

Marc Jens Seidler
Dr. sc. hum.

Functional Genomic Studies of *Aspergillus fumigatus* Biofilm Formation

Geboren am 12.04.1976 in Heidelberg
Diplom der Fachrichtung Angewandte Chemie / Biotechnologie am 16.12. 2004 and der FH
Mannheim für Technik und Gestaltung

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Frank-Michael Müller

The opportunistic pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* is an increasing cause of morbidity and mortality in immunocompromised and in parts in immunocompetent patients. The virulence of *A. fumigatus* is exhibited by the production of fungal proteins promoting mycelial growth into the lung parenchyma or by structural features of the conidia that confer resistance to the host's antifungal properties. In this work it was demonstrated that *A. fumigatus* can grow in multicellular communities on plastic surfaces and bronchial epithelia cells by the production of a hyphal network within a self produced ECM. The growth of the biofilm can be classified into an attachment phase where conidia attach to the substrate, an early phase with beginning of sporulation, an intermediate phase with first hyphal structures and beginning of the production of the ECM and a mature phase with a dense hyphal network and maximum ECM gluing together the hyphae into strands that strengthen the structure additionally. Antifungal resistance profiling showed that these multicellular communities are more resistant against antifungals than their planktonic counterparts. Functional genomic studies using oligonucleotide microarray and 2D gelelectrophoresis displayed a higher energy conversion in biofilm growth. The results suggest that, with the beginning of ECM production, reactive oxygen species are produced being responsible for a higher risk of inflammation and invasiveness in patients. Additionally, virulence factors are activated, e.g. the pyridoxine in intermediate *A. fumigatus* biofilm or core elements of the signalling pathway that play a role in virulence and are involved in antifungal drug resistance. Of potential relevance are the regulations in the ergosterol pathway or the rodlet hydrophobins that are build up on the surface layer of *A. fumigatus*. The Rod-genes are also found to be a component of the ECM in *A. fumigatus* biofilm. A second factor may be the regulations of MFS and ABC transporters. These transporters influence the development of antibiotic resistance mechanisms. These findings indicate that with the beginning of ECM production antifungal drug resistance may occur. *A. fumigatus* can produce toxins, mainly gliotoxin. Therefore the gliotoxin cluster is an interesting pathway being possibly involved in *A. fumigatus* biofilm formation. Genes and enzymes of the gliotoxin synthesis pathway were upregulated and later confirmed by Real-Time PCR and HPLC. Gliotoxin is immunosuppressive, which is directly contributed to a higher virulence and can be found in the sera of patients suffering from chronic *Aspergillus* infections. Future studies will show, in which way gliotoxin is important for biofilm formation and how its secretion affects the lungs of chronically ill patients suffering from *A. fumigatus* colonisation.

Der opportunistisch pathogene Schimmel *Aspergillus fumigatus* ist zunehmend der Grund für Morbidität und Mortalität bei immunsupprimierten und teilweise bei immunkompetenten Patienten. Die Virulenz von *A. fumigatus* zeigt sich durch die Produktion von Proteinen des Pilzes, welche das Wachstum des Myzels in das Lungenparenchym begünstigen, oder durch strukturelle Eigenschaften der Konidien, die Resistenz gegenüber der Pilzabwehr des besiedelten Wirts aufweisen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *A. fumigatus* als vielzellige Gemeinschaft auf Plastikoberflächen und Bronchialepithelzellen wachsen kann, indem der Pilz ein Hyphennetzwerk mit selbstproduzierter extrazellulärer Matrix ausbildet. Das Biofilmwachstum kann in eine Adhärenzphase, in der die Konidien auf das Substrat anhaften, in eine frühe Phase, mit beginnender Aussprossung, in eine Zwischenphase mit ersten Hyphenstrukturen und Beginn der Produktion einer extrazellulären Matrix, und in eine ausgereifte Phase, mit dichtem Hyphennetzwerk und maximaler extrazellulärer Matrix, die die Hyphen als Stränge zusammenklebt und somit die Struktur weiter stabilisiert, eingeteilt werden. Die Profilerstellung der Antimykotikaresistenz zeigte, dass diese multizellulären Gemeinschaften eine höhere Resistenzentwicklung gegen Antimykotika aufweisen als ihre planktonischen Pendanten. Die Studien der funktionalen Genomik mittels Oligonukleotid-Arrays und 2D Gelelektrophorese zeigten einen erhöhten Energieumsatz im Biofilmwachstum. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass mit Beginn der Produktion von extrazellulärer Matrix reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die für ein erhöhtes Entzündungs- und Invasivitätsrisiko bei Patienten verantwortlich sind. Zusätzlich sind die Gene von Virulenzfaktoren reguliert, z.B. Pyridoxin als potentieller Virulenzfaktor in Biofilmen der Zwischenphase von *A. fumigatus* oder Kernelemente der Signaltransduktion, die eine Rolle in der Virulenz spielen und an der Resistenzentwicklung gegen Antimykotika beteiligt sind. Eine mögliche Relevanz könnte die Regulation von Genen im Ergosterol Signalweg oder dem Signalweg der Rodlet-Hydrophobinen darstellen, die auf der Oberfläche von *A. fumigatus* gebildet werden. Zusätzlich wurden die Rod-Gene auch als Bestandteil in der extrazellulären Matrix von *A. fumigatus* Biofilm gefunden. Ein zweiter Faktor könnten die Regulationen der MFS und ABC Transporter sein. Diese Transporter beeinflussen das Entstehen von Resistenzmechanismen gegen Antibiotika. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit dem Beginn der Produktion der extrazellulären Matrix Resistenzen gegenüber Antimykotika auftreten könnten. *A. fumigatus* kann Toxine produzieren, hauptsächlich Gliotoxin. Daher stellt der Cluster der Gliotoxingene einen interessanten Signalweg dar, der möglicherweise an der Bildung von *A. fumigatus* Biofilmen beteiligt sein könnte. Gene und Enzyme des Gliotoxinsynthese Signalwegs waren hochreguliert und wurden später mittels Real-Time PCR und HPLC bestätigt. Gliotoxin wirkt immunsuppressiv, das damit direkt einen Beitrag zu einer erhöhten Virulenz leistet und im Serum von Patienten mit chronischen *Aspergillus*-Infektionen nachgewiesen werden kann. Weiterführende Untersuchungen werden zeigen, in welcher Art und Weise Gliotoxin für die Biofilmbildung wichtig ist und wie sich die Sekretion auf die Lunge von chronisch kranken Patienten auswirkt, die mit *A. fumigatus* kolonisiert sind.