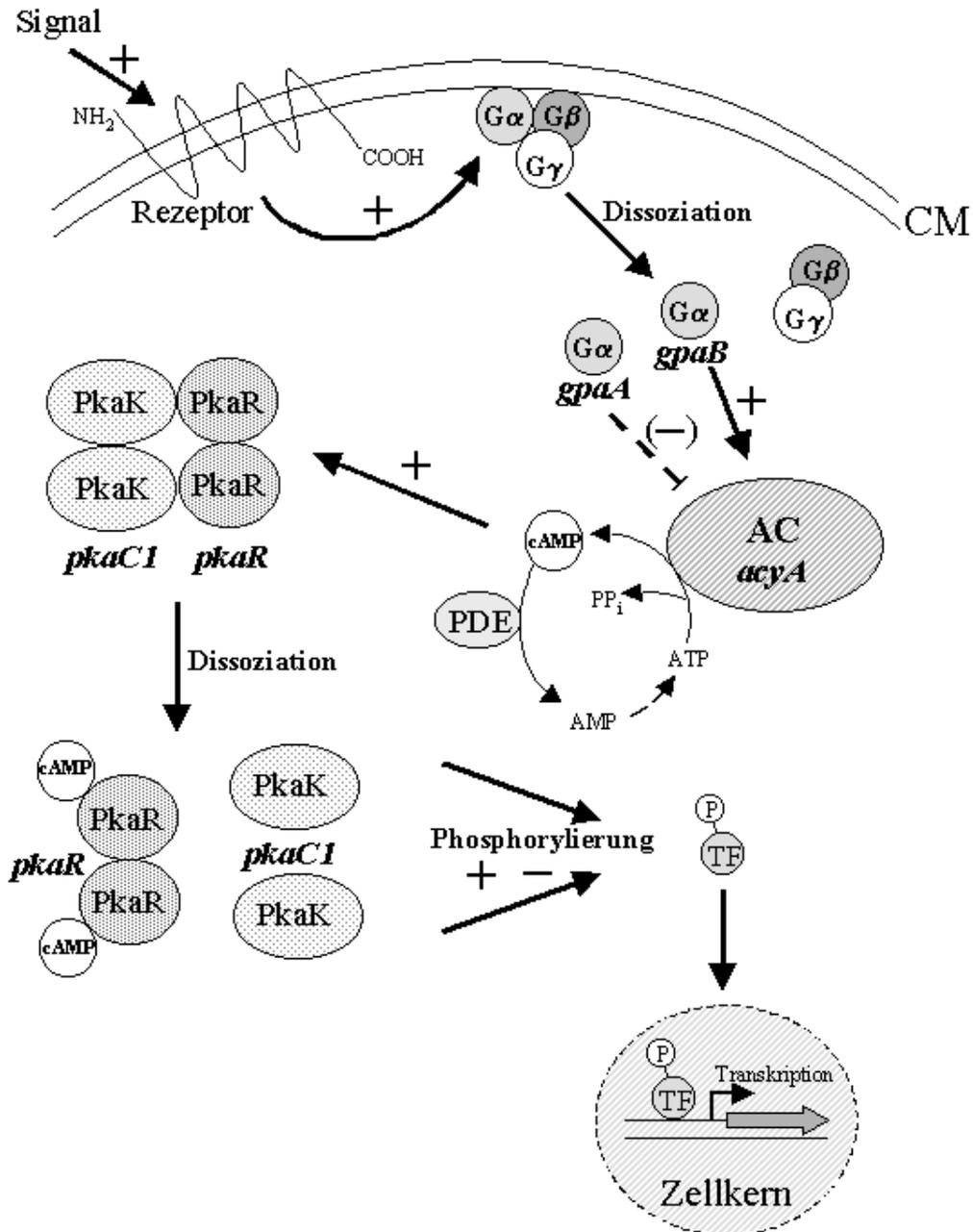


Abb. 28: Modell der cAMP-Signaltransduktion in *A. fumigatus*. Die mit Genbezeichnungen versehenen Komponenten konnten in dieser Arbeit identifiziert werden. Ein Zytoplasmamembran (CM)-ständiger Rezeptor wird durch ein Signal aktiviert, ändert daraufhin seine Konformation und aktiviert seinerseits ein membrangebundenes heterotrimeres G-Protein, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Die nach Aktivierung und Dissoziation freie $G\alpha$ -Untereinheit GPA aktiviert (+) die cAMP-Synthese durch die Adenylatzyklase (AC). Nach Sequenzvergleichen konnte GPAA der die Adenylatzyklase inhibierenden (-) Gruppe von $G\alpha$ -Untereinheiten zugeordnet werden. Durch cAMP-Bindung an die regulatorischen Untereinheiten (PkaR – PKAR) freigewordene katalytische Untereinheiten (PkaK – PKAC1) der Proteinkinase A können Zielproteine, z.B. Transkriptionsfaktoren (TF), durch Phosphorylierung aktivieren oder inhibieren (+ -). Diese Transkriptionsfaktoren steuern möglicherweise die Genexpression potentieller cAMP-Zielgene im Zellkern. cAMP-Moleküle werden durch Phosphodiesterasen (PDE) hydrolysiert, was zur Beendigung der Signalweiterleitung führt.

Es ist anzunehmen, daß PKAC1 die einzige aktive katalytische PKA-Untereinheit in *A. fumigatus* darstellt. Ein Grund zu dieser Annahme liegt in der Sequenzabweichung der N-terminalen ATP-Bindestelle im PKAC2-Protein (GXGXXA) von der normalerweise hoch konservierten Konsensussequenz (GXGXXG). Das PKAC2-homologe Protein CPK2 (EMBL-Datenbank-Nummer: AA021201) aus *M. grisea*, welches bis heute noch nicht charakterisiert wurde, weist ebenfalls diese Abweichung auf. Weiterhin war in *A. fumigatus* *pkaC1*-Deletionsstämmen keine PKA-Aktivität mehr messbar, was ein weiteres Indiz für eine mögliche Funktionslosigkeit von PKAC2 darstellt. Die Existenz multipler Isoformen katalytischer PKA-Untereinheiten wurde für verschiedene andere Pilze beschrieben. Drei katalytische PKA-Untereinheiten (TPK1-3) sind für die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* essentiell (Toda et al. 1987b). Diese sind unter anderem in die Regulation des Kohlenstoff-Intermediärstoffwechsels (zur Übersicht: Thevelein et al. 2000), die Reaktion auf Stressbedingungen (Smith et al. 1998), die Zellzykluskontrolle (Reinders et al. 1998) sowie die Morphogenese von Pseudohyphen (Robertson und Fink 1998, Pan und Heitman 1999) involviert. In der humanpathogenen Hefe *C. albicans* haben TPK1 und TPK2 als katalytische PKA-Untereinheiten ebenfalls Einfluß auf Morphogenese und Wachstum (Sonneborn et al. 2000, Bockmühl et al. 2001). Ebenso enthält *U. maydis* zwei entsprechende Proteine, ADR1 und UKA1, von denen ADR1 hauptsächlich für die zelluläre PKA-Aktivität sowie für Paarung und Virulenz verantwortlich ist (Dürrenberger et al. 1998). Das gleiche gilt für den humanpathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* und den Reispflanzen infizierenden Pilz *M. grisea*. Deletionsstämme der katalytischen PKA-Untereinheiten PKA1 bzw. CPKA zeigten fast keine detektierbare PKA-Aktivität mehr, wobei aber jeweils eine zweite PKA-Isoform in entsprechenden Genomdatenbanken identifiziert werden konnte (D'Souza et al. 2001, Adachi und Hamer 1998, EMBL-Datenbank-Nummer: AA021201).

2. Die cAMP-Signaltransduktion beeinflusst das Wachstum und die Entwicklung von *A. fumigatus*

In dieser Arbeit konnten die Gene *gpaB*, *acyA* und *pkaC1* mittels unterschiedlicher Selektionsmarker in zwei verschiedenen *A. fumigatus* Wildtyp-Stämmen deletiert werden. Dies resultierte in deutlichen phänotypischen Veränderungen im Bezug auf Wachstum und Konidienbildung. Dabei waren Mutanten der Adenylatzyklase ACYA und der katalytischen PKA-Untereinheit PKAC1 phänotypisch sehr ähnlich. Die spezifischen Wachstumsraten der Stämme auf Minimal- und Vollmedium sowie ihre Fähigkeit, Konidien zu bilden, waren im Vergleich mit den entsprechenden Wildtyp-Stämmen deutlich reduziert (Abb. 12, 14; Tab. 6, 7).

Solche Phänotypen zeigten auch entsprechende Null-Mutanten verschiedener anderer Pilze. Die Deletion des Adenylatzyklase-kodierenden Gens *cyaA* in *N. crassa* führte zu verkürzten Luftmyzelien und einer geringeren apikalen Wachstumsrate (Terenzi et al. 1974). Die humanpathogene Hefe *C. albicans* zeigt nach Deletion der Adenylatzyklase (CaCdc35p) ein verlangsamtes Wachstum und war weiterhin nicht mehr in der Lage, ein morphogenetisches Umschalten von Hefe- auf Myzelwachstum durchzuführen, welches essentiell für die Virulenz des Pilzes ist (Rocha et al. 2001). In *A. nidulans* führten Deletionen der kodierenden Gene für Adenylatzyklase (*cyaA*) und katalytische PKA-Untereinheit (*pkaA*) zu Wachstumsdefekten und zur Verzögerung der Konidienkeimung (Fillinger et al. 2002). Diese Merkmale wurden ebenfalls für eine *M. grisea* Adenylatzyklase-Mutante ($\Delta mac1$) beschrieben (Choi und Dean 1997). Auch die Deletion des Gens der katalytischen PKA-Untereinheit PKAC in *A. niger* resultierte in einem zwei- bis dreifach reduzierten Koloniedurchmesser und verzögerter Konidienkeimung (Staudohar et al. 2002). Eine verzögerte Konidienkeimung könnte initial auch für das reduzierte Wachstum der *A. fumigatus* $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Stämme nach 24 h (Abb. 13) verantwortlich sein. Die Mobilisierung von Trehalose, welche als Speicherstoff in Konidien filamentöser Pilze fungiert, stellt eine wichtige Voraussetzung bei der Konidienkeimung dar. Die für die Trehalosespaltung notwendigen Trehalasen werden durch PKA-Phosphorylierung cAMP-abhängig reguliert (d'Enfert et al. 1999). Bei der Keimung von Konidien der *A. nidulans* Mutanten $\Delta cyaA$ und $\Delta pkaA$ erfolgt der Trehalose-Abbau langsamer bzw. kaum noch (Fillinger et al. 2002). Eine verzögerte Keimung von *A. fumigatus* $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Konidien könnte somit auch auf eine fehlende cAMP-abhängige Trehalose-Mobilisierung zurückzuführen sein. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß cAMP-Synthese und PKA-Aktivität wichtig aber nicht essentiell für die *A. fumigatus* Konidienkeimung sind, da $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Deletionsstämme in der Lage sind, wenn auch mit deutlich reduzierten Wachstumsraten, zu wachsen. Während PKA-Mutanten von Pilzen, welche nahe mit *A. fumigatus* verwandt sind, der Literatur nach ähnliche Wachstumsphänotypen aufwiesen, zeigen sich im Bezug auf die Konidienbildung interessanterweise Unterschiede. Während die *pkaC1*-Deletion in *A. fumigatus* zu deutlich reduzierter Konidienbildung führte, war diese beim *A. nidulans* *pkaA*-Deletionsstamm gesteigert (Shimizu und Keller 2001). Eine PKAA-Überproduktion in *A. nidulans* führte folgerichtig zur Verminderung der Konidienbildung (Shimizu und Keller 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, daß die asexuelle Bildung von Konidien auf PKA-Ebene bei beiden Pilzen unterschiedlich reguliert wird.

Die Zugabe von dBcAMP zu den Agarplatten komplementierte die Phänotypen der *A. fumigatus* Adenylatzyklase-Mutanten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei *C. albicans*, *N. crassa* und *M. grisea* gemacht. Durch Zugabe von cAMP konnten Wachstumsdefekte der Adenylatzyklase-Mutanten dieser Pilze ebenfalls supplemiert werden (Rocha et al. 2001, Kays et al. 2000, Adachi und Hamer 1998). Der *A. fumigatus* *pkaC1*-Deletionsphänotyp konnte wie erwartet nicht durch dBcAMP-Supplementation komplementiert werden. Aufgrund der Tatsache, daß die PKA ein cAMP-Zielprotein darstellt, sollte eine Erhöhung des cAMP-Spiegels keine Auswirkungen in einer PKA-Mutante haben. Weiterhin enthält dieses Ergebnis einen weiteren Hinweis darauf, daß PKAC1 die einzige aktive katalytische PKA-Untereinheit in *A. fumigatus* ist. Durch die cAMP-Zugabe konnte keine andere, möglicherweise noch nicht identifizierte Untereinheit aktiviert werden, die den *pkaC1*-Deletionsphänotyp dann wenigstens teilweise komplementiert hätte.

Versuche zur Deletion der regulatorischen PKA-Untereinheit PKAR in *A. fumigatus* führten nicht zur Isolierung entsprechender Mutanten. Möglicherweise ist die *pkaR*-Gendeletion für *A. fumigatus* letal, da es in diesem Fall zu einer konstitutiv aktiven Signalweiterleitung kommen könnte. Die katalytischen PKA-Untereinheiten würden dann immer frei und somit aktiv vorliegen, was zur völligen Deregulation der zellulären Prozesse führt. Gegen diese Annahme spricht, daß Mutanten der regulatorischen PKA-Untereinheit in anderen Pilzen, wie z.B. *A. niger*, *C. neoformans* oder *U. maydis*, lebensfähig sind (Staudohar et al. 2002, D'Souza et al. 2001, Gold et al. 1994). Die Deletion des *pkaR*-Gens in *A. niger* resultierte allerdings in einem sehr reduzierten Koloniewachstum auf Agarplatten, fehlender Konidienbildung sowie einem kompletten Verlust des polaren Myzelwachstums in Flüssigkultur (Staudohar et al. 2002). Deswegen scheint es eher möglich, daß *A. fumigatus* *pkaR*-Deletionsstämme aufgrund ihres drastischen Phänotyps schwer zu isolieren sind.

Der Phänotyp der *gpaB*-Deletionsstämme unterstützt die Theorie, daß GPAB der Gruppe der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheiten angehört. Auch bei den *A. fumigatus* $\Delta gpaB$ -Stämmen waren die gebildeten Konidienmengen reduziert, wenn auch nicht so stark wie bei den $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Mutanten. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die asexuelle Entwicklung von Konidien in *A. fumigatus* durch die $G\alpha$ -Untereinheit GPAB kontrolliert wird, welche die cAMP-Synthese durch ACYA aktiviert, was nachfolgend zu erhöhtem cAMP-Spiegel und PKA-Aktivität führt. Aufgrund der verbliebenen Fähigkeit der *gpaB*-Deletionsstämme, Konidien zu bilden, ist es wahrscheinlich, daß die Aktivierung der *A. fumigatus* Adenylatzyklase auch von anderen Proteinen abhängt, welche unabhängig von GPAB agieren. Ähnlich wie in *A. fumigatus* führt auch in *N. crassa* die Inaktivierung des GPAB homologen Proteins GBA3 durch

Gendeletion zu Defekten in der Konidienbildung (Kays et al. 2000). Weiterhin wiesen *N. crassa* $\Delta gba3$ -Mutanten Störungen der Luftmyzelbildung auf, wie sie schon bei den Adenylatzyklase-defizienten Stämmen ($\Delta cyaA$) beobachtet wurden (Kays et al. 2000). Im Gegensatz dazu kam es bei *A. fumigatus* nicht zur Beeinflussung der Myzel-Wachstumsrate durch die *gpaB*-Deletion. Die phänotypischen Defekte der *N. crassa* $\Delta gba3$ -Mutante sowie von Mutanten der GPAB-homologen $G\alpha$ -Untereinheiten in *C. neoformans* ($\Delta gpa1$), *U. maydis* ($\Delta gpa3$) und *Ustilago hordei* ($\Delta fill$) konnten durch cAMP-Zugabe komplementiert werden (Alspaugh et al. 1997, Regenfelder et al. 1997, Lichter und Mills 1997). Wie in dieser Arbeit gezeigt, war auch der Phänotyp der *A. fumigatus* $\Delta gpaB$ -Mutante mit dBcAMP komplementierbar, was ein weiterer Hinweis auf eine Adenylatzyklase-aktivierende Funktion von GPAB ist. G-Proteine kontrollieren ebenfalls die asexuelle Entwicklung der Konidien in dem nahe mit *A. fumigatus* verwandten Pilz *A. nidulans*. Bisher konnten drei α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (FADA, GANA, GANB) identifiziert werden, wobei die $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GANB eine vergleichbare Funktion wie GPAB in der Aktivierung der Adenylatzyklase und in der Regulation von Entwicklungsprozessen zu haben scheint. Das vermeintliche Homologe der *A. fumigatus* $G\alpha$ -Untereinheit GPAA ist in *A. nidulans* FADA. Beide Proteine zeigen 98% identische AAs und gehören zur Gruppe der $G\alpha_{(i)}$ -Untereinheiten. Auch FADA ist in die Regulation morphogenetischer Prozesse von *A. nidulans* involviert. Eine konstitutiv aktive Variante von FADA führt zu einer Blockierung der asexuellen Vermehrung, wohingegen ein dominant negatives Allel von *fada* die Konidienbildung ermöglicht (Yu et al. 1996, Hicks et al. 1997, Shimizu und Keller 2001). Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen überein, daß die Deletion der aktivierenden $G\alpha$ -Untereinheit GPAB in *A. fumigatus* zu verringerter Aktivierung der Adenylatzyklase führte, was in reduzierter Konidienbildung resultierte. Demnach scheint es auch möglich, daß GPAA die *A. fumigatus* Adenylatzyklase inhibiert. Durch Deletion, Überexpression oder Einführung einer dominant aktiven Mutation in *gpaA* könnte diese Annahme überprüft werden.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die cAMP-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Entwicklung sowie asexueller Konidienbildung in *A. fumigatus* spielt. Weiterhin indiziert die Ähnlichkeit der $\Delta gpaB$ -, $\Delta cyaA$ - und $\Delta pkaC1$ -Phänotypen, daß GPAB als eine aktivierende $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit der Adenylatzyklase fungiert und das daraufhin gebildete cAMP die *pkaC1*-kodierte, katalytisch aktive PKA-Untereinheit aktiviert. Ein weiterer experimenteller Nachweis für das Zusammenwirken dieser drei Komponenten wurde durch Messung der PKA-Aktivität in den entsprechenden Deletionsstämmen erhalten. Weder ein $\Delta pkaC1$ - noch

$\Delta gpaB$ - sowie $\Delta acyA$ -Stämme wiesen PKA-Aktivität auf. Während dies bei der $\Delta pkaC1$ -Mutante auf die Deletion der enzymatisch aktiven Untereinheit zurückzuführen war, kann bei den $\Delta gpaB$ - und $\Delta acyA$ -Mutanten dieses Ergebnis mit fehlender PKA-Aktivierung durch verminderte oder fehlende cAMP-Synthese begründet werden. Allerdings konnte die PKA-Aktivität in diesen beiden Stämmen durch Zugabe von cAMP wieder gesteigert werden, was die Verknüpfung zur $pkaC1$ -kodierten PKA-Aktivität klar nachweist.

3. Die cAMP-Signaltransduktion reguliert die Virulenz von *A. fumigatus*

Um den Einfluß der cAMP-Signaltransduktion auf die Virulenz von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Ansätze verfolgt. (1) Die Bedeutung der Gene *acyA* und *gpaB* für das Überleben von Konidien in Makrophagen wurde untersucht. (2) Im Mausinfektionsmodell erfolgte der Nachweis, inwieweit *gpaB*-, *acyA*- und *pkaC1*-Deletionsstämme in der Lage sind, eine Erkrankung auszulösen. (3) Ein möglicher Einfluß von GPAB und PKAC1 auf die Expression der *pksP*-Virulenzdeterminante wurde nachgewiesen. Von den zwei in dieser Arbeit beschriebenen G α -Untereinheiten wurde GPAB für die Virulenzstudien gewählt, da es die homologe Komponente von Proteinen ist, für die eine Involvierung in Virulenzprozesse des humanpathogenen Pilzes *C. neoformans* (GPA1) (Alspaugh et al. 1997) und des pflanzenpathogenen *U. maydis* (GPA3) (Regenfelder et al. 1997) nachgewiesen worden war. Von den beschriebenen katalytischen PKA-Untereinheiten wurde PKAC1 für die Untersuchungen gewählt, da anzunehmen war, daß PKAC2 keine zelluläre Funktion besitzt.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, wurden Konidien der $\Delta acyA$ - und $\Delta gpaB$ -Mutanten deutlich effizienter durch Makrophagen abgetötet als Wildtyp-Konidien. Beobachtungen, welche in Experimenten gemacht wurden, in denen Makrophagen mit Zellen des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* infiziert wurden, stehen in Einklang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen. Eine *C. albicans* Adenylatzyklase-Mutante ($\Delta cacdc35$) wurde effizienter durch Makrophagen phagozytiert und anschließend abgetötet als Wildtyp-Zellen (Rocha et al. 2001). Die Infektion mit einer *C. albicans* RAS1-Mutante führte zu einer etwa siebenfachen Steigerung der Makrophagen-Überlebensrate im Vergleich zur Wildtyp-Infektion (Leberer et al. 2001). RAS-Proteine gehören zur Gruppe der G-Proteine. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß RAS2 eine duale Rolle in der Signalweiterleitung spielt. Es ist in der Lage, sowohl die Adenylatzyklase, als auch den MAP-Kinase-Signalweg zu aktivieren (Jiang et al. 1998, Mösch et al. 1999). Auch in *C. albicans* leitet RAS1 Signale an die cAMP-Signalkaskade und an die MAP-Kinase-Kaskade weiter (Leberer et al. 2001). Der ebenfalls

humanpathogene Pilz *C. neoformans* bildet eine Kapsel in Abhängigkeit von cAMP. Diese vermittelt den Zellen einen Schutz vor Phagozytose, bewirkt aber auch eine Erhöhung der Überlebensrate in Makrophagen (Feldmesser et al. 2000). Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ist es denkbar, daß die cAMP-Signaltransduktion Verteidigungsmechanismen von *A. fumigatus* aktiviert, die dem Schutz vor einem Angriff von Immuneffektorzellen dienen. Ein Verteidigungsmechanismus könnte die Expression der Virulenzdeterminante *pksP* und eine damit verknüpfte DHN-Melaninbiosynthese sein.

