

# mikrobiologie

## David gegen Goliath

Entwicklung neuer antifungaler Wirkstoffe und Strategien

Dr. Dirk Müller-Hagen und Prof. Dr. Vera Meyer  
Fachgebiet Angewandte und Molekulare Mikrobiologie,  
Technische Universität Berlin

**Wo der Laie nur ekligen Schimmel sieht, offenbart sich beim Blick durch das Mikroskop eine ganz besondere Welt der Ästhetik. Ein filigranes Netzwerk aus lang gestreckten und verzweigten Pilzhypen durchsetzt das Substrat, Lufthyphen erobern den Luftraum und bilden farbige Sporen, mit denen das gesamte Farbspektrum abgedeckt werden kann (Abb. 1). Wir Forscher sprechen daher lieber von Hyphenpilzen als von Schimmelpilzen.**





Hyphenpilze haben mittlerweile alle Bereiche menschlichen Lebens erobert. Als Lebensmittelproduzenten nutzen wir diese schon seit der Frühzeit. Als Edelschimmel im Schimmelkäse oder als Edelfäule bei der Herstellung hochwertiger Beerenauslesen sind sie unsere unverzichtbaren Begleiter. Eine immer bedeutendere Rolle spielen Hyphenpilze in der industriellen Produktion. Pilzliche Produktionsstämme finden sich in der großtechnischen Herstellung von Feinchemikalien, Proteinen und bioaktiven Wirkstoffen wie Enzymen und Antibiotika. Neuerdings machen sich Hyphenpilze auch als Fleischersatz einen Namen. Unter der Bezeichnung „Quorn“ steht dem Verbraucher ein proteinreicher und dabei fett- und cholesterinärmer Fleischersatz zur Verfügung.

Wo Licht ist, da ist auch Schatten. Befällt *Botrytis cinerea* bei trockenem, warmem Wetter die reife Weinbeere, so ermöglicht dies die Herstellung von hochwertigem Beerenauslesen. Erfolgt der Befall dagegen auf der unreifen Frucht, so entwickelt sich die Rohfäule mit erheblichen Ernteausschlägen als Konsequenz.

## Die Herausforderung

Pilzliche Infektionen sind generell auf dem Vormarsch. Sie entwickeln immer ausgeklügeltere Strategien, um die tödliche Wirkung von Fungiziden zu umgehen. Als Schädling in der Landwirtschaft führen sie zu Ausfällen, die nicht selten bis zu 50% einer gesamten Ernte betreffen können [1]. Nicht zuletzt ist auch der Mensch Ziel pilzlicher Infektionen, insbesondere invasive Mykosen lassen sich nur noch schwer therapieren. Die Verbreitung von Resistenzen gegen vorhandene Antimykotika, zumeist aus der Gruppe der Azole, resultiert in einer gestiegenen Mortalitätsrate. Zudem sind verfügbare Antibiotika oftmals von schweren Nebenwirkungen begleitet. Neue Antimykotika erreichen kaum noch die Marktreife. Es steht zu befürchten, dass wir den Wettlauf gegen pathogene Pilze verlieren werden.

## Auf der Suche nach neuen antifungalen Wirkstoffen

Unsere Gruppe sucht nach biologischen Wirkstoffen, die spezifisch das Wachstum von Hyphenpilzen hemmen, jedoch für Mensch und Umwelt unbedenklich sind. Dabei interessiert uns nicht nur die Frage nach dem Wirkort und dem Wirkmechanismus dieser Substanzen, sondern wir versuchen auch zu verstehen, welche Verteidigungsstrategien Hyphenpilze nutzen, um die tödliche Wirkung von Antimykotika zu umgehen. Wir gehen davon aus, dass uns die Kombination beider Fragestellungen ein umfassendes Verständnis antifungaler Überlebensstrategien liefert. Mit diesem Wissen können neue zelluläre Targets identifiziert oder vorhandene antifungale Substanzen optimiert werden. Um antifungale Verteidigungsstrategien zu untersuchen, bedienen wir uns eines antimikrobiellen Peptids (AMP), das wir aus dem Hyphenpilz *Aspergillus giganteus* gewinnen, dem Antifungalprotein AFP. AMPs sind Teil des natürlichen Abwehrmechanismus aller lebenden Organismen und verfügen über ein breites antimikrobielles Spektrum. Sie wirken gegen Bakterien, Pilze und Viren und gehören zum antibiotischen Reservoir der Natur. Als positiv geladene, amphipathische Peptide haben sie eine Länge von nur sechs bis 100 Aminosäuren. Basierend auf ihrer Sekundärstruktur werden sie in vier Hauptgruppen eingeteilt: 1.  $\beta$ -Sheet, 2.  $\alpha$ -helical, 3. loop und 4. extended protein. So verschieden ihre Struktur, so verschieden ihre Wirkmechanismen: Sie können die Integrität der Zellmembran stören, die DNA, RNA oder Proteinsynthese inhibieren, die Quervernetzung von Zellwandpolymeren unterbinden, die Funktion von Chaperonen blockieren sowie Mitochondrien zerstören. Die Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.umc.edu/AP/main.php>) verfügt derzeit über 2253 Einträge zu AMPs aus verschiedenen Organismen.

Das für uns interessante Antifungalprotein AFP besteht aus 51 Aminosäuren. Fünf antiparallele  $\beta$ -Sheets, stabilisiert durch vier Disulfidbrücken, formen eine fassartige Struktur, die so genannte  $\beta$ -Barrel-Topologie. Diese tertiäre Struktur verleiht dem AFP eine außergewöhnliche Resistenz gegenüber hohen Temperaturen und Proteasen. Eine positive Nettoladung wird durch zwölf Lysine gewährleistet, die zur Ausbildung einer kationischen Domäne an der Oberfläche des Proteins beitragen (K9, K10,



### Your Approach to Quality.

Zur Erfüllung nationaler und internationaler Qualitätsnormen sind die UFAG LABORATORIEN AG der Partner für Unternehmen in den Bereichen Lebensmittel und Pharma.

100 Mitarbeitende erbringen alle erforderlichen Dienstleistungen für standardisierte Verfahren und für individuelle Problemlösungen. Die UFAG LABORATORIEN sind zudem Lohnhersteller für Sprühprodukte für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie.

**UFAG LABORATORIEN**

UFAG LABORATORIEN AG  
Kornfeldstrasse 4  
CH-6210 Sursee  
Telefon +41 58 434 43 00  
Telefax +41 58 434 43 01  
info@ufag-laboratorien.ch  
www.ufag-laboratorien.ch

Akkreditiert nach  
ISO 17025,  
GMP-zertifiziert und  
FDA-anerkannt.

# mikrobiologie

K32). Durch eine benachbarte hydrophobe Domäne (Y29, Y30, Y45, Y50) erhält das Protein seinen amphipathischen Charakter (Abb. 2). Das AFP ist für uns von besonderem Interesse, da sein Wirkspektrum ausschließlich auf Hyphenpilze beschränkt ist, darunter so bedeutende landwirtschaftliche Schädlinge wie Fusarien (Abb. 3) und humanpathogene Aspergillen. In unseren bisherigen Untersuchungen zeigten sich Hefen, Bakterien und Pflanzen resistent gegenüber AFP, selbst in Säugerzellen zeigen sich weder zytotoxische noch immunogene Effekte des Proteins [2].

## Survive or not to survive

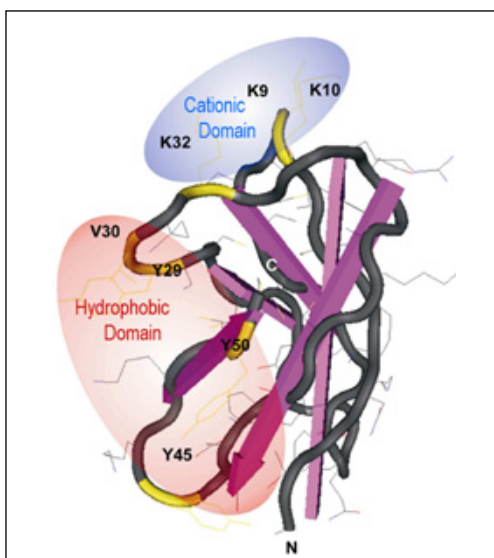
Was unterscheidet AFP-sensitive von AFP-resistenten Organismen? *A. niger* ist ein AFP-sensitiver Pilz. Bei einer minimalen Hemmkonzentration von nur 1 µg/ml treten zuerst apikale und subapikale Verzweigungen auf – der Pilz versucht, die Hemmung des polaren Wachstums durch Neubildung von Hyphenspitzen zu umgehen. Trotzdem: Die Hyphenspitzen schwellen an, um schließlich zu platzen [5]. *A. niger* hat den Kampf gegen das AFP verloren. Elektronenmikroskopische und immunofluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass AFP bei

sensitiven Pilzen hauptsächlich an die Zellwand bindet und zu einem geringen Teil an die Plasmamembran. Es kommt zu Membranveränderungen in Form von Einstülpungen, bis sie schließlich permeabilisiert wird. Bei resistenten Pilzen wurde AFP dagegen im Zellinneren lokalisiert [3, 4]. Wir konnten Chitin sowie die Chitinbiosynthese als potenzielle zelluläre Targets von AFP ausmachen [5]. Chitin, ein Polymer aus  $\beta$ -1,4-verlinkten N-Acetylglucosaminen, stellt bei Hyphenpilzen einen Anteil von bis zu 30% der Zellwandtrockenmasse dar. Bei resistenten Hefen sind dies nur 1–2%, Bakterien,



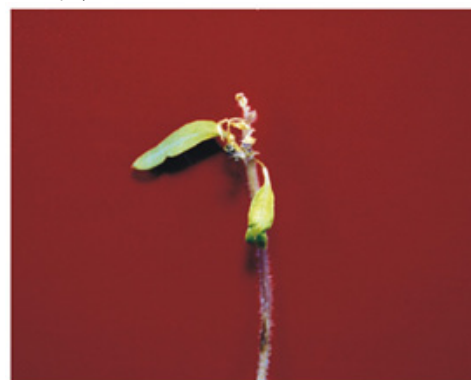
**Abb. 1** Der Lebenszyklus des Hyphenpilzes *Aspergillus niger*. Aus einer Spore entsteht ein junger Keimling (A), bei dem das Wachstum auf die Spitze beschränkt ist, sodass lang gezogene Zellfäden entstehen, die Hyphen. Diese verzweigen sich und bilden den Vegetationskörper, das Myzel (B). Wenn die Nährstoffe im Medium aufgebraucht sind, wird der Luftraum erobert – es

bilden sich Lufthyphen, an deren Enden die vegetativen Sporen abgeschnürt werden (C). Ihre Farbe bestimmt unsere Farbwahrnehmung der Pilzkolonie, die wir dann mit bloßem Auge erkennen können. Im Falle von *A. niger* sind die Sporen braun-schwarz (D).



**Abb. 2** Dreidimensionale Struktur des AFP aus *A. giganteus*. Der amphipathische Charakter wird durch das Zusammenspiel einer kationischen und einer hydrophoben Domäne bestimmt. Die fünf antiparallelen  $\beta$ -Sheets des Proteins sind durch lila Pfeile dargestellt.

**A)** Tomatenpflanze infiziert mit *Fusarium oxysporum* ohne AFP



**B)** Tomatenpflanze infiziert mit *Fusarium oxysporum* mit AFP



**Abb. 3** Protektive Wirkung des AFP auf Tomatenpflanzen, die mit dem Schädling *Fusarium oxysporum* infiziert wurden. Die Wurzeln von Tomatenpflanzen wurden für zehn Tage in Nährmedium mit 100 µg/ml AFP (rechtes Bild) oder ohne AFP (linkes Bild) inkubiert. Danach wurden die Medien mit AFP-freien Nährmedien ausgetauscht, welche jedoch mit Sporen von *F. oxysporum* versetzt wurden. Nach weiteren zehn Tagen Inkubation zeigte sich eindeutig, dass eine Vorinkubation der Pflanzen mit AFP vor einer Fusarieninfektion schützt [3].



# MP Biomedicals

*Visit our booth at Biotechnica and Discover*

*Our BRAND NEW Solution in  
SAMPLE PREPARATION*



**HALL 9  
STAND A28**



**Hannover**

**8-10 October 2013**



[www.mpbio.com/sampleprep](http://www.mpbio.com/sampleprep)

MP Biomedicals Europe, Tel: 00800 7777 9999 • email: [custserv.eur@mpbio.com](mailto:custserv.eur@mpbio.com)



# mikrobiologie



**Dirk Müller-Hagen**, geb. 1967, studierte Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin und promovierte dort 2004. Von 2006 bis 2010 war er Scientist bei der PolyPhag GmbH. Nach einigen Monaten Elternzeitpause war er von 2011 bis 2012 Scientist bei der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. Seit 2011 ist Dirk Müller-Hagen zusätzlich tätig als freier Consultant Mikrobiologie/Pharma und seit 2012 Senior Scientist am Fachgebiet Angewandte und Molekulare Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin.



**Vera Meyer**, geb. 1970, studierte Biotechnologie an der Universität Sofia und der Technischen Universität Berlin, wo sie 2001 promovierte. Nach Forschungsaufenthalten am Imperial College London und der Universität Leiden habilitierte sie 2008 an der Technischen Universität Berlin. Von 2008 bis 2011 war sie Assistenzprofessorin am Fachgebiet Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Leiden. Seit 2011 ist Vera Meyer Professorin für Angewandte und Molekulare Mikrobiologie an der Technischen Universität Berlin. Sie ist vielfach national und international in Wissenschaftsorganisationen engagiert. 2005 erhielt Sie Hochschullehrer-Nachwuchspreis der Dechema, im März 2013 wurde sie in den Vorstand der Fachgemeinschaft Biotechnologie der Dechema gewählt.

Pflanzen und Säugerzellen enthalten gar kein Chitin. Dies wäre eine Erklärung, warum das AFP spezifisch für Hyphenpilze ist.

Der Mechanismus der Chitinbiosynthese in Hyphenpilzen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Generell geht man davon aus, dass zymogene Chitinsynthasen mithilfe spezialisierter Mikrovesikel, den Chitosomen, zur Hyphenspitze transportiert und dort erst proteolytisch aktiviert und in der Plasmamembran verankert werden. Nach der Aktivierung katalysieren sie die Polymerisation von N-Acetylglucosamin zum  $\beta$ -1,4-verknüpften Homopolymer Chitin. Die Chitinmoleküle werden daraufhin über die Plasmamembran transloziert, verbinden sich zu Mikrofibrillen und assoziieren mit weiteren Komponenten der Zellwand. Hyphenpilze verfügen über Chitinsynthasen der Klassen I – VII, dabei sind die Chitinsynthase III, V und VI und VII spezifisch für Hyphenpilze, während Hefen nur über die Klassen I, II und IV verfügen. Chitinsynthasen der

Klasse III und V sind insbesondere deshalb interessant, da sie essenziell für das Aufrechterhalten des polaren Wachstums in Hyphenpilzen, und für die Virulenz gegenüber Pflanzen und Säugerzellen sind und möglicherweise spezifische Targets von AFP sein könnten. Werden sensitive Hyphenpilze mit AFP konfrontiert, bei denen die Chitinsynthase III deletiert wurde, zeigt sich eine starke Verminderung der Suszeptibilität gegenüber dem Wildtyp – also ein deutlicher Hinweis auf eine Bedeutung der Chitinsynthase im Zusammenhang mit der Abwehr gegenüber AFP [5].

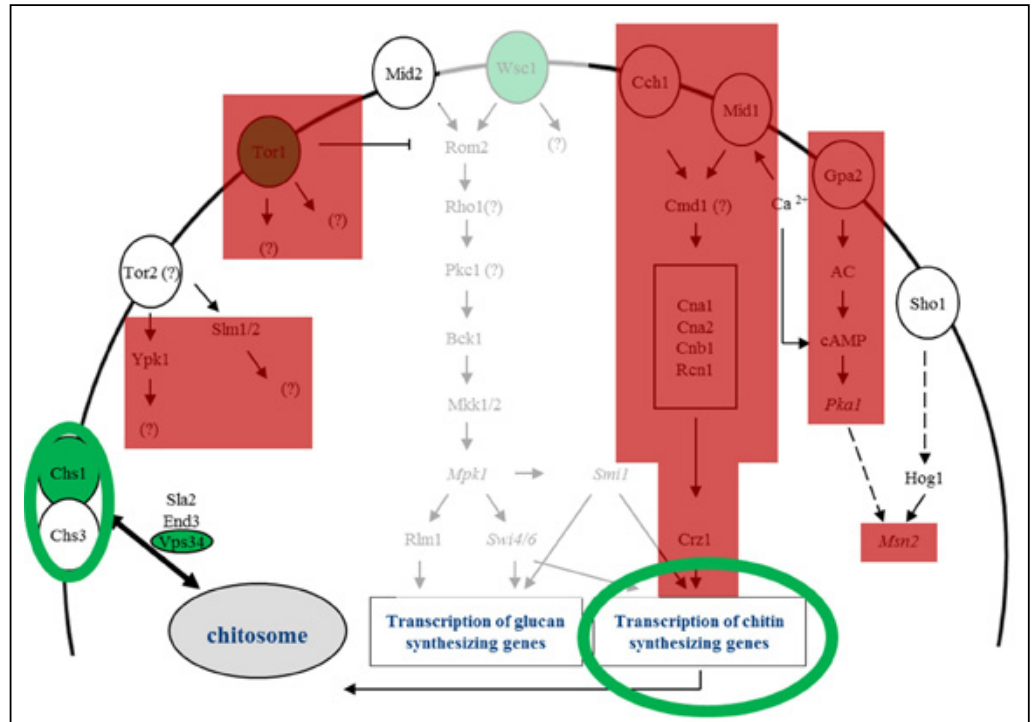
## Alles eine Frage der richtigen Antwort

Warum sind nun aber einige Hyphenpilze AFP-sensitiv und andere AFP-resistent? Prinzipiell liegen einer Resistenz gegenüber einem beliebigen AMP zwei unterschiedlichen Möglichkeiten zu Grunde. Entweder

fehlen dem resistenten Organismus das bzw. die AMP Target(s) oder er verfügt über eine erfolgreiche Verteidigungsstrategie. Verteidigungsstrategien gegenüber AMPs sind z.B. das Maskieren der Oberfläche durch einen Umbau der Zelloberfläche, das extrazelluläre Abfangen des AMP durch spezielle Oberflächenstrukturen, eine Expression spezifischer Proteasen oder auch die Modifikation der intrazellulären Targets. Voraussetzung solcher Verteidigungsstrategien sind Signalkaskaden, die es der Zelle ermöglichen, die Anwesenheit des AMP zu erfassen, dies als Stresssignal zu interpretieren und intrazellulär weiterzuleiten, so dass daraufhin das zelleigene Verteidigungssystem aktiviert wird.

Wie ist das nun im Falle des AFPs? Durch eine Interaktion des AFPs mit Chitin bzw. der Chitinbiosynthese wird Zellwandstress auf den sensitiven Pilz ausgeübt und die Integrität der Zellwand gestört. Zellwandstress löst in Hefen und Hyphenpilzen den so genannten „Cell Wall Integrity (CWI) Pathway“ als Antwort aus. In der Folge wird der Transkriptionsfaktor RlmA aktiviert und induziert die Expression der  $\alpha$ -1,3-Glucansynthase, um den Anteil an Glukanen in der Zellwand zu erhöhen [6]. Diese Antwort wird bei einer Konfrontation von *A. niger* mit AFP beobachtet [7]. Nun zählt *A. niger* aber zu den AFP-sensitiven Pilzen. Wieso also führt die Aktivierung dieser Verteidigungsstrategie mit dem Ziel, die Integrität der Zellwand wiederherzustellen, ins Leere? Ist dies möglicherweise die falsche bzw. eine nicht ausreichende Antwort? Um dieser Frage nachzugehen, haben wir uns die Reaktion eines resistenten Pilzes, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, auf das AFP angeschaut. Unser Gedankengang: Kann ein AFP-resistenter Pilz AFP-sensitiv werden, wenn seine Verteidigungsstrategien ausgehebelt werden? Wenn ja, dann können wir aus diesen Experimente Rückschlüsse für die überlebenswichtigen Antworten bzgl. des AFPs ziehen. Dazu haben wir aus einer genomischen Deletionsbank von *S. cerevisiae* 100 Mutanten ausgewählt, die spezifisch Defekte in der Zellwand oder Zellmembranintegrität aufwiesen bzw. bei denen verschiedene Signalkaskaden – u.a. der CWI-Weg – gestört waren. Von den 100 untersuchten Mutanten wurden 35 tatsächlich AFP-sensitiv. Neben zellulären Prozessen (Chitinsynthese, Endocytose) betrafen diese Mutationen verschiedene Signalwege (CWI

Weg, Calcium Signalkaskade, TOR Signalkaskade, cAMP-PKA Signalkaskade; [8]). Das Interessante hierbei: Sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten von *S. cerevisiae* reagieren mit einer verstärkten Chitinsynthese auf die Anwesenheit von AFP (Abb. 4), aber nicht mit einer verstärkten Glukansynthese. Und dies scheint den entscheidenden Unterschied zu *A. niger* und anderen AFP-sensitiven Hyphenpilzen zu machen. Diese reagieren auf die Anwesenheit von AFP mit einer Verstärkung der Glukansynthese (Abb. 5) [8]. Offensichtlich die falsche Antwort. Eine Konfrontation mit AFP wird somit von Pilzen unterschiedlich interpretiert. Während einige versuchen, den Zellwandstress zu umgehen, indem sie den Anteil an Glukanen in der Zellwand erhöhen, setzen andere auf die Chitinbiosynthese. Nur Letztere setzen jedoch auf das richtige Pferd. Die Verteidigungsstrategie wird somit zu einem wichtigen Parameter bei der Bestimmung der Suszeptibilität gegenüber AFP.



**Abb.4** Die Antwort von *S. cerevisiae* auf die Konfrontation mit AFP. Die richtige Antwort auf eine Konfrontation mit AFP ist die Hochregulierung von Chitinsynthese-Genen. In betrachteten Mutanten wird eine Reihe von Signalkaskaden aktiviert (rot), die in ihrem Zusammenspiel zur Erhöhung des Chitin Gehaltes in der Zellwand führen.

### Was wir daraus lernen können

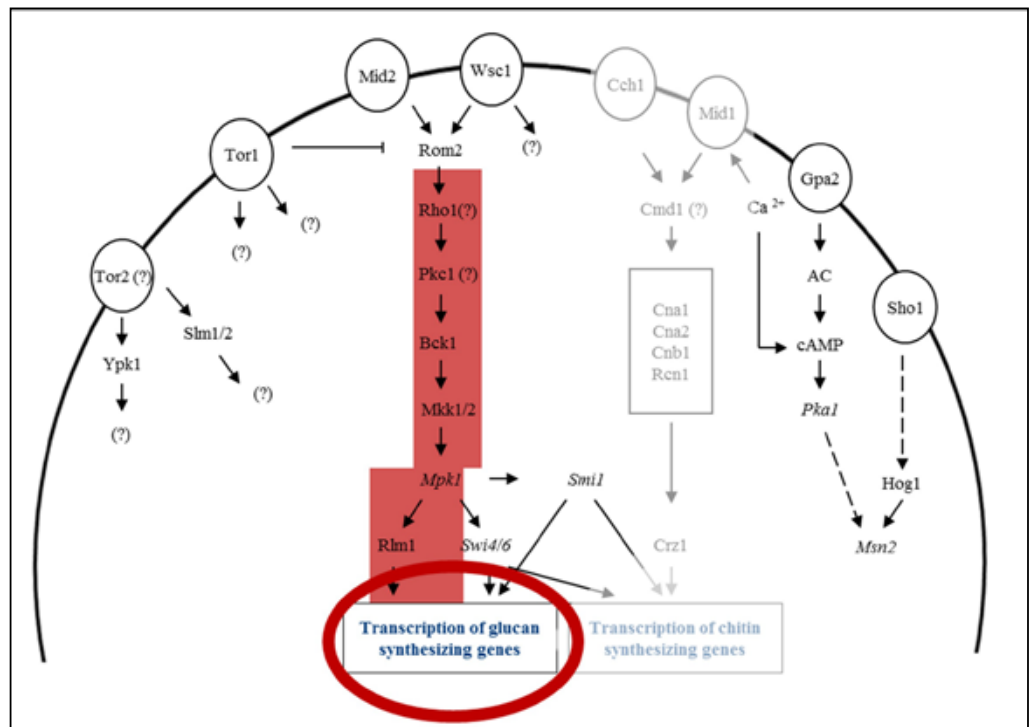
Wenn wir unsere Erkenntnisse bezüglich des AFP auf eine generelle Interaktion zwischen Mikroorganismen und AMPs übertragen, können wir schlussfolgern: Ob ein Organismus resistent oder sensitiv im Hinblick auf einen Wirkstoff ist, hängt nicht nur von der Anwesenheit des Targets ab oder der Konzentration des Inhibitors, sondern im erheblichen Maß von der Verteidigungsstrategie des attackierten Organismus. Wird eine adäquate Antwort gewählt, so überlebt der Mikroorganismus. Ist die Antwort zu schwach oder falsch, wird er beschädigt oder abgetötet. Dies bedeutet, dass der Erfolg zukünftiger Wirkstoffanwendungen auch davon abhängt, ob kluge Kombinationen verschiedener Substanzen gewählt werden. So kann eine Substanz ein spezifisches Target angreifen, eine oder weitere Substanzen sollten die Verteidigungsstrategie aushebeln. Nur so hat Goliath eine Chance.

→ vera.meyer@tu-berlin.de

→ dirk.müller-hagen@tu-berlin.de

#### Literatur

- [1] *Armed and Dangerous*. (2010), *Science* Vol. 327 no. 5967 pp., 804–805
- [2] Meyer V. (2008), *Appl Microbiol Biotechnol*. 78(1), 17–28
- [3] Tbeis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V. (2005), *Res Microbiol*. 156(1), 47–56
- [4] Tbeis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. (2003), *Antimicrob Agents Chemother*. 47(2), 588–93
- [5] Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. (2007), *Appl*



**Abb.5** Die Antwort von *A. niger* auf die Konfrontation mit AFP. Der CWI Weg (rot) wird aktiviert und es kommt zu einer erhöhten Produktion von Zellwandglukanen. Leider die falsche Antwort, da der Chitin-gehalt nicht hochreguliert wird. *A. niger* bleibt sensitiv und wird bereits von geringen AFP-Konzentrationen abgetötet.

*Environ Microbiol*. 73(7), 2128–34

[6] Damveld RA, Arentsborst M, Franken A, vanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF. (2005), *Mol Microbiol*. 58(1), 305–19.

[7] Meyer V, Damveld RA, Arentsborst M, Stahl U, van den Hondel CA, Ram AF. (2007), *J Biol Chem*. 282(45), 32935–48

[8] Ouedraogo JP, Hagen S, Spielvogel A, Engelhardt S, Meyer V. (2011), *J Biol Chem*. 286(16), 13859–68

Foto: © panthermedia.net \ Erika Nacke