

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie

**Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des
humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*,
die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden.**

Monika Anna Schwienbacher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Höll
2. Priv.-Doz. Dr. F. Ebel
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 25.04.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 08.06.2005 angenommen.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären, wenn man
nach Zeit und Umständen, das mögliche
getan hat.“

(J.W.von Goethe, Italienische Reise, 16. März 1787)

Meinen geliebten Eltern!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. F. Ebel im Zeitraum September 2001 bis Dezember 2004 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Publikationen:

Schwienbacher M., Israel L., Heesemann J., Ebel F.

Manganese-dependent superoxid dismutase, an allergen recognized specifically by patients suffering from allergenic bronchopulmonary aspergillosis, is differentially expressed during germination. Allergy, eingereichtes Manuskript.

Schwienbacher M., Weig M., Thies S., Regula J., Heesemann J., Ebel F.

Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions. Med. Mycol., 2005, im Druck.

Rohde M., Schwienbacher M., Nikolaus T., Heesemann J., Ebel F.

Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. FEMS Microbiol. Lett., 2002; 206: 99-105.

Tagungsbeiträge:

Schwienbacher M., Heesemann J., Ebel F.

Identifizierung sekretierter Proteine aus dem humanpathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*. (Vortrag) Statusworkshop Eukaryote Krankheitserreger, 26.02.-27.02.04 in Innsbruck.

Schwienbacher M., Heesemann J., Ebel F.

Analysis of proteins secreted by the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. (Poster) 55. DGHM-Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 28.09.-01.10.2003 in Dresden. Int. J. Med. Microbiol., Vol. 293 (Suppl. 36): 223.

Schwienbacher M., Heesemann J., Ebel F.

Analysis of proteins secreted by the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. (Poster) 7. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, 27.02.-01.03.2003 Infection, Vol. 31 (Suppl. 1): 113.

Schwienbacher M., Rhode M., Nikolaus T., Heesemann J., Ebel F.

Identification of surface appendages that are specific for an early phase in the germination process of *Aspergillus fumigatus*. (Poster) 53. Jahrestagung der DGHM, 30.09.-04.10.2001 in Aachen.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
Acc.No.	Accession Number
Ak	Antikörper
AMM	Aspergillus Minimal Medium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Auskeimende Sporen
Asp f	Allergene von <i>Aspergillus fumigatus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Toluidin Salz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalzium-Chlorid
CA-Filter	Celluloseacetat-Filter
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CatA	Katalase A
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
CHAPS	3-[(3 Cholamidopropyl) dimethylamino]-1-propan sulfat
CO ₂	Kohlenmonoxid
Csn	Chitosanase
C-terminal	Carboxyl-endständig
CuZnSOD	Kupfer-Zink-abhängige Superoxiddismutase
D	Asparagin
DAB	3,3`Diaminobenziden
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme linked ImmunoSorbent Assay
<i>et al.</i>	und andere
ExPASy	Expert Protein Analysis System
F	Phenylalanin
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanidin-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hypoxanthin Azaserin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His ₆	rekombinant hergestelltes 6x Histidin gekoppeltes Protein
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICL	Isocitratlyase
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IgA	Ig der Klasse A
IgG	Ig der Klasse G
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K	Lysin
Kan	Kanamycin
KCl	Kalium-Chlorid
kDa	Kilodalton
kVh	Kilovolt-Stunden
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry
LP	zytosolisches Protein
M	molar
mA	milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MG	molekulares Gewicht
min	Minute
mM	milli-molar
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mPa	mega-Pascal
mRNA	messenger RNA
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid]
MY	Myzel
μF	Mikrofarad
μm	Mikrometer
<i>N.</i>	<i>Neurospora</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanometer
Nr.	Nummer
N-terminal	amino-terminal
Ø	Durchmesser
OD ₂₈₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280nm
ORF	offener Leserahmen
<i>P.</i>	<i>Paracoccoidis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PKA	Proteinkinase A
pkaA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PP	Probenpuffer
%	Prozent

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
Sanger	Wellcome Trust Sanger Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunden
SP	Sporen
sp	surfactant protein
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TblastN	in DNA-Sequenz rückübersetzte Proteinsequenz gegen Nukleotid-BLAST
TBP	Tributylphosphin
TBS(-T)	Tris gepufferte Salzlösung (+Tween)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIGR	The Institute for Genomic Research
TLR	Toll-like Rezeptoren
Tris	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifugation
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumen/ Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse/ Volumen
x g	vielfache Erdbeschleunigung
YG ^{dial}	dialysiertes Hefe-Glukose-Medium
YG-Medium	Hefe-Glukose-Medium
ZfP	Zentrallabor für Proteomanalyse
α	Anti
Ω	Ohm

EINLEITUNG	1
1 Taxonomie und Morphologie von <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
2 Die medizinische Bedeutung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
3 Abwehrmechanismen des Wirtes.....	4
4 Diagnostik und Therapie	6
5 Der Lebenszyklus von <i>Aspergillus fumigatus</i>	7
5.1 Die Auslösung der Konidienkeimung	8
5.2 Das Aggregationsverhalten während der Auskeimung	8
5.3 Die Rolle von Signaltransduktionskaskaden bei der Auskeimung von ruhenden Konidien ..	9
5.4 Die Rolle der Proteinbiosynthese	10
6 Zielsetzung der Arbeit	11
MATERIAL UND METHODEN	13
7 Allgemein	13
7.1 Chemikalien	13
7.2 Gerätenachweis	13
7.3 Verwendete <i>Aspergillus</i> -Stämme und Zelllinien	14
7.4 Oligonukleotide.....	15
7.5 Antikörper	16
7.5.1 Primäre Antikörper	16
7.5.2 Sekundäre Antikörper	17
7.5.3 Rekombinante <i>Aspergillus</i> -Proteine	17
8 Mikrobiologische Methoden.....	18
8.1 Kultivierung und Ernte.....	18
8.1.1 Kultivierung auf festen Nährmedien.....	18
8.1.2 Kultivierung in Flüssigmedien.....	18
8.1.3 Anzucht von <i>Aspergillus fumigatus</i> für mRNA Isolierung.....	20
8.1.4 Anzucht von <i>Aspergillus fumigatus</i> für die Ernte sekretierter Proteine.....	20
8.1.5 Sporenstammssuspension	20
8.1.6 Bestimmung der Sporenzahl	21
9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	21
10 Proteinchemische Methoden	22
10.1 Aufschluss und Anreicherung von Proteinen.....	22
10.1.1 Aufschluss von <i>Aspergillus fumigatus</i> für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	22
10.1.2 Phenolfällung zur Anreicherung von Proteinen	22
10.1.3 TCA-Fällung zur Anreicherung von sekretierten Proteinen	23
10.2 Quantifizierung von Proteinen	23

Inhaltsverzeichnis

10.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	23
10.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	25
10.3.1	Molekulargewichtsstandard	25
10.4	Eindimensionale SDS-PAGE.....	25
10.5	Gradientengel-Elektrophorese.....	27
10.6	Native Gelelektrophorese.....	28
10.7	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	28
10.7.1	Aufschluss für die 2D-PAGE (siehe Punkt 10.1.1).....	28
10.7.2	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	28
10.7.3	Äquilibrieren der IPG-Streifen	30
10.7.4	Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	30
10.8	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen.....	31
10.8.1	Färbung mit Coomassie Brillant Blau G250 (langsame Färbung).....	32
10.8.2	Färbung mit Coomassie Brillant Blau R250 (schnelle Färbung)	32
10.8.3	Silberfärbung	33
10.8.4	Digitalisierung der 2D-Gele.....	34
10.8.5	Spotanalyse	34
10.9	Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen	35
10.9.1	N-terminale Ansequenzierung	35
10.9.2	Tryptischer Verdau von separierten Proteinen.....	35
10.9.3	Nano-LC-MS/MS und Sequenzanalyse.....	35
10.10	Nachweis der Katalase-Aktivität im nativen Gel	36
10.11	Nachweis von Proteinen durch Antikörper	37
10.11.1	„Western Blot“	37
10.11.2	Immunfärbung	38
10.11.3	ELISA-Screening.....	39
11	Zytologische Methoden	40
11.1	Nachweis der Isocitratlyase mit Hilfe der Immunfluoreszenz	40
11.2	Anfärbung atmungsaktiver Mitochondrien	41
11.3	MTT-Test.....	41
12	Molekulargenetische Methoden	42
12.1	Gewinnung chromosomaler DNA.....	42
12.1.1	Protoplastierung.....	42
12.1.2	DNA-Präparation.....	43
12.2	Herstellung von cDNA.....	43
12.2.1	RNA-Isolierung aus dem Gesamtzelllysat und Umschreiben in cDNA	43
12.3	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen	44
12.3.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	44

Inhaltsverzeichnis

12.3.2	Agarosegel-Elektrophorese.....	45
12.3.3	Klonierung der amplifizierten Gene in einen Expressionsvektor	46
12.3.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	46
12.3.5	Elektroporation	47
12.3.6	Die chemische Transformation	48
12.3.7	Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung	48
12.3.8	Induktionskulturen	48
12.3.9	Bakterienanzucht	48
12.3.10	Aufschluss der Bakterien	49
12.3.11	Reinigung der rekombinanten Proteine über die TALON-Matrix	49
12.3.12	Reinigung unlöslicher Proteine.....	50
12.4	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	51
12.4.1	Verwendete Antigene	51
12.4.2	Vorbereitung der Antigene	51
12.4.3	Immunisierung der Mäuse	51
12.4.4	Isolierung von Peritonealmakrophagen	52
12.4.5	Fusion	52
12.4.6	Durchmusterung der Hybridom-Überstände.....	54
ERGEBNISSE		55
1	Morphologische Untersuchungen des Lebenszyklus von <i>Aspergillus fumigatus</i> ...	55
1.1	Von der ruhenden Spore zum Myzel.....	55
2	Optimierung der Anzuchtbedingungen verschiedener Germinationsstadien von <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	58
3	Etablierung einer geeigneten Aufschlussmethode für <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
4	Identifizierung von phasenspezifischen Proteinen mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE	62
4.1	Vergleich des eindimensionalen Proteinmuster der verschiedenen Germinationsstadien...	62
4.2	Analyse der identifizierten phasenspezifischen Proteine	64
4.2.1	Identifizierung sporenspezifischer Proteine aus den eindimensionalen Gradientengelen.....	66
4.2.2	Identifizierung von auskeimungsspezifischen Proteinen aus den eindimensionalen Gradientengelen	67
4.2.3	Identifizierung von hyphenspezifischen Proteinen aus den eindimensionalen Gradientengelen	69
5	Identifizierung von phasenspezifischen Proteinen mit Hilfe der zweidimensionalen SDS-PAGE (2D-PAGE)	70
5.1	Vergleich der Proteinmuster mit Hilfe der 2D-PAGE	70
5.2	Identifizierung phasenspezifischer Proteine aus 2D-Gelen.....	70
6	Antikörperbank.....	85
6.1	Testen der Antikörper auf Proteinen der verschiedenen Germinationsstadien	86

Inhaltsverzeichnis

6.2	Durchmustern der Hybridombank mit rekombinanten <i>Aspergillus fumigatus</i> Proteinen (His ₆ -Fusionen)	87
6.3	Test des α -Asp f8 Antikörpers B8-C4 auf dem rekombinanten Protein und <i>Aspergillus fumigatus</i> Germinationsstadien	89
7	Die sporenspezifische Katalase A.....	90
7.1	Identifizierung der Katalase CatA als sporenspezifisches Protein	90
7.2	Herstellung spezifischer Antikörper gegen CatA.....	91
7.3	Identifizierung von CatA in verschiedenen <i>Aspergillus</i> -Spezies.....	92
7.4	Die Abbaukinetik von CatA.....	94
7.5	Blockierung des CatA-Abbaus.....	96
7.6	Ubiquitinierung von CatA.....	97
8	Die Mangan-abhängige Superoxiddismutase von <i>Aspergillus fumigatus</i>	98
8.1	Identifizierung der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase aus den Hyphen von <i>Aspergillus fumigatus</i>	98
8.2	Herstellung spezifischer Antikörper gegen MnSOD durch die Durchmusterung der α - <i>Aspergillus</i> -Hybridombank.....	99
8.3	Nachweis der MnSOD in den verschiedenen Germinationsstadien.....	100
8.4	Nachweis von MnSOD in verschiedenen <i>Aspergillus</i> -Spezies.....	101
8.5	Nachweis der MnSOD durch verschiedene ABPA-Patientenseren	103
8.6	Nachweis atmungsaktiver Mitochondrien in den Hyphen	104
9	Die Isocitratlyase	106
9.1	Isocitratlyase in verschiedenen Germinationsstadien.....	106
9.2	Identifizierung der ICL in verschiedenen <i>Aspergillus</i> -Spezies.....	107
9.3	Nachweis der ICL in verschiedenen auf Acetat gewachsenen <i>Aspergillen</i>	108
9.4	Nachweis der Isocitratlyase in <i>Aspergillus fumigatus</i> nach Infektion von J774-Zellen....	109
9.5	Nachweis der Lokalisation der ICL in der Immunfluoreszenz mit dem α -ICL mAk E30-F8.	110
10	Analyse der durch <i>Aspergillus fumigatus</i> sekretierten Proteine	111
10.1	Nachweis von sekretierten Proteinen in verschiedenen Medien	111
10.2	Identifizierung von Mitogillin, einer Chitosanase und Aspergillopepsin i.....	112
10.3	Proteinsekretion zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten.....	115
10.4	Nachweis von sekretierten Proteinen in verschiedenen <i>Aspergillus</i> -Spezies.....	116
10.5	Mischung RPMI und AMM	117
10.6	Antikörper gegen Chitosanase und Mitogillin	118
10.7	Nachweis von Mitogillin und Chitosanase im Überstand durch monoklonale Antikörper	119
10.8	Detektion von Antikörpern in verschiedenen Patientenseren.....	120

Inhaltsverzeichnis

10.9	Auswirkung von sekretierten Proteinen auf das Überleben von A549-Zellen und Vero-Zellen	121
DISKUSSION		123
1	Morphologische Veränderungen während der Auskeimung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	124
2	Proteomanalyse von <i>Aspergillus fumigatus</i> während der Auskeimung.....	126
2.1.1	Etablierung einer Methode zur Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese	127
3	Identifizierung von Proteinen, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden.	128
3.1	Differentiell exprimierte Proteine der ruhenden Konidien.....	129
3.1.1	Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase.....	130
3.1.2	Superoxiddismutasen	131
3.1.3	Katalase A.....	132
3.1.4	<i>Aspergillus</i> Hämolsin.....	135
3.1.5	Mannose-6-Phosphat-Isomerase	136
3.1.6	Bli-3-Protein	136
3.1.7	SP 25(2D)	137
3.1.8	Isocitratlyase	137
3.1.9	Acyl-CoA-Dehydrogenase.....	140
3.2	Differentiell exprimierte Proteine der auskeimenden Sporen	141
3.2.1	Ribosomale Proteine und NudC.....	141
3.2.2	ATP-Citrat-Lyase.....	142
3.2.3	Peroxisomales Membranprotein (Asp f3)	143
3.3	Differentiell exprimierte Proteine der Hyphen.....	143
3.3.1	Mangan-abhängige Superoxiddismutase	144
3.3.2	CipC.....	146
3.4	Untersuchung sekretierter Proteine der Myzel-Hyphen	146
4	Schlussfolgerung.....	151
ZUSAMMENFASSUNG		154
ANHANG.....		156
LITERATURVERZEICHNIS.....		166
DANKSAGUNG.....		178
LEBENS LAUF		180

EINLEITUNG

Schimmelpilze wurden lange Zeit zum Reich der Pflanzen gezählt, ihnen fehlen jedoch die Pigmente für die Photosynthese, daher sind sie nicht in der Lage Kohlendioxid aus der Luft zu assimilieren. Heute werden Pilze in ihr eigenes Reich gestellt. Sie sind ubiquitär vorhanden, aber in erster Linie im Boden zu finden. Ihre Lebensweise kann saprophytisch oder parasitär sein. Je nach Gegebenheit bevorzugen manche Pilze die eine oder andere Lebensweise. So sind z.B. Vertreter der Gattung *Fusarium* gefürchtete Parasiten von Nutzpflanzen, können aber auch auf abgestorbenen Pflanzenteilen im Boden existieren. Andererseits sind Einige, in erster Linie saprophytische Vertreter der Gattung *Aspergillus*, in der Lage, in verschiedenen Organen des menschlichen Körpers zu gedeihen und dort parasitär gefährliche Mykosen zu verursachen (Ainsworth & Sussman, 1966). Der wichtigste pathogene Vertreter dieser Gattung ist *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), der im Menschen schwerwiegende Infektionen hervorrufen kann.

1 Taxonomie und Morphologie von *Aspergillus fumigatus*

Charakteristische Kennzeichen zur Identifizierung von *A. fumigatus* sind die Konidiophoren und die Konidien (siehe Abb. 1). Konidiophoren bilden sich aus einer Fußzelle (Raper & Fennell, 1965), die aus dem Substratmyzel gebildet wird und dienen dem Pilz zur Fortpflanzung. Bei *A. fumigatus* sind diese Gebilde ca. 500µm lang und bilden am Ende ein birnenförmig abgerundetes Bläschen (Konidiophorenvesikel). Diesem Vesikel sitzen konidienbildende Phialiden auf. Diese sind längliche (6-8µm lang, 2-3µm breit) grünliche Ausstülpungen, die die grün-braun gefärbten Konidien in langen Ketten basipetal abschnüren (Raper & Fennell, 1965). Konidien sind asexuelle Sporen, die der Vermehrung und Verbreitung der Pilze dienen.

In Kultur entwickelt der Pilz einen samtigen, zum Teil flockigen Thallus, dessen Färbung von weiß bis grüngrau oder sogar mehr oder minder schwarz reichen kann. *Aspergillus*-Arten sind allgemein Wärme liebend, so kann *A. fumigatus* noch bei Temperaturen von bis zu 55°C wachsen und bis zu Temperaturen von 70°C überleben (Raper & Fennell, 1965). Den Namen *A. fumigatus* („rauchender *Aspergillus*“) verdankt dieser Schimmelpilz wohl der starken „Rauchentwicklung“ beim Ablösen der Sporen von den Konidiophoren. Jede

Konidiophore ist in der Lage Tausende von Sporen zu bilden, die schon durch leichte Luftbewegungen abgelöst werden und so in die freie Luft gelangen, wo sie über große Entfernungen hinweg transportiert werden können (Reiß, 1998).

Schimmelpilze werden praktisch ohne Ausnahme den Klassen der Zygomycetes, der Ascomycetes und Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) zugeordnet. Da bis heute für *A. fumigatus* keine sexuellen Fortpflanzungsstadien gefunden wurden, wird er zur künstlichen Gruppe der Deuteromycota (Fungi Imperfecti) gezählt (Samson, 1999).

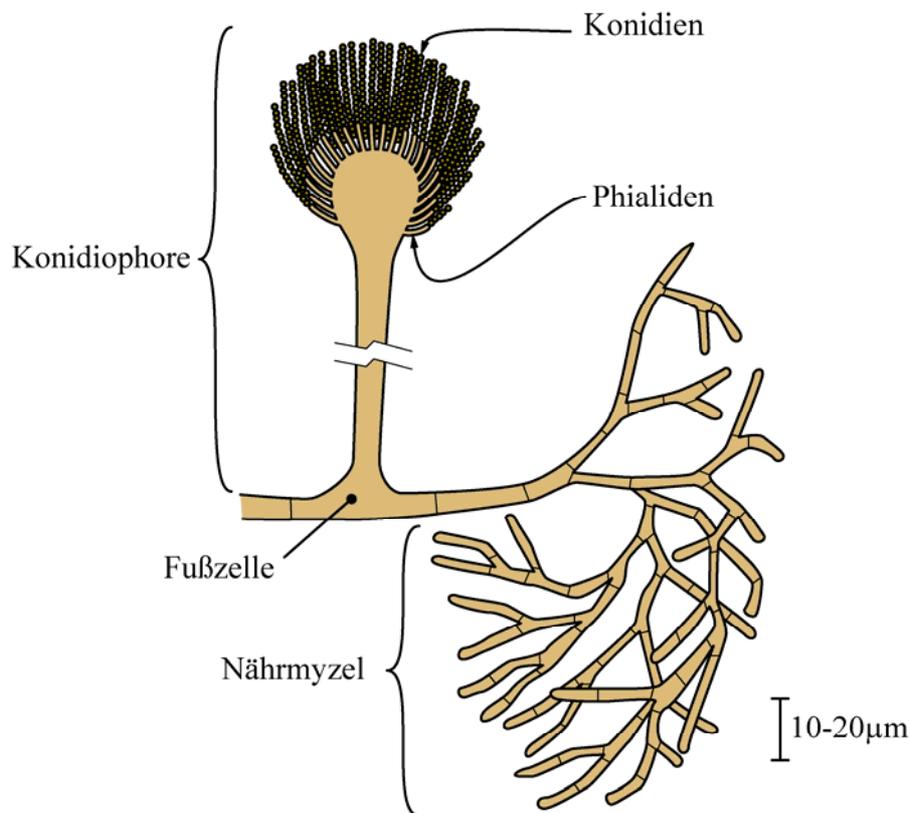


Abb. 1: Schematische Darstellung der Morphologie von *A. fumigatus*.

2 Die medizinische Bedeutung von *Aspergillus fumigatus*

Die Medizin hat sich in den letzten Jahrzehnten enorm weiterentwickelt, dadurch wurde aber auch Raum für Krankheitserreger geschaffen, die bis dahin kaum medizinische Bedeutung besaßen. Zu diesen zählt der Schimmelpilz *A. fumigatus*, der in der Lage ist lebensbedrohliche, systemische Aspergillosen zu verursachen. *A. fumigatus* ist ein

opportunistischer Krankheitserreger, das bedeutet dass hauptsächlich Personen mit einem stark geschwächten Immunsystem betroffen sein können. Durch die wachsende Zahlen von Organ- und Knochenmarkstransplantationen, Therapien zur Tumorbehandlung und durch die Verbreitung von AIDS kam es in den letzten Jahren zu einer drastischen Zunahme von Patienten, bei denen die körpereigenen Abwehrfunktionen deutlich geschwächt sind. Deshalb steigt die Zahl der Patienten mit akuten invasiven Aspergillosen (iA) ständig an, so vervierfachte sich zwischen 1987 und 1999 die Zahl der invasive Aspergillose-Infektionen (Latge, 1999).

Für immunkompetente Personen besteht hingegen kaum ein Infektionsrisiko. Umweltstudien ergaben, dass jeder Mensch täglich bis zu mehreren hundert Konidien einatmet ohne zu erkranken (Chazalet *et al.*, 1998; Hospenthal *et al.*, 1998). Anatomische Barrieren wie das Flimmerepithel oder Epithelzellen sorgen für einen Abtransport der Konidien und verhindern damit eine Besiedlung der Atemwege („Clearance“) (Latge, 1999).

Während der letzten Jahrzehnte wurde *A. fumigatus* der wichtigste durch die Luft verbreitete pilzliche Krankheitserreger. Etwa 90% aller invasiven Aspergillosen werden durch diesen Pilz verursacht. Die invasive Aspergillose ist die vorherrschende und schwerwiegendste Form der Aspergillosen in immunsupprimierten Patienten (Denning, 1998; Latge, 1999). Da sowohl die Diagnose dieser Erkrankung als auch die therapeutischen Maßnahmen eingeschränkt sind, liegt die Sterblichkeitsrate bei 30-98%, ohne Behandlung liegt die Sterblichkeit sogar bei 100% (Denning, 1998; Latge, 1999).

Vielen opportunistischen Krankheitserregern fehlen speziell entwickelte Pathogenitätsmechanismen oder Virulenzfaktoren. Sie besitzen vielmehr physiologische Eigenschaften, die sie von anderen nicht pathogenen Verwandten unterscheiden. Dieser Unterschied ermöglicht es ihnen, einen Wirtsorganismus zu befallen oder ihn gar zu töten. Im Falle von *A. fumigatus* nahm man lange Zeit an, dass die geringe Größe der Sporen (2-3µm) ein entscheidender Faktor für sein pathogenes Potential sein könnte (Latge, 1999). Durch ihre geringe Größe können sie nämlich bis in die Lungenalveolen eingeatmet werden. Dieser Umstand unterscheidet *A. fumigatus* allerdings nicht von vielen apathogenen oder weniger pathogenen Verwandten. Andere Vertreter der Gattung Aspergillus, welche allerdings nur gelegentlich zu einer Erkrankung führen, sind *A. flavus*, *A. terreus* und *A. versicolor*.

A. flavus ist vor allem als Lebensmittelkeim von Bedeutung, weil er toxische und z.T. krebserregende Substanzen wie das Aflatoxin synthetisiert (Denning & Williams, 1987). Auch eine Reihe allergischer Erkrankungen können von Aspergillen ausgelöst werden, z.B. Asthma, eine allergische Alveolitis oder die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA). ABPA ist die schwerwiegendste allergische Lungenkomplikation, die durch *A. fumigatus* verursacht wird. Sie kommt in Patienten vor, die an atopischem Asthma (1-2%) oder cystischer Fibrose (7-35%) leiden (Basich *et al.*, 1981; Knutsen & Slavin, 1992; Krasnick *et al.*, 1995). Seltener treten auch Infektionen der oberen Atemwege (Sinusitis), der Haut (kutane Aspergillose), der Ohren (Otitis) oder der Augen (Keratinitis) auf (Rüchel & Reichard, 1999). Nach vorhergehenden Krankheiten, wie einer Tuberkulose, die zu einer Kavernenbildung in der Lunge führen, kann es zur Ausbildung eines „Pilzballes“ (Aspergillom) kommen. All diese Krankheiten können in Personen auftreten, die keine Beeinträchtigung der körpereigenen Immunabwehr aufweisen, während die invasive Aspergillose, hauptsächlich immunsupprimierte, vor allem neutropenische, Patienten betrifft (Denning, 1998).

Bei der invasiven Aspergillose kommt es wie bei anderen Aspergillosen anfangs lediglich zu einem Wachstum des Pilzes 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 & Reichard, 1999).

3 Abwehrmechanismen des Wirtes

Bei der Abwehr des Wirtes gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* spielt die nicht-spezifische oder natürliche Immunität die größte Rolle. Dabei werden in immunkompetenten Wirten drei Linien der Abwehr unterschieden: die anatomischen Barrieren, die humoralen Faktoren und die phagozytierenden Zellen.

Die Mehrheit der Sporen von *A. fumigatus* wird wie die meisten inhalierten Schmutzpartikel aus der Luft über die Zilien des mucosalen Epitheliums (Flimmerepithel) aus der Lunge transportiert (siehe Abb. 2). Allerdings behindert *A. fumigatus* diese Eliminierung der Sporen durch toxische Moleküle, wie das Gliotoxin, und Proteasen, die das Epithel angreifen (Robinson *et al.*, 1990; Amitani *et al.*, 1995). Epithelzellen und

Endothelzellen nehmen Sporen *in vitro* auf und können somit selbst einen Infektionsherd darstellen (DeHart *et al.*, 1997; Taramelli *et al.*, 1996; Thurston *et al.*, 1979). Der übliche Infektionsweg im Tiermodell verläuft über das Epithel der Lunge (d'Enfert *et al.*, 1996; Eisenstein *et al.*, 1990). Im Menschen konnte die Rolle des Lungenepithels als primärer Infektionsort oder als Ort der Sporeneliminierung noch nicht geklärt werden. Die Phagozytose und die Abtötung der *A. fumigatus*-Sporen durch alveolare Makrophagen und Neutrophile wird jedoch durch die hydrophilen sp-A und sp-D „surfactant“-Proteine verstärkt (Madan *et al.*, 1997).

Die humoralen Komponenten, also die Wechselwirkung von Komponenten aus dem Serum mit *A. fumigatus*, wurden in mehreren Studien untersucht. So steigt z.B. bei einer invasiven Aspergillose im Serum die Konzentration an Fibrinogen, das in der Lage ist *A. fumigatus* zu binden. Die genaue Rolle dieses Moleküls bei der Invasion ist allerdings noch nicht geklärt (Caillot *et al.*, 1997; Tronchin *et al.*, 1993). Das C-reaktive Protein, ein Akute-Phase-Protein, das die Komplementkaskade auszulösen vermag, kann *A. fumigatus* binden. Wahrscheinlich besitzen die verschiedenen *A. fumigatus*-Germinationsstadien unterschiedliche Mechanismen, um die Komplementkaskade auszulösen. Dies ist allerdings bisher nicht im Detail untersucht worden.

Die Erkennung, die Bindung und die Verdauung von Sporen durch alveolare Makrophagen ist bisher wenig untersucht worden. Zur Zeit wird vermutet, dass vor allem Interaktionen mit Lektin-ähnlichen Molekülen für die Anlagerung und die Aufnahme der Konidien von *A. fumigatus* verantwortlich sind. Von polymorphonukleären Zellen wird angenommen, dass sie nur mit den Hyphen interagieren und diese gezielt abtöten (Schaffner *et al.*, 1982). Meier *et al.* konnten nachweisen, dass *A. fumigatus* in murinen Makrophagen durch die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 erkannt wird (Meier *et al.*, 2003). TLR bilden eine Familie von Rezeptoren, die auf die Erkennung von mikrobiellen Molekülen spezialisiert sind. Sie erkennen so genannte „Pathogen-associated molecular pattern“ und induzieren nach entsprechender Ligation Signaltransduktionskaskaden. Diese resultieren unter anderem in Zytokin-Produktion, die der Verteidigung gegen den eingedrungenen Organismus dient.

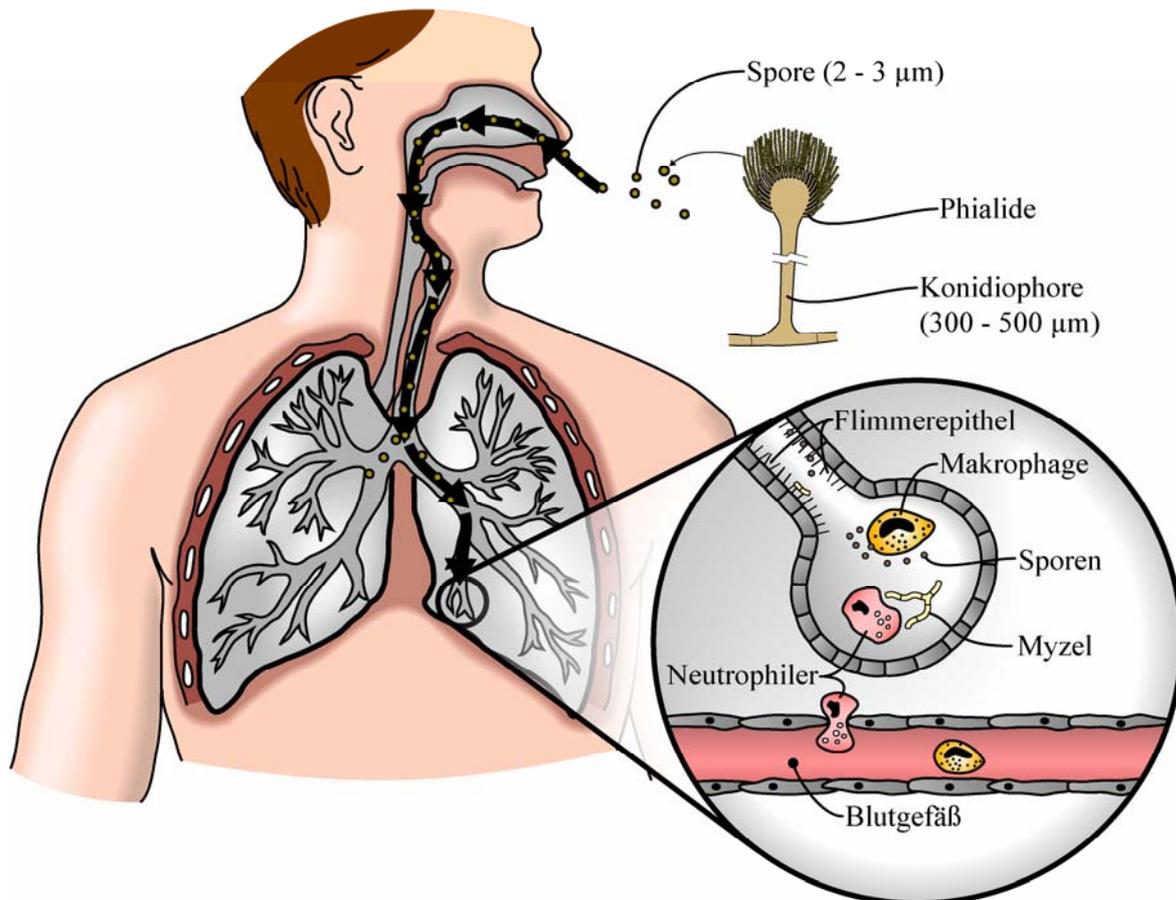


Abb. 2: Schematische Darstellung des Infektionsweges von *A. fumigatus*-Sporen. Durch den Respirationstrakt gelangen täglich mehrere hundert Sporen, die von den Konidiophoren gebildet werden, in die Lunge. Durch ihre geringe Größe (2-3µm) sind sie in der Lage, die Alveolen der Lunge zu erreichen, wenn sie nicht vom Flimmerepithel wieder aus dem Luftweg hinaus transportiert werden. Falls die Wirtsabwehr geschwächt ist, können die Sporen in der Lunge auskeimen und Hyphen bilden. Die zelluläre Abwehr, die Phagozytose und Abtötung einschließt, wird für die Sporen von Makrophagen vermittelt. Das Myzel wird von Neutrophilen eliminiert.

4 Diagnostik und Therapie

Für eine erfolgreiche Therapie aller Aspergillus-assoziierten Erkrankungen ist eine frühzeitige Erkennung von entscheidender Bedeutung. Die Krankheitsbestimmung ist jedoch äußerst schwierig, da die meisten Patienten nicht alle Kriterien erfüllen bzw. sie nicht alle zur selben Zeit erfüllen (Greenberger *et al.*, 1989; Greenberger *et al.*, 1993). Ein entscheidendes Hindernis für eine rechtzeitige Diagnose, gerade der invasiven Aspergillose, ist jedoch das Fehlen von geeigneten beurteilenden Mitteln.

Für die Behandlung einer invasiven Aspergillose stehen hauptsächlich zwei Wirkstoffe zur Verfügung: Amphotericin B und Itraconazol. Die Wirkung dieser Antimykotika ist jedoch

bei der Behandlung eines Patienten oft nur gering, obwohl die Medikamente in vitro gute Wirksamkeit gezeigt hatten. Dieser Umstand erklärt die hohe Sterblichkeitsrate von Patienten mit invasiver Aspergillose (Latge, 1999).

Heute wird meist Amphotericin B bei der Behandlung eingesetzt. Das Polyenmakrolid Amphotericin B greift an Ergosterol, einem Bestandteil der Pilzzellmembran, an und führt so zu Störungen der Membranfunktion. Das Medikament ist allerdings hoch nephrotoxisch und kann schwere Nebenwirkungen hervorrufen. Bleibt diese Therapie erfolglos oder muss sie wegen Unverträglichkeit abgebrochen werden, wird häufig auf Itraconazol zurückgegriffen. Die Wirksamkeit ist ähnlich gut wie bei Amphotericin B (Denning *et al.*, 1989), allerdings wurden bereits früh erste Resistenzen gegen Itraconazol in *A. fumigatus* nachgewiesen (Denning & Williams, 1987). Das zu den Azolen gehörende Itraconazol ist ein Breitspektrum-Antimykotikum. Es hemmt Cytochrom P-450-abhängige Enzyme und verhindert so die Ergosterolsynthese und führt zu Membranfunktionsstörungen der Pilzzelle (Denning *et al.*, 1989).

Eine erst seit kurzem verfügbare Alternative bieten die Wirkstoffe Voriconazol (Azole) und Caspofungin (Kandine), die eingesetzt werden, wenn eine Therapie mit Amphotericin B oder Itraconazol nicht möglich ist (Jeu *et al.*, 2003).

5 Der Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*

Für das Überleben in Zeiten schlechter Umweltbedingungen haben viele Spezies ruhende, Austrocknungs-resistente Sporen als „genomisches Rettungshaus“ ausgebildet. Diese asexuellen Sporen können sich, ohne vorhergehende Fusion mit einem Partner, zu einem neuen Individuum entwickeln.

Die Mechanismen der Konidiengermination sind sehr verschieden und variieren in dem Maße wie es Spezies gibt, die Konidien produzieren. Ungeachtet der ungeheuren technischen und methodischen Fortschritte in der Molekularbiologie, konnten die grundlegenden molekularen Schritte der Sporenkeimung noch nicht definiert werden.

Trotzdem gibt es einige Abläufe, die in allen Spezies gleich sind. Die Germination ist mit Sicherheit ein Schritt, der von vielen Rezeptoren und Signalwegen kontrolliert wird. Jeder Rezeptor für sich ist zuständig für ein spezifisches Umweltsignal. Die Zusammenarbeit der einzelnen Rezeptoren kann zur Induktion von spezifischen Signalkaskaden führen, die

wiederum die Germination auslösen und das polare Wachstum aufrechterhalten können. In Abb. 3 sind die wichtigsten Schritte der Auskeimung dargestellt.

5.1 Die Auslösung der Konidienkeimung

Für das Auslösen der Auskeimung ruhender Konidien ist in den meisten filamentösen Pilzen die Anwesenheit von niedermolekularen Nährstoffen wie Zucker, Aminosäuren und anorganischen Salzen notwendig (Carlile & Watkinson, 1994). Der Anspruch verschiedener Organismen ist jedoch unterschiedlich, so müssen für *Neurospora crassa* (*N. crassa*) Salze und eine Kohlenstoffquelle vorhanden sein (Schmit & Brody, 1976), um die Germination auszulösen, während bei *A. nidulans* bereits Glukose ausreicht (Oshero & May, 2000).

5.2 Das Aggregationsverhalten während der Auskeimung

Ist die Germination ausgelöst, kommt es zunächst zum Anschwellen, dem so genannten isotropen Wachstum, der ruhenden Konidien. Dabei wird die Zellwand umorganisiert (Griffin, 1994) und eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit tritt ein. Bei auskeimenden Sporen führt dies zu einem signifikant erhöhten Aggregationsverhalten. Dies ist normalerweise ein Zwei-Schritte Prozess: Primäre Aggregation resultiert aus einer Interaktion der bestehenden Glykoprotein-Schichten oder der Zellwandkomponenten ruhender Konidien. Die nachfolgende, engere Verbindung entsteht durch die metabolische Aktivierung und Proteinbiosynthese (Oshero & May, 2001). Konidien von *Blumeria graminis* antworten innerhalb von Sekunden nach Kontakt mit dem Wirt durch das Abstoßen der extrazellulären Matrix und die Aufnahme von anionischen, niedermolekularen Stoffen (Nicholson, 1992). In *Colletotrichum*-Spezies sind Konidien in eine vorgeformte, wasser-lösliche extrazelluläre Matrix aus Glykoproteinen eingebettet (Sela-Buurlage *et al.*, 1991), zusätzlich wird Schleim sekretiert (Braun & Howard, 1994). *A. nidulans*-Konidien aggregieren aneinander und an die Polystyroloberfläche der Petrischale, in der sie ausgekeimt sind, was erst durch Proteinbiosynthese ermöglicht wird. Dies zeigten Experimente mit Temperatur-sensitiven Mutanten, die in der Proteinbiosynthese blockiert waren. Diese Konidien konnten weder adhären noch auskeimen (Oshero & May, 2000). Durch subtraktive Hybridisierung gelang es einige - in

ruhenden Konidien vorkommende - Mucin-ähnliche Transkripte zu isolieren, die als potentielle Liganden fungieren könnten (Osherov & May, 2001).

Konidien von *A. fumigatus* adhäreren in Wirtsgeweben an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Kollagen und Laminin. Dies belegt eine Studie, in der ein 72 kDa Laminin-bindendes Zellwandprotein aus *A. fumigatus*-Konidien isoliert wurde (Thau *et al.*, 1994). Die Deletion des Hydrophobin Gens *rodA*, führt zudem zu einer erhöhten Bindung an Kollagen nicht aber an Fibronectin und Laminin (Sundstrom, 1999).

5.3 Die Rolle von Signaltransduktionskaskaden bei der Auskeimung von ruhenden Konidien

Die Erkennung von Umweltsignalen spielt für alle eukaryontischen Zellen eine essentielle Rolle. Viele verschiedene Signale werden an der Zelloberfläche wahrgenommen, mittels transmembraner Rezeptormoleküle übertragen und durch zytoplasmatische Signalwege weitergeleitet, um spezifische Reaktionen, wie Genexpression, Proteinphosphorylierung oder Zytoskelettveränderung, auszulösen. Die cAMP-Signaltransduktion (zyklisches Adenosinmonophosphat) ist einer der wichtigsten Signalwege in filamentösen Pilzen. Das sekundäre Signalmolekül cAMP wird dabei als Reaktion auf extrazelluläre Signale gebildet und reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse. In *Saccharomyces cerevisiae* wird diese Transduktionskaskade mit dem Erkennen bestimmter Nährstoffquellen verbunden, was in der Regulation unterschiedlicher biologischer Prozesse wie Wachstum, Metabolismus, Stressresistenz und Morphogenese resultiert (D'Souza & Heitman, 2001). Auch in *Neurospora crassa* spielt die cAMP-Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle bei der Regulation morphologischer Vorgänge (Lengeler *et al.*, 2000).

A. 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 (Calvo *et al.*, 2002). Außerdem wird dem cAMP eine wichtige Rolle bei der Kontrolle früher Ereignisse in der Auskeimung von Konidien zugeschrieben (Fillinger *et al.*, 2002). Einer der ersten Schritte nach Induktion der Sporenkeimung ist der Abbau des intrazellulären Trehalose-Kohlenstoffspeichers. Durch die Zugabe einer Kohlenstoffquelle zum Medium wird die cAMP-Signaltransduktionskaskade ausgelöst und es kommt zum cAMP-induzierten Trehalose-Abbau. Die cAMP abhängige PKA (Proteinkinase A)-

Signalübertragung ist sicherlich eine wichtige, aber nicht eine essentielle Komponente der asexuellen Sporenkeimung des filamentösen Pilzes *A. nidulans*. Die Signalübertragung durch die RasA GTPase, die unabhängig von der cAMP-Synthese in *A. nidulans* agiert, ist ebenfalls wichtig für den Prozess der Auskeimung (Osherov & May, 2000). Die Beteiligung von verschiedenen Signalwegen bei der Auskeimung erklärt, warum es so schwierig ist, über klassische Mutagenesen Germinations-defiziente Aspergillus-Stämme zu erhalten.

5.4 Die Rolle der Proteinbiosynthese

Die Auskeimung der Konidien kann nicht ablaufen, wenn die Proteinbiosynthese komplett blockiert wird. Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass DNA-Synthese in dieser Phase nicht notwendig ist (Osherov & May, 2000; Loo, 1976). Untersuchungen mit RNA-Synthese Blockern ergaben kein einheitliches Bild. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Vorgang essentiell für die Auskeimung in *N. crassa* und *A. nidulans* ist, nicht aber in *Fusarium solani* und *Peronospora tabacina* (Hollomon, 1970). Andere Arbeiten mit *N. crassa* und *A. nidulans* hingegen zeigen, dass RNA-Synthese nicht essentiell für die Konidienkeimung ist (Osherov & May, 2000; Mirkes, 1974).

Nach dem Anschwellen der ruhenden Konidien kommt es zu einem polarisierten Wachstum, das zur Ausbildung langer Hyphen führt, die sich verzweigen und mit anderen Hyphen das Myzel bilden. Manche Verzweigungen wachsen schließlich zu einer Konidiophore heran, an deren Phialiden sich wiederum Tausende von ruhenden Konidien abschnüren (für diesen Zyklus siehe Abb. 3).

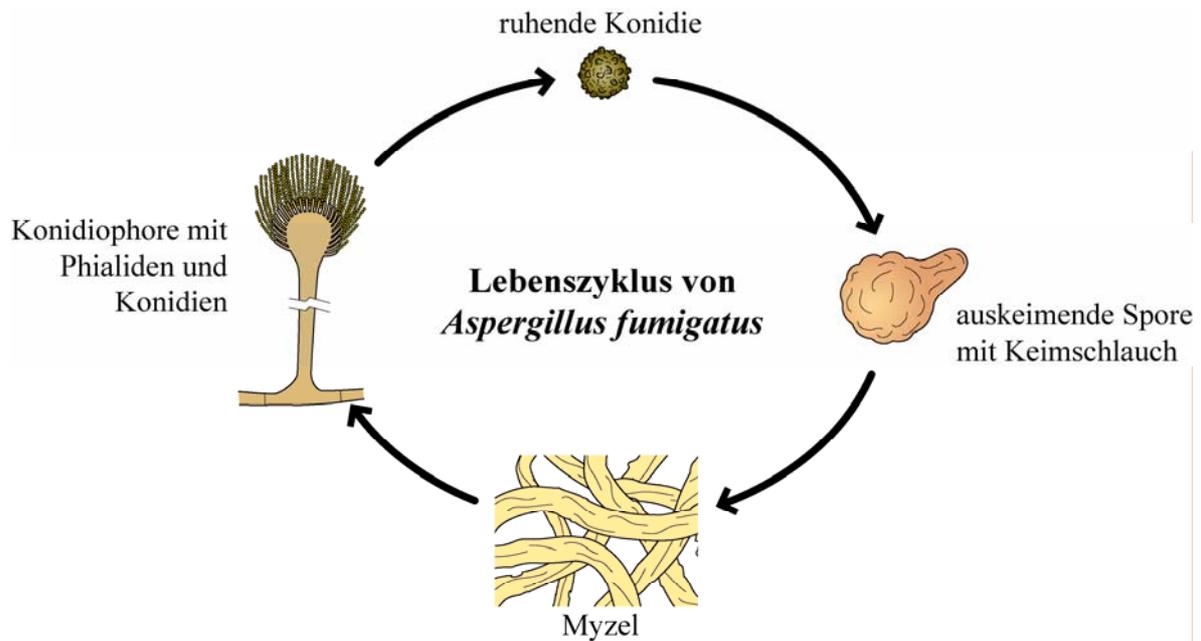


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *A. fumigatus*. Die von den Phialiden gebildeten Konidien können durch kleinste Windstöße in die Umgebung gelangen. Unter geeigneten Umweltbedingungen schwellen sie an und bilden schließlich einen Keimschlauch, der zu einer Hyphe heranwächst (die Abbildung gibt die äußere Morphologie der Hyphen schematisch wieder). Es kommt zur Bildung von Myzel und Konidiophoren (spezialisierte Hyphenenden). Deren Phialiden dann wiederum die nächste Generation von Konidien.

6 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, ist die Auskeimung von *A. fumigatus* ein wichtiges Ereignis für das Überleben und den Fortbestand dieses filamentösen Pilzes. In Hinblick auf sein hohes Potential als humanpathogener Krankheitserreger ist es wichtig, die Mechanismen dieses Vorganges auf morphologischer und molekularer Ebene besser zu verstehen, um zielgerichtet dieses Ereignis im Menschen verhindern zu können. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit verschiedene Fragestellungen zur Auskeimung von *A. fumigatus* bearbeitet werden. Dabei sollten vor allem drei, während der Auskeimung auftretende Differenzierungsstadien, untersucht werden: das Stadium der ruhenden Konidien, das Stadium der auskeimenden Sporen und das Hyphenstadium. Durch die Untersuchungen sollten morphologische und molekulare Veränderungen detektiert werden. Morphologische Veränderungen sollten im Lichtmikroskop und im Elektronenmikroskop beobachtet werden. Die Proteinsekretion von *A. fumigatus* ist bisher kaum untersucht. Aus diesem

EINLEITUNG

Grund war es ein Ziel dieser Arbeit diesen Vorgang unter verschiedenen Bedingungen zu beobachten.

Mit Hilfe verschiedener proteinchemischer Methoden, wie der SDS-PAGE und der hochauflösenden 2D-PAGE, sollten die drei Differenzierungsstadien untereinander verglichen werden, um Markerproteine für die einzelnen Phasen zu erhalten. Antikörper sollten gegen ausgewählte Proteine generiert werden, um diese näher untersuchen zu können.

MATERIAL UND METHODEN

7 Allgemein

7.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien im Reinheitsgrad zur Analyse „p.a.“ bzw. „reinst“ der Firmen Biomol, BioRad, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco, ICN, Biomedicals, Merck, Roth, Serva und Sigma verwendet.

7.2 Gerätenachweis

CO ₂ -Brutschrank	Nunc
Drehrad	Bachofer
Densitometer GS 800	BioRad
Digitalkamera	Kodak
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser II
ELISA Reader	Tecan, Tecan Sunrise Reader
French-Press	SLM-Aminco
Geldokumentationsgerät	Herolab, E.A.S.Y bzw. BioRad
Gelkammer	BioRad, Mini Protean2
2D-Elektrophorese	
Isoelektrische Fokussierung	BioRad, Protean IEF cell
2. Dimension	BioRad, PROTEAN Plus Dodeca Cell
Kühlgerät	Thermo Haake
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001 K
Mikrobiologische Brutschränke	Heraeus, function line
Mikroskope	
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM LB
Konfokales Lasermikroskop	Leica, TCS NT
Mikrowelle	Privileg
Massenspektrometers	Applied Biosystems, QStarXL

PCR Geräte	Biometra, T Gradient Biometra, Personal Cyclor
pH-Meßgerät	Mettler, Toledo 320
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Schüttelinkubator	B.Braun Biotech, Certomat HK
Spannungsquelle	BioRad, Power pac 1000
Sterilbank	Heraeus, Hera safe
Taumler	GFL, 3014
Thermomixer	Eppendorf
SpeedVac	Savant, Speed Vac Concentrator
Ultraschallbad	Sonorex RK 100H, Bandelin
Ultrazentrifuge	Du Pont Instruments, Sorvall Optima LE-80, Beckman Coulter Optima TL, Beckman Coulter
Vortexer	Scientific Instruments
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Sigma 1-13, 1K15, 6K15 Heraeus, Megafuge 1.0R Roth, Micro Centrifuge

7.3 Verwendete Aspergillus-Stämme und Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Aspergillus-Stämme verwendet:

Wildtyp-Stamm	Stamnummer	Bezugsquelle
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC (American Type Culture Collection) 46645	Prof. A. Brakhage
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 737	Stämme wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH) bezogen.
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826	
<i>Aspergillus giganteus</i>	DSM 1146	
<i>Aspergillus nidulans</i>	DSM 820	
<i>Aspergillus oryzae</i>	DSM 1862	
<i>Aspergillus flavus</i>	Stammsammlung des MvP	

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zelllinien	Stammnummer	Bezugsquelle
P3-X63-Ag8.653 („Ag8“) Murine Myelomzelllinie	ATCC TIB-132	Prof. Jürgen Wehland, Braunschweig
J 774.A1 („J 774“) Murine Makrophagen	ATCC TIB 67	Prof. Jürgen Wehland, Braunschweig
HeLa	ATCC CCL-2	Dr. Francisco Garcia del Portillo, Madrid
Vero	ATCC CCL-81	Dr. Christian Menge, Gießen
A 549 Humane Lungenepithelzellen	ATCC CCL-185	Dr. Sven Hammerschmidt, Braunschweig

7.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) bezogen.

Name	Sequenz (5` - 3`)
Poly T	5`-TTT TTT TTT TTT-3`
MnSOD-5`-For	5`-ATG TCA CAG CAA TAC ACG CTC CCA-3`
MnSOD-3`-Rev	5`-CTA CAG CTT CAT GAA TGG GTG TCC-3`
Csn-5`-For	5`-TAT AAT TTG CCC AAC AAC TTG AAA-3`
Csn-3`-Rev	5`-CTA TGC TTT CAA ACC AGC AAC CAG-3`
Mitog-5`	5`-CGG GAT CCG CGA CCT GGA CAT GCA TCA AC-3`
Mitog-3`	5`-GGA ATT CCT AAT GAG AAC ACA GTC T-3`
Prc22-5`	5`-ATG GCT CCC AAG GT-3`
Prc22-3`	5`- TCA CGC GAA GTT GA-3`
CatA1-5`	5`-AGA GAT ACG GCC GA-3`
CatA1-3`	5`- ACG GTT GAT TGG CA-3`
CatA2-5`	5`-CCA GTG TGC CCT GT-3`
CatA2-3`	5`-CTA GAA AGC AAT GG-3`

7.5 Antikörper

7.5.1 Primäre Antikörper

Name	Spezifität	Verdünnung	Bezugsquelle
α -RGS-His	RGS-Histidin Antikörper, monoklonaler Maus Antikörper	1:1000	Qiagen
α -Ubq	α -Ubiquitinierungs Antikörper, Ub (P4D1): sc-8017, monoklonaler Maus Antikörper	1:300	SantaCruz, Biotechnology
α -Mito (B203G9)	Monoklonaler Antikörper gegen Mitogillin aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion B
α -CatA (D40-E30)	Monoklonaler Antikörper gegen Katalase A aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion D
α -Chito (C43)	Monoklonaler Antikörper gegen Chitosanase aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion C
α -MnSOD (M1-A12)	Monoklonaler Antikörper gegen Mangan-abhängige Superoxiddismutase aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion B
α -ICL (D40-E3)	Monoklonaler Antikörper gegen Isocitratlyase aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion D
α -P0,1,2 (B8)	Monoklonaler Antikörper gegen Asp f8 aus <i>A. fumigatus</i> (Maus)	unverdünnt	Fusion B

7.5.2 Sekundäre Antikörper

Alkalische Phosphatase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Human-IgG+IgM (Ziege) (Sigma)

Alkalische Phosphatase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Human-IgE (Ziege) (Sigma)

Alkalische Phosphatase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG+IgM (Ziege) (Dianova)

Meerrettich Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Dianova)

Immunfluoreszenz Carbocyanin 3 (Cy3) konjugierter Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Dianova)

7.5.3 Rekombinante Aspergillus-Proteine

Name	Spezifität	Größe	Bezugsquelle
Asp f1	Mitogillin	19,6 kDa	Prof. Griesse
Asp f3	Putatives peroxisomales Protein PMP 20	18,4 kDa	Prof. Griesse
Asp f4	Fragment	30 kDa	Prof. Griesse
Asp f6	Mangan-abhängige Superoxiddismutase	23,4 kDa	Prof. Griesse
Asp f8	Saures ribosomales Protein	11,1 kDa	Prof. Griesse
Asp f9	Fragment	32,3 kDa	Prof. Griesse
Asp f11	Peptidyl-Propyl Isomerase	19,5 kDa	Prof. Griesse
His ₆ -CatA	Katalase A	45 kDa	Eigenproduktion
His ₆ -Csn	Chitosanase	26 kDa	Eigenproduktion
His ₆ - Mitogillin	Mitogillin	18 kDa	Eigenproduktion
His ₆ -MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase	25 kDa	Eigenproduktion

8 Mikrobiologische Methoden

8.1 Kultivierung und Ernte

8.1.1 Kultivierung auf festen Nährmedien

Die Kultivierung der Aspergillus-Stämme erfolgte auf Potato-Dextrose-Agar (Difco) bzw. auf Sabourod-Dextrose-Agar (Difco) mit folgender Zusammensetzung:

Potato-Dextrose-Agar: 200g Kartoffelmehl
 20g Bacto Dextrose
 15g Bacto Agar
 ad 1000ml dest. H₂O

Sabouraud-Dextrose-Agar: 20g Neopepton
 40g Dextrose
 15g Agar
 ad 1000ml dest. H₂O

Die Medien wurden durch Autoklavieren (121°C, 3 bar, 20min) sterilisiert und jeweils 100ml in Zellkulturflaschen (Nunc Brand Products) mit 175 cm³ Kulturfläche gefüllt.

Die Nährmedien wurden durch einer 1:100 Verdünnung einer Sporenstamm suspension (siehe Punkt 8.1.5) beimpft. Von dieser Impflösung wurden 100µl auf den Agar pipettiert und mit Hilfe von sterilen Glasperlen (Sigma, Ø 4mm) unter intensivem Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 5-7 Tage. Nachdem sich auf dem Agar ein dichtes, stark sporulierendes Myzel gebildet hatte (samtige Oberfläche mit grüner bis schwarzer Färbung), wurden die Sporen entweder sofort abgeerntet oder die Flaschen bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

8.1.2 Kultivierung in Flüssigmedien

Für die Anzucht von auskeimenden Sporen, Myzel und die Gewinnung von Überstandsproteinen wurden folgende Medien verwendet:

MATERIAL UND METHODEN

<u>Aspergillus Minimal Medium (AMM):</u>	20ml Salzlösung (nach Cove66) 1% Glukose <u>20mM Ammonium-D-Tartrat</u> ad 1000ml dest. H ₂ O, pH 6,5
<u>Salzlösung (50x):</u>	26g KCl 26g MgSO ₄ ·7H ₂ O 76g KH ₂ PO ₄ <u>50ml Spurenelementlösung</u> ad 1000ml dest. H ₂ O + 1,5ml Chloroform
<u>Spurenelementlösung (Cove 1966):</u>	40mg Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O 400mg CuSO ₄ · 5 H ₂ O 800mg FePO ₄ · H ₂ O 800mg MnSO ₄ · 4 H ₂ O 800mg Na ₂ Mo ₄ · 2 H ₂ O <u>8000mg ZnSO₄ · 7 H₂O</u> ad 1000ml dest. H ₂ O
<u>Hefe-Glukose-Medium (YG_{dial}):</u>	5g Hefeextrakt <u>20g Glukose</u> ad 1000ml dest. H ₂ O (Dialyse erfolgte ÜN mit einer Ausschluss- porengröße von 6000-8000Da; Dialyseschlauch: Spectrum; Spectra/ Por Membrane)

Die Flüssigmedien wurden mit Sporen aus einer Stammsuspension beimpft (siehe 8.1.5). Die eingesetzte Sporenzahl betrug, falls nicht anders angegeben, 1×10^9 Sporen/ml mit denen 50ml des Flüssigmediums beimpft wurden.

Die Kultivierung der auskeimenden Sporen für die Analyse mittels zweidimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) oder eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-

gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte schüttelnd bei 37°C, 200U/min für 8h. Für das Wachstum zum Myzel wurde die Kultivierung über Nacht (ÜN) fortgesetzt.

8.1.3 Anzucht von *Aspergillus fumigatus* für mRNA Isolierung

Die Anzucht von *A. fumigatus* für die mRNA Isolation erfolgte in Hefe-Glukose Medium (YG_{dial}) im 500ml Erlenmeyerkolben. 250ml YG_{dial}-Medium wurden in den Kolben gefüllt und mit 4×10^9 *A. fumigatus* Sporen beimpft. Die Inkubation erfolgte stehend bei 37°C für 5-7 Tage. Das Myzel, das auf dem Medium schwamm und am Beginn der Sporulation stand (leicht grünliche Färbung des Myzels), wurde abgenommen und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

8.1.4 Anzucht von *Aspergillus fumigatus* für die Ernte sekretierter Proteine

Für die Anzucht zur Proteinsekretion wurden 50ml AMM (+ Penicillin/ Streptomycin) in einem 300ml Erlenmeyerkolben mit 1×10^{10} *A. fumigatus*-Sporen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu 120h. Anschließend wurde das auf dem Medium schwimmende Myzel vorsichtig abgenommen. 20ml des Mediums wurden durch einen Sterilfilter (0,45µm, Celluloseacetat-Membran) filtriert. Anschließend erfolgte eine Trichloressigsäure (TCA)-Fällung zur Anreicherung der Proteine (siehe 10.1.3)

8.1.5 Sporenstammsuspension

In jede bewachsene Zellkulturflasche wurden 10ml autoklaviertes 0,01%Tween 20 pipettiert. Durch intensives Schwenken und Zugabe weiterer steriler Glasperlen wurden die Sporen vom Myzel gelöst. Je nach Bedarf wurde der Vorgang zwei- bis dreimal wiederholt, bis das weiße Myzel sichtbar wurde.

Kunststoff-Trichter wurden mit einer Lage Miracloth-Filterpapier (Calbiochem) ausgekleidet und autoklaviert. Die Sporensuspension wurde durch das Filterpapier filtriert, um eventuelle Myzel- und Agarstücke zu entfernen. Durch Zentrifugation der Sporensuspension für 5min bei 9000xg wurden die Sporen sedimentiert und in 15ml PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 9000xg für 5min wurden die Sporen in sterilem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Sporenstammsuspension erfolgte in „Falcon“-Röhrchen (Becton Dickinson) bei 4°C.

8.1.6 Bestimmung der Sporenzahl

Nach der Ernte wurde die Sporenzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde aus der Sporenstammssuspension eine 1:1000 Verdünnung in sterilem Wasser hergestellt und eine kleine Menge davon in die Zählkammer eingebracht. Es wurden immer 4 Gruppenquadrate ausgezählt.

Die Zahl der Sporen pro Milliliter errechnet sich nach folgender Formel:

Sporen/ml: (Mittelwert aus 4x Großquadrate) x 10^4

9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenstrahlen können zur Erzeugung vergrößerter Bilder von Objekten angewendet werden. Der Vorteil von Elektronen gegenüber Licht zur Bilderzeugung liegt darin, dass mit Elektronen ein tausendfach höheres Auflösungsvermögen erreicht werden kann. In dieser Arbeit wurde die Elektronenmikroskopie zur Analyse der morphologischen Veränderung von *A. fumigatus* während der Auskeimung eingesetzt.

Sterile Deckgläschen wurden auf eine 6-Loch Zellkulturschale (Nunc) verteilt, in jede Vertiefung wurden 3ml AMM (siehe 8.1.2) pipettiert und mit 6×10^8 Sporen/ Vertiefung beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für bis zu 32h. Die Deckgläschen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in Cacodylatpuffer fixiert (Rohde *et al.*, 2002).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Manfred Rhode an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig mit Hilfe eines Raster-Transmissionselektronenmikroskop mit einer Feldemissionskathode (Zeiss DSM 962 Gemini field-emission scanning microscope) durchgeführt.

Cacodylatpuffer: 4% Glutaraldehyd in 0,1% Cacodylat, und pH 7,4

10 Proteinchemische Methoden

10.1 Aufschluss und Anreicherung von Proteinen

10.1.1 Aufschluss von *Aspergillus fumigatus* für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Lysepuffer: 100mM Tris, pH 7,5
1mM EDTA (Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure)
5µg/µl Pepstatin A
1% (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail für Pilzextraktionen (Sigma)
1mM PMSF

Die frisch geernteten Konidien wurden in 15ml Lysepuffer resuspendiert und in eine 70ml Schüttelflasche (Braun-Biotech) aus Glas überführt. Ungefähr 5g Glaskugeln (Ø 0,45-0,50mm) wurden zugegeben. Anschließend wurden die Sporen für 10min im MSK-Zellhomogenisator (Braun-Biotech) mit 4000U/min und unter CO₂-Kühlung aufgeschlossen.

Die auskeimenden Sporen (2g) und das Myzel (4g) wurden in gefrorenem Zustand in die 70ml Schüttelflasche mit Glaskugeln und 15ml Lysepuffer überführt und unter denselben Bedingungen wie die Sporen aufgeschlossen.

Nach dem Aufschluss erfolgte die Überführung der homogenen Flüssigkeit in ein 50ml „Falcon“-Röhrchen und eine Zentrifugation für 30min, 8000xg und 4°C. Der Überstand wurde durch einen 0,8µm Filter filtriert. Das jeweilige Filtrat wurde auf 2ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

10.1.2 Phenolfällung zur Anreicherung von Proteinen

Für die Phenolfällung (Hancock & Nikaido, 1978) wurden jeweils 8ml der verschiedenen Fraktionen aufgetaut. Jeweils 1ml Probenlysat wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1ml Phenol vermischt. Die Probe wurde kräftig auf dem Vortexer durchmischt und 10min bei 70°C erhitzt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000xg für 10min bei RT. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein Gefäß für Phenolabfälle überführt. Nach der Zugabe von 1ml dest. H₂O wurde die Probe kräftig durchmischt und 10min bei

70°C inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000xg für 10min. Wiederum wurde die obere Phase abgenommen und in das Abfallgefäß überführt. Anschließend wurde 1ml eiskaltes Aceton der Probe zugegeben, nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 30min bei 4°C und 15000xg. Das Sediment wurde erneut in eiskaltem Aceton resuspendiert. Dieser Waschschrift ist wichtig, um Phenolreste aus der Probe zu entfernen. Schwer zu lösende Proteine wurden im Ultraschallbad vollständig in Lösung gebracht. Dabei wurde immer wieder Eis in das Wasserbad gegeben, um eine Temperaturerhöhung zu vermeiden. Ein letzter Zentrifugationsschritt erfolgte für 30min bei 4°C und 15000xg. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment wurde an der Luft getrocknet, bis das Aceton vollständig verdampft war.

10.1.3 TCA-Fällung zur Anreicherung von sekretierten Proteinen

Für die Anreicherung der sekretierten Proteine wurde die TCA-Fällung verwendet. Dafür wurden 20ml des Mediums mit den sekretierten *A. fumigatus*-Proteinen in einem 50ml Röhrchen mit 2,5ml 100% TCA-Lösung versetzt und anschließend 1h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 9000xg, 4°C für 60min. Das Sediment wurde einmal mit 15ml Aceton gewaschen und anschließend mit 2ml Aceton in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 15000xg für 30min bei 4°C. Das Sediment wurde getrocknet und anschließend in 20µl 2x Probenauftragspuffer aufgenommen.

10.2 Quantifizierung von Proteinen

10.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte leicht modifiziert nach Bradford (Bradford, 1976). Es wurde nicht Rinderserumalbumin sondern Ovalbumin als Standard-Protein zur Erstellung einer Eichkurve verwendet.

100mg Ovalbumin wurden in 10ml dest. H₂O vollständig gelöst (1h über Kopf schütteln). Die Messung der Konzentration des Proteins erfolgte bei 280nm in einer Quarzküvette. Dabei entspricht der theoretische Messwert $OD_{280nm}=7,5$ einer Konzentration von ca. 10mg/ml. Die Ovalbumin-Standardlösung wurde zu Aliquots mit je 300µg Protein und 1000µg Protein aliquotiert. Diese Aliquots wurden in der „SpeedVac“ 1h getrocknet. Das

Trocknen des Standardproteins ist von Vorteil, da der Puffer, in dem das Standardprotein aufgenommen werden soll, so frei wählbar bleibt. Die Verwendung eines einheitlichen Puffers ist wichtig, da nur so der Hintergrund der Messung bei dem Standardprotein und bei den Proben derselbe ist. In unserem Fall wurden die Ovalbumin-Aliquots in Harnstoffpuffer aufgelöst.

Die Proteine der jeweiligen Fraktionen wurden in Harnstoffpuffer aufgenommen und gut resuspendiert. Das Volumen des Puffers wurde je nach Größe des Sediments zugegeben. Meist waren es Volumina von 200µl bis 300µl. Jeweils 1µl der Proben wurden für die Proteinbestimmung verwendet. Meist wurde von den verschiedenen Fraktionen auch eine 1:5 Verdünnung angefertigt, um sicherzustellen, dass die Messwerte der Proteine im signifikanten Bereich der Standardkurve lagen.

Bradford-Reagenz: 0,1g Coomassie Brillant Blau G 250
 50ml 50% (v/v) Ethanol
 100ml 85% (v/v) Phosphorsäure
 ad 250ml dest. H₂O

Diese Bradford-Reagenz-Stammlösung musste vor dem Erstgebrauch etwa 4 Wochen bei 4°C stehen. Sie ist im Kühlschrank monatelang stabil. Es wurde eine größere Menge dieser Stammlösung hergestellt, da unterschiedliche Chargen des Farbstoffes sich negativ auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse über einen längeren Zeitraum auswirken. Vor Gebrauch wurde 1 Vol. Bradford-Reagenz mit 4 Vol. dest. H₂O gemischt.

Die Mischung des Standards erfolgte nach den Angaben in der Tabelle 1. Für die Proben wurde anstelle des Ovalbumins 1µl Probenlösung in Harnstoffpuffer zugegeben. Für die Eichkurve wurden dreifache Ansätze hergestellt, die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595nm im Photometer.

Die Proben wurden zu Aliquots von 1mg Protein abgefüllt und bei -80°C eingefroren.

Tab. 1: Mischung für die Proteinbestimmung

µg Protein	0	6	12	18	25	30	36	42	48	54	60
µl Ovalbumin Standard	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
µl Harnstoffpuffer	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
0,1 M HCl	jeweils 50µl zugeben										
Bradford-Lösung B	jeweils 1,4ml zugeben										

10.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet optimal an durch Hitze denaturierte Proteine. Da sich die SDS-Moleküle proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide anlagern, ist eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht durch das netzartige Polyacrylamidgel möglich.

10.3.1 Molekulargewichtsstandard

Der Molekulargewichtsstandard „Precision Plus Protein Standard All Blue“ bzw. „Unstained“ wurde von der Firma BioRad bezogen (siehe Abb. 4).

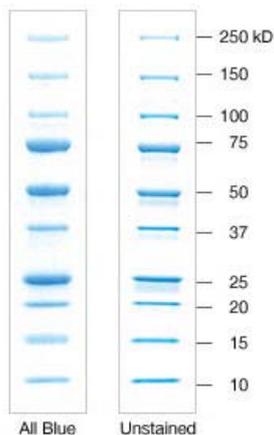


Abb. 4: Darstellung der Molekulargewichtsstandards Plus Protein Standard All Blue bzw. Unstained. Rechts sind die Molekulargewichte in kDa angegeben.

10.4 Eindimensionale SDS-PAGE

Für die Elektrophorese wurde das BioRad Mini PROTEAN II Elektrophoresesystem mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Zwischen zwei fixierten Gelplatten wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das 2-Butanol sorgfältig mit dest. H₂O abgespült.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurde über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Die Proteine wandern darin schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe

MATERIAL UND METHODEN

Bande. Erst durch den Eintritt in das Trenngel erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesteckt, dadurch konnten sich Taschen ausbilden. Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer überführt, die mit SDS-Elektrophoresepuffer befüllt war.

Die Proben wurden vor dem Auftragen in 2x Probenauftragspuffer verdünnt und 10min bei 95°C aufgeköcht. Danach wurden sie auf Eis gekühlt und für 15min bei 15000xg 4°C abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Kammes aus dem Sammelgel wurde der Überstand in die Taschen des Sammelgels pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bis zum Eintritt in das Trenngel bei 120V (ca. 15min), nach dem Eintritt in das Sammelgel bei 200V (ca. 45min) durchgeführt.

Trenngel (für 2 Gele mit 1mm Spacern)

T(=Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid im fertigen Gel)	5%	6%	7,5%	10%	12%	15%
H ₂ O	8,6ml	8,1ml	7,35ml	6,1ml	5,1ml	3,6ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,8ml	3,8ml	3,8ml	3,8ml	3,8ml	3,8ml
30% Acrylamid	2,5ml	3,0ml	3,75ml	5,0ml	6,0ml	7,5ml
10% (w/v) SDS	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl
TEMED	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20ml
25% Ammoniumpersulfat (APS)	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl

Sammelgel (für 2 Gele mit 1mm Spacern)

H ₂ O	2,9ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25µl
30% Acrylamid	850µl
10% (w/v)SDS	50µl
TEMED	10µl
25% APS	10µl

MATERIAL UND METHODEN

<u>2x Probenauftragspuffer:</u>	25% Glycerin	25ml
	8 % SDS	8g
	100mM Tris	1,2g
	4 β -Mercaptoethanol	4ml
	0,02% Bromphenolblau	ca. 20mg
		ad 100ml dest. H ₂ O, pH 6,8

<u>10x Elektrophoresepuffer:</u>	0,1% SDS	10g
	0,025M Tris	30,3g
	0,192M Glycin	144g
		ad 1000ml dest. H ₂ O

Wasser-gesättigtes 2-Butanol: 100ml dest. H₂O mit 300ml 2-Butanol schütteln, nach der Phasentrennung das überschüssige 2-Butanol abdekantieren.

10.5 Gradientengel-Elektrophorese

Für die Gradientengele wurde das Hoefer-Gelsystem mit Glasplatten der Größe 18x16cm und der Spacerdicke 1,5mm verwendet. Die Gradientengele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau) gegossen. Die Zusammensetzung der Lösungen für einen Gradienten von 7,5-20% ist unten dargestellt.

Gradiententrenngel (für 2 Gele)

T(=Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid im fertigen Gel)	7,5% (vorne im Gradientenmischer)	20%
H ₂ O	7,5ml	1,2ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,7ml	3,7ml
30% Acrylamid	2,7ml	10ml
10% (w/v) SDS	150 μ l	150 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l
25% APS	23 μ l	23 μ l

Sammelgel (für 2 Gele mit 1mm Spacern)

H ₂ O	9,9ml
0,5M Tris, pH 6,8	4,3µl
30% Acrylamid	3µl
10% (w/v) SDS	177µl
TEMED	36µl
25% APS	88µl

10.6 Native Gelelektrophorese

Die native eindimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (native PAGE) wurde nach der Laemmli-Methode in einer Hoefer-Elektrophoresekammer durchgeführt (siehe Punkt 10.4), wobei das denaturierende Detergenz SDS nicht beigemischt wurde. Die Proben wurden mit einem Probenpuffer versetzt, der kein β -Mercaptoethanol und die Proben wurden nicht gekocht. Der Laufpuffer enthielt ebenfalls kein SDS.

10.7 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

O'Farrell veröffentlichte 1975 das Prinzip der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) zur Trennung von Proteinen nach den beiden physikalischen Größen Ladung und Molekulargewicht (O'Farrell, 1975). Dadurch wird die Auftrennung von mehreren hundert Proteinen auf einem Gel ermöglicht. Görg und Mitarbeiter verbesserten das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit der 2D-Technik durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung (Görg *et al.*, 1988; Bjellqvist *et al.*, 1982).

10.7.1 Aufschluss für die 2D-PAGE (siehe Punkt 10.1.1)

10.7.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die erste Dimension bzw. die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden Polyacrylamidgele mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) der Firma BioRad mit dem Namen „Ready Strip“ bezogen. Der eingesetzte pH-Gradient umfasste den Bereich pH 4-7.

Bevor das getrocknete Proteinsediment für die IEF eingesetzt werden kann, muss dieses rehydratisiert werden. Da die Proteine in der ersten Dimension nach ihrer elektrischen Ladung getrennt werden sollen, können zur Solubilisierung keine ionischen Tenside (z.B. SDS) verwendet werden. Die Rehydratisierungslösung enthält deshalb folgende Komponenten, um die Proteine dennoch möglichst vollständig zu lösen und zu denaturieren:

- das zwitterionische Detergenz 3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat (CHAPS) verhindert Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen der Proteine. Die Nettoladung der Proteine wird dabei im Gegensatz zur Verwendung von SDS nicht verändert.
- das Reagenz Dithiothreitol (DTT) reduziert die kovalenten Disulfid-Brücken der Proteine zu Thiolgruppen.
- Harnstoff entzieht den Proteinen die Hydrathülle. Hierdurch werden die Proteine in Kombination mit den Tensiden und DTT denaturiert.

Rehydratisierungslösung: 8M Harnstoff
10mM DTT
1% CHAPS
0,25% Ampholyte, pH 4-7 (Serva)

Je nach Größe des getrockneten Sediments wurden zwischen 100µl und 400µl Rehydratisierungslösung eingesetzt.

Um die Sedimente vollständig zu lösen, wurden sie zunächst bei 36°C und 1400U/min im Thermomixer geschüttelt und anschließend im Ultraschallbad inkubiert. Die Temperatur darf 37°C nicht überschreiten, da Harnstoff bei zu hohen Temperaturen in Isocyanat umgesetzt wird, was zur Carbamylierung der Proteine führt. Nach vollständiger Lösung erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30min, 10°C und 15000xg, um eventuell unlösliche Reste abzutrennen. Die Überstände der jeweiligen Fraktionen wurden zusammengeführt. 10µl wurden für die Proteinbestimmung (siehe Punkt 10.2.1) abgenommen, der Rest der Proben wurde bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Die getrockneten IPG-Streifen wurden vor der eigentlichen Fokussierung direkt mit der Proteinprobe rehydratisiert. Dazu wurden sie luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig in den mit ca. 320µl Proteinproben/Gel beladenen „IEF-Tray“ hineingelegt. Die

IPG-Streifen wurden mit Mineralöl überschichtet, um sie vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffs zu schützen. Dann wurde der „IEF-Tray“ in die „Protean IEF-Cell“ (BioRad) überführt. Die Rehydratisierung der IEF-Streifen erfolgte für 12h bei 20°C und unter Anlegung einer Spannung von 50V/Gel. Die Fokussierung startete automatisch nach Abschluss der Rehydratisierung. Es wurde das in Tab. 2 dargestellte Zeitprogramm für die anliegende Spannung verwendet, wobei die Stromstärke auf 50µA/Streifen begrenzt wurde. Nach Erreichen von ca. 60kVh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -80°C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

Tab. 2: IEF-Spannungs Programm

Schritt	Spannung	Dauer
1	200V	30min
2	500V	30min
3	10000V	55kVh
4	500V	24h

10.7.3 Äquilibrieren der IPG-Streifen

Die fertig fokussierten IPG-Gele mussten zunächst für die 2. Dimension vorbereitet werden. Dazu wurden die IPG-Streifen jeweils mit 5ml SDS-Äquilibrierungspuffer, der 15mM DTT enthielt, überschichtet und für 15min leicht schüttelnd inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Streifen für 15min in jeweils 5ml SDS-Äquilibrierungspuffer mit 150mM Iodacetamid gelegt (Görg *et al.*, 1988).

SDS-Äquilibrierungspuffer: 50mM Tris-HCl (pH 8.8)
 6M Harnstoff
 2% (w/v) SDS
 35% (w/v) Glycerin
 0.01% (w/v) Bromphenolblau

10.7.4 Zweite Dimension: SDS-PAGE

In der zweiten Dimension der 2D-PAGE werden die Proteine durch eine SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse getrennt. Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) ohne Sammelgel hergestellt und die zweite Dimension über einen Zeitraum von 6-16 Stunden durchgeführt. Die Konzentration betrug

je nach Bedarf 12% oder 15% Polyacrylamid. Die bei 4°C hergestellten Lösungen für 12%ige oder 15%ige SDS-Gele (siehe Tab. 3) wurden durchmischt und kurz vor dem Gießvorgang wurden die Katalysatoren APS und TEMED dazugegeben. Der Polymerisationsvorgang dauerte ungefähr 2 Stunden. Die Gele wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C zwischen den Glasplatten (Größe 20x20,5cm, „Spacer“ 1mm) gelagert.

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz mit der Pinzette in Elektrophoresepuffer getaucht und luftblasenfrei auf das vertikale SDS-Gel mit einem geeigneten Spatel aufgebracht. Der Marker wurde auf 0,5x0,5cm zurechtgeschnittenen Whatmanpapiere (0,36mm Dicke) pipettiert und ebenfalls auf das Gel gelegt. Der IPG-Streifen und der Marker wurden mit warmer 5%iger Agarose in Elektrophoresepuffer auf dem SDS-Gel fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in die „PROTEAN Plus Dodeca Cell“ (BioRad) eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, wurde die Stromstärke für 2h auf 20mA pro Gel begrenzt und anschließend bei 3W/Gel über Nacht (ÜN) fortgesetzt. Die Trennung erfolgte bis die Bromphenolfront das Ende des Gels erreicht hatte. Dann wurden die Gelkassetten vorsichtig mit einem Plastik-Spatel geöffnet und das Gel für die Färbung entnommen.

Tab. 3: Tabelle der benötigten Gellösungen für 2 SDS-Gele (20x20cm, Spacer 1mm)

	T=12%	T=15%
30% Acrylamid/Bis-Lösung	40ml	50ml
1,5M Tris, pH8,8	25ml	25ml
dest. H ₂ O	34ml	24ml
10%SDS-Lösung	1ml	1ml
Endvolumen	100ml	100ml
TEMED (100%)	50µl	50µl
APS (40%)	150µl	150µl

10.8 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen

Nach der Elektrophorese müssen die Proteine sichtbar gemacht werden. Die Proteine werden als gefärbte Komplexe nach ihrer Reaktion mit Farbstoffen oder Silbersalzen detektiert.

10.8.1 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G250 (langsame Färbung)

Die Gele wurden nach der Elektrophorese aus den Gelplatten entnommen und direkt in die kolloidale Coomassie-Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgte unter langsamem Schwenken auf einem Taumler für mindestens 6h. Intensivere Färbungen wurden durch längere Inkubationszeiten erreicht. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch Spülen der Gele in dest. H₂O, optimale Kontraste wurden durch die komplette Entfärbung des Hintergrunds erreicht.

Kolloidale Coomassie-Färbelösung: 0,08% (w/v) Coomassie G250 in 1,6% (v/v) Phosphorsäure
8% (w/v) Ammoniumsulfat
20% (v/v) Methanol (erst kurz vor Gebrauch zugeben und kräftig rühren).

10.8.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 (schnelle Färbung)

Diese Färbung eignet sich, wenn Proteine schnell sichtbar gemacht werden sollen. Die Gele wurden nach der Elektrophorese durch Spülen für 10min in dest. H₂O von überschüssigem SDS und Ionen befreit. Anschließend wurden die Gele für 1h oder ÜN in Fixierlösung unter leichtem Schwenken auf dem Taumler inkubiert. Das Fixieren ist notwendig, um getrennte Proteine im Gel zu immobilisieren, und um Nicht-Protein Komponenten zu entfernen, die mit der nachfolgenden Färbung interferieren könnten (Görg, 1998). Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau R250 Färbelösung überschichtet und für 1h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Entfernen der wieder verwendbaren Färbelösung wurden die Gele zweimal mit dest. H₂O gewaschen und mit Entfärbelösung überschichtet. Die Entfärbelösung wurde bis zum gewünschten Kontrast ca. alle 20min gewechselt. Falls eine Silberfärbung folgen soll, kann das Gel restlos entfärbt werden. Gebrauchte Entfärbelösung kann mit Aktivkohle regeneriert werden.

Gel-Fixierlösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessigsäure
50% (v/v) dest. H₂O

Coomassie Brillant Blau R250 Färbelösung: 0,1% (v/v) Coomassie Brillant Blau R250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessigsäure
50% (v/v) dest. H₂O

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessigsäure
50% (v/v) dest. H₂O

10.8.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach Vorschrift von Blum (Blum *et al.*, 1987) durchgeführt. Silberfärbungen sind 10-100fach sensitiver als Coomassie Brillant Blau Färbungen, weshalb sie bei sehr geringen Proteinmengen im Gel angewendet werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 5ng. Bei dieser Färbung ist jedoch keine Korrelation der Färbung zu der Proteinmenge gegeben, wie das bei der Coomassie Färbung der Fall ist. Alle Inkubationen werden unter leichtem Schwenken der Gele durchgeführt. Die Gele werden in ca. 500ml der Reagenzlösungen inkubiert.

Reagenzlösungen:

Thiosulfatlösung: 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat in dest. H₂O

Silbernitratlösung: 0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,02% (v/v) einer 37%igen Formaldehydlösung in dest. H₂O

Entwicklerlösung: 3% (w/v) Natriumcarbonat, 0,05% (v/v) einer 37%igen Formaldehydlösung, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat in dest. H₂O

Stopplösung: 0,5 % (w/v) in dest. H₂O

Arbeitsschritte:

Arbeitsschritt	Reagenzien	Zeitdauer
Fixierschritt	40% (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig	1h
Waschschritt	30% (v/v) Ethanol	3×20min
Thiosulfatschritt	Thiosulfatlösung	1min
Waschschritt	dest. H ₂ O	3×20sek
Färbeschritt	Silbernitratlösung	20min
Waschschritt	dest. H ₂ O	2×20sek
Entwicklerschritt	Entwicklerlösung	5min
Waschschritt	dest. H ₂ O	2×1min
Stopschritt	Stopplösung	5min
Waschschritt	dest. H ₂ O	30min

10.8.4 Digitalisierung der 2D-Gele

Bevor die 2D-Gele mit einem Bildauswertesystem analysiert werden können, müssen sie digitalisiert werden. Unter Digitalisierung versteht man das Messen der Absorptionswerte kleiner, nebeneinander liegender Gelregionen, so genannter Pixel (picuter element), und die Transformation dieser Analogwerte in eine digitale Form, die der Computer interpretieren kann. Für diese Arbeit wurde ein BioRad Densitometer GS-800 verwendet.

10.8.5 Spotanalyse

Die Auswertung der Gele erfolgte vorwiegend visuell, da das „PDQUEST“ Programm (BioRad) Probleme hatte, die Gele der verschiedenen Germinationsstadien in digitaler Form übereinander zulagern.

10.9 Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen

10.9.1 N-terminale Ansequenzierung

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe des „Western Blot“ auf eine ProBlott-Membran (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) transferiert. Nach Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie wurden interessante Banden aus der Membran ausgeschnitten und mit einem ABI 492 cLC Aminosäure-Sequenzierer N-terminal analysiert. Die Arbeiten erfolgten am Institut für Mikrobiologie und Biophysik der ETH in Zürich.

10.9.2 Tryptischer Verdau von separierten Proteinen

Coomassie-gefärbte Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 0,2ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde viermal für 30min mit je 100µl dest. H₂O gewaschen. Die Proteinbande wurde zweimal mit 50% Acetonitril gespült und anschließend 5min an der Luft getrocknet. Dann wurde 1µl modifiziertes Trypsin (0,2µg/µl, Promega) direkt auf das Gelstück platziert und nach 3min wurden 40µl 40mM Ammonium Bicarbonat (pH 7,8) zugegeben. Die Reaktion wurde ÜN bei 37°C inkubiert.

10.9.3 Nano-LC-MS/MS und Sequenzanalyse

Die Analyse der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteine erfolgte mittels LC-MS/MS im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU. Dabei handelt es sich um eine Kopplung einer analytischen HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) mit einem Massenspektrometer (MS).

In dieser Arbeit wurden die LC-MS/MS Spektren mit Hilfe des QStarXL Massenspektrometers (Applied Biosystems) aufgenommen. Dieses Gerät ist mit einer Nanospray Ionenquelle (Protana, Odense, Dänemark) und einer LC-bepackten Nano HPLC (bestehend aus Ultimate, Famos und Switchos) ausgestattet.

Nach dem Trypsinverdau wurden die Proben getrocknet und in 20µl 0,1M Trifluoressigsäure resuspendiert. 5µl der Lösung wurden auf eine C18 Pepmap Trap Trennkapillare geladen, diese wurde anschließend einmal gewaschen und in die HPLC montiert. Die Peptide wurden auf der C18 Pepmap Kapillare (150mm, 75µm) mit einem

Gradienten von 10-50% Acetonitrilin 40min lang separiert. Die Massen wurden automatisch aufgezeichnet und die zwei intensivsten Ionen der ToF (time of flight) fragmentiert. Nach dem Erhalt der Spektren wurden sie mit der Analyst Software (MDS Sciex) ausgewertet. Durch MASCOT (Matrix Science) wurden die Proteine identifiziert. Die verwendete lokale MASCOT Datenbank-Suchmaschine benutzte sowohl eine aktuelle Version der NCBI nr Protein-Datenbank als auch eine Aspergillus-spezifische Datenbank, die aus Sequenzen des Aspergillus-Genomprojekt hergestellt wurde. Vorläufige Sequenzdaten wurden vom Institut für Genomforschung (The Institute for Geomic Research) erhalten, die Webseite lautet <http://www.tigr.org>.

Proteinrecherchen wurden in allgemeinen Datenbanken und in der TIGR *A. fumigatus*-Genomdatenbank (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>) durchgeführt, unter der Verwendung von BlastP und tBlastN. Vorhersagen der Intron-Exon-Struktur von putativen ORFs (offenen Leserastern) erfolgten durch das GENSCAN-Programm (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>). Vorhersagen über mögliche Signalsequenzen erfolgten mit SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Vorhersage zur Lokalisation des Proteins (z.B. Kern) oder möglicher Transmembranregionen wurde mit den Programmen PSORT II und PROSCAN (PROSITE SCAN) auf der Homepage von ExPASy (Expert Protein Analysis System <http://www.expasy.org/>) angefertigt, das theoretische Molekulargewicht und pI wurde mit „Compute pI/Mw tool“ aus derselben Homepage berechnet.

10.10 Nachweis der Katalase-Aktivität im nativen Gel

Um den Abbau der Katalase A-Aktivität über die Zeit der Auskeimung von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurde ein Katalase Aktivitäts-Test durchgeführt. Dafür wurden jeweils 200ml YG_{dial}-Medium mit 3×10^9 Sporen beimpft und schüttelnd bei 37°C für 2h, 3h, 6h, 8h und ÜN inkubiert. Durch Zentrifugation für 5min bei 9000xg und 4°C erfolgte die Ernte der verschiedenen Wachstumsfraktionen. Das jeweilige Sediment wurde in 300µl PBS resuspendiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße (Braun, für Ultrazentrifugation) überführt. Je nach Größe des Sediments wurden 300-400mg Glaskugeln zugegeben und mit 700µl Lysepuffer (siehe Punkt 10.1.1) überschichtet. Durch das Vortexen der Gefäße erfolgte eine gute Durchmischung der Glaskugeln und der *A. fumigatus*-Sporen. Anschließend wurden die Fraktionen im MSK-Zellhomogenisator (B.Braun Biotech/ Sartorius) für 10min bei 4000U/min und unter CO₂-Kühlung aufgeschlossen. Anschließend erfolgte ein

Zentrifugationsschritt (15min, 15000xg und 4°C), um die Glasperlen und die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden in nativen 2x Probenpuffer aufgenommen und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen.

Das native Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 5min in 5% Methanol inkubiert. Anschließend wurde es dreimal mit 10mM PBS gewaschen und dann in einer Lösung aus 0,05% 3,3`Diaminobenziden (DAB) Tetrahydrochlorid in PBS bei RT 20min inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit dest. H₂O und eine Inkubation von 20min in 10mM H₂O₂ bei RT. Dann wurde das Gel mit dest. H₂O gespült und in eine Lösung mit frisch angesetzter eins zu eins Lösung aus 2% Eisenchlorid und 2% Kalium-Eisen-Zyanid überführt. Dabei färbte sich das Gel blau an, die Stellen in denen das H₂O₂ abgebaut worden war, blieben dagegen hell. Die Reaktion wurde durch Waschen des Gels mit 10% Essigsäure und 5% Methanol gestoppt.

10.11 Nachweis von Proteinen durch Antikörper

10.11.1 „Western Blot“

Beim „Western Blot“ werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamid-Matrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (z.B. Polyvinylidendifluorid (PVDF)- oder Nitrocellulosemembran) transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Durch hydrophobe Wechselwirkung werden die Proteine an die PVDF-Membran gebunden. Für den elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Verfahren im Einsatz, das „Tankblotsystem“ und das „Semidryblotsystem“.

In dieser Arbeit erfolgte der Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) in einem „Tankblotsystem“ (BioRad).

Die PVDF-Blotmembran (auf 10x7cm zurechtgeschnitten) wurde vor dem Transfer mit Methanol durchnässt und anschließend in Transferpuffer für 5min äquilibriert. Das SDS-Gel wurde ebenfalls 5min in Transferpuffer äquilibriert. Die Schwämme und die zurechtgeschnittenen Blotpapiere (Whatman) wurden in Transferpuffer eingeweicht und ein Sandwich wurde wie in Abb. 5 dargestellt in der Lochschablone aufgebaut:

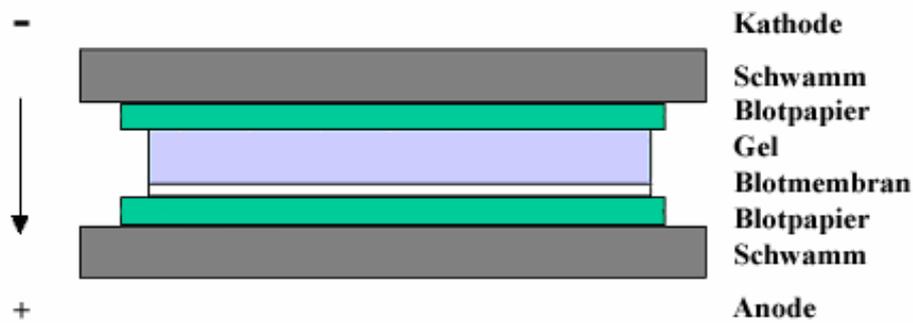


Abb. 5: Zusammensetzung eines Naßblots.

Der Transfer erfolgte bei 100mA ÜN.

Anschließend wurde die Blot-Membran mit Ponceau-S red angefärbt und mit Wasser entfärbt.

<u>Transferpuffer:</u>	50mM Tris	3,03g Tris
	39mM Glycin	14,4g Glycin
	20% (v/v) Methanol	<u>200ml Methanol</u>
		ad 1000ml dest. H ₂ O

<u>10x Ponceau-S red Lösung:</u>	2,5g Ponceau-S red
	400ml Methanol
	<u>150ml Eisessig</u>
	450ml dest. H ₂ O

10.11.2 Immunfärbung

Nach dem elektrophoretischen Transfer des Proteins auf PVDF-Membran müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Da Antikörper Proteine sind, würden sie sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen.

Das Blockieren freier Bindungsstellen wird mit einem nicht für die Antikörper erkennbaren Protein durchgeführt. In dieser Arbeit erfolgte die Blockierung der Membran durch Inkubation in 3% BSA-TBS-Tween (Rinderserumalbumin in TBS-T) für mindestens 1h.

Anschließend wurde der abgesättigte Blot mit dem primären Antikörper (z.B. α -RGS-His-Antikörper) in 10ml Blockierlösung oder in unverdünntem Antikörper-Überstand (z.B.

α CatA- oder α MnSO-Antikörper) 1h bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Alternativ wurde die Membran in ein 50ml „Falcon“-Röhrchen überführt und mit 2ml Antikörperlösung überschichtet, diese Methode wurde angewendet, wenn nur ein geringes Volumen Antikörperlösung zur Verfügung stand. Das „Falcon“-Röhrchen wurde auf einem Roll-Inkubator (Stuart-Scientific) für 1h bewegt, danach wurde der Blot dreimal 5min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (z.B. Ziege α -Maus Immunglobulin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) in 10ml TBS-T für 1h bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde dreimal 5min mit TBS-T und einmal 5min mit Entwicklungspuffer gewaschen und der Blot mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Toluidin Salz (BCIP) entwickelt. Die Reaktion konnte durch Zugabe von Wasser oder 2% Essigsäure abgestoppt werden.

Entwicklungspuffer: 100mM Glycin
1mM ZnCl₂
1mM MgCl₂

Entwicklungslösung: 0,5-1mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) frisch angesetzt in Entwicklungspuffer.

20x TBS-Tween (TBS-T): 96,8g Tris
318,9g NaCl
20ml Tween

ad 2000ml dest. H₂O, pH 7,6

10.11.3 ELISA-Screening

Für den „Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“ (ELISA) wurden Maxisorp-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (NUNC) verwendet.

200 μ l des jeweiligen Antigens (rekombinantes His-Protein) wurden in 9,5ml Beschichtungs-Puffer verdünnt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 μ l der Antigenmischung pipettiert und 2h bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend

wurde die Platte mit Blockierlösung 3h bei 37°C abgesättigt (200µl/Vertiefung) und danach einmal mit je 200µl TBS-T gewaschen.

Als primäre Antikörper dienten die nach der Fusion gewonnenen Kulturüberstände. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt (100µl/Vertiefung). Die Inkubation wurde 1h lang bei 37°C durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde der α -RGS-His Antikörper (Qiagen) in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt, als Negativkontrolle diente PBS. Nach der Inkubation wurde dreimal mit TBS-T gewaschen (200µl/Vertiefung).

Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit einem alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper (Dianova). Dieser wurde 1:1000 in Blockierlösung verdünnt und 100µl pro Vertiefung bei 37°C 1h inkubiert. Danach wurde dreimal mit TBS-T und einmal mit ELISA-Entwicklungspuffer gewaschen.

Die Entwicklungslösung musste jeweils frisch angesetzt werden. Dazu wurde pro 5ml Entwicklungspuffer eine Tablette Sigma 104 („Phosphatase Substrate Tablets“, Sigma) aufgelöst. In jede Vertiefung wurden 100µl der Entwicklungslösung pipettiert. Nach einer Entwicklungszeit von 5-30 Minuten erfolgte die Quantifizierung durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm (Referenz OD₆₂₀) auf einem Tecan Sunrise Reader (Tecan).

Beschichtungspuffer: 0,1M Carbonat, pH 9,8

Entwicklungspuffer: 9,7ml Diethanolamin
100µl 1M MgCl₂

ad 1000ml dest. H₂O, pH 9,8
+ Sigma 104 Substrat Tablette

11 Zytologische Methoden

11.1 Nachweis der Isocitratlyase mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Die Hyphen wurden in AMM mit Glukose bzw. mit Acetat bei 37°C stehend inkubiert, anschließend 10min mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und dann zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert.

Die Ansätze (300µl PBS plus 60mg Ovalbumin plus 24mg „Lytic Reagent“ (Sigma)) wurden 1h bei 37°C im Thermoschüttler bei 1000U/min geschüttelt. Anschließend wurde

einmal mit PBS gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Sediment in je 0,5ml 0,2% TritonX100 in PBS aufgenommen und 1min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Dann wurde dem Ansatz der unverdünnte α -ICL Antikörper zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und eine Inkubation mit dem 2. Antikörper α -Maus-Cy3 (1:50 in PBS). Anschließend wurde der Ansatz nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden an einem konfokalen Leica TCS-NT Mikroskop angefertigt.

11.2 Anfärbung atmungsaktiver Mitochondrien

GFP („Green Fluorescent Protein“-)exprimierende *A. fumigatus*-Sporen (Meier *et al.*, 2003) wurden in AMM für 15h inkubiert. Die Ernte der Hyphen erfolgte über Miracloth Filterpapier. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann in vorgewärmtem PBS mit 25 μ M MitoTracker Red CM-H₂XRos (Molecular Probes) für 1h inkubiert. MitoTracker Red CM-H₂XRos ist ein rot-fluoreszierendes membranpermeables Agens, das in aktiven Mitochondrien akkumuliert wird und auch nach der Zellfixierung und -permeabilisierung erhalten bleibt. Es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und die Zellen wurden für 15min in 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert. Die Aufnahme der Immunfluoreszenz erfolgte an einem konfokalen Leica TCS-NT Mikroskop.

11.3 MTT-Test

Im MTT-Test wird die Reduktion des Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethyl diazol-2-yl)-2,5 Diphényl Tetrazolium Bromid (MTT) zu einem Formazan gemessen. Diese Reaktion erfolgt durch das Succinatdehydrogenase-System der Atmungskette und ermöglicht so die quantitative Erfassung von stoffwechselaktiven Zellen.

A. fumigatus konditioniertes AMM wurde nach 96h stehendem Wachstum in AMM bei 37°C geerntet. Nach einer Filtration durch einen ST 69 (1,2 μ m) Filter erfolgte ein weiterer Filtrationsschritt durch einen 0,8 μ m Filter. Vero-Zellen und A 549-Zellen wurden in einer 96-Loch-Platte ausgesät (5x10⁵ Zellen pro Vertiefung in 200 μ l RPMI 1640 mit 5% fötalem Kälberserum [FCS]). Nach einem Wachstum ÜN wurde das Medium der Zellen ersetzt durch: entweder 100 μ l Zellkulturmedium (mit oder ohne Serum) oder 50% zellfreies *A. fumigatus*-konditioniertes AMM plus 50% Zellkulturmedium (mit oder ohne Serum) oder 50% frisches AMM plus 50% Zellkulturmedium (mit oder ohne Serum). Die Kulturen wurden für 12h bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 10 μ l MTT-Lösung (5mg MTT

(Serva) pro ml PBS) zu jeder Vertiefung wurde die Inkubation bei 37°C für weitere 4h fortgesetzt. Die Platten wurden dann für 5min bei 300xg abzentrifugiert und das Medium abgenommen. Ein Teil DMSO wurde mit zwei Teilen 5% Ameisensäure in Isopropanol gemischt, 100µl dieser Lösung wurden in jede Vertiefung gegeben, um die Formazan-Aggregate zu lösen. Die Platten wurden geschüttelt bis die Aggregate vollständig gelöst waren. Die Absorption wurde im „ELISA-Reader“ bei OD₅₅₀ gemessen.

12 Molekulargenetische Methoden

12.1 Gewinnung chromosomaler DNA

12.1.1 Protoplastierung

Ungefähr 0,5g Myzel (Anzucht und Ernte des Myzels siehe Punkt 8.1.2) wurde in ein 15ml „Falcon“-Röhrchen gegeben und in 5ml 0,6M KCl-Lösung durch kräftiges Vortexen aufgeschlämmt. In einem 500ml Erlenmeyerkolben wurde eine 40ml Glucanex-Lösung vorgelegt und anschließend wurde das aufgeschlämte Myzel zugeben. In einem Schüttelinkubator wurde das Myzel bei 28°C unter leichtem Schütteln für ca. 4h inkubiert. Die Protoplastierung des Myzels wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Mikroskop überprüft. Falls die Protoplastierung unzureichend war, wurde frische Glucanex-Lösung zugegeben und die Inkubationszeit verlängert. Nach Protoplastierung wurde der Ansatz über Miracloth-Filterpapier in 50ml „Falcon“-Röhrchen abfiltriert und mit 0,6M KCl-Lösung nachgewaschen. Das Filtrat mit den Protoplasten wurde für 10min bei 2000g und 20°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit ca. 10ml 0,6M KCl-Lösung gewaschen und dann für 5min bei 2000xg und 20°C abzentrifugiert. Dann wurde das Sediment mit 1ml 0,6M KCl-Lösung in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und 1min bei 6000xg und 20°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde entweder sofort für die DNA-Extraktion weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Glucanex-Lösung: 40ml 0,6M KCl
+ 600mg Glucanex (Novo nordisk Ferment)

12.1.2 DNA-Präparation

Das Sediment wurde in 180µl ATL-Puffer (enthalten im “DNeasy Tissue Kit” der Firma Qiagen) resuspendiert. Anschließend wurde nach dem Protokoll “DNeasy Protocol for Animal Tissues” aus dem “DNeasy Tissue Kit” ab Schritt 2 die chromosomale DNA aus *A. fumigatus* isoliert.

12.2 Herstellung von cDNA

12.2.1 RNA-Isolierung aus dem Gesamtzellslysat und Umschreiben in cDNA

Alle Geräte und Flaschen wurden vor dem Gebrauch in 30%iger H₂O₂-Lösung gespült und anschließend gründlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser abgespült und getrocknet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, um sicherzugehen, dass sie RNase frei waren (siehe 2.1.3).

Das eingefrorene sporulierende Myzel wurde in einen mit flüssigem Stickstoff befüllten Mörser überführt. Für 10min wurde das Myzel mit dem Pistell unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff bearbeitet, bis ein feines Pulver entstanden war. Dieses Pulver wurde in ein 50ml „Falcon“-Röhrchen überführt und mit 10ml Trizol (Invitrogen) versetzt. Die Isolierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers für das „TRIZOL-Reagent“.

Die mRNA wurde mit Hilfe des „mRNA Direct Kits“ (Dynal) aus der Gesamt-RNA isoliert. Anschließend konnte die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Stratagene) in cDNA umgeschrieben werden.

DEPC-Wasser: 0,1% DEPC in H₂O ÜN bei 37°C inkubieren und anschließend autoklavieren

<u>Reaktions-Mix:</u>	Amplifikationspuffer	4µl
	mRNA	2µl
	10mM dNTPs	5µl
	RNasin	0,5µl
	Reverse Transkriptase	0,5µl
	Poly-T-Primer	3µl
	dest. H ₂ O	5µl

Die Reaktion wurde für 90min bei 37°C inkubiert.

12.3 Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen

12.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Zunächst wurden kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) synthetisch hergestellt (Metabion, München), die komplementär zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens waren und sich an diese anlagern konnten. Ausgehend von den Primern konnte die Taq-DNA Polymerase eine Strangverlängerung durchführen. Ein Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus der Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strangverlängerung. Als Template wurde jeweils chromosomale DNA oder cDNA von *A. fumigatus* eingesetzt.

Ein PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 20µl bzw. 50µl setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

<u>Master-Mix:</u>	Für die Reaktionen:	50µl	20µl
	Puffer PE	5µl	2µl
	dNTPs (je 2 mM)	5µl	2µl
	Taq PE	0,5µl	0,2µl
	dest. H ₂ O	28,5µl	11,3µl

Der Master-Mix wurde jeweils für n +1 Reaktionen angesetzt.

<u>Reaktions-Mix:</u>	Primer A	5µl	2µl
	Primer B	5µl	2µl
	Master-Mix	39µl	15,5µl
	Template	1µl	0,5µl
	Gesamtvolumen	50µl	20µl

Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler der Firma Biometra folgendermaßen durchgeführt:

First Delay	95°C, 10min
Denaturierung	95°C, 30sec
Primer-Anlagerung	55°C, 45sec
Strangverlängerung	72°C, 3min
Last Delay	72°C, 6min
Heizdeckeltemperatur: 105°C	Zahl der Zyklen: 35, danach 4°C

12.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

DNA bzw. DNA-Fragmente können auf einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Auftrennung der Produkte wurden Gele mit 0,7% Agarose verwendet. 0,7g Agarose (Serva) wurde in einem 250ml Erlenmeyer Kolben eingewogen, mit 100ml TAE-Puffer aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach kurzer Abkühlung wurde die Lösung in eine Flachbettgelkammer (Eigenbau Werkstatt) gegossen, anschließend wurde ein Kamm mit Zähnen eingebracht. Nach dem Erstarren des Gels und der Entfernung des Kamms, konnten die Proben in die entstandenen Taschen pipettiert werden. Zum Beladen des Gels wurde dieses in eine, mit TAE-Puffer befüllte, Elektrophoresekammer (Eigenbau Werkstatt) gelegt. Je 5µl PCR-Produkt wurden mit 1µl „6x Loading Dye“ (MBI Fermentas) versetzt. Als Größenstandard diente „GeneRuler 1kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas), von dem 10µl aufgetragen wurden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90V und dauerte ca. 45min. Anschließend wurde das Gel 10min in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml) gefärbt. Durch Fluoreszenz im ultravioletten Licht (UV-Licht) wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und im Geldokumentationsgerät (BioRad) fotografiert.

TAE-Puffer: 4,84g Tris
 2ml 0,5M EDTA
 1,14ml Eisessig
 ad 1000ml dest. H₂O

12.3.3 Klonierung der amplifizierten Gene in einen Expressionsvektor

Nach der Amplifikation und Reinigung der entsprechenden Gene konnten diese in einen Expressionsvektor kloniert werden. Es wurde das „QIAexpress UA Cloning Kit“ (Qiagen) oder das „PCR Cloning Kit“ (Qiagen) verwendet, was eine direkte Klonierung von PCR-Produkten ermöglichte. Diese Systeme machen sich die Tatsache zu Nutze, dass die Taq-Polymerase sowie auch andere Polymerasen ohne „Proofreading“-Aktivität einen A-Überhang an das 3'-Ende der PCR-Produkte anfügen. Die Vektoren lagen bereits linearisiert vor und hatten an jedem 3'-Ende einen U-Überhang. Dies ermöglichte eine schnelle und effiziente Ligation ohne vorherigen Restriktionsverdau. Allerdings konnte mit diesem System keine gerichtete Klonierung durchgeführt werden, d.h. die Orientierung des Inserts im Vektor konnte nach Ligation sowohl richtig als auch falsch sein. Dies konnte jedoch z.B. durch Expression des entsprechenden Gens nach Transformation kontrolliert werden.

Ligationsansatz: 1µl pQE-30
4µl PCR Produkt
5µl 2x Ligationspuffer

Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16°C inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen musste anschließend die Ligase bei 72°C für 10min inaktiviert werden.

12.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Eine ÜN Kultur von [TG2]-*E. coli* Bakterien wurden 1:100 in LB-Medium verdünnt und 3h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3800xg, 20min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für 5min auf Eis gehalten. Dann wurde das Sediment in 20ml 0,1M CaCl₂ resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Die Lösung mit den Bakterien wurde wiederum bei 3800xg, 20min und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 800µl eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden 100µl der kompetenten Zellen mit 25µl 50% Glycerin in sterile Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung.

12.3.5 Elektroporation

Die erhaltenen Plasmide wurden entweder mit Hilfe der Elektroporation in den elektrokompenten *E. coli*-Stamm M15 [pRep4] oder durch chemische Transformation in den chemisch kompetenten *E. coli*-K12-Stamm [TG2] eingebracht.

Für beide Transformationen wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Für die Elektroporation wurden dann 15µl der Bakteriensuspension mit 5µl Ligationsansatz in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Eurogentec) gemischt. Diese wurde anschließend 10min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 200Ω, 25µF und 1.8kV mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad). Um den transformierten Bakterien Erholung und Wachstum zu erleichtern, wurde sofort 300µl vorgewärmtes Luria Bertani (LB) Medium zugegeben, das mit 1M Glukose versetzt war. Danach wurde der Transformationsansatz mindestens 30min bei 37°C und 200U/min geschüttelt. Es folgte die Ausplattierung von jeweils 50µl und 250µl auf LB-Agar-Platten, die als Selektionsmarker die Antibiotika Carbpenicillin (50µg/ml) und Kanamycin (50µg/ml) enthielten. Die LB-Agar-Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation waren nach dieser Zeit Bakterienkolonien gewachsen.

Luria Bertani (LB) Medium: 10g Trypton
5g NaCL
5g Hefeextrakt

ad 1000ml dest. H₂O

LB-Agar: 15g Agar auf 1000ml LB Medium
pro Petrischale ca. 20ml LB-Agar

Die transformierten Bakterien erhielten die Carbpenicillin Resistenz durch Aufnahme des pQE-30 Vektors, der das β-Lactamase Gen enthält. Die Kanamycin Resistenz wurde durch das low-copy Plasmid [pRep4] vermittelt, das der M15 *E. coli*-Stamm bereits enthielt. Außerdem wurde von diesem Plasmid konstitutiv der lac-Repressor exprimiert (Farabaugh *et al.*, 1978). Die klonierten Gene standen im pQE-30 Vektor unter der Kontrolle eines T5-Promotor/lac-Operator Systems. Mit Hilfe des gebildeten lac-Repressors konnte die Transkriptionsrate am T5-Promotor reguliert werden.

12.3.6 Die chemische Transformation

5µl des Ligationsansatzes wurden mit 100µl chemisch kompetenten *E. coli* [TG2] Zellen gemischt. Der Ansatz wurde für 30min auf Eis inkubiert und anschließend für 3min auf 42°C erhitzt und dann wieder für 2min auf Eis gehalten. Anschließend wurden 900µl LB-Medium, dem 10% Glukose zugesetzt worden waren, zu den Bakterien gegeben und 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Auf LB-Agar-Platten mit Carbpenicillin wurden 50µl, 250µl und 500µl des Ansatzes ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

12.3.7 Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung

Aus einer 2ml ÜN Kultur wurde das pQE-30 UA Plasmid mit Hilfe des „QIAprep Spin miniprep Kit“ (Qiagen) bzw. aus einer 200ml ÜN Kultur mit dem „QIAprep Spin Midi Kit“ aufgereinigt. 60µl der Plasmidlösung wurden an die Firma GATC-Biotech (www.gatc-biotech.de) geschickt, diese führte die Sequenzierung der Plasmid-DNA durch.

12.3.8 Induktionskulturen

Um die rekombinanten His₆-Proteine in *E. coli* zu exprimieren, konnte der Regulationsmechanismus des lac-Repressors überwunden werden, indem Isopropyl-β-D-Thiogalaktosidase (IPTG) zugegeben wurde. Der Induktor IPTG bindet das lac-Repressor-Protein und inaktiviert es, wodurch die Transkription des klonierten Gens möglich wird.

Zur Induktion wurden von einigen Einzelkolonien zunächst 3ml-Kulturen in LB-Medium mit Carbpenicillin und Kanamycin (je 100µg/ml) angesetzt und diese ÜN bei 37°C und 200U/min im Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit einer Endkonzentration von 1mM IPTG die Expression des rekombinanten Proteins in 200ml frischem LB-Medium induziert. Nach 4h bei 37°C und 250U/min wurden die Kulturen bei 2000xg für 10min abzentrifugiert. Ein Teil des Sediments wurde in 60µl 2x Probenpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

12.3.9 Bakterienanzucht

Für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde jeweils 20ml LB-Medium (mit Carbpenicillin 100µg/ml) mit den entsprechend transformierten *E. coli*-Stämmen angesetzt.

Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte ÜN bei 37°C und 200U/min. Am nächsten Tag wurden 200ml frisches LB-Medium (mit Carbpenicillin 100µg/ml) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurde 1mM IPTG (Endkonzentration) beigemischt. Die Kultur wurde 5h bei 37°C und 250U/min geschüttelt und anschließend bei 2000xg für 20min abzentrifugiert. Das Sediment wurde zur Erleichterung des Aufschlusses eingefroren. Anschließend wurde das Sediment in 5ml Extraktionspuffer (siehe 12.3.11) resuspendiert und konnte in der French-Press aufgeschlossen werden.

12.3.10 Aufschluss der Bakterien

Der Aufschluss der Bakterien erfolgte in der French-Press. Es wurde zweimal hintereinander mit einem Druck von 275MPa aufgeschlossen und die Probe anschließend bei 3000xg für 20min abzentrifugiert.

Die beiden Fraktionen (Sediment und Überstand) wurden durch Weiterverarbeitung von Proben in der SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, entweder sofort für die Aufreinigung verwendet oder bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

12.3.11 Reinigung der rekombinanten Proteine über die TALON-Matrix

Die verwendete TALON-Matrix (Clontech) besteht aus Sepharosepolymeren, an die positiv geladene Metallionen gekoppelt sind. Unter physiologischem pH binden die Histidine an diese immobilisierten Metallionen, was eine spezifische Aufreinigung von Proteinen unter nativen und denaturierenden Bedingungen ermöglicht. Die rekombinanten Proteine konnten über eine N-terminale 6xHistidin-Sequenz gereinigt werden, die aus der pQE-30 Vektor Sequenz stammte.

Für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde zunächst 1ml der TALON-Matrix zweimal mit 5ml Extraktions-/Waschpuffer gewaschen, durch Resuspension der Matrix und anschließender Zentrifugation bei 4000xg für 5min bei 4°C. Danach wurde der Überstand des French-Press Lysates mit der TALON-Matrix vermischt und diese, zur Bindung des Proteins, 3h bei 4°C im Kühlraum auf einem Drehrad gedreht. Anschließend wurde ungebundenes Protein durch dreimaliges Waschen mit Extraktions-/Waschpuffer entfernt.

Es folgte die kompetitive Elution mit Imidazol. Dafür wurde die TALON-Matrix zunächst in 3ml Elutionspuffer resuspendiert und dann für 2h bei 4°C im Kühlraum auf einem Drehrad gedreht. Um das Protein möglichst vollständig zu eluieren, wurde außerdem eine ÜN Elution mit weiteren 2ml Elutionspuffer durchgeführt. Die Analyse der Probe erfolgte über SDS-PAGE.

Extraktions-/Waschpuffer: 50mM Natriumphosphat
300mM NaCl
pH 7,0

Elutionspuffer: 50mM Natriumphosphat
300mM NaCl
150mM Imidazol
pH 7,0

12.3.12 Reinigung unlöslicher Proteine

Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen ist für schwer lösliche bzw. unlösliche Proteine, die durch Zentrifugation sedimentiert werden, gebräuchlich. Die Durchführung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Punkt 12.3.11 beschrieben, die Puffer waren jedoch unterschiedlich.

Denaturierender Extraktions-/Waschpuffer: 50mM Natriumphosphat
300mM NaCl
6M Guanidin-Hydrochlorid
pH 7,0

Denaturierender Elutionspuffer: 45mM Natriumphosphat
270mM NaCl
5,4M Guandidin-Hydrochlorid
150mM Imidazol
pH 7,0

In Anwesenheit von Guanidin-Hydrochlorid können Proteine nicht in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Deshalb muss Guanidin-Hydrochlorid nach der Elution durch Dialyse entfernt werden. Die Dialyse erfolgte ÜN bei 4°C gegen das 5-fache Probenvolumen Extraktions-/Waschpuffer. Es wurde ein Spectra/Por Dialyseschlauch (Spectrum) mit einer Ausschlussporengröße von 6-8000 Da verwendet, der vor der Dialyse 30min in destilliertem Wasser äquilibriert wurde.

12.4 Herstellung monoklonaler Antikörper

12.4.1 Verwendete Antigene

Für die Erstellung der Antikörperbank wurden Proteine von *A. fumigatus* aus den auskeimenden Sporen und dem Myzel verwendet. Um spezifische Antikörper zu erhalten wurden die Mäuse mit rekombinant hergestellten Proteinen (z.B. His₆-CatA) oder gereinigten Proteinen (z.B. Isocitratlyase) immunisiert.

12.4.2 Vorbereitung der Antigene

Die Proteine aus auskeimenden Sporen und Myzel wurden wie in Punkt 10.1.1 beschrieben vorbereitet und zu gleichen Teilen gemischt.

12.4.3 Immunisierung der Mäuse

Zwei Balb/c Mäuse wurden mit dem vorbereiteten Antigen nach folgendem Schema intraperitoneal immunisiert:

- Tag 1: Injektion von 250µl des jeweiligen Antigens emulgiert mit 250µl Freund`schem Adjuvans (Sigma).
- Tag 14 : Injektion wie Tag 1.
- Tag 28 : Injektion von 250µl des jeweiligen Antigens ohne Adjuvans.
- Tag 32 : Entnahme der Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Anschneiden des Organs und anschließendes Durchspülen mit einer Spritze.

Zuvor wurde die murine Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 in RPMI 1640-Medium (Gibco) expandiert, so dass zum Zeitpunkt der Fusion 10-12 dicht bewachsene Petrischalen mit

Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zur Verfügung standen. Dies entsprach etwa 4×10^8 Zellen. Die Zellen wurden durch kräftiges Resuspendieren von den Schalen abgelöst, in 50ml-„Falcon“-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (950U/min, Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in HEPES-Medium gewaschen und nochmal abzentrifugiert.

HEPES-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) mit 25mM HEPES-Puffer (Biochrom)

12.4.4 Isolierung von Peritonealmakrophagen

Die Mäuse wurden durch Begasung mit CO₂ getötet und das Fell über der Bauchdecke vorsichtig abpräpariert. Mit einer feinen Kanüle (0,45µm) wurden 4ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle injiziert und diese anschließend vorsichtig massiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben und mit einer feinen Präparierschere wurde ein kleines Loch geschnitten, durch das mit einer sterilen Pasteurpipette die Zellsuspension aus der Bauchhöhle abgezogen werden konnte. Die Makrophagen einer Maus wurden auf 8 Zellkultur-Platten (100mm) verteilt und als „Feeder“-Zellen für Hybridomzellen verwendet. Für eine Zellfusion wurden die Makrophagen 3 Tage vorher in HA-Selektionsmedium (siehe unten) in 24-Loch-Platten ausplattiert.

12.4.5 Fusion

Die Myelomzellen wurden in HEPES-Medium aufgenommen und auf das Lymphozytensediment gegeben, beide Zelltypen wurden durch Resuspendieren gemischt und zusammen bei 950U/min (5min, Heraeus Megafuge 1.0R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment durch leichtes Schütteln des Röhrchens aufgelockert und im Wasserbad auf 37°C gebracht. Um die Temperatur während des Fusionsvorganges auf 37°C zu halten, wurde bei den nachfolgenden Schritten das Röhrchen in das Wasserbad gehalten. Innerhalb einer Minute wurde tropfenweise 1ml PEG 4000 (Polyethylenglycol) auf das Zellsediment gegeben. Dabei wurde das Röhrchen leicht geschüttelt. Nach einer weiteren Minute wurde das PEG langsam durch Zugabe von HEPES-Medium ausverdünnt: 1ml in 30 Sekunden, 3ml in 30 Sekunden und schließlich 16ml innerhalb einer Minute. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 37°C inkubiert,

dann abzentrifugiert, in HA (Hypoxanthin/Azaserin)-Selektionsmedium aufgenommen und auf vorbereiteten 24-Loch-Platten ausplattiert. Um die Wachstumsbedingungen für die fusionierten Zellen zu verbessern, enthielten die Kulturen auch murine Peritonealmakrophagen (Isolierung siehe Punkt 12.4.4).

Das Selektionsverfahren zwischen Myelom- und Hybridomzellen basiert auf einem Enzymdefekt der Myelomzellen. Durch die Zugabe von Azaserin wird der Hauptsyntheseweg der Purinbasen, die für die Synthese von Nukleinsäuren bereitgestellt werden müssen, blockiert. Normale Zellen verfügen über einen Reserveweg, und können deshalb bei Zugabe von Hypoxanthin überleben. Die Myelomzellen können dagegen diesen Reserveweg nicht nutzen, da sie nicht über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase verfügen, so dass sie nach wenigen Tagen absterben. Die Lymphozyten, die nicht fusioniert sind, sind in Kultur ohne weitere Stimulation nicht lange lebensfähig, so dass nur Zellen überleben, die aus der Fusion einer Myelomzelle (Immortalisierung) und eines Lymphozyten (Kompensation des Stoffwechseldefektes) hervorgegangen sind.

Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Selektionsmedium versorgt, und nachdem sich nach 8-10 Tagen deutlich sichtbare Zellklone entwickelt hatten, wurden die Überstände getestet (siehe Punkt 12.4.6). Positive Kulturen wurden auf 6-Loch-Platten expandiert. Sobald sie dort eine ausreichende Dichte erreicht hatten, wurden die fusionierten Zellen eingefroren und die Überstände auf spezifische Antikörper untersucht.

PEG-Lösung: 5g Polyethylen-Glycol (PEG) 4000 (Merck) wurden bei 60°C (Wasserbad) in 5ml HEPES-Medium gelöst, der pH auf 7,4 gebracht und die Lösung anschließend durch einen 0,2µm-Filter (Sartorius) sterilfiltriert.

HA-Selektionsmedium: OPTIMEM-Medium (Gibco) wurde mit 5% FKS (Gibco), 2mM L-Glutamin (Gibco) und 10000units/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) versetzt. Zur Selektion wurden außerdem 20mg/l Hypoxanthin und 1,5mg/l Azaserin (Sigma) zugegeben.

12.4.6 Durchmusterung der Hybridom-Überstände

Da für die Herstellung der Antikörperbank als Antigen ein Gemisch aus Proteinen der auskeimenden Sporen und des Myzels verwendet wurde, wurde die Durchmusterung auf Proteinblots mit den entsprechenden Proteinen durchgeführt. Dafür wurden SDS-Gele mit speziellen Kämmen angefertigt. Die Form der Kämmen war so, dass im Sammelgel zwei Taschen entstanden, eine kleine Tasche an der Seite diente zum Auftragen des Proteinstandards, die andere Tasche verlief über die restliche Länge des Gels, hier wurden die zu testenden Proteine aufgetragen. Nach dem „Western Blot“ wurden die Proteinmembranen in einer speziellen Testkammer (Miniblotter (Biometra)), eingespannt. In dieser Testkammer können bis zu 16 Antikörper-Überstände getestet werden. In jeden Schlitz der Kammer wurden 200µl des jeweiligen Antikörper-Überstandes aufgebracht und nach 1h Inkubation bei 37°C wurde die Membran entnommen und 3mal mit TBS-T gewaschen. Die weiteren Schritte wurden wie unter 10.11.2 beschrieben durchgeführt. Für die rekombinant hergestellten Antigene wurde die Durchmusterung der Fusion mit Hilfe des „ELISA-Screenings“ durchgeführt.

ERGEBNISSE

13 Morphologische Untersuchungen des Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*

13.1 Von der ruhenden Spore zum Myzel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die zu einem besseren Verständnis der Vorgänge während des Wachstums von *A. fumigatus* beitragen sollen. Dafür sollten die Germinationsstadien der ruhenden Sporen, der auskeimenden Sporen und der Hyphen miteinander verglichen werden. Zunächst wurden dafür mikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Germinationsstadien des *A. fumigatus* Stammes ATCC 46645 angefertigt. Hierfür wurden Deckgläschen in eine 6-Loch Zellkulturschale verteilt und in jede Vertiefung wurden 3ml AMM pipettiert und mit 6×10^8 Sporen/Vertiefung beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu 32h. Die Deckgläschen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in Cacodylatpuffer fixiert und für die Raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen präpariert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Rohde an der GBF-Braunschweig durchgeführt.

Ein morphologisches Charakteristikum der ruhenden Konidie ist die echinulate Oberflächenmorphologie (siehe Abb. 6 A). Diese wurde bereits für andere *A. fumigatus*-Stämme beschrieben und stellt wahrscheinlich eine hydrophobe Hüllschicht dar (Hearn & Mackenzie, 1980). Nach einer Inkubation von 6-8h in AMM bei 37°C waren viele Sporen vergrößert beziehungsweise angeschwollen, während andere unter diesen Bedingungen morphologisch nicht von ruhenden Sporen zu unterscheiden waren. Bei einigen kleineren Konidien war allerdings zu diesem Zeitpunkt die echinulate Oberflächenstruktur nicht mehr detektierbar, diese waren dagegen durch eine glatte Oberfläche mit teilweise anhaftendem Material gekennzeichnet (siehe Abb. 6 B, Pfeil). Dabei könnte es sich möglicherweise um Überreste der hydrophoben Hüllschicht handeln (Rohde *et al.*, 2002). Nach dem Verlust der hydrophoben Hüllschicht (echinulate Struktur) führt Wasseraufnahme zu einem Anschwellen der Konidien. Dies ist ein charakteristischer Schritt während der Auskeimung (Van Etten *et al.*, 1983). Im Falle von *A. fumigatus* ATCC 46645 führt dieser Vorgang zu einer Zunahme des Zelldurchmessers um einen

Faktor von 1,5-3,0 (vgl. Abb. 6 A und B). Die Oberflächenbeschaffenheit der angeschwollenen Konidien ist deutlich unterschiedlich zu der der ruhenden Konidien, unabhängig davon, ob sie die hydrophobe Oberfläche verloren haben oder nicht. Die Morphologie auskeimender Sporen ist nicht glatt, vielmehr führen vielfältige Einfaltungen zu einem „gehirnartigen“ Erscheinungsbild (siehe Abb. 6 B und C). Durch die schonende Methode der Kryo-Elektronenmikroskopie wurde diese Struktur bestätigt, es handelte sich dabei nicht um ein Artefakt des Fixierungsprozesses (Rohde *et al.*, 2002).

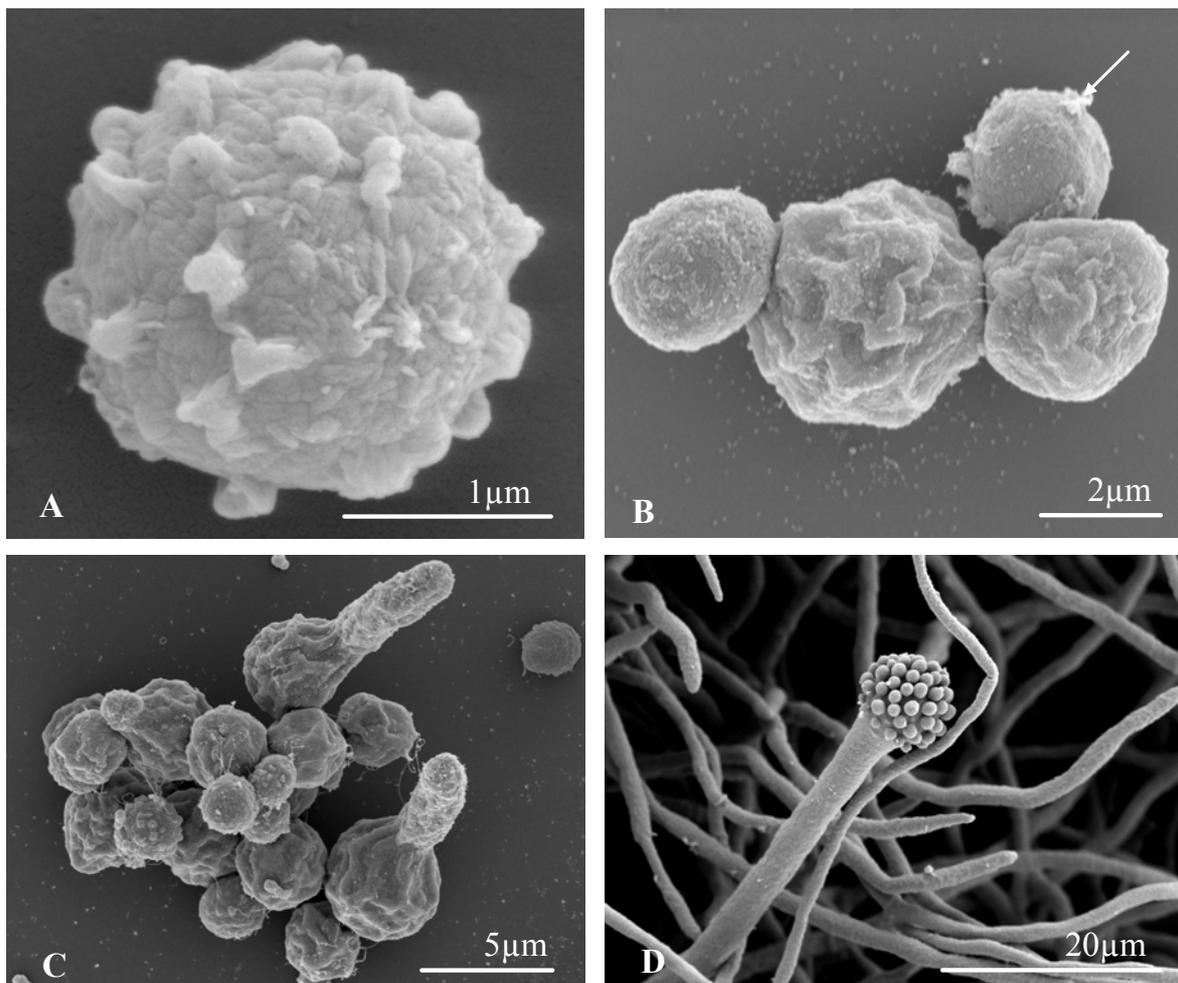


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Auskeimungsvorganges. **A** Darstellung einer ruhenden Konidie (\varnothing ca. $2\mu\text{m}$) mit echinulater Morphologie. **B** Angeschwollene Konidie nach ca. 6h Wachstum. Der Pfeil deutet auf die Überreste der hydrophoben Hüllschicht auf kleinere, nicht angeschwollene Konidien. Die angeschwollene Konidie zeigt eine „gehirnartige“ Morphologie. **C** Auskeimende Sporen nach ca. 8h Wachstum in AMM (\varnothing $3\text{-}5\mu\text{m}$): An einem Pol der globulär angeschwollenen Konidie erscheint ein Keimschlauch. **D** Myzel-Hyphen nach 24h in AMM: Hyphenenden und Myzelgeflecht. Konidiophoren, an deren Köpfchen neue Phialiden erscheinen.

Im nächsten Schritt der Auskeimung erscheint an einem Pol der sphärisch angeschwollenen Konidie ein Keimschlauch. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die klar unterschiedliche Morphologie der Keimschläuche: sie sind von vielen filamentösen Fortsätzen bedeckt, die sich auf der „älteren“ Oberfläche der sphärischen Konidie nicht, oder nur in sehr geringen Mengen zeigen (siehe Abb. 7 A).

Auf der Oberfläche einiger Keimschläuche, die in Kontakt mit der festen Glasoberfläche standen, scheinen die Fortsätze radial verlängert und am Glas zu haften (siehe Abb. 7 B). Die Länge dieser gestreckten Fortsätze beträgt ca. $1\mu\text{m}$, der Durchmesser ca. 30nm . Eine höhere Vergrößerung der Übergangsregion von geschwollener Konidie zu Keimschlauch ist in Abb. 7 D dargestellt. In dieser Aufnahme wird eine Grenze (mit Sternen dargestellt) zwischen dem globulären Körper (links) und dem Keimschlauch (rechts) deutlich.

Die Untersuchung von Keimschläuchen verschiedener Länge zeigte, dass die oben beschriebenen filamentösen Fortsätze nur auf die ersten $2\text{--}7\mu\text{m}$ des Keimschlauchs beschränkt waren. Von der Konidie entfernter liegende Bereiche der Hyphen wiesen diese Fortsätze nicht mehr auf (Rohde *et al.*, 2002).

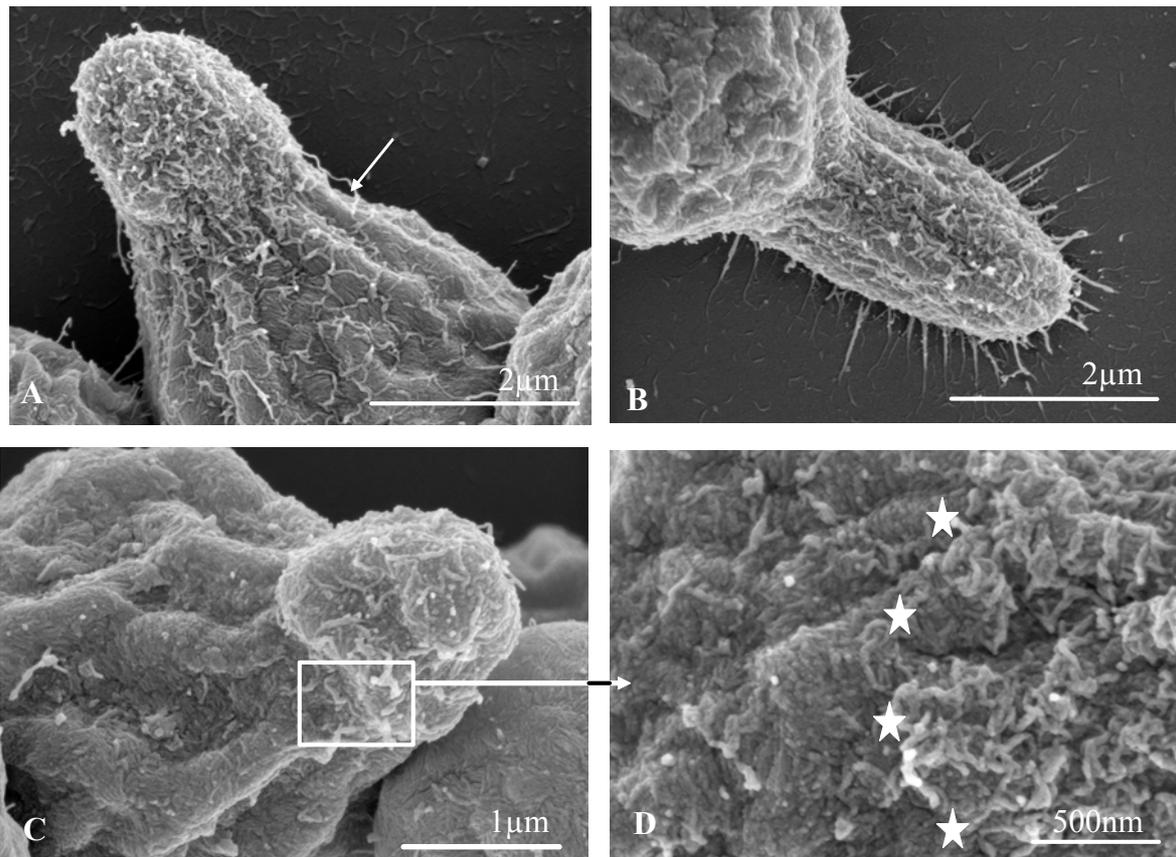


Abb. 7: Identifizierung von filamentösen Fortsätzen am Beginn von Keimschläuchen. **A** Oberflächenstrukturen des neu gebildeten Keimschlauchs (Pfeil). **B** filamentöse Fortsätze auf einem neu gebildeten Keimschlauch bei Anheftung an eine Glasoberfläche. **C** und **D** Grenze zwischen globulärem Konidienkörper und Keimschlauch, Sterne zeigen Grenze an (links Konidie, rechts Keimschlauch).

14 Optimierung der Anzuchtbedingungen verschiedener Germinationsstadien von *Aspergillus fumigatus*

Für weitere Untersuchungen der Germination mit Hilfe proteinchemischer Methoden mussten homogene Präparationen der verschiedenen Wachstumsphasen hergestellt werden. Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte bereits gezeigt werden, dass die Sporen nach Wachstum auf Potato-Dextrose-Agar (PD-Agar) eine einheitliche Größe von 2-3µm aufwiesen. Auch für das Myzel (MY) (Flüssigkultur, 24h bei 37°C schüttelnd inkubiert) konnten Bedingungen gefunden werden, die zu einem einheitlichen Hyphengeflecht ohne Konidien führten.

Das Stadium der Auskeimung stellte zunächst ein Problem dar. Nach achtstündigem Wachstum in AMM befanden sich viele der Sporen zwar in der Phase der Auskeimung, einige Sporen zeigten auch deutliche Keimschlauchbildung, aber ein Großteil befand sich noch im Stadium der Schwellung und einige hatten gerade erst die hydrophobe Hüllschicht abgeworfen. Auch nach verlängerter Inkubationszeit in AMM konnte kein einheitliches Auskeimen erzielt werden. Für eine vergleichende Analyse des Proteoms der verschiedenen Stadien musste aber ein höherer Prozentsatz auskeimender Sporen erreicht werden.

Um Bedingungen für ein homogeneres Auskeimen von *A. fumigatus* zu etablieren, wurden verschiedene Medien getestet: AMM, Brain-Heart-Infusion-Medium, YG, YEPD-Medium, LB-Medium, RPMI 1640-Zellkulturmedium und DMEM. Nach einem Wachstum von 8h wurde der Grad der Auskeimung bestimmt. Das YG-Medium führte zu einem Anteil von 80% auskeimenden Sporen und wurde daher für die weiteren Analysen verwendet (siehe Abb. 8).

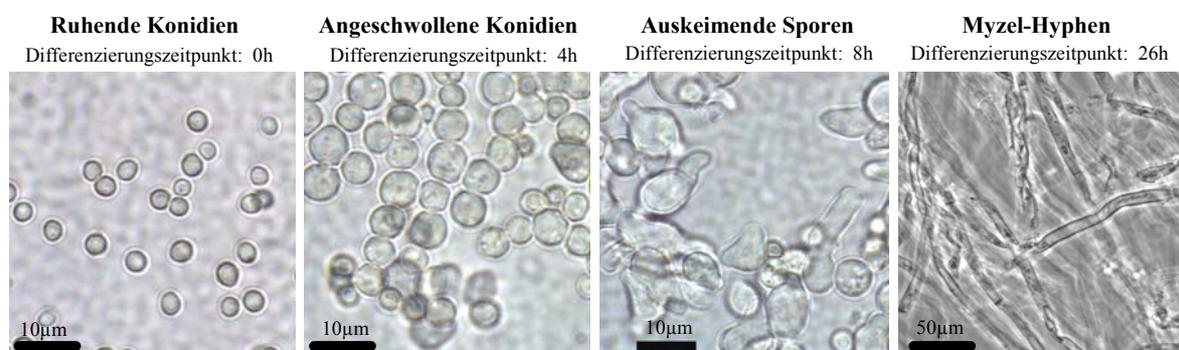


Abb. 8: Darstellung der verwendeten Differenzierungsstadien im Lichtmikroskop. Das Wachstum erfolgte in YG-Medium.

15 Etablierung einer geeigneten Aufschlussmethode für *Aspergillus fumigatus*

Ruhende Konidien, auskeimende Sporen und ein Myzelgeflecht stellen drei grundlegend verschiedene Stadien im Lebenszyklus von *A. fumigatus* dar. Ziel dieser Arbeit war, Proteine zu identifizieren, die für diese unterschiedlichen Stadien charakteristisch sind. Differenzielle Proteinexpression sollte durch vergleichende Proteomanalysen nachgewiesen werden. Die Proteomanalyse stellt eine wichtige Ergänzung zur Genomanalyse dar, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation lässt sich nicht nur durch das Entschlüsseln der genomischen DNA eines Organismus charakterisieren. Auch gibt es nur eine geringe Korrelation zwischen den Mengen an mRNA und den entsprechenden Genprodukten, so dass man nur mit Hilfe der Proteomanalyse feststellen kann, welche Proteine unter bestimmten Bedingungen wie stark exprimiert werden (Wilkins *et al.*, 1996). Eine der größten Herausforderungen der Proteomanalyse ist die reproduzierbare Auftrennung komplexer Proteingemische unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse. Die Methode der Probenvorbereitung ist dabei der Schlüssel zu einer erfolgreichen Analyse (Cutler *et al.*, 1999).

Deshalb ist die Isolierung der gesamten löslichen Proteine der erste Schritt für die Proteomanalyse mittels gelelektrophoretischer-Methoden und insbesondere der 2D-Gelelektrophorese. Dafür sollten *A. fumigatus*-Zellen der verschiedenen Germinationsstadien geerntet und aufgeschlossen werden. Eine optimale Aufschlussmethode war nicht vorhanden und musste daher experimentell etabliert werden.

Eine geeignete Aufschlussmethode sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- (1) sie sollte die Extraktion der gesamten Proteine der löslichen Fraktion erlauben. Die Proteine sollten nach dem Aufschluss intakt sein und nicht während des Aufschlussprozesses degradiert werden.
- (2) weiterhin sollte es möglich sein, präparative Proteinmengen (zwischen 0,6-3mg) aus allen drei Germinationsstadien von *A. fumigatus* zu erhalten.
- (3) schließlich sollten alle Germinationsstadien (Sporen, auskeimende Sporen und das Myzel) auf dieselbe Weise aufgeschlossen werden können.

Um diese Bedingungen erfüllen zu können wurden mehrere Standard-Zellaufschlussmethoden getestet: (i) Aufschluss in der Retsch-Kugelmühle, (ii) Aufschluss

in der French-Press, (iii) Aufschluss im Mörser und (iv) Aufschluss im MSK-Zellhomogenisator. Parameter wie Aufschlusszeit, einzusetzendes Probevolumen, Kühlung der Proben und Proteindegradation wurden beurteilt. Vor- und Nachteile der einzelnen Aufschlussmethoden sind in Tab. 4 aufgelistet. Der MSK-Zellhomogenisator erfüllte alle Kriterien und wurde deshalb für die weiteren Analysen zum Zellaufschluss eingesetzt.

Tab. 4: Vorteile und Nachteile der einzelnen Aufschlussmethoden für *A. fumigatus*

Methode	Vorteil	Nachteil
Aufschluss in der <u>Retsch-Kugelmühle</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Kurze Aufschlusszeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Da mit 1,5ml Reaktionsgefäßen gearbeitet wird eignet sich diese Methode nicht für das Myzel • Keine Kühlmöglichkeit im Gerät, Gefahr der Degradation • Durch das geringe Probenvolumen können kaum präparative Proteinmengen erzielt werden
Aufschluss in der <u>French-Press</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Hohes Suspensionsvolumen, ca. 30ml Probe • Sauberes Arbeiten, da der Aufschlussprozess in einem geschlossenen Kolben abläuft 	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr schlechte Kühlmöglichkeit des Gerätes, Gefahr der Degradation • Der hohe Druck führt zu starker Erwärmung der Probe • Für das zähe Myzel nicht geeignet, da Ablaufschlauch verstopft
Aufschluss im <u>Mörser</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr gute Kühlmöglichkeit durch flüssigen Stickstoff • Für alle Germinationsstadien geeignet 	<ul style="list-style-type: none"> • Unangenehmes Arbeiten, da sich die Probe in einem offenen Gefäß befindet • Lange Aufschlusszeit • Relativ schlechte Reproduzierbarkeit im Bezug auf die erhaltene Proteinmenge
Aufschluss im <u>MSK-Zellhomogenisator</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr gute Kühlmöglichkeit durch CO₂ • Relativ kurze Aufschlusszeiten • Gute Reproduzierbarkeit der erhaltenen Proteinmengen • Alle drei Germinationsstadien können aufgeschlossen werden 	

Die Wahl eines geeigneten Lysepuffers kann die Qualität der isolierten Proteine entscheidend beeinflussen. Durch eine SDS-PAGE Analyse wurden die Proteinmuster nach Anwendung der unterschiedlichen Aufschlussverfahren und der Verwendung verschiedener Lysepuffer überprüft. Proteinabbau durch Proteasen war eines der Hauptprobleme. Verschiedene kommerziell erhältliche Proteaseinhibitoren wurden auf ihre

Verwendbarkeit getestet. Ein Lysepuffer der Proteaseinhibitoren gegen Serin-, Thiol- (PMSF, Phenylmethylsulfonyl-Fluorid), Metalloprotease (EDTA chelatiert 2-wertige Metallionen) und saure Proteasen (Pepstatin A), sowie einen Proteaseinhibitor-Cocktail (Protease Inhibitor Cocktail for fungal extracts, Sigma) enthielt, erwies sich als geeignet, um die Protein-Degradation effizient zu unterbinden.

Nach Optimierung des Zellaufschluss-Verfahrens und der Wahl eines geeigneten Lysepuffers konnten schließlich reproduzierbare Proteinmuster erhalten werden. Für die Proteinextraktion wurden ruhende Konidien, auskeimende Konidien und Myzel in Lysepuffer aufgenommen und im MSK-Zellhomogenisator aufgeschlossen. Ein Teil der Proteinlösung wurde einem Ultrazentrifugationsschritt (UZ-Schritt) (100000xg für 1h) unterzogen, um Membranen und partikuläre Strukturen zu sedimentieren. Für manche Fragestellungen war diese An- bzw. Abreicherung hilfreich. In den weiteren Experimenten wurde jedoch, falls nicht anders angegeben, die lösliche Fraktion der Gesamtzelllysate verwendet.

In Abb. 9 sind die Extrakte von auskeimenden Sporen dreier unterschiedlicher Aufschlüsse, jeweils vor UZ und nach UZ, dargestellt. Hier wird deutlich, dass durch die gewählte Aufschlussmethode reproduzierbare Proteinmuster erhalten werden können und keine erhebliche Protein-Degradation stattfindet. Die erzielte Ausbeute war zudem ausreichend für eine präparative 2D-Gelelektrophorese (zwischen 0,6-3 mg).

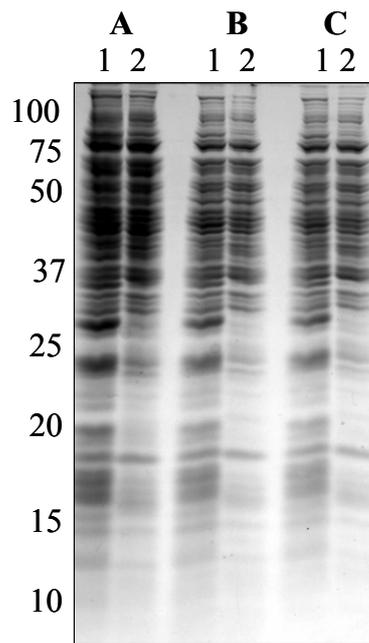


Abb. 9: Reproduzierbarkeit der Proteilmuster nach Aufschluss der auskeimenden Sporen im MSK-Zellhomogenisator. Coomassie-gefärbtes Gradientengel (7,5-20%), links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. **A**, **B** und **C** zeigen die Proteinextrakte der auskeimenden Sporen aus drei verschiedenen Ansätzen. Die Spuren 1 und 2 zeigen die Proteine der auskeimenden Sporen vor UZ (Spur 1) und nach UZ (Spur 2).

16 Identifizierung von phasenspezifischen Proteinen mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE

16.1 Vergleich des eindimensionalen Proteinmuster der verschiedenen Germinationsstadien

Um zu untersuchen, welche Proteine während der Sporenkeimung differentiell exprimiert werden, wurden eindimensionale Gradientengele (Hoefler-Gelsystem) vom löslichen Anteil des Gesamtproteins der verschiedenen Stadien (ruhende Konidien, auskeimende Konidien, Myzel) angefertigt. Der Vorteil eines Gradientengels ist die bessere Bandenauflösung innerhalb eines Gels, das durch einen Gradienten des Polyacrylamidgehalts im Gel zustande kommt. Hochmolekulare Proteine (MG = 100-250 kDa) und niedermolekulare Proteine (MG 0-20 kDa) können so gleichermaßen noch gut sichtbar auf demselben Gel aufgetrennt und dargestellt werden. Durch den Vergleich der eindimensionalen Proteinmuster zwischen ruhenden Konidien (SP), auskeimenden Konidien (AS) und Myzel (MY) konnten erste differentielle Proteine, d.h. Banden, die ausschließlich oder verstärkt in

einer Fraktion, nicht aber in den beiden anderen detektiert werden konnten, identifiziert werden (siehe Abb. 10).

In den ruhenden Konidien wurden 4 Proteine als differentielle Proteine identifiziert (siehe Abb. 10, A1 und B1), in den auskeimenden Sporen waren es 10 Proteine (siehe Abb. 10, A2). Auffallend war, dass in der Fraktion der auskeimenden Sporen einige Proteine nach einem Ultrazentrifugationsschritt im Proteinmuster nicht mehr vorhanden waren (siehe Abb. 10, vgl. C und D). Dieses Phänomen konnte bei der Hälfte der differentiellen Proteine aus den auskeimenden Sporen beobachtet werden. In der Fraktion des Myzels konnten 2 Proteine als differentielle Proteine identifiziert werden (siehe Abb. 10, E). Auch hier befand sich ein Protein nach einem Ultrazentrifugationsschritt im Sediment (siehe Abb. 10, vgl. E).

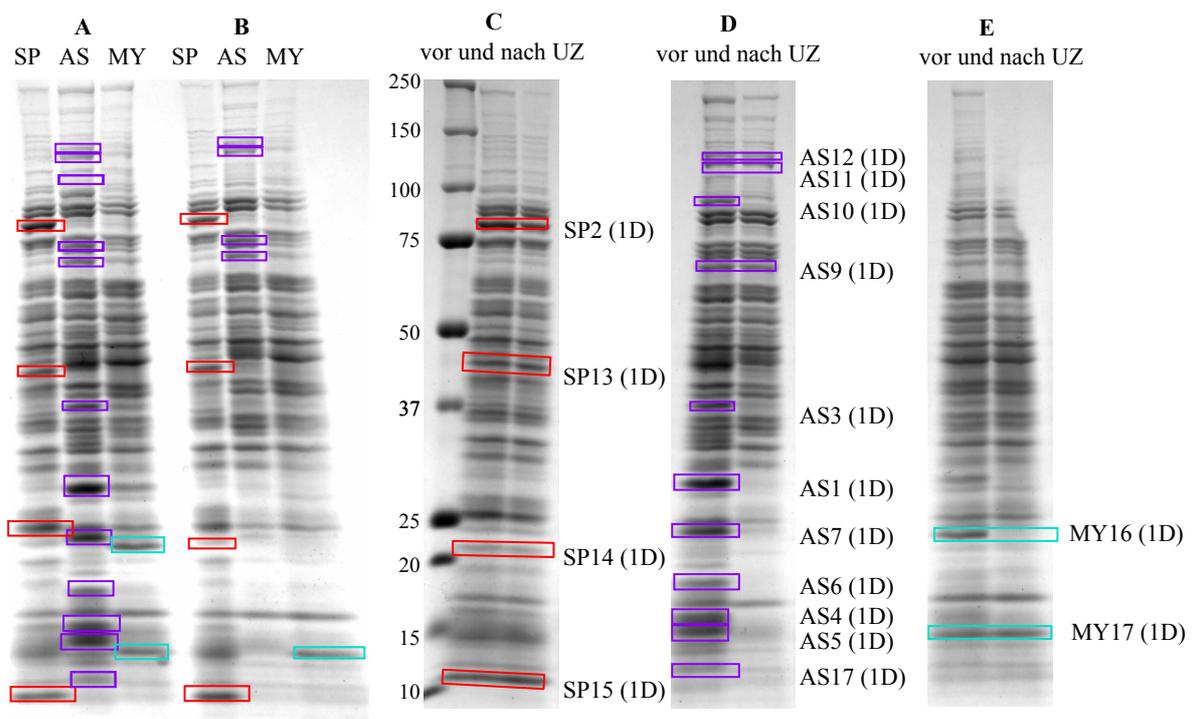


Abb. 10: Identifizierung phasenspezifischer Proteine mit Hilfe einer 1D-PAGE. Coomassie-gefärbtes Gradientengel mit einem Polyacrylamidgehalt von 7,5-20%. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. **A** Proteine der jeweiligen Wachstumsfraktionen vor UZ, **B** Proteine der jeweiligen Wachstumsfraktionen nach UZ. Die Gele C-E stellen die Proteine der ruhenden Sporen (Gel C), der auskeimenden Sporen (Gel D) und der Hyphen (Gel E) dar. Hervorgehoben sind differentielle Proteine deren Benennung rechts neben den Gelen der jeweiligen Differenzierungsstadien angegeben ist.

16.2 Analyse der identifizierten phasenspezifischen Proteine

Die identifizierten phasenspezifischen Proteine wurden aus dem Gel ausgestochen, extrahiert und mit Hilfe von LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer) analysiert. Die Nomenklatur erfolgte sowohl auf den Gelen der 1D- als auch der 2D-PAGE nach der Reihenfolge des Auffindens. Die Spektren wurden mit der Analyst Software ausgewertet. Durch die MASCOT-Proteindatenbank konnte eine passende Proteinsequenz für die erhaltenen Peptide identifiziert werden. Die für diese Arbeit verwendete lokale MASCOT-Datenbank Suchmaschine benutzt sowohl eine aktuelle Version der NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.NCBI.nlm.nih.gov/>) nr (non redundant) Protein-Datenbank als auch eine Aspergillus-spezifische Datenbank, die auf Sequenzen des Aspergillus-Genomprojektes beruht. Vorläufige Sequenzdaten wurden vom „The Institute for Genomic Research“ (TIGR) erhalten (<http://www.tigr.org>).

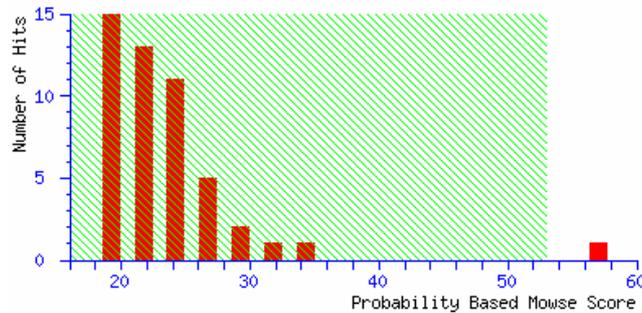
Die Proteinrecherchen wurden in allgemeinen Datenbanken und in der TIGR *A. fumigatus*-Genomdatenbank (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>) durchgeführt, unter der Verwendung von BlastP (Protein gegen Protein-BLAST [Basic Local Alignment Search Tool]) und tBlastN (in DNA-Sequenz rückübersetzte Proteinsequenz gegen Nukleotid-BLAST). Die Vorhersagen der Intron-Exon Struktur von putativen ORFs (offenen Leserastern) wurden unter Benützung des GENSCAN-Programms mit dem Algorithmus für Arabidopsis (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) vorgenommen. Vorhersagen über mögliche Signalsequenzen erfolgten mit SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

In Abb. 11 wird eine MASCOT Identifizierung beispielhaft anhand des sporenspezifischen Proteins SP 13 (1D) dargestellt. Die Graphik in Abb. 11 Teil A zeigt die Signifikanz der Homologien von Datenbanksequenzen zu den durch LC-MS/MS-Analyse identifizierten internen Sequenzen des Proteins SP 13 (1D). In diesem Fall ist ein „Score“-Wert über 53 signifikant. Die „glimmer“-Sequenz ist ein vorhergesagtes theoretisches *A. fumigatus*-Protein, das durchaus noch Fehler beinhalten kann. Dieses entstand durch Annotation der *A. fumigatus*-Genomsequenz mit Hilfe des Programms GENSCAN. Die Sequenz des SP 13 (1D) mit dem glimmer_7014 wies einen signifikanten „Score“-Wert von 57 auf. Das theoretische Molekulargewicht (MG) betrug 43 kDa und der theoretische pI war 5,63 (Abb. 11 B). Die identifizierten Peptide, die der Proteinsequenz glimmer_7014 zugeordnet

werden konnten, sind in Abb. 11 B rot hervorgehoben. Mit Hilfe dieser Sequenz konnte eine Datenbanksuche in NCBI gegen nr durchgeführt werden. Als Ergebnis zeigte sich eine 83%ige Homologie zu einer Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase aus *A. niger*.

A

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 53 are significant ($p < 0.05$).



1. glimmer_7014	Mass: 42977	Total score: 57	Peptides matched: 8
2. glimmer_9702	Mass: 6774	Total score: 35	Peptides matched: 3
3. glimmer_8786	Mass: 12545	Total score: 31	Peptides matched: 3
4. glimmer_5554	Mass: 57483	Total score: 29	Peptides matched: 5
5. glimmer_5330	Mass: 46090	Total score: 29	Peptides matched: 5
6. glimmer_10082	Mass: 78105	Total score: 28	Peptides matched: 6
7. glimmer_2008	Mass: 14757	Total score: 28	Peptides matched: 3

B

Nominal mass (M_r): 42977; Calculated pI value: 5.63
Match to: **glimmer_7014**; Score: 57

```

1  MGKKAAIQFGG GNIGRGFVAE FLHEAGYEVV FIDVVDKIID ALKSTPSYEV
51  TEVSEEGEKT KTITNYRAIN SKTNEEDVVK EIGTADVVC AVGNVLKFI
101 APVIAKGIDA RTASKPVAVI ACENAIGATD TLRGFIEQNT DKDRLSSMSE
151 RARFANSAID RIVPNQPPNA GLNVRIEKFY EWTVEQTPFG EFGHPDIPAI
201 HWVDDLKPYI ERKLFTVNTG HATTAYYGHM RGKKMIADAL ADAEIRQIVH
251 KVLEQTAKLI TTKHEITEQE QNEYVDTIVK RMSNPFLEDN VERVGRAPLR
301 KLSRNERFIG PASQLAEKGL PFDALLGSIE MALRFQNVPG DEESAELAKI
351 LKEMSAEEAT GKLTGLEKHH PLYEPVQNVI AKVQKDSK
    
```

Abb. 11: Beispiel einer MASCOT-Identifizierung nach LC-MS/MS-Analyse anhand des sporenspezifischen Proteins SP 13 (1D). Teil A gibt die „Score“-Werte der Peptidsequenzen, die einer Proteinsequenz in der Datenbank zugeordnet wurden, graphisch wieder. Die Schraffur gibt an, ab welchem Wert ein „Score“ signifikant ist, in diesem Fall ab einem „Score“-Wert von 53. In Teil B ist die Proteinsequenz (glimmer_7014) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 57 dargestellt. Die acht übereinstimmenden Peptidsequenzen sind in rot hervorgehoben.

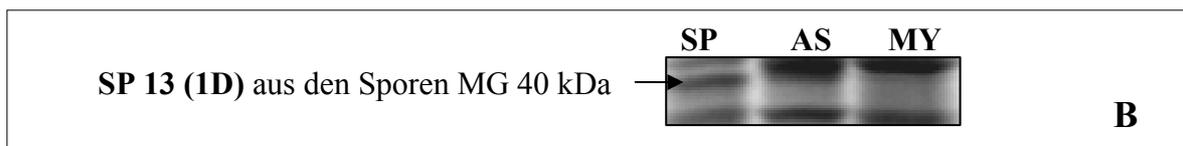
Im Folgenden werden die identifizierten differentiellen Proteine, die durch LC-MS/MS analysiert und denen eine Sequenz zugeordnet werden konnte, beschrieben. Jedes Protein wird anfangs nochmals als Ausschnitt des Gradientengels aus Abb. 10 dargestellt. Das

Vorgehen bei der Auswertung der folgenden Proteine erfolgte nach dem Verfahren, das in Abb. 11 dargestellt und beschrieben ist.

16.2.1 Identifizierung sporenspezifischer Proteine aus den eindimensionalen Gradientengelen



Das sporenspezifische Protein **SP 2 (1D)** hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von ca. 85 kDa. SP 2 ist eines der quantitativ dominantesten Proteine in den ruhenden Sporen (siehe A). Da es weder in den auskeimenden Sporen noch in den Hyphen zu finden war, wurde es als differentielles sporenspezifisches Protein aus dem Gel ausgeschnitten. Durch eine LC-MS/MS-Analyse konnte MASCOT den Peptiden eine Sequenz mit einem signifikanten „Score“-Wert von 173 (siehe Anhang) zuordnen. Das theoretische Molekulargewicht (84,5 kDa) passte sehr gut zu den experimentellen Daten (85 kDa). Der errechnete pI war 6,56. Durch die in die NCBI-Datenbank eingetragene Sequenz gi|2493538 konnte dem Protein eine 98%ige Homologie zu Katalase A (CatA) aus *A. fumigatus* zugewiesen werden.



Das sporenspezifische Protein **SP 13 (1D)** (siehe B), wurde aus dem Gel isoliert und mit Hilfe der LC-MS/MS Methode analysiert. Die MASCOT-Suchmaschine lieferte eine Sequenz (glimmer_7014), die einen signifikanten „Score“-Wert von 57 aufwies (siehe auch Abb. 11). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 43 kDa, was gut zu den experimentellen Daten (40 kDa) passte. Der errechnete pI Wert beträgt 5,63. Nach einer NCBI-Datenbanksuche mit der durch MASCOT ermittelten Sequenz wurde eine 83%ige Homologie zu einer Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase aus *A. niger* festgestellt.

Die Identität der sporenspezifische Proteine **SP 14 (1D)** und **SP 15 (1D)** konnten mit Hilfe der LC-MS/MS Methode nicht bestimmt werden. Bei diesen Proteinbanden handelte es sich vermutlich um mehrere Proteine, die nicht aufgetrennt werden konnten. Das Vorkommen von Mischbanden kann bei der eindimensionalen Auftrennung von Proteinen nicht ausgeschlossen werden.

16.2.2 Identifizierung von auskeimungsspezifischen Proteinen aus den eindimensionalen Gradientengelen



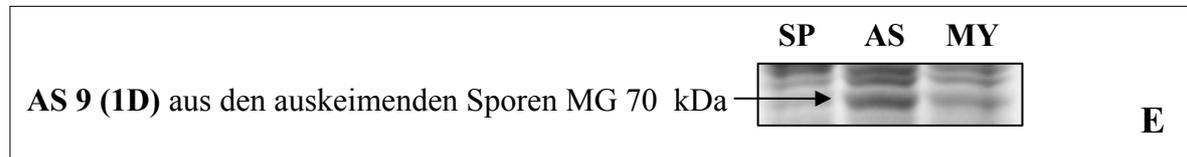
Das **AS 1 (1D)** Protein (siehe C) ist ein Protein, das sich stark in der Fraktion der auskeimenden Sporen anreichert. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt wandert dieses Protein ins Sediment (siehe Abb. 10, D Protein AS1 (1D)). Das experimentell ermittelte Molekulargewicht betrug 30 kDa. Nach LC-MS/MS-Analyse lieferte die MASCOT Suchmaschine eine Sequenz (glimmer_934), die einen signifikanten „Score“-Wert von 94 aufwies (siehe Anhang). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 39 kDa, der pI 9,64. Durch eine NCBI-Datenbanksuche wurde eine 96%ige Homologie zu einem zytosolischen putativen ribosomalen Protein 10 von *N. crassa* gefunden. Weitere homologe aber noch hypothetische Proteine fanden sich für *A. nidulans* (98% Homologie) und für *Magnaporthe grisea* (96% Homologie). Das Protein aus *A. nidulans* besitzt eine Größe von 29,1 kDa, was sehr gut zu den experimentellen Daten passt. AS 1 (1D) ist ein Beispiel dafür, dass die Vorhersagen der glimmer-Sequenzen fehlerbehaftet sein können.



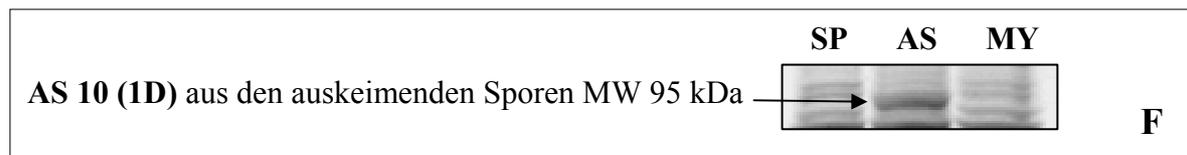
Das auskeimungsspezifische Protein **AS 7 (1D)** (siehe D) war ebenfalls ein Protein, das nach Ultrazentrifugation auf dem Gel nicht mehr sichtbar war. Die Sequenz, die aus der MASCOT Suchmaschine nach LC-MS/MS-Analyse (glimmer_8905) hervorging, hatte ein theoretisches Molekulargewicht von 19,5 kDa, auf dem Gel zeigte das Protein ein

ERGEBNISSE

Molekulargewicht von 24 kDa. Der errechnete pI betrug 10,24 (siehe Anhang). Nach einer NCBI-Datenbanksuche konnte eine 94%ige Homologie zu einem ribosomalen L10-Protein aus *Paracoccidioides brasiliensis* gefunden werden.



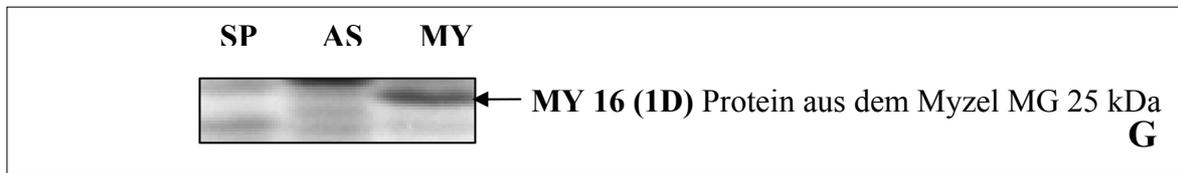
Das Protein **AS 9 (1D)**, das verstärkt in den auskeimenden Sporen zu finden war (siehe E), hat ein experimentelles Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Nach LC-MS/MS-Analyse und anschließender MASCOT Auswertung wurde für AS 9 eine Sequenz mit einem signifikanten „Score“-Wert von 197 erhalten. Das theoretische Molekulargewicht dieser Sequenz ist 73 kDa, der pI ist 8,20. Durch eine NCBI-Datenbanksuche wurde eine 91%ige Homologie zu einer ATP-Citrate-Lyase Untereinheit 1 aus *Sordaria macrospora* gefunden.



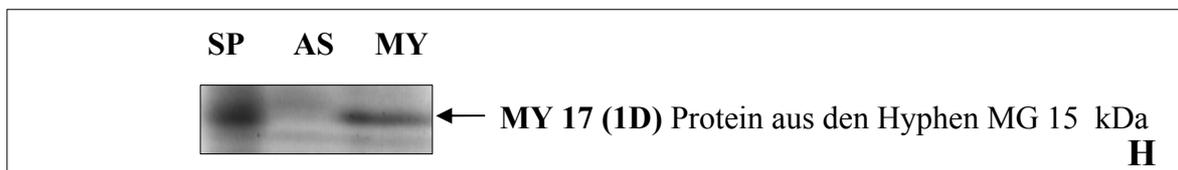
Das experimentelle Molekulargewicht von **AS 10 (1D)** betrug ca. 95 kDa (siehe F). Auch dieses Protein war nach UZ nicht mehr auf dem Gel sichtbar (siehe Anhang). Die nach LC-MS/MS und MASCOT-Auswertung erhaltene Sequenz (glimmer_8509) hatte einen signifikanten „Score“-Wert von 260 und ein theoretisches Molekulargewicht von 93 kDa, was gut zu den experimentell erhaltenen Daten passt. Der errechnete pI Wert war 6,51. Die Datenbanksuche in NCBI ergab eine 85%ige Homologie zu einem Elongationsfaktor 2 aus *Candida albicans*.

Die Identität der auskeimungsspezifischen Proteine **AS 3 (1D)**, **AS 4 (1D)**, **AS 5 (1D)**, **AS 6 (1D)**, **AS 12 (1D)** und **AS 11 (1D)** konnten mit Hilfe der LC-MS/MS Methode nicht bestimmt werden.

16.2.3 Identifizierung von hyphenspezifischen Proteinen aus den eindimensionalen Gradientengelen



Das hyphenspezifische Protein **MY 16 (1D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 25 kDa (siehe G). Nach einem Ultrazentrifugationsschritt war das Protein auf dem Gel nicht mehr in der löslichen Fraktion der Proteine nachweisbar (siehe Abb. 10, vgl. A3 und B3). Die LC-MS/MS-Analyse lieferte nach einer MASCOT-Auswertung eine Proteinsequenz mit einem signifikanten „Score“-Wert von 154. Das nominale Molekulargewicht beträgt 23,4 kDa (siehe Anhang), was zu den experimentellen Daten passte, der pI beträgt 7,14. Nach einer Datenbanksuche mit der Sequenz gi|12231036 in NCBI wurde das Protein mit einer Homologie von 93% als Mangan-abhängige Superoxiddismutase aus *A. fumigatus* identifiziert.



MY 17 (1D) ein Protein, das in den Hyphen stärker exprimiert wurde, hat ein experimentelles Molekulargewicht von 15 kDa (siehe H). Die MASCOT Suchmaschine lieferte nach einer LC-MS/MS-Analyse eine Sequenz (glimmer_1056) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 95. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 12,2 kDa, was zu den experimentellen Daten passte. Der errechnete pI beträgt 6,16 (siehe Anhang). Die Datenbanksuche in NCBI lieferte Homologien zu mehreren Proteinen: eine 76%ige Homologie zu einem unbenannten Protein aus *Debaryomyces hansenii*, eine 68%ige Homologie zu dem hypothetischen Protein CNBC1030 aus *Cryptococcus neoformans* und des weiteren eine 60%ige Homologie zum CipC (Concanamycin induced protein) Protein aus *A. nidulans*.

17 Identifizierung von phasenspezifischen Proteinen mit Hilfe der zweidimensionalen SDS-PAGE (2D-PAGE)

17.1 Vergleich der Proteinmuster mit Hilfe der 2D-PAGE

Um eine bessere Auflösung im Proteinmuster zu erhalten wurde eine zweidimensionale SDS-PAGE durchgeführt. Mit dieser Methode werden die Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach der erfolgreichen Etablierung einer geeigneten Methode für die 2D-PAGE von *A. fumigatus* wurden die Versuche dreimal unter denselben Bedingungen wiederholt. Auf die Gele wurde jeweils eine Proteinmenge von 800µg aufgetragen. Die Färbung erfolgte bei allen Gelen parallel über Nacht. Die Auswertung erfolgte hauptsächlich durch den visuellen Vergleich der Gele (siehe Abb. 12).

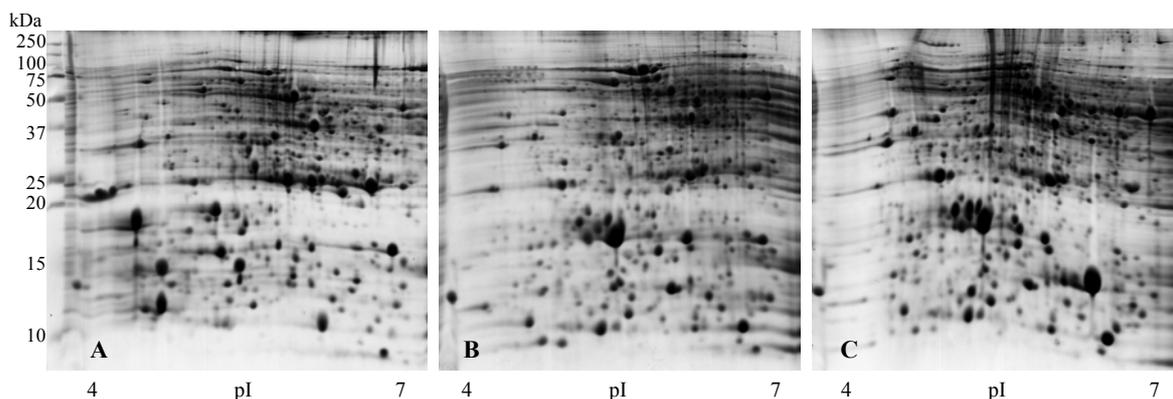


Abb. 12: Gegenüberstellung der 2D-PAGE Gele der verschiedenen Wachstumsfraktionen. Gezeigt sind Coomassie-gefärbte 12%ige 2D-Gele mit einem pH-Bereich 4-7. **A** zeigt die Proteine der ruhenden Sporen, **B** stellt die Proteine der auskeimenden Sporen dar und **C** zeigt die Proteine der Myzel-Hyphen.

17.2 Identifizierung phasenspezifischer Proteine aus 2D-Gele

Der Vergleich der 2D-Gele zeigt deutlich mehr Unterschiede, als in der 1D-Analyse gefunden wurden. Insgesamt ähneln sich die Muster von auskeimenden Sporen und Myzel-Hyphen, während das Proteinmuster der ruhenden Sporen deutlich unterschiedlich ist. Insbesondere im sauren Bereich des unteren Molekulargewichtsbereichs finden sich bei den ruhenden Sporen deutlich mehr Proteine mit starker z.T. Expression (siehe Abb. 13). Proteine, die für AS und MY spezifisch waren, fanden sich insbesondere ab einem pH Bereich von 5.

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Methode mit der es schwierig ist, alle Molekulargewichts-Bereiche gleich scharf aufzutrennen, Proteine mit einem höheren Molekulargewicht wandern bei der isoelektrischen Fokussierung nicht besonders gut im elektrischen Feld. Durch mehrere Versuche ist es gelungen den Molekulargewichtsbereich bis 70 kDa reproduzierbar und gut aufgetrennt im SDS-Gel darzustellen, das Problem der Proteine mit höherem Molekulargewicht konnte noch nicht gelöst werden, aus diesem Grund werden die hochmolekularen Proteine in diesem Teil der Arbeit kaum behandelt.

Die Abb. 13 bis Abb. 15 zeigen die differentiell exprimierte Proteine der einzelnen Wachstumsfraktionen. In der Tab. 5 sind die Proteine aufgelistet mit den Angaben des Molekulargewichts (MG) und des isoelektrischen Punkts (pI). Abb. 13 zeigt die Proteine der ruhenden Sporen, in diesem Gel wurden 25 Proteine als sporenspezifisch identifiziert und entweder mit Edman-Abbau oder LC-MS/MS analysiert. Nicht bei allen Proteinen gelang eine Analyse bis zur vollständigen Identifizierung, bei einigen Proteinen wurden Hinweise zu ihrer Lokalisation in der Zelle durch eine spezielle Datenbanksuche erhalten. Bei anderen konnte weder in der *A. fumigatus*-Datenbank noch in der *A. nidulans*-Datenbank eine homologe Sequenz gefunden werden. Ähnlich verhielt es sich mit den Proteinen der auskeimenden Sporen (siehe Abb. 14), in dieser Fraktion wurden 9 differentielle Proteine gefunden. In der Fraktion des Myzels (siehe Abb. 15) waren es 11 Proteine, die als differentielle Proteine einer näheren Analyse unterzogen wurden.

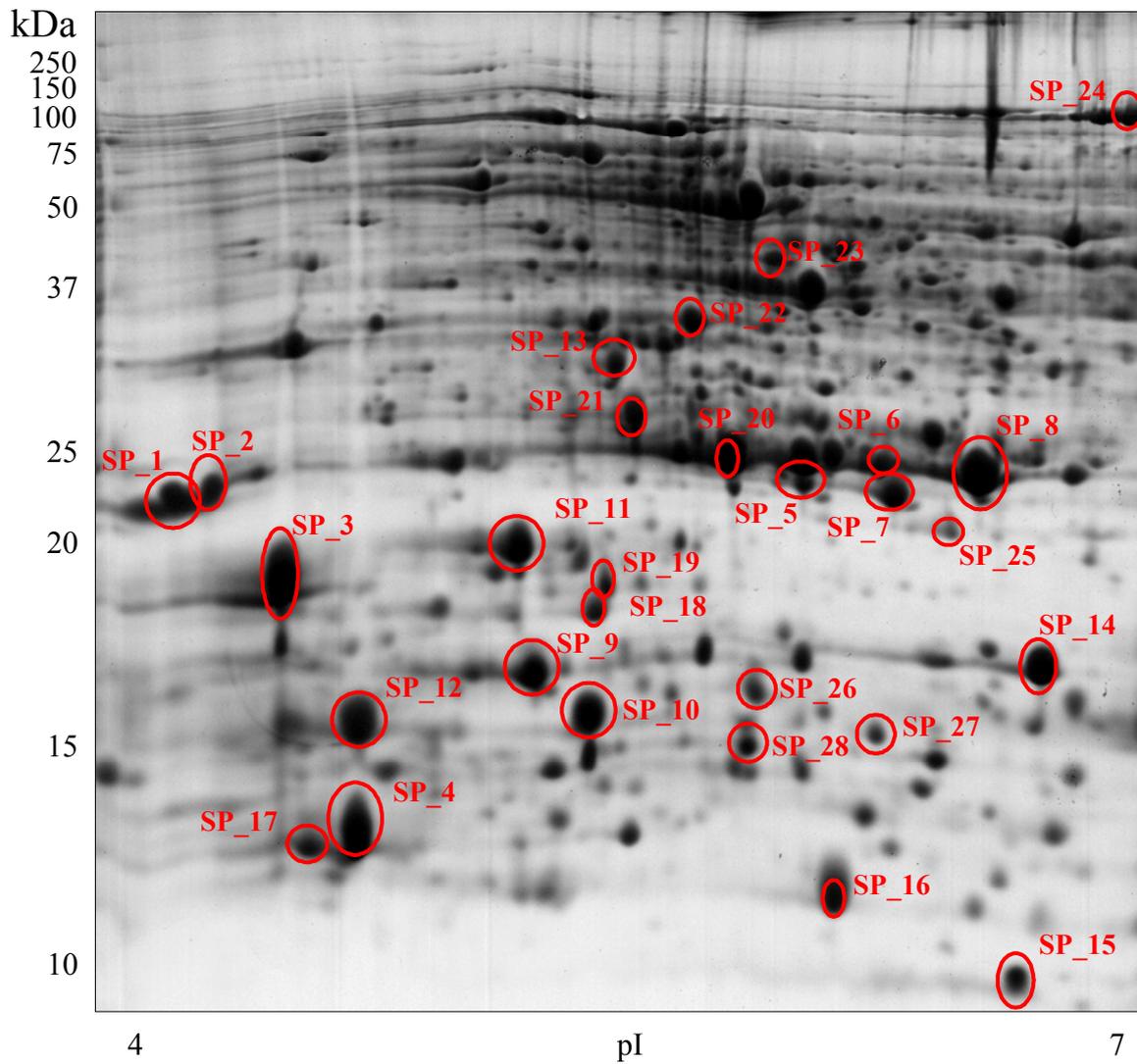


Abb. 13 Proteine der ruhenden Sporen in einer 2D-PAGE aufgetrennt. Die eingekreisten und beschrifteten Proteinpunkte zeigen phasenspezifische Proteine oder Proteine, die in den Sporen hochreguliert sind. Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Gel, pH Gradient 4-7, eine Proteinmenge von 800µg wurde aufgetragen.

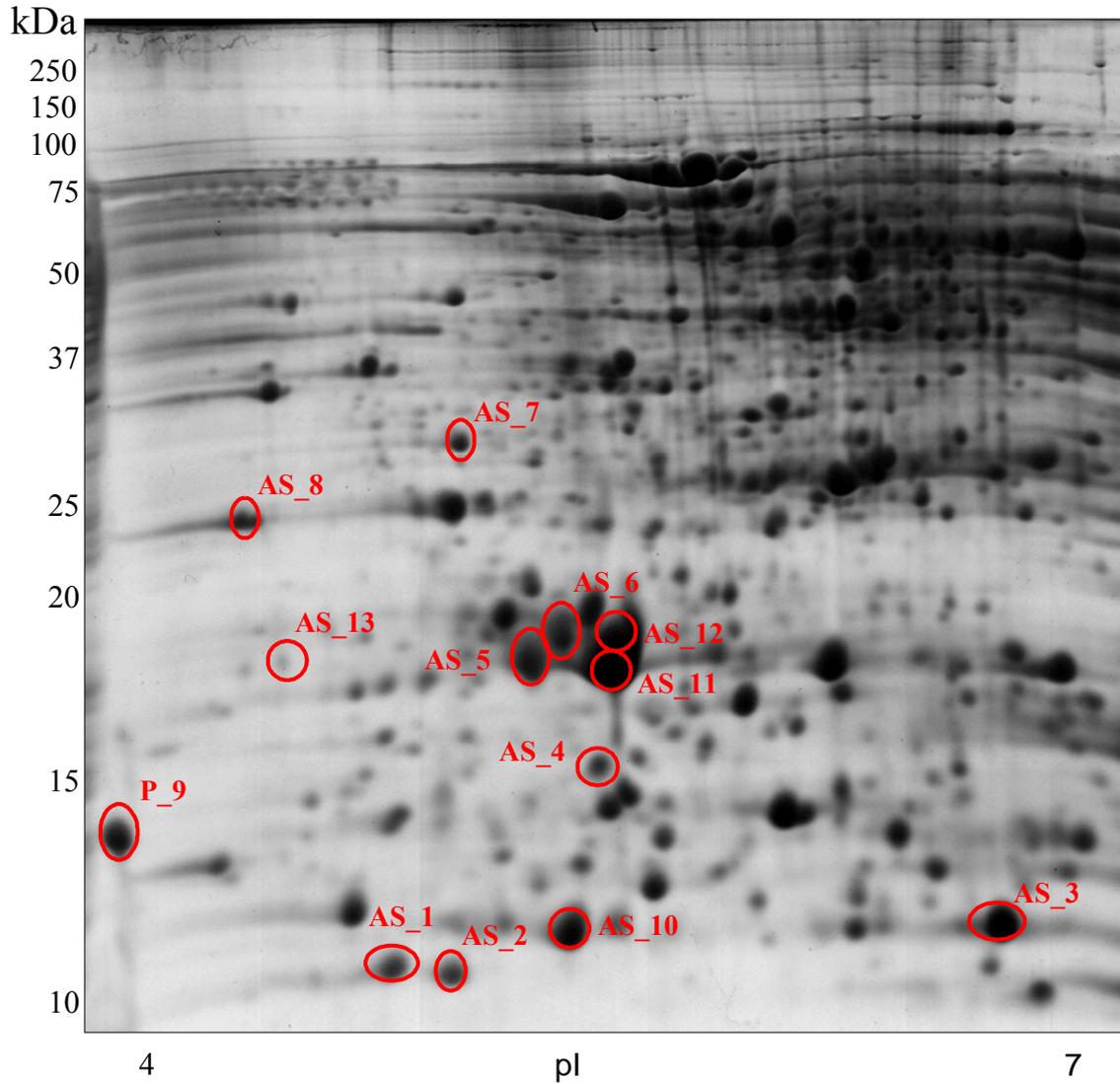


Abb. 14: Proteine der auskeimenden Sporen in einer 2D-PAGE aufgetrennt. Die eingekreisten und beschrifteten Proteinpunkte zeigen phasenspezifische Proteine oder Proteine, die in den auskeimenden Sporen hochreguliert sind. Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Gel, pH Gradient 4-7, eine Proteinmenge von 800µg wurde aufgetragen.

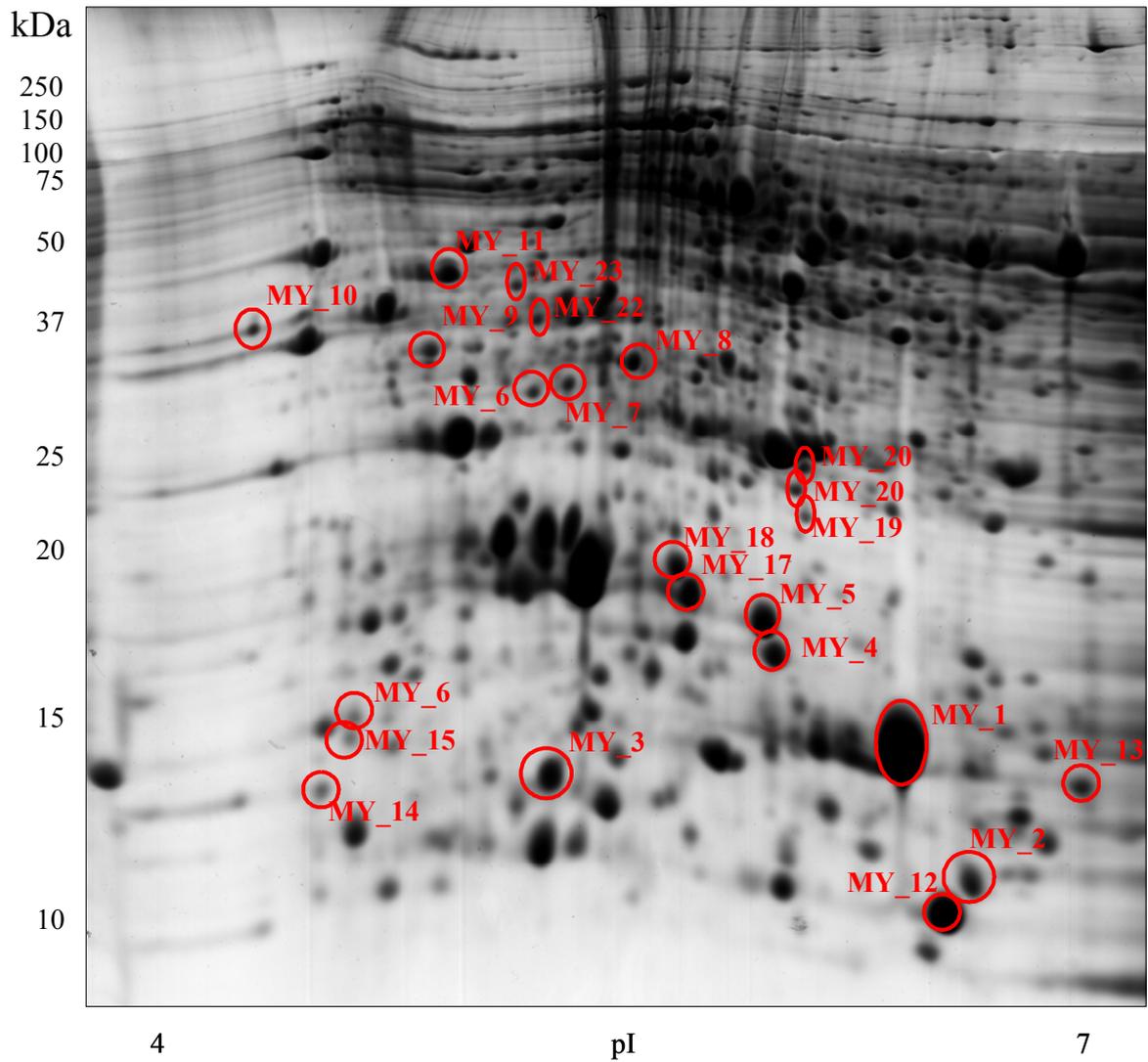


Abb. 15: Proteine des Myzels in einer 2D-PAGE aufgetrennt. Die eingekreisten und beschrifteten Proteinpunkte zeigen phasenspezifische Proteine oder Proteine, die im Myzel hochreguliert sind. Coomassiegefärbtes 12%iges SDS-Gel, pH Gradient 4-7, eine Proteinmenge von 800µg wurde aufgetragen.

ERGEBNISSE

Tab. 5: Liste der differentiell exprimierten Proteine der 2D-PAGE Analyse mit den Angaben der Molekulargewichte und pI

Sporenproteine (kDa/ pI)		Auskeimende (kDa/pI)	Sporen	Myzel-Hyphen (kDa/ pI)	
SP 1(2D)	(23 kDa/ 4)	AS 1(2D)	(11 kDa/ 5)	MY 1(2D)	(15 kDa/ 6,5)
SP 2(2D)	(23 kDa/ 4,1)	AS 2(2D)	(11 kDa/ 5,2)	MY 2(2D)	(13 kDa/ 6,9)
SP 3(2D)	(18 kDa/ 4,3)	AS 3(2D)	(12 kDa/ 6,8)	MY 3(2D)	(14kDa/ 5,3)
SP 4(2D)	(13 kDa/ 4,6)	AS 4(2D)	(16 kDa/ 5,3)	MY 4(2D)	(17 kDa/ 5,5)
SP 5(2D)	(24 kDa/ 5,9)	AS 5(2D)	(18 kDa/ 5,1)	MY 5(2D)	(27,5kDa/5,4)
SP 6(2D)	(24,5k/ 6,2)	AS 6(2D)	(19 kDa/ 5,2)	MY 6(2D)	(29 kDa/ 5,1)
SP 7(2D)	(24 kDa/ 6,2)	AS 7(2D)	(32 kDa/ 4,8)	MY 7(2D)	(29 kDa/ 5,2)
SP 8(2D)	(24 kDa/ 6,5)	AS 8(2D)	(25 kDa/ 4,2)	MY 8(2D)	(30 kDa/ 5,4)
P 9(2D)	(17 kDa/ 5,2)	AS 10(2D)	(12 kDa/ 5,3)	MY 9(2D)	(33 kDa/ 4,7)
SP 10(2D)	(16 kDa/ 5,3)	AS 11(2D)	(18 kDa/ 5,4)	MY 10(2D)	(36 kDa/ 4,3)
SP 11(2D)	(21 kDa/ 5,2)	AS 12(2D)	(19 kDa/ 5,4)	MY 11(2D)	(40 kDa/ 4,7)
SP 12(2D)	(15 kDa/ 4,6)			MY 12(2D)	(10 kDa/ 6,9)
SP 13(2D)	(37 kDa/ 5,2)			MY 13(2D)	(13 kDa/ 7)
SP 14(2D)	(17 kDa/ 6,9)			MY 14(2D)	(13kDa/4,6)
SP15(2D)	(9kDa/ 6,8)			MY 15(2D)	(14kDa/ 4,7)
SP 16(2D)	(11 kDa/ 6,1)			MY 16(2D)	(14,2kDa/4,7)
SP 17(2D)	(12 kDa/ 4,6)			MY 17(2D)	(17,5kDa/5,6)
SP 18(2D)	17,5kDa/ 5,3			MY 18(2D)	(18 kDa/ 5,5)
SP 19(2D)	18kDa/ 5,4			MY 19(2D)	(20 kDa/ 5,7)
SP 20(2D)	(27 kDa/ 5,7)			MY 20(2D)	(20,5kDa/ 5,7)
SP 21(2D)	(30 kDa/ 5,5)			MY 21(2D)	(21 kDa/ 5,7)
SP 22(2D)	(37 kDa/ 5,6)			MY 22(2D)	(37 kDa/ 5)
SP 23(2D)	(40 kDa/ 6)			MY 23(2D)	(40 kDa/ 5)
SP 24(2D)	(80 kDa/ 7)				
SP 25(2D)	(22 kDa/ 6,8)				

Im Folgenden werden die identifizierten differentiellen Proteine, die durch LC-MS/MS analysiert wurden und denen eine Sequenz zugeordnet werden konnte, beschrieben. In Abb. 16 sind die Regionen gekennzeichnet, in denen diese Proteine lokalisiert sind. Jedes Protein wird anfangs nochmals in einer Gegenüberstellung von Gelausschnitten der drei Auskeimungsfraktionen SP, AS und MY dargestellt. Die Proteine werden nach ihrem Vorkommen auf den Gelausschnitten abgehandelt, d.h. dass die Proteine nicht mehr, wie bei den 1D Gelen, nach SP, AS und MY geordnet sind. Das Vorgehen bei der Auswertung der nachfolgenden Proteine erfolgte nach demselben Verfahren, wie es bereits für die Identifizierung der Proteine aus den eindimensionalen Gelen beschrieben wurde (siehe Punkt 16.2).

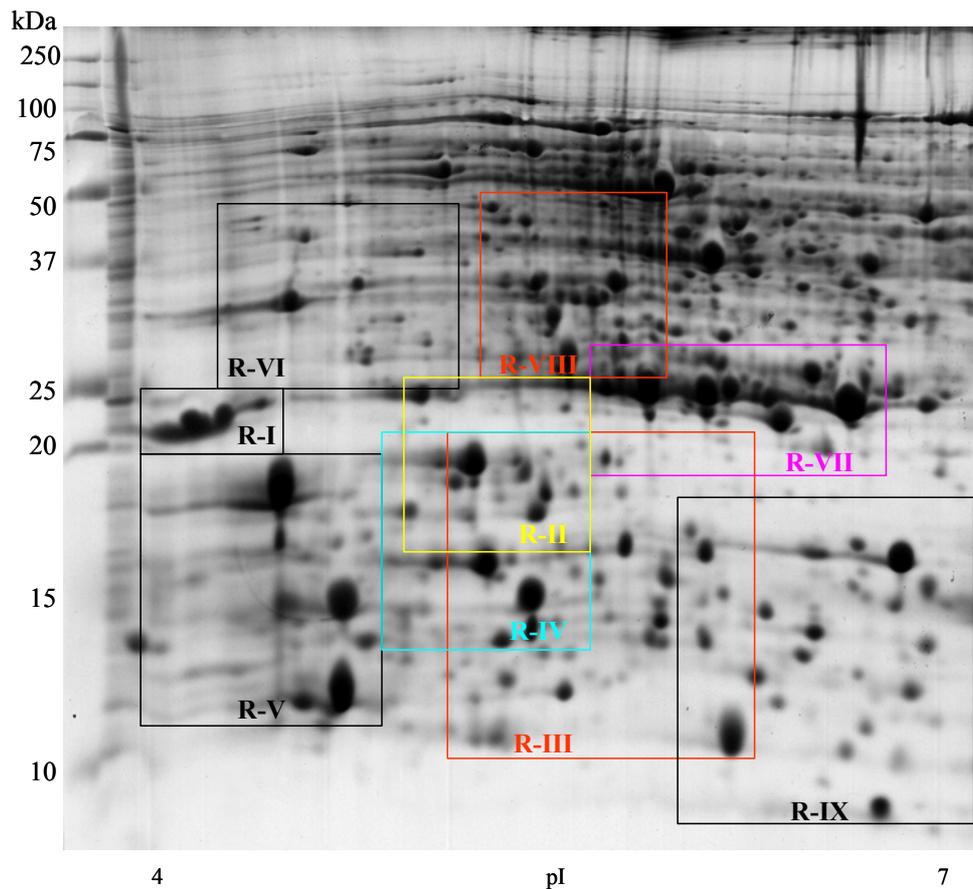
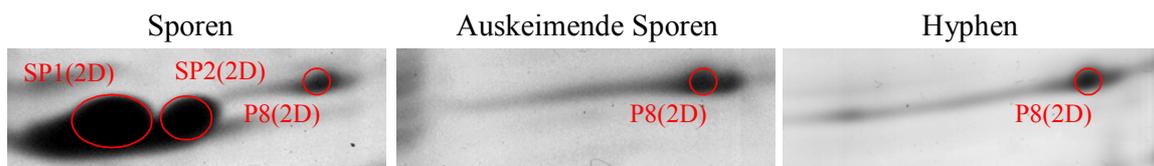


Abb. 16: Regionen aus denen differenzielle Proteine identifiziert wurden, hier beispielhaft für das 2D-Gel der ruhenden Sporen. R=Region

Region I:



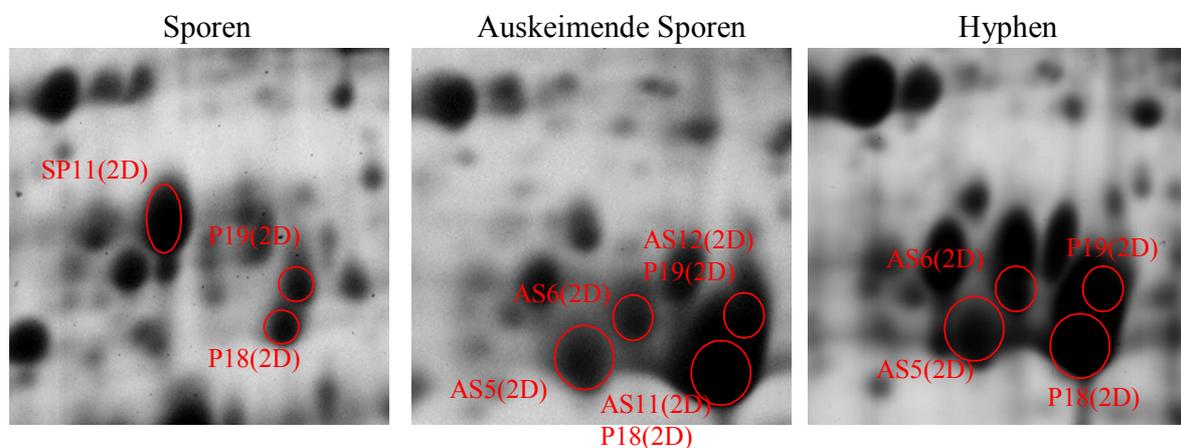
Das Sporenprotein **SP 1(2D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 26 kDa und einen pI von 4. Durch eine LC-MS/MS-Analyse konnte mit Hilfe der MASCOT Suchmaschine eine Sequenz (AN6595.2, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 48 ermittelt werden. Das theoretische Molekulargewicht (94 kDa) und der errechnete pI (9) dieser Sequenz passten nicht zu den experimentellen Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurde eine 91%ige Homologie zu einem hypothetischem Protein AN2264.2 aus *A. nidulans* gefunden, dieses Protein besitzt eine konservierte Acyl-CoA-

Dehydrogenase Domäne. Des Weiteren wurde eine 71%ige Homologie zu einer Acyl-CoA-Dehydrogenase aus *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 gefunden.

SP 2(2D) konnte nicht identifiziert werden.

P 8(2D) ist ein konstitutiv exprimiertes Protein, es konnte noch nicht analysiert werden. In dieser Arbeit wurden auch konstitutive Proteine untersucht, diese sollten als Markerproteine für alle drei Fraktionen dienen.

Region II:



Das sporenspezifische Protein **SP 11(2D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 30 kDa und einen pI von 5. Durch LC-MS/MS wurde mit Hilfe der MASCOT Suchmaschine eine Sequenz (glimmer_6158, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 57 ermittelt. Das theoretische Molekulargewicht (29,1 kDa) und der errechnete pI (7,85) dieser Sequenz passten gut zu den experimentell ermittelten Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurden Homologien zu einem hypothetischen Protein AN5332.2 aus *A. nidulans* (78%), einer Mannose-6-Phosphat-Isomerase aus *Dechloromonas aromatica* (60%) und zu einer Mannose-6-Phosphat-Isomerase aus *Methanosarcina barkeri str.fusaro* (57%) gefunden.

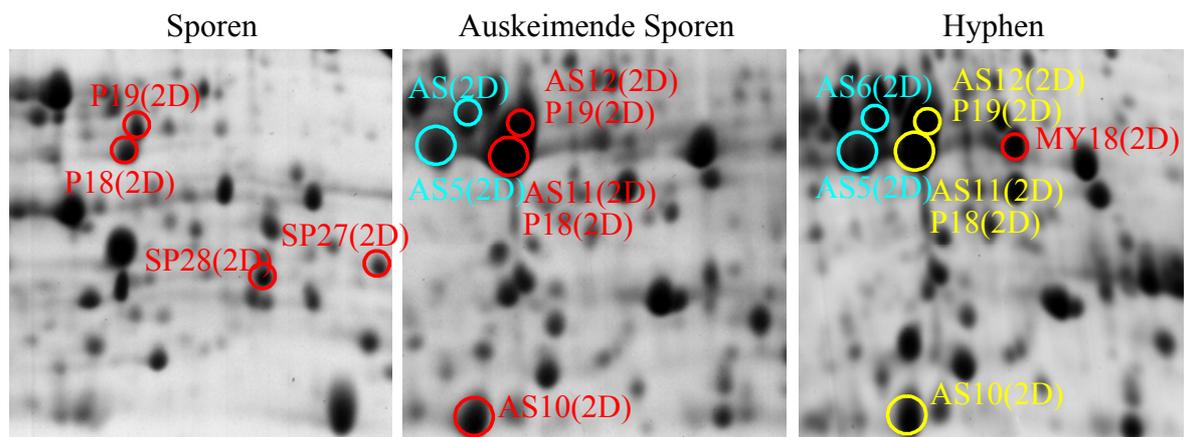
Das experimentelle Molekulargewicht des **AS 5(2D)** Proteins beträgt 27 kDa und der experimentelle pI 5. MASCOT lieferte nach LC-MS/MS-Analyse eine Sequenz (glimmer_10674, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 100. Die Sequenz hat ein theoretisches Molekulargewicht von 18 kDa, das nicht ganz zu den experimentellen Daten passte, der pI Wert von 5,07 passte hingegen sehr gut. Nach einer

NCBI-Datenbanksuche wurde das Protein mit 98%iger Homologie als putatives peroxisomales Membran Protein PMP20 aus *A. fumigatus* identifiziert. Bei diesem Protein handelt es sich um das Allergen Asp f3, das in Region III noch näher behandelt wird.

Die Protein AS 5(2D) und AS 6(2D) konnten noch nicht analysiert werden.

Für die weiteren Proteine siehe untere Abbildung.

Region III:



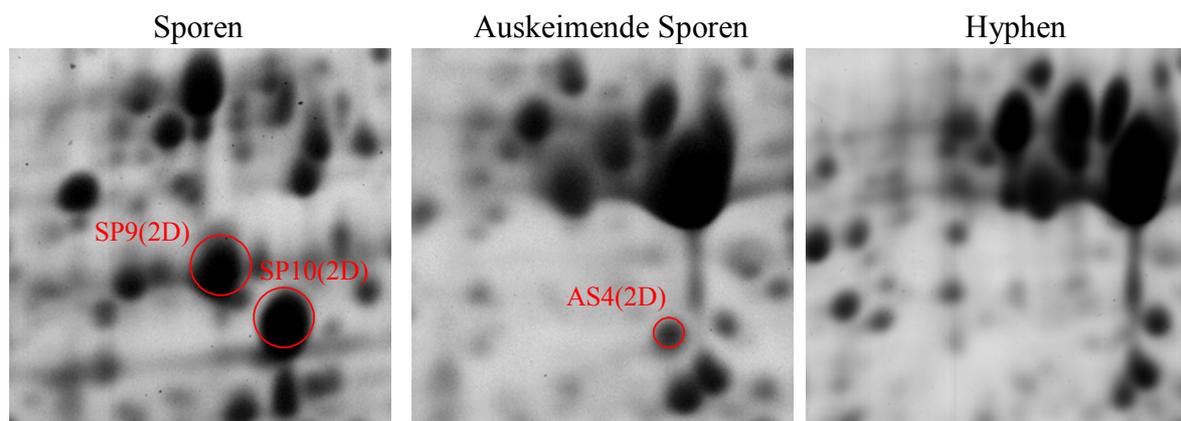
P 18(2D), ist ein Protein das auf dem 2D-Gel der SP als distinkter Spot nachgewiesen wurde. Die Expression dieses Proteins wird in den AS und MY jedoch deutlich hochreguliert. Es wurde aus dem 2D-Gel der Sporen ausgestochen, da dieses Protein in den anderen beiden Wachstumsfraktionen als ein dicker Proteinpunkt erscheint. In dem wahrscheinlich mehrere Proteine enthalten sind. Um eventuelle Kontaminationen durch andere Proteine zu vermeiden, wurde das als distinkter Proteinpunkt auf den 2D-Gelen der ruhenden Konidien erscheinende Protein P 18 ausgestochen. Das experimentelle Molekulargewicht beträgt 17 kDa und der pI 5,2. MASCOT lieferte nach LC-MS/MS-Analyse eine Sequenz (glimmer_10674 (siehe Anhang)) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 100. Das theoretische Molekulargewicht (17,1 kDa) passt perfekt zu den experimentellen Daten, während der errechnete pI (5,07) sehr gut passt. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurde eine 98%ige Homologie zu einem putativen peroxisomalen Membranprotein PMP20 (Acc.No.: O43099) aus *A. fumigatus* (ATCC 42202) ermittelt. Bei diesem Protein handelt es sich um das Allergen Asp f3.

Die Proteine **P 19(2D)**, **SP 28(2D)**, **SP 27(2D)**, **AS 12(2D)**, **AS 11(2D)**, **AS 10(2D)** und **MY 18(2D)**, wurden ebenfalls durch eine LC-MS/MS-Analyse als das Protein Asp f3

identifiziert. Die Verteilung der Asp f3-Spots ist in der obigen Abbildung dargestellt. Gelbe Protein-Spots zeigen Proteine an, die nicht aus dem Gel dieses Differenzierungsstadiums identifiziert wurde, hier aber auch vorhanden ist.

Wie oben bereits erwähnt konnten die Proteine **AS 5(2D)** und **AS 6(2D)** (obige Abbildung türkisfarben) noch nicht analysiert werden, wahrscheinlich handelt es sich jedoch ebenfalls um das Asp f3).

Region IV:

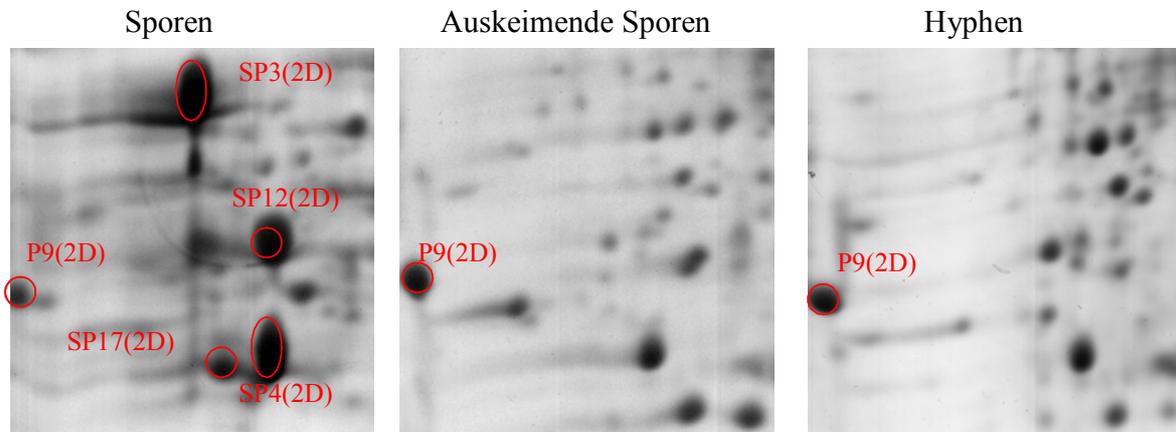


Das sporenspezifische Protein **SP 9(2D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 17 kDa und einen pI von 5,3. Nach LC-MS/MS-Analyse lieferte MASCOT eine Sequenz (glimmer_318, siehe Anhang) mit einem signifikanten Score von 115. Das theoretische Molekulargewicht (21,1 kDa) und der theoretische pI (5,97) passten nicht ganz zu den experimentellen Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche konnte keine signifikante Homologie zu einem bekannten Protein ermittelt werden. Nach einer PSORT II-Analyse handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein zytosolisches Protein.

Für **SP 10(2D)**, ein Protein aus den Sporen, mit einem experimentellen Molekulargewicht von 16 kDa und einem pI von 5,4, wurde nach LC-MS/MS-Analyse mit MASCOT eine Sequenz (glimmer_2635, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 77 ermittelt. Das theoretische Molekulargewicht (12,2 kDa) und der pI (8,98), passen nicht zu den experimentell ermittelten Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche konnte keine signifikante Homologie zu einem bekannten Protein ermittelt werden. Laut PSORT II handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein mitochondriales Protein.

AS 4(2D), ein Protein aus den auskeimenden Sporen konnte noch nicht analysiert werden.

Region V:



Für **SP 3(2D)**, ein sporenspezifisches Protein, mit einem experimentell ermittelten Molekulargewicht von 18 kDa und einem experimentellen pI von 4,3, wurde nach LC-MS/MS-Analyse eine MASCOT Sequenz (glimmer_7619, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 77 ermittelt. Das errechnete Molekulargewicht (14,4 kDa) sowie der pI (4,46) passen zu den experimentellen Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurde das Protein mit 54%iger Homologie als Hämolyysin aus *A. fumigatus* identifiziert (siehe Abb. 17). Weitere Recherchen in der TIGR-Datenbank zeigten, dass es ein zweites Hämolyysin-Gen im Aspergillus-Genom gibt. Ein eigener Eintrag für dieses zweite Protein in die NCBI-Datenbank ist in Vorbereitung. Beide Proteine besitzen keine vorhersagbare Signalsquenz.

```

Hemolysin      MASVQAYAQWVTVHLINMSSETLSIKNASLSWGKWKDGDKDAEITSEDVQQKTAPP-G 59
SP 3(2D)        MASTTG-QQFLDIEIKDDMN-----GEFYREGDQNDTLTTDDIEDMLIRHNG 46
                ***. . *:: :: :*.                *:::***:: :***::: *

Hemolysin      GSVNVNSCGRSDASSGTTGGFDLYDG--NTKIGRVHWDCPWG-SKTNDFDVGERNKNYWV 116
SP 3(2D)        GLRHVCSGEEKGFKGLQGTIDLIDDVKAICTLEWNPMEPGKRNTFMLRDQDPYHI 106
                * :* ***... .* * :** *. ::** :*:* .* * * : : : .* :

Hemolysin      EIGTWNKYGGAIGNC----- 131
SP 3(2D)        DIGQWNESG-ILGKVPVTISDE 127
                :** **: * . :*:
    
```

Abb. 17: Vergleich der Proteinsequenzen Asp-Hemolysin (Acc.No.: S47523) und SP 3(2D).

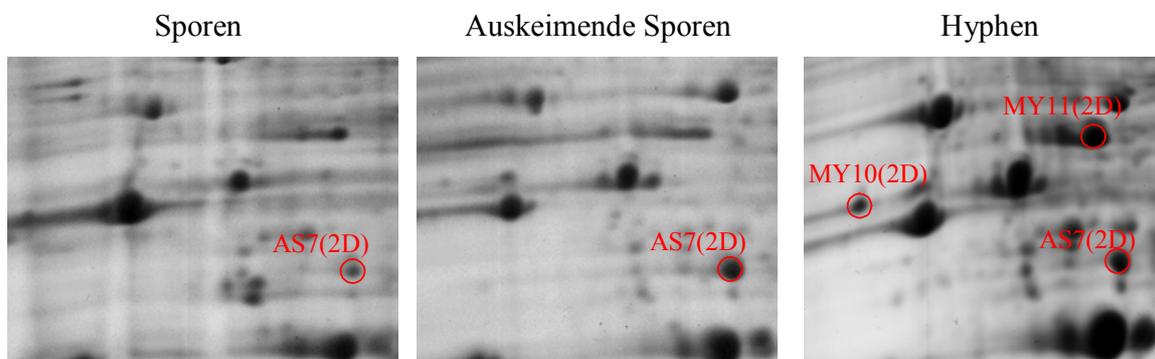
Das sporenspezifische Protein **SP 12(2D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 25 kDa und einen pI von 4,6. Für dieses Protein wurde mit Hilfe eines Edman-Abbaus ein

Peptidstück mit der Sequenz PVPDDITVK erhalten. Mit diesem Peptidstück wurde in der SANGER Aspergillus-Datenbank nach homologen Sequenzen gesucht. Es wurde ein 100%ig übereinstimmendes Peptidstück gefunden, die entsprechende Proteinsequenz wurde durch eine GENSCAN Analyse vorhergesagt. Die NCBI-Datenbanksuche mit dieser Sequenz identifizierte das Protein mit 85%iger Sicherheit als Hydrophobin A (RodA) (Acc.No.: P41746) aus *A. fumigatus* (Stamm CBS 144-89).

Das Sporenprotein **SP 4(2D)** hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 13 kDa und einen pI von 4,6. Die durch MASCOT identifizierte homologe Sequenz (glimmer_6042, siehe Anhang) hatte einen signifikanten „Score“-Wert von 235. Das theoretische Molekulargewicht (23 kDa) und der errechnete pI (9) passen allerdings nicht gut zu den experimentellen Daten. In den MASCOT- und NCBI-Datenbanken konnte kein homologes Protein identifiziert werden. Eine PSORT II Analyse sagt eine zytosolische Lokalisation des Proteins voraus.

SP 17(2D) und **P 9(2D)** wurden noch nicht analysiert.

Region VI:



AS 7(2D), ein Protein, das in den auskeimenden Sporen hochreguliert wird und dann in ähnlicher Intensität auch in den Hyphen zu finden ist, hat ein experimentelles Molekulargewicht von 26 kDa und einen pI von 5. Nach LC-MS/MS lieferte MASCOT eine Sequenz (glimmer_4462) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 80. Das theoretische Molekulargewicht (26 kDa) und der errechnete pI (5,17) passen gut zu den experimentellen Daten. Eine NCBI-Datenbanksuche zeigte eine 98%ige Homologie der Sequenz des NudC Protein (Nuclear Movement Protein) (Acc.No.: CAD22885) aus *A. fumigatus* (ATCC 46645)

MY 10(2D) und **MY 11(2D)** konnten noch nicht erfolgreich analysiert werden.

Region VII:



Das sporenspezifische Protein **SP 5(2D)**, kommt in einem Bereich des SDS-Gels vor in dem die Proteine sehr eng beieinander liegen. Die Proteine der Sporen, die in diesem Abschnitt behandelt werden, liegen alle in diesem Bereich (siehe oben in der Abbildung). SP 5 hat ein Molekulargewicht von 24 kDa und einen pI von 5,6. Nach einer LC-MS/MS-Analyse lieferte MASCOT eine Sequenz (AfA31E11.020c, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 209. Das theoretische Molekulargewicht (22,1 kDa) und der errechnete pI (5,4) passen gut zu den experimentell ermittelten Werten. Eine NCBI-Datenbanksuche zeigte hohe Homologien (92%) zu dem Bli-3-Protein (Blaues-Licht-induziertes Protein) (Acc.No.: CAF32114) aus *A. fumigatus* (unbekannter Stamm). Dieses Bli-3-Protein besitzt eine konservierte Pyridoxamin 5'-Phosphat Oxidase Domäne (siehe Anhang).

SP 6(2D) hat ein experimentelles Molekulargewicht von 24,5 kDa und einen pI von 6,2. Die LC-MS/MS-Analyse lieferte durch MASCOT eine Sequenz (glimmer_10157, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 81. Der errechnete pI (6,7) und das theoretische Molekulargewicht (30,1 kDa) passen zu den experimentellen Werten. In einer NCBI-Datenbanksuche zeigte sich eine 79%ige Homologie zu einem Hitzeschock-Protein (HS30_EMENI 30 kD Hitzeschock-Protein) aus *A. nidulans* (siehe Anhang).

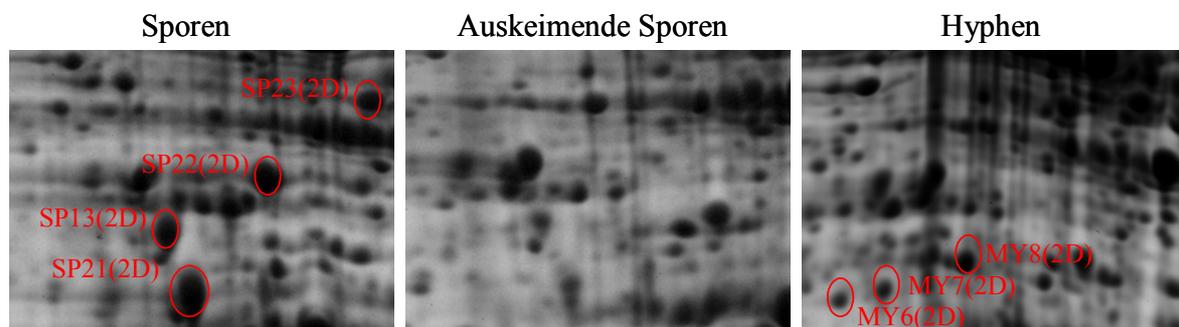
Sporenprotein **SP 7(2D)** hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 24 kDa und einem pI von 6,2. Nach einer LC-MS/MS-Analyse wurde durch MASCOT eine Sequenz (glimmer_5262, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 65 ermittelt. Diese Sequenz hat ein theoretisches Molekulargewicht von 25 kDa und einem errechneten pI von 5,78, was sehr gut zu den experimentellen Daten passt. Eine NCBI-

Datenbanksuche ergab eine Homologie von 74% zu einem hypothetischen Protein MG09138.4 aus *Magnaporthe grisea*. Dieses Protein besitzt eine Glutathion-S-Transferase Domäne.

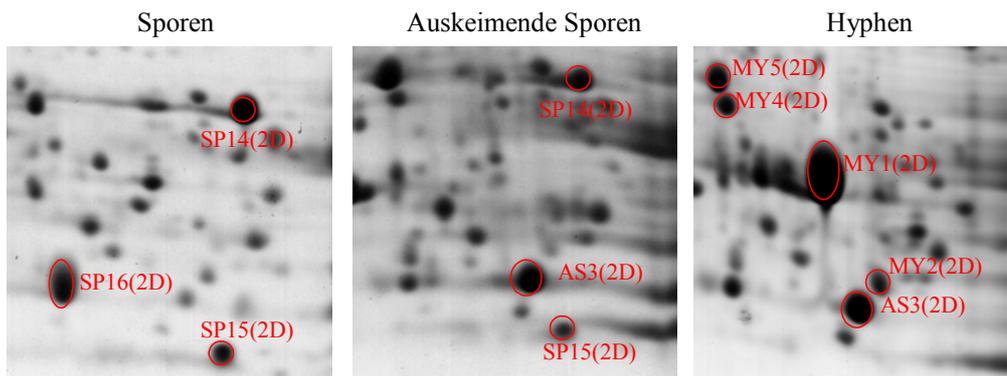
Das Sporenprotein **SP 8(2D)** hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 24 kDa und einen pI von 6,5. Die LC-MS/MS-Analyse lieferte durch MASCOT eine Sequenz (glimmer_10157, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 81 und einem theoretischen Molekulargewicht von 30 kDa. Der errechnete pI beträgt 6,7. Sowohl Molekulargewicht als auch pI passen zu den experimentellen Werten. Durch eine NCBI-Datenbanksuche wurde das Protein mit einer Homologie von 79% als ein Hitzeschock-Protein (HS30_EMENI 30 kD Hitzeschock-Protein) aus *A. nidulans* identifiziert (siehe Anhang). Dieses Ergebnis ist identisch mit dem Ergebnis des SP 6(2D).

Das Sporenprotein **SP 25(2D)** hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 22 kDa und einem pI von 6,2. Nach einer LC-MS/MS-Analyse wurde durch MASCOT eine Sequenz (AN0297.2, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 28 ermittelt. Diese Sequenz hat ein theoretisches Molekulargewicht von 22 kDa und einem errechneten pI von 5,8, was sehr gut zu den experimentellen Daten passt. Diese Sequenz führte direkt zu einem *A. nidulans* Protein. Ein BalstP-Abgleich in der ExpASY-Datenbank mit dieser Sequenz ergab eine Homologie von 86% zu dem Y20-Protein aus *P. brasiliensis*.

Region VIII:



Die Proteine aus den Sporen **SP 13(2D)**, **SP 20(2D)**, **SP 21(2D)**, **SP 22(2D)** und **SP 23(2D)** konnten noch nicht identifiziert werden, gleiches gilt für die Proteine aus dem Myzel **MY 6(2D)**, **MY 7(2D)** und **MY 8(2D)** .

Region IX:


Das Protein **SP 14(2D)** ist ein Protein, das sowohl in den ruhenden Konidien als auch in den auskeimenden Sporen vorkommt, das aber im Myzel nicht nachweisbar ist. SP 14 hat ein experimentelles Molekulargewicht von 17 kDa und einen pI von 6,9. Die LC-MS/MS-Analyse lieferte nach einer Suche in MASCOT eine Sequenz (glimmer_1079, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 73. Während das theoretische Molekulargewicht (14 kDa) gut zu den experimentell ermittelten Daten passte, passt der pI (7,7) nicht gut. Eine NCBI-Datenbanksuche ergab eine 100%ige Homologie zu einer Cu-Zn Superoxiddismutase (Acc.No.: Q9Y8D9) aus *A. fumigatus* (ATCC 46645).

SP 16(2D) hat ein experimentelles Molekulargewicht von 11 kDa und einen pI von 6,1. Das Protein wurde zunächst durch einen Trypsinverdau und durch die Analyse interner Peptidsequenzen untersucht. Die dabei identifizierte Peptid-Sequenz SYSQQA lieferte zwar drei 100%ig homologe Sequenzen. Durch Analysen mit verschiedenen Programmen und Datenbanksuchen konnte aber keine eindeutige Identifizierung erreicht werden. Durch eine nachfolgende LC-MS/MS konnte mit Hilfe der MASCOT Suchmaschine eine Sequenz (glimmer_2849) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 41 ermittelt werden. Das theoretische Molekulargewicht (10,7 kDa) und der errechnete pI (5,1) dieser Sequenz passen gut zu den experimentell ermittelten Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurde das Protein als ein Hitzeschock-Protein (chaperone/ heat shock protein) identifiziert. Das homologe Protein stammt aus *A. nidulans* (Acc. Nr.: AAB69701).

Das hyphenspezifische Protein **MY 1(2D)** hat ein experimentelles Molekulargewicht von 15 kDa und einen pI von 6,5. Durch LC-MS/MS wurde mit Hilfe der MASCOT Suchmaschine eine Sequenz (glimmer_1056, siehe Anhang) mit einem signifikanten „Score“-Wert von 344 ermittelt. Das theoretische Molekulargewicht (12,3 kDa) und der

errechnete pI (6,16) dieser Sequenz passen gut zu den experimentell ermittelten Werten. Nach einer NCBI-Datenbanksuche wurden Homologien zu einem unbenannten Protein aus *Debaryomyces hansenii* (76%), dem hypothetischen Protein CNBC1030 aus *Cryptococcus neoformans* (68%) und dem CipC Protein aus *A. nidulans* (60%) gefunden. Dieses Protein entspricht dem MY 17 Protein aus den eindimensionalen Gelen.

Die Proteine **SP 15(2D)**, **AS 3(2D)**, **MY 5(2D)**, **MY 4(2D)** und **MY 2(2D)** konnten noch nicht identifiziert werden.

18 Antikörperbank

In dieser Arbeit sollten monoklonale Antikörper (mAk), die spezifisch gegen *A. fumigatus* Proteine gerichtet sind, hergestellt werden. Damit sollten die Daten der SDS-PAGE verifiziert werden, außerdem sollten weiterführende Untersuchungen mit den Proteinen durchgeführt werden. Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden zwei Strategien angewendet. Zum einen wurden Mäuse mit einer Mischung aus den Proteinen von auskeimenden Sporen und von Hyphen immunisiert (siehe Schema in Abb. 18). Ziel dieses Ansatzes war es, in einer Immunisierung ein möglichst breites Spektrum an Hybridomen bzw. mAk herzustellen. In diesem Verfahren wurden daher insgesamt 118 unabhängige Hybridom-Zellkulturen eingefroren. Wenn im Verlauf der Arbeit keine spezifischen Antikörper gegen bestimmte Proteine aus dieser Hybridombank isoliert werden konnten, wurde gezielt z.B. mit dem entsprechenden rekombinanten His₆-Protein immunisiert.

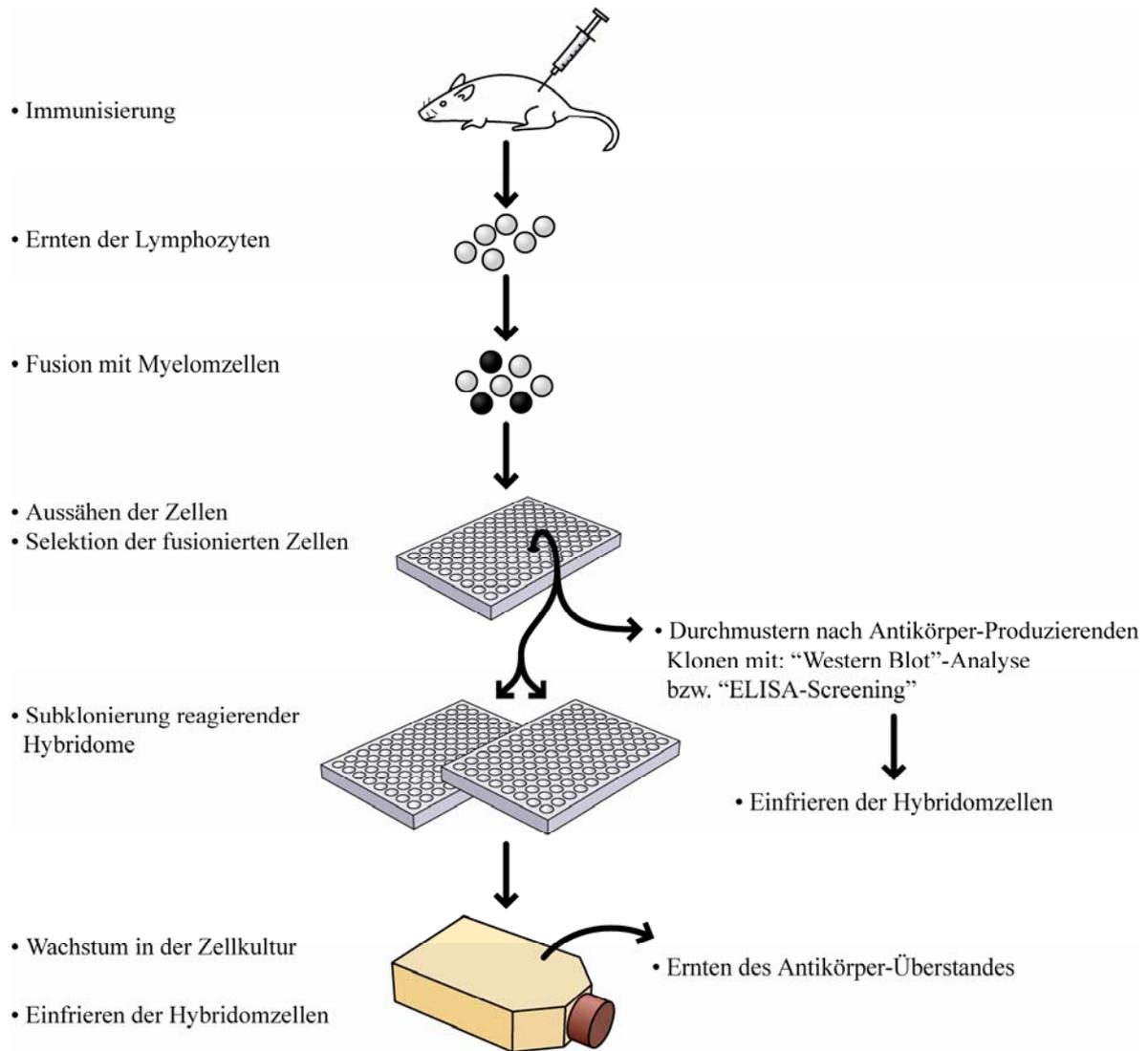


Abb. 18: Schema zur Herstellung und Verwendung einer *A. fumigatus*-Hybridombank.

18.1 Testen der Antikörper auf Proteinen der verschiedenen Germinationsstadien

Um die Qualität und Spezifität der Antikörperbank zu überprüfen, wurden zunächst „Western Blot“-Analysen mit den verschiedenen Hybridom-Überständen (Aks) durchgeführt. Als Proben wurden hierfür Gesamtproteine der auskeimenden Sporen und Myzel-Hyphen verwendet. In Abb. 19 ist beispielhaft eine solche Analyse dargestellt. Als differentiell identifizierte Proteine sind mit Pfeilen markiert.

Insgesamt wurden ungefähr 300 Hybridom-Überstände mit Hilfe der „Western Blot“-Analysen auf den verschiedenen Wachstumsfraktion (SP, AS und MY) durchgeführt. Die Durchmusterung der Antikörper-Bank durch „Western Blot“-Analysen erwies sich jedoch als aufwendig und schwierig. So zeigten Proteine aus dem niedermolekularen (kleiner als

30 kDa) Abschnitt des Gels kaum Reaktivitäten. Aus Zeitgründen war es nicht möglich den Antikörper-vermittelten Nachweis differentiell exprimierter Proteine weiter zu verfolgen. Durch die nun zur Verfügung stehende und mittlerweile kommerziell erhältliche *A. fumigatus*-Expressionsbank der Firma Stratagene kann dieser Ansatz aber in Zukunft gewählt werden, um alternativ zum proteomischen Ansatz weitere Phasen-spezifische Proteine zu identifizieren.

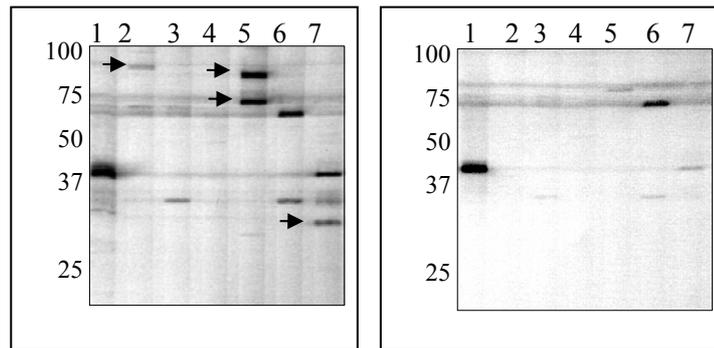


Abb. 19: Beispiel einer „Western Blot“-Analyse zur Durchmusterung der Antikörperbank (Fusion B). Die Überstände der jeweiligen Hybridome wurden mit Hilfe eines „Western Blot“-Verfahrens in einer Biometra Schlitzkammer auf ihre Reaktivität getestet. Auf dem linken Blot sind Proteine aus den auskeimenden Sporen, auf dem rechten Blot sind die Proteine des Myzels aufgetragen. Aufgetragene Hybridom-Überstände: **1** Fusion B Hybridom #67, **2** Fusion B Hybridom #130, **3** Fusion A Hybridom #180, **4** Fusion B Hybridom #185, **5** Fusion B Hybridom #204, **6** Fusion B Hybridom #212 und **7** Fusion B Hybridom #203. Die Pfeile zeigen Unterschiede in der Reaktivität der Hybridom-Überstände in den unterschiedlichen Proteinfraktionen an.

18.2 Durchmustern der Hybridombank mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus* Proteinen (His₆-Fusionen)

Um die Qualität der Antikörperbank zu überprüfen, wurde diese mit Hilfe von rekombinanten Histidin-gekoppelten Proteinen (His₆-Proteinen) durchmustert (Crameri & Blaser, 1996). Bei den Proteinen handelte es sich um bekannte Allergene von *A. fumigatus*. His₆-Proteine können mit Hilfe eines „ELISA-Screenings“ sehr schnell zu einem Ergebnis führen, was bei der Durchmusterung der verschiedenen Hybridomzelllinien einen entscheidenden Vorteil gegenüber *A. fumigatus*-Gesamtproteinlysaten und „Western Blot“-Analysen darstellt. Bei den Allergenen handelte es sich um Asp f1, Asp f3, Asp f4, Asp f6, Asp f8 und Asp f11 (vgl. Tab.6).

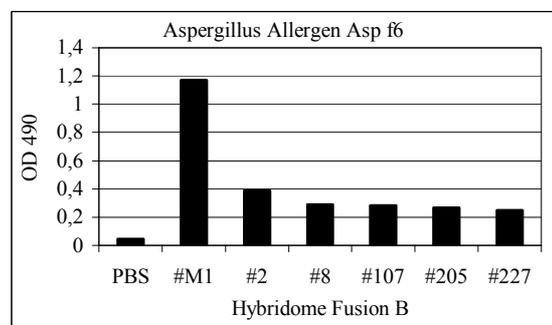
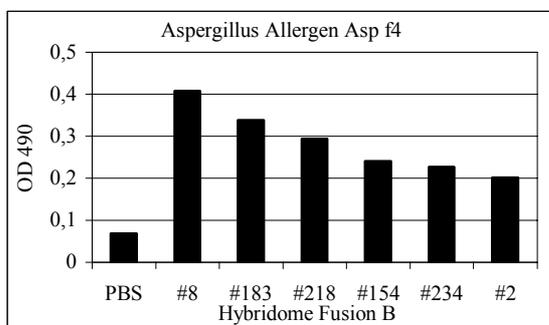
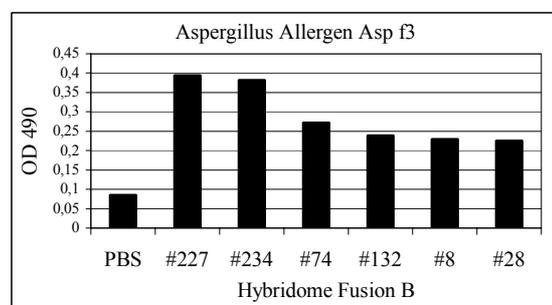
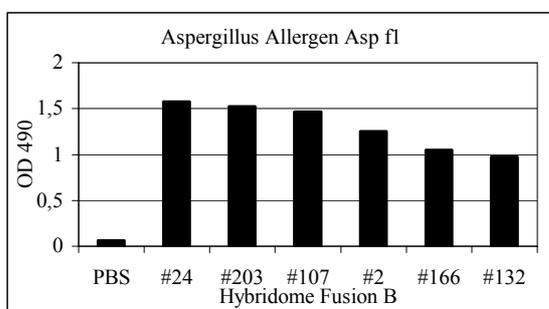
Tab. 6: Klonierte *A. fumigatus* Allergene

Name	Größe in kDa	Protein
Asp f1	18	Ribonuklease/ Mitogillin
Asp f3	19	Peroxisomales Protein
Asp f4	30	Unbekannte biologische Funktion
Asp f6	26,5	MnSOD
Asp f8	11	Ribosomales Protein P2
Asp f11	24	Peptidyl-Prolyl-Isomerase

Tatsächlich konnten für alle Allergene positive Hybridom-Überstände identifiziert werden. In Abb. 20 ist dies in graphischer Form dargestellt.

Wie bereits erwähnt, wurden für jedes Allergen mehrere reagierende Antikörper aus der Antikörperbank identifiziert. Nicht alle waren auch in der „Western Blot“-Analyse positiv. So reagierte der Überstand des Hybridoms #24 am stärksten mit dem His₆-Protein Asp f1, für eine „Western Blot“-Analyse war aber das #203 Hybridom besser geeignet (siehe Abb. 20, oben links). Für das Allergen Asp f6 hingegen war das Hybridom #M1 für beide Analysen gleichermaßen geeignet (siehe Abb. 20, Mitte rechts).

Zur Herstellung von mAk wurden bisher folgende Hybridome durch Verdünnung kloniert: Hybridom #203 für Asp f1, Hybridom #8 für Asp f8 und Hybridom M1 für Asp f6.



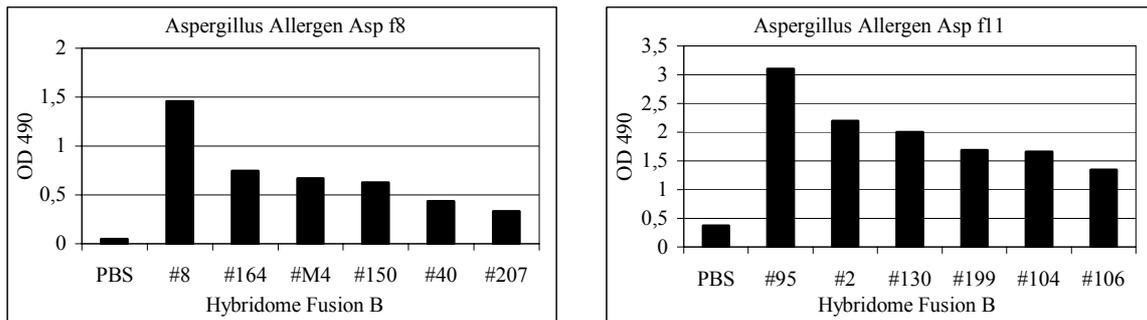


Abb. 20: Überstände der Antikörperbank, die mit *A. fumigatus* Allergenen positiv reagieren. Die Überstände der Antikörperbank wurden mit Hilfe eines „ELISA-Screening“ auf His₆-Allergene von *A. fumigatus* getestet

18.3 Test des α -Asp f8 Antikörpers B8-C4 auf dem rekombinanten Protein und *Aspergillus fumigatus* Germinationsstadien

Asp f8 ist ein Allergen und das P2-Protein der Familie der sauren ribosomalen Proteine. Mit Hilfe eines His₆-Asp f8 wurde eine Durchmusterung der Antikörperbank mit Hilfe eines „ELISA“ durchgeführt. Der Überstand des Hybridoms B8-C4 reagierte am stärksten mit dem Asp f8. Durch eine „Western Blot“-Analyse wurde festgestellt, dass der mAk B8-C4 mit allen drei sauren ribosomalen Proteinen (P0, P1, und P2) reagiert (siehe Abb. 21, Spuren 2- 4). Die P-Proteine sind in ihrem C-terminalen Bereich hochkonserviert, was die beobachtete Kreuzreaktion erklärt.

Das Allergen P2 (Asp f8) ist in der „Western Blot“-Analyse in allen drei Germinationsstadien nachweisbar, wobei die Reaktivität in den ruhenden Konidien geringer ist.

P0, ein Protein, das mit dem Elongationsfaktor 2 interagiert, wurde als auskeimungsspezifisches Protein in diesem Blot identifiziert (siehe Abb. 21, Spur 3). Durch eine nachfolgende „Western Blot“-Analyse, mit anderen Proteinextrakten der SP, AS und MY konnte es allerdings auch in den Myzel-Hyphen nachgewiesen werden, während es in keinem der Versuche in den ruhenden Sporen nachgewiesen werden konnte.

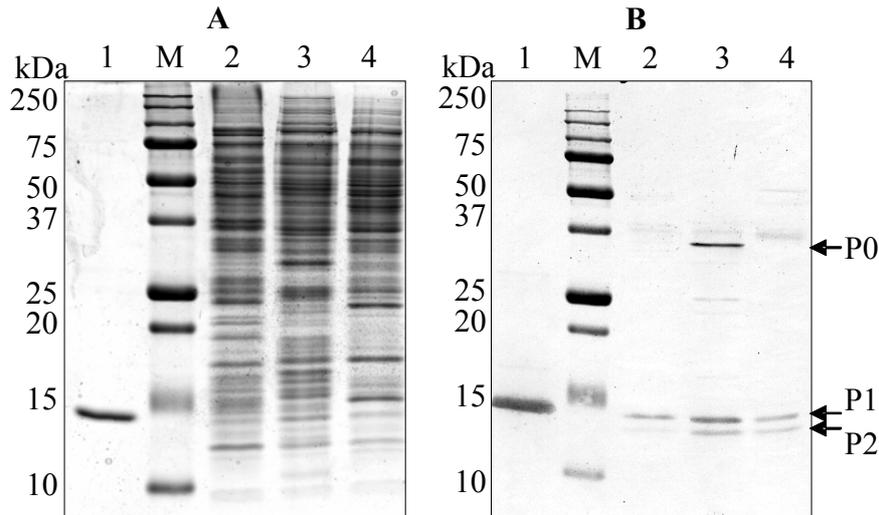


Abb. 21: Nachweis von Asp f8 (P2-Protein) in den verschiedenen Germinationsstadien von *A. fumigatus*. A zeigt ein 12%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. B stellt die „Western Blot“-Analyse mit dem α-Asp f8 mAk B8-C4 dar. In den Spuren 1 bis 4 sind die Proteine des His₆-Asp f8 (Spur 1) und die Proteine der ruhenden Sporen (Spur 2), der auskeimenden Sporen (Spur 3) und der Hyphen (Spur 4) dargestellt.

19 Die sporenspezifische Katalase A

19.1 Identifizierung der Katalase *CatA* als sporenspezifisches Protein

Bei dem Vergleich der Proteinmuster auf eindimensionaler Ebene (vergleiche Abschnitt 16.1) fiel das SP 2 Protein in den Sporen besonders stark auf. Es besitzt ein experimentelles Molekulargewicht von ungefähr 82 kDa, ist in der Coomassie-Färbung eines der stärksten Proteine und wird spezifisch in der ruhenden Spore exprimiert (siehe Abb. 22). Durch eine LC-MS/MS-Analyse und mit Hilfe von Datenbanksuchen wurde das Protein als *CatA* identifiziert. In der Literatur war bekannt, dass *A. fumigatus* 3 Katalasen besitzt: eine in den Sporen (*CatA*) und zwei, die während des Wachstums gebildet werden (*Cat1p* und *Cat2p*) (Paris *et al.*, 2003).

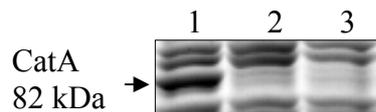


Abb. 22: Katalase A in den verschiedenen Wachstumsfraktionen von *A. fumigatus*. Ausschnitt aus einem Coomassie-gefärbten Gradientengel (7,5-20% Polyacrylamidgehalt). Spuren 1 bis 3 zeigen Proteine aus den Sporen (Spur 1), den auskeimenden Sporen (Spur 2) und den Hyphen (Spur 3).

19.2 Herstellung spezifischer Antikörper gegen CatA

Um ein besseres Bild über das Verhalten dieser Katalase während des Wachstums zu erhalten, wurden Antikörper gegen CatA hergestellt. Ursprünglich sollte für die Immunisierung der Mäuse das gesamte *catA*-Gen aus einer *A. fumigatus* cDNA amplifiziert und als Histidin-gekoppeltes Protein exprimiert werden. Aus noch ungeklärten Gründen gelang die Amplifikation des gesamten Gens jedoch nicht (siehe Abb. 26, A). Aus diesem Grund wurden Sequenz-interne Primer hergestellt. Die Amplifikation gelang mit den ersten 1014 Nukleotiden von insgesamt 2247 (siehe Abb. 26, A).

Das rekombinante Protein unter eine denaturierenden Bedingungen (TALON-Matrix, siehe Material und Methoden) aus der unlöslichen Proteinfraction des *E. coli* Lysates gereinigt (siehe Abb. 26, B).

A	
1	ATGCCACAAAGATTGCTGGAGGCTTACACAGAGCGCAGGAAGTGCCTTCAAAACACATCCTCTAAAAGCAAGAAATTGGTCGAT
1	M A T K I A G G L H R A Q E V L Q N T S S K S K K L V D
85	TTAGAAAGAGATACGGCCGATGCGCATACCCAGCAGCCATTGACTACGGATCACGGTGTACGAGTCAGCAACACCCGATCAATGG
29	L E R D T A D A H T Q Q P L T T D H G V R V S N T D Q W
169	CTTAGAGTTACGAATGACCGCCGAACTGGCCCATCCTTGTCTGGAGGATCAGATTGCCAGAGAAAAGATCCATCGCTTTGATCAT
57	L R V T N D R R T G P S L L E D Q I A R E K I H R F D H
181	GAACGTATTCCTGAAAGAGTAGTCCATGCGCGTGGCACTGGCGCATTTCGAAACTTCAAGCTTAAGGAGAGCATTGAAGATCTG
84	E R I P E R V V H A R G T G A F G N F K L K E S I E D L
301	ACTTATGCCGGTGTGTTGACGGATACTCCAGAAACACGCCAGTCTTTGTTCGCTTTTCAACCGTCCAAGGAAGTAGAGGTAGC
112	T Y A G V L T D T S R N T P V F V R F S T V Q G S R G S
361	GCTGATACAGTCCCGATGTTTCGTGGGTTTCGCTGTCAAGTTCTACACCGATGAAGGCAACTGGGACATTGTTGGGAACAACATC
140	A D T V R D V R G F A V K F Y T D E G N W D I V G N N I
421	CCTGTGTTTTTTCATTCAAGATGCCGTCAAGTTCCCAGATTTTGTCCATGCTGTCAAGCCGGAGCCTCACAACGAGGTCCCTCAG
16	P V F F I Q D A V K F P D F V H A V K P E P H N E V P Q
481	GCCCAACAGCCCAACAACCTTCTGGGATTTTGTGTACTTGCACCCAGAAGCCACCCACATGTTTCATGTGGGCCATGTCTGAC
161	A Q T A H N N F W D F V Y L H P E A T H M F M W A M S D
601	CGCGCCATCCCCCGATCCTACCGGATGATGCAGGGATTGGTGTCAATACTTTTGCTCTCGTCAACAAAGAAGGAAAGCGACAC
201	R A I P R S Y R M M Q G F G V N T F A L V N K E G K R H
721	TTTGTCAAGTTCCTACTGGATCCCCATCTGGGTGTTCACTCTCTCGTGTGGGACGAAGCCTTGAAGCTGGGAGGCCAAGACCCT
241	F V K F H W I P H L G V H S L V W D E A L K L G G Q D P
781	GATTTCCATCGCAAAGACCTGATGGAGGCTATCGACAACAAGGCGTATCCGAAATGGGACTTCGCAATCCAAGTCATTCCAGAG
261	D F H R K D L M E A I D N K A Y P K W D F A I Q V I P E
901	GAGAAGCAGGATGACTTTGAGTTTGACATTTTGGATGCCACCAAGATCTGGCCTGAAAACCTTGTGCCCTTCGTGTGATTGGA
301	E K Q D D F E F D I L D A T K I W P E N L V P L R V I G
961	GAGCTCGAGCTGAACCGCAACGTCGACGAATTCTCCCTCAGACCCAGGTCGCATTCTGCACCAGCCACATCGTCCCTGGC
321	E L E L N R N V D E F F P Q T E Q V A F C T S H I V P G
1021	ATTGACTTACCAGCATCCACTTCTCCAAGGCCGAAACTTCTCCTACTTCGACACCCAGATCAGCCGCTGGGCATCAATTGG
341	I D F T D D P L L Q G R N F S Y F D T Q I S R L G I N W
1081	GAAGAGCTGCCAATCAACCGT
361	E E L P I N R

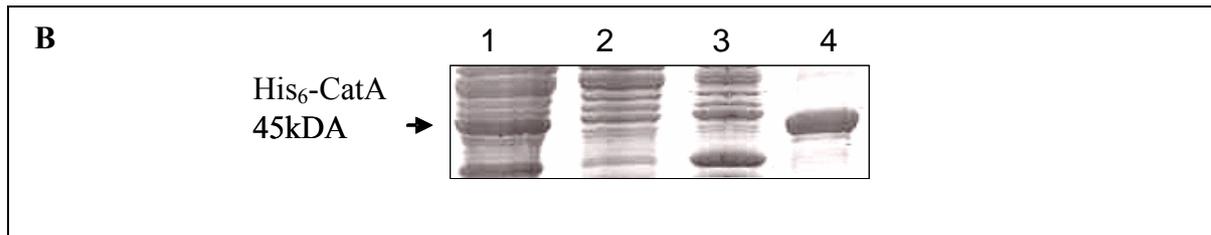


Abb. 23: Protein- und DNA-Sequenz von CatA und Reinigung des His₆-CatA Proteins. A: Aminoendständiger Teil der Protein- und DNA-Sequenz von CatA (Acc.No.: U87630). Abgebildet ist der offene Leserahmen von *catA*. Gelb hervorgehoben sind die DNA-Bereiche in denen die Primer liegen: B: Ausschnitt aus einem 15%igen Coomassie-gefärbtem SDS-Gel. Die Spuren 1-4 zeigen die Proteine aus *E. coli* [TG2] Klon 9 mit induziertem His₆-CatA (Spur 1), lösliche Proteinfraction aus *E. coli* [TG2] Klon 9 mit induziertem His₆-CatA (Spur 2), Sediment-Proteine aus *E. coli* [TG2] Klon 9 mit induziertem His₆-CatA (Spur 3) und gereinigtes His₆-CatA aus der unlöslichen Proteinfraction nach einem ÜN Dialyseschritt (Spur 4).

Mit dem gereinigten Protein wurden Mäuse immunisiert. Nach der Fusion wurden insgesamt 86 Hybridom-Überstände getestet, davon zeigten 21 Reaktivität mit dem His₆-CatA. Diese 21 Hybridome der CatA Fusion (Fusion D) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Hybridom #40 reagierte sowohl im „Western Blot“ als auch im „ELISA“ am besten mit CatA, deshalb wurde es durch Verdünnung kloniert. Für weitere Versuche wurde der Überstand des Hybridoms #D40/3 (α -CatA), mit der Subklasse IgG₁, als mAk eingesetzt.

19.3 Identifizierung von CatA in verschiedenen Aspergillus-Spezies

Es war bereits bekannt, dass es sich bei dem CatA-Protein aus *A. fumigatus* um ein Protein handelte, dass in seiner 749 Aminosäuren umfassenden Sequenz hohe Homologien zu CatA aus *A. nidulans* und der bakteriellen Katalase HP11 aus *E. coli* (Paris *et al.*, 2003) aufwies. Die Frage war nun, ob der mAk, der CatA aus *A. fumigatus* erkennt, auch Katalasen in anderen verwandten Aspergillus-Spezies nachweisen kann. Um dies zu untersuchen, wurde eine „Western Blot“-Analyse mit extrahiertem Sporengesamtprotein aus folgenden Aspergillus-Spezies angefertigt: *A. fumigatus*, *A. giganteus* (DSM 114), *A. terreus* (DSM 826), *A. nidulans* (DSM 820), *A. niger* (DSM 737), *A. flavus* und *A. oryzae* (DSM 1862). Dafür wurden die Sporen der verschiedenen Aspergillus-Stämme mit dem MSK-Zellhomogenisator aufgeschlossen. Die isolierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine „Western Blot“-Analyse mit dem mAk α -CatA durchgeführt (siehe Abb. 24).

Das Ergebnis zeigt, dass der mAk D40-E3 in allen getesteten Aspergillus-Spezies ein Protein erkennt. Das Protein weist in allen Spezies das ungefähr gleiche Molekulargewicht

ERGEBNISSE

wie CatA aus *A. fumigatus* auf. Was darauf hindeutet, dass es sich bei diesen Proteinen um ein zu CatA homologes Protein handelt.

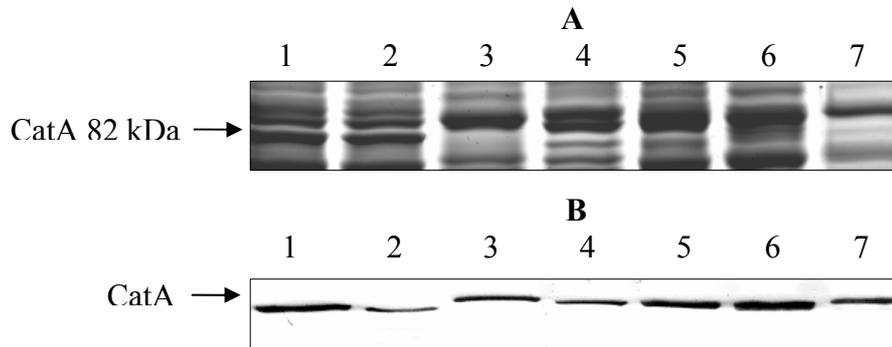


Abb. 24: Nachweis der Katalase A in verschiedenen Aspergillus-Spezies. **A:** Ausschnitt aus einem Coomassie-gefärbten Gradienten SDS-Gel (Gradient 7,4-20% Polyacrylamidgehalt). **B:** „Western Blot“-Analyse mit dem monoklonalen α -CatA D40-E3 Antikörper. Die Spuren 1-7 zeigen die Proteine aus *A. fumigatus* (Spur 1), *A. giganteus* (Spur 2), *A. terreus* (Spur 3), *A. nidulans* (Spur 4), *A. niger* (Spur 5), *A. flavus* (Spur 6) und *A. oryzae* (Spur 7).

Durch den Vergleich der Katalase-Proteinsequenzen verschiedener filamentöser Pilze, wie *N. crassa* (Acc.No.: Q9C168) oder *Paracoccidioides brasiliensis* (Acc.No.: Q6RSH8), aber auch verwandter Aspergillus-Spezies wie *A. nidulans* (Acc.No.: P55305) und *A. oryzae* (Acc.No.: Q877A1) mit der Sequenz aus *A. fumigatus* (Acc.No.: P78574) konnte zudem gezeigt werden, dass CatA ein sehr konserviertes Protein ist. In Abb. 25 ist dieser Sequenzabgleich dargestellt.

```

A. fumigatus -----MATKIAGGLHRAQEVLTQNTSSKSKKLVLDLERDTADAHT-QQPLTT
A. oryzae -----MANIVAGGLHKEVAVQGAASKDKKLVLDLAPDTHNVQSSKEPLTT
A. nidulans -----MATSTITAGLQKAQQAVQDTATKNNKIVDISHDTVNVVHT-DEQRT
N. crassa -----MQRLALHYPLDPAAEPPTEHILQQSNPTMSNIIISQAGQKAKEALTS-APSSKVVDDLKNEFKETDK-SARLTT
P. brasiliensis -----MASKATEGLRKTQGMVESMHPGNKKVADLARDTVDVHA-PAEFTT

A. fumigatus -----DHGVRVSNTDOWLRVNDRRTGPSLLEDQIAREKIHRFDHERIPERVVHARGTGAFGNFKLKESIEDLTYAGVL
A. oryzae -----DHGVRISDIDHWLKEVNDNHTGPMLEDOIAREKIHRFDHERIPERVVHARGTAAFGNFKLHESAEEDVSYAGIIL
A. nidulans -----DFGVAITDDEHWRVTNETHSGPSLLEDHIFARERIHFRDHERIPERVVHARGTGAFGNFKLKESEDLTAYAGVL
N. crassa -----DYGVKQTTADDWLRIVSDDKIGPSLLEDPFARERIMFRDHERIPERVVHARGSGAFGKFKVYESASDLTMAEVL
P. brasiliensis -----DHGTVKVSNTDNWLRRAAENQGPSLLEDQIAREKIHRFDHERIPERVVHARGTGAFGHFKLVESAEDATSAAGVL

A. fumigatus -----TDTSRNTPVFVRFSTVQSGRSADTVRDVRFVAVKFYTDEGNWDIVGNNIPVFFIQDAVKFPD-----
A. oryzae -----TDTSRNTPVFLRFSTVQSGKGSADTVRDVRFVAVKFYTDEGNWDIVGNNIPVFFIQDAIKFPD-----
A. nidulans -----TDTSRNTPVFVRFSTVQSGRSADTVRDVRFVAVKFYTDEGNWDIVGNNIPVFFIQDAIKFPD-----
N. crassa -----TDTSRNTPVFVRFSTVQSGRSADTVRDVRFVAVKFYTEEGNWDIVGNNIPVFFIQDAIKFPD-----
P. brasiliensis -----TDTSRNTPVFVRFSTVQSGKGSADTVRDVRFVAVKFYTDEGNWDIVGNNIPVFFIQDAIKFDISKQSIPIPSFLS

A. fumigatus -----FVHAVKPEPHNEVPQAQTAHNNFDFVYLHPEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTFALVNKEGK
A. oryzae -----FVHAVKPEPHNEVPQAQTAHNNFDFVYLHPEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTFSLVNKEGK
A. nidulans -----FVHAVKPEPHNEVPQAQTAHNNFDFVYLHPEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTFSLVNKEGK
N. crassa -----VIHAGKPEPHNEVPQAQSAHNNFDFVYLNHTEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTYTLVNAQGGK
P. brasiliensis -----RCYLSSVHAVKPE-RQRSPOGN-CHNNFDFVYSCILKATHMFMWAMSDRAIPRILPVCRGFGVNTFVLVNRQGGK

A. fumigatus -----RHFVKFHWIPIHLGVHSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLMEAIIDNKAYPKWDFAIQVIPEEKQDDFEFDILDATKI
A. oryzae -----RHFVKFHFIPHLGVHSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLMEAIIDNCAYPKWDFAIQVIPEEKQDDFEFDILDATKI
A. nidulans -----RHFVKFHWIPIHLGVHSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLMEAIIDNKAYPKWDFAIQVIPEEKQDDFEFDILDATKI
N. crassa -----RHFVKFHWIPIELGVHSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLWEAIEIDNCAYPKWKDFGIQATIAEEDHKKFDILDATKI
P. brasiliensis -----RHFVKFHWIPIELGVHSLVWDESEFKLGGQDPDFHRKDLMEAIIDNKAYPKWKDFGIQVIPEEKHEFEFDILDATKI

```

<i>A. fumigatus</i>	WPENLVPLRVIGELELNRNVDFFPQTEQVAFCTSHIVPGIDFDDPLLQGRNFSYFDTOISRLGINWEELPIN
<i>A. oryzae</i>	WPENLVPLRVIGELELNRNVDFFPQTEQVAFCTSHIVPGIDFSDPLLQGRNFSYFDTOISRLGINWEELPIN
<i>A. nidulans</i>	WPENLVPLRVIGELELNRNVDFFPQTEQVAFCTSHIVPGIDFSDPLLQGRNFSYFDTOISRLGINWEELPIN
<i>N. crassa</i>	WPEDLVPLRVYIGEMELNRNVDFFPQTEQVAFCTSHVYVNGIGFSDPLLQGRNFSYFDTOISRLGVNFCLELPIN
<i>P. brasiliensis</i>	WPEDLVPLRVYIGEMELNRNVDFFPQTEQVAFCTSHIVPGIEFSDPLLQGRNFSYFDTOISRLGVNWEELPIN
<i>A. fumigatus</i>	RPVCPVLNHNRDGQMRHRTIQTGTVNYWPNRFEAVPPTGTKGSGVGGGFTTYPQRVGVIKRNALNDKFRHHNOA
<i>A. oryzae</i>	RPVCPVLNHNRDGAKRHRITAOGTVTIWSNRSEAGPPAPVEH---GGFASYPAKLNGIKKRGLSPKFRHHNOA
<i>A. nidulans</i>	RPVCPVLNHNRDGAKRHRITKGTVNYWPNRFEANPPASDK-----GFKSHAPAITGRKRDITPKFKVHNOA
<i>N. crassa</i>	RPVCPVMMNHNRDGAMRHITSRGTVNYYPNRFDAOPPASKKE---GGYLEVYAKVAGIKARARSAKFKVHFSQA
<i>P. brasiliensis</i>	RPVCPVMMNHNRDGAMRHKITQGTVNYWPNRFEAVPPTNPED---GGFVTPYQKITRRLSYMVSNKFEANTS-PA
<i>A. fumigatus</i>	QLFYNSMSEHEKLMKKAFFSFLDHCDDPTVYERLAGHRLAEIDLELAQKVAEMVGAPIPAKALKQNHGRRAPH
<i>A. oryzae</i>	QLFYNSLSEHEKLVHKKAFSFLDHCDDPTVYERLAGHRLAEIDLELAQVVAELVGAIPDPKALRFNHGRKRSKH
<i>A. nidulans</i>	QLFYNSLSEVEKLVHKKAFSFLDHCDDPTVYERLAGQLAEIDLELAQVVAEMVGAPIPTKALRDNDHCKTSVR
<i>N. crassa</i>	QLFYNSMSPLEKOHMINAFSFLDHCDEDPVYVGRMVQR-LADIDLGLAQTIAEMVGGAEPTTTHNFNHGRKTIN
<i>P. brasiliensis</i>	QLFYNSLS-YEQLHTQNAFCFLDHCYDQVVTDDSSSD-LLKSPYRSHELSSQSKSALQHTGLDVPTKQKQKTIN
<i>A. fumigatus</i>	LSQTEFTPKNPPTIASR---RIAI IIGDGYDPVASITGLKTAIKAAASALPFTIGTKRSAIYAT-EDKTSKGIIPD
<i>A. oryzae</i>	LSQTEFFPKQOPTIASR---RIAI IIGDGYDPVAFNGLKGAITAVGALPFTVIGTKRSPIYADGEDKSSKGVVAD
<i>A. nidulans</i>	LSQTEFTPKAPGTTISR---RIAI IIGDGYDKIAFNGMKAAIILAAASAPLRHHQTSAIYAQGEDKSSKGVVAD
<i>N. crassa</i>	LSQTEFFPATPTIKSR---RVAI IIGDGYDNVAIDAAYAAISANQAIPLVIGPRRSKVTAA--N---GSTVQPH
<i>P. brasiliensis</i>	LSQTEYINERQPFCTHNPRGENTILLGDGTQSPSP-LSNRGNSHECSAHHNGTKROPTIFADHEDRETGAQVTPD
<i>A. fumigatus</i>	HHYDQQRSTMFDAFFIPG-GPHVATLIRNGQIKYWISETFGHLKALGATGEAVDLVKEITSGTLHVQVASSQSP
<i>A. oryzae</i>	HOYDQQRSTMFDAFFIPG-GPHVESLKNQIRYWIIEITFGHLKALGATGEAAAFIKEALGSAIDVQVASSDNP
<i>A. nidulans</i>	HMVDGMRSTMFDAFFIPG-GSHIEITLQKNGQIRYWIAETFGHLKALGAMGEAAQFLVKEVIGNVMGVQIAGDSA
<i>N. crassa</i>	HHLEGFIRSTMVDATFIPGGAKAAETLSKNRGRALHWIREAFGHLKALGATGEAVDLVAKAI-ALP--QVTVSSEA
<i>P. brasiliensis</i>	HNVTIGQRSTLLTPRSYPV-ARISRSCASIGAFRWIIEAFGHCKAIGATGEAVDLIAQVNSLPLGNVALASSS
<i>A. fumigatus</i>	EPVEWYGVVTTAGKQKPESEFKESVQILKGTDFVKGFFYQISQHRNYQRELDGLASTIAF
<i>A. oryzae</i>	QPVWYGVVTTAGKIHKPESEFKEGIQIVKDAKDFISTFFYQISQHRNYQRELDGLASTVAF
<i>A. nidulans</i>	EPVEWYGVVTTAGKPESESLSEGFKVLKDAGDFTSKFFYQISQHRNWQRELDGLASTVAF
<i>N. crassa</i>	EVHESYGVVTLKKVK-PESFTDAVKIAKGAAGTGEFFYATAQHRNWQRELDGLHSMIAF
<i>P. brasiliensis</i>	DVVEWYGVVTTSSKLHEPHTLLEGFKLFPEAKDFLKGKFLYQVSQHRNYQRELDVGLTDQVAF

Abb. 25: Vergleich der Proteinsequenzen homologer Katalasen verschiedener filamentöser Pilze. Dargestellt ist CatA aus *A. fumigatus* (Acc. No.: P78574), CatA aus *A. oryzae* (Acc. No.: Q877A1), CatA aus *A. nidulans* (Acc. No.: P55305), CatA aus *N. crassa* (Acc. No.: Q9C168) und Cat1 aus *P. brasiliensis* (Acc. No.: Q6RSH8). Schwarz unterlegte Sequenzabschnitte zeigen identische Aminosäuren.

19.4 Die Abbaukinetik von CatA

In den eindimensionalen Gelen wurde bereits beobachtet, dass CatA nach 8h Inkubation der Sporen in YG-Medium nicht mehr auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 22). Da es mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers α -CatA (D40-E3) möglich war, geringere Mengen der Katalase nachzuweisen, sollte durch eine „Western Blot“-Analyse nachgeprüft werden, wie schnell CatA während des Wachstums abgebaut wird. Dafür wurde YG-Medium mit *A. fumigatus* beimpft und zu den Zeitpunkten 2h, 4h, 6h und 8h (letzteres entspricht der Fraktion der auskeimenden Sporen) geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden äquivalente Proteinmengen auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen und eine „Western Blot“-Analyse mit dem mAk D40-E3 durchgeführt. Abb. 26 stellt das Ergebnis einer solchen Analyse dar: Die Menge der CatA nimmt mit verlängerter Wachstumszeit ab, nach 8h ist dieses Protein mit dem monoklonalen α -CatA Antikörper nicht mehr nachweisbar.

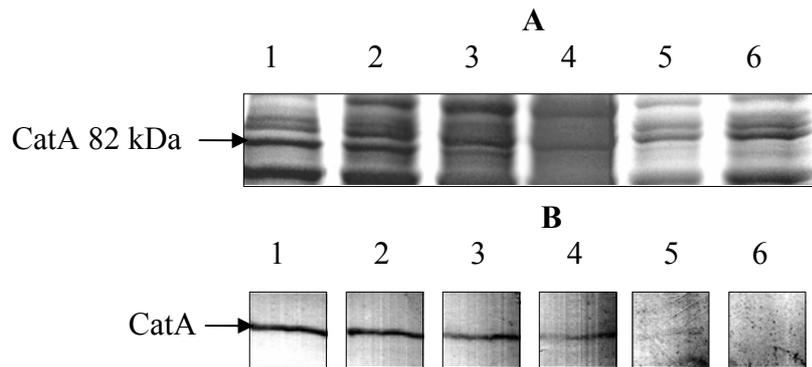


Abb. 26: Der CatA-Abbau erfolgt in einem Zeitraum von 8h während der Germination. In **A** ist ein Coomassie-gefärbtes Gradienten SDS-Gel (7,5-20% Polyacrylamidgehalt) dargestellt **B** zeigt eine „Western Blot“-Analyse mit dem mAk D40-E30. Die Spuren 1 bis 6 zeigen die Proteine aus *A. fumigatus* der Sporen (Spur 1), nach 2h Inkubation in YG (Spur 2), nach 4h Inkubation in YG (Spur 3), nach 6h Inkubation in YG (Spur 4), nach 8h Inkubation in YG (Spur 5) und nach einer Inkubation ÜN in YG (Spur 6).

Zusätzlich zur Analyse der CatA-Abbaukinetik während der Sporen-Auskeimung wurde ein Katalase Aktivitätstest durchgeführt (Paris *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 1997). Der Test sollte überprüfen, wie lange CatA in der Lage war die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser und Sauerstoff zu katalysieren. Mit einem nativen Gelsystem wurde der Test in einer Hoefer-Gelkammer durchgeführt. Nach mehreren „Inkubationsschritten“ (in Methanol, Wasser, H_2O_2 , Kalium-Eisen-Cyanid und Eisen-Chlorid) konnte der H_2O_2 -Abbau als blauer Niederschlag auf dem Gel in der Proteinbande nachgewiesen werden (siehe Abb. 27) die CatA entspricht. Die Katalase-Aktivität zeigte sich in den ruhenden Sporen als distinkte Bande. Mit steigender Inkubationszeit begann die Bande zu verschwinden. Nach 8h war praktisch keine Aktivität mehr zu erkennen (siehe Abb. 27, Spur 5).

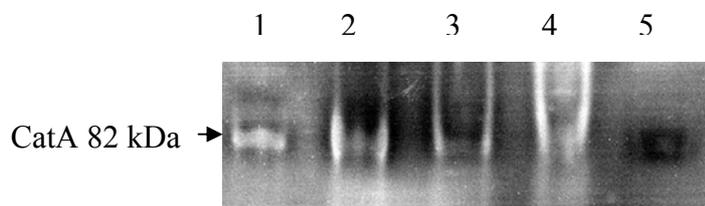


Abb. 27: Nachweis der Katalase A-Aktivität aus *A. fumigatus* Aktivität zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten. Natives Höfer-Polyacrylamidgel durch den Niederschlag eines Katalase Aktivitätstests angefärbt. Um Banden besser darstellen zu können ist das Gel als Negativ-Darstellung abgebildet. Die Spuren 1-5 stellen die CatA-Aktivität aus *A. fumigatus* in den ruhenden Sporen (Spur 1), nach 2h Inkubation in YG (Spur 2), nach 4h Inkubation in YG (Spur 3), nach 6h Inkubation in YG (Spur 4) und nach 8h (auskeimende Sporen) Inkubation in YG (Spur 5) dar.

19.5 Blockierung des CatA-Abbaus

Es lagen keine Untersuchungen vor, durch welchen Mechanismus die Katalase A abgebaut wurde. Ob das Protein durch Ubiquitinierung ins Proteasom geleitet, oder ob es durch Proteasen abgebaut wurde, sollte zunächst durch den Versuch der Blockierung des CatA-Abbaus mit Hilfe verschiedener Proteaseinhibitoren und anschließend durch den Nachweis einer möglichen Ubiquitinierung von CatA untersucht werden.

Für den Versuch, den Abbau der Katalase zu blockieren, wurden verschiedene Proteaseinhibitoren getestet. Pepstatin A ist ein Inhibitor, der saure Proteasen (z.B. das Pepsin (in *A. fumigatus* z.B. das PEP 2) blockiert. PMSF hemmt irreversibel Serin- und Thiolproteasen (z.B. ALP2 in *A. fumigatus*). Um ein breiteres Proteasespektrum abdecken zu können, wurde des Weiteren ein Proteaseinhibitor-Cocktail für Pilzextrakte (Sigma) eingesetzt, der sowohl Serin-, Cystein-, Aspartat- als auch Metalloproteasen inhibiert. Zusätzlich wurde die Translation durch Cycloheximid blockiert. Cycloheximid hemmt bei Eukaryonten die Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Ribosomenuntereinheit. Dadurch sollte festgestellt werden, ob ein CatA-abbauendes Enzym in der Zelle bereits vorhanden ist oder neu synthetisiert werden muß. Durch Actinomycin D wird die Transkription blockiert. Wie bei Cycloheximid sollte mit diesem Reagenz festgestellt werden, ob es zu einer Neubildung des Proteins kommen muss, diesmal allerdings auf transkriptioneller Ebene. Die Inhibitoren wurden mit den Konzentrationen 50µg/ml Cycloheximid, 20mM PMSF, 20mM Pepstatin A und 200µl Proteaseinhibitor-Cocktail beim Beimpfen von 200ml Medium zugegeben. Die Kulturen wurden 8h schüttelnd bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Auskeimung mikroskopisch untersucht. Abb. 28 zeigt eine „Western Blot“-Analyse mit dem α -CatA mAk D40-E3. Durch eine Inhibierung der Translation mit Cycloheximid konnte sowohl der CatA-Abbau als auch die Auskeimung blockiert werden, dasselbe galt für PMSF und den Proteaseinhibitor-Cocktail (siehe Abb. 28, Spuren 3, 4 und 6). Trotz Zugabe von Pepstatin A fand Auskeimung statt und der Abbau von CatA wurde nicht blockiert (siehe Abb. 28, Spur 5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Blockierung der Auskeimung auch der Abbau von CatA blockiert wird, während eine erfolgreiche Auskeimung mit einem CatA-Abbau einhergeht. Demnach kann das CatA-Protein als ein Markerprotein für die Auskeimung verwendet werden. Actinomycin D verhinderte den CatA-Abbau, bei 10% der Sporen konnte eine Keimschlauchbildung beobachtet werden und 30% waren nach 8h Wachstum deutlich angeschwollen. Möglicherweise könnte eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einer

vollständigen Auskeimung führen. Durch dieses Ergebnis kann angenommen werden, dass das mögliche Enzym für den CatA-Abbau möglicherweise bereits als mRNA in den ruhenden Konidien vorliegt.

Die Sporen, deren Auskeimung durch Cycloheximid, PMSF und den Proteaseinhibitor-Cocktail verhindert werden konnte, wurden nach einer solchen Inkubation mit PBS gewaschen und weiter bei 37°C in YG-Medium inkubiert. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die Auskeimung durch die Inhibitoren irreversibel ist oder nicht. Es stellte sich heraus, dass die Sporen in der Lage waren die Auskeimung fortzusetzen, nachdem die Inhibitoren abgewaschen worden waren. Das bedeutet, dass keiner dieser Inhibitoren toxisch wirkte.

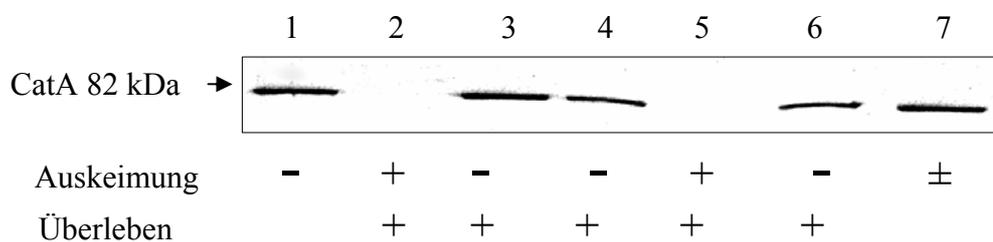


Abb. 28: Versuch den CatA-Abbau durch Proteaseinhibitoren zu blockieren. „Western Blot“-Analyse mit dem α -CatA Antikörper. Die Auskeimung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und ist durch + (Auskeimung hat bei ca. 80% der Konidien stattgefunden) und - (keine Auskeimung) dargestellt. Das Überleben der Sporen nach Waschen und weiterer Inkubation bei 37°C ist mit + dargestellt. Spuren 1 bis 6 zeigen die Proteine der Sporen (Spur 1), Proteine der auskeimenden Sporen (Spur 2), Proteine von *A. fumigatus* 8h in Medium mit 50 μ g/ml Cycloheximid (Spur 3), Proteine von *A. fumigatus* 8h in Medium mit 20mM PMSF (Spur 4), Proteine von *A. fumigatus* 8h in Medium mit 20mM Pepstatin A (Spur 5), Proteine von *A. fumigatus* 8h in Medium mit mit 200 μ l Proteaseinhibitor-Cocktail (Spur 6) und Proteine von *A. fumigatus* mit 0,4mg/ml Actinomycin D (Spur 7).

19.6 Ubiquitinierung von CatA

In einer Zelle gibt es verschiedene Systeme für den Abbau von Proteinen: zum einen können Proteine durch Proteasen abgebaut werden, zum anderen existiert ein effizientes Abbausystem, das so genannte Proteasom. Proteine, die im Proteasom abgebaut werden, werden durch Polyubiquitin markiert. Durch einen polyklonalen Antikörper gegen Ubiquitinreste sollte festgestellt werden, wie sich die Ubiquitinierung der gesamten Proteine und im speziellen die Ubiquitinierung von CatA während der Germination verändert.

Dafür wurde eine „Western Blot“-Analyse mit einem kommerziell erhältlichen α -Ubiquitin-Antikörper untersucht. In Abb. 29 wurden ruhende Sporen und Sporen nach 4h Wachstum mit dem anti-Ubiquitin-Antikörper immungefärbt (Spuren A), zur Kontrolle (Vorhandensein von CatA) wurden dieselben Proben mit α -CatA gefärbt (siehe Abb. 29,

Spuren B). Aus dem Blot geht hervor, dass in den ruhenden Sporen bereits einige Proteine in ubiquitiniertes Form vorliegen, die Ubiquitinierung nimmt aber bereits nach 4h Wachstum in YG stark zu (siehe Abb. 29, A2). Eine spezifische Ubiquitinierung für CatA konnte mit diesem Experiment nicht eindeutig belegt werden. Möglicherweise könnte durch Versuche, CatA durch eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen CatA Antikörper aus dem Proteinlysate zu reinigen, der spezifische Nachweis einer Ubiquitinierung gelingen. Die Immunpräzipitation von CatA mit dem generierten monoklonalen α -CatA D40-E3 Antikörper, war aber noch nicht erfolgreich.

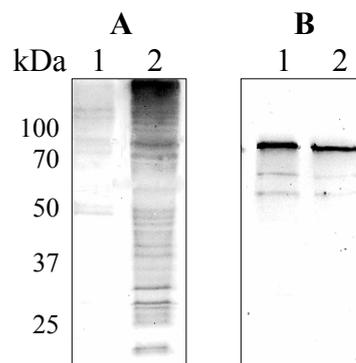


Abb. 29: Ubiquitinierung von CatA in den ruhenden Sporen und nach 4h Inkubation in YG. „Western Blot“-Analyse mit dem α -Ubiquitinierungs-Antikörper (A) und α -CatA-Antikörper D40-E3 (B). Aufgetragen wurden Proteine der ruhenden Sporen (Spur 1) und Proteine der Sporen nach 4 h Inkubation in YG (Spur 2).

20 Die Mangan-abhängige Superoxiddismutase von *Aspergillus fumigatus*

20.1 Identifizierung der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase aus den Hyphen von *Aspergillus fumigatus*

Ein hyphenspezifisches Protein mit dem experimentellen Molekulargewicht von 25 kDa wurde aus einem eindimensionalen SDS-Gel ausgeschnitten (siehe Abb. 30). Mit Hilfe der LC-MS/MS wurde es als Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) identifiziert (siehe 16.2 und Abb. 30).

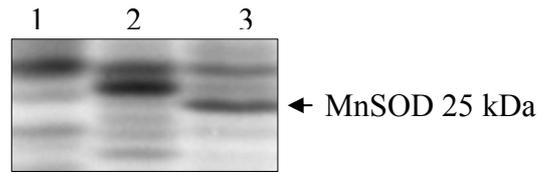


Abb. 30: Mangan-abhängige Superoxiddismutase in den verschiedenen Wachstumsfraktionen von *A. fumigatus*. Ausschnitt aus einem Coomassie-gefärbtes Gradienten SDS-Gel (Gradient 7,4-20% Polyacrylamidgehalt) ausgeschnitten. Durch LC-MS/MS konnte das Protein als Mangan-abhängige Superoxiddismutase identifiziert werden. Die Spuren 1 bis 3 zeigen die Proteine aus den ruhenden Sporen (Spur 1), Proteine aus den auskeimenden Sporen (Spur 2) und Proteine aus den Hyphen (Spur 3).

20.2 Herstellung spezifischer Antikörper gegen MnSOD durch die Durchmusterung der α -Aspergillus-Hybridombank

Die MnSOD wurde zunächst mit Primern aus einer cDNA von *A. fumigatus* amplifiziert (Sequenz siehe Abb. 31). Nach Ligation in den pQE30 Vektor und Transformation in *E. coli* [TG2] wurde das His₆-Protein mit Hilfe eines denaturierenden Puffersystems und einer Talonmatrix aus der unlöslichen *E. coli* Zellfraktion gereinigt (siehe Abb. 32, Spur 3). Dieses His₆-MnSOD wurde benutzt, um die Antikörperbank mit Hilfe eines „ELISA“ zu durchmusteren. Der Überstand des Hybridoms M1 reagierte am stärksten mit MnSOD und wurde durch Verdünnung der Hybridomzellen kloniert. Das Hybridom M1-A12 produziert den Antikörper α -MnSOD und wurde für alle weiteren Versuche eingesetzt.

```

1  ATGTCACAGCAATACACGCTCCCA1CCCCTCCCCTACCCCTACGATGCCCTCCAACCCTACATCTCCCAACAGATCATGGAGCTG
1  M S Q Q Y T L P P L P Y P Y D A L Q P Y I S Q Q I M E L

87  CACCACAAAAAGCACCATCAAACCTACGTCAATGGCCTGAATGCCGCACTCGAGGCGCAGAAGAAAGCGGGGAAGCCACCGAC
29  H H K K H H Q T Y V N G L N A A L E A Q K K A A E A T D

174  GTCCCCAAGCTCGTCTCCGTGCAGCAAGCGATCAAATTCACGGCGGGGGCACATCAACCATTCCCTCTTCTGGAAGAATCTG
58  V P K L V S V Q Q A I K F N G G G H I N H S L F W K N L

261  GCCCCGGAGAAATCCGGGGGTGGCAAGATCGATCAGGCACCGGTCTCAAAGCAGCCATCGAGCAGCGTTGGGGATCCCTTCGAT
87  A P E K S G G G K I D Q A P V L K A A I E Q R W G S F D

348  AAGTTCAAGGATGCTTTCAACACGACCCTGCTGGGCATTAGGGCAGCGGATGGGGTTGGTTAGTGACCGACGGACCCAAGGGA
116  K F K D A F N T T L L G I Q G S G W G W L V T D G P K G

435  AAGCTAGACATTACCACAACCCACGACCAGGATCCGGTGACCGGGCGGCCCGTCTTTGGGGTGGATATGTGGGAGCATGCT
145  K L D I T T T H D Q D P V T G A A P V F G V D M W E H A

522  TACTACCTTCAGTACTTGAACGACAAAGCCTCGTATGCCAAGGGCATCTGGAACGTGATCAACTGGGCTGAAGCGGAGAATCGG
174  Y Y L Q Y L N D K A S Y A K G I W N V I N W A E A E N R

60  TACATAGCGGGTGACAAGGGT2GGACACCCATTCATGAAGCTGTAG
203  Y I A G D K G G H P F M K L *
    
```

Abb. 31: Gen- und Aminosäuresequenz der MnSOD. Für die Herstellung der His₆-MnSOD wurden Primer (Positionen sind gelb unterlegt) aus der Nukleotidsequenz des Gens (Acc. No.: Q92450) hergestellt. Das entsprechende Gen wurde mittels PCR aus einer *A. fumigatus*-cDNA amplifiziert. Diese Sequenz zeigt eine 100%ige Homologie zu der MnSOD-Sequenz aus *A. fumigatus*-Stamm 293.

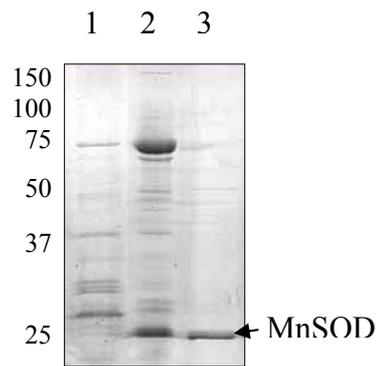


Abb. 32: Aufreinigung der His₆-MnSOD. 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. Molekulargewichte sind an der linken Seite in kDa angegeben. In den Spuren 1 bis 3 wurde *E. coli* [TG2] Lysat als Leerprobe (Spur 1), unlösliches Protein aus *E. coli* [TG2] mit pQE30::MnSOD aus einer mit 0,1mM IPTG induzierten 200ml Kultur (Spur 2) und gereinigte His₆-MnSOD aus der unlöslichen Proteinfraction nach einem ÜN-Dialyseschritt (Spur 3) aufgetragen.

20.3 Nachweis der MnSOD in den verschiedenen Germinationsstadien

Durch eine „Western Blot“-Analyse mit dem α -MnSOD Antikörper, wurde das Ergebnis aus den eindimensionalen Höfer-Gelen bestätigt: die MnSOD ist ein Protein das spezifisch für die Wachstumsfraktion der Hyphen ist (siehe Abb. 31, Spur 3).

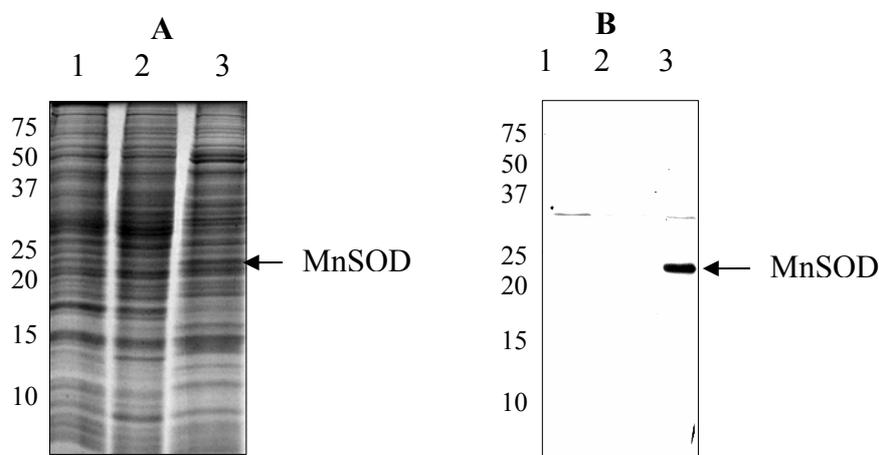


Abb. 33: Nachweis der MnSOD in den verschiedenen Germinationsstadien von *A. fumigatus* durch den α -MnSOD mAk M1-A12. A: 12%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. B: „Western Blot“-Analyse mit dem α -MnSOD mAk M1-A12, links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. In die Spuren 1 bis 3 von A und B wurden Proteine aus den Sporen (Spur 1), Proteine aus den auskeimenden Sporen (Spur 2) und Protein aus den Hyphen (Spur 3) aufgetragen.

20.4 Nachweis von MnSOD in verschiedenen Aspergillus-Spezies

Eine „Western Blot“-Analyse mit α -MnSOD wurde mit verschiedenen Aspergillus-Spezies durchgeführt. *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger* und *A. flavus* reagierten mit dem α -MnSOD mAk M1-A12 (siehe Abb. 34), lediglich *A. oryzae* zeigte unter diesen Bedingungen keine Reaktivität. Das bedeutet, dass der mAk ein konserviertes Epitop erkennt.

Um dieses Epitop möglicherweise zu identifizieren wurde ein Vergleich folgender in der Datenbank zugänglicher Proteinsequenzen der MnSOD durchgeführt: *A. oryzae* (Acc.No.: Q877B6), *A. nidulans* (Acc.No.: Q9P945), *N. crassa* (Acc.No.: Q9Y783), humane MnSOD (Acc.No.: P04179), MnSOD aus der Maus (Acc.No.: P09671) und *A. fumigatus* (Acc.No.: AAB60779) durchgeführt (siehe Abb. 36). Das Ergebnis zeigt, dass die einzelnen Sequenzen hohe Homologien untereinander aufweisen, was bedeutet, dass die MnSOD ein konserviertes Protein ist.

Um festzustellen, ob das Epitop, das der α -MnSOD mAk M1-A12 in den verschiedenen Aspergillen erkennt, auch in anderen Spezies konserviert ist, wurde eine „Western Blot“-Analyse mit verschiedenen anderen Extrakten durchgeführt. Murine J774-Zellen, humane HeLa-Zellen, sowie Proteine aus *N. crassa* und gereinigtes Mitochondrienlysat aus *N. crassa*, sowie *E. coli*-Lysat und Proteine aus *A. fumigatus*-Hyphen wurden auf das Gel aufgetragen (siehe Abb. 35, Spuren 1-7). Die „Western Blot“-Analyse zeigt, dass der α -MnSOD mAk M1-A12 nur mit der MnSOD aus den Hyphen von *A. fumigatus* reagiert (siehe Abb. 35, Spur 4). Eine kreuzreagierende Bande ist auch in den J774- und HeLa-Zellen zu detektieren, jedoch stimmt das Molekulargewicht nicht mit dem einer MnSOD überein. Somit könnte das Epitop, das dieser Antikörper erkennt, spezifisch für fast alle Aspergillus-Spezies sein.

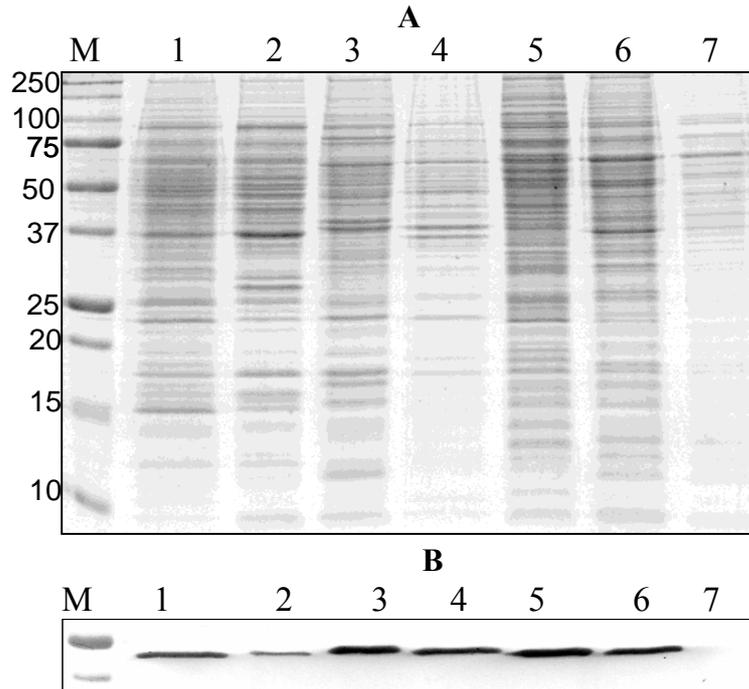


Abb. 34: Nachweis der MnSOD in den Hyphen verschiedener Aspergillus-Spezies. A zeigt ein Coomassie-gefärbtes 15%iges SDS-Gel, links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. In B wurde die „Western Blot“-Analyse mit dem α -MnSOD mAk M1-A12 dargestellt. Die Spuren 1 bis 7 zeigen die Proteine aus den Hyphen von *A. fumigatus* (Spur 1), *A. giganteus* (Spur 2), *A. terreus* (Spur 3), *A. nidulans* (Spur 4), *A. niger* (Spur 5), *A. flavus* (Spur 6) und *A. oryzae* (Spur 7).

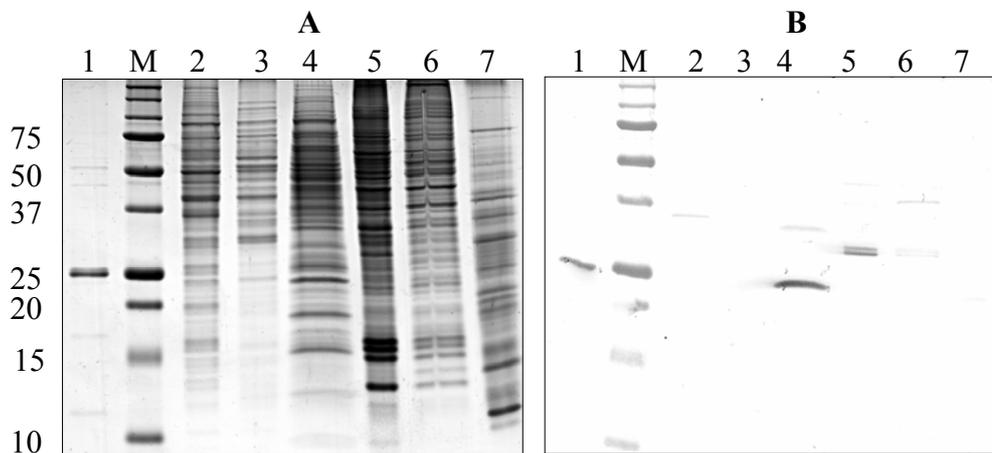


Abb. 35: Nachweis der MnSOD in *A. fumigatus*, *N. crassa*, Säugerzellen und *E. coli*. A Coomassie-gefärbtes 15%iges SDS-Gel, B „Western Blot“-Analyse mit dem α -MnSOD Antikörper. Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Die Spuren 1 bis 7 zeigen His₆-MnSOD (Spur 1), *N. crassa* Gesamtzelllysate (Spur 2), gereinigte Mitochondrien aus *N. crassa* (Spur 3), Proteine der Hyphen von *A. fumigatus* (Spur 4), Gesamtzelllysate von murinen J774-Zellen (Spur 5), Gesamtzelllysate von humanen HeLa-Zellen (Spur 6) und Gesamtzelllysate aus *E. coli* (Spur 7).

<i>A. fumigatus</i>	-----MSQQYTLPPLPYPYDALQPYISQQIMELHHKHHQ
<i>A. oryzae</i>	-----MATTFSLPPLPYAYDALEPVICKQIMEHHQKHHQ
<i>A. nidulans</i>	--MASLIRTS--LRTGLRASSSSAAPTFTTRGKATLPDLAYDYGALEPAISGKIMELHHKHHQ
<i>N. crassa</i>	MSASLFRATPVARSAALRAASAVKPAATFVRGKATLPDLQYDYGALEPYISSKIMELHHSKHHQ
<i>Homo sapiens</i>	---MLSRV--CGTSRQLAP--ALGYLGSRQKHSLEPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSKHHH
<i>Mus musculus</i>	---MLCRAA--CSTGRRLGP--VAGAAGSRHKHSLPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSKHHH
<i>A. fumigatus</i>	TYVNGLNAALEAOKKAAEATDVPKLVSVQQAIFKNGGGHINHSFLWKNLAPEKSGGKIDQ--A
<i>A. oryzae</i>	TYITNLNAALSQAOSTALAANNIPQLINLQOKIKFNGGGHINHSFLWKNLAPHASPETNIDQAA
<i>A. nidulans</i>	TYVNSYNTAIEQLQBAQASNNIAAQIALKPLINFHGGGHINHTLFWENLAPKNAGGGEPPSGA
<i>N. crassa</i>	TYVNGLNSALTTTIAEAESKGDFTKAASVAPLLNFHGGGHLNHTLFWENLAPASREGGGSPDGA
<i>Homo sapiens</i>	AYVNNLNVTEEKYQBALAKGDVTAQIALQPAKLFNGGGHINHSIFWNTLSPN---GGGEPKGE
<i>Mus musculus</i>	AYVNNLNATEEKYHEALAKGDVTTQVALQPAKLFNGGGHINHTIFWNTLSPK---GGGEPKGE
<i>A. fumigatus</i>	PVLKAAIEQRWGSFDFKDFKDAFNNTLLGIQSGSGWGLVTDGPK-GKLDITTTTHDQDPVTG---A
<i>A. oryzae</i>	PVLKAAIEAQYGSVEKFKFAFGATLLGLQSGSGWGLVANGPG-GKLEIVSTTKDQDPVTD---K
<i>A. nidulans</i>	--LSKAINESFSGLENFQGMNTALAAIQSGGAWLVQDKQT-GSLATKTYANQDPVVG---QF
<i>N. crassa</i>	--LGKAITTEFGSFESEFVKQMNAAALAGIQSGGAWLAKDKAANGKALITRANQDPVTG---NY
<i>Homo sapiens</i>	--LLEAIKRDFGSFDFKFKELTAASVGVQSGSGWGLGFNKER-GHLDQIAACPNDPQLQGTTLGL
<i>Mus musculus</i>	--LLEAIKRDFGSFDFKFKELTAVSVGVQSGSGWGLGFNKER-GHLDQIAACSNQDPLQGTTLGL
<i>A. fumigatus</i>	APVFGVDMWEHAYYLQYLNDKASYAKGIWNVINWABAENRYIAGDKGGHPFMKL
<i>A. oryzae</i>	VPVFGVDMWEHAYYLQYFNKASYVEGIWKVLNWRTAEDRF---KNGVEALRF
<i>A. nidulans</i>	KPLLCTDAWEHAYYLQYQNRKAEYFKAIWEVINWKAVERKFA-----
<i>N. crassa</i>	VPLLGI DAWEHAYYLQYENRKAEIFEAIWNVINWKTVAKRFEA-----
<i>Homo sapiens</i>	IPLLGI DVWEHAYYLQYKNVRPDYLLKAIWNVINWENVTERYMACKK-----
<i>Mus musculus</i>	IPLLGI DVWEHAYYLQYKNVRPDYLLKAIWNVINWENVTERYTACKK-----

Abb. 36: Vergleich der MnSOD-Proteinsequenz aus *A. fumigatus* mit den MnSOD-Sequenzen anderer Aspergillus-Spezies. Dargestellt sind die MnSOD-Proteinsequenzen aus *A. fumigatus* (Acc.No.: AAB60779), *A. oryzae* (Acc.No.: Q877B6), *A. nidulans* (Acc.No.: Q9P945), *N. crassa* (Acc.No.: Q9Y783), aus *Homo sapiens* (Acc.No.: Q727M4) und *Mus musculus* (Acc.No.: P09671). Schwarz untermalte Sequenzabschnitte zeigen identische Aminosäuren.

20.5 Nachweis der MnSOD durch verschiedene ABPA-Patientenseren

Die MnSOD ist ein Allergen (Asp f6), das spezifisch in Seren von Patienten, die an einer ABPA-Erkrankung leiden, nachgewiesen werden kann (Cramer *et al.*, 1998). Mit Hilfe einer IgE-, Western Blot“-Analyse wurden Seren von Patienten mit allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA) auf den verschiedenen Germinationsstadien von *A. fumigatus* und auf His₆-MnSOD getestet. Spur 1 in Abb. 37 A und B zeigt die Reaktivität der Seren auf die Proteine aus den ruhenden Sporen, Spur 2 mit Proteinen aus den auskeimenden Sporen, Spur 3 mit Proteinen aus den Hyphen und Spur 4 zeigt die Reaktivität mit der His₆-MnSOD. Die Proteinblots C und D wurden mit dem α-MnSOD mAk M1-A12 nachgefärbt, um eine eindeutige Zuordnung der in den Hyphen erscheinenden 25 kDa großen Proteinbande zu erhalten. Beide Seren erkennen die MnSOD in der Hyphenfraktion von *A. fumigatus*, die His₆-MnSOD wird, aus noch nicht erklärbarem Grund, nicht erkannt. Die Patientenseren erkennen noch weitere IgE-bindende Proteine auf den Proteinblots, die in allen Wachstumsfraktionen mehr oder weniger konstant vorhanden sind. Die MnSOD ist das einzige in diesem Versuch erkannte Allergen, das eine Regulation im Verlauf der Germination zeigt.

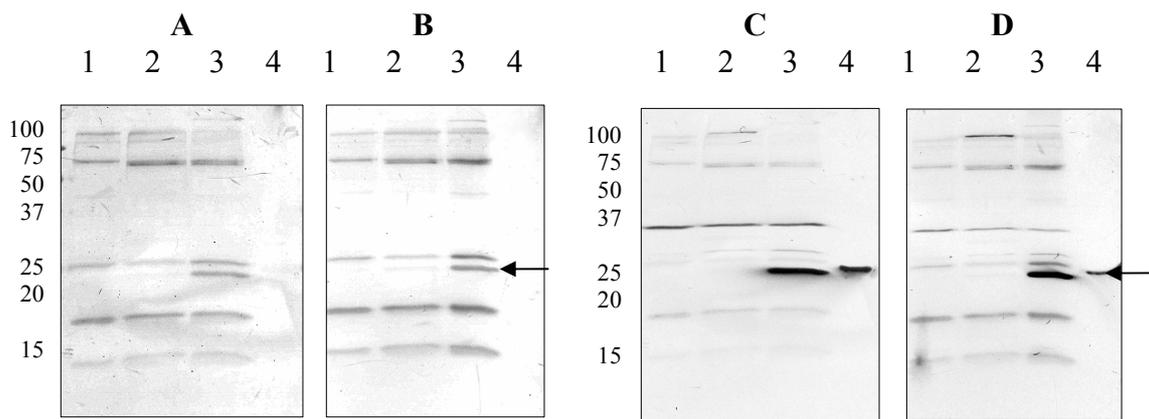


Abb. 37: Seren von Patienten mit ABPA reagieren mit der MnSOD aus *A. fumigatus*. IgE-, „Western Blot“-Analyse mit Seren von ABPA-Patienten (A und B) und mit dem α -MnSOD Antikörper nachgefärbte Blots (C und D). Molekulargewichte sind an der linken Seite in kDa angegeben. In den Spuren 1 bis 4 sind Proteine aus den Sporen (Spur 1), den auskeimenden Sporen (Spur 2), den Hyphen (Spur 3) und die His₆-MnSOD aufgetragen.

20.6 Nachweis atmungsaktiver Mitochondrien in den Hyphen

MnSOD entgiftet reaktive Sauerstoffspezies, die während einer aktiven Atmung entstehen. Da in dieser Arbeit die MnSOD erst in den Hyphen nachweisbar war lag die Vermutung nahe, dass die Atmungsaktivität zu diesem Zeitpunkt stark ansteigen würde. Um dies nachzuweisen wurden Myzel-Hyphen und auskeimende Sporen eines GFP-exprimierenden *A. fumigatus*-Stammes (siehe Abb. 38 C) mit dem Reagenz MitoTracker angefärbt (siehe Abb. 38 B), das atmungsaktive Mitochondrien färbt. Abb. 38 zeigt, dass in den auskeimenden Sporen keine aktiven Mitochondrien durch das Reagenz MitoTracker nachweisbar sind (siehe Abb. 38 B, Pfeil), während in den Hyphen durch das Reagenz atmungsaktive Mitochondrien angefärbt werden (siehe Abb. 38 B).

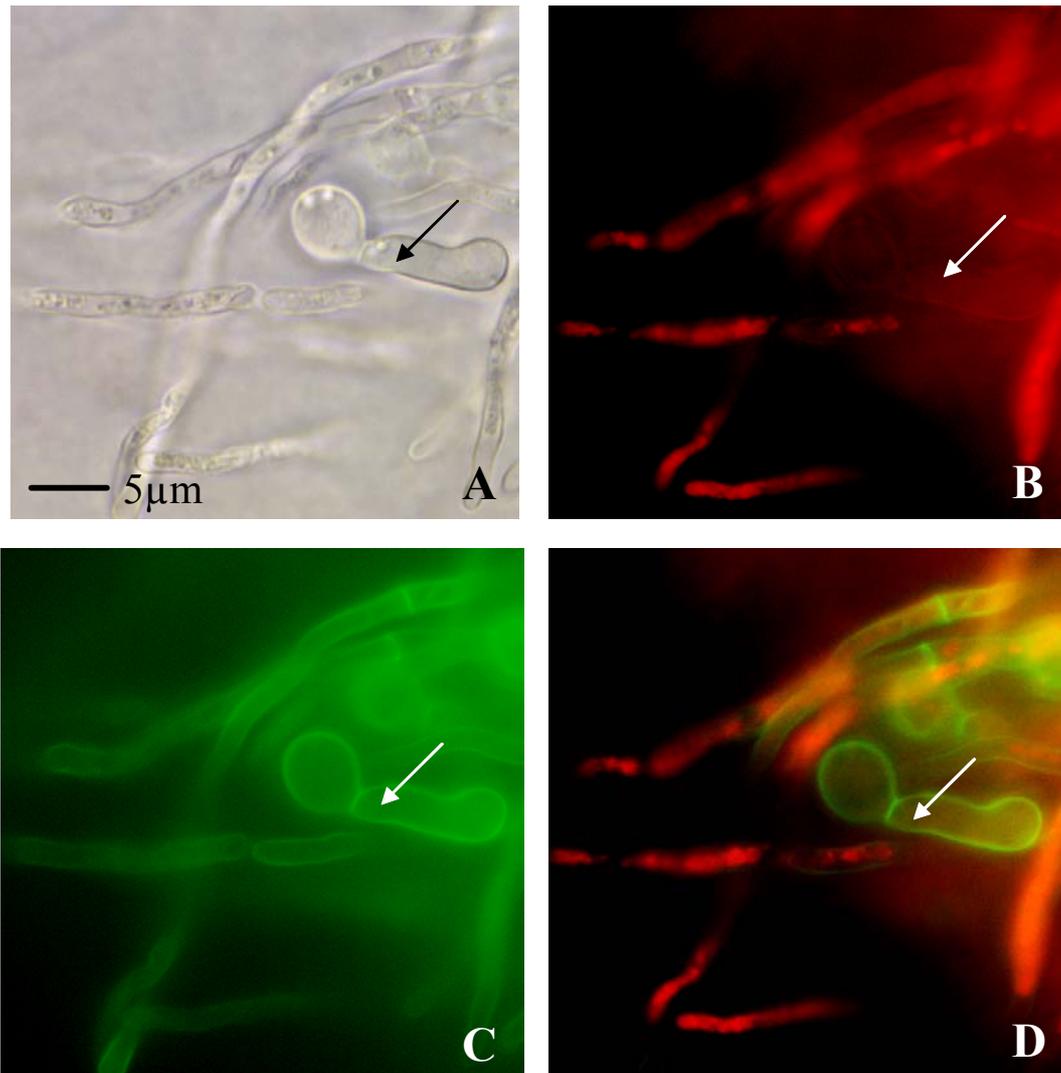


Abb. 38: Anfärbung der atmungsaktiven Mitochondrien mit dem Reagenz MitoTracker. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von GFP-produzierenden *A. fumigatus*-Hyphen sowie einer auskeimenden Spore (Pfeil). **A** Hellfeld, **B** Anfärbung mit dem Reagenz MitoTracker, **C** GFP-produzierende Hyphen sowie auskeimende Spore und **D** Überlagerung der Fluoreszenzen aus B und C.

21 Die Isocitratlyase

21.1 Isocitratlyase in verschiedenen Germinationsstadien

Das Wachstum auf Acetat oder Verbindungen, die über Acetat abgebaut werden (Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe), wird Mikroorganismen durch den Glyoxylatzyklus ermöglicht (Schlegel, 1992). Die Isocitratlyase (ICL) ist ein Enzym des Glyoxylatzyklus, es spaltet Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat.

In Zusammenarbeit mit Matthias Brock (Universität Hannover) wurden Untersuchungen an der Isocitratlyase in *A. fumigatus* vorgenommen. Zunächst wurden mAk gegen die gereinigte ICL generiert. Insgesamt wurden 10 Hybridome eingefroren, alle Antikörper zeigten eine positive Reaktion auf die ICL im „Western Blot“. Hybridom #30 und #21 wurden kloniert. Das Hybridom E30-F8 produzierte Antikörper, die für weitere Versuche als α -ICL mAk eingesetzt wurden.

Durch den mAk E30-F8 konnte der Nachweis erbracht werden, dass die ICL in den Hyphen von *A. fumigatus* exprimiert wurde, wenn die Inkubation in AMM mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle erfolgte. Während nur eine geringe Expression in den Hyphen stattfand, wenn *A. fumigatus* in AMM mit Glukose inkubiert wurde (persönliche Mitteilung von Matthias Brock)

SP, AS und MY sollten nach Wachstum in komplexem Medium einer „Western Blot“-Analyse unterzogen werden. Abb. 39 zeigt das Coomassie-gefärbte Gel der Fraktionen SP, AS und MY (A) und die parallele Immunfärbung mit α -ICL mAk E30-F8 (B). Durch diesen Versuch wurde die erstaunliche Entdeckung gemacht, dass bei Wachstum in einem komplexen Medium die ICL ein differentielles Protein der ruhenden Sporen ist. Der Abbau der ICL während Auskeimung in YG, ist dem von CatA ähnlich (siehe Abb. 22). In den auskeimenden Sporen konnte unter den gegebenen Bedingungen die ICL durch eine „Western Blot“-Analyse mit dem α -ICL mAk E30-F8 nach 8h nicht mehr nachgewiesen werden.

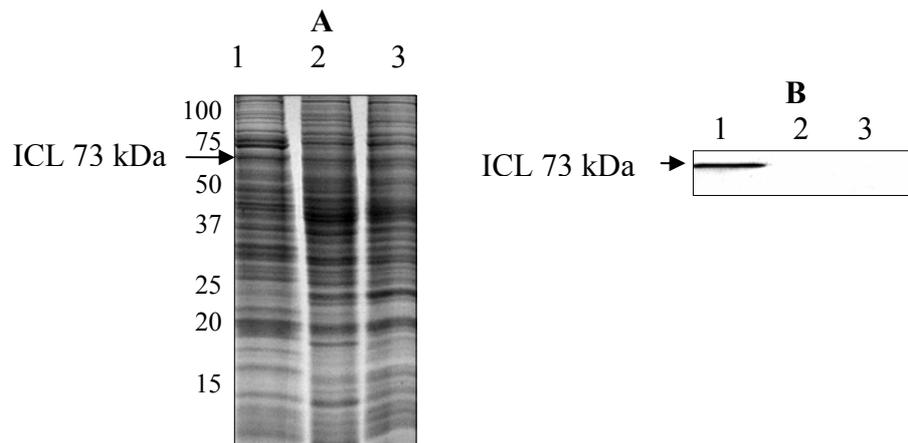


Abb. 39: Nachweis der Isocitratlyase in den verschiedenen Germinationsstadien von *A. fumigatus*. **A** zeigt ein 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. **B** stellt die „Western Blot“-Analyse mit dem α -ICL mAk E30-F8 dar. In den Spuren 1 bis 3 sind die Proteine der ruhenden Sporen (Spur 1), der auskeimenden Sporen (Spur 2) und der Hyphen (Spur 3) dargestellt.

21.2 Identifizierung der ICL in verschiedenen Aspergillus-Spezies

In der Literatur gab es keinen Hinweis darauf, ob die ICL aus *A. fumigatus* ein Enzym ist, das Homologien zu Isocitratlyasen anderer Aspergillus-Spezies aufwies. Zusätzlich zur Sequenz aus *A. fumigatus* (Acc.No.: Q6T267) war in der NCBI-Datenbank lediglich die Sequenz einer ICL aus *A. nidulans* (Acc.No.: P28298) zugänglich. Durch einen Vergleich wurde eine Homologie von 90% zwischen den beiden Sequenzen festgestellt. Um ein homologes Protein in anderen Aspergillus-Spezies zu detektieren, wurde mit dem α -ICL mAk E30-F8 eine „Western Blot“-Analyse mit den Sporenproteinen verschiedenen Aspergillen durchgeführt. Untersucht wurden *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus* und *A. oryzae* (siehe Abb. 40, Spuren 1-7). Als Kontrolle diente der α -CatA mAk D40-E3 Antikörper. Aus dem Blot geht hervor, dass der α -ICL mAk E30-F8 in *A. fumigatus* und *A. giganteus* dieselben Epitope erkennt. Die anderen getesteten Aspergillus-Spezies besitzen entweder keine ICL in den Sporen oder der Antikörper erkennt ein Epitop, das in diesen Spezies nicht konserviert ist.

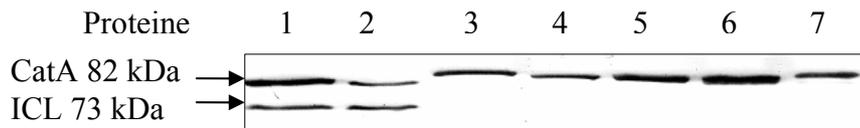


Abb. 40: Nachweis von CatA und ICL in verschiedenen Aspergillus-Spezies. „Western Blot“-Analyse mit einer 1:1 Mischung aus den monoklonalen Antikörpern α -CatA D40-E3 und α -ICL E30-F8. Die Spuren 1 bis 7 zeigen die immungefärbten Banden der CatA und der ICL aus *A. fumigatus* (Spur 1), *A. giganteus* (Spur 2), *A. terreus* (Spur 3), *A. nidulans* (Spur 4), *A. niger* (Spur 5), *A. flavus* (Spur 6) und *A. oryzae* (Spur 7).

21.3 Nachweis der ICL in verschiedenen auf Acetat gewachsenen Aspergillen

Die meisten Sporen verschiedener Aspergillus-Spezies, außer *A. fumigatus* und *A. giganteus*, reagierten nicht mit dem α -ICL mAk E30-F8 (siehe Abb. 40). In diesem Experiment sollte das Verhalten der ICL aus *A. giganteus*, *A. terreus* und *A. flavus* untersucht werden. Die Sporen dieser Aspergillus-Spezies wurden in einem AMM mit Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen. Nach einer Inkubation von 7h wurden die Sporen geerntet und im MSK-Zellhomogenisator aufgeschlossen. Die isolierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine „Western Blot“-Analyse mit dem α -ICL mAk E30-F8 durchgeführt (siehe Abb. 41). Die Immunfärbung zeigt, dass in *A. giganteus* die ICL durch ein Wachstum auf Acetat aktiviert bleibt (siehe Abb. 41, Spur 1), während sie in *A. terreus* nicht nachweisbar ist (siehe Abb. 41, Spur 2). *A. flavus* aktiviert die ICL nach 7h Wachstum in Acetatmedium (siehe Abb. 41, Spur 3), in den Sporen ist sie in diesem Stamm nicht nachweisbar (siehe Abb. 40), was auf eine unterschiedliche Regulation des ICL-Gens in *A. fumigatus* und *A. flavus* hinweist.

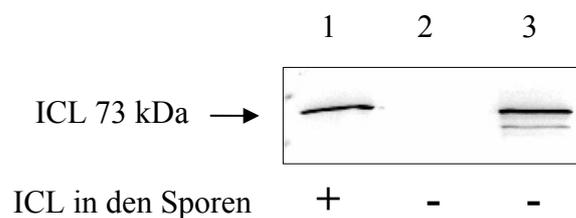


Abb. 41: Wachstum von *A. giganteus*, *A. terreus* und *A. flavus* auf Acetat. „Western Blot“-Analyse mit dem α -ICL mAk E30-F8. Die Spuren 1 bis 3 zeigen Proteine aus *A. giganteus* (Spur 1), *A. terreus* (Spur 2) und *A. flavus* (Spur 3) nach 7h Wachstum in AMM-Acetat-Medium.

21.4 Nachweis der Isocitratlyase in *Aspergillus fumigatus* nach Infektion von J774-Zellen.

Für *C. albicans* ist bereits beschrieben worden, dass der Glyoxylatzyklus notwendig für das Überleben in Makrophagen ist. Die ICL ist eines der Schlüsselenzyme dieses in den Peroxisomen ablaufenden Kreislaufs und dient der Energiegewinnung und Verwertung von C₂-Verbindungen (Lorenz & Fink, 2001).

Durch eine Infektion von murinen J774-Makrophagen mit *A. fumigatus*-Sporen sollte nachgewiesen werden, ob die ICL der Sporen unter in vivo Bedingungen exprimiert bleiben würde. Dafür wurden J774-Zellen in Zellkulturmedium mit *A. fumigatus*-Sporen beimpft. Die Sporen waren für diesen Versuch auf AMM-Agar mit Glucose angezogen worden. Nach einer stehenden Inkubation von 7h bei 37°C wurden die Zellen von der Schale abgeschabt, die Makrophagen wurden durch Zugabe von eiskaltem H₂O lysiert. Die Sporen wurden im MSK-Zellhomogenisator aufgeschlossen. Als Kontrollen wurden uninfizierte J774-Zellen und Sporen von *A. fumigatus*, die ohne J774-Zellen für 7h bei 37°C inkubiert wurden, eingesetzt. Durch eine „Western Blot“-Analyse mit einer 1:1 Mischung der mAk α -CatA und α -ICL, erfolgte der spezifische Nachweis (siehe Abb. 42, B). Wie bereits erwähnt, ist der α -CatA mAk D40-E3 ein Kontrollantikörper, um den Grad der Auskeimung feststellen zu können. In den ruhenden Sporen konnte die ICL nachgewiesen werden. Das ist ein Nachweis dafür, dass die ICL nicht nur durch Wachstum auf einem komplexen Medium wie PD-Agar sondern auch in Minimalmedium mit Glukose gebildet wird. Auf dem „Western Blot“ konnte nach einer Infektion von 7h in J774-Zellen die ICL in *A. fumigatus* nachgewiesen werden, allerdings auch das CatA (siehe Abb. 42, B Spur 3). In den J774-Zellen ohne *A. fumigatus* konnte wie erwartet weder ICL noch CatA nachgewiesen werden (siehe Abb. 42, B Spur 2). Die ausgekeimten Sporen reagierten sowohl mit dem α -CatA Antikörper als auch mit dem α -ICL (siehe Abb. 42, B Spur 4), was darauf hindeutet, dass diese Sporen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgekeimt waren.

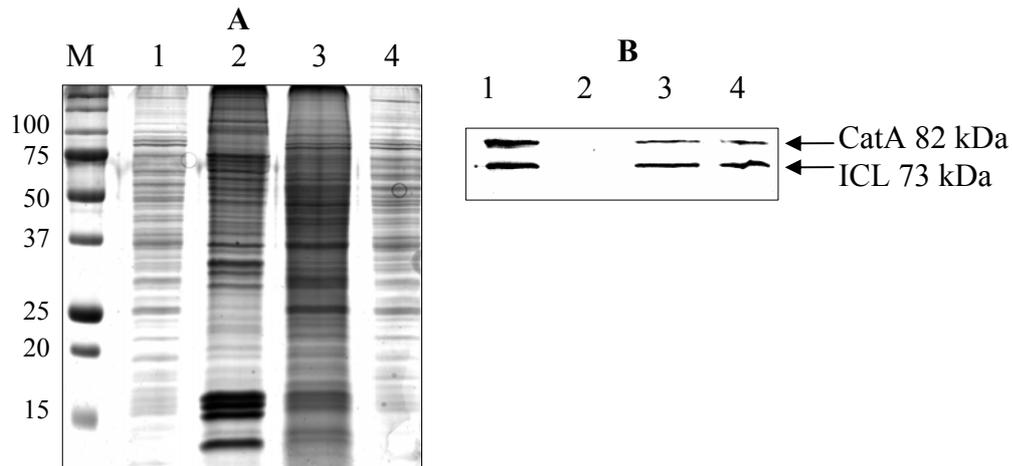


Abb. 42: Infektion von J774-Zellen mit *A. fumigatus*. In **A** ist ein 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel dargestellt, links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. **B** zeigt eine „Western Blot“-Analyse mit einer 1:1 Mischung aus den monoklonalen Antikörpern α -CatA und α -ICL. Die Spuren 1 bis 4 zeigen Proteine ruhender Sporen auf AMM-Agar gewachsen (Spur 1), J774-Zelllysat als Negativkontrolle (Spur 2), Proteine von Sporen nach einer 7h Infektion in J774-Zellen (Spur 3) und Proteine von *A. fumigatus*-Sporen nach 7h Inkubation in Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 5%-FCS Spur 4).

21.5 Nachweis der Lokalisation der ICL in der Immunfluoreszenz mit dem α -ICL mAk E30-F8

Nach Wachstum von *A. fumigatus*-Sporen in AMM mit Glukose sowie AMM mit Acetat als jeweils einziger Kohlenstoffquelle sollte mit dem α -ICL mAk E30-F8 die ICL in den Hyphen nachgewiesen werden. In Hyphen, die auf Glukose gewachsen sind, konnte die ICL nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 43 A und B), diese Daten passen gut zur erwarteten Regulation der ICL. Eine Färbung wurde lediglich in einigen auskeimenden Sporen, nicht aber in den Hyphen, nachgewiesen (siehe Abb. 43 B).

Auf Acetat gewachsenen Hyphen konnte eine deutliche Färbung der ICL mit dem mAk beobachtet werden (siehe Abb. 43 C und D). In Abb. 43 E ist deutlich zu erkennen, dass die ICL in speziellen Kompartimenten, den Glyoxysomen, lokalisiert ist. Dies ist der erste erfolgreichen Nachweis von Organellen in *A. fumigatus* durch einen spezifischen Antikörper.

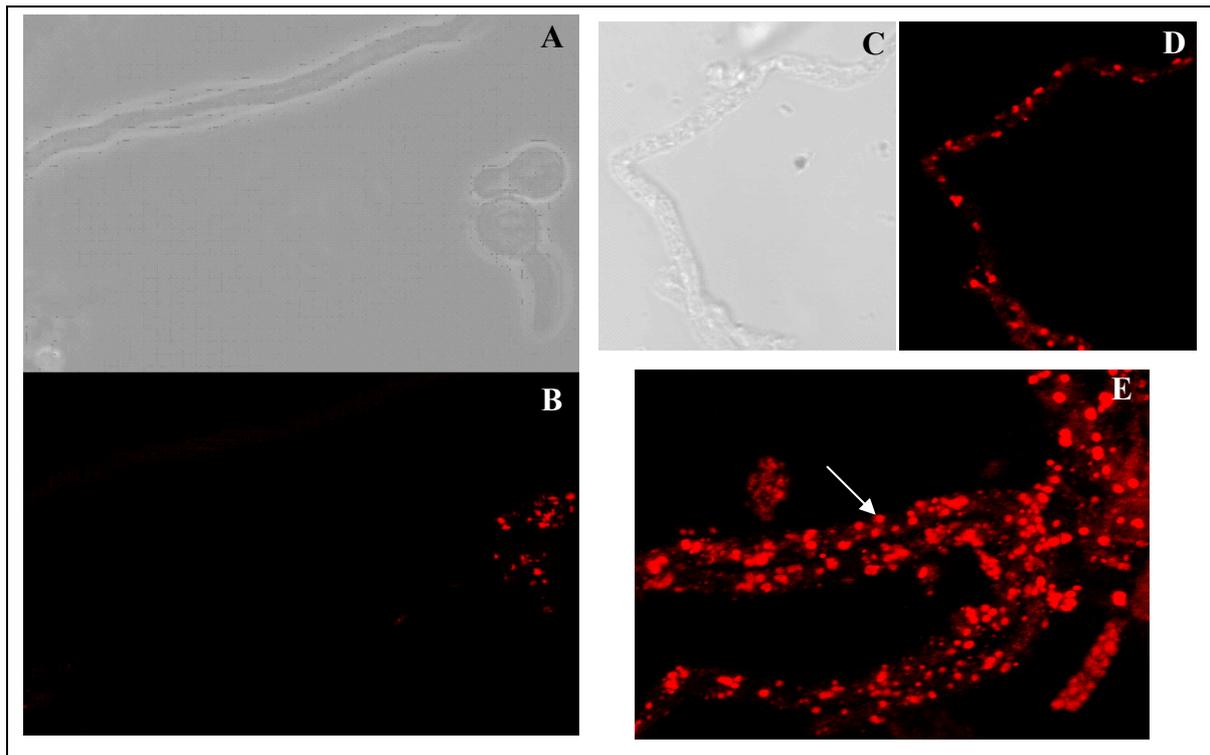


Abb. 43: Immunfluoreszenzfärbung mit dem α -ICL mAk E30-F8. A (Hellfeld) und B (Immunfluoreszenz) zeigt *A. fumigatus* Hyphen und auskeimende Sporen auf in AMM+ Glukose gewachsenen. C (Hellfeld), D und E (Immunfluoreszenz) zeigt die auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gewachsenen Hyphen. Der Pfeil markiert ein Glyoxysomen.

22 Analyse der durch *Aspergillus fumigatus* sekretierten Proteine

22.1 Nachweis von sekretierten Proteinen in verschiedenen Medien

Über die Proteinsekretion von *A. fumigatus* war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Zunächst wurden drei verschiedene Medien getestet. Unter natürlichen Umweltbedingungen stehen dem Pilz nicht alle Nährstoffe immer sofort und in üppigen Mengen zur Verfügung. Wachstum in einem Minimalmedium wie AMM könnte daher den natürlichen Bedingungen, die *A. fumigatus* in der Umwelt vorfindet, am besten entsprechen. Für diese Untersuchungen wurde das AMM nach Cove (Cove, 1966) verwendet. Des Weiteren sollte Proteinsekretion dem Vollmedium, Hefe-Glukose Medium (YG_{dial}) untersucht werden. Dieses Medium wurde vor Verwendung über Nacht mit einer Ausschlussporengröße von 6-8 kDa dialysiert, um Hefeproteine aus dem Medium zu entfernen, da diese die Ergebnisse verfälschen würden. Als drittes Medium wurde ein serumfreies Zellkulturmedium, RPMI 1640 (HEPES gepuffert), getestet.

Die Medien wurden jeweils mit einer Sporenmenge von 1×10^9 pro 50ml Medium beimpft und für 120h bei 37°C stehend inkubiert. Das gebildete Myzel wurde vorsichtig abgenommen und das Gewicht wurde nach Trocknung auf einer Waage bestimmt. Die Menge der gebildeten Biomasse war stark vom Wachstumsmedium abhängig. Die Medien AMM und YG_{dial} zeigten ein gutes Myzel-Wachstum (3,3mg und 4,4mg) während im RPMI 1640 das Wachstum des Myzels um etwa 90% geringer war (0,3mg). Die aufgetragene Proteinmenge wurde den Mengen an gebildetem Myzel angepasst. Das Medium wurde sterilfiltriert und durch eine TCA-Proteinfällung erfolgte eine tausendfache Ankonzentrierung der Proteine. Nach SDS-PAGE und einer Coomassie-Färbung der Gele fielen vor allem die Proteine p17 und p27 (siehe Abb. 44, Spur 1) im AMM auf, während im YG_{dial} Medium die p37 Proteinbande die stärkste auf dem Gel war (siehe Abb. 44, Spur 3). Im Zellkulturmedium RPMI 1640 konnte mit der gewählten Färbemethode keine Proteinsekretion nachgewiesen werden.

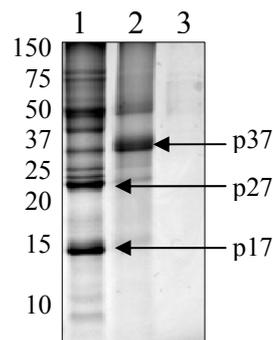


Abb. 44: Sekretierte Proteine in verschiedenen Wachstumsmedien. Coomassie-gefärbtes 15%iges SDS-Gel. Molekulargewichte sind an der linken Seite angegeben. Spuren 1-3 zeigen konzentrierte Überstandsproteine nach Wachstum in AMM (Spur1), in YG_{dial} (Spur2) und in RPMI 1640 (Spur 3). Die aufgetragene Proteinmenge entsprach jeweils 20mg des Myzeltrockengewichts.

22.2 Identifizierung von Mitogillin, einer Chitosanase und Aspergillopepsin i

Für die Proteine p17, p27 und p37 (siehe Abb. 44) wurde ein Edman-Abbau durchgeführt. Die erhaltene N-terminale Peptidsequenz für p17 war: ATW_XTXIN. Bei den Aminosäuren der Peptidsequenzen handelt es sich um den Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren. X steht für eine nicht identifizierte Aminosäure, die in diesem Fall einen Cystein (C)-Rest darstellt, der im Edman-Abbau nur sehr schlecht nachgewiesen werden kann. Die erhaltene Sequenz war identisch zu der N-terminalen Sequenz von Mitogillin (siehe Abb. 45, A). Die N-terminale Peptidsequenz für das Protein p37 lautete: SSGSAVTTPE und war identisch zu einer partiellen Sequenz des *A. fumigatus* Aspergillopepsin i (siehe Abb. 45, C). N-

terminale Signalsequenzen wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit für beide Proteine vorhergesagt. Die experimentell erhaltene Sequenz für Mitogillin entspricht exakt dem vorhergesagten N-Terminus des prozessierten Mitogillin Proteins. Während der experimentell bestimmte N-Terminus des sekretierten Aspergillopepsin i 51 Aminosäuren vom vorhergesagten Signalpeptid entfernt liegt (siehe Abb. 45, C). Das dazwischen liegende Sequenz-Element ist homolog zu putativen Propeptiden verwandter Aspergillus-Proteasen, wie Aspergillopepsin F (Acc.No.: P41748). Die Molekulargewichte der prozessierten reifen Proteine passen gut zu den Molekulargewichten, die durch die SDS-PAGE bestimmt wurden: 16,9 kDa für das p17 Protein (Mitogillin) und 34,4 kDa für das p37 Protein (Aspergillopepsin i).

Die N-terminale Sequenz für das p27 Protein lautet YNLPNNLKQIYDKHK. Durch eine Datenbanksuche in der genomischen Sequenz des *A. fumigatus* Stammes AF293 konnte ein mögliches Gen identifiziert werden, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch zu der N-terminalen Sequenz des p27 ist. Das vorhergesagte offene Leseraster zeigte hohe Homologie zu der Chitosanase CsnB aus *A. oryzae* (Acc.No.: Q8NK76) (siehe Abb. 45, B). Die Gen- und Proteinsequenz von p27 wurde letztendlich durch die Sequenzierung einer entsprechenden cDNA des *A. fumigatus*-Stammes NCTC2109 bestimmt (siehe Abb. 45, p27). Die Sequenz der 717bp großen *csn* mRNA (Acc.No.: AJ607393) zeigte, dass das *csn*-Gen aus drei Exons besteht, die durch zwei kurze Introns unterbrochen werden. Für das daraus resultierende Protein Chitosanase konnte ein Datenbankeintrag mit der Acc.No.: CAE54966 hergestellt werden. Das vorhergesagte N-terminale Signalpeptid für das entsprechende Protein passt perfekt zum experimentell bestimmten N-Terminus des p27 Proteins. Die mögliche Chitosanase hat als sekretiertes Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 23,5 kDa, was zu den experimentell erhaltenen Daten passt. Eine Aspergillus Chitosanase mit 99% Homologie zum p27 Protein wurde zwischenzeitlich auch von einer anderen Gruppe sequenziert (Acc.No.:Q875I9).

ERGEBNISSE

A	
1	TCTCGTTTGTGCAACCAATAGGAAGACATCGTCACAATTGCCCTGACTACGTCCAAG
1	
61	TCGTTGCAATCAAAAATCTTTTCTGCTGGCTGCCACAGCCGTGTCTGTTCTAGCTGCTC
20	M V A I K N L F L L A A T A V S V L A A
121	CCTCGCCCTCGACGCTCGTGGTAAGAGTCACATCGAAAGGCCCTTCGAAAGGATGACT
40	P S P L D A R A
181	GACATGACCCCTAGACCTGGACATGCATCAACCAACAGCTGAATCCCAAGACAAACAAA
60	T W T C I N Q Q L N P K T N K
241	TGGGAAGACAAGCGGCTTCTATAACAATCAAGCCAAGGCCGAAAGCAACTCCCACCAGCA
80	W E D K R L L Y N Q A K A E S N S H H A
301	CCTCTTTCCGACGGCAAGACCGGTAGCAGCTACCCGCACTGGTTCACTAACGGCTACGAC
100	P L S D G K T G S S Y P H W F T N G Y D
361	GGGAATGGCAAGCTCATCAAGGGTCGCACGCCATCAAATTCGGAAAAGCCGACTGTGAC
120	G N G K L I K G R T P I K F G K A D C D
421	CGTCCCCCGAAGCACAGCCAGAACGGCATGGGCAAGGATGACCACTACCTGCTGGAGTTC
140	R P P K H S Q N G M G K D D H Y L L E F
481	CCAACTTTTCCAGATGGCCACGACTATAAGTTTGACTCGAAGAAACCCAAGGAAGACCCG
160	P T F P D G H D Y K F D S K K P K E D P
541	GGCCAGCGAGGGTCATCTATACTTATCCCAACAAGGTGTTTTGCGGCATTGTGGCCAT
180	G P A R V I Y T Y P N K V F C G I V A H
601	CAGCGGGGAATCAGGGAGACTTGAAGCTGTGTTCTCATTAGTTATGTGGGTATTATGCC
200	O R G N O G D I R T C S H *
B	
1	ATCGTCTCTCTGAAATTCCTTACTGTTGCTCTGGTCACTGGGGCCACTGCTTATAATTTG
1	M R L S E I L T V A L V T G A T A Y N L
61	CCCAACAACCTGAAAACAGATCTACGACAAACACAAGGGAAAATGTTCCAAGATACTGGCA
21	P N N L K Q I Y D K H K G K C S K I L A
121	AAAGGGTTACCAATGGTGATGCTAGCCAAGGCAAGTCTTTTCACTGCGCCGACATC
41	K G F T N G D A S Q G K S F S Y C G D I
181	CCGGGTGCCATTTTTCATCTCCTCCTCCAAGGGGTACACCAATATGGACATTGACTGCGAC
61	P G A I F I S S S K G Y T N M D I D C D
241	GGCGCCAACAACCTCCGCCGCAAGTGCGCCAACGCCGTCCGGCCAGGGCCGACTGCC
81	G A N N S A G K C A N D P S G Q G E T A
301	TTCAAGTCCGACGTGAAGAAGTTTGGCATCTCCGACCTGGACGCCAACATCCACCCCTAT
101	F K S D V K K F G I S D L D A N I H P Y
361	GTGGTGTGTTTGGAAACGAGGACCACTCTCCCAAGTTCAAGCCCCAGTCACATGGCATGCAG
121	V V F G N E D H S P K F K P Q S H G M Q
421	CCATTGAGTGTATGGCTGTGCTGCAATGGCCAACCTGCATTACGGAATCTGGGGTGAC
141	P L S V M A V V C N G Q L H Y G I W G D
481	ACCAACGGTGGCGTTTCTACCGGTGAAGCCTCCATTTCTTTGGCCGACCTTTGCTTCCCC
161	T N G G V S T G E A S I S L A D L C F P
541	AACGAGCATCTCGATGGCAACCATGGTCACGATCCCAATGATGTCCTCTTCATTGGCTTC
181	N E H L D G N H G H D P N D V L F I G F
601	ACTAGCAAGGACGCCGTGCCTGGAGCGACTGCCAAGCGGAAGGCAAGAATGCCAAAGAA
201	T S K D A V P G A T A K R K A K N A K E
661	TTTCGAGGACAGTATCAAGTCGATTGGTGACAAAGCTGGTTGCTGGTTTGAAGCATAG
221	F F D S T K S T G D K I V A C I K A *

C MVVFSKVTAVVVGLSTIVSAVPVVQPRKGF TINQVARPVTNKKTVNLPVYANALTKYGGTVPD
 SVKAAA SSGSAVTTPEQYDSEYLTPVKVGGTTLNLDFTGSADLWVFSSELSASQSSGHAIYKP
 SANAQKLNQYTWKIQYGDSSASGDVYKDTVTVGGVTAQSQAVEAASHISSQFVQDKDNDGLLG
 LAFSSINTVSPRPQTTFFD TVKSQLDSP LFAVTLKYHAPGTYDFGYIDNSKFQGELTYTDVDS
 QGFWM TADGYGVNGAPNSNSISGIADTGTLLLLLDDSVVADYYRQVSGAKNSNQYGGYVFPCS
 TKLPSFTTVIGGYNAVVPGEYINYAPVTDGSSTCYGGIQSNSGLGFSIFGDI FLKSQYVVFDSQ
 GPERLGFAPOA

Abb. 45: Gen- und Aminosäuresequenzen der Proteine p17, p27 und p37. A zeigt die Aminosäure- und Gensequenz des Proteins p17. Die Primersequenz für die Amplifikation des *mit* Gen sind lila hervorgehoben. In B ist die Aminosäure- und Gensequenz des p27 dargestellt. Lila hervorgehoben sind die Primersequenzen für die Amplifikation des Gens. C zeigt die Aminosäuresequenz des p37, durch die grün hervorgehobene Sequenz wurde es als Aspergillopepsin i identifiziert, rote Buchstaben markieren die Signalsequenz des Proteins.

22.3 Proteinsekretion zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten

Um zu untersuchen, wann *A. fumigatus* die meisten Proteine sekretiert und den möglichen Zeitpunkt einer partiellen Zelllyse bestimmen zu können, wurde der Pilz in AMM angezogen und stehend bei 37°C inkubiert. Täglich wurde eine Kultur geerntet und die pilzliche Biomasse nach einer Lyophilisierung des Myzels bestimmt. Das Gewicht des Myzels nahm von 48h zu 72h Wachstum um 50% zu (siehe Abb. 46, Diagramm) und erreichte seinen Höhepunkt nach 96h, was den Eintritt in die stationäre Phase kennzeichnet. Vor 48h konnte keine signifikante Proteinsekretion beobachtet werden. Nach 48h konnten nach einer Coomassie-Färbung zwei Hauptbanden identifiziert werden, eine mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 27 kDa (siehe Abb. 46, Spur 1), diese beiden Proteine waren bereits als Mitogillin und Chitosanase identifiziert worden (siehe 22.2). Dieses Proteinmuster blieb konstant bis zu einem Wachstumszeitpunkt von 96 h (siehe Abb. 46, Spur 1-3). Nach 120h, dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, änderte sich das Proteinmuster, im SDS-Gel erschienen neue Proteinbanden (siehe Abb. 46, Spur 4). Um festzustellen, ob es sich bei den Proteinen um zytosolische Proteine, was auf eine partielle Zelllyse hindeuten würde, oder sekretierte Proteine handelte, wurden zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 48 kDa, (p48 Protein) und einem Molekulargewicht von 70 kDa, (p70 Protein) (siehe Abb. 46, Pfeile in Spur 4) durch „MALDI-TOF MS“ („Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight Mass Spectrometry“) identifiziert. Das p48 wurde als die Chitinase ChiB1 (Acc.No.: AA061686) identifiziert und das p70 Protein als β -(1,3)-Endoglucanase (Acc.No.: AAF13033). Eine Sequenzanalyse zeigte das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz für beide Polypeptide, was darauf hinweist, dass es sich bei den Proteinen um sekretierte Proteine handelt und nicht um

Proteine, die durch partielle Lyse freigesetzt worden waren. Das theoretische Molekulargewicht der prozessierten Polypeptide ist 45,3 kDa für ChiB1 und 77,4 kDa für die β -(1,3)-Endoglucanase, was gut zu den experimentellen Daten passt.

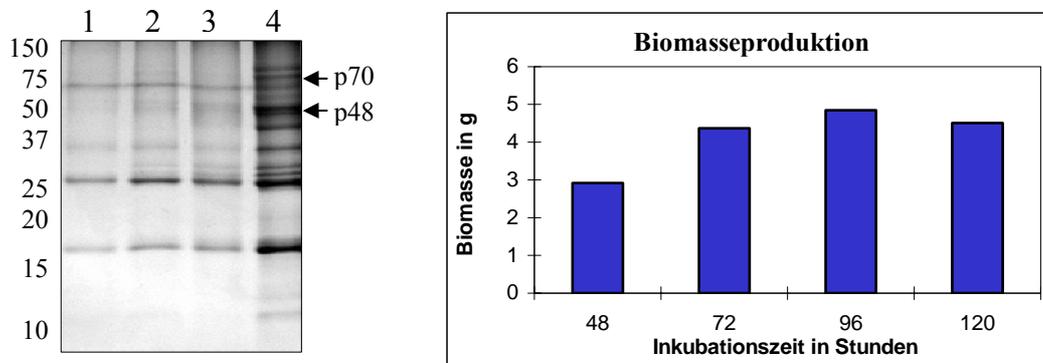


Abb. 46: Sekretierte Proteine zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten in AMM. Links ist ein 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel dargestellt. Molekulargewichte sind in kDa an der linken Seite angegeben. Spuren 1-4 zeigen konzentrierte Überstandsproteine in AMM gewachsen und zu den Zeitpunkten 48h (Spur 1), 72h (Spur 2), 96h (Spur 2) und 120h (Spur 4) geerntet. Im Diagramm ist das Trockengewicht des Myzels zum jeweiligen Wachstumszeitpunkt dargestellt. Die aufgetragene Proteinmenge entsprach 20mg des Myzeltrockengewichts.

22.4 Nachweis von sekretierten Proteinen in verschiedenen Aspergillus-Spezies

Die Untersuchung der Proteinsekretion von *A. fumigatus* führte zu der Frage, wie sich andere Aspergillus-Spezies unter denselben Wachstumsbedingungen verhalten würden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden sechs repräsentative Aspergillus-Stämme untersucht: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. giganteus*, *A. nidulans*, *A. niger*, und *A. terreus*. Die Pilze wurden unter denselben Bedingungen kultiviert, d.h. in AMM bei 37°C für 120h stehend inkubiert. Die Myzelbildung war bei allen Aspergillus-Stämme vergleichbar. Das Medium wurde mit TCA gefällt, um eine 1000fache Anreicherung der Proteine zu erhalten. Die auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen entsprachen jeweils 20mg des Myzeltrockengewichts pro Spur. Sekretierte Proteine in signifikanten Mengen wurden nur in den Kulturüberständen von *A. giganteus*, *A. fumigatus* und *A. flavus* (siehe Abb. 47, Spuren 1, 4 und 6) nachgewiesen, während für *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* (siehe Abb. 47 Spuren 2, 3 und 5) unter den gewählten Bedingungen keine Proteinsekretion nachweisbar war. Auffallend war die Ähnlichkeit der Proteinmuster in *A. fumigatus* und *A. giganteus*, die sich wiederum deutlich vom Proteinmuster von *A. flavus* unterschieden. *A. giganteus* besitzt ein Toxin, das Gigantin, das wie das Mitogillin eine Größe von 17 kDa

aufweist. In der Abbildung unten ist ein *A. fumigatus*-Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa deutlich zu erkennen. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei diesem Protein um das Gigantin handelt. Das Protein wurde aus dem Gel ausgestochen und eine MALDI-Analyse wurde durchgeführt. Aufgrund der Massenwerte konnte anschließend ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Protein um Gigantin handelt.

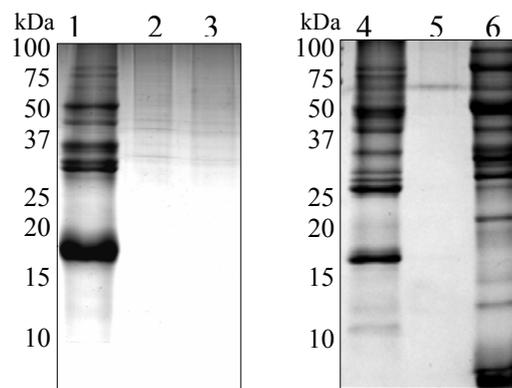


Abb. 47: Proteinsekretion unterschiedlicher Aspergillus-Spezies. 15%ige Coomassie-gefärbte SDS-Gele. Links sind die Molekulargewichte in kDa dargestellt. Spuren 1-6 zeigen konzentrierte Überstandsproteine nach einem Wachstum von 120h bei 37°C der Aspergillus-Spezies: *A. giganteus* (Spur 1), *A. niger* (Spur 2), *A. terreus* (Spur 3), *A. fumigatus* (Spur 4), *A. nidulans* (Spur 5) und *A. flavus* (Spur 6). Die aufgetragene Proteinmenge entsprach 20mg des Myzeltrockengewichts.

22.5 Mischung RPMI und AMM

Das AMM stellte sich als das geeignete Medium zur Untersuchung der Proteinsekretion dar, während im RPMI 1640-Medium unter den gewählten Bedingungen keine nachweisbare Sekretion von Proteinen stattfand. Daher sollte das RPMI 1640-Medium schrittweise mit AMM supplementiert werden, um einen Anhaltspunkt zu erhalten, ab welcher Konzentration an AMM eine Proteinsekretion stattfindet. Die Medien wurden in folgenden Verhältnissen gemischt: 100% AMM, Mischung 50% AMM mit 50% RPMI 1640-Medium, Mischung 25% AMM mit 75% RPMI 1640 und 100% RPMI 1640. Das Beimpfen erfolgte mit einer Sporenzahl von 1×10^9 Sporen pro 50ml Medium und die Inkubation erfolgte stehend bei 37°C für 120h. Die aufgetragene Proteinmenge entsprach den sekretierten Proteinen von 20mg des Myzeltrockengewichts. Die gebildete Myzelmenge änderte sich durch ein Mischen der Medien kaum, bei Wachstum in RPMI 1640-Medium nahm die Myzelbildung jedoch deutlich ab. Die Proteinsekretion nahm durch das Mischen der Medien geringfügig ab (siehe Abb. 48, Spuren 1-3), nur beim

Einsatz des reinen RPMI 1640-Mediums konnte unter den gewählten Bedingungen wiederum keine Proteinsekretion nachgewiesen werden (Abb. 48, Spur 4).

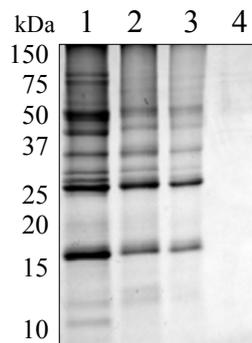


Abb. 48: Durch Mischung von AMM und RPMI 1640-Medium kommt es zu einer Abnahme der Proteinsekretion. 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, Molekulargewichte sind an der linken Seite in kDa angegeben. Spuren 1-4 zeigen konzentrierte Proteine von *A. fumigatus* nach 120h Wachstum bei 37°C in AMM (Spur 1), einer Mischung aus 50% AMM mit 50% RPMI 1640-Medium (Spur 2), einer Mischung aus 25% AMM mit 75% RPMI 1640-Medium (Spur 3) und RPMI 1640-Medium (Spur 4). Die aufgetragene Proteinmenge entsprach 20mg des Myzeltrockengewichts.

22.6 Antikörper gegen Chitosanase und Mitogillin

Die Untersuchung von sekretierten Proteinen könnte in Hinblick auf diagnostische Hilfsmittel zur Identifizierung einer Aspergillus-Infektion von großer Bedeutung sein. Aus diesem Grund wurden Antikörper gegen die zwei Hauptproteine hergestellt. Als erster Schritt wurden dafür das Mitogillin und die Chitosanase (Csn) als rekombinante Histidin-gekoppelte Proteine (His₆-Proteine) hergestellt und gereinigt (Primersequenzen siehe Abb. 45 A und B, lila hervorgehobene Nukleotidsequenzen). Für das Mitogillin, eines der Hauptallergene von *A. fumigatus*, konnte bereits ein reaktiver Antikörper durch ein „ELISA-Screening“ aus der Antikörperbank identifiziert werden (siehe Punkt Antikörperbank). Durch die Subklonierung des Hybridoms B203 wurde der monoklonale Antikörper B203-G9 sowohl im „ELISA“ als auch im „Western Blot“ als α -Mitogillin Antikörper für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Für die Herstellung des α -Csn Antikörper wurden Mäuse mit dem His₆-Chitosanase-Protein immunisiert. Durch Zellfusion wurden Hybridomzellen, welche die Antikörper gegen die Chitosanase produzieren, erhalten. Durch „Western Blot“-Analyse erfolgte die Durchmusterung der Hybridome. Mehrere reagierende Antikörper wurden erhalten. Das Hybridom B45 wurde kloniert und für weitere Versuche als α -Csn eingesetzt.

22.7 Nachweis von Mitogillin und Chitosanase im Überstand durch monoklonale Antikörper

Nach der Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen die Chitosanase und das Mitogillin sollten die löslichen Proteine aus den ruhenden Sporen, den auskeimenden Sporen und des Myzels untersucht werden. Durch die Antikörper sollte es möglich sein auch geringe Mengen der Proteine in den Germinationsstadien nachzuweisen. Auf die Gele wurden Proteine aus den Sporen, den auskeimenden Sporen, dem Myzel und sekretierte Proteine aufgetragen (siehe Abb. 49, A und B, Spuren 3, 4, 5 und 1). Als Kontrolle diente entweder das His₆-Mitogillin (siehe Abb. 49, C Spur 2) oder die His₆-Chitosanase (siehe Abb. 49, A Spur 2). Für den Nachweis wurde eine „Western Blot“-Analyse mit dem α -Mitogillin Antikörper und dem α -Csn Antikörper durchgeführt (siehe Abb. 49, B und D). Die His₆-Chitosanase (siehe Abb. 49, B Spur 1) und die Chitosanase aus den Überstandsproteinen (siehe Abb. 49, B Spur 5) wurde vom Antikörper erkannt. Weder in den Sporen, den auskeimenden Sporen noch im Myzel (siehe Abb. 49, B Spur 4, 3 und 2) konnte das Protein durch den α -Csn Antikörper detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Mitogillin erzielt, His₆-Mitogillin und das Mitogillin aus den sekretierten Proteinen wurden detektiert (siehe Abb. 49, D 1 und 2), während in den Proteinextrakten der einzelnen Germinationsstadien kein Mitogillin nachweisbar war (siehe Abb. 49, D 2, 3 und 4).

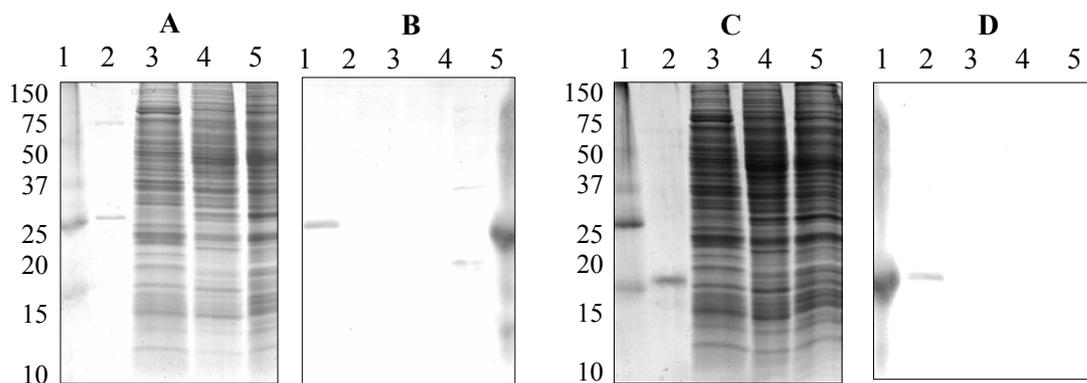


Abb. 49: Nachweis von Chitosanase und Mitogillin durch monoklonale Antikörper in den verschiedenen Germinationsstadien und den sekretierten Proteinen. 15%ige SDS-Gele, A und C Coomassie-gefärbt, B und D immungefärbt. Molekulargewichte sind links in kDa angegeben. Die Spuren 1-6 in den Coomassie-gefärbten Gelen A und C zeigen sekretierte Proteine (Spur 1), His₆-Chitosanase (Gel A, Spur 2), His₆-Mitogillin (Gel C, Spur 2), Sporenprotein (Spur 3), Protein der auskeimenden Sporen (Spur 4) und Protein des Hyphen (Spur 5). Die Immunblots wurden mit den Antikörpern α -Csn (Blot B) und α -Mitogillin (Blot D) angefärbt. Die Spuren 1-5 zeigen His₆-Chitosanase (Blot B, Spur 1), His₆-Mitogillin (Blot D, Spur 2), Protein aus den Sporen (Blot B, Spur 2; Blot D Spur 3), Protein der auskeimenden Sporen (Blot B, Spur 3; Blot D Spur 4), Protein aus den Hyphen (Blot B, Spur 4; Blot D Spur 5) und sekretierte Proteine (Blot B, Spur 5; Blot D Spur 1).

22.8 Detektion von Antikörpern in verschiedenen Patientenseren.

Es konnte gezeigt werden, dass Mitogillin und Chitosanase gemeinsam unter in vitro Bedingungen sekretiert werden. Für Mitogillin ist bekannt, dass es in Patienten während einer Infektion exprimiert wird (Haynes *et al.*, 1990; Haynes *et al.*, 1992). Nun sollte untersucht werden, ob die Chitosanase ähnlich wie das Mitogillin (Haynes *et al.*, 1990), durch Seren von Patienten, die an einer Aspergillus-Infektion erkrankt sind, erkannt wird. Dazu wurden zunächst sekretierte Proteine von *A. fumigatus* über eine SDS-PAGE aufgetrennt, nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Ponceau-Färbelösung angefärbt und die entsprechenden Proteinbanden markiert. Durch die „Western Blot“-Analyse wurde die Reaktivität von Patientenseren mit den sekretierten Proteinen getestet. Die getesteten Seren stammten von einem Patienten der an einer invasiven Aspergillose erkrankt ist (siehe Abb. 50, A) und einem Patienten, der an einem Aspergillom litt (siehe Abb. 50, B). Beide Seren erkannten Banden auf der Höhe der Chitosanase und des Mitogillin.

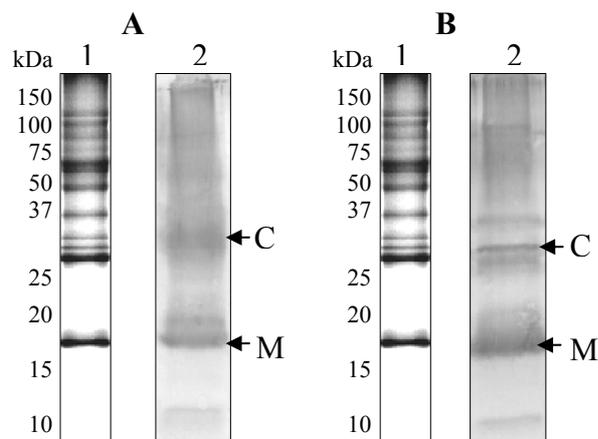


Abb. 50: Seren von Patienten mit invasiver Aspergillose bzw. Aspergillom reagieren mit sekretierten Proteinen. 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (A Spur 1 und B Spur 1) bzw. Immunblot (A Spur 2 und B Spur 2). Molekulargewichte sind an der linken Seite in kDa angegeben. Die Pfeile zeigen die Chitosanase (C) bzw. das Mitogillin (M), die nach einer Ponceau-Färbung markiert worden sind. Die Spuren A1 und B1 zeigen jeweils sekretierte Proteine, A2 und B2 zeigen die entsprechenden Immunblots. A2 wurde mit dem Serum eines Patienten mit invasiver Aspergillose angefärbt, B2 mit dem Serum eines Patienten mit einem Aspergillom.

Um eine bessere Aussage über die Reaktivität der Patientenseren treffen zu können, wurden sowohl das Mitogillin als auch die Chitosanase als His₆-Proteine exprimiert und gereinigt. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe einer „Western Blot“-Analyse wurde die Reaktivität von Patientenseren mit den rekombinanten

Proteinen getestet (siehe Abb. 51, B). In Abb. 51 wurde in den Spuren A-F mit Seren von Aspergillom-Patienten getestet und in den Spuren G-K mit Seren von Patienten mit einer invasiven Aspergillose. Wie erwartet, erkannten die Seren aller Patienten das rekombinante Mitogillin (Daten nicht gezeigt). Die rekombinante Chitosanase wurde ebenfalls von allen Seren erkannt. Kontrollseren (Abb. 51, Spuren L und M) von gesunden Individuen erkannten die rekombinanten Proteine nicht.

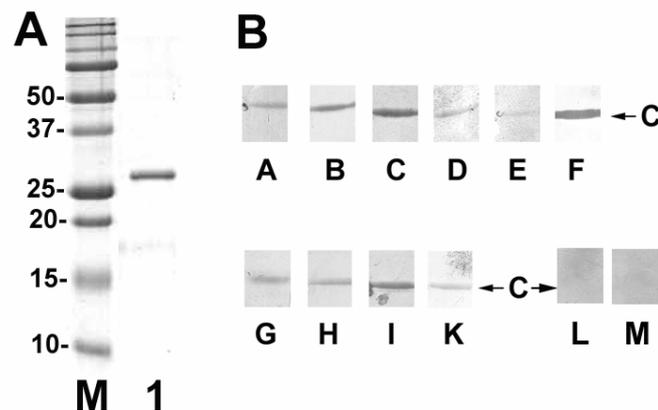


Abb. 51: Detektion von Antikörpern gegen Chitosanase in Patientenseren. A Spur 1 ist gereinigte His-gekoppelte Chitosanase gezeigt nach Coomassie-Färbung. Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. In B sind die Reaktivitäten der Seren von Patienten, die an einem Aspergillom leiden dargestellt (Spuren A bis F) weiters die Reaktivität der Seren von Patienten, die an einer invasiven Aspergillose leiden (Spuren G bis K). L und M zeigen die Reaktivität von Seren gesunder Personen.

22.9 Auswirkung von sekretierten Proteinen auf das Überleben von A549-Zellen und Vero-Zellen

Die Anwesenheit von Antikörpern in humanen Patientenseren zeigt an, dass Mitogillin und Chitosanase während einer Infektion exprimiert werden. Ein pathogenes Potential für die Chitosanase im Menschen scheint unwahrscheinlich (siehe Diskussion). Das zur Ribotoxin-Familie gehörende Mitogillin ist dagegen ein wirkungsvoller Inhibitor der eukaryontischen Proteinbiosynthese, dies konnte in Experimenten mit Zell-freien Extrakten gezeigt werden (Fando *et al.*, 1985). Aus diesem Grund könnte das Mitogillin aus *A. fumigatus* einen Virulenzfaktor darstellen. Da das Mitogillin vor allem im AMM sekretiert wurde, wurde dieses Medium mit Überstandsproteinen von *A. fumigatus* für einen Zytotoxizitätstest (MTT-Test) mit der humanen Lungeneithelzelllinie A549- und an Vero-Zellen verwendet. Vero-Zellen wurden häufig für Studien herangezogen, um bakterielle Cytotoxine nachzuweisen. In diesem Versuch wurden die Zellen für 16h

entweder mit RPMI 1640-Zellkulturmedium (mit oder ohne 5% fötalem Kälberserum versetzt), einer 50%-50% Mischung aus RPMI und AMM (als Kontrolle) oder einer Mischung aus RPMI 1640 und AMM mit Überstandsproteinen nach 96h Wachstum von *A. fumigatus* inkubiert.

Im MTT-Test wird die Reduktion des Tetrazoliums Salzes MTT zu einem Formazan gemessen. Diese Reaktion erfolgt durch das Succinatdehydrogenase-System der Atmungskette und ermöglicht so die quantitative Erfassung der stoffwechselaktiven Zellen. In unserem Experiment konnte keine hemmende oder gar abtötende Wirkung des Aspergillus-Überstandes auf die Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 52).

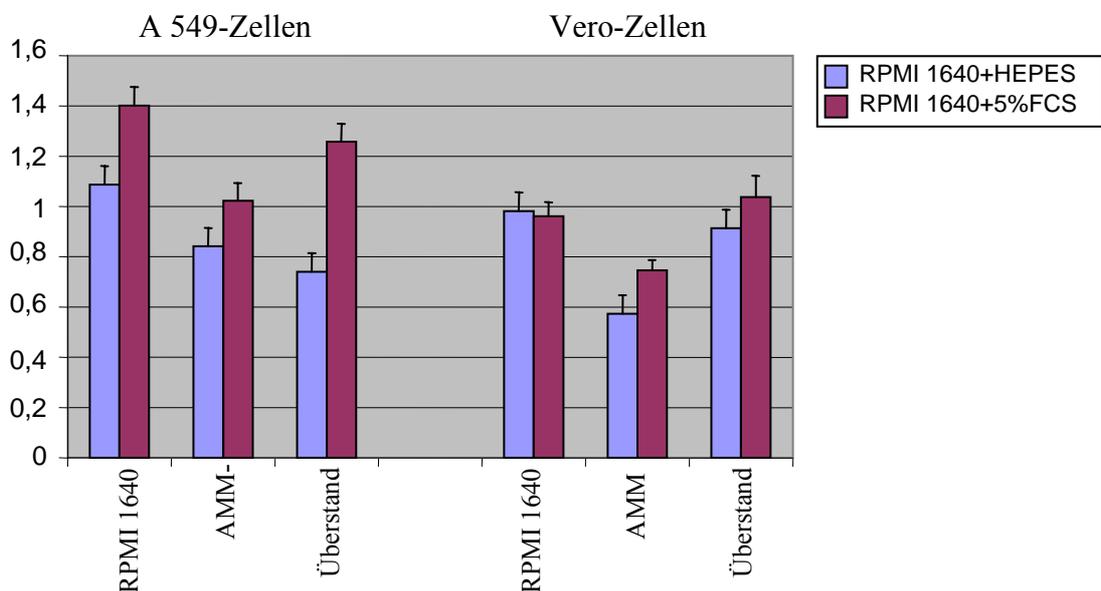


Abb. 52: Auswirkungen von *A. fumigatus*-konditioniertem AMM-Medium auf eukaryontische Zellen. Die humane Lungenepithelzelllinie A549- und Vero-Zellen wurden mit RPMI 1640-Zellkulturmedium mit oder ohne 5% fötalem Kälberserum (blaue bzw. rote Balken) inkubiert. Mischungen für die Inkubation waren: 50% RPMI 1640-Zellkulturmedium mit oder ohne 5% fötalem Kälberserum mit 50% Zellkulturmedium (RPMI 1640 als Kontrolle), 50% RPMI 1640-Zellkulturmedium mit oder ohne 5% fötalem Kälberserum mit 50% AMM-Medium und 50% RPMI 1640-Zellkulturmedium mit oder ohne 5% fötalem Kälberserum mit 50% *A. fumigatus* konditioniertem AMM-Medium. Nach 16h Inkubation bei 37°C wurde die Zellaktivität mit einem MTT-Test bei einer OD₅₅₀ gemessen.

DISKUSSION

A. fumigatus ist der häufigste Erreger meist tödlich verlaufender invasiver Schimmelpilzmykosen bei stark immunsupprimierten Patienten, aber auch ein häufiger Mitverursacher von allergisch-asthmatischen Erkrankungen. Invasive Aspergillosen treten in immunkompetenten Personen so gut wie nicht auf und so ist die Definition klassischer Virulenzfaktoren ein schwieriges Unterfangen. Tatsächlich liegen kaum Kenntnisse über Pathogenitätsfaktoren vor. Jean-Paul Latge (Institut Pasteur, Paris) setzte voraus, dass mindestens drei Bedingungen erfüllt sein müssen, um den durch die Luft übertragenen saprophytär lebenden Schimmelpilz *A. fumigatus* in einen invasiven pathogenen Organismus zu „verwandeln“: (i) die Wirtsabwehr muss geschwächt sein, (ii) eine Auskeimung von ruhenden Konidien in den alveolaren Makrophagen muss stattfinden, und (iii) pilzliche Enzyme und Toxine müssen während der Penetration in das Lungenparenchym sekretiert werden (Weig *et al.*, 2001b).

Die Eintrittspforte von *A. fumigatus* in den Menschen ist der Respirationstrakt. Inhalierter Aspergillus-Konidien können in der Lunge vermutlich über einen längeren Zeitraum in Makrophagen persistieren (Paris *et al.*, 1997). Mit deren Hilfe werden die Konidien wahrscheinlich durch das Bronchialepithel in das tiefere Gewebe, Lymphknoten und Blutgefäße transportiert. Die Auskeimung der Konidien gilt als erster und entscheidender Schritt einer invasiven Aspergillose. Die Bedingungen und Mechanismen dieses Vorganges sind bisher jedoch kaum untersucht. Die wenigen Erkenntnisse beschreiben die Auskeimung als einen Vorgang, der in mehreren Schritten abläuft. Zuerst kommt es zu einer Aktivierung der ruhenden Sporen. Hierbei reagieren die ruhenden Sporen auf vorhandene Umweltfaktoren: Wasser, Sauerstoff, Kohlenhydrate, anorganische Salze und niedermolekulare Nährstoffe wie Aminosäuren sind dabei Voraussetzung. Nach dem Aktivierungsschritt kommt es zu einem isotropen Wachstum. Dabei schwellen die Konidien durch Wasseraufnahme bis auf das Dreifache ihrer ursprünglichen Größe an und werfen ihre Schutzhüllschicht ab (Rohde *et al.*, 2002). Schließlich kommt es zu einem polarisiertem Wachstum, bei dem an einer bestimmten Stelle der angeschwollenen Konidie ein Keimschlauch erscheint (d'Enfert & Fontaine, 1997), der zu einer Hyphe auswächst und mit den Hyphen anderer Konidien das Myzel bildet.

Ziel der Versuche dieser Arbeit war es, zu einem besseren Verständnis des Germinationsvorganges der Konidien von *A. fumigatus* beizutragen. Dafür wurden die

Germinationsstadien der ruhenden Sporen (SP), der auskeimenden Sporen (AS) und der Myzel-Hyphen (MY) mit verschiedenen Methoden untersucht. Die morphologischen Unterschiede wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen analysiert. Viele Mikroorganismen sekretieren unterschiedliche Enzyme, die eine Bedeutung bei der Pathogenese haben können. Da über die Sekretion von Proteinen durch *A. fumigatus* bisher kaum etwas bekannt war, wurde sie näher untersucht. Mit Hilfe der hochauflösenden 2D-Gel-Elektrophorese und der eindimensionalen Gelelektrophorese wurden Markerproteine der Germination identifiziert. Einige besonders interessante Proteine wurden näher untersucht, hierfür wurden monoklonale Antikörper hergestellt.

23 Morphologische Veränderungen während der Auskeimung von *Aspergillus fumigatus*

Wie bereits erwähnt, ist die Auskeimung der ruhenden Konidien ein zentraler Schritt im Lebenszyklus von *A. fumigatus* und ein kritischer Vorgang bei der Infektion der menschlichen Lunge. Ein besseres Verständnis des Mechanismus und der Signaltransduktionskaskaden, die während der Germination aktiviert werden, könnte neue therapeutische Möglichkeiten schaffen. Bis jetzt sind die biologischen Aspekte der Auskeimung kaum verstanden. Wenig ist über die Signalmoleküle, die diesen Prozess regulieren, und ihren Einfluss auf die Proteinexpression bekannt. Oberflächenmarker, die helfen würden, bestimmte Schritte der Germination zu erkennen, fehlen ganz. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in dieser Arbeit Konidien zu verschiedenen Zeitpunkten der Germination untersucht. Dadurch war es möglich, spezifische morphologische Marker für den Differenzierungsprozess der Konidienkeimung zu identifizieren.

Hydrophobine bedecken die Oberfläche vieler asexueller Sporen und stellen daher in Pilzen wichtige Strukturproteine dar (Asgeirsdottir *et al.*, 1997). Durch die Schicht hydrophober Oberflächenproteine zeigen ruhende Konidien eine echinulate Oberflächenmorphologie mit einer verflochtenen fibrillären Struktur. Ähnliche hydrophobe Proteine bilden zudem eine wasserabweisende Schicht in Lufthyphen mancher Pilze, wodurch diese - wie auch die Konidien - nur schwer mit Wasser durchnässt werden können. Durch diese hydrophobe Schicht gelingt es den Hyphen vieler Pilze, vom wässrigen Milieu aus in die Luft zu wachsen und Konidiophoren für die Vermehrung zu bilden. Die von den Phialiden abgeschnürten Konidien können sich dann wieder über den

Luftweg ausbreiten. Diese Eigenschaft, die Luftbewegungen zur eigenen Verbreitung zu nutzen, trägt dazu bei, dass jeder Mensch täglich einige hundert Sporen einatmet. In der Hülle der ruhenden Sporen von *A. fumigatus* konnten bis jetzt zwei Hydrophobine nachgewiesen werden, RodA und RodB wobei nur RodA eine essentielle Komponente der Hülle ist (Paris *et al.*, 2003a). Durch die 2D-PAGE Analyse konnte in dieser Arbeit eine differentielle Expression von RodA in den ruhenden Sporen bestätigt werden. Die Hydrophobizität dieser fibrillären Schicht an der Oberfläche könnte den Konidien auch Schutz vor antimikrobiellen Substanzen sowie vor Adhäsion an und Aufnahme durch Abwehrzellen bieten (Ebbole, 1997). Während des Germinationsprozesses wird diese Oberflächenschicht abgeworfen (Tronchin *et al.*, 1995), was zu einer glatten Oberfläche führt (Thau *et al.*, 1994; Jahn *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998). Eine ähnliche Oberflächenbeschaffenheit wurde auch für eine weiße *A. fumigatus*-Mutante beschrieben, die nicht in der Lage ist, Melanine zu bilden (Brakhage *et al.*, 1999). Interessanterweise zeigten die Konidien dieser Mutante im Mausmodell eine verminderte Virulenz, was darauf hindeutet, dass die hydrophobe Schicht eine wichtige Rolle im Infektionsprozess von *A. fumigatus* spielt. Bei dem Aspergillus-Stamm ATCC 46645, der in dieser Arbeit verwendet wurde, konnten angeschwollene Konidien mit abgeworfener hydrophober Hüllschicht beobachtet werden. Aber auch nicht angeschwollene Konidien ohne hydrophobe Hüllschicht, die damit ihre echinulate Morphologie verloren hatten. Diese Zellen wiesen große Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp der oben beschriebenen glatten Mutante auf, denen die essentiellen Komponenten der fibrillären Oberfläche fehlen (Thau *et al.*, 1994; Jahn *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass ruhende Konidien bei der Auskeimung die hydrophobe Schicht abwerfen müssen, um den Prozess der Auskeimung vollziehen zu können. Dieses Ereignis ist die erste große morphologische Veränderung, die während der Auskeimung von *A. fumigatus*-Konidien stattfindet. Da die hochgradig organisierte und hydrophobe Hülle mit Sicherheit ein Hindernis für diesen Prozess darstellt, findet wohl ein aktiver Abwurf dieser Schicht statt (Rohde *et al.*, 2002). Für die geschwollene Konidie des *A. fumigatus*-Stammes ATCC 46645 wurde ein Umfang von 4-6µm ermittelt, was dem 1,5- 3fachen des Umfangs einer ruhenden Konidie entspricht. Die stark eingefaltete Oberfläche der auskeimenden Konidien verlieh ihnen ein „gehirnartiges“ Aussehen. Durch die schonende Kryo-Fixation und die anschließende Untersuchung in einem Kryo-Elektronenmikroskop konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Oberflächenstruktur um ein Artefakt des Fixierungsprozesses handelt

(Rohde *et al.*, 2002). Auch diese Aufnahmen zeigten die klar unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten: das „gehirnartige“ Aussehen auskeimender Konidien und die glatte Morphologie ruhender Konidien, ohne hydrophobe Hüllschicht.

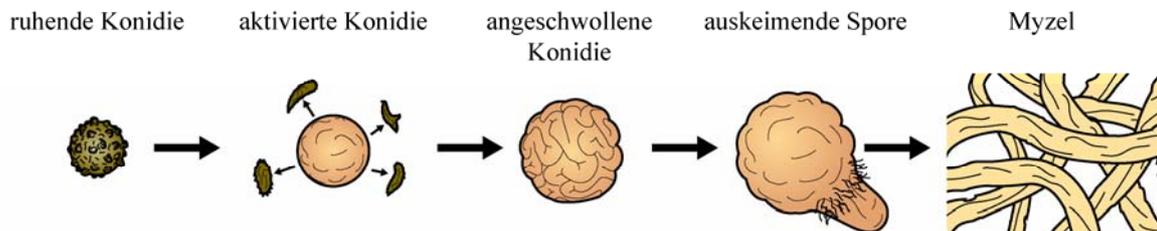


Abb. 53: Modell des Auskeimungsvorganges

Die wohl bemerkenswertesten Strukturen, die durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden wurden, waren Oberflächenfortsätze an jungen Keimschläuchen. Interessanterweise beschränken sie sich auf einen Bereich von 2-7 μ m am beginnenden Keimschlauch. Die Länge dieser Fortsätze beträgt ca. 1 μ m und der Durchmesser ca. 30nm. Da sich diese Fortsätze bei direktem Kontakt mit der Oberfläche des Glaträgers an diesen anheften, könnten diese Fortsätze an Adhäsionsprozessen beteiligt sein. Eine auskeimende Konidie könnte sich dadurch selbst an einer festen Oberfläche fixieren, also eine Art Anker für den Keimschlauch darstellen, der die Konidie in einer auskeimungsfreundlichen Umgebung festhält. Diese klare Begrenzung der Oberflächenfortsätze ist vermutlich auf eine strenge Regulation zurückzuführen.

24 Proteomanalyse von *Aspergillus fumigatus* während der Auskeimung

Auf morphologischer Ebene wurden in dieser Arbeit für jede Phase der Auskeimung (SP, AS und MY) charakteristische Merkmale identifiziert (siehe auch Abb. 53): Die ruhende Spore ist von einer hydrophoben Zellhülle umgeben, welche abgeworfen wird. Durch Anschwellen und Keimschlauchbildung entsteht die auskeimende Spore. Der Keimschlauch verlängert sich zur Hyphe und bildet mit den Hyphen anderer Sporen das Myzel. Auf molekularer Ebene ist über den Prozess der Auskeimung jedoch sehr wenig bekannt. Sicher ist, dass die Auskeimung ein Vorgang ist, der unter der Kontrolle einer Reihe von Rezeptoren steht. Diese erkennen verschiedene Signale an der Zelloberfläche und leiten sie über Signaltransduktionskaskaden von der Zellmembran in den Zellkern. Durch die Expression entsprechender Genprodukte können die Konidien dann auf die

veränderten Umweltbedingungen reagieren (Oshero & May, 2001). Ziel dieser Arbeit war es, durch die Untersuchung des Proteoms (Gesamtheit aller Proteine eines Organismus) der unterschiedlichen Auskeimungsphasen von *A. fumigatus* ein klareres Bild des Germinationsprozesses auf der Ebene der Proteinexpression zu zeichnen. Dafür wurden die Proteinmuster der verschiedenen Auskeimungsstadien SP, AS und MY nach 1D und 2D SDS-PAGE Analyse verglichen. Die erste große Hürde für dieses Vorhaben und vor allem für eine erfolgreiche 2D-PAGE stellte dabei die Probenvorbereitung dar.

24.1.1 Etablierung einer Methode zur Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese

Das System der 2D-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (2D-PAGE) stellt einen methodischen Ansatz dar, das Proteom von verschiedenen Organismen und Geweben zu untersuchen (Wilkins *et al.*, 1998; Laemmli, 1970; O'Farrell, 1975). Dabei können die Untersuchungen nach verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt werden: Verschiedene Wachstums- oder Differenzierungsstadien eines Organismus können untersucht werden, Vergleiche verschiedener Wachstumsbedingungen (z.B. verschiedene Medien und Temperaturen) können durchgeführt werden, eingefügte Mutationen können untereinander und mit dem Wildtyporganismus verglichen werden und vieles mehr. In dieser Arbeit wurde die Methode der 2D-Elektrophorese zur Untersuchung der verschiedenen Germinationsstadien eingesetzt. Wie bereits erwähnt, laufen während der Germination eine Reihe morphologischer Veränderungen im Pilz ab, die von ruhenden Konidien, die von einer hydrophoben Hüllschicht umgeben sind, zu den Hyphen des Myzels führen. Ein Problem, das sich bei jeder Untersuchung eines Organismus mit Hilfe der 2D-PAGE ergibt, ist die Probenvorbereitung. Leider gibt es keine Methode die universell für jeden Organismus und jedes Gewebe anwendbar wäre. Für *A. fumigatus* gab es zu Beginn dieser Arbeit keine etablierte Methode zur Bearbeitung der Proben, die für die 2D-PAGE geeignet gewesen wäre. Es existierte lediglich eine Veröffentlichung, die sich mit der Proteom-Analyse von *A. fumigatus* beschäftigt hatte. In dieser Arbeit wurde die Zellwand des Myzels untersucht. Die Untersuchung sollte Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine identifizieren. Dafür musste die Zellwand verdaut werden, um Proteine freizusetzen (Bruneau *et al.*, 2001). Diese Methode war nicht für die Fragestellung dieser Arbeit geeignet. Deshalb musste zunächst in zeitaufwändigen Vorarbeiten eine Methode etabliert werden, die für *A. fumigatus* anwendbar war und den Ansprüchen der 2D-PAGE

gerecht wurde. Aufgrund der morphologischen Veränderungen, die der Pilz während der Germination durchläuft, stellte die Wahl einer einheitlichen Aufschlussmethode ein großes Problem dar. Verschiedene Aufschlussmethoden wurden überprüft, die meisten erwiesen sich als ungünstig, vor allem das Myzel bereitete große Schwierigkeiten. Es konnte weder in der Retsch-Kugelmühle noch in der French-Press effizient aufgeschlossen werden, da zum einen das Volumen des Aufschlussgefäßes der Kugelmühle zu gering war, und zum anderen das Myzel das Abfließen der Proteinlösung aus der French-Press verhinderte. Letzteres führte zudem zu einer Probenerwärmung mit daraus resultierender Proteindegradation. Die mechanische Bearbeitung im Mörser bot die Möglichkeit, unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff alle drei Stadien aufzuschließen. Dies verhinderte zwar die Degradation, jedoch war die Proteinausbeute gering und trotz des Einsatzes gleicher Mengen an Material von Aufschluss zu Aufschluss unterschiedlich. Der Aufschluss im MSK-Zellhomogenisator, in dem die Probe unter ständiger Kühlung und mit Glasperlen aufgeschlossen wird, stellte sich schließlich als die geeignetste Methode heraus. Degradation der Proteine konnte verhindert werden und die Proteinausbeute sowie die erhaltenen Proteinmuster waren zwischen verschiedenen Aufschlüssen vergleichbar.

25 Identifizierung von Proteinen, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden.

Aufgrund dieser Vorarbeiten konnten schließlich die aus der 2D-PAGE resultierenden Proteinmuster auf den Gelen verglichen werden und differentiell exprimierte Proteine mit verschiedenen Analysemethoden identifiziert werden. Es war nicht möglich Standardmethoden zur Proteinidentifizierung problemlos einzusetzen, da das Genom von *A. fumigatus* nicht vollständig annotiert ist. Dadurch wird die Zuordnung von Peptidsequenzen zu einem Protein schwierig. Um ein besseres Verständnis der Pathogenität von *A. fumigatus* zu erhalten, wurde 1998 eine internationale Vereinigung gegründet, welche die Sequenzierung des kompletten Genoms von *A. fumigatus* (~ 30 Mb) anstrebte (Denning *et al.*, 2002). Inzwischen ist die Sequenzierung zwar beinahe abgeschlossen, jedoch steht die Annotierung des Genoms noch weitgehend am Anfang. Die Annotierung wird vom „Wellcome Trust Sanger Institute“ (GB) und „The Institute for Genomic Research“ (TIGR, USA) ausgeführt (Mabey *et al.*, 2004). In Zusammenarbeit mit dem „Zentrallabor für Proteinanalytik“ der Ludwig-Maximilians-Universität München

wurden in dieser Arbeit differentielle Proteine mit Hilfe der LC-MS/MS oder MALDI analysiert. Mittels einer „Blast-Search-Analyse“, sowohl in der Sanger- als auch in der TIGR-Datenbank, konnten erhaltene Peptidsequenzen einer DNA-Sequenz aus *A. fumigatus* zugeordnet werden. Durch eine theoretische Annotierung in „GENSCAN“ wurde aus dieser DNA-Sequenz die putative Sequenz des Gesamtproteins ermittelt. Mit Hilfe dieser Proteinsequenz konnten eine ganze Reihe von Proteinen durch Datenbanksuchen identifiziert werden, für andere gelang jedoch keine Zuordnung zu einem bekannten Protein.

Durch den visuellen Vergleich der Muster sowohl der eindimensionalen SDS-PAGE als auch der 2D-PAGE wurden insgesamt 63 differentielle Proteine gefunden. 24 in den ruhenden Sporen, 18 in den auskeimenden Sporen und einundzwanzig in den Hyphen. Entweder durch MALDI oder durch eine LC-MS/MS wurden bisher 25 analysiert. Eine eindeutige Identifizierung gelang bei einundzwanzig Proteinen, während für vier keine Homologien gefunden werden konnten. Die restlichen Proteine werden noch einer Analyse unterzogen.

25.1 Differentiell exprimierte Proteine der ruhenden Konidien

Wie bereits erwähnt, konnten 63 differentiell exprimierte Proteine auf den Gelen der SDS-PAGE gefunden werden. Erstaunlich ist, dass die Mehrzahl in den ruhenden Sporen zu finden war. Zudem fiel auf, dass viele dieser Proteine Schutzenzyme vor oxidativem Stress oder vor anderen Stressfaktoren darstellten.

Viele der Sporenspezifischen Proteine zeigten eine schnelle Regulation während der ersten Stunden des Auskeimungsprozesses, d.h. bereits nach achtstündiger Inkubation bei 37°C konnten viele der Proteine nicht mehr auf den Gelen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist wahrscheinlich in der besonderen Lebensform der ruhenden Sporen zu finden. Die ruhende Konidie ist ein Gebilde mit relativ geringem Wassergehalt, in dem wahrscheinlich keine oder kaum Stoffwechselforgänge ablaufen. Wegen ihrer geringen Größe, ihres geringen Gewichtes und ihrer hydrophoben Schutzhülle werden sie mit den Luftbewegungen in der Umwelt verstreut, wobei sie vielen schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Um in der Atmosphäre überleben zu können und sich vor den zerstörerischen Effekten reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“ ROS), die sowohl extrazellulären (aus unterschiedlichen Quellen in der Umwelt) als auch intrazellulären Ursprungs (durch den natürlichen Atmungsprozess)

entstammen können, zu schützen, mussten Pilze spezielle Mechanismen entwickeln (Hamilton & Holdom, 1999). Einen ersten Schutzmechanismus vor extrazellulären ROS bilden die in der hydrophoben Hüllschicht eingebetteten Melanine, die den Sporen unter anderem auch ihre charakteristische Farbe verleihen. Eine länger anhaltende Exposition der Konidien unter schädigenden Umweltbedingungen könnte diesen Schutzmechanismus schwächen. Wenn zusätzlich „Gefahr“ droht, ist es den ruhenden Konidien durch ihren reduzierten Metabolismus mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht möglich, schnell und effizient Proteinbiosynthese zu betreiben. Deshalb ist es vorstellbar, dass Antioxidansenzyme bei der Sporulation in die Sporen eingelagert werden, als eine Art „Vorratslager“ für Zeiten, in denen schneller Schutz notwendig ist.

Beispiele solcher Antioxidansenzyme werden im Folgenden diskutiert.

25.1.1 Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase

Neben Melanin kommt auch Mannit in den ruhenden Konidien vor. Mannit ist ein Polyol, dem in filamentösen Pilzen verschiedene Rollen zugeschrieben werden. Es soll als Reservekohlenstoff in den ruhenden Konidien eingelagert sein, aber auch eine wichtige Funktion beim Schutz vor ROS ausüben (Touster & Shaw, 1962; Brown & Simpson, 1972). Die Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase (MPD) wurde in dieser Arbeit als differentiell exprimiertes Protein in den ruhenden Konidien gefunden. Die MPD ist ein Enzym, das in filamentösen Pilzen, unter anderem in *A. nidulans*, *A. niger*, *C. neoformans* und *Alternaria alternata*, den ersten katalytischen Schritt der Mannit-Biosynthese katalysiert (Stoop & Mooibroek, 1998; Hult *et al.*, 1980; Witteveen & Visser, 1995; Chaturvedi *et al.*, 1989). In umgekehrter Richtung, also im Abbauzyklus von Mannit, scheint die MPD im filamentösen Pilz *Agaricus bisporus* involviert zu sein (Hult *et al.*, 1980). Die Rolle der MPD in *A. fumigatus* - ob das Enzym also eine katabolische und/oder eine anabolische Funktion ausübt - muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Eine Funktion im Abbau von Mannit wäre plausibler, da Mannit auch für *A. fumigatus* einen Reservekohlenstoff darstellt. Es könnte sich bei dem Protein aber auch um einen Überrest aus dem Aufbauzyklus des Mannits während der Sporulation handeln.

25.1.2 Superoxiddismutasen

Eine weitere Klasse von Antioxidansenzymen sind die Superoxiddismutasen (SOD). Es sind Metallo-Enzyme, die in allen aerob lebenden Organismen vorkommen. Superoxiddismutasen katalysieren die Umwandlung zweier freier Sauerstoffradikale in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und in molekularen Sauerstoff (O_2). In der Natur existieren zwei nicht zusammenhängende Klassen dieser Enzyme, die unterschiedliche Metalle in ihren aktiven Zentren besitzen: Die erste Klasse besitzt Eisen (FeSOD) oder Mangan (MnSOD), die zweite Kupfer und Zink (CuZnSOD) (Fridovich, 1989). Die FeSOD wurde in Prokaryonten und einigen Pflanzenfamilien nachgewiesen, die MnSOD in Prokaryonten und der mitochondrialen Matrix eukaryontischer Organismen und die CuZnSOD meist im Zytoplasma von eukaryontischen Zellen (Fridovich, 1978), aber auch extrazellulär (Marklund, 1982). Durch die Versuche dieser Arbeit konnten in *A. fumigatus* zwei Superoxiddismutasen identifiziert werden. Eine myzelspezifische und eine, die sowohl in den Sporen als auch in den auskeimenden Sporen nachweisbar war.

Die Proteinbande der letzteren SOD wies auf den Gelen der 2D-PAGE ein experimentelles Molekulargewicht von ca. 17 kDa auf, die Proteinsequenz zeigte nach einer LC-MS/MS-Analyse eine Homologie von 100% zur CuZnSOD aus *A. fumigatus*. Im Myzel wurde die CuZnSOD auf den angefertigten Gelen der 2D-PAGE nicht nachgewiesen. Dies ist erstaunlich, da die CuZnSOD in der Literatur als ein konstitutiv exprimiertes Gen beschrieben wurde (Hamilton & Holdom, 1999). Das Protein ist im Zytoplasma lokalisiert, wahrscheinlich unmittelbar unterhalb der Zellwand, kommt aber auch in die Zellwand integriert vor (Hamilton *et al.*, 1996). Ferner wurde in der Literatur beschrieben, dass die CuZnSOD auch extrazellulär, mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Zellwand gebunden, vorkommt (Hamilton & Holdom, 1999). Aufgrund dieser Lokalisation ist es der CuZnSOD möglich, Sauerstoffradikale extrazellulären Ursprungs abzufangen und zu eliminieren. Die in der Literatur beschriebene Lokalisation der CuZnSOD in oder an der Zellwand könnte erklären, warum dieses Protein im Myzel nicht mehr nachweisbar war. Während der Germination ist die CuZnSOD im Zytoplasma lokalisiert, was den Nachweis des Proteins auf den Gelen der 2D-PAGE erklärt. In der späten Wachstumsphase könnte das Protein allerdings in der Zellwand der Hyphen vorkommen. Während des mechanischen Aufschlusses mit Glaskugeln im MSK-Zellhomogenisator wird die Zellwand in Bruchstücke zerrissen. Diese relativ großen Zelltrümmer werden während des ersten Zentrifugationsschrittes (12000xg für 30min) sedimentiert, dies gilt somit auch für die

Mehrzahl der Proteine der Zellwand. Durch eine Sequenzanalyse mit PSORT II konnte für die CuZnSOD jedoch keine Signalsequenz nachgewiesen werden, was gegen die obige Annahme spricht. Allerdings wurden in unserer Arbeitsgruppe noch weitere Hinweise darauf gefunden, dass es in *A. fumigatus* zum Export von Proteinen ohne Signalsequenz in die Zellwand kommen kann. So wurde z.B. GFP auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Ein weiterer möglicher Grund für die Abwesenheit der CuZnSOD im Myzel könnte die Aktivierung der myzelspezifischen MnSOD sein, die in einem späteren Abschnitt behandelt wird.

25.1.3 Katalase A

In der Zelle ist die Rolle der SOD eng verbunden mit der Aktivität anderer Antioxidansenzyme, wie den Katalasen. Katalasen sind wie Superoxiddismutasen Metalloenzyme, die ebenfalls in allen aeroben Organismen gefunden wurden. Die Aufgabe der Katalase ist die Eliminierung von Wasserstoffperoxiden, die während des zellulären Metabolismus z.B. durch die Superoxiddismutasen gebildet werden (Hamilton & Holdom, 1999). In *A. fumigatus* konnten bis jetzt drei aktive Katalasen nachgewiesen werden, allerdings nur durch enzymatische Tests. Eine dieser Katalasen ist in den Konidien aktiv und zwei in den Hyphen. Die Katalase A (CatA) wird in den Sporen produziert, während die Hyphen Cat1p und Cat2p aufweisen (Paris *et al.*, 2003b). In dieser Arbeit wurde CatA als sporenspezifisches Protein in den eindimensionalen SDS-PAGE Gelen identifiziert. Dies bestätigt die von Paris (2003) publizierten Daten. Dies ist zudem ein direkter Nachweis der Regulation und Expression von CatA. CatA ist während des Auskeimungsvorganges einem schnellen Abbau unterworfen, da das Protein in den auskeimenden Sporen und im Myzel nicht mehr nachweisbar ist. Das Protein zeigt eine 79%ige Homologie zur CatA aus *A. nidulans* und ist ebenso wie Cat-2 aus *N. crassa* ein Dimer (Chary & Natvig, 1989; Goldberg & Hochman, 1989).

Katalasen werden als Virulenzfaktoren diskutiert. Das gilt insbesondere für die Katalasen der Hyphen (Cat1p und Cat2p), die eine Schutzfunktion gegen die Zerstörung beim „oxidative Burst“ von Neutrophilen während einer Infektion ausüben (Crameri *et al.*, 1996; Holdom *et al.*, 2000). Die sporenspezifische CatA soll in *A. nidulans* vor allem wichtig für die Regeneration nach einer Behandlung mit Hitze (Hitzeschockbehandlung) sein (Noventa-Jordao *et al.*, 1999).

Wie bereits erwähnt, wird CatA in *A. fumigatus* sehr rasch abgebaut. In den ruhenden Sporen konnte die Aktivität der CatA mit Hilfe eines Aktivitätstests nachgewiesen werden. Außerdem konnte sie in den ruhenden Konidien mit einem in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper (mAk D40-E3) detektiert werden. Das Enzym verlor mit steigender Inkubationszeit zunehmend an Aktivität und war bereits nach acht Stunden nicht mehr nachweisbar. Dies war auch der Zeitpunkt, an dem das Protein mit Hilfe einer „Western Blot“-Analyse nicht mehr nachgewiesen werden konnte. In *N. crassa* wurden 2 Katalasen, Cat-1 und Cat-3, ebenfalls als differentiell exprimierte Proteine während des asexuellen Wachstums beschrieben. In diesem Pilz wird Cat-1 während des Sporulationsprozesses gebildet und ist in den Sporen, aber auch während der Germination, aktiv (Michan *et al.*, 2002). Nach 6h ist auch in *N. crassa* kaum noch Aktivität der Cat-1 nachweisbar, dafür kann nach diesem Zeitpunkt Cat-3-Aktivität nachgewiesen werden (Michan *et al.*, 2002).

Wie bereits erwähnt, zeigte sich durch die Untersuchungen der Proteinmuster in dieser Arbeit, dass viele Proteine in den ruhenden Konidien differentiell exprimiert sind. Wie die oben angesprochene Theorie besagt, ist die durch die Luft getragene Spore einer Reihe von Stressfaktoren ausgesetzt. Um unter solchen Bedingungen überdauern oder auskeimen zu können, braucht die Spore ein effizientes Arsenal an Schutzsystemen. Es scheinen daher während der Sporulation möglichst viele Proteine für eine solche Stresssituation eingelagert zu werden. Das verschafft dem Organismus sicherlich auch einen entscheidenden Vorteil sobald er mit einem komplexen Abwehrsystem, wie mit dem des Menschen, in Kontakt kommt. Wenn *A. fumigatus* unter optimalen Auskeimungsbedingungen angezogen wird, werden manche dieser Proteine während der Auskeimung erstaunlich schnell abgebaut. Der Abbau der Proteine wird möglicherweise durch Rezeptoren gesteuert, die auch die Germination kontrollieren. Signalisieren die Rezeptoren, dass genügend Nährstoffe vorhanden sind und die Proteine nicht für den unmittelbaren Schutz benötigt werden, können entbehrliche Proteine zerkleinert und für die Biosynthese neuer Proteine verwendet werden.

Wie dieser schnelle und effiziente Proteinabbau in *A. fumigatus* abläuft, wurde bislang nicht untersucht. In einer Zelle gibt es verschiedene Systeme für den Abbau von Proteinen: Zum einen können Proteine durch lösliche Proteasen abgebaut werden, zum anderen existiert ein effizientes Abbausystem, das so genannte Proteasom. Das Proteasom ist ein großer Proteinkomplex, der im Zytoplasma und im Zellkern Proteine zu Fragmenten

abbaut (zur Übersicht siehe: Bochtler *et al.*, 1999). Es besteht aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten, die ihrerseits wieder aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind. Die 20S-Untereinheit ist ein hohler Zylinder, an dessen Innenwand die proteolytische Aktivität lokalisiert ist. Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, werden in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess mit einer Polyubiquitin-Kette markiert. Der 19S-Komplex erkennt diese Polyubiquitin-Ketten und transportiert das Protein zur 20S-Untereinheit. Ubiquitin ist ein kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von 6,5 kDa (Bochtler *et al.*, 1999). Ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Antikörper, der Ubiquitinreste detektiert, wurde in dieser Arbeit verwendet, um zu klären, ob CatA durch das Proteasom abgebaut wird. Zudem sollte untersucht werden, wie sich das Ubiquitinierungs-Muster der Proteine während der ersten Stunden der Auskeimung verändert. Die Ergebnisse zeigten, dass in den Konidien nur wenige Proteine in „ubiquitiniertes“ Form vorliegen. Diese Proteine dienen den Konidien wahrscheinlich als Aminosäurespeicher. Bei erhöhtem Bedarf an Aminosäuren, was beim Vorgang der Auskeimung mit Sicherheit der Fall ist, können bereits ubiquitinierte Proteine sehr schnell ins Proteasom wandern, wo sie, wie vorher beschrieben, zerkleinert werden und so der „de novo“-Synthese von Proteinen zugänglich werden. Nach einer Auskeimungszeit von vier Stunden steigt die Ubiquitinierung stark an, was anhand der „Western Blot“-Analyse sehr gut dokumentiert werden konnte. Ein spezifischer Nachweis dafür, dass die Katalase A über das Proteasom abgebaut wird, konnte dadurch allerdings nicht erbracht werden.

Um festzustellen, ob der CatA-Abbau über proteolytische Enzyme erfolgt, wurde das Verhalten der CatA durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren untersucht. So wurde durch die Proteaseinhibitoren PMSF und einem Proteaseinhibitor-Cocktail der CatA-Abbau zusammen mit der Auskeimung blockiert. Während durch den Einsatz von Pepstatin A, einem Inhibitor für saure Proteasen, weder Auskeimung noch CatA-Abbau blockiert wurden. Dies bedeutet, dass Proteinabbau über Proteasen erforderlich ist, damit Auskeimung stattfinden kann, saure Proteasen aber nicht in diesen Prozess involviert sind. Der Einsatz von Cycloheximid, ein Reagenz das die Translation hemmt, blockiert sowohl die Auskeimung als auch den CatA-Abbau. Das bedeutet, dass die Protease für den CatA-Abbau neu gebildet werden muss. Durch Actinomycin D wurde der CatA-Abbau ebenfalls verhindert, es kam aber bei 10% der Sporen zu einer Keimschlauchbildung und 30% waren nach acht Stunden Wachstum angeschwollen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CatA-Abbau für eine erfolgreiche Auskeimung nicht notwendig ist. Jedoch ist es nur

schwer möglich durch eine „Western Blot“-Analyse festzustellen, ob der Anteil an CatA in diesen Präparationen abgenommen hat oder nicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit könnte ein besseres Ergebnis erbringen. Insgesamt deuten die Ergebnisse aber darauf hin, dass Proteinabbau ein essentieller Schritt für die Auskeimung ist und der CatA-Abbau eng mit dem Auskeimungsmechanismus zusammenhängt. Ob Proteinabbau durch Proteasen oder durch das Proteasom stattfindet, bedarf noch weiterer Versuche. Durch eine Immunpräzipitation von CatA mit einem spezifischen Antikörper könnte ein spezifischer Ubiquitinierungs-Nachweis gelingen, allerdings erwies sich der monoklonale Antikörper D40-E3 für diese Versuche als nicht geeignet. Da weitere CatA-spezifische Hybridome hergestellt wurden, aber bisher noch nicht kloniert wurden, könnten diese Versuche mit weiteren CatA-spezifischen Antikörpern fortgeführt werden.

Neben Proteinen, die an der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind, wurden noch weitere identifiziert, deren Expression auf die ruhenden Sporen beschränkt war. Diese werden im Folgenden diskutiert.

25.1.4 Aspergillus Hämolysin

A. fumigatus produziert ein Hämolysin, das in experimentellen Aspergillosen nachgewiesen werden konnte. Das Protein könnte an der Lyse von roten Blutkörperchen beteiligt sein (Ebina *et al.*, 1994). Für eine solche Funktionsweise müsste es während einer Infektion sekretiert werden. In dieser Arbeit wurde in den ruhenden Sporen ein 18 kDa-Protein mit einer Homologie von 54% zum Hämolysin aus *A. fumigatus* identifiziert. Durch eine weitere Analyse konnte festgestellt werden, dass im Genom von *A. fumigatus* neben dem Hämolysin-Gen noch ein zweites Gen vorkommt, das hohe Homologien zum Asp-Hämolysin aufweist. Ein eigener Datenbankeintrag in der NCBI-Datenbank ist in Vorbereitung. Für beide Proteine konnte mit PSORT II keine Signalsequenz identifiziert werden, jedoch konnten in dieser Arbeit Hinweise darauf gefunden werden, dass Proteine ohne Signalsequenz an die Zelloberfläche gelangen können. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Funktion dieses Proteins in den Sporen von *A. fumigatus* zu ergründen.

25.1.5 Mannose-6-Phosphat-Isomerase

Die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (PMI) wurde in allen drei Auskeimungsstadien gefunden. In den ruhenden Sporen ist das Protein jedoch um ein Vielfaches stärker exprimiert als in den auskeimenden Sporen und im Myzel. Die PMI ist in Hefen ein essentielles Enzym für den Zellwandaufbau (Proudfoot *et al.*, 1994). Diese Funktion legt die Vermutung nahe, dass die Expression des Proteins in den auskeimenden Sporen, mehr aber noch im Myzel, erhöht sein müsste, da es in diesen beiden Phasen der Auskeimung zu einem starken Zellwandwachstum kommt. In *A. nidulans* ist die PMI für die Verlängerung der Hyphenspitze notwendig (Smith & Payton, 1994). Da die Proteinbiosynthese in den ersten acht Stunden der Auskeimung vor allem auf die Synthese von Proteinen des Proteinsyntheseapparates fokussiert ist (siehe 25.2.1), die PMI jedoch mit Sicherheit in dieser Phase der Auskeimung gebraucht wird, wäre eine Einlagerung dieses essentiellen Proteins in die ruhenden Sporen für die Auskeimung von *A. fumigatus* vorteilhaft. In Zukunft könnte die PMI für neue antimykotische Medikamente ein effektiver Angriffspunkt sein, da bereits gezeigt wurde, dass eine Mutation in diesem Gen zum Absterben von *A. nidulans* führt (Smith & Payton, 1994).

25.1.6 Bli-3-Protein

In dieser Arbeit wurde ein sporenspezifisches Protein mit Homologie zu einem putativen Bli-3-Protein (Blaues Licht induziertes Protein 3) identifiziert. Über Bli-3 ist zurzeit noch wenig bekannt. Nach Eberle und Russo wird im verwandten Organismus *N. crassa* die mRNA des Bli-3-Proteins zwei Minuten nach Beginn einer Bestrahlung mit blauem Licht induziert (Eberle & Russo, 1994), weiterführende Untersuchungen über die Funktionsweise wurden jedoch nicht erwähnt.

Blaues Licht löst in filamentösen Pilzen viele verschiedene physiologische, morphologische und biochemische Reaktionen aus (Eberle & Russo, 1994). Möglicherweise ist Bli-3 ein Rudiment aus der Phase der Sporulation, da die Konidiophoren erst gebildet werden, wenn das Myzel die Luft erreicht und dort meist auch auf Licht trifft. In dieser Arbeit verlief die Sporulation jedoch unter Lichtausschluss, was gegen eine solche Theorie spricht. Warum ein durch blaues Licht induzierbares Protein, wie das Bli-3 Protein, in den Sporen vorkommt und welche Aufgabe es dort übernimmt, ist bisher nicht bekannt.

25.1.7 SP 25(2D)

SP 25(2D) zeigte eine Homologie von 86% zu einem Y20-Protein aus *P. brasiliensis*. Dieser Pilz ist ein thermal dimorpher Ascomycet, der vor allem in Lateinamerika eine Paracoccidiomycose hervorrufen kann (Franco, 1986). Die pathogene Form ist die Hefe-Form. Das Y20-Protein wurde als differentielles Protein in der Hefe-Form gefunden und es wird angenommen, dass es als vermutlich DNA-bindendes Protein an der Aufrechterhaltung dieses Differenzierungsstadiums beteiligt ist (Cunha *et al.*, 1999). Eine solche Funktion könnte auch das Protein SP 25(2D) in den ruhenden Sporen ausüben. Wie das Y20-Protein besitzt auch SP 25(2D) eine Flavodoxin-ähnliche Domäne und zeigt hohe Homologien zum Tryptophan-Repressor-bindenden Protein (WrbA), das in *E. coli* die Bindung des Tryptophan-Repressors an DNA stimuliert (Grandori & Carey, 1994).

25.1.8 Isocitratlyase

Phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Neutrophile bilden die erste Linie in der Abwehr gegen mikrobielle Infektionen. Eindringende Mikroorganismen werden in einem unwirtlichen intrazellulären Kompartiment, dem Phagolysosom in den Makrophagen und Neutrophilen, eliminiert. In dieser Umgebung stehen dem eindringenden Mikroorganismus kaum Nährstoffe für überlebenswichtige Stoffwechselfvorgänge zur Verfügung. Um in solch einem Milieu überleben zu können, haben pathogene Mikroorganismen verschiedene Strategien entwickelt. Der erste Schritt nach der Aufnahme in einen Makrophagen ist jedoch bei allen Organismen derselbe: Sie induzieren den Glyoxylatzyklus. Der Glyoxylatzyklus ist eine Variante des Citratzyklus, der in eukaryontischen Organismen in speziellen Organellen, den Peroxisomen, abläuft. Dieser Mechanismus ermöglicht den Mikroorganismen die Nutzung von C₂-Verbindungen (z.B. Fette und Acetat) als einziger Energiequelle (Lorenz & Fink, 2001; Lorenz & Fink, 2002).

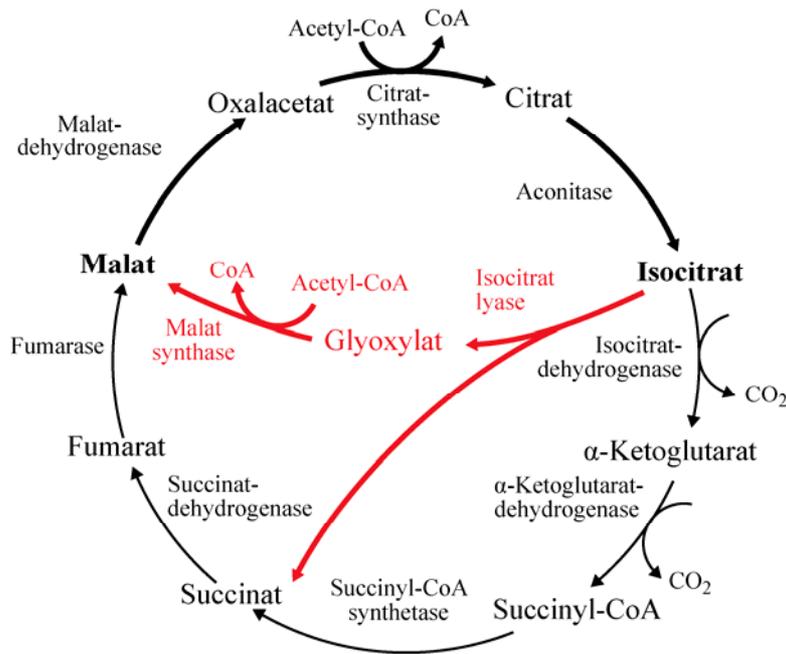


Abb. 54: Abbildung des Glyoxylatzyklus. Isocitrat wird durch die ICL in Glyoxylat und Succinat umgewandelt. Glyoxylat kann anschließend mit Acetyl-CoA zum Aufbau von Malat benutzt werden.

Die Isocitratlyase (ICL) ist das zentrale Enzym des Glyoxylatzyklus. In dieser Arbeit wurden für dieses Enzym in Zusammenarbeit mit Matthias Brock (Universität Hannover) mehrere monoklonale Antikörper (z.B. mAk E30-F8) hergestellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die ICL in *A. fumigatus* Hyphen, die auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, induziert war, während nach einem Wachstum auf Glukose kaum ICL detektierbar war (persönliche Mitteilung von M. Brock). Überraschend war die Beobachtung, dass in Sporen, die entweder auf komplexen und kohlenhydratreichen PD-Agar oder auf Minimalagar mit Glukose als einziger C-Quelle gebildet worden waren, die ICL nachgewiesen werden konnte. Somit ist die ICL ein sporenspezifisches Protein, das in Gegenwart von Glukose ähnlich wie CatA einer raschen Regulation während der Germination unterworfen war. Bereits nach acht Stunden Wachstum konnte die ICL mit Hilfe einer „Western Blot“-Analyse nicht mehr detektiert werden. Wie bereits erwähnt, spielt der Glyoxylatzyklus vor allem während der Infektion eines Wirtsorganismus oder beim Wachstum auf Fetten oder Acetat eine zentrale Rolle. In *Magnaporthe grisea*, einem pflanzenpathogenen Pilz, wurde die ICL mit Hilfe einer GFP-Reportergenfusion ebenfalls in den Konidien nachgewiesen. Die Expression des Gens nahm auch in diesem Organismus während der Keimschlauchbildung ab (Thines *et al.*, 2000). Die ICL1 aus *M. grisea* zeigt eine 85,5%ige Identität zur Isocitratlyase Acu3 aus *N. crassa* und eine 76,3%ige Identität zur Isocitratlyase AcuD aus *A. nidulans* (Gainey *et al.*,

1992). Dies weist auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins zwischen verschiedenen filamentösen Pilzen hin. Mit dem mAk E30-F8 gegen die ICL aus *A. fumigatus* wurden die Sporenproteine der Aspergillus-Stämme *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus* und *A. oryzae* einer „Western Blot“-Analyse unterzogen. Das Ergebnis zeigt, dass der α -CatA mAk D40-E3 die ICL des nahe verwandten Pilzes *A. giganteus* ebenso erkennt wie die ICL aus *A. fumigatus*. Für die übrigen getesteten Aspergillus-Spezies kann angenommen werden, dass das D40-E3 Epitop nicht konserviert ist, oder dass sie keine ICL in den ruhenden Konidien besitzen.

Um dies zu klären, wurden Hyphen nach Wachstum in AMM, das als einzige Kohlenstoffquelle Acetat enthielt, untersucht. Es wurden die Aspergillus-Spezies *A. flavus*, *A. giganteus* und *A. terreus* angezogen. Mit dem mAk E30-F8 wurden die Proteinextrakte einer „Western Blot“-Analyse unterzogen. Die ICL der Schimmelpilze *A. flavus* und *A. terreus* war durch den mAk E30-F8 in den Proteinextrakten der ruhenden Sporen nicht detektierbar. Nach dem Wachstum mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle wurde die ICL aus *A. flavus* nachweisbar. Dieses Ergebnis deutet auf eine unterschiedliche Regulation der ICL in verschiedenen Aspergillus-Stämmen hin. In einigen Stämmen, z.B. in *A. fumigatus* und *A. giganteus*, wird die ICL während der Sporulation gebildet, in den ruhenden Konidien eingelagert und während der Auskeimung rasch abgebaut, wenn sie nicht zum Überleben gebraucht wird. In anderen Stämmen wie *A. flavus* wird die ICL erst synthetisiert, wenn der Glyoxylatzyklus induziert wird. Die Aminosäuresequenz des Epitops, an das der mAk E30-F8 bindet, ist in *A. terreus* trotz des hohen Konservierungsgrades der ICL in verschiedenen filamentösen Pilzen wahrscheinlich abweichend, da das Protein durch die „Western Blot“-Analyse weder in den ruhenden Konidien nachgewiesen werden konnte noch in den Hyphen nach einem Wachstum auf Acetat.

Bei der Infektion eines Wirtes müssen Aspergillen den Glyoxylatzyklus aktivieren, um in intrazellulären Kompartimenten überleben zu können. Der Nachweis der ICL gelang mit dem mAk E30-F8 nach einem acht stündigem Infektionsversuch von J774-Makrophagen mit *A. fumigatus*-Konidien im serumhaltigen RPMI 1640-Zellkulturmedium. Dieses Ergebnis zeigt, dass *A. fumigatus* unter Infektionsbedingungen den Glyoxylatzyklus benötigt. Die konidien-spezifische CatA, die während der Auskeimung rasch abgebaut wird, diente als Kontrollprotein. Durch die „Western Blot“-Analyse mit einer Mischung der monoklonalen Antikörper E30-F8 (α -ICL) und D40-E3 (α -CatA) konnte nach null Stunden

und acht Stunden neben dem ICL-Protein auch das CatA-Protein detektiert werden. Ein Hinweis darauf, dass nach einer Infektion von acht Stunden die Konidien in den Makrophagen noch nicht vollständig ausgekeimt waren oder das CatA unter diesen Stressbedingungen langsamer abgebaut wird. Parallel wurden *A. fumigatus*-Konidien in RPMI 1640-Zellkulturmedium ohne J774-Zellen angezogen. In diesen Proteinextrakten waren ebenfalls beide Proteine durch eine „Western Blot“-Analyse nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Konidien unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen noch nicht vollständig ausgekeimt waren. Durch die Untersuchung der Konidien unter einem Mikroskop konnte dies bestätigt werden. Ein Großteil der Konidien hatte noch keinen Keimschlauch gebildet und befand sich noch im Stadium der ruhenden Sporen. Weitere Versuche mit längeren Inkubationszeiten werden zeigen, ob der Glyoxylatzyklus unter Infektionsbedingungen aktiviert wird. Infektionsversuche mit *A. fumigatus* in der Zellkultur stellen jedoch immer ein Problem dar. Die Ermittlung des optimalen Zeitpunktes, an dem die Konidien gerade ausgekeimt sind, aber noch kein Myzel gebildet haben, ist ein entscheidender Schritt für weiterführende Versuche. Ein weiteres Problem stellt die Ermittlung der quantitativen Aufnahme der Konidien durch Makrophagen in einem Zellkulturversuch dar, auch auf diesem Gebiet werden weitere Untersuchungen durchgeführt. Da die ICL in *A. fumigatus* bereits in den Sporen vorkommt, ist es für weiterführende Versuche, besser einen anderen Aspergillus-Stamm zu verwenden, um eine Aktivierung der ICL in infizierten Zellen nachzuweisen. Denkbar wäre z.B. *A. flavus*, bei dem die ICL in den Sporen nicht induziert ist.

25.1.9 Acyl-CoA-Dehydrogenase

In den ruhenden Sporen wurde ein differentiell exprimiertes Protein mit einem experimentellen Molekulargewicht von 23 kDa gefunden. Durch eine LC-MS/MS-Analyse wurde nach einer NCBI-Datenbanksuche eine 91%ige Homologie zu dem hypothetischen Protein AN2264.2 aus *A. nidulans* identifiziert, das eine konservierte Acyl-CoA-Dehydrogenase Domäne besitzt. Des Weiteren wurde eine 71%ige Homologie zu einer Acyl-CoA-Dehydrogenase aus *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 gefunden. Die Acyl-CoA-Dehydrogenase aus *Oceanobacillus iheyensis* besitzt jedoch ein Molekulargewicht von 94 kDa, was nicht dem experimentell ermittelten Molekulargewicht entspricht. Es könnte sich bei dem identifizierten Protein um ein Fragment der Acyl-CoA-Dehydrogenase

handeln. Die Aufgabe der Acyl-CoA-Dehydrogenase ist der Abbau von Fettsäuren (Knoop, 1904; Dakin, 1912; Lynen, 1942). In den Sporen sind Kohlenhydrate und Lipide als Speicherstoffe eingelagert (Morozova *et al.*, 2002). Während des Wachstums müssen solche Speicherstoffe möglichst schnell mobilisiert und zur Energieversorgung verwendet werden. Wie bereits erwähnt, findet in den ersten Stunden der Auskeimung wahrscheinlich nur eine geringe Proteinbiosynthese statt. Damit Lipid-Reserven schnell für die Energiegewinnung aktiviert werden können, macht das Einlagern der Acyl-CoA-Dehydrogenase in die ruhenden Sporen von *A. fumigatus* Sinn. Anschließend können die Abbauprodukte des Fettsäureabbaus im Glyoxylatzyklus, dessen zentrales Enzym die in dieser Arbeit bereits besprochene Isocitratlyase ist, weiterverarbeitet und zur Energiegewinnung genutzt werden.

25.2 Differentiell exprimierte Proteine der auskeimenden Sporen

Von den 63 Proteinen, die auf den Gelen der SDS-PAGE als differentiell exprimiert gefunden wurden, konnten 18 den auskeimenden Sporen zugeordnet werden. Die meisten, die in diesem Stadium der Auskeimung gefunden und identifiziert werden konnten, waren ribosomale Proteine, die zur Proteinbiosynthese benötigt werden. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass es in dieser Phase des erhöhten Wachstums möglicherweise auch zu einer Erhöhung der Proteinbiosynthese kommt. Zudem weist dies darauf hin, dass in der frühen Auskeimungsphase kaum ribosomale Proteine vorhanden sind und deshalb wenig Proteinbiosynthese betrieben wird. Diese These wird von einer früheren Studie im verwandten Organismus in *N. crassa* bestätigt, in der festgestellt wurde, dass in den ersten Stunden der Auskeimung ebenfalls keine Proteinbiosynthese stattfindet (Hawley & Greenawalt, 1975).

25.2.1 Ribosomale Proteine und NudC

Der Differenzierungsprozess des filamentösen Schimmelpilzes *A. fumigatus* beginnt in der ruhenden Spore, in der kaum metabolische Vorgänge ablaufen und wohl, wie erwähnt, kaum Proteinbiosynthese stattfindet. Vermutlich muss im Stadium der Auskeimung die Maschinerie der Proteinbiosynthese aktiviert werden. Tatsächlich konnten während der Auskeimungsphase in den Gelen der 1D-PAGE und der 2D-PAGE vor allem Proteine hochreguliert werden, die in die Proteinbiosynthese involviert sind. Außerdem wurde sowohl in den auskeimenden Sporen als auch im Myzel, nicht aber in den ruhenden

Sporen, ein Kernwanderungsprotein (NudC) identifiziert (Xiang *et al.*, 1995). Die Kernwanderung ist sowohl in höheren als auch niederen eukaryontischen Organismen für eine normale Entwicklung essentiell (Zhang *et al.*, 2002). Dieser Vorgang findet in ruhenden Sporen nicht statt.

In dieser Arbeit wurde ein Antikörper (B8-C4) gegen das Allergen Asp f8 aus *A. fumigatus* hergestellt. Asp f8 gehört zu den sauren ribosomalen Proteinen. Die sauren ribosomalen Proteine P0, P1 und P2 sind phosphorylierte Proteine (P) die in vielen Kopien am Ribosom vorkommen (Rich & Steitz, 1987). Asp f8 entspricht dem P2-Protein, das wie P1 ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa besitzt. Alle drei P-Proteine weisen untereinander hohe Homologien in ihrem C-terminalen Bereich auf. Im „Western Blot“ erkennt der Antikörper B8-C4 drei Banden, die den Molekulargewichten der drei P-Proteine entsprechen. Da die drei einen konservierten C-Terminus besitzen, erkennt der Antikörper B8-C4 vermutlich ein Epitop, das in dieser Region sitzt. Das Ergebnis des Experiments zeigte außerdem, dass P1 und P2 in den Proteinextrakten SP, AS und MY in vergleichbaren Mengen zu finden sind. Anders verhält es sich bei dem P0, das ein Molekulargewicht von ca. 37 kDa besitzt. Es wurde mit Hilfe der „Western Blot“-Analyse als ein spezifisches Protein der auskeimenden Sporen identifiziert. In einem späteren Versuch wurde P0 dann aber auch in den Hyphen nachgewiesen. Kein Nachweis konnte in den ruhenden Sporen erbracht werden. P1 und P2 interagieren mit den eukaryontischen Elongationsfaktoren EF1 und EF2 und werden für die Bindung von Aminoacyl-tRNAs sowie Polypeptidsynthese gebraucht (MacConnell & Kaplan, 1980; MacConnell & Kaplan, 1982; Sanchez-Madrid *et al.*, 1979). Ein Grund für die Expression des P0 in der Phase der auskeimenden Sporen könnte darin liegen, dass P0 mit dem Elongationsfaktor 2 interagiert (Uchiumi & Ogata, 1986; Uchiumi *et al.*, 1986a; Uchiumi *et al.*, 1986b), der in dieser Arbeit ebenfalls als hochreguliertes Protein der auskeimenden Sporen identifiziert wurde.

25.2.2 ATP-Citrat-Lyase

Auf den Gelen der eindimensionalen SDS-PAGE wurde ein spezifisches Protein für auskeimende Konidien mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 70 kDa identifiziert. Es wies eine 91%ige Homologie zu einer ATP-Citrate-Lyase Untereinheit 1 aus *Sordaria macrospora* auf. Die ATP-Citrat-Lyase (ACL) ist bei der Bildung von zytosolischem Acetyl-CoA involviert, das für viele Biosynthesen, u.a. von Fettsäuren und Sterolen, benötigt wird (Adams *et al.*, 2002). Fettsäuren und Sterole spielen in vielen

zellulären Prozessen eine wichtige Rolle wie dem Aufbau von Biomembranen, Hormonen und sekundären Botenstoffen. Neben diesen generellen Funktionen hängen in verschiedenen Organismen auch viele Entwicklungsprozesse vom Fettsäuremetabolismus ab. So wird die ACL z.B. bei der sexuellen Entwicklung des Pilzes *Sardoria macrospora* benötigt (Nowrousian *et al.*, 1999). In *A. fumigatus*, der keinen sexuellen Zyklus besitzt, ist dieses Protein wahrscheinlich nicht für die Auskeimung essentiell. Es ist aber für den Aufbau von Biomembranen, die während der Auskeimung benötigt werden, wichtig.

25.2.3 Peroxisomales Membranprotein (Asp f3)

Auf den Gelen der 2D-PAGE-Analyse fiel ein Proteincluster auf der Höhe von ca. 18 kDa in einem pI-Bereich von ca. 5-5,5 auf. Das Besondere ist, dass es in den Sporen zwei distinkte Protein-Punkte darstellt, die ausgestochen und analysiert werden konnten. Es handelte sich bei beiden um das peroxisomale Membranprotein, das eines der Hauptallergene (Asp f3) in *A. fumigatus* darstellt. Nach einer Inkubation von acht Stunden zeigte sich eine starke Hochregulation dieser beiden Proteine. Sie stellten sich auf den Gelen der 2D-PAGE der auskeimenden Sporen und des Myzels als ein großer Protein-Cluster dar. Eine Analyse des benachbarten MY 18(2D), sowie der der Proteine SP 28(2D), SP 27(2D), AS 10(2D) zeigte, dass es sich auch bei diesen um das Allergen Asp f3 handelt. In der 2D-Analyse kann es zu einer Verschiebung im pI-Wert eines Proteins kommen, so genannten „Streak“-Bildung. Dieses Phänomen kann verschiedene Ursachen haben, unter anderem kann es postranslational zu unterschiedlichen Phosphorylierungen des Proteins kommen. Ebenso kann es zur Bildung von Bruchstücken kommen, wie das Beispiel des AS 10(2D)-Proteins zeigt, das ein Molekulargewicht von 12 kDa, anstatt der 18 kDa des Protein-Clusters, aufweist. Durch die massive Hochregulation des peroxisomalen Membranproteins in der Phase der auskeimenden Sporen und im Myzel, könnte die Denaturierung zur Bildung von Bruchstücken führen, die sich sowohl im pI als auch im Molekular anders verhalten als das intakte Protein.

25.3 Differentiell exprimierte Proteine der Hyphen

Einundzwanzig der differentiellen Proteine wurden in der Fraktion der Hyphen gefunden. Die eindeutige Identifizierung gelang bisher bei sieben. Bei diesen Proteinen handelt es sich sowohl um zytosolische als auch um solche, die von den pilzlichen Hyphen sekretiert

werden. Erstere werden nachfolgend behandelt, während die sekretierten Proteine am Ende dieses Abschnitts diskutiert werden.

25.3.1 Mangan-abhängige Superoxiddismutase

Ein hyphenspezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 23 kDa wurde in den Gelen der eindimensionalen SDS-PAGE nachgewiesen. Mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte es als die Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) aus *A. fumigatus* identifiziert werden. Die MnSOD wird auch als Asp f6 bezeichnet und ist eines der Hauptallergene von *A. fumigatus* (Cramer *et al.*, 1996).

Frühere Arbeiten zeigten, dass die α -MnSOD-IgE-Antikörper in ABPA-Patienten nicht nur mit der humanen MnSOD, sondern auch mit den hoch homologen Proteinen aus der Maus, aus *Drosophila* und *E. coli* reagierten (Fluckiger *et al.*, 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit der mAk M1-A12 auf seine Reaktivität mit verschiedenen MnSOD getestet. Tatsächlich wurde die MnSOD in der Fraktion der Hyphen in *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger* und *A. flavus* durch den mAk M1-A12 erkannt. Der mAk M1-A12 reagierte dagegen mit der MnSOD aus *N. crassa* (69% Identität), aus *E. coli* (45% Identität), aus der murinen J774-Zelllinie und der humanen HeLa-Zelllinie nicht. Das weist darauf hin, dass das Epitop des mAk M1-A12 nicht identisch mit dem IgE-Epitop ist, welches für die oben beschriebene Kreuzreaktivität verantwortlich ist. Aufgrund seiner Spezifität für MnSOD verschiedener Aspergillus-Spezies könnte dieser Antikörper ein wertvolles Werkzeug zur Detektion von Asp f6 in klinischen Proben und Umweltproben sein.

Mitochondrien stellen die größte Quelle endogen produzierter ROS in eukaryontischen Zellen dar und sind extrem anfällig gegen oxidative Zerstörung (Raha & Robinson, 2000). Auch im Ruhezustand wird im Menschen 1-2% des konsumierten Sauerstoffs in der Elektronentransportkette in Superoxidradikale umgewandelt (Boveris, 1977). Bei den Superoxidradikalen handelt es sich um geladene Moleküle, daher ist es ihnen kaum möglich, die Mitochondrienmembran zu passieren. Aus diesem Grund müssen Superoxidradikale in den Mitochondrien selbst eliminiert werden. Diese Aufgabe übernehmen die Mangan-abhängigen Superoxiddismutasen (Zhu & Scandalios, 1992). Im Genom von *A. fumigatus* gibt es nur ein Gen für die MnSOD. Die Abwesenheit der MnSOD in den ruhenden Konidien und den auskeimenden Konidien deutet darauf hin, dass der Atmungszyklus in dieser Phase der Germination nur in geringem Umfang aktiv

ist. Diese Vermutung stimmt mit den Beobachtungen von Hawley und Greenawalt überein, die während der Germination des nahe verwandten filamentösen Pilzes *N. crassa* die Produktion von Ethanol und ATP über die Substratkettenphosphorylierung beobachteten (Hawley & Greenawalt, 1975). Einige Komponenten der Atmungskette, wie die Cytochrom-c-Oxidase, sind in den Mitochondrien der auskeimenden Sporen aus *N. crassa* (Stade & Brambl, 1981) und *Botryodiplodia theobromae* (Brambl & Josephson, 1977) präsent und aktiv. Sie werden aber wahrscheinlich nur benutzt, um Reduktionsäquivalente zu produzieren, um z.B. NAD^+ oder NADP^+ zu regenerieren.

Seren von Patienten, die an atopischem Asthma oder allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA) leiden, besitzen IgE-Antikörper gegen über 40 verschiedene Aspergillus-Proteine (Cramer, 2002). Da eine ABPA-Erkrankung zu einer irreversiblen Veränderung der Lungenfunktion und zu pulmonaler Fibrose führen kann, ist es wichtig, ABPA-Patienten von *A. fumigatus*-sensibilisierten asthmatischen Personen zu unterscheiden. Durch den diagnostischen Einsatz der rekombinanten *A. fumigatus*-Allergene, Asp f6 und Asp f4, in Hauttestreaktionen kann bei *A. fumigatus*-sensibilisierten asthmatischen Personen zwischen einer ABPA und einer pilzlichen Sensibilisierung unterschieden werden. Aus diesem Grund kommt dem intrazellulären Protein MnSOD (Asp f6) eine besondere Bedeutung zu (Hemmann *et al.*, 1999). Die Ursachen für diese spezifische IgE-Antwort in ABPA-Patienten waren bis jetzt noch ungeklärt.

Die ABPA ist eine Typ I und Typ III Hypersensibilität gegenüber dem Schimmelpilz *A. fumigatus*, der in diesen Patienten auf der Schleimhaut der Atemwege wächst (Marr *et al.*, 2002). Sowohl Patienten, die an atopischem Asthma leiden, als auch Patienten mit einer ABPA sind Allergenen ausgesetzt, die von ruhenden oder auskeimenden Konidien stammen. Bei hyphenspezifischen Proteinen muss man zwischen zytosolischen und sekretierten Proteinen unterscheiden. So findet man sekretierte Proteine wie das Mitogillin im Hausstaub (Sporik *et al.*, 1993), dagegen ist bei einer allergischen Reaktion auf intrazelluläre, nicht-sekretierte Proteine wahrscheinlich die Lyse der Zellen notwendig, um relevante Proteinkonzentrationen zu erreichen. Durch residente Makrophagen in der Lunge werden ruhende Konidien von *A. fumigatus* lysiert. Dies ist ein Ereignis, das täglich in jeder menschlichen Lunge abläuft. Die Lyse von Hyphen ist dagegen auf Patienten beschränkt, die eine Pilzkolonisierung aufweisen. Bei einer ABPA-Erkrankung kommt es zu einer transienten Kolonisierung der Lunge (Greenberger & Patterson, 1987; Wardlaw & Geddes, 1992; Latge, 1999). Die dabei entstehenden Hyphen werden in der Lunge durch

Neutrophile angegriffen und lysiert (Schaffner *et al.*, 1986), was bedeutet, dass ABPA-Patienten nicht nur sekretierten Proteinen und intrazellulären Konidien-Proteinen, sondern auch intrazellulären Hyphen-Proteinen ausgesetzt sind. Differentiell exprimierte Proteine, die spezifisch für die Hyphen sind, wie die MnSOD, könnten deshalb Hauptkandidaten für Allergene sein, die für die Unterscheidung zwischen ABPA-Patienten und Patienten, die an atopischem Asthma leiden, eingesetzt werden.

25.3.2 CipC

Das Protein MY 1(2D) ist ein dominierender Protein-Spot auf den Gelen der Hyphen in der 2D-PAGE. MY 1(2D) zeigt hohe Homologie zu dem CipC Protein (Concanamycin induziertes Proteine) aus *A. nidulans* und wurde sowohl in den Gelen der eindimensionalen SDS-PAGE als auch in den Gelen der zweidimensionalen PAGE identifiziert. Melin *et al.* wiesen dieses Protein in *A. nidulans* mit Hilfe einer 2D-PAGE-Analyse nach einer Antibiotikabehandlung mit Concanamycin A nach (Melin *et al.*, 2004). Diese Substanz ist ein effektiver Inhibitor von vakuolären ATPasen und bewirkt in filamentösen Pilzen eine dramatische Veränderung der Morphologie (Melin *et al.*, 2004). In *A. nidulans* wird CipC zusammen mit CipA und CipB nach Zugabe von Concanamycin A zum Wachstumsmedium überexprimiert (Bowman *et al.*, 1988; Melin *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 1999; Melin *et al.*, 2004). Die Funktion dieser Proteine ist bislang unbekannt. Vielleicht hängt die Expression dieses Proteins von *A. fumigatus* mit der verstärkten Bildung von Vakuolen in den Hyphen zusammen.

25.4 Untersuchung sekretierter Proteine der Myzel-Hyphen

Bei der großen Mehrheit der mit der pilzlichen Zellwand verbundenen Proteine, handelt es sich um sekretierte Proteine, die vorübergehend auf der Zelloberfläche gefunden werden können, bevor sie in die extrazelluläre Umgebung sekretiert werden (Klis, 1994). Die meisten dieser Proteine fungieren als Enzyme, die der Pilz benötigt, um in seiner natürlichen Umgebung überleben zu können (Bernard *et al.*, 2002).

Über die Proteinsekretion von *A. fumigatus* war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Die meisten Untersuchungen, die sich mit sekretierten Proteinen befassten, taten dies mit dem Ziel, Markerproteine für diagnostische Zwecke zu identifizieren. Proteine aus Kulturüberständen wurden für den Nachweis von Antikörpern gegen *A. fumigatus*-Proteine in humanen Seren verwendet (Weig *et al.*, 2001a; Latge *et al.*, 1991). Durch

Immunisierung mit *A. fumigatus*-Kulturüberständen wurden polyklonale Antikörper hergestellt, mit deren Hilfe Aspergillus-Proteine im Urin und Serum von Patienten und experimentell infizierten Ratten detektiert wurden (Latge *et al.*, 1991; Haynes *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1990).

Eine Reihe von Studien beschäftigten sich mit der Auswirkung von Proteinen und anderen Substanzen aus Kulturüberständen auf die Aktivität der Wirts-Abwehrmechanismen (Murayama *et al.*, 1996; Murayama *et al.*, 1998; Bertout *et al.*, 2002; Kamei *et al.*, 2002). In keiner dieser Studien wurden jedoch die Bedingungen, unter welchen der Pilz Proteine sekretiert, näher untersucht. In dieser Arbeit sollten daher zunächst die Auswirkungen des Wachstumsmediums, der Temperatur und der Inkubationszeit auf die Proteinsekretion untersucht werden. Da die Proteine der Kulturüberstände bis auf das 18 kDa große Mitogillin nicht bekannt waren, wurden die stärksten Banden mit Hilfe einer N-terminalen Sequenzierung oder später einer LC-MS/MS-Analyse identifiziert.

Die Proteine wurden zunächst in AMM bei 37°C stehend inkubiert. Unter diesen Wachstumsbedingungen konnten während der ersten drei Tage lediglich zwei Proteinbanden auf den Gelen der eindimensionalen SDS-PAGE detektiert werden. Durch einer N-terminale Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem p17 um das Ribotoxin Mitogillin (p17) (Latge *et al.*, 1991; Weig *et al.*, 2001a) und beim p27 um ein Protein mit hoher Homologie zu einer Chitosanase aus *A. oryzae* (p27) handelt (Zhang *et al.*, 2001). Eine japanische Arbeitsgruppe beschrieb kurz darauf zwei Chitosanasen mit den Molekulargewichten von 111 kDa (Chitosanase I) und 23 kDa (Chitosanase II) im *A. fumigatus*-Stamm KB-1 (Eom & Lee, 2003). Der N-Terminus (YNLPNNLKQIYDKHK) der Chitosanase II, die Chitosan in kleine Zucker-Oligomere spaltet, ist identisch mit der N-terminalen Sequenz des in dieser Arbeit identifizierten p27.

Die Wahl des Wachstumsmediums erwies sich als entscheidend für die Proteinsekretion. Während Mitogillin und Chitosanase die dominierenden Proteine bei einem Wachstum in AMM darstellten, konnte ein weiteres dominantes Protein nach Wachstum in dialysiertem Hefe-Glukose-Medium (YG_{dial}) identifiziert werden. Für die Untersuchung sekretierter Proteine wurde YG_{dial} mit einer Porenausschlussgröße von 6000 bis 8000 Da verwendet, um Kontaminationen durch Hefe-Proteine zu verhindern. Das Protein (p37) wies ein Molekulargewicht von 37 kDa auf und wurde durch eine N-terminale Sequenzierung als Aspergillopepsin i (Reichard *et al.*, 1995) identifiziert. Im Gegensatz dazu fand in serumfreien Zellkulturmedium RPMI 1640 geringes Wachstum und keine detektierbare

Proteinsekretion statt. Durch Mischversuche von RPMI 1640-Medium mit AMM konnte bei ungefähr gleichem Wachstum eine deutlich reduzierte Proteinsekretion durch Zugabe von RPMI 1640-Medium beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Proteinsekretion ein stark regulierter Prozess ist.

Wurde eine Wachstumszeit von drei Tagen überschritten erschienen neben dem Mitogillin und der Chitosanase weitere Proteinbanden auf den Gelen der eindimensionalen SDS-PAGE. Dieser Zeitpunkt markiert den Übergang der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase. Obwohl zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Anstieg bei der Zahl der sekretierten Proteine zu beobachten war, blieb das Proteinmuster auf den Gelen weiterhin distinkt, und entsprach nicht dem komplexen Proteinmuster eines *A. fumigatus*-Lysates. Eine MALDI-Analyse zweier Proteine, die während der stationären Wachstumsphase in Erscheinung traten, zeigte, dass es sich um eine Chitinase (p48) und eine β -(1-3)-Endoglucanase (p70) handelte. Beide Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz und können aus diesem Grund auf dem normalen Proteinsekretionsweg aus der Zelle ausgeschleust werden. Eine Sequenzanalyse unter der Verwendung des DGPI Algorithmus ergab keinen Hinweis auf GPI-Anker in diesen Proteinen. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie konstitutiv exprimiert werden, aber erst durch eine Reorganisation der Zellwand, beim Übergang in die späte Wachstumsphase, in das Medium gelangen. Wie bereits erwähnt, konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gezeigt werden, dass sich das Wachstum in AMM günstig auf die Proteinsekretion von *A. fumigatus* auswirkt, während durch Wachstum im komplexen YG_{dial} Medium andere Proteine sekretiert werden und im serumfreien Zellkulturmedium RPMI 1640 keine detektierbare Proteinsekretion stattfindet. Eine Erklärung für die gesteigerte Proteinsekretion nach verlängerter Wachstumszeit in AMM könnten die vorherrschenden Bedingungen in diesem Medium sein. Diese Theorie würde auch die Ergebnisse der Versuche erklären, in denen das AMM mit dem Zellkulturmedium RPMI 1640 in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt wurde und die sekretierten Proteine nach 120h analysiert wurden. Diese Versuche zeigten, dass durch die Erhöhung der Konzentration an RPMI 1640-Zellkulturmedium im AMM die Proteinsekretion bei vergleichbarem Wachstum abnahm.