In dieser Arbeit werden Ergebnisse dargestellt, welche verdeutlichen, daß die *pksP*-Expression durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert wird. In $\Delta gpaB$ - und $\Delta pkaCI$ -Mutanten wurde in Hyphen unter standardisierten Wachstumsbedingungen eine reduzierte *pksP*_P-*lacZ*-Expression gemessen. Der in der $\Delta gpaB$ -Mutante beobachtete Effekt ist wahrscheinlich auf einen verminderten cAMP-Spiegel aufgrund fehlender Adenylatzyklase-Aktivierung durch die $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GPAB zurückzuführen. Eine verringerte Anzahl an cAMP-Molekülen führt dann zu schwächerer PKA-Aktivierung. Wahrscheinlich ist der komplette Ausfall der PKA-Aktivität in den $\Delta pkaCI$ -Stämmen für die reduzierte *pksP*-Expression verantwortlich. Allerdings wiesen die $\Delta pkaCI$ -Mutanten höhere *pksP*_P-*lacZ*-Expressionsraten als der $\Delta gpaB$ -Stamm auf. Dieses Ergebnis könnte dafür sprechen, daß neben dem GPAB-aktivierten cAMP/PKA-Netzwerk ein PKA-unabhängiger Signalweg existiert, der ebenfalls von GPAB aktiviert wird und die *pksP*-Expression beeinflusst. Durch Supplementation des Mediums mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX ließ sich die *pksP*_P-*lacZ*-Expression im Wildtyp-Stamm und der $\Delta gpaB$ -Mutante deutlich steigern, weil der intrazelluläre cAMP-Spiegel konstitutiv erhöht wurde. Überraschenderweise war eine Steigerung der *pksP*_P-*lacZ*-Expression aber auch bei beiden $\Delta pkaCI$ -Mutanten nach IBMX-Zugabe zu beobachten. Im Falle einer *pkaCI*-Deletion fehlt die katalytisch aktive Untereinheit des Effektorproteins, welches auf erhöhte cAMP-Spiegel mit verstärkter Aktivität reagieren kann. Deshalb sollte die IBMX-Zugabe dann keine Rolle mehr spielen. Eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen könnte sein, daß es noch andere Zielproteine für cAMP gibt, die in die *pksP*-Expression involviert sind. IBMX könnte aber auch unspezifisch auf andere Proteine wirken oder eine Stressreaktion hervorrufen, welche möglicherweise zur Aktivierung der *pksP*-Expression führt.

Verschiedene Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, daß PKSP und die DHN-Melaninbildung für eine Verteidigung von *A. fumigatus* gegen die Angriffe des Immunsystems wichtig sein könnten (zusammengefaßt in: Langfelder et al. 2003, Brakhage und Jahn 2002). Makrophagen, welche in der Lunge als erstes Kontakt mit inhalierten *A. fumigatus*

Konidien haben, töten phagozytierte Antigene ab, um sie anschließend abzubauen. Phagozytierte Erreger müssen, wenn sie diese Passage überleben wollen, demnach in der Lage sein, sich gegen den Angriff zu verteidigen. Bei *A. fumigatus* könnte dies z.B. durch eine DHN-Melaninproduktion geschehen, in welche die Polyketid-Synthase PKSP involviert ist. *A. fumigatus* Wildtyp-Konidien zeigten gegenüber ROS eine 10- bis 20-fach gesteigerte Resistenz verglichen mit Konidien einer *pksP*-Mutante (Jahn et al. 1997, 2000). DHN-Melanin scheint demnach in der Lage zu sein, Sauerstoffradikale zu detoxifizieren. Außerdem werden Konidien der *A. fumigatus pksP*-Mutante effizienter als Wildtyp-Konidien durch Makrophagen abgetötet, wobei PKSP für eine Inhibierung der Phagolysosomenfusion verantwortlich zu sein scheint (Jahn et al. 2002). Eine Phagolysosomenfusion ist für den effizienten Abbau der Konidien innerhalb von Makrophagen notwendig. Konidien von cAMP-Signaltransduktionsmutanten werden, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenfalls effizienter durch Makrophagen abgetötet als Wildtyp-Konidien. Weiterhin wird die Expression der *A. fumigatus* Virulenzdeterminante *pksP* durch cAMP reguliert. Diese Ergebnisse implizieren, daß die verringerte *pksP*-Expression wenigstens teilweise für die höhere Abtötungsrate der Mutantenkonidien verantwortlich ist.

Einen weiteren wichtigen Hinweis darauf, daß die cAMP-Signaltransduktion die Virulenz von *A. fumigatus* steuert, konnte durch die *in vivo*-Testung von $\Delta gpaB$ -, $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Mutanten im Mausinfektionsmodell erhalten werden. Die Gendelektionen führten zu drastisch reduzierter Virulenz der entsprechenden Stämme. Dieses Ergebnis stimmt mit den für die $\Delta gpaB$ - und $\Delta acyA$ -Mutanten in Makrophagenversuchen erhaltenen *in vitro*-Daten überein. Für die $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Mutanten kann nicht ausgeschlossen werden, daß die attenuierte Virulenz auf eine verzögerte Konidienkeimung bzw. ein reduziertes Wachstum zurückzuführen ist. Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Adenylatzyklase-Mutanten von *C. albicans* und *M. grisea* gemacht, welche ebenfalls eine deutlich verminderte Virulenz aufwiesen (Rocha et al. 2001, Adachi und Hamer 1998). Ebenso zeigten Mutanten katalytischer PKA-Untereinheiten in *C. neoformans* und *U. maydis* Wachstumsdefekte, die eventuell zur attenuierten Virulenz der Stämme beitrugen (D'Souza et al. 2001, Dürrenberger et al. 1998). In *A. fumigatus* wird die Virulenzdeterminante *pksP* durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert und die verringerte *pksP*-Expression, wie sie hier für die $\Delta pkaC1$ -Mutante gezeigt wurde, könnte für eine bessere Abtötung der Mutanten im Tiermodell verantwortlich sein. Der $\Delta gpaB$ -Stamm exprimiert eine *pksP_P-lacZ*-Genfusion auch vermindert, zeigt im Gegensatz zur $\Delta pkaC1$ -Mutante aber keine Wachstumsreduktion. Trotzdem war seine Virulenz, wie hier gezeigt, deutlich attenuiert. Mittels einer *pksP_P-egfp*-Fusion konnte nachgewiesen werden,

daß es zu einer *pksP*-Expression während der Keimung von *A. fumigatus* Konidien in den Lungen von Versuchstieren kommt (Langfelder et al. 2001). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß DHN-Melanin oder Zwischenprodukte der DHN-Melaninbiosynthese zum Schutz vor dem Wirtsimmunsystem oder zur Immunsuppression des Wirtes gebildet werden, um ein Pilzwachstum zu ermöglichen.

Auch bei anderen humanpathogenen Pilzen wiesen cAMP-Signaltransduktionsmutanten eine deutlich reduzierte Virulenz auf bzw. waren avirulent. *C. neoformans*-Mutanten der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit GPA1 sowie der katalytischen PKA-Untereinheit PKA1 konnten zwei bekannte Virulenzfaktoren, DOPA-Melanin und Kapselbildung, nicht mehr induzieren. Beide Mutanten waren in verschiedenen Tiermodellen avirulent (Alspaugh et al. 1997, D'Souza et al. 2001). In Übereinstimmung damit zeigte eine Mutante der regulatorischen PKA-Untereinheit PKR1, welche eine konstitutiv aktive Signalweiterleitung aufweist, eine gesteigerte Virulenz und bildete eine dickere Kapsel als Wildtyp-Zellen (D'Souza et al. 2001). In *C. albicans* stellt die phänotypische Umstellung von Hefe- auf Hyphenwachstum einen wichtigen Virulenzfaktor dar. Deletionen der *C. albicans* Adenylatzyklase und der katalytischen PKA-Untereinheit TPK2 führten zu starken Einschränkungen bzw. zum Verlust dieser Fähigkeit, was eine deutlich reduzierte Virulenz zur Folge hatte (Rocha et al. 2001, Sonneborn et al. 2000). In pflanzenpathogenen Pilzen wie *U. maydis* und *M. grisea* führte die Inaktivierung von Genen für $G\alpha$ -Untereinheiten, die Adenylatzyklase und katalytische PKA-Untereinheiten zum Verlust bzw. zur Reduktion der Fähigkeit, eine Erkrankung der Wirtspflanzen zu induzieren (Regenfelder et al. 1997, Liu und Dean 1997, Gold et al. 1994, Dürrenberger et al. 1998, Mitchell und Dean 1995).

4. Regulation der *pksP*-Expression über cAMP und Stress

Durch Analyse einer *pksP_P-lacZ*-Fusion konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die *A. fumigatus* Virulenzdeterminante *pksP* durch cAMP reguliert wird. K. Langfelder (2001) konnte im Promotor des *pksP*-Gens neben anderen potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen zwei konservierte Sequenzmotive identifizieren, die möglicherweise auf eine Stress- oder cAMP-abhängige *pksP*-Expressionsregulation hindeuten. Diese mit STRE (5'-AGGGG-3') und SSA3 (5'-TCCCTAA-3') bezeichneten Sequenzmotive wurden innerhalb der *pksP_P-lacZ*-Fusion mutiert und in Einzelkopie in den chromosomalen *A. fumigatus pyrG*-Locus integriert. Die Analyse zeigte, daß unter standardisierten Wachstumsbedingungen lediglich die STRE-Mutation einen Effekt auf die *pksP_P-lacZ*-Expression im Vergleich zum nicht mutierten *pksP*-Promotor hatte. Erhöhte Expressionsraten im Δ STRE-Stamm könnten

auf eine STRE-vermittelte Repression der *pksP*-Expression unter den gewählten Bedingungen hindeuten. ROS-Stress, wie er durch Zugabe von Paraquat oder H₂O₂ zu den Kulturen induziert wird, hatte im Wildtyp-Stamm keine Steigerung der *pksP*-Expression zur Folge. Möglicherweise unterscheiden sich die hier gewählten artifiziellen Kulturbedingungen aber zu stark von der Situation, die vorherrscht, wenn *A. fumigatus* im Organismus auf den Angriff von Immuneffektorzellen reagieren muß. Philippe et al. (2003) konnten nachweisen, daß die Bildung von ROS eine Voraussetzung für die Abtötung von *A. fumigatus*-Konidien in Maus-Alveolarmakrophagen ist. Die Tatsache, daß Konidien einer *pksP*-Mutante 10- bis 20-fach empfindlicher gegenüber ROS sind als Wildtyp-Konidien (Jahn et al. 1997, 2000), impliziert, daß die *pksP*-Expression eine Rolle bei der Detoxifizierung von ROS haben könnte. Möglicherweise war diese aber mit der Messung der *pksP*_P-*lacZ*-Expression unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen nicht nachweisbar. Im Δ STRE-Stamm konnte nach Paraquat-Supplementation eine etwa 30%-ige *pksP*-Expressionssteigerung gemessen werden, welche ebenfalls auf eine STRE-vermittelte Repression der *pksP*-Expression schließen lassen könnte. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen, welche nach Untersuchungen der STRE-vermittelten multiplen Stressantwort in *S. cerevisiae* erhalten wurden. Die *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p binden an STRE-Elemente und induzieren durch Transkriptionsaktivierung die Antwort auf verschiedene Stressbedingungen, u.a. Hitzeschock oder oxidativen Stress (Martinez-Pastor et al. 1996). Solche Bedingungen könnten auch für *A. fumigatus* eine Rolle spielen, wenn der Pilz in einem immunsupprimierten Wirt wächst. Der Pilz wäre dann einer erhöhten Wachstumstemperatur oder dem Angriff von Immuneffektorzellen mit ROS ausgesetzt. Gene, deren Expression in *S. cerevisiae* über STRE-Sequenzen reguliert werden, kodieren für Proteine mit unterschiedlichen zellulären Funktionen. Sie sind in Signaltransduktionsprozesse oder in metabolische Abläufe, aber auch in die zelluläre Proteinsortierung involviert (Moskvina et al. 1998). Bei der Durchmusterung der Genomsequenz unter Verwendung der Msn2p- bzw. Msn4p-Sequenzen als Sonde, konnten bis heute keine homologen Komponenten für *A. fumigatus* identifiziert werden (H. Tappe, pers. Mitteilung). Deshalb kann angenommen werden, daß die Regulation einer Stress-Antwort, welche eventuell auch die *pksP*-Expression mit einbezieht, in *A. fumigatus* nicht über ein *S. cerevisiae* homologes MSN2/MSN4-System vermittelt wird. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß eine STRE-vermittelte Hitzeschockreaktion negativ über den RAS-cAMP-Signalweg reguliert wird (Marchler et al. 1993). Weiterhin konnten Görner et al. (2002) nachweisen, daß der Msn2p-Transkriptionsfaktor direkt von der cAMP-abhängigen PKA durch Phosphorylierung inhibiert wird. In *A. fumigatus* könnte eine Verknüpfung von Stressregulation und cAMP-

abhängiger Signalweiterleitung auch auf Ebene der PKA stattfinden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, weisen die Promotorsequenzen der Gene *pkaR* und *pkaC1*, welche für die regulatorische und eine katalytische PKA-Untereinheit kodieren, jeweils mehrere STRE-Sequenzmotive auf. Dieses gehäufte Auftreten von STRE-Elementen deutet möglicherweise auf eine Transkriptionsregulation der entsprechenden Gene unter Stressbedingungen hin. Da das PKA-Holoenzym im stöchiometrischen Verhältnis von 2:2 aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten aufgebaut ist, könnte die gleichmäßig hohe Expression beider Komponenten, reguliert über eine ähnliche Anzahl an STRE-Elementen, einen sinnvollen Regulationsmechanismus darstellen. Demnach würde eine stressabhängige Expressionsregulation des *pkaC2*-Gens sehr reduziert stattfinden, da der *pkaC2*-Promotor nur ein STRE-Sequenzmotiv aufweist. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Hinweis darauf, daß das *pkaC2*-Gen eine im Vergleich zu *pkaC1* völlig andere zelluläre Funktion erfüllt oder keine katalytisch aktive Untereinheit der PKA kodiert. Das Auftreten mehrerer STRE-Sequenzmotive wurde ebenfalls für die homologen Gene *pkaR* und *pkaC* aus *A. niger* beschrieben (Staudohar et al. 2002). Möglicherweise wird die Signalweiterleitung und damit die Aktivierung oder Repression von Effektoren in filamentösen Pilzen über die stressregulierte Expression der PKA-Untereinheiten beeinflusst. Die Funktionalität der *A. fumigatus* STRE-Elemente könnte durch Reporteranalysen der jeweiligen Promotoren, z.B. mit β -Galaktosidase-Fusionen, in Msn2p- oder Msn4p-überexprimierenden *S. cerevisiae* Stämmen getestet werden. Damit wäre eventuell nachweisbar, ob es nach Bindung von Msn2p oder Msn4p an die unveränderten oder auch mutierten STRE-Elemente zu einer Transkriptionsaktivierung von *pkaR* und *pkaC1* kommt.

Bei dem in dieser Arbeit mit SSA3 bezeichneten Sequenzmotiv handelt es sich um ein Element, welches im Promotor des *S. cerevisiae* *SSA3*-Gens identifiziert wurde. Das *SSA3*-Gen kodiert für ein Hsp70-Hitzeschockprotein. Boorstein und Craig (1990) wiesen nach, daß eine cAMP-abhängige Expressionsregulation von *SSA3* über dieses Promotorelement erfolgt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß es weder unter standardisierten Wachstumsbedingungen noch nach IBMX-Supplementation zu einer signifikanten Veränderung der *pksP*-Expression des Δ SSA3-Stammes im Vergleich zum Wildtyp kam. Dies gibt Grund zu der Annahme, daß das SSA3-Sequenzmotiv keine Rolle bei einer cAMP-regulierten *pksP*-Expression in *A. fumigatus* spielt. Wie schon erläutert scheint IBMX auch einen unspezifischen Einfluß auf die *pksP*-Expression zu haben. Es könnte demnach sein, daß geringere Expressionsunterschiede nach Mutation der potentiellen regulatorischen Sequenzen nicht feststellbar waren.

Die inhalative Aufnahme von *A. fumigatus* Konidien über die Atemwege und eine beginnende Auskeimung in der Lunge könnte eine Adaptation des Pilzwachstums an die physiologische Körpertemperatur von etwa 37 °C erfordern. Langfelder et al. (2001) konnten zeigen, daß die *pksP*-Virulenzdeterminante auch exprimiert wird, wenn *A. fumigatus* Konidien in den Lungen infizierter Mäuse keimen. Eine Erhöhung der Wachstumstemperatur auf 37 °C könnte demnach auch ein Signal zur Aktivierung der *pksP*-Expression darstellen. Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichten, daß ein Umsetzen der Kulturen von 28 °C auf 37 °C nicht zur Steigerung der *pksP*-*lacZ*-Expression führte. Die untersuchten Stämme zeigten sogar eine signifikant höhere Expression bei 28 °C, was dafür spricht, daß die *pksP*-Virulenzdeterminante durch eine Temperaturerhöhung eher reprimiert wird.

5. cAMP-Signaltransduktion und Melaninbildung

Eine Reihe von Studien belegt, daß die Biosynthese von DHN-Melanin in *A. fumigatus* eine wichtige Voraussetzung für die Virulenz ist (Jahn et al. 1997, Langfelder et al. 1998, Tsai et al. 1998). In dieser Arbeit wurde bewiesen, daß die *A. fumigatus* Polyketid-Synthase PKSP, welche den initialen Schritt der DHN-Melaninbiosynthese katalysiert, durch die cAMP-Signaltransduktion reguliert wird. Für einige andere Pilze, z.B. *M. grisea*, *C. lagenarium*, *Alternaria alternata*, *W. dermatitidis* oder *S. schenkii* konnte gezeigt werden, daß DHN-Melanin eine wichtige Virulenzdeterminante ist (Howard und Valent 1996, Takano et al. 1997, Dixon et al. 1987, Romero-Martinez et al. 2000). Dies führt zu der Frage, ob die Expression von Genen für die Melaninbiosynthese und deren mögliche cAMP-abhängige Regulation ein genereller Mechanismus ist, der pilzliche Krankheitserreger vor den Verteidigungsmechanismen des Wirtes schützt (zur Übersicht: Langfelder et al. 2003). In *M. grisea* ist DHN-Melanin für die Bildung von Infektionsstrukturen essentiell, welche als Appressorien bezeichnet werden. Dabei verleiht Melanin den Appressorienzellwänden eine hohe Festigkeit. Ohne DHN-Melanin wäre ein Appressorium nicht in der Lage, dem hohen Druck zu widerstehen, der notwendig ist, um die pflanzliche Zellwand zu durchbrechen und damit den Wirt zu infizieren (Howard und Valent 1996). *M. grisea*-Stämme, die kein DHN-Melanin bzw. keine Appressorien bilden, sind apathogen. Interessanterweise wird die Appressorienbildung in *M. grisea* durch cAMP reguliert. Mutanten der Adenylatzyklase (MAC1) und der G α -Untereinheit (MAGB) zeigen Defekte in der Appressorienbildung, welche durch Zugabe von cAMP komplementiert werden können (Choi und Dean 1997, Liu und Dean 1997). Stämme, die eine Deletion des Gens *cpkA* aufwiesen, welches eine katalytische PKA-Untereinheit kodiert, waren nicht mehr in der Lage, Appressorien zu formen (Mitchell und Dean 1995). Im Gegensatz

zum pflanzenpathogenen *M. grisea* ist beim humanpathogenen *C. neoformans* DOPA-Melanin wichtig für die Virulenz. Melanisierte Zellen sind resistenter gegen Phagozytose und weniger empfindlich gegenüber Sauerstoff- und Stickstoffradikalen als nicht melanisierte (Wang et al. 1995). Die DOPA-Melaninbildung wird in *C. neoformans* auch durch die cAMP-Signaltransduktionskaskade gesteuert. Deletionen von Genen, welche für die $G\alpha$ -Untereinheit GPA1 bzw. die katalytische PKA-Untereinheit PKA1 kodieren, resultierten in deutlichen Melanisierungsdefekten der Zellen (Alspaugh et al. 1997, D'Souza et al. 2001). Kolonien der $\Delta gpa1$ -Mutante zeigten nach cAMP-Zugabe bzw. Deletion der regulatorischen PKA-Untereinheit ($\Delta pkr1$), welche zu konstitutiv aktiver PKA-Signalweiterleitung führt, wieder eine normale Melaninbildung (D'Souza et al. 2001). $\Delta pka1$ -Stämme konnten auf diese Weise nicht komplementiert werden, da PKA1 im Signalweg nach GPA1 und PKR1 funktionell aktiv ist. Wie in dieser Arbeit dargestellt, zeigen *A. fumigatus* $\Delta gpaB$ - und $\Delta pkaC1$ -Mutanten eine reduzierte Expression des Polyketid-Synthasegens *pksP*. Demnach scheinen Signaltransduktionsprozesse, die eine Expression von Genen der DHN-Melaninbiosynthese in *A. fumigatus* steuern, den in *C. neoformans* beschriebenen Mechanismen ähnlich zu sein. Ebenso könnte ein Melanin vom DOPA-Typ auch in *A. fumigatus* eine weitere Rolle für die Virulenz spielen. Beobachtungen, daß eine *pksP*-Mutante, welche kein DHN-Melanin mehr produzieren kann, zwar attenuiert virulent aber nicht avirulent ist, stützen diese Annahme (Langfelder 2001).

In *C. neoformans* und *A. fumigatus* scheinen hohe cAMP-Spiegel oder eine aktivierte cAMP-Kaskade die Melaninbildung oder eine Expression von Genen, welche wichtig für die Biosynthese von Melaninen sind, zu induzieren. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen, die im pflanzenpathogenen Pilz *U. hordei* gemacht wurden. Dieser produziert Teliosporen, die ebenfalls ein melaninähnliches Pigment enthalten. Durch Zugabe von cAMP oder IBMX sowie durch die Überproduktion der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit FIL1 wird bei *U. hordei* die Pigmentbildung reprimiert, was auf eine negative Regulation der Melaninbiosynthese durch die cAMP-Signaltransduktion schließen läßt (Lichter und Mills 1997, 1998). Die humanpathogenen Pilze *W. dermatitidis* und *S. schenkii* synthetisieren ebenfalls DHN-Melanin, was für ihre Virulenz wichtig ist. Wie auch bei *A. fumigatus* (Jahn et al. 1997) scheint DHN-Melanin bei *W. dermatitidis* in der Lage zu sein, ROS zu detoxifizieren (Wheeler und Bell 1988). Außerdem stellt DHN-Melanin anscheinend einen Phagozytoseschutz dar, da Mutanten, welche Defekte in der Melaninbiosynthese aufweisen, effizienter durch humane Monozyten phagozytiert werden (Wheeler und Bell 1988, Romero-Martinez et al. 2000). In Analogie zu *C. neoformans*, *M. grisea* oder *A. fumigatus* bleibt eine mögliche Klärung der Frage abzuwarten, ob cAMP

auch bei *W. dermatitidis* und *S. schenkii* in die Regulation der Melaninbiosynthese involviert ist.

6. Interaktion zwischen Pilz und Immunsystem

Um den Organismus vor einer systemischen *A. fumigatus* Infektion zu schützen, muß das Wirtsimmunsystem auf das Eindringen und die Keimung von *A. fumigatus* Konidien adäquat reagieren können. Dabei sind mit den Alveolarmakrophagen und den neutrophilen Granulozyten zwei Zellpopulationen besonders wichtig. Alveolarmakrophagen haben in der Lunge als erste Kontakt mit *A. fumigatus* Konidien. Nach deren Phagozytose ist ein Schwellen der Konidien verbunden mit metabolischer Aktivierung Voraussetzung für die effiziente Bekämpfung innerhalb von Makrophagen (Schaffner 1994). Die Deletion der *A. fumigatus* Adenylatzyklase scheint zu einer Verzögerung von Konidienschwellung und beginnender Stoffwechsellaktivität zu führen, da Konidien der ΔcyA -Mutante, wie in dieser Arbeit gezeigt, erst nach Verlängerung des Inkubationszeitraums effizient abgetötet wurden. Phillippe et al. (2003) konnten nachweisen, daß eine Hemmung der Makrophagen-NADPH-Oxidase von Mäusen die Konidienkeimung ermöglicht. Diese Beobachtung zeigt, daß ROS eine wichtige Rolle in der antikonidialen Makrophagenaktivität spielen. Dagegen beobachteten Schaffner et al. (1983), daß humane Makrophagen, welche nicht mehr in der Lage waren, ROS zu bilden, immer noch in der Lage sind, Konidien abzutöten, was auf zusätzliche Mechanismen von Makrophagen gegen Konidien schließen läßt. Die immunsuppressive Behandlung von Mäusen mit Glukocortikoiden, wie z.B. Cortisonacetat, führt zu einer Reduktion der ROS-Produktion, wodurch eine Konidienkeimung in Maus-Alveolarmakrophagen ermöglicht wird (Philippe et al. 2003). Neutrophile Granulozyten sind ebenfalls in der Lage, Konidien aufzunehmen und abzutöten, falls diese dem Makrophagenangriff entgangen sind (Sturtevant und Latgé 1992). Ihre Hauptaufgabe besteht allerdings in der Bekämpfung von Pilzhyphen, welche für eine Phagozytose zu groß sind. Dabei führt ein Angriff aus ROS kombiniert mit der Entleerung von Granulainhalten zur Schädigung der Pilzhyphen (Levitz et al. 1986). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Infektion immunsupprimierter Mäuse mit *A. fumigatus* Wildtyp-Konidien zu einem signifikanten Anstieg der Zahl neutrophiler Granulozyten in der Lunge führte. Dieser ist wahrscheinlich auf eine akute Entzündungsreaktion zurückzuführen. Makrophagen sind nach unspezifischer Phagozytose, welche zu ihrer Aktivierung führt, in der Lage, Mediatoren der akuten Entzündungsreaktion zu induzieren. Diese aktivieren neutrophile Granulozyten, erhöhen die Gefäßpermeabilität oder führen zur Bildung von Adhäsionsmolekülen an den Gefäßwänden. Letztlich resultieren diese Prozesse in einer Rekrutie-

rung der neutrophilen Granulozyten am Ort des Antigenkontaktes. Chu et al. (1996) beobachteten in frühen Stadien der murinen pulmonalen Aspergillose eine gesteigerte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α , welche außerdem mit einer Hochregulation des interzellulären Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 assoziiert war. Infektionen mit *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsstämmen bzw. einer Lysin-auxotrophen Mutante führten, wie in dieser Arbeit gezeigt, nur zu gering gesteigerten Granulozytenzahlen. Dies könnte an der relativ kurzen Lebensdauer neutrophiler Granulozyten liegen. Da die meisten Versuchstiere die Infektion mit den *A. fumigatus*-Mutanten jedoch bis zum Versuchsende (Tag 15) überlebten, und die BAL erst am Ende durchgeführt wurde, ist anzunehmen, daß nur noch ein Teil der Granulozyten zu detektieren war. Nach einer Wildtyp-Infektion erkrankten die Mäuse dagegen schon deutlich eher (Tag 3-9). Demzufolge war die Chance, aus den Lungen dieser Tiere neutrophile Granulozyten der akuten Entzündungsreaktion zu isolieren, deutlich besser. Um das Entzündungsgeschehen nach Infektion mit Wildtyp-Konidien im Vergleich mit Mutanten genauer zu untersuchen, müßte die BAL-Zusammensetzung zu definierten Zeitpunkten unabhängig vom Erkrankungsphänotyp der Versuchstiere bestimmt werden. Außerdem wäre die Bestimmung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukinen oder Interferonen, im Serum infizierter Versuchstiere eine Möglichkeit, weitere Anhaltspunkte über die Immunreaktion nach Infektion mit *A. fumigatus*-Stämmen zu gewinnen.

Die mit der Aktivität der Polyketid-Synthase PKSP verknüpfte DHN-Melaninbildung scheint für die Interaktion von *A. fumigatus* mit dem Wirtsimmunsystem von Bedeutung zu sein. Das Vorhandensein eines funktionalen *pksP*-Gens inhibiert in Makrophagen die Fusion von Lysosomen mit Konidien-enthaltenden Phagosomen (Jahn et al 2002). Durch die Ansäuerung des Phagolysosoms können die Konidien dann abgetötet werden (Ibrahim-Granet et al. 2003). Untersuchungen in *C. neoformans* ergaben, daß DOPA-Melanin die TNF α -Produktion und die Lymphoproliferation inhibieren könnte (Huffnagle et al. 1995). Dies würde zu einer deutlichen Reduktion der Immunantwort des Wirtes führen, da TNF α ein zentrales Molekül der T-Zell-vermittelten Entzündungsantwort ist, welche auch zur Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt. In *C. neoformans* wird die DOPA-Melaninproduktion durch cAMP reguliert (D'Souza und Heitman 2001). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist cAMP auch für die *A. fumigatus* *pksP*-Expression wichtig. Möglicherweise ist die verringerte Virulenz von *A. fumigatus* cAMP-Signaltransduktionsmutanten im Makrophagen-Assay und im Tiermodell auf eine reduzierte Melaninbildung und damit bessere Erkennung bzw. Angreifbarkeit während der Interaktion mit Immuneffektorzellen zurückzuführen. Tsai et al. (1998) zeigten, daß Konidien der *pksP*-Mutante den Komplementfaktor C3 deutlich besser binden als Wild-

typ-Konidien. Dies könnte in der glatten Oberfläche der Mutanten-Konidien begründet sein, während die Oberflächen von Wildtyp-Konidien eine stark ornamentierte Struktur aufweisen (Jahn et al. 1997, Tsai et al. 1998). Die bessere Komplementbindung ist wahrscheinlich für eine gesteigerte Phagozytose der *pksP*-Mutantenkonidien durch humane Makrophagen bzw. neutrophile Granulozyten verantwortlich (Jahn et al. 2002, Tsai et al. 1998). Inwieweit das Komplementsystem wirklich eine Rolle bei der Opsonierung von *A. fumigatus* Konidien für Immuneffektorzellen spielt ist fraglich, da der Alveolarraum, in dem die erste Interaktion zwischen Pilz und Immunsystem stattfindet, wahrscheinlich frei von opsonierenden Komplementfaktoren ist (Latgé 1999). Ein funktionales *pksP*-Gen ist für die Oberflächenstruktur der Konidien von Bedeutung. Da die *pksP*-Expression, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch cAMP reguliert wird, liegt die Annahme nahe, daß die cAMP-Signaltransduktion möglicherweise auch bei der Ausbildung von intakten Konidien- und Myzeloberflächenstrukturen eine Rolle spielt. Eine Analyse der Zellwandzusammensetzung bzw. der Konidienoberfläche der *A. fumigatus* $\Delta gpaB$ -, $\Delta acyA$ - und $\Delta pkaC1$ -Mutanten wäre in diesem Zusammenhang ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Arbeiten.

Die mRNA-Expression des *A. fumigatus* *pkaR*-Gens wird während des Pilzwachstums im Kontakt mit Endothelzellen hochreguliert (Rhodes et al. 2001). Die gleiche Beobachtung konnte für *pkaR*, aber auch für das *pkaC*-Gen (= *pkaC1*) gemacht werden, wenn *A. fumigatus* in Co-Kultur mit Alveolarendothelzellen wuchs (Oliver et al. 2001). Diese Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, daß die cAMP-Kaskade angeschaltet wird, wenn *A. fumigatus* in Interaktion mit dem Wirtsimmunsystem tritt. Die Suche nach den Signalen, welche dabei zur Aktivierung der cAMP-Signaltransduktion führen bzw. nach Effektorgenen der PKA, die für die Virulenz von *A. fumigatus* von Bedeutung sein könnten, stellt diesbezüglich eine der wichtigsten und in der Zukunft interessantesten Aufgaben dar.

7. Eingangssignale und Effektoren der cAMP-Signaltransduktion

Die Suche nach Eingangssignalen der cAMP-Sinalkaskade in Pilzen führte bis heute vor allem zur Aufdeckung stoffwechselphysiologischer bzw. entwicklungsbiologisch relevanter Zusammenhänge. In *S. cerevisiae* konnte der Rezeptor Gpr1p identifiziert werden, welcher mit der $G\alpha_{(s)}$ -Untereinheit Gpa2p interagiert und eine wichtige Rolle für das vegetative Wachstum spielt (Yun et al. 1997, Xue et al. 1998). Die Zugabe von Glukose zu hungrigen Hefezellen führt vorübergehend zu einem Gpr1p/Gpa2p-vermittelten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels (Thevelein und de Winde 1999). Auch die Ansäuerung des intrazellulären Milieus führt zur Ras2p-vermittelten Aktivierung der *S. cerevisiae* Adenylatzyklase-

Aktivität, welche aber in länger erhöhten cAMP-Spiegeln resultiert (Kraakman et al. 1999). Stoffwechselphysiologische Untersuchungen lassen darauf schließen, daß auch *A. fumigatus* der Kohlenstoff-Kataboliten-Repression unterliegt und daß Glukose selbst bzw. die intrazelluläre Ansäuerung nach Glukosemetabolisierung zur Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges führt (Oliver et al. 2002). Ein Gpr1p-homologer Rezeptor konnte in *A. fumigatus* bislang allerdings noch nicht identifiziert werden. Die Isolierung und Charakterisierung des RAS-verwandten Proteins RHBA in *A. fumigatus*, welches zur Rheb-Familie gehört, wurde von Rhodes et al. (2001) und Panepinto et al. (2003) beschrieben. Die *rhbA*-Expression wird in Co-Kultur mit Endothelzellen hochreguliert (Rhodes et al. 2001) und eine *rhbA*-Deletion führt zu attenuierter Virulenz im Tiermodell (Panepinto et al. 2003). Im Gegensatz zum Wachstum auf Ammonium zeigte eine $\Delta rhbA$ -Mutante beeinträchtigt Wachstum auf schlechter verwertbaren Stickstoff-Quellen (Panepinto et al. 2003). Dies scheint darauf hinzuweisen, daß *rhbA* in Prozesse involviert ist, die für die Erkennung und Reaktion auf veränderte Nähstoffbedingungen wichtig sind. Möglicherweise ist RHBA in Homologie zu Ras2p aus *S. cerevisiae* auch in der Lage, mit dem cAMP-Weg zu interagieren.

Die aktive Erkennung des Wirtsorganismus könnte eine wichtige Voraussetzung für die pathogene Entwicklung pilzlicher Krankheitserreger darstellen. Im pflanzenpathogenen *M. grisea* wurde ein Transmembranrezeptor (PTH11) identifiziert, welcher in die Erkennung der Wirtsoberfläche involviert ist und dessen Deletion aufgrund von Appressoriendefekten zum Verlust der Pathogenität führt (DeZwaan et al. 1999). Wahrscheinlich aktiviert PTH11 in Abhängigkeit von verschiedenen Kontaktflächen Signalprozesse, welche die Appressoriendifferenzierung regulieren. Auch für *A. fumigatus* könnten verschiedene Rezeptoren bei der Erkennung von Wirtsstrukturen oder Nährstoffbedingungen eine Rolle spielen. Die Analyse der *A. fumigatus* Genomsequenz im Bezug auf relevante Rezeptorgene sowie deren Charakterisierung könnte ein interessantes Projekt zukünftiger Arbeiten darstellen. So ist es durchaus vorstellbar, daß Eingangssignale wie wirtsspezifische, niedermolekulare Serumfaktoren, das Vorhandensein bestimmter Nährstoffe oder Temperaturunterschiede Signaltransduktionsprozesse wie die cAMP-Kaskade aktivieren, welche dann in die Regulation von Virulenzdeterminanten münden. Durch experimentelle Ansätze wie „Two Hybrid“-Assays wäre es möglich, Rezeptoren oder andere Proteine als Interaktionspartner der G α -Untereinheiten GPAA und GPAB zu identifizieren und somit näheres über die Eingangssignale der cAMP-Signaltransduktion in *A. fumigatus* zu erfahren.

Die Suche nach Effektoren der cAMP-Signaltransduktion stellt im Bezug auf die Virulenz von *A. fumigatus* eine weitere wichtige Aufgabe dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden,

daß die *pksP*-Virulenzdeterminante durch cAMP reguliert wird. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu erfahren, ob andere in die Melaninbiosynthese involvierte Komponenten, die im selben Gencluster wie *pksP* lokalisiert sind, auch einer cAMP-abhängigen Expression unterliegen. Durch Proteom-Analysen, bei denen die Proteinproduktion im Wildtyp mit der in den cAMP-Signaltransduktionsmutanten verglichen wird, könnten möglicherweise weitere Effektoren des cAMP-Weges identifiziert werden. Erweitern könnte man diesen experimentellen Versuchsansatz, in dem man die Stämme unter verschiedenen Bedingungen wachsen ließe, welche potentielle Virulenzdeterminanten eventuell induzieren. Dies kann vielleicht durch Zugabe von humanem Serum zu den Kulturen oder aber durch Co-Kultur mit humanen Epithelzellen, Makrophagen oder Granulozyten erreicht werden. Aufgrund der teilweise stark beeinflussten Wachstumseigenschaften der in dieser Arbeit charakterisierten Mutanten, wäre die Untersuchung der Δ *gpaB*-Stämme wohl am aussichtsreichsten. Diese zeigen eine relativ normale Entwicklung und sind trotzdem deutlich attenuiert virulent. Möglicherweise sind bei den Δ *gpaB*-Mutanten daher eher virulenzspezifische und weniger stoffwechselphysiologische Vorgänge beeinflusst.

Durch phänotypische Charakterisierung bzw. Epistasie-Analysen von Mutanten konservierter Komponenten gelang es bisher bei zahlreichen Pilzen, die cAMP-Signaltransduktion und ihren Einfluß auf Wachstum, Entwicklung und Virulenz zu rekonstruieren (zur Übersicht: Lenggeler et al. 2000). In einigen Fällen war es bei human- und pflanzenpathogenen Vertretern möglich, Effektoren der cAMP/PKA-Signalweiterleitung nachzuweisen. So zeigten *C. albicans* Mutanten der katalytischen PKA-Untereinheit TPK2 sowie des Transkriptionsfaktors EFG1 ähnliche Wachstumsdefekte und eine reduzierte Virulenz (Stoldt et al. 1997, Lo et al. 1997, Sonneborn et al. 2000). Eine Überproduktion von EFG1 unterdrückte den Δ *tpk2*-Phänotyp, was darauf hindeutet, daß EFG1 ein Zielprotein der TPK2-Aktivität sein könnte (Sonneborn et al. 2000). In *C. neoformans* wird der Transkriptionsfaktor Ste12 α für die haploide Vermehrung, für Melanin- und Kapselbildung sowie in geringerem Anteil auch für die Paarung benötigt (Wickes et al. 1997, Yue et al. 1999, Chang et al. 2000). Ste12 α weist Konsensus-Sequenzen für eine PKA-Aktivierung auf und eine Überproduktion des Transkriptionsfaktors führt zur Unterdrückung des Paarungsdefektes eines Stammes mit Deletion der katalytischen PKA-Untereinheit PKA1 (D'Souza et al. 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß Ste12 α ein Zielprotein der *C. neoformans* PKA ist. In *U. maydis* wird eine koordinierte Regulation von Paarung und Virulenz über den Transkriptionsfaktor Prf1 vermittelt (Hartmann et al. 1996, 1999). Prf1 ist in die Regulation der Paarungstyp-abhängigen Genexpression involviert und stellt ein Zielprotein sowohl der cAMP-

Signaltransduktion als auch der MAP-Kinase-Kaskade dar (Hartmann et al. 1999). Wachstum und Entwicklung werden in mehreren Pilzen durch parallel agierende cAMP- und MAP-Kinase-Signaltransduktionsprozesse reguliert (Kronstad et al. 1998). Neben *U. maydis* (Krüger et al. 1998) kann auch die Virulenz anderer pathogener Pilze, wie *C. neoformans* und *C. albicans* (Lengeler et al. 2000) sowie *M. grisea* (Xu und Hamer 1996), durch beide Signalwege beeinflusst werden. Durch Analyse der Genomsequenz könnten auch Komponenten einer möglicherweise konservierten MAP-Kinase-Kaskade in *A. fumigatus* identifiziert und ein Zusammenhang mit cAMP-Signaltransduktion bzw. Virulenz untersucht werden.

8. Der alpha-Aminoadipat-Weg der Lysinbiosynthese als potentielles Ziel einer antimykotischen Therapie

A. fumigatus ist für etwa 90 % aller Erkrankungen an einer Invasiven Aspergillose (IA) verantwortlich. Zur Zeit sind sowohl spezifische diagnostische Mittel als auch therapeutische Eingriffsmöglichkeiten bei der IA sehr limitiert, weshalb diese Erkrankung mit einer hohen Sterblichkeitsrate von 30-98% verbunden ist (zur Übersicht: Denning 1998, Latgé 1999). Zur antimykotischen Behandlung wird hauptsächlich Amphotericin B eingesetzt. Allerdings ist eine Amphotericin B-Therapie oft mit schweren Nebenwirkungen, z.B. Nierenschäden verbunden. Demnach besteht ein großer Bedarf an der Identifizierung pilzspezifischer Angriffsziele, deren Inaktivierung zu keiner Schädigung des menschlichen Organismus führen sollte. Als mögliche Ziele bieten sich dabei Stoffwechselwege an, mit denen der Pilz für sich essentielle Substanzen synthetisiert. Der alpha-Aminoadipat-Weg der Lysinbiosynthese, welcher nicht in menschlichen Zellen vorkommt, stellt so ein potentielles Ziel antimykotischer Substanzen dar (Garrad und Bhattacharjee 1992, Tang et al. 1994). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte das *lysF*-Gen aus *A. fumigatus* isoliert und charakterisiert werden (Mühleisen 2001). Es kodiert ein homologes Protein der Homoaconitase LYSF aus *A. nidulans*. Das *A. nidulans* LYSF katalysiert die Umsetzung von Homocitrat über Homoaconitat zum Homoisocitrat im alpha-Aminoadipat-Weg der Lysinbiosynthese (Weidner 1998). Die Deletion des *A. fumigatus lysF*-Gens resultierte in der lysin-auxotrophen Mutante $\Delta lysF$ (entspricht TWM6, Mühleisen 2001). Die Lysin-Auxotrophie des Stammes $\Delta lysF$ konnte durch Zugabe von L-Lysin und alpha-Aminoadipat zum Medium komplementiert werden. Menschliche Zellen besitzen katabolische Enzyme, welche die essentielle Aminosäure L-Lysin zu alpha-Aminoadipat abbauen können (Fellows und Lewis 1973). Um eine Interaktion mit den humanen Stoffwechselprozessen zu vermeiden, sollten deswegen nur Enzyme des ersten Abschnitts der pilzspezifischen Lysin-Biosynthese bis zum alpha-Aminoadipat als potentielle antimyko-

tische Zielproteine in Frage kommen. Die Homoaconitase des alpha-Aminoacetyl-CoA-Weges von *A. fumigatus* katalysiert solch eine Reaktion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *lysF*-Deletion zu einer drastischen Reduktion der Virulenz von *A. fumigatus* führte. Die getestete Δ *lysF*-Mutante war fast avirulent. Trotzdem konnten aus den Lungen einiger Versuchstiere *A. fumigatus*-Kolonien isoliert werden, was darauf hindeutet, daß diese in der Lage waren, aus dem Gewebe freigesetztes oder endogen in den Konidien gespeichertes Lysin für ihr Wachstum zu nutzen. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann trotzdem geschlossen werden, daß sich die Homoaconitase LYSF aus *A. fumigatus* als potentielles Zielprotein eines zu entwickelnden selektiv inhibierenden Substratanalogons eignen würde.

A. nidulans ist für immunkompetente Menschen avirulent (Tang et al. 1994). Die intravenöse Applikation von $4 \cdot 10^6$ Konidien eines *A. nidulans* Wildtyp-Stammes führte trotzdem zum Tod von 70% der Versuchstiere. Eine Δ *lysF*-Mutante von *A. nidulans* hingegen war avirulent (Weidner 1998). Diese Beobachtung unterstreicht die Eignung von LYSF als Zielprotein einer antimykotischen Therapie, auch wenn sie das Ergebnis eines recht artifiziellen Testsystems war. Die i.v.-Applikation einer extrem hohen Sporenmenge bei nicht immunsupprimierten Mäusen entspricht nicht dem natürlichen Infektionsweg. Es ist anzunehmen, daß die intranasale Applikation von $5 \cdot 10^3$ oder 10^4 *A. nidulans* Wildtyp-Konidien selbst bei immunsupprimierten Tieren nicht zu Erkrankungen führen würde, und die bei Weidner (1998) beschriebene Virulenz von *A. nidulans* hauptsächlich auf die hohe Infektionsdosis und die schnelle systemische Verbreitung der Konidien über die Blutbahn zurückzuführen ist.

Für *A. fumigatus* wurden bislang auch andere Stoffwechselwege beschrieben, welche als Angriffspunkte selektiv wirkender Antimykotika dienen könnten. So führte die Mutation des *pabaA*-Gens zum kompletten Verlust der Fähigkeit, letale Infektionen in Versuchstieren hervorzurufen (Sandhu et al. 1976, Tang et al. 1994, Brown et al. 2000). *pabaA* kodiert für die *para*-Aminobenzoensäure-Synthase, welche einen späten Schritt der Folat-Biosynthese katalysiert. Die Avirulenz von Δ *pabaA*-Mutanten unterstreicht die Bedeutung des Folat-Syntheseweges für das Überleben von *A. fumigatus* im Wirtsorganismus (Brown et al. 2000). Auch die selektive Inhibierung des *A. fumigatus* Pyrimidin-Biosyntheseweges könnte für die Entwicklung pharmazeutischer Substanzen genutzt werden. So zeigten Uracil-auxotrophe Δ *pyrG*-Mutanten eine deutlich attenuierte Virulenz im Tiermodell, wofür scheinbar eine reduzierte Konidienkeimung verantwortlich ist (d'Enfert et al. 1996). Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, findet das eine OMP-Decarboxylase kodierende *pyrG*-Gen neben seiner Eignung als antimykotisches Zielprotein auch vielfältige Anwendung als Selektionsmarker für die homo-

loge Transformation von *A. fumigatus* (Weidner et al. 1998, d'Enfert 1996, Brakhage und Langfelder 2002).

Zusammenfassung

Die cAMP-Signaltransduktion stellt einen in Eukaryonten konservierten Mechanismus zur Signalweiterleitung dar. Unter den Pilzen gibt es zahlreiche Vertreter, bei denen eine Involvierung der Kaskade in die Regulation von morphogenetischen und stoffwechselfysiologischen, aber auch von virulenzspezifischen Prozessen nachgewiesen werden konnte. Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob der cAMP-Signalweg auch in dem opportunistisch humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* konserviert vorliegt und welche Rolle er möglicherweise bei der Kontrolle von Wachstum, Entwicklung und Virulenz in diesem Organismus spielt. Weiterhin sollte ein intranasales *A. fumigatus*-Mausinfektionsmodell etabliert und optimiert werden, um *in vivo* Virulenztestungen von *A. fumigatus*-Stämmen durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, eine konservierte cAMP-Signalkaskade in *A. fumigatus* nachzuweisen. Aus einer Genbank bzw. durch Analyse der gegen Ende der Arbeit vorliegenden *A. fumigatus* Genomsequenz konnten Gene isoliert werden, welche für zwei α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (*gpaA*, *gpaB*), die Adenylatzyklase (*acyA*), die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (*pkaR*) sowie zwei katalytische Untereinheiten der Proteinkinase A (*pkaC1*, *pkaC2*) kodieren. Die Gene *gpaB*, *acyA* und *pkaC1* wurden mittels verschiedener Selektionsmarker in unterschiedlichen *A. fumigatus*-Wildtypstämmen deletiert. *acyA*- und *pkaC1*-Deletionsstämme zeigten deutliche Defekte im Wachstum und in der Konidienbildung. *gpaB*-Deletionsstämme waren lediglich in der Konidienbildung beeinträchtigt. Die Δ *gpaB*- und Δ *acyA*-Pänotypen konnten durch cAMP-Zugabe supprimiert werden. Durch PKA-Aktivitätsmessungen und mit Hilfe von GFP-Reporteranalysen konnte gezeigt werden, daß das *pkaC1*-Gen eine katalytisch aktive PKA-Untereinheit darstellt, deren zytosolische Expression nicht durch Erhöhung des cAMP-Spiegels oder mittels Stressinduktion durch ROS („Reactive Oxygen Species“) gesteigert werden kann. Wie Δ *gpaB*- und Δ *acyA*-Mutanten zeigten *pkaC1*-Deletionsstämme keine PKA-Aktivität im Rohextrakt. Im Gegensatz zu den *pkaC1*-Deletionsstämmen konnte diese aber bei den Δ *gpaB*- und Δ *acyA*-Mutanten durch cAMP-Zugabe wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die cAMP-Signaltransduktion einen starken Einfluß auf Wachstum und Entwicklung von *A. fumigatus* ausübt. Weiterhin belegen sie, daß GPAB, ACYA und PKAC1 funktionell zusammenhängen. Während die cAMP synthetisierende Enzymaktivität der Adenylatzyklase ACYA neben der GPAB-Aktivierung offensichtlich auch von anderen Proteinen reguliert wird, scheint die PKAC1-Aktivität zwingend vom gebildeten cAMP abzuhängen. cAMP sollte

durch Bindung an die regulatorischen Untereinheiten zur Freisetzung der dann katalytisch aktiven PKA-Untereinheiten führen.

Die *A. fumigatus* Virulenzdeterminante *pksP* kodiert für eine Polyketid-Synthase, die in die Dihydroxynaphthol-Melaninbiosynthese involviert ist und deren Mutation zu deutlich attenuierter Virulenz des Pilzes führt. Die Analyse der *pksP*-*lacZ*-Expression in Myzelien von Δ *gpaB*- und Δ *pkaC1*-Mutanten zeigte, daß eine gestörte cAMP-Signaltransduktion zu reduzierter *pksP*-Expression führt. Dieses Ergebnis deutet auf eine cAMP-abhängige Regulation der *pksP*-Virulenzdeterminante hin. Im *pksP*-Promotor konnten putative STRE- und SSA3-Sequenzmotive identifiziert werden. Mutationsanalysen belegten, daß eine mögliche stress- oder cAMP-abhängige Transkriptionsregulation von *pksP* nicht über diese Elemente zu erfolgen scheint. Die Regulation von Stressreaktionen könnte in *A. fumigatus* hingegen über die Expression der PKA-Untereinheiten erfolgen, da in den Promotoren der *pkaR*- und *pkaC1*-Gene zahlreiche putative STRE-Boxen vorhanden sind.

Konidien der Δ *gpaB*- und Δ *acyA*-Mutanten wurden deutlich effizienter durch MDMs („Monocyte Derived Macrophages“) abgetötet als Wildtyp-Konidien. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die cAMP-Signaltransduktion für Verteidigungsmechanismen von *A. fumigatus* gegen Immuneffektorzellen wichtig sein könnte.

Um die Virulenz von *A. fumigatus*-Stämmen *in vivo* zu testen, wurde ein intranasales Infektionsmodell für den Mausstamm BALB/c etabliert. Dabei konnte ein optimales Verhältnis von Immunsuppressionsdosis zu Infektionsdosis ermittelt werden. Die Infektion mit $5 \cdot 10^3$ bzw. 10^4 Wildtyp-Konidien bei einer Immunsuppression von 100 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht resultierte in einer hohen Sterblichkeitsrate der Versuchstiere. Die Analyse von Δ *gpaB*-, Δ *acyA*- und Δ *pkaC1*-Deletionsstämmen im Tiermodell zeigte unter gleichen Bedingungen eine deutlich attenuierte Virulenz der Mutanten. Dies könnte zum einen auf die reduzierte Expression der *pksP*-Virulenzdeterminante, bei den Mutanten Δ *acyA* und Δ *pkaC1* aber auch auf das reduzierte Wachstum zurückzuführen sein.

Die Homoaconitase LYSF von *A. fumigatus* katalysiert Reaktionen in der pilzspezifischen Lysinbiosynthese. Δ *lysF*-Mutanten waren im Mausinfektionsmodell avirulent. LYSF stellt demnach ein mögliches Zielprotein der antimykotischen Therapie einer invasiven Aspergillose dar.

LITERATUR

- Adachi, K. & Hamer, J.E.** (1998) Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **10**: 1361-11374.
- Alspaugh, J.A., Cavallo, L.M., Perfect, J.R. & Heitman, J.** (2000) RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **36**: 352-365.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. & Heitman, J.** (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **11**: 3206-3217.
- Alspaugh, J.A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L.M., Funnell, D., Cox, G.M., Perfect, J.R., Kronstad, J.W. & Heitman, J.** (2002) Adenylyl cyclase functions downstream of the G α protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **1**: 75-84.
- Altschuler, D.L., Muro, A., Schijman, A., Almonacid, F.B. & Torres, H.N.** (1990) *Neurospora crassa* cDNA clones coding for a new member of the *ras* protein family. *FEBS Lett* **273**: 103-106.
- Andrianopoulos, A. & Hynes, M.J.** (1988) Cloning and analysis of the positively acting regulatory gene *amdR* from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **8**: 3532-3541.
- Bahn, Y.S. & Sundstrom, P.** (2001) *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 3211-3223.
- Ballance, D.J. & Turner, G.** (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**: 321-331.
- Bhattacharjee, J.K.** (1992) Evolution of alpha-aminoadipate pathway for the synthesis of lysine in fungi. In: Mortlock, R.P. (ed.), The evolution of metabolic function. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Birch, M., Robson, G., Law, D. & Denning, D.W.** (1996) Evidence of multiple phospholipase activities in *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **64**: 751-755.
- Birnboim, C. & Doly, J.** (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. & Ernst, J.F.** (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 1243-1257.
- Bölker, M.** (1998) Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol* **25**: 143-156.
- Boorstein, W.R. & Craig, E.A.** (1990) Transcriptional regulation of *SSA3*, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 3262-3267.
- Bouchara, J.P., Tronchin, G., Larcher, G. & Chabasse, D.** (1995) The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **3**: 327-330.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brakhage, A.A.** (1998) Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 547-585.
- Brakhage, A.A. & Jahn, B.** (2002) Molecular mechanisms of pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*. In Osiewacz, H.D. (ed.) *Molecular Biology of fungal development*. pp. 559-582, Marcel Dekker, Inc., Dordrecht.
- Brakhage, A.A. & Langfelder, K.** (2002) Menacing Mold: The molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* **56**: 433-455.
- Brown, J.S., Aufauvre-Brown, A., Brown, J., Jennings, J.M., Arst Jr, H. & Holden, D.W.** (2000) Signature-tagged and directed mutagenesis identify PABA synthetase as essential for *Aspergillus fumigatus* pathogenicity. *Mol Microbiol* **36**: 1371-1380.
- Bruno, K.S., Aramayo, R., Minke, P.F., Metzberg, R.L. & Plamann, M.** (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* **15**: 5772-5782.
- Buhr, T.L., Oved, S., Truesdell, G.M., Huang, C., Yarden, O. & Dickman, M.B.** (1996) A kinase-encoding gene from *Colletotrichum trifolii* complements a colonial growth mutant of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **251**: 565-572.
- Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., Lopez-Medrano, R., Leal, F. & Latgé, J.P.** (1997) Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **65**: 4718-4724.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Woo Bok, J. & Keller, N.P.** (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447-459.
- Casperson, G.F., Walker, N. & Bourne, H.R.** (1985) Isolation of the gene encoding adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5060-5063.
- Chalfie, M.C., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Stuhl, K.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chang, Y.C., Wickes, B.L., Miller, G.F., Penoyer, L.A. & Kwon-Chung, K.J.** (2000) *Cryptococcus neoformans* STE12 α regulates virulence but is not essential for mating. *J Exp Med* **191**: 871-882.
- Chazalet, V., Debeaupuis, J.P., Sarfati, J., Lortholary, P., Ribaud, P., Shah, M., Cornet, M., Vu Thien, H., Gluckman, G., Brücker, G. et al.** (1998) Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* **36**: 1494-1500.
- Choi, W. & Dean, R.A.** (1997) The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* **9**: 1973-1983.
- Chu, H.W., Wang, J.M., Boutet, M. & Laviolette, M.** (1996) Tumor necrosis factor- α and interleukin-1- α expression in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Lab Anim Sci* **46**: 42-47.
- De Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N. & Talbot, N.T.** (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244-245.
- d'Enfert, C.** (1996) Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Curr Genet* **30**: 76-82.

- d'Enfert, C., Bonini, B.M., Zapella, P.D.A., Fontaine, T., da Silva, A.M. & Terenzi, H.F.** (1999) Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **32**: 471-483.
- d'Enfert, C., Diaquin, M., Delit, A., Wuscher, N., Debeauvais, J.P., Huerre, M. & Latgé, J.P.** (1996) Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **64**: 4401-4405.
- Denning, D.W.** (1987) Aflatoxin and human disease. A review. *Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews* **4**: 175-209.
- Denning, D.W.** (1996) Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **23**: 608-614.
- Denning, D.W.** (1998) Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **26**: 781-803.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B. & Sweigard, J.A.** (1999) *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**: 2013-2030.
- Dixon, D.M., Polak, A. & Szanislo, P.J.** (1987) Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *J Med Vet Mycol* **25**: 97-106.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J.** (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688.
- D'Souza, C.A., Alspaugh, J.A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G.M., Perfect, J.R. & Heitman, J.** (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* **21**: 3179-3191.
- D'Souza, C.A. & Heitman, J.** (2001) Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 349-364.
- Dürrenberger, F., Wong, K. & Kronstad, J.W.** (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5684-5689.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. & Casadevall, A.** (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* **68**: 4225-4237.
- Fellows, F.C.I. & Lewis, M.H.R.** (1973) Lysine metabolism in mammals. *Biochem J* **136**: 329-334.
- Feng, B., Wang, X., Hauser, M., Kaufmann, S., Jentsch, S., Haase, G., Becker, J.M. & Szanislo, P.J.** (2001) Molecular cloning and characterisation of *WdPKS1*, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect Immun* **69**: 1781-1794.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G.** (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 6339-6346.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.K., Shimizu, K., Keller, N.P. & d'Enfert, C.** (2002) cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **44**: 1001-1016.
- Garrad, R.C. & Bhattacharjee, J.K.** (1992) Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned *LYS1* gene of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **174**: 7379-7384.

- Gattung, S.** (2001) Molekularbiologische Analyse von potentiell virulenz-determinierenden Genen des opportunistisch human-pathogenen Pilzes *Aspergillus fumigatus*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Genetik, TU Darmstadt.
- Gehring, H.** (1997) Molekulargenetische Untersuchungen an dem opportunistisch humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus*. Diplomarbeit, Institut für Genetik und Mikrobiologie, LMU München.
- Gilman, A.G.** (1987) G-proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. & Kronstad, J.** (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**: 2805-2816.
- Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H. & Schüller, C.** (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* **21**: 135-144.
- Haribabu, B. & Dottin, R.P.** (1991) Identification of a protein kinase multigene family of *Dictyostelium discoideum*: molecular cloning and expression of a cDNA encoding a developmentally regulated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1115-1119.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R. & Bölker, M.** (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**: 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F. & Kahmann, R.** (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* **11**: 1293-1305.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P. & Adams, T.H.** (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**: 4916-4923.
- Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R.K.** (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interaction. *Nucl Acids Res* **16**: 7351-7367.
- Hopwood, D.A. & Sherman, D.H.** (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* **24**: 37-66.
- Hospenthal, D.R., Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E.** (1998) Concentration of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol* **36**: 165-168.
- Howard, R.J. & Valent, B.** (1996) Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **50**: 491-512.
- Huffnagle, G.B., Chen, G.H., Curtis, G.L., McDonald, R.A., Strieter, R.M. & Toews, G.B.** (1995) Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **155**: 3507-3516.
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M. & Latgé, J.P.** (2003) Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* **71**: 891-903.
- Jahn, B., Boukhallouk, F., Lotz, J., Langfelder, K., Wanner, G. & Brakhage, A.A.** (2000) Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect Immun* **68**: 3736-3739.

- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S. & Brakhage, A.A.** (1997) Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect Immun* **65**: 5110-5117.
- Jahn, B., Langfelder, K., Schneider, U., Schindel, C. & Brakhage, A.A.** (2002) PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* **4**: 793-803.
- Jahn, B., Rampp, A., Dick, C., Jahn, A., Palmer, M. & Bhakdi, S.** (1998) Accumulation of amphotericin B in human macrophages enhances activity against *Aspergillus fumigatus* conidia: quantification of conidial kill at the single-cell level. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2569-2575.
- Jiang, Y., Davis, C. & Broach, J.R.** (1998) Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *EMBO J* **17**: 6942-6951.
- Kahmann, R., Basse, C. & Feldbrügge, M.** (1999) Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize patho-system. *Curr Opin Microbiol* **2**: 647-650.
- Kana-uchi, A., Yamashiro, C.T., Tanabe, S. & Murayama, T.** (1997) A *ras* homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. *Mol Gen Genet* **254**: 427-432.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. & Wigler, M.** (1984) Genetic analysis of yeast *RAS1* and *RAS2* genes. *Cell* **37**: 437-445.
- Kays, A.M., Rowley, P.S., Rudeina, A.B. & Borkovich, K.A.** (2000) Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the G α protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **20**: 7693-7705.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M.** (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**: 407-420.
- Kore-eda, S., Murayama, T. & Uno, I.** (1991) Isolation and characterisation of the adenylate cyclase structural gene of *Neurospora crassa*. *Jpn J Genet* **66**: 317-334.
- Kraakmann, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W.R.H., Donaton, M.C.V., Dijck, P.V., Winderickx, J., de Winde, J.H. & Thevelein, J.M.** (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**: 1001-1012.
- Kronstad, J., De Maria, A.D., Funnell, D., Laidlaw, R.D., Lee, N., de Sa, M.M. & Ramesh, M.** (1998) Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch Microbiol* **170**: 395-404.
- Krüger, J., Loubradou, E., Regenfelder, E., Hartmann, A. & Kahmann, R.** (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signaling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**: 193-198.
- Landry, S., Pettit, M.T., Apolinario, E. & Hoffman, C.S.** (2000) The fission yeast *git5* gene encodes a G β subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* **154**: 1463-1471.
- Langfelder, K.** (2001) Melanin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Dissertation, Fachbereich Biologie, TU Darmstadt.

- Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G. & Brakhage, A.A.** (1998) Identification of a polyketide synthase gene (*pkpP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**: 79-89.
- Langfelder, K., Philippe, B., Jahn, B., Latgé, J.P. & Brakhage, A.A.** (2001) Differential expression of the *Aspergillus fumigatus* *pkpP* gene detected *in vitro* and *in vivo* with green fluorescent protein. *Infect Immun* **69**: 6411-6418.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A.A.** (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**: 143-158.
- Latgé, J.P.** (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**: 310-350.
- Latgé, J.P.** (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**: 382-389.
- Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.J. & Schröppel, K.** (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 673-687.
- Lee, N. & Kronstad, J.W.** (2002) *ras2* controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **1**: 954-966.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. & Heitman, J.** (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785.
- Levitz, S.M., Selsted, M.E., Ganz, T., Lehrer, R.I. & Diamond, R.D.** (1986) *In vitro* killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis* **154**: 483-489.
- Lichter, A. & Mills, D.** (1997) Fill1, a G-protein alpha-subunit that acts upstream of cAMP and is essential for dimorphic switching in haploid cells of *Ustilago hordei*. *Mol Gen Genet* **256**: 426-435.
- Lichter, A. & Mills, D.** (1998) Control of pigmentation of *Ustilago hordei*: the effect of pH, thiamine, and involvement of the cAMP cascade. *Fungal Genet Biol* **25**: 63-74.
- Litzka, O., Then Bergh, K., Van den Brulle, J., Steidl, S. & Brakhage, A.A.** (1999) Transcriptional control of expression of β -lactam biosynthesis genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 95-105.
- Liu, S. & Dean, R.A.** (1997) G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 1075-1086.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R.** (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G. & Ruis, H.** (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* **12**: 1997-2003.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F.** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J* **15**: 2227-2235.

- Matsumoto, K., Uno, I. & Ishikawa, T.** (1984) Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **157**: 277-282.
- Mayorga, M.E. & Timberlake, W.E.** (1992) The developmentally regulated *Aspergillus nidulans wA* gene encodes a polypeptide homologues to polyketide and fatty acid synthases. *Mol Gen Genet* **235**: 205-212.
- Mitchell, T.K. & Dean, R.A.** (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **7**: 1869-1878.
- Mitchell, T.G. & Perfect, J.R.** (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* **8**: 515-548.
- Monod, M., Paris, S., Sarfati, J., Jatton-Ogay, K., Ave, P. & Latgé, J.P.** (1993) Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 39-46.
- Mösch, H.U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G.R. & Braus, G.H.** (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1325-1335.
- Moskvina, E., Schüller, C., Maurer, C.T.C., Mager, W.H. & Ruis, H.** (1998) A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* **14**: 1041-1050.
- Mühleisen, T.W.** (2001) Charakterisierung des Homoaconitase-Gens *lysF* der Lysinbiosynthese von *Aspergillus fumigatus*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Genetik, TU Darmstadt.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K.-i., Matsumoto, K. & Kaziro, Y.** (1988) Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (*GPA2*) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: Studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1374-1378.
- Nikawa, J., Sass, P. & Wigler, M.** (1987) The cloning and characterization of the low affinity cAMP phosphodiesterase gene of *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 3629-3636.
- Oliver, B.G., Panepinto, J.C., Askew, D.S. & Rhodes, J.C.** (2002) cAMP alteration of growth rate of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* is carbon-source dependent. *Microbiology* **148**: 2627-2633.
- Oliver, B.G., Panepinto, J.C., Fortwendel, J.R., Smith, D.L., Askew, D.S. & Rhodes, J.C.** (2001) Cloning and expression of *pkaC* and *pkaR*, the genes encoding the cAMP-dependent protein kinase of *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* **154**: 85-91.
- Pan, X. & Heitman, J.** (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-4887.
- Panepinto, J.C., Oliver, B.G., Fortwendel, J.R., Smith, D.L.H., Askew, D.S. & Rhodes, J.C.** (2003) Deletion of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding the Ras-related protein RhbA reduces virulence in a model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **71**: 2819-2826.
- Patel, R. & Paya, C.V.** (1997) Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* **10**: 86-124.
- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prévost, M.C., Gougerot-Pocidallo, M.A., Sanchez Perez, M., Van der Meer, A. & Latgé, J.P.** (2003) Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* **71**: 3034-3042.

- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bolker, M. & Kahmann, R.** (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**:1934-1942.
- Reichard, U., Cole, G.T., Rüchel, R. & Monod, M.** (2000) Molecular cloning and targeted deletion of *PEP2* which encodes a novel aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* **290**: 85-96.
- Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A. & DeVirgilio, C.** (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* **12**: 2943-2955.
- Rhodes, J.C., Oliver, B.G., Askew, D.S. & Amlung, T.W.** (2001) Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Med Mycol* **39**: 253-260.
- Robertson, L.S. & Fink, G.R.** (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13783-13787.
- Rocha, C.R.C., Schröppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. & Leberer, E.** (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**: 3631-3643.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. & Torres-Guerrero, H.** (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* **68**: 3696-3703.
- Rosen, S., Yu, J.H. & Adams, T.H.** (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein β subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**: 5592-5600.
- Rüchel, R. & Reichard, U.** (1999) Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. In Brakhage, A.A., Jahn, B. and Schmidt, A. (eds.), *Aspergillus fumigatus*: biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. *Contributions to Microbiology* Vol. **2**, pp. 21-43, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, Switzerland.
- Salonen, J. & Nikoskelainen, J.** (1993) Lethal infections in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* **51**: 102-108.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samson, R.A.** (1999) The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. In Brakhage, A.A., Jahn, B. and Schmidt, A. (eds.), *Aspergillus fumigatus*: biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. *Contributions to Microbiology* Vol. **2**, pp. 5-20, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, Switzerland.
- Sandhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M.J., Reed, S.I. & Hicks, J.B.** (1992) A G-protein alpha subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ repressor. *Mol Cell Biol* **12**: 1977-1985.
- Sandhu, D.K., Sandhu, R.S., Khan, Z.U. & Damodaran, V.N.** (1976) Conditional virulence of a *p*-aminobenzoic acid requiring mutant of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **13**: 527-532.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T. & Wigler, M.** (1986) Cloning and characterization of the high affinity cAMP phosphodiesterase of *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 9303-9307.
- Schaffner, A.** (1994) Macrophage-*Aspergillus* interactions. *Immunol Series* **60**: 545-552.
- Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A.I. & Davis, C.E.** (1983) Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun* **42**: 1109-1115.
- Schmidt, A. & Schmidt, D.I.** (1999) J.B. Georg W. Fresenius and the description of the species *Aspergillus fumigatus*. In Brakhage, A.A., Jahn, B. and Schmidt, A. (eds.), *Aspergillus fumigatus: biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Contributions to Microbiology* Vol. **2**, pp. 1-4, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, Switzerland.
- Schneemann, M. & Schaffner, A.** (1999) Host-defense mechanisms in *Aspergillus* infections. In Brakhage, A.A., Jahn, B. and Schmidt, A. (eds.), *Aspergillus fumigatus: biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Contributions to Microbiology* Vol. **2**, pp. 57-68, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, Switzerland.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. & Galbraith, D.W.** (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* **8**: 777-784.
- Shimizu, K. & Keller, N.P.** (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**: 591-600.
- Smith, J.M., Tang, C.M., Van Noorden, S. & Holden, D.W.** (1994) Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restrictocin and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **62**: 5247-5254.
- Smith, A., Ward, M.P. & Garret, S.** (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J* **17**: 3556-3564.
- Som, T. & Kolaparthi, V.S.R.** (1994) Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol Cell Biol* **14**: 5333-5348.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. & Ernst, J.F.** (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**: 386-396.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Staudohar, M., Bencina, M., van de Vondervoort, P.J., Panneman, H., Legisa, M., Visser, J. & Ruijter, J.G.** (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase is involved in morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiology* **148**: 2635-2645.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. & Ernst, J.F.** (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**: 1982-1991.
- Sturtevant, J. & Latgé, J.P.** (1992) Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* **166**: 580-586.
- Sutton, P., Newcombe, N.R., Waring, P. & Müllbacher, A.** (1994) *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun* **62**: 1192-1198.

- Takano, Y., Kubo, Y., Kawamura, C., Tsuge, T. & Furusawa, I.I.** (1997) The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genet Biol* **21**: 131-140.
- Tang, C.M., Smith, J.M., Arst Jr., H.N. & Holden, D.W.** (1994) Virulence studies of *Aspergillus nidulans* mutants requiring lysine or p-aminobenzoic acid in invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **62**: 5255-5260.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. & Yonemoto, W.** (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005.
- Terenzi, H.F., Flawi, M.M. & Torres, H.N.** (1974) A *Neurospora crassa* morphological mutant showing reduced adenylate cyclase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **58**: 990-996.
- Thevelein, J.M.** (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**: 1753-1790.
- Thevelein, J.M., Cauwenberg, L., Colombo, S., de Winde, J.H.D., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D. et al.** (2000) Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb Technol* **26**: 819-825.
- Thevelein, J.M. & de Winde, J.H.** (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**: 904-918.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G. & Wigler, M.** (1987a) Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & Wigler, M.** (1987b) Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**: 277-287.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, S., Powers, S., Kataoka, D., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. & Wigler, M.** (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**: 27-36.
- Tolkacheva, T., McNamara, P., Piekarz, E. & Courchesne, W.** (1994) Cloning of a *Cryptococcus neoformans* gene, *GPA1*, encoding a G-protein alpha-subunit homolog. *Infect Immun* **62**: 2849-2856.
- Treger, J.M., Magee, T.R. & McEntee, K.** (1998) Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 13-19.
- Trinci, A.P.J.** (1971) Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J Gen Microbiol* **67**: 325-344.
- Tsai, H.F., Chang, Y.C., Washburn, R.G., Wheeler, M.H. & Kwon-Chung, K.J.** (1998) The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* **180**: 3031-3038.
- Tsai, H.F., Fujii, I., Watanabe, A., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Yasuoka, Y., Ebizuka, Y. & Kwon-Chung, K.J.** (2001) Pentaketide-melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* requires chain-length shortening of a heptaketide precursor. *J Biol Chem* **276**: 29292-29298.
- Tsai, H.F., Washburn, R.G., Chang, Y.C. & Kwon-Chung, K.J.** (1997) *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol Microbiol* **26**: 175-183.

- Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C. & Kwon-Chung, K.J.** (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* **181**: 6469-6477.
- Tsien, R.Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.
- Turner, G.E. & Borkovich, K.A.** (1993) Identification of a G protein α subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the G_i family. *J Biol Chem* **268**: 14805-14811.
- van Gorcom, R.F., Punt, P.J., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C.A.** (1986) A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene* **48**: 211-217.
- Umbarger, H.E.** (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* **47**: 532-606.
- Wang, Y., Aisen, P. & Casadevall, A.** (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanisms of action. *Infect Immun* **63**: 3131-3136.
- Wang, P., Perfect, J.R. & Heitman, J.** (2000) The G-protein β subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* **20**: 352-362.
- Watanabe, A., Fujii, I., Tsai, H.F., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. & Ebizuka, Y.** (2000) *Aspergillus fumigatus alb1* encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 39-44.
- Waugh, M.S., Nichols, C.B., DeCesare, G.M.C., Heitman, J. & Alspaugh, J.A.** (2002) Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **148**: 191-201.
- Weidner, G.** (1998) Die Homoacnitase von *Aspergillus nidulans*: Funktion, Lokalisation und Regulation des kodierenden Gens. Dissertation, Fakultät für Biologie, LMU München.
- Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P.C. & Brakhage, A.A.** (1998) Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Curr Genet* **33**: 378-385.
- Welton, R.M. & Hoffman, C.S.** (2000) Glucose monitoring in fission yeast via the *gpa2* $G\alpha$, the *git5* $G\beta$ and the *git3* putative glucose receptor. *Genetics* **156**: 513-521.
- Wheeler, M.H.** (1981) Melanin biosynthetic enzymes in cell-free homogenates of *Verticillium dahliae* and *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* **71**: 912.
- Wheeler, M.H.** (1982) Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Exp Mycol* **6**: 171-179.
- Wheeler, M.H. & Bell, A.A.** (1988) Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGinnis, M.R. (ed.), Current topics in medical mycology., pp. 338-387, Springer Verlag, New York, NY.
- Wheeler, M.H. & Klich, M.A.** (1995) The effects of tricyclazole, pyroquilon, phthalide, and related fungicides on the production of conidial wall pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Pestic Biochem Physiol* **52**: 125-136.
- Wheeler, M.H. & Stipanovic, R.D.** (1985) Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. *Arch Microbiol* **142**: 234-241.
- Wickes, B.L., Edman, U. & Edman, J.C.** (1997) The *Cryptococcus neoformans* *STE12 α* gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* *STE12* homologue that is mating type specific. *Mol Microbiol* **6**: 951-960.

- Xu, J.R. & Hamer, J.E.** (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev* **10**: 2696-2706.
- Xue, Y., Batlle, M. & Hirsch, J.P.** (1998) *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G α subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* **17**: 1996-2007.
- Yang, Q., Poole, S.I. & Borkovich, K.A.** (2002) A G-protein β subunit required for sexual and vegetative development and maintenance of normal G α protein levels in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **1**: 378-390.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yu, J.H., Wieser, J. & Adams, T.H.** (1996) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**: 5184-5190.
- Yue, C., Cavallo, L.M., Alspaugh, J.A., Wang, P., Cox, G.M., Perfect, J.R. & Heitman, J.** (1999) The STE12 α homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **153**: 1601-1615.
- Yun, C.W., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K. & Kumagai, H.** (1997) G-protein-coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 287-292.
- Yun, C., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K. & Kumagai, H.** (1998) Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **252** : 29-33.

Anhang A: *gpaA*

(EMBL- bzw. SWISSPROT-Datenbanknummer: AJ276276, Q8J132)

-354 CCCTCCAGCACAGCCGCCCATCTGTCTGGTCTGCCTCGAGAGGGCCCTGCCGCCGCATGAACCTACCTCTCCTTGGCGTC
-275 AGCACGATCACTCTGATTTGTAATTGTCTGTTCCTGTCCGTTTTCTATGGGCATTTTTCCATTGCAATTATTCTCTC
-196 CCATGGTGTATCACGTTTCGATGTCGTTAACTGTCTCATCGGATGGTTTCGTGTCGGTACTTGTCTTCTTTGCTGACGTC
-117 TGTTATTGATAGGCTTCCAGAATAATCAATACCGCGAGACCCCTTCCGAGTATACTTGCCTTACACTAGACTTTCGTTA
-38 AGAGACTCCAATCAATTGAATCGTCAACTGTCGCCAAG

+1 ATG GGT TGT GGA ATG AGT ACC GAG GAT AAG GAG GGC AAG GCC CGT AAC GAG GAG ATT GAG **As**
M G C G M S T E D K E G K A R N E E I E 20

+61 AAC CAG CTC AAA AGG GAC AAG ATG ATG CAG CGA AAT GAG ATT AAG ATG CTT CTG CTC G G
N Q L K R D K M M Q R N E I K M L L L G 40

+120 TATGTCTCCATCGAGCCGCTCCTCAACCTCGACAGGACCTATTTCCACTAACGTCCTTGAACAG GG GCT GGT GAG
A G E 43

+195 TCC GGC AAG TCG ACG ATC CTA AAG CAG ATG AAG CTC ATC CAT GAG GGT GGG TAC TCG CGC
S G K S T I L K Q M K L I H E G G Y S R 63

+255 GAT GAG CGG GAA TCT TTC AAG GAA ATC ATC TAC AGC AAC ACT GTT CAG TCG ATG CGC GTC
D E R E S F K E I I Y S N T V Q S M R V 83

+315 ATC TTG GAG GCC ATG GAG TCG CTG GAG CTT CCC CTG GAA GAC GCT CGC AAC GAG TAC CAT
I L E A M E S L E L P L E D A R N E Y H 103

+375 GTT CAG ACC ATC TTC ATG CAG CCG GCT CAG ATT GAG GGC GAC AGC CTG CCC CCG GAA GTT
V Q T I F M Q P A Q I E G D S L P P E V 123

+435 GGA AAC GCC ATT GGT GCT CTT TGG CGT GAT ACT GGT GTC CAG GAG TGC TTC AAG CGT TCC
G N A I G A L W R D T G V Q E C F K R S 143

+495 CGT GAG TAC CAA TTG AAT GAT TCC GCC AAA TA GTGGGTCTACTCGGTCCGTCAGCGGTGCTTTAGAAA
R E Y Q L N D S A K Y 154

+563 GTTTTGGCTAATCGGGTTGACAG C TAC TTT GAC GCG ATC GAC CGT ATC GCT CAG CCC GAC TAC C
Y F D A I D R I A Q P D Y L 168

+628 TT CCC ACC GAC CAG GAT GTT CTG CGC TCT CGA GTC AAG ACC ACT GGT ATC ACA GAG ACA
P T D Q D V L R S R V K T T G I T E T 188

+687 ACC TTC ATC ATT GGT GAC TTG ACG TAC CGC ATG TTT GAT GTC GGA GGT CAG CGG TCG GAG
T F I I G D L T Y R M F D V G G Q R S E 207

+746 CGT AAG AAG TGG ATT CAC TGC TTT GAG AAC GTG ACA ACA ATT CTT TTC CTG GTC GCT ATC
R K K W I H C F E N V T T I L F L V A I 227

+806 TCG GAG TAC GAT CAG CTG CTG TTC GAA GAC GAG ACC GTC AAC CGC ATG CAG GAA GCG CTC
S E Y D Q L L F E D E T V N R M Q E A L 247

+866 ACC CTG TTC GAC TCG ATT TGC AAC TCA CGG TGG TTC GTC AAG ACC TCT ATT ATC TTG TTC
T L F D S I C N S R W F V K T S I I L F 267

+926 CTG AAC AAG ATC GAT CGA TTC AAG GAG AAG CTG CCC GTC AGC CCC ATG AAG AAC TAT TTC
L N K I D R F K E K L P V S P M K N Y F 287

+986 CCC GAT TAT GAG GGC GGT GCC GAC TAC GCC GCG GCC TGT GAT TAC ATC CTG AAC CGC TTC
P D Y E G G A D Y A A A C D Y I L N R F 307

+1046 GTA TCA CTC AAC CAG GCC GAG CAA AAG CAG ATC TAC ACT CAC TTC ACA TGC GCC ACC GAT
V S L N Q A E Q K Q I Y T H F T C A T D 327

+1106 ACT ACA CAA ATC CGT TTC GTC ATG GCG GCT GTA AAT G GTGCGTCTCCGAGGACCTTGTATACTC
T T Q I R F V M A A V N D 340

+1172 TTTGATTACCGACCACTAACGTCTTCCAG AT ATC ATT ATC CAA GAG AAC CTC AGA CTC TGT GGT CT
I I I Q E N L R L C G L 352

+1238 G ATC TAA TGAGCCATTATACTTGACGGAGTGAGGATTTTCTTTCAACACATTAAGACCACATCATAGCTGTGGCTT
I * 353

+1314 GTA

Legende siehe Anhang F

Anhang B: *gpaB*

(EMBL- bzw. SWISSPROT-Datenbanknummer: AJ277436, Q8TFX6)

-1194 TAGTCACCTCTACCTCCCTTAGGGCACCTAGGTAAGATATGGAGGTATTCGCTTTACTGTTACGGAGTACTCCGTACG
-1115 CATCTACGTTGAAACTGGCAAGCCTGATGCTGTGAAGTTACATTGGACACTTAGAATATCTAGGTAGGTACCCCTTTTCC
-1036 TGCCTCACTCTAAACCAGTGGACAGCAGCACTACCGGAATTTAAAGCATCTCTTGCTCTTTCCGATCTTACCTTGAAGT
-957 GACCGTCAGACTTTTACCTGGCGCGGTAGACAAACCATTACCTACTAGTACCCCGTAAGCTTCGCCATCCACGTTTTT
-878 ACCAATAATTACCCACTCAACTCCTTCTCAGGCTCTCTCCTCTACTATCTCCACTTCAACCTGTCTACATGACGATTT
-799 GGAATACCCCAACTGGGTGCTTATACCCTGATACTGATTCCTCAAAGCCACTCCAAACGTACGCTAATATATCAGAT
-720 CTTAGTTGTCTATCACGTTAAGACATCTACCATTATTGCAGATACCTTGGTATAATACCCTGTACCAATTGCCTTACCA
-641 TCATTCTTAGTACTTCGCCGTCACCCATCTTGATTGCTTACATGATCTCCTTTGAGATCCGCTTCCATCCACTCTT
-562 CCCGATCGACCTCGACTACCCTTTTTAGCGTTCGTTCTGCTACTCTCACACACCTGTCTGCTCCGCAATCGAGTCTGTG
-483 ACCCCTCATCCCAATCAGTCTATTTCGCGGAGTAAAAGCGATAGGAGCTTGGGCTCTTCCCTCACCGACCGAAGCAACAT
-404 TTTCTTAGCCTTATTACCTGCGTACAGAGTCACTGCGCTCCACAGCCTGACGGTCTTTACTCTGTGCTCGCTTC
-325 TTGCGCCTTTTACGAAGACTGGAAGTCTGCGCTTGCCTTACAACTCTCTATACCGCGTTCAACTACTCTTCATCTC
-246 CCTCTTGTCGGTTCGAACCATCGTCGAACGTTACTTGCCTGTAACCCCGATTGCCTGTATACCTAGAATCCAAGAGT
-167 CGGTTTTCAACGCCATAGGGGTTGCGCGCAAGAGGCTGCCTAGTACATGAGTCTTACCCGAGTGTCTCGGGTGTGAGT
-88 TCTCGTAAATTGATGCCGCTTACCTCTGCTGCAGCTAATGCTTTAGGCCTTTCCGCTGTTCTATACATAACACATAACC
-9 TTGTCGAAA

+1 ATG GGG TCA TGT TTC AGC ACA GAG TCA CCA GGG GAT GCG GAA CAA AAG AAA CGA AGT CAG **As**
M G S C F S T E S P G D A E Q K K R S Q 20

+61 GCC ATT GAT CGC CGG TTA GAG GAG GAT TCC AGG CGA CTA CGG AGA GAA TGC AAG ATA CTT
A I D R R L E E D S R R L R R E C K I L 40

+121 CTG CTG G *GTCAGTTCGGATTTCTCTGAGTATAATAATGGTGATTGTGCCGTGGGCTAACGGGAGCTTTCTTTGA*
L L G 43

+197 *TTTGCGACAG* GG TCC GGA GAG AGC GGG AAA TCT ACA ATT GTC AAG CAA ATG AAA ATC ATT C
S G E S G K S T I V K Q M K I I H 60

+258 AT CAA AAC GGC TAC ACA GTG GAG GAA CTT GCG TTA TAT CGT TTA ACG ATC TAC AAA AAT
Q N G Y T V E E L A L Y R L T I Y K N 79

+317 CTC CTA GAT TGC GCC AAA GCT CTC ATT GGA GCT TAC CAC CAA TTC AAC CTC CAA CCA ACG
L L D C A K A L I G A Y H Q F N L Q P T 99

+377 AGT CCC AAA GTC CGC GAA TTC ATC GAG TTC CTT TCT GAA TAC AAT ATT GAC CCG GAT CCA
S P K V R E F I E F L S E Y N I D P D P 119

+437 AAC ACG CCT CTA GAT CCT CGA ATT GGA GAT GCG GTC ACC TAT CTC TGG AAT GAT CCA TGC
N T P L D P R I G D A V T Y L W N D P C 139

+497 ACG TCC ACT GCG TTA GAG CAT CAG AAT GAG TTT TAC CTG ATG GAT TCT GCG CCA TA *GTAC*
T S T A L E H Q N E F Y L M D S A P Y 158

+557 *GTTCATTCTTTGCCCTTCTAGAGATATGCACATTAACCCAATCTGCGATTAG* T TTC TTT GAA GAA GCG AAG
F F E E A K 164

+628 CGC ATA GCG GCG CCT GAT TAT ATT CCG AAC GTG GCG GAC GTC CTC CGA GCT CGA ACA AAG
R I A A P D Y I P N V A D V L R A R T K 184

+688 ACG ACA GGT ATC TAT GAG ACA AGA TTT ACA ATG GGC CAG CTC AGC ATA CA *GTATGCGACTGT*
T T G I Y E T R F T M G Q L S I H 201

+750 *CTTCCAAAATATTGTCCTGTCCCTAGTCTAGGCTACTAACGAGTCCGTAG* T ATG TTC GAT GTC GGT GGA C
M F D V G G Q 208

+821 AG CGC AGC GAG CGA AAA AAA TGG ATC CAT TGT TTC GAG AAC GTC ACG TCG ATC ATT TTC
R S E R K K W I H C F E N V T S I I F 227

+880 TGT GTG GCA TTG AGT GAG TAC GAT CAA GTA CTG CTA GAA GAG AGC AAT CAA *GTAAGTCATTA*
C V A L S E Y D Q V L L E E S N Q 244

+942 *CTGTATTTACTGAACTATGGCTTTCTTTGTTAACCATCTTTCAAG* AAT CGA ATG ATG GAA AGC CTG GTT C
N R M M E S L V L 253

+1012 TT TTT GAC TCT GTC GTT AAT TCA CGA TGG TTC ATG CGA ACA AGT ATT ATT CTT TTC CTC
F D S V V N S R W F M R T S I I L F L 272

+1071 AAC AAA GTG GAT CTC TTT CGA CAG AAA TTG CCC CGT TCG CCC CTG AGT AAC TAC TTT CCC
N K V D L F R Q K L P R S P L S N Y F P 292

+1131 GAT TAC TCT GGC GGT AAT GAT GTG AAC CGG GCT GCC AAG TAT CTC CTG TGG AGA TTT AAC
D Y S G G N D V N R A A K Y L L W R F N 312

Fortsetzung Anhang B: *gpaB*

+1191 CAG GTC AAC CGA GCA CAC CTG AAC CTA TAT CCA CA GTAAGTACCTTCTTGGGGCCAGTAGGCCAGC 324
 Q V N R A H L N L Y P H

+1258 TCAGGGAGTTTGACAAACTAAGTTGACCTCATGACAG T TTG ACT CAA GCA ACG GAT ACC ACG AAT ATT 334
 L T Q A T D T T N I

+1318 CGT CTA GTG TTC GCT GCA GTC AAG GAA ACA ATA TTA CAA AAT GCC CTG AAA GAT TCA GGT 354
 R L V F A A V K E T I L Q N A L K D S G

+1378 ATC TTG TGA TCTTTCTCAATCGCTTCTTCGATCATTCCAATCGTTCCATCATTGTTCCCGACTTCCTATGACGAGC 356
 I L *

+1454 TTCATCGCCAAAGACACCACCTCCACCAACTCACGGCTACGACTCTGCTCTAATTCTCGTTCCAATCCCCGGTCTTCA
 +1533 TCTCGATACTCTCTTATGTTTGGCTGAATGCATAGGCGTTGTGTGCTCTGCTATTCTTGTCTCGCGTCATGTGACAG
 +1612 GCGCTGGGCTGGGTCATACTTTTTCTGGACATTTGTGGCATGGTGTCTTTTTGGTTTTCGGTGGCTTTTTTTTTTT
 +1691 CATGGGAGCAATCTTTTCGCTGCATTCGGTCGACGACGATTAGCTCTTGGTTTGTCTTTGGGATCTGATGCCACATATT
 +1770 ACCTTCAGTGAAAAGTTGGCGGCCACGGCACGATTTGCATATATCAAGTGTGAAGCCTCATACTATCATTGTTTCATGC
 +1849 TTTCAGACATTTTATCTACTTTGACCGCTACGTCTCACCTTTGGCTTCTGGGTCTTCTCTCATGCATTGACGGCGG
 +1928 TCTACTTCGTTTCAATTGCCGACGACCCTCTCGATACTTCTTCTGTGTTTATAGTGCTTGCAGCATCTCTTGCATTG
 +2007 GCCTAATTTTTTTTTTACTCTTGAGAATGATCCTTATCCCCCATTGCTGGTCAGTCCATCTATGTGCGACGGAGAT
 +2086 CTGACCACTCTTCGCACGCCTACCTAAGCTGCCTCTGCATGGTCGTTGGACACAACGCTGAGATAAATAAAGCCAGTCC
 +2165 GTCGTTATGTGAAGAGATGAGACTTATCTTTGAGAGGAATATCAGTCGTCCCTCAGAAGCCAACATGTTCTGACATAT
 +2244 GAGGTGGCGATCTACGAGAGCCTCGGTTGCTAATTAGAAACAAGGCTCATTGACTGTATTTGAGATGATATATACTAA
 +2323 TACCACATCAAAATTTCTCAACATACTGAGAATTCTATATTTGGTCCCAGCGAACATTGATGGGGGCCCGAGCATACT
 +2402 CTACGGTGACTACAAGATCATCGATCCATTGGGCCTGCCCTGCCTGAACGTCTACTAGGTACGCACGTACTCCATTATT
 +2481 ATGCGGGGATCTCCACCTCCCGGAGTCGAGATGATATGATCTGGTGAACACTCCTCAAAGAGGGGGCCTACCTTACAC
 +2560 GTGAGAGTGTCTCTTCCGAAGCCACTTTGTTGAGCTAGGTTGAGCGTTTCTTTAAGTTCACCGAGCGACCGAAAACG
 +2639 AGCAATTTCCGGTCGCACGGTGGATAAGGTTGGTTCTCATGAACGTTCCCTTCAAGTCCTTAGATTCAATGGGTTC
 +2718 CACCATATGCTGATAAGATT

Legende siehe Anhang F

Anhang C: *acyA*

(EMBL- bzw. SWISSPROT-Datenbanknummer: AJ276703, Q8J131)

-384 GGTATTATTTGCTCTGTGTATTCCCTACCTTCAACGAAACGAACCTTGCTATCGCATCCGACCATCTGGTCTTAATCG
-305 CACACGCCTCCGTACAACGCCCTCGTCGAGCTTTGATTTCCCTTCCCTCAACCTCCTCCTCATCGCTTCCCTCCGAGGCCG
-226 TTTGCTACATTCATGGTGGATTCTTCCCTGGCTCCGCCACTGCTGTGACACACGGGCTGATCCTCACTCCTGGCTGCC
-147 AAGATTGGGTAATATAACAGCATGTCACTGCGCGGAAGTGAGAATTCGCACAGAAGGCGCAGTTCTGAGAGCTCCGGGG
-68 CCCACAGCTTGTGTGTCGCAAGAAACCGTCAGAGAGATTCAAATCCTCGTCCGCTATACAACACAGTC
↗ mRNA
+1 ATG CCG AAT GGT CGT AGC AAT TCT CCT TTC CCT AGG TCT GCG GGC TTA GAG AG GTAAGAAA **As**
M P N G R S N S P F P R S A G L E R 18

+62 CAGTGCAGAAATTGATTTCTCTCCCGTTTCTTTTTCACCCATGTTGAATCGCTGGTATGCTTTTTGGAAATTTGGGGTAT
+141 GTAGACAGTCCGGTTGCGCGGCGAGGTTGACGAACATTGATTACCGGCTGTCACAACCTCAAATCCGCTTCAAATTTGG
+220 GGCTGTGGACTTTACCATTATGCTGGGCTTGATGTTGTGATGTCGGATGAAGTTCCGTGCCAGCATTTGTTCTCTGTTA
+299 TCTGCCAATACGGCGGGGTTTTTGTGGAAGTAACATGAGTGCTAACTACCTTTAG A TCT GCA TCT CAG GGT C
S A S Q G H 24

+371 AC AAC CAG CCA AGA CAA GGC TCT TCG AAT AAC TTA TAT TCT TCT ACT TTC TCG TGG AAC
N Q P R Q G S S N N L Y S S T F S W N 43

+430 TCG CCC GAT ATC TCA CAC ACA GAT CAG CGG AGA GGC GTT GGC AGG AAG GCT ATG GCG ACC
S P D I S H T D Q R R G V G R K A M A T 63

+490 TCC GGG GCT GAC GAT CCT GGG CCC CCA CCC ACG TCT AGC TCA AGC TCG AAA CAG TTG CAG
S G A D D P G P P P T S S S S S K Q L Q 83

+550 CTA AAT CCC AAC CAA ATC GAC TAC TTT CAT CAG AAC CCC AAT GCC TCC TGG TCA TCC TCC
L N P N Q I D Y F H Q N P N A S W S S S 103

+610 CCT AAG ATA GCC CCC ATG GAT AGC TCG GGA ACG TTC TCC CAT GAC TTC TCC GAA CAA GAG
P K I A P M D S S G T F S H D F S E Q E 123

+670 GCA TCA CCG GCA TCT GCC ACT TTC CGT CCT AGC ACC GGC CGG ACC TTC GCC AGT GAA CCC
A S P A S A T F R P S T G R T F A S E P 143

+730 GTG GAT TTT GAC TAC AAC AGA GAC GAC CGT AGA CCA TCG GTA GCC AGC GCC ACG ACA ATC
V D F D Y N R D D R R P S V A S A T T I 163

+790 AGC AGC CAG GGC TCG AAG TCC AGT ACA GGC GGC CGA TTC CGG AAG AAG TTG CAG GGT TTC
S S Q G S K S S T G G R F R K K L Q G F 183

+850 TTT GGC GAT GAA TAC CTC CCG CCA GGC GAA TCG AAA CAG GAG CAG GAA CAA GAT ACC CGA
F G D E Y L P P G E S K Q E Q E Q D T R 203

+910 TCG TTG AGC AGC AGG CCA GCC TCT ATT GAT CAC TTC AAA GCC CGC GAA AGA GCC AAT TCT
S L S S R P A S I D H F K A R E R A N S 223

+970 GAT GGC GCT CGA AAC TTC CCA GAA AGA TCC CAG GAT GAT ACT TCC TCA CTA CAT CCT TCA
D G A R N F P E R S Q D D T S S L H P S 243

+1030 AGA CCG CGA ACC CCG CTA CCA TCC AGT GAG ATT ACT CCA TGG TTG TAT CAA AGC TTC AAT
R P R T P L P S S E I T P W L Y Q S F N 263

+1090 GTAAGTTCATGACCCAATTGCCACATTGCAAGTGCCTTACATGTCGTCCTCTGTTTTGGAAATTTGGGGTT

+1169 TCTTATTTGTGACTATCATTAG GAC ATT CCG CAA TTT GGA GAA GCT CCT ATT CGA GAA GTC CCC
D I P Q F G E A P I R E V P 277

+1234 ATC GCC CCT GAA GGA AGT CGC CTT GCT GGT CAG ACT GCT ACG AAC TCA GGT GCG CCA AGA
I A P E G S R L A G Q T A T N S G A P R 297

+1294 GAA GCT CGG AGG CAC CAT GGC AGC CAC CGT CAT TCA CGA AGC AAG GAA GAA AAG CCG ACT
E A R R H H G S H R H S R S K E E K P T 317

+1354 GTC GCG GGT GAT CTT GCT GGT TAT CCA GCT CGT CCA GCT ACA GGA CGT GAT GAT TCT TAT
V A G D L A G Y P A R P A T G R D D S Y 337

+1414 CTC GGA TTA CGC CCC TTC CGA GAC CAT AGC CTA AAT GCC TCG ACA GCG ATG AGC TCA ACT
L G L R P F R D H S L N A S T A M S S T 357

+1474 ACC ACT CTC GGC GGT CGC TCT ACT AGC CCC ACG CCG AGT ATA CAG AGC GCC TAT TCT CGA
T T L G G R S T S P T P S I Q S A Y S R 377

+1534 GAA CAA AGC CAG AAC TCC CCC GGA GCG CCG TCC AAC AAG CGA TCG ATA CTG GAT AAA ATC
E Q S Q N S P G A P S N K R S I L D K I 397

Fortsetzung Anhang C: *acyA*

+1594	CGT CGT ACC AAA GCA CAT GGC CCC TTG AAG CAT TTT CCC GGA TCA AAA TCC GCG CAA GAA R R T K A H G P L K H F P G S K S A Q E	417
+1654	GCA TCA AAG TCT TCA TCG AAG CTC GCG CGG AGG GAG GCT TCT CCT CGA CGG GGC CGG CAA A S K S S S K L A R R E A S P R R G R Q	437
+1714	GGC AGT CTG GAA GGT GGC ACA TCT CTC AGA AAC CTG GAT CTA GGC GAT TAC GAG CGT CGA G S L E G G T S L R N L D L G D Y E R R	457
+1774	AAG GAC GGG AAA GGC ATT GTG ATG GGC TCC ACA AAG TTA CGA AAC CGG CGG GGC CTT GGC K D G K G I V M G S T K L R N R R G L G	477
+1834	AAT GAA GCG CCT CCT GGG AAG GAC GTC AAA CTT TCT GAG GAG CCT GGT GTT TGG AGG CTT N E A P P G K D V K L S E E P G V W R L	497
+1894	GAT ACA GAC CTT TCA CAC ATG GAG GGA ATC GTT AGC CAG CAA CCC CCT CCT TCT CCA GGC D T D L S H M E G I V S Q Q P P P S P G	517
+1954	GAC AAA AGC AAA GCT CAG GAT GGG GTC CCA CCA AAG CAT GAG GAA GGG AAG AAG TCG GAG D K S K A Q D G V P P K H E E G K K S E	537
+2014	GGC TTG CCT CCG GGT CAC TGG GAT GCT CCG GAG AGC TGG CAA GTG AAG AAG CAT GGG GAG G L P P G H W D A P E S W Q V K K H G E	557
+2074	GAT CTC GCT GCG CGG CTT CCA AAT GTG GCA AGT GAT GCG ACA GGT ATT GCA CGT GAG CCA D L A A R L P N V A S D A T G I A R E P	577
+2134	GAT GGG ACT TCA TAC TTC ATC CGG GTC TTT CGT ATT GAT TCC ACG TTT GCT ACG CTT TCA D G T S Y F I R V F R I D S T F A T L S	597
+2194	GCT GGC CTG AAT GCC ACC GTT GCA GAT ATC CTC CTT ATG CTT GGC CGA AAG TCT TTT CTT A G L N A T V A D I L L M L G R K S F L	617
+2254	CAG GAC CAC TTA AAC AAC TAT GAA ATC GTC ATG AAG AGG AAT GAT CTC TCT AGA CAG CTT Q D H L N N Y E I V M K R N D L S R Q L	637
+2314	GAT CAC TCG GAG AGA CCC ATT CTT ATG CAG AAG CGA TTG CTG GAG CAA GTC GGA TAC ACT D H S E R P I L M Q K R L L E Q V G Y T	657
+2374	GCC AAG GAT AGA ATT GAA GAG ATC GGT CGG GAA GAT CAC AGT TAC ATC TGC CGC TTC ATA A K D R I E E I G R E D H S Y I C R F I	677
+2434	TTC CTT CCA ACC AAG CTC AGT GGC TAC AGC AGT CTT GAC GGC GAT CCA GGA TTC AGC AGA F L P T K L S G Y S S L D G D P G F S R	697
+2494	ATG CAG AAG TTC AGT CAT GTG GAT CTT CAG GGT CGG AGT CTC GTC ACC ATT CCG ATC ACA M Q K F S H V D L Q G R S L V T I P I T	717
+2554	CTC TAC AAG AAG GCG TCC GAG ATT ATC TCA CTG AAC CTG TCT AGG AAT TTG TCC CTG GAT L Y K K A S E I I S L N L S R N L S L D	737
+2614	GTC CCC AAA GAT TTT ATC CAG GGT TGT ATC AAT CTA CGA GAG ATC AAG TTT ATT GGC AAC V P K D F I Q G C I N L R E I K F I G N	757
+2674	GAA GCT CGG CGT TTG CCA GCG AGT TTT AGC CTT GCA AGT CGG TTG ACT TAC TTG GAC GTG E A R R L P A S F S L A S R L T Y L D V	777
+2734	TCC AAT AAT CTC TTG GAG GAG CTT GGA CAT GCC AAT CTC GAC AGA TTG CAT GGC CTC GTC S N N L L E E L G H A N L D R L H G L V	797
+2794	AGT ATC AAA ATG GCC AAC AAC AAG CTA TCA GAG CTA CCG AGT TAC TTT GGG AAC TTT CAG S I K M A N N K L S E L P S Y F G N F Q	817
+2854	TAT CTC AGA AGT CTC AAC ATC TCC TCC AAC AAC TTC CAA GTC TTT CCT TCA TTC CTC TGC Y L R S L N I S S N N F Q V F P S F L C	837
+2914	AAT TTG AAG AGT CTT GTG GAT CTT GAT ATC AGT TTC AAC AAT ATC GCT GAG CTG CCA AAT N L K S L V D L D I S F N N I A E L P N	857
+2974	ATC GGA AAA CTG GTG ACA CTG GAA CGG CTC TGG ATG ACG AAT AAT ATG CTG AGC GGC CCA I G K L V T L E R L W M T N N M L S G P	877
+3034	TTG GAT GAG ACA TTC AAG GAC CTC GTT AAC TTG AGG GAG ATT GAT GCG CGC TTT AAT GCC L D E T F K D L V N L R E I D A R F N A	897

Fortsetzung Anhang C: *acyA*

+3094 ATT ACC AAC ATA GAC ATT CTG GCT CAA CTC CCT CGA CTG GAG CAA CTG CTG ATT GGG CAT
I T N I D I L A Q L P R L E Q L L I G H 917

+3154 AAT GCA GTC TCG AAA TTT AAA GGG TCA TTC CCG AAA CTG CGG ACT TTG CTC CTC GAT CAT
N A V S K F K G S F P K L R T L L L D H 937

+3214 TGC CCA ATG ACG CAG TTT GAC ATT GAT GCA CCA GTG CCA ACC CTG ACC TCG CTC AAC ATT
C P M T Q F D I D A P V P T L T S L N I 957

+3274 GCC TCC GCC AAG CTT GTA CAA TTC CGG GAT TCA TTG TTC GAG AAC CTG CCC AAC CTG ACC
A S A K L V Q F R D S L F E N L P N L T 977

+3334 AAA CTG ATT CTT GAT AAG AAT CAT TTT GTT TCC ATG TCA CCG CAT ATT GGA AAA CTT CGT
K L I L D K N H F V S M S P H I G K L R 997

+3394 CGG CTG GAG CAC TTC AGC ATG ATC AAA AAC CCC TTG GCT GCG CTC CCT GCC ACC ATT GGA
R L E H F S M I K N P L A A L P A T I G 1017

+3454 TGC CTG ACG GAA CTT AAA TAT CTC AAC CTC AGG GAA TGC AAT TTG AGA AGG CTG CCC GCC
C L T E L K Y L N L R E C N L R R L P A 1037

+3514 GAA ATT TGG CAC TGT GCG AGA CTG GAG ACC CTC AAC GTC TCG TCA AAC GTG CTG GAC AGC
E I W H C A R L E T L N V S S N V L D S 1057

+3574 TTT CCC AAA CAC GGC AGT TCT CCG CCT CAG CCA CCT ACC GAC ACG GGA ATT ACG CCT GCA
F P K H G S S P P Q P P T D T G I T P A 1077

+3634 GCG ACT CCA GGG GGA GCT ACA ACA CCA AGT TAT GAA GAA CTC GGT CCT CTT CAG GAG CAA
A T P G G A T T P S Y E E L G P L Q E Q 1097

+3694 GAT GGG CTA GAA ACA CGT CGA CCC AGC CAA ACG TCG GGA GGC TTT ATC AGC TCC GGA GGC
D G L E T R R P S Q T S G G F I S S G G 1117

+3754 TCA CCA AAT GAT GGG ACC TAT CGC AAA CCG TCC GTT GCT TCG TCT CTG GGC CAA AGC GGG
S P N D G T Y R K P S V A S S L G Q S G 1137

+3814 AGA AAA GTG TCG GCA GCT TCT CGA TCG GGT ACC GAG GGC AGC CCT TCT TCC AGG AAA GAT
R K V S A A S R S G T E G S P S S R K D 1157

+3874 TCA AAC TTC TCC CAG CAC GTG GCG TCA ACG TTT GCC GGC TCG CTA CGA AAT TTA TAT CTT
S N F S Q H V A S T F A G S L R N L Y L 1177

+3934 GCC GAC AAT CGT CTA GAA GAC GAT ATT TTC CGA GAG CTT TCC TTG ATT CCA GAG TTG CGC
A D N R L E D D I F R E L S L I P E L R 1197

+3994 GTT GTT AAC CTG TCG TAC AAT GAA TTG ACC GAA CTT CCG CAG GGC TTG CTC AAG CGC TGG
V V N L S Y N E L T E L P Q G L L K R W 1217

+4054 CCG TTC CTG ACC GAG TTG TAC CTT TCG GGC AAT GAG CTG ACT TCG CTT CCT TCT GAT GAT
P F L T E L Y L S G N E L T S L P S D D 1237

+4114 CTC GAG GAA GGC AGT AAC CTC AAA GTT CTC AAC CTG AAT GCG AAC CGG TTC CAG GTA CTG
L E E G S N L K V L N L N A N R F Q V L 1257

+4174 CCA GCA GAA CTC TGC AAG GTC AGC AAA CTT GCA ATC TTA GAT GTT GGC AGC AAC GCC TTG
P A E L C K V S K L A I L D V G S N A L 1277

+4234 AAG TAT AAT GTG TCC AAC TGG CCG TAC GAT TGG AAC TGG AAC TGG AAT CGG AAT TTG AAA
K Y N V S N W P Y D W N W N W N R N L K 1297

+4294 TAC CTC AAT TTC TCT GGG AAC AAG CGC TTG GAG ATT AAA CCA AAC ATC ACC TCG GCG GGA
Y L N F S G N K R L E I K P N I T S A G 1317

+4354 ACG ACC ACC GCC AAT GGA ACC GAC TTA ACT GAT TTC AAC TCT CTT ACC CAT CTC CGT GTT
T T T A N G T D L T D F N S L T H L R V 1337

+4414 CTC GGT TTG ATG GAT GTC ACA CTG ACA ACA CCC ACC ATT CCT GAG GAG AAC GAA GAT CGA
L G L M D V T L T T P T I P E E N E D R 1357

+4474 CGT GTC AGA ACG TCT GCT TCA CTT GCT GGG TCT CTG GCT TAT GGC ATG GCC GAC TTT TTG
R V R T S A S L A G S L A Y G M A D F L 1377

+4534 GGT AAA AGC GAG CAT TTG TCC ATC ATC GAT ATG ATC GTT CCA CGT CTG AAG CCG GAC AAT
G K S E H L S I I D M I V P R L K P D N 1397

Fortsetzung Anhang C: *acyA*

+4594 GTG GAA ACG CTT GTA GGG TTG TTT GAT GGC CAA GCC CAG TCA ACT GGG GGT TCT AGG ATT
V E T L V G L F D G Q A Q S T G G S R I 1417

+4654 GCC AAG TTT CTG CAT GAG AAT TTC ACC TCA ACC TTC TCT TCC GAG CTT AAA AGG CTA CGA
A K F L H E N F T S T F S S E L K R L R 1437

+4714 GTG GAA GAA GAA GAA ACA CCG CTT GAT GCA CTG CGG CGG ACA TTC TTG GCG CTG AAC AAG
V E E E E T P L D A L R R T F L A L N K 1457

+4774 AAT ATG GCT GCT GCT GCC TAC AAA TCT ATC GAC GAC CGT AGT GTT CGG CAA TTT CAC AGA
N M A A A A Y K S I D D R S V R Q F H R 1477

+4834 GGA TCC CCA GCT ACG AAA CTT CTC AAT CAA GAC GAT ATA CGG TCT GGT GGG GTT GCA ACG
G S P A T K L L N Q D D I R S G G V A T 1497

+4894 GTG TTG TAT CTG AAT AAC ATG GAT CTA TAT GTC GCC AAC GTT GGT GAT GCA CAG GCA ATT
V L Y L N N M D L Y V A N V G D A Q A I 1517

+4954 CTT GTG AAG TCA GAC GGG ACG CTG AAG TAC CTA ACC AAG AAT CAT GAT CCT GCA GAG CCC
L V K S D G T L K Y L T K N H D P A E P 1537

+5014 CAT GAG CGG GCG AGA ATC CGG GCT GCT GGA GGA TTT GTC TCT CGC AAC GGA AGA CTA AAC
H E R A R I R A A G G F V S R N G R L N 1557

+5074 GAC ATT CTT CAT GTG TCA AGA GCC TTT GGA CAC TTT CAG CTG ATG CCC GCA GTC GTT GCA
D I L H V S R A F G H F Q L M P A V V A 1577

+5134 GCG CCC CAC ACC ATG CAT GTG CAG TTG ACT GAA CAG GAT GAG ATG ATC ATA CTG GCA TCG
A P H T M H V Q L T E Q D E M I I L A S 1597

+5194 AAG GAA TTG TGG GAC TAC GTG ACG CCA GAC GTG GTG GTC GAT GTC ACC AGA GCG GAG CGT
K E L W D Y V T P D V V V D V T R A E R 1617

+5254 AGA GAC CTC ATG ATT GCC GCT CAG AAA ATC CGG GAC CTG GCG ATA TCC TTT GGT GCT AAC
R D L M I A A Q K I R D L A I S F G A N 1637

+5314 AAT AAA CTC ATG GTG ATG ATT CTC GGC GTG AGT GAC CTA AAG AAG CGG GAG AAG TTC AAG
N K L M V M I L G V S D L K K R E K F K 1657

+5374 TTT CGT GGA ACA AGC CTC TCG ATG GGG CCT CCT GCT TTT CCC GAG GAA CAA ATC ATC CCT
F R G T S L S M G P P A F P E E Q I I P 1677

+5434 AGC ACG AAG CGT ACC AAG AAA CCG CGT GAC ATG CCT GGC GAT TCG AGA CTC GCC CGC TTC
S T K R T K K P R D M P G D S R L A R F 1697

+5494 GAT TAC GTG GAT GCC CCT ATT GGG GAG TTG GCC ATC ATC TTC ACA GAT ATT AAG AAG TCC
D Y V D A P I G E L A I I F T D I K K S 1717

+5554 ACA AGT CTG TGG GAG ACA TGT CCC GAC GCG ATG CGC TCT GCA ATT CAG ATA CAT AAC GAC
T S L W E T C P D A M R S A I Q I H N D 1737

+5614 ATC CTT CGT CGA CAA CTT GGA ATC ATT GGT GGC TAC GAA GTC AAG ACT GAA GGT GAC GCT
I L R R Q L G I I G G Y E V K T E G D A 1757

+5674 TTT ATG GTC GCT TTT TCC ACC ACC ACA GCA GCC CTA CTC TGG TGT TTC AAC TGC CAA ACC
F M V A F S T T T A A L L W C F N C Q T 1777

+5734 CAG CTT TTG GAG GCC GAA TGG CCT ACC GAA ATC CTT GAA CAG CCT CAG TGC CAG GTC CAG
Q L L E A E W P T E I L E Q P Q C Q V Q 1797

+5794 TAC GAT ATG GAG AAC AAC ATC ATC TTC CGG GGT TTG TCT GTC CGC ATG GGT ATA CAC TGG
Y D M E N N I I F R G L S V R M G I H W 1817

+5854 GGA GAG CCT GTC TGT GAG AAA GAT CCT GTC ACT AAT CGC ATG GAT TAT TTC GGA CCC ATG
G E P V C E K D P V T N R M D Y F G P M 1837

+5914 GTC AAC CGC GCA TCG CGT ATT TCG GCA GTA GCC GAT GGT GGC CAG ATT TTC GTC TCG TCC
V N R A S R I S A V A D G G Q I F V S S 1857

+5974 GAC TTC ATG AGT GAT ATT CAG CGC AAC CTT GAA GTG TAC GCT GAT AGC GAA CGA GCT GCT
D F M S D I Q R N L E V Y A D S E R A A 1877

+6034 TCT ACT GGC TCG GAG GAA AGC TAC GCG GTA GAT AGT CTG GGA TAT AAT ATT CGA CGT GAA
S T G S E E S Y A V D S L G Y N I R R E 1897

Fortsetzung Anhang C: *acyA*

+6094 CTT CAG CAA CTC AAC AGC CAA GGA TTC GTC ATC AAA GAT CAA GGT GAA CGA AAG CTG AAG
L Q Q L N S Q G F V I K D Q G E R K L K 1917

+6154 GGC CTG GAG AAT CCG GAG CCA CTC TAT CTC ATC TAC CCT CAC TCG CTT TCC GGG CGA TTG
G L E N P E P L Y L I Y P H S L S G R L 1937

+6214 ACC ACG TTG GAA CAA GCG GAA GCA AGA GAG AAC GGC CCC ACG ACC ATA AGT AAA CAC TCC
T T L E Q A E A R E N G P T T I S K H S 1957

+6274 GAG CTC GAA ATT CAG GCG GAT CTC ATA TGG CGC CTA TGG GAG CTC ACT CTT CGC TTG GAA
E L E I Q A D L I W R L W E L T L R L E 1977

+6334 AGA CTA TGC GGT GCG CTG GAG AAT CCA GGT GAA GCG CGA CTG AAG GAG CCG AAC GTC GCT
R L C G A L E N P G E A R L K E P N V A 1997

+6394 TTG TTC AAT CTG GTC AAG AAT CAT GGT GGC GAG CTG GCT GAT TCG ACG GTG GTG AGT CTA
L F N L V K N H G G E L A D S T V V S L 2017

+6454 GTC GAG CAG CAG GTC ACT CGC ATC GAG *GTTAGTCCACAACCTTTGATCCCTCTAGCTTCTTTTTTCTTTA*
V E Q Q V T R I E 2026

+6524 *CTTCTCCTTCTTGATTTTTCTCAAACTGACATTTGATGCCTCATTACAG* ATG AAC GTT ACG ACC CTC TCG
M N V T T L S 2033

+6595 GTG CGA TAC ATG CTG AAG CCC TTC AAA CCT GGT GAC AAA CTA AGT GAC CAC GCC GTC CCT
V R Y M L K P F K P G D K L S D H A V P 2053

+6655 ATT GGT GTG GTG ATG CAA CAA CTA CAA ACC CAA CTT GCC GAA TAC AGA GCG CTC AAG GAA
I G V V M Q Q L Q T Q L A E Y R A L K E 2073

+6715 CAA CTG GCT GTC GGT GGT GCG GGC ATC ACT GGT GTG TCA TCC AGC TCT CCA GGA GCT GAA
Q L A V G G A G I T G V S S S S P G A E 2093

+6775 GGT CAG GAT ACT GGC GAG AGC GAT CCC AGC TCC GCG TCT TCG TCC TTC CTC CAA CTT GCT
G Q D T G E S D P S S A S S S F L Q L A 2113

+6835 ACA TCC TCA GAG TAG CGGTATCTTACATGA
T S S E * 2117

Legende siehe Anhang F

Anhang D: *pkcR*

(EMBL- bzw. SWISSPROT-Datenbanknummer: AJ277652, Q96UX3)

-1909 CTTGAAAGACACGGCGCTCCAGTAAGTATCACTAAGGCGAATCTATCCCTACTTACTTACTCTGTAGAAAAGAAGCATA
-1830 CCGTGAACCAATCGCACCTAGGCATTAGTCTTCAAGCCCAGCATTGATCTTGTGTAATCAACCATCCATCTGGGGCAG
-1751 AAGCTACCTAGTAAACGAGACATCCATCCATGGGCGGAAGCTCAGCAAGAACCAGAAACTCTCAAAGAGTTAGAATGTA
-1672 GTGGCAACTCTTCCACTGGGACGACACTCAGCGGTACTTTGTTACCACAAATCCATGAAGATCCAGAACCAGATATTC
-1593 GTCGTAGACGTAGCGATTATTTAGCGTTTGATACTCATGACCTCACCAGATTGGAGCTGATAGCTTTTCACCACACA
-1514 ATTTTCATCATCACTTCAAGCCCTATTCGGGTGGAAAGCTATACTGAGAGTAGGCATAACTACGGAGTTAATTATGTG
-1435 AAAACTTCTTCTATCATATTTCCCTTTTCCATCCCTTATGTGGCAATCTAGATATCAGCGGAGCCCTTCGGG
-1356 AACGTCTCTTCCCGTAAACTGTTAGTCTGTTTTTAGGCCCGTTCAAACGTTCTAGAAGACACCTGGAAAGGAGTCAC
-1277 ATTCATTAGAACTTCCGTCCCATGATTTTCATTGTTGGCTTTTCCTCGATAACTAGATGGACCAGGATCAAGTCGGA
-1198 TGGATCCCTTTCTGAACTAGGCGTTGATTGTTCCCTCCTTAACTCTTATCGTCTGTTCAAGGCCAGACTATTGCAGA
-1119 ATACACCATCGACTATTGGCGTAGTGTATGGTCTAGCAGGGGCAATCCGTGACGTGATCAAACCTGGTGTGATACAG
-1040 GAGCCGGCAGCTTGTCTACAGTCTGCTCGCATGATCATGAGTAGATTTTATGGCAGATAGCTAGGTAGATGAGGA
-961 ACACACTCGACACCTAAAAGGAGAGACTCTTTAAATATGATTTGCTCTTAGAAATTGATCGTCTCTGGGAGATGT
-882 AGAAGCACAAGCCATAGCAAGCTTCCGTCACATCTGCTACTCCCGCCTTTTCCACTGATTTCCCTCTCTCTTTCT
STRE
-803 GCGACCCCTCTGGATCAGTTTATTAGGTATTGCTCCTCTCCCATCTTCTTTCCACCTTGCTCAGAGTTCCCTCTATT
STRE STRE
-724 TTCTCATGCCTCTTTCCCTCTCTCCCTCCTACTACTACCCCTGCCCTATCTGCTTGGACGGTCTCACCTCGGCTA
STRE STRE
-645 CCGGGCGTCGTCTCTCTGAACTCCTTGTGTGGCTTACTCAGAGTCATCATACTCCATCTTCTTCCAGCCACCCATC
-566 AATATAAGAGACAGAGTTAGGTCCGTAGCTCCATTCCATTTTCTCAAGCTTCAACCTTCCCTTTTCCAGTGTGTA
-487 CTTGCTGTTTATCATCTTCTTGTCCAATACTTCTGTTTCAAATTTGTGCACGCACTTGTTCCTCTCACTGAAACACAAA
-408 AAATTGCAATGAGCGTCTGCTACTGTCATTACTCAAAGAGAAGGGTTATAGAAGGAAGCATAACGATCATCTTCGGAT
STRE
-329 TGCTGCGTCTTAAACTCTCCAATTAGGCTTCACTTTGAGATACCCACCCAGTCTTTCAGCGGGGACGGTTGCTGTGTGT
-250 GCCTTTCAACTCCGCCCCCTCCACCCTATCTTCTGCTGCTTCAACTTCGACATCTCTCCTCCATTGAAGAACTTCAT
STRE
-171 CTACTATCTTCCCAACTGGACCTCAAGTCTGTCTTCCCTTGTCTTAACTCCTACAGACCCTTTTCGTCTCTGCTCTT
-92 CCACCAGTCTGCCCACAACAACCAAGCTCTCCACTTCCCGCTCCAAGTTGGTCGGAAGTGTACCATCTCCGGCT
-13 TACAGCCAACAGG

+1 ATG GCT GAT AGC TCT TCT TTC CCG GGT ACA AAC CCG TTC CTT AAG GTC AGC ACG AAA GAC **As**
M A D S S S F P G T N P F L K V S T K D 20

+61 GAC AAA TAT TCC CCG ATC CAG AAG ATA TCC GAG GAG GAA GAA TAT GAG GTG ACG TCA CCG
D K Y S P I Q K I S E E E E Y E V T S P 40

+121 ACC GAT CCC ACT TTC CGC AGC GCG CAC TCC GGG GCT ACA GCA CCC ACT GCT GGA AAC TCG
T D P T F R S A H S G A T A P T A G N S 60

+181 TTC AAT GGA GAC AAT GGC TCC AAC GAA GGT GGT GAG GGA ATA CAG TTC AAT AGG CCC TTT
F N G D N G S N E G G E G I Q F N R P F 80

+241 GAT GCA GGA TTT GGT CAG GGG AGC GAA GGT CAA GGC GAA CAC GTC GAG CCT CCC GGA GGA
D A G F G Q G S E G Q G E H V E P P G G 100

+301 GCT CGC CCA ACG GCA GCC GCC AAC CAA GGG TTC CCT AAC AAC TAT GCT CTC GGC CGT CGT
A R P T A A A N Q G F P N N Y A L G R R 120

+361 ACC TCT GTA TCC GCC GAG TCC CTG AAC CCT ACC TCT GCT GGC TCA GAT AGC TGG ACG CCC
T S V S A E S L N P T S A G S D S W T P 140

+421 CCA TGT CAT CCG AAG ACC GAA GAA CAG CTT TCG CGT TTG AAA ACG GCT GTG AGC AAC AAT
P C H P K T E E Q L S R L K T A V S N N 160

+481 TTC TTG TTT TCT CAC CTG GAC GAC GAC CAA TTC AGG ACT GTA CTT GAC GCT TTG GTT GAA
F L F S H L D D D Q F R T V L D A L V E 180

+541 AAA CCC ATT CCT GCG AAA GAT ATC AAG GTG ATT TCG CAG GGA GAT GCC GGT GAT TAC TTT
K P I P A K D I K V I S Q G D A G D Y F 200

+601 TAC ATA GTG GAG AAT GGC CAT TTC GAT GTC TAC ATC AAC CCC GCG GGC TCA GTC CAA CCA
Y I V E N G H F D V Y I N P A G S V Q P 220

+661 GGC CCC GAT GGT ATT GGC AAC AAG GTC AGC ACC ATT GGT CCT GGA GGC TCC TTT GGT GAA
G P D G I G N K V S T I G P G G S F G E 240

+721 CTA GCC TTG ATG TAC AAC GCG CCC CGA GCC GCG ACT ATT GTC TCA GCA GAC CCC AAG AGC
L A L M Y N A P R A A T I V S A D P K S 260

+781 ACG CTT TGG GCT TTG GAC CGC ATC ACT TTC CGC CGG ATT CTC ATG GAC TCT GCC TTC CAG
T L W A L D R I T F R R I L M D S A F Q 280

Anhang E: *pkaC1*

(EMBL- bzw. SWISSPROT-Datenbanknummer: AJ297841, Q8J129)

-1094 GGAATAGTGCCGGTTGGGCACAACAGGCCCGGAAGCGGGGCTTCGGGGGATCCGCTGGGGGTAATGAAGTCACCAAG
-1015 CTAGAGGCTTCGTAGGGTCTATCTAGAGAGGTTACTGCTGGATGGAATCGAGATATTTGACAACCTGACCTCTGGTAGGTA
-936 TAAAATGGGTTGAACTTTGACAGTATATCAAAGGCCGTACCAGTGGTGGAGTAATCCAGCGGCAACAGGGCCTGAAG
-857 TTGTGGTGGGCCAGTCATGATCTCAATGAATGGTACATGGTCCCGGATGTCGAAGGATCTAATATTGAGTGATGATCTC
-778 ATAGTGCCTGAGAGGTTACTCTCCACTCTCTCCGTAGATCTTCACGAAAATGGACTCAATGGCTCTTAGATGATGCGA
-699 ATCTAGAGCGAGATTATATGCAGTGTAGTTTCTCACCGACTGGCTATTCGGGAGAATGATTTGTTTGAAGACGTAGATAG
-620 GGTCGAACAAATGAGTGAGATGAGTGAGTACTATATAGGTACTCTGCAGAGACAATTATCCCACTTAAATGAAACCT
-541 TACAACAACGCTATATTATCATCATCACATCCCTTATCATCCGCAAGTAAGGGCATCATCATCATCATCTTGACTA
-462 TGAAGTACTCCCTCCCAACCCCTTTGGCTTTGCTTCCATTTACTCGGTACCATCTAAGATATAATCTACAAGAGGACAT
-383 TGGGCATTGCGATCAATTGACCTTGTGATATAAGAGGAAAGCCACGAAACAAAAGAAAGCAGCAATCACTCAATCTTCC
-304 GCCCACTTTTGCTCGAACGTTGGAGTGTCTGTTTACACACGATCGGGCGGTCGATTGACTCCATCTGGTCGTCTCTA
-225 GCCCCAGGAGGCGTCCGCACCATCTCTTGCTCCCTCGTGTCTTGTGTCTCCCCCTCTTTGACGCTTCCCCCTCC

↗ mRNA

STRE STRE STRE STRE

-146 CTACCCCCCAAGCCCCAAGAGAAGGGGTTGATTTGCTCACACAAAACCTCCCGCACCCCTAACCTACCCTGCCACT
STRE STRE STRE STRE

-67 CACCAATCCTATGGTCCATGTTTACCTTATCTCTGACCTCTTATACTTTTAACTCTCGTTTTCCTCG

+1 ATG CCG ACT TTA GGA GGT CTC TTG AAG AAA CGG CGG ACA AAG GAT TCG CAT ACC CTC TCT **As**
M P T L G G L L K K R R T K D S H T L S 20

+61 AAA GAA CTG GAA TCA AGT TCG TCA CCC GCA GCA GCC CAG ACA CAG ACG TCA CCC AAC TCT
K E L E S S S S P A A A Q T Q T S P N S 40

+121 GCC GAC CAC GAC CAC CAC TAC CAG CAC TAC GAT CAA ACC CAC CAT CAT CAA CAT TCG GCC
A D H D H H Y Q H Y D Q T H H H Q H S A 60

+181 AGC AGT AAC CCC AGC AAT AAT TCC GCA ACT CCC TCT GCT GCT CAG CCT CAT CGC TCA TCC
S S N P S N N S A T P S A A Q P H R S S 80

+241 AAC GAC AAC CCC AAT CGC TCT TCA GGT ACA GAT CAA AAA TCC GAA GGT CAA ACT GCC TCC
N D N P N R S S G T D Q K S E G Q T A S 100

+301 ATG CAA TTC GCC GTG ACG CAA CCC CAT CCC TCC ACC CAC CAC AAC CCG CGC CTC CAC CAC
M Q F A V T Q P H P S T H H N P R L H H 120

+361 CTA CAA CAA CAG CCA
L Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q P 140

+421 CAA CAA CAA TCC CAT ACC TCC AGG TTA CAC AAT ATA CTT CAC CCC TCT CAT CAT GCG TCT
Q Q Q S H T S R L H N I L H P S H H A S 160

+481 TCA CAG GCT TCT ACC GAA GGT CAT GCA CAC TCC CAG CAG GCC AAT CAG ACT GAA GCC CGC
S Q A S T E G H A H S Q Q A N Q T E A R 180

+541 ACT ACG AAA GGG AAA TAT TCC CTA GAC GAT TTC ACC ATA CAA CGT ACT CTA GGT ACT GGT
T T K G K Y S L D D F T I Q R T L G T G 200

+601 AGT TTC GGT CGT GTC CAT TTG GTG CAG TCG AAA CAC AAT CAT CGC TTC TAT GCG ATC AAG
S F G R V H L V Q S K H N H R F Y A I K 220

+661 GTT CTG AAG AAG GCG CAG GTG GTC AAA ATG AAA CAG GTC GAG CAT ACG AAT GAC GAG CGA
V L K K A Q V V K M K Q V E H T N D E R 240

+721 CGA ATG CTC AAT CGT GTC AGG CAT CCA TTC CTG ATC ACA TTG TGG GGT ACC TGG CAA GAT
R M L N R V R H P F L I T L W G T W Q D 260

+781 GCA AGG AAT CTG TAC ATG GTA ATG GAC TTT GTG GAG GGC GGA GAG CTC TTT AGT TTA CTT
A R N L Y M V M D F V E G G E L F S L L 280

+841 CGC AAA TCT CAG GTGAGTGCTCTTCGCGTCCATATCAATGCAAGTTTTGGTAGGCTGATGTCATGGACCCGTTGC
R K S Q 284

+916 AG CGG TTC CCA AAC CCT GTC GCC AAG TTT TAT GCG GCC GAG GTG ACT CTT GCA CTG GAG
R F P N P V A K F Y A A E V T L A L E 303

+975 TAT CTA CAC TCT CAG CAG ATT ATC TAC CGG GAC CTG AAG CCT GAG AAT CTG CTG CTG GAC
Y L H S Q Q I I Y R D L K P E N L L L D 323

+1035 CGG CAC GGC CAC CTG AAG ATC ACC GAT TTT GGG TTC GCG AAG GAG GTA CCT GAT ATC ACA
R H G H L K I T D F G F A K E V P D I T 343

+1095 TGG ACT CTT TGC GGA ACG CCC GAT TAT CTT GCT CCA GAA GTT GTT TCG TCC AAG GGA TAT
W T L C G T P D Y L A P E V V S S K G Y 363

Fortsetzung Anhang E: *pkaC1*

+1155 AAC AAA TCG GTT GAT TG GTAGGCATTC CCTTCAATGCGTTTTGCGTTTCCATTGGCTGACTAGAGCCAAG G
 N K S V D W 369

+1226 TGG TCA CTT GGA ATT CTT ATC TTC GAA ATG TTG TGC GGC TTC ACA CCC TTC TGG GAC AGT
 W S L G I L I F E M L C G F T P F W D S 389

+1286 GGC TCG CCC GTC AAG ATC TAC GAG AAC ATT CTC CGC GGC CGT GTC AAG TAC CCG CCC TAT
 G S P V K I Y E N I L R G R V K Y P P Y 409

+1346 CTT CAC CCA GAC GCC GTC GAC TTG CTC TCG CAG CTC ATC ACA GCG GAT TTG ACA AAG CGA
 L H P D A V D L L S Q L I T A D L T K R 429

+1406 CTG GGC AAC CTT CAT GGA GGT TCC GAA GAT GTG AAG AAC CAC CCT TGG TTT GCG GAA GTC
 L G N L H G G S E D V K N H P W F A E V 449

+1466 ACC TGG GAT CGT CTT GCA AGA AAG GAC ATT GAT GCT CCT TAT GTT CCT CCT ATC CGT GGA
 T W D R L A R K D I D A P Y V P P I R G 469

+1526 GGT CAG GGT GAT GCC AGC CAA TAC GAT CGG TAT CCC GAG GAG ACT GAA CAA TAC GGT CAG
 G Q G D A S Q Y D R Y P E E T E Q Y G Q 489

+1586 CAG GGC GAA GAT GT GTATGTGTTCCAGTTGCGAATCATTCTCGATCAGAGTACTAACC GAAACTCTTGCTACAG
 Q G E D V 494

+1660 G CAT GGC CAT CTT TTC CCA GAC TTC TAG TGCAATATACGACATTTGATAGAGCAATGAACAATTGGTAA
 H G H L F P D F * 502

+1729 TTGTTGACTGGAGATGGCCACGATACAAATGCACTAGCCTCCACTCTAGGCTCCAAATAAAACTGCTCTGTTCACTATT
 +1808 GTCTTGAAGATCGTGTCTGTCCACGACACTAATATGTCTCGTACTCACCCATGATGCTCCAGGCTCGCAAACGTGCC
 +1887 AGGAGCATGCGTGTGGGGCTCTTTTACATTCTACTTCTGCAAAAGTTTTGTGGCTTGACATGGACTGATCCTTACCTT
 +1966 CTTTCGACATTGACGCATCTGAGAGATACTCTTGAATTCAGGGTGCCAATATTATGTTCTTCTATTGCGTTCGACGC
 +2045 TTTAGCCTTTGAACATGTCGGTGGTGTTCGCTCGGACAACATTTTTGTCGACTACTTGGATCCTGGGAGACCGGACTCG
 +2124 TCATTGTTTTTCGCCTTATGTATATCTTCTCAAGACGTGGACAGCGTGCAAGCCATCCATGTCATTTTTTCGTCTCT
 +2203 CTTTCGCTGGCACACCTGATCGGGTGTGTTGTTACGAGTACGGGATGAAGGTCGCTCCTGGCCTCATCCATTGTC
 +2282 TTTCTATCTGCGTCGATTTTCGTCTTCGGTCTGTATAATGTACATATCTTCGATGTCTTGAACAAGTGGAAAAGGCAGG
 +2361 CGCCAAATCTGAATATTATCAGATGCAGACCAATCGTCTTCCATTCGAGTGGCTGGCAATCAGTCTCGGAGGCTCTGCC
 +2440 GCGTCGTCTTTAATTTTAGACGAGTACTCTACAGAATAGTCTCCACCTGTCACCCTGTATATAGTATTGTACAGAAATC
 +2519 TTACCGGTTGAAGGTCACGGCAAGAAAAGCAACGCCTTTTTGAAGTACCGCAAACCATTTGAAGCAGGGGGCGAGAA
 +2598 AAACACCAAGAAATCTCGTAATGTTGCAGTCACGGACACAATCAGCCTTCAACTCCCTCCTCAACAAATATCAAGCTTC
 +2677 GATGCGCCAGTGTCTACAGGCTGGATTTCCAGATTGAACAAACGATGCGTCGAGGGCACCACCACCGTACGCCTTCCT
 +2756 CTCGTTTCGCGAGACGCGCAATGTAGCCACGGCTGACTGCGTTCAGAAAGGAGATGACTTCTCCATGCACTGCGAAAGA
 +2835 CACGTGTGTTTCGGCGGAGGAGTGTGTGCCGGGGTTGGGAATGCAGGCTTCGAAGCAGTGTCTGTTGACTTTCTACA
 +2914 TGCGGGGTGAAAACCATCCTTGGTCAGCTTGGTTTGATCCAATGTGCGATCTGGTAGGTTACATACACCGATCAGATTC
 +2993 CGGGCGTTGGTCACGGCGCTTCTTGCCGCACTTGGTTCATGAGGTGGGTTTT

Legende siehe Anhang F

Anhang F: *pkaC2* (EMBL- Datenbanknummer: AJ575357)

-784 ATTTGTGCTAACTGCTGTCAGACTAATTGTGCGGTCTCATCCTCAACTCAAAGAGCAAATAGATCCCTCCCCCTCCGCGCT
STRE

-705 TCGAACCGAATCAATGATGTGCTTGCAACTCGAAGTACGTCTAAAGCGACGTGCATAACTGCGCAGGTACCTCATGGTG
-626 TTACATAACTGCGTAGCCAAATTCATAAGTTTCTTGGTATGGTAAAGGCGCACCGGGGCTTCCTTGGCGCAAGGGACTA
-547 TTCTGCGCGTGTGACCTTTTAGAGGCTTGTCCGTATGACTCCTGAGGGCCTTCTTGTACTAGTGCCTACTTCACATTC
-468 CTGGACATGAAGATGTATCCAACAGCTCTGTGTTTGTATCTCCAAAAATACCATGGCTATTCGGAGATAGCGTCAGTTGT
-389 AGTCATAAAAACCATGCAACAACCGGGATCTGTCCGATCACGCTAGTGGTGCATGCCGAGTCGTTGACAGGCTGCCCG
-310 CCAGTCGGTAACGTCAGAGCCTTAGGTGCTCCGTGGACGCCCATGGACCATTGCTGCTTGGTTCCGCGGCCAGAAAA
-231 GACGAACTTCAGCAAAAAGCTCTTACCTCCCATGAAGGATTGATCAAGGCTTGGCTGGCATAATTGAGCATTTCACAGG
-152 CAGTTTAAATGACCGATCTTCCAATTTCTGCCTGCTTTGGCCAGTAGCCTTCGAAATCGCAGTTGTCGTCACAACAACAG
-73 CTCTGTGGCGTCTTTTTTTTACCCACATCCATTCCCGCTGTGCTCGAGACATGATCTCTTGCATCCCA

+1 ATG GCT ACA GGA AAG GCC GAG CCT TCG ACA CAT AGT GAG ATT CCG AGC TCC TCT CCG CCA **As**
M A T G K A E P S T H S E I P S S S P P 20

+61 TCG AGA GGG GTG GAC ACT CCT TTG GAA GAC GTT CAG AAG AGA GAA AAG CAG ATG GTT GCG
S R G V D T P L E D V Q K R E K Q M V A 40

+121 TCC TTC CGA CCC CCT CAC CAG AGA TCG GTG AAT CCT TTC GTC ATT AAA GAT CGG CTG GAG
S F R P P H Q R S V N P F V I K D R L E 60

+181 GAA AGG CAG CTG GGG ATA TCA ACT CGG ACC CTT TGC GTT AAT GAT TTT ACG CTA ATC AAA
E R Q L G I S T R T L C V N D F T L I K 80

+241 ACA CTT GGT ACT G *GTAAGTCTCGACGCAAGTGGCGAGGTCTGCAGTGCGCCATGTTGACACCGCTGGGGTGCAT*
T L G T G 85

+315 *CCAG GT ACC TTT GCT CGG GTG TGG CTG GCG AAA TTC AAA GAC GAA ACG ATC CGG CGG GAC*
T F A R V W L A K F K D E T I R R D 103

+375 AAT GTG TAC GCG CTA AAG GTT TTA CGC AAA GCA GAT G *GTGAGGATGCATGTGCAAGCTTCTATCCG*
N V Y A L K V L R K A D V 116

+441 *CATCTTTGGCCGGGCTGACGGGCGAGATTCTGGGATTATAG* TG ATC AAG TTG AAG CAA GTG GAG CAT GT
I K L K Q V E H V 125

+510 G CGC AAT GAG CGA AAA GCA CTT GCT GCG GTT GCC GGT CAC CCT TTT ATC ACG ACT CTG A
R N E R K A L A A V A G H P F I T T L I 145

+569 TC GCG TCA TTT TCC GAT GAA CAG AGC CTA TAT ATG CTG *GTATGCAAGCCACCGCTTGTGAAGA*
A S F S D E Q S L Y M L 157

+635 *AACGACCTTCCCATGCCCTTTCTTCTGCTGGACCACGTCCCGTCGTATTTTCATTGGTACCCTCGTCTGACCTTGTTCT*

+714 *CTACATAG CTG GAC TAC TGT CCC GGA GGT GAG ATC TTC AGC TAT CTT CGG CGT GCG CGG CG*
L D Y C P G G E I F S Y L R R A R R 175

+775 A TTT AAC GAG ACT ACC TCG AGA TTC TAT GCC GCC GAG ATC ACG CTA ACG ATC GAG TAC C
F N E T T S R F Y A A E I T L T I E Y L 195

+834 TT CAT GAC GTT GAG GGC ATC GTT TAC CGT GAT CTG AAG CCG GAA AAC ATC CTC TTG GAC
H D V E G I V Y R D L K P E N I L L D 214

+893 GCT GAC GGG CAT ATT AAG CTG GTC GAC TTT GGA TTC GCA AAG CAG ATC AAC GAT CGC GAG
A D G H I K L V D F G F A K Q I N D R E 234

+953 ACG TAC ACG TTA TGC GGC ACT CCG GAG TAC CTA GCT CCT GAG GTC ATC CAC AAC AGC GGT
T Y T L C G T P E Y L A P E V I H N S G 254

+1013 CAT GGC CTC GCT GTG GAC TGG TGG GCT CTC GGG ATC CTC ATC TAC GAG TTT TTG GTT GGG
H G L A V D W W A L G I L I Y E F L V G 274

+1073 CAG CCC CCG TTC TGG GAT CAG AAC CCG ATG CGC ATC TAC GAA CAG ATT GTC GAG GGT CGC
Q P P F W D Q N P M R I Y E Q I V E G R 294

+1133 TTG CGT TTT CCT CCA AAC ATG TCG CCG GCA GCC CAG AAC ATC ATA TCA TGT CTC TGC AAG
L R F P P N M S P A A Q N I I S C L C K 314

+1193 ACC AAT CCG AGT GAG CGG CTT GGC CAC ATC TCA GGT GGC TCT GCG AGA GTC AAA GCG CAC
T N P S E R L G H I S G G S A R V K A H 334

+1253 CCC TTC TTT GAG GAC ATA GAT TGG GAT GAC TTG TTC CAC CGG CGC ATG AAA GGC CCC ATC
P F F E D I D W D D L F H R R M K G P I 354

Fortsetzung Anhang F: *pkaC2*

```

+1313 ATC CCG CGA GTT GAC CAT CCC GCA GAT ACC GGA AAC TTC GAG GAC TAT CCC GAC GTA GAC
      I P R V D H P A D T G N F E D Y P D V D 374
+1373 GTG AAG GGT CAG GCC ATT TAC ACC GAC GAC ATG AAA AAG AAA TAC GAA GCT TTG TTC AGC
      V K G Q A I Y T D D M K K K Y E A L F S 394
+1433 GAT TTC TAA GGCAGTGATTCCAACGGGACACCAGTCCCTTCCCCTGATACACATTCAACATGAGAATCATTGTAA
      D F * 396
+1509 AACGTCAGGATGTCGCCACGACCTATCTACGCTTATACGGAACGCTCCTGCCACGACGTTACGAATTCTTGTACTATC
+1588 GTTTTGCAACAGTTTCATAAGGCCTGCAACCGCCACCAGTCCATACCCACCAATCCATACATCTATATATAAGGAGACA
+1667 GCGCAGTGCTGCCTTCATTTCTCGACTTATTGATGACACATAATCCGTCCTTTCTTCTCCGCATGTGTCACGATGTAC
+1746 AACGCAATCTGTCCTCATTTGCCTATATAATATACATCTGATGTCTCTCATTGGGACTTTGTGAACTTGCTTTGCGTGTC
+1825 CATCTGTCGCATCGTCTGGGCTATATTCTGATTTTTGGAATGTAATACCCACAGGCTCATGGAGGCGGGATGAGTGAA
+1904 GATCTCAGCAGAAACTGGGCTGGTTGAATATATGGCTACAGCTACTTGCGGCATCCTGTACATGCAAACATTCTCCAA
+1983 TGGTCTCTGCCATTGAATGCACCGGGGAATACAAGGACAATTCGCCCTTCTCTGATCACATAGTCTATTTGATATTC
+2062 TGTATATGCAACGTATGATCTGTTCATGAATAGTAGAGGAACGACCAGGCAATAAGGTCGCTGACCGGAATGGATCAGG
+2141 GGTGGTCAATGCCATGCTATCACCCAGTCGATTTTCAAATGGTAAGGAGAGTGCCACCGAATACATCCGCTCTTCTCC
+2220 TTGTTCTAGATAGAACACATAGGCGGCCCGTAAAAGCGACAGGCAGCGCTGTGTTTGGACCTGGTTGGAAAAACCCAA
+2299 GCCACGCTTCTAGGACGAATCCGTACTTTCCAAGGCCGACATGCACGCATCCGAAATGGAATCCATATTAGATCCCACA
+2378 ACGGCGTCGGATTGGGCGCTTTTGAGTGACATCTCATTATTGAGAGTAGGCTCACTAAGGT

```

Die Sequenzen der *A. fumigatus* Gene *gpaA*, *gpaB*, *acyA*, *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2*. Intronsequenzen sind kursiv dargestellt. Unterhalb von kodierenden Sequenzabschnitten ist der Aminosäure-Code angegeben. Transkriptionsstartpunkte sind, sofern experimentell nachgewiesen, mit einem Pfeil über dem Start-Nukleotid kenntlich gemacht. Die Nummerierung links bezieht sich auf die Nukleotidposition im Bezug auf das Initiationscodon. Auf der rechten Seite ist die Nummerierung der Aminosäuren (As) innerhalb der abgeleiteten Proteinsequenz angegeben. In den Promotorbereichen der Gene *pkaR*, *pkaC1* und *pkaC2* sind potentielle „Stress Response Element“ (STRE) -Bindestellen unterstrichen und mit STRE gekennzeichnet.

Teile dieser Arbeit gingen / gehen in folgende Veröffentlichungen ein:

Liebmann, B., Gattung, S., Jahn, B. & Brakhage, A.A. (2003) cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene *pksP* and in defense against killing by macrophages. *Mol Gen Genom* **269**: 420-435.

Liebmann, B., Müller, M., Braun, A. & Brakhage, A.A. (2003) The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Eingereicht.

Liebmann, B., Mühleisen, T.W., Hecht, M., Braun, A. & Brakhage, A.A. (2003) Deletion of the *Aspergillus fumigatus* gene *lysF* encoding a homoaconitase involved in lysine biosynthesis strongly reduces virulence in a model of invasive pulmonary aspergillosis. In Vorbereitung.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank...

... Prof. Dr. Axel Brakhage für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an einem überaus interessanten Thema arbeiten zu können, welches genau meinen Vorstellungen entsprach. Weiterhin danke ich ihm für sein fortwährendes, stets von Optimismus geprägtes Interesse an der Weiterentwicklung des Projektes, das in mich gesetzte Vertrauen sowie die mir gebotene experimentelle Freiheit, nicht zuletzt während der Umzugsphase der Arbeitsgruppe nach Hannover.

... der Abteilung Immunologie des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie und Experimentelle Medizin, besonders Dr. Matthias Hecht, Dr. Meike Müller, Dr. Armin Braun, Sabine Schild und Olaf Macke, für die Weitergabe ihres „know how“ und die sehr gute Zusammenarbeit während der Tierversuchsreihen.

... PD Dr. Bernhard Jahn für die enge Kooperation bei der Durchführung der Makrophagen-Versuche sowie für sein Interesse an meiner Arbeit und die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft.

... Yvonne für die optimale technische Unterstützung bei nicht immer schönen, aber nie langweiligen Experimenten.

... Matthias für interessante Anregungen und Diskussionen an der Laborbank.

... den Alt-Darmstädtern Maria-Louise, Sybille, André, Stefan, Markus, Stephe, Corina und Thomas für die entspannte Arbeitsatmosphäre und zahlreiche Hilfestellungen.

... allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Universität Hannover, vor allem Hella, Venelina, Claudia, Katrin, Astrid, Michael, Dr. Plattner ..., für die vielen kleinen Begebenheiten und Hilfen, die den Arbeitsalltag auszeichneten.

... Kim für zahllose Hilfeleistungen und vor allem für die Freundschaft jenseits von Pilzen und Aspergillose. Er wußte zwar schon alles über Hockey, aber jetzt vielleicht auch etwas mehr über Fußball.

... meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und ihre Unterstützung.

Mein herzlichstes Dankeschön gilt Peggy für ihr Vertrauen und den Rückhalt, den sie mir gibt, sowie für ihre Geduld und Ausdauer besonders während der räumlichen Trennung zwischen Darmstadt und Hannover.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Hannover, den 13.10.03

Burghard Liebmann

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Burghard Liebmann
Geburtsdatum: 02.05.1975
Geburtsort: Dessau

schulischer und beruflicher Werdegang

1981 - 1983 Oberschule in Dessau-Mildensee
1983 - 1990 Oberschule in Vockerode
1990 - 1991 1. Oberschule mit Leistungsklassen in Dessau
1991 - 1993 1. Gymnasium „Philanthropinum“ in Dessau
10/1993 – 09/1994 Grundwehrdienst in Perleberg
10/1994 – 07/1999 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/1998 – 07/1999 Diplomarbeit „Molekularbiologische Analyse von Genen der D-Prolin-
Reduktase aus *Clostridium sticklandii*“ in der Arbeitsgruppe von Prof.
Dr. Jan R. Andreesen
10/1999 – 10/2003 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof.
Dr. Axel A. Brakhage; wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt, am Institut für Mikro-
biologie der Universität Hannover und im SFB 587 der Medizinischen
Hochschule Hannover