

Polyextremophile schwarze Pilze

Modelle für Stresstoleranz und Herausforderung für die Medizin

KATJA STERFLINGER, BARBARA BLASI, CAROLINE POYNTNER, DONATELLA TESEI, HAKIM TAFER
UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN, EXTREMOPHILE CENTER, WIEN

***Exophiala dermatitidis* is a polyextremophilic fungus able to live in glaciers and in the human environment. This emerging human pathogen causes skin infections, deep mycosis, and it can get neurotropic. Non-coding RNA, small circular RNA, and fusion transcripts are involved in its stress resistance and pathogenicity. Melanin is one of its most important virulence factors. Results from *ex-vivo* skin infections suggest that melanin might serve as a Trojan horse for the fungus in order to invade human skin.**

DOI: 10.1007/s12268-018-0946-1
© Die Autoren

■ Schwarze Pilze oder Hefen, Weltraum- oder Killerpilze, Radioaktivitätsfresser, Gesteinszerstörer, Kohlenwasserstoffabbauer, Krankheitserreger – diese und viele weitere Bezeichnungen und Charakterisierungen existieren für eine Gruppe von Pilzen, die im Wesentlichen Folgendes gemeinsam haben: Sie sind mikroskopisch klein, durch Melanin dunkel pigmentiert und besiedeln Standorte, die durch extreme Umweltbedingungen charakterisiert sind. Zunächst waren mikrokoloniale schwarze Pilze vor allem als Besiedler von Gesteinsoberflächen in heißen und kalten Wüstengebieten bekannt, wo sie zur Verwitterung der Gesteine beitragen und als Zerstörer wertvoller Marmormonumente gelten [1]. Die Pilze sind resistent gegenüber hohen und tiefen Temperaturen, außerordentlich austrocknungstolerant und können sogar unter Mars-ähnlichen Bedingungen überleben, ohne ihren aktiven Stoffwechsel zu ändern [2].

Mediale Aufmerksamkeit bekam in den letzten Jahren insbesondere der Pilz *Exophiala dermatitidis*, zum einen wegen seiner erstaunlichen ökologischen Amplitude, zum anderen wegen seiner bislang wenig erforschten Humanpathogenität. Der Pilz kommt in der Umwelt in tropischen Gebieten, aber auch in Gletscherregionen vor und hat von dort

den Weg in unsere Haushalte gefunden, wo er Wasserleitungen, Sauna- und Dampfbäder, Geschirrspüler und Waschmaschinen besiedelt. Der Pilz gilt als polyextremophil [3].

Die Gattung *Exophiala* gehört zu den „schwarzen Hefen“, dunkel pigmentierte Ascomyceten der Ordnung Chaetothyriales (Familie Herpotrichiellaceae), die sowohl ein hyphales Stadium als auch hefeartige Knospung zeigen. Die Gattung *Exophiala* hat sich evolutionär rasch entwickelt und zahlreiche Arten hervorgebracht, von denen sich mehrere auf die Besiedlung von Menschen spezialisiert haben. *E. dermatitidis* kann kutane, subkutane und systemische Mykosen hervorrufen, wobei die Infektionen noch als selten gelten, mit derzeit steigender Inzidenz bei immunsupprimierten und immunkompetenten Menschen. Er kann neurotrop werden, das heißt, er kann das Nervensystem befallen, die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das Gehirn eindringen. Zudem besiedelt der Pilz die Bronchien von Patienten mit zystischer Fibrose; seine Rolle dabei ist noch unbekannt. Bislang ist wenig über die Ökologie, Stressresistenz und Virulenzfaktoren dieses Pilzes bekannt.

Die wesentlichen Forschungsfragen, die sich im Zusammenhang mit schwarzen Pilzen stellen, sind: Welche zellulären Mecha-

nismen und biochemischen Eigenschaften sind für die Stressresistenz verantwortlich? Welche Virulenzfaktoren spielen für die Besiedlung und die Infektion des Menschen eine wesentliche Rolle? Gibt es Zusammenhänge zwischen der Ökophysiologie und der potenziellen und beobachteten Virulenz?

Um diese Fragen zu klären, wählten wir einen systemischen Ansatz. Wir erfassten die zellulären Prozesse und Zustände mit Methoden der Genomik, der Proteomik und Transkriptomik und analysierten sie bioinformatisch.

Von der Arktis in die Sauna: Finetuning der Proteine und RNA-Baukasten

Da Temperaturtoleranz bei der Besiedlung der unterschiedlichen Lebensräume, aber auch bei der Besiedlung und Infektion des Menschen eine entscheidende Rolle spielt, untersuchten wir zunächst das Proteom des Pilzes bei verschiedenen Temperaturen. Die Proteinausstattung des Pilzes bei 0 °C, 37 °C und 45 °C zeigte keine auffälligen Variationen. Eine eigentlich erwartete klassische Schockantwort, etwa die Produktion von molekularen Chaperonen, blieb vollständig aus. Ein erstaunliches Ergebnis: Der Pilz verfügt über eine Proteinausstattung, die in der Amplitude zwischen 0 und 45 °C aktiv ist; lediglich eine Feinregulation der Expression ist zu beobachten [4].

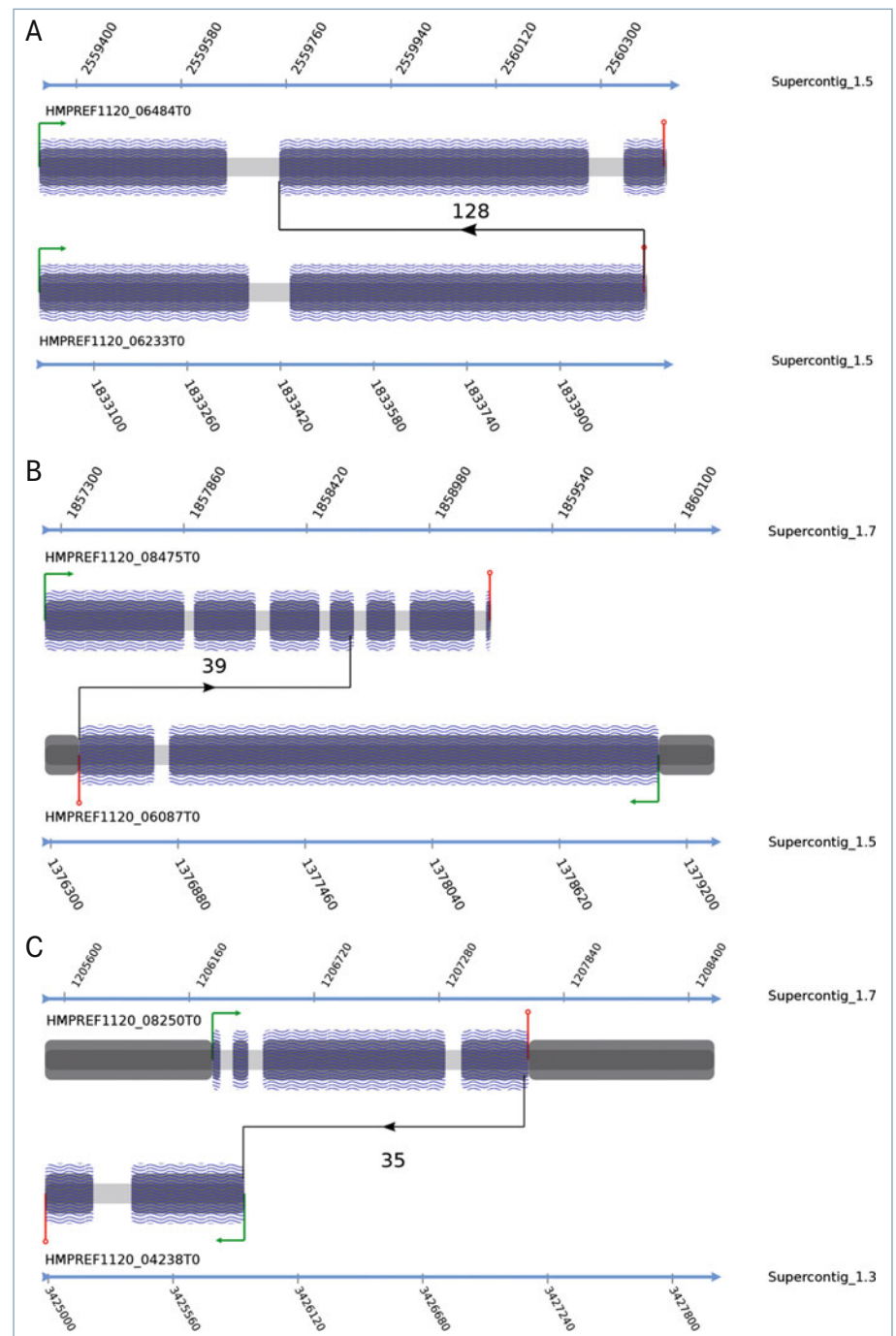
Erst die Analyse des vollständigen Transkriptoms deckte Faktoren auf, die unter Stress signifikant reguliert werden: eine Reorganisation des Cytoskeletts, Änderungen der Membranfluidität und ein Zellschutz durch Trehalose und Polyole. Selbst bei 1 °C kann der Pilz metabolisch aktiv sein, bei Temperaturen über 45 °C geht er in ein replikatives Stadium über, und die Aktivität des Golgi-Apparates ist deutlich erhöht. Zusätzlich zu diesen bereits bekannten Mechanismen zeigen die RNA-Studien, dass der Pilz bisher noch wenig untersuchte RNA-Typen unter Stressbedingungen moduliert: Es sind dies nicht-codierende RNAs (ncRNAs), kleine ringförmig geschlossene RNA-Moleküle (*circular*

RNAs) und die differenzielle Regulation fusionierender Transkripte (*chimeric RNA*). Letztere ermöglichen es der Zelle, sich quasi aus einem „Baukastensystem“ zu bedienen, um daraus die an die jeweilige Umweltbedingung angepassten Proteine und Funktionen zu erstellen (Abb. 1). Die enorme ökologische Plastizität der Pilze erklärt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dieser Fähigkeit der flexiblen Proteinzusammenstellung und -modifikation [5].

Virulenzfaktoren: Melanin als Trojanisches Pferd?

Da *E. dermatitidis* nicht nur in extremen Habitaten und bei wechselnden Umweltbedingungen wächst, sondern auch ein Erreger von Hautmykosen und systemischen Mykosen beim Menschen ist, untersuchten wir das Verhalten des Pilzes auf menschlicher Haut im *ex vivo*-Modell. Das Expressionsprofil des Pilzes sieben Tage nach der Infektion (Abb. 2) zeigt – wie bei der Stressresistenz – eine deutliche Modulation der ncRNAs und der fusionierenden Transkripte sowie der zirkulären RNAs. Wesentlich für die Infektion scheint auch die Ausscheidung der ncRNAs zu sein [6]. Hier kommt die bedeutende Rolle extrazellulärer Vesikel (EVs) ins Spiel: Im Virulenzmodell mit Larven von *Galleria mellonella* (Große Wachsmotte) verursachen EVs von *E. dermatitidis* eine hohe Mortalität. Pyomelanin, also Melanin, das über den L-Tyrosin-Weg produziert wird, ist während der Infektionsphase deutlich hochreguliert und scheint bei der Infektion eine Schlüsselrolle zu spielen. Um die Rolle des Melanins zu überprüfen, erzeugten wir unter Verwendung von CRISPR/Cas9 eine nicht-pigmentierte Mutante mit einer Mutation der Polyketidsynthase. Damit und mit dem pigmentierten Wildtyp infizierten wir humane Haut. Während die Transkriptome des Wildtyps und der Mutante zunächst nur geringe Unterschiede zeigten, ergab das mikroskopische Bild ein klares Ergebnis: Der Wildtyp hatte nach sieben Tagen die Hornschicht (Stratum corneum) vollständig besiedelt und durchdrungen, war in die Lederhaut (Dermis) eingedrungen und hatte die Keratinozyten infiziert und Zellen geschädigt. Die nicht-pigmentierte Mutante war hingegen nicht fähig, in die Haut einzudringen, und das Wachstum begrenzte sich auf die Epidermis [7].

Melanin spielt auch für pflanzenpathogene Pilze eine wesentliche Rolle. Während es bei der Infektion der Pflanzen in erster Linie um



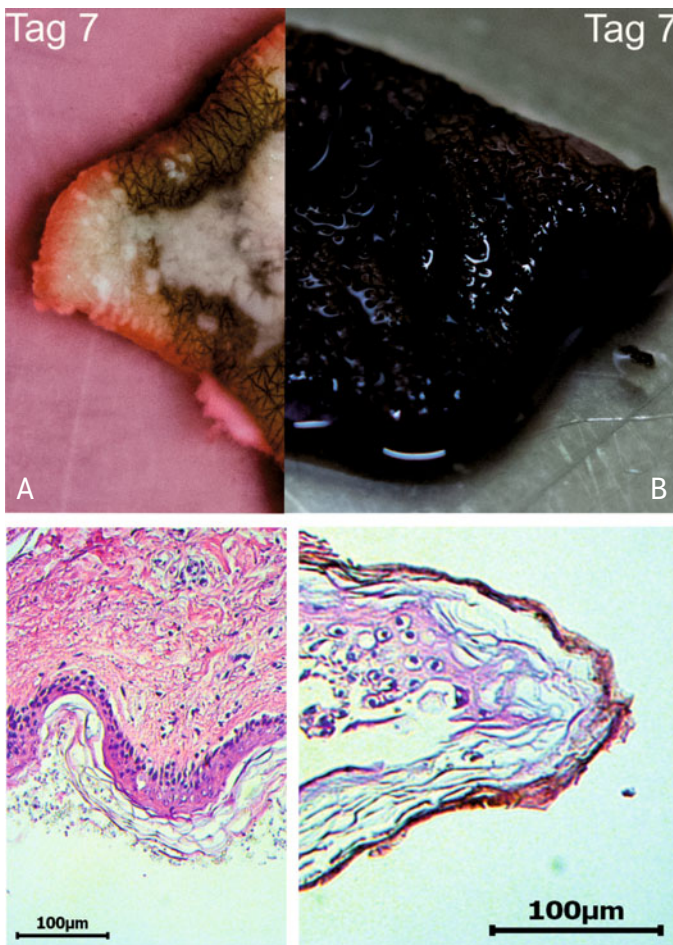
▲ **Abb. 1:** Fusionierende Transkripte in *Exophiala dermatitidis* bei 1 °C (A), 37 °C (B) und 45 °C (C). Der blaue Pfeil repräsentiert den Supercontig, der grüne Pfeil markiert das Startcodon, und die rote Linie steht für das Stoppcodon. Die Spleißverbindung zwischen den Genen ist schwarz dargestellt. Die blauen Regionen stellen die codierende DNA-Sequenz (CDS) dar und die grauen Regionen die nicht-translatierten Regionen (UTRs). Die Spleißrichtung kennzeichnet der schwarze Pfeil.

den Aufbau des Turgordrucks in Appressorien geht, spielen Appressorien jedoch bei zoopathogenen Pilzen keine Rolle. Es lässt sich aber schlussfolgern, dass das Melanin für den Pilz eine gelungene Maskierung bietet, die es den Humanzellen erschwert, den Pilz als Eindringling zu erkennen, und somit eine Immunantwort der Haut nicht oder ver-

spätet stattfindet. Das Melanin des Pilzes ist dann eine Art Trojanisches Pferd und für die Pathogenität essenziell.

Zunahme der Pilzinfektionen bremsen

Wesentliche Faktoren für die Humanpathogenität und Stressresistenz der polyextremo-



◀ **Abb. 2:** A, Weiße Mutante von *Exophiala dermatitidis* auf Humanhaut ohne Eindringen in die Hautschichten. B, Wildtyp mit deutlichem Eindringen in die Haut, aufgelockerten Hautschichten und geschädigten Zellen.

- [2] Zakharova K, Marzban G, de Vera JP et al. (2014) Protein patterns of black fungi under simulated Mars-like conditions. *Sci Rep* 4:5114
- [3] Zalar P, Novak M, de Hoog GS et al. (2011) Dishwashers – a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol* 115:997–1007
- [4] Tesei D, Marzban G, Marchetti-Deschmann M et al. (2015) Proteome of tolerance fine-tuning in the human pathogen black yeast *Exophiala dermatitidis*. *J Proteomics* 128:39–57
- [5] Blasi B, Tafer H, Tesei D et al. (2015) From glacier to sauna: RNA-Seq of the human pathogen black fungus *Exophiala dermatitidis* under varying temperature conditions exhibits common and novel fungal response. *PLoS One* 10:e0127103
- [6] Poyntner C, Blasi B, Arcalis E et al. (2016) The transcriptome of *Exophiala dermatitidis* during *ex-vivo* skin model infection. *Front Cell Infect Microbiol* 6, doi: 10.3389/fcimb.2016.00136
- [7] Poyntner C, Mirastschijski C, Sterflinger K et al. (2018) Transcriptome study of an *Exophiala dermatitidis* PKS1 mutant on an *ex vivo* skin model: is melanin important for infection? *Front Microbiol* 9:1457

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Open access funding provided by University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Katja Sterflinger
Universität für Bodenkultur Wien
Department für Biotechnologie
Muthgasse 18
A-1190 Wien
Tel.: +43-(0)1-47654-79862
Katja.Sterflinger@boku.ac.at

philen schwarzen Hefe *E. dermatitidis* sind in den nicht-codierenden RNAs, den ringförmig geschlossenen RNAs und den extrazellulären Vesikeln zu suchen. Darüber hinaus dient das Melanin dem Pilz als Maskierung, um unerkannt in das Wirtsgewebe eindringen zu können. Zukünftige Analysen sollten die Immunantwort der Haut mit einbeziehen. Die steigende Anzahl von Pilzinfektionen beim Menschen, darunter auch solche mit hoher Mortalitätsrate, sowie die zunehmende Resistenz von Pilzen gegenüber den gängigen Antimykotika machen die Erforschung der Virulenzfaktoren von Pilzen wesentlich für die Entwicklung von Antimykotika mit neuen Wirkungsweisen.

Danksagung

Wir bedanken uns beim Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung Österreich und bei der EQ-Equipment GmbH für die Förderung unserer Projekte. ■

Literatur

- [1] Sterflinger K, Krumbein WE (1997) Dematiaceous fungi as a major agent of biopitting for Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiol J* 14:219–230

AUTOREN



Hakim Tafer, Katja Sterflinger, Caroline Poyntner und Barbara Blasi (v. l. n. r.)

Katja Sterflinger

Jahrgang 1967. 1987–1993 Biologiestudium an der Universität Oldenburg. 1995 Promotion. 1996–1997 Forschungsaufenthalte in Belgien und den Niederlanden. 2000 Habilitation für das Fach Geomikrobiologie. Seit 2000 an der Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Professorin für Geomikrobiologie, seit 2013 Leiterin des BOKU Extremophile Centers.

Caroline Poyntner

Jahrgang 1987. 2006–2014 Bachelor- und Masterstudium Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien sowie in Finnland. Seit 2014 Doktoratsstudium am Department für Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien.

Hakim Tafer

Jahrgang 1976. 1996–2001 Physikstudium an der ETH Zürich. 2004–2009 Doktorand an der Universität Wien mit Aufhalten an der Universität Leipzig und Kopenhagen. 2009–2012 Postdoktorand an der Universität Leipzig, 2012–2014 am Max F. Perutz Laboratory, Wien, und seit 2014 am Extremophile Center der BOKU Wien.

Donatella Tesei

Jahrgang 1984. 2003–2010 Biologiestudium an der Universität Tuscia, Italien. 2010–2011 Erasmus-Studentin an der Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), dort 2012–2015 Doktoratsstudium. Seit 2016 Postdoc mit Hertha-Firnberg-Stipendium des FWF am Extremophile Center der BOKU; derzeit Forschungsaufenthalt bei der NASA, Kalifornien.

Barbara Blasi

Jahrgang 1882. 2001–2007 Biotechnologiestudium an der Universität Perugia, Italien. 2008–2009 Forschungsförderungen in Perugia und Szeged (Ungarn). 2009–2012 Doktoratsstudium Genetik und Zellbiologie. Seit 2013 Postdoc am Extremophile Center der BOKU Wien.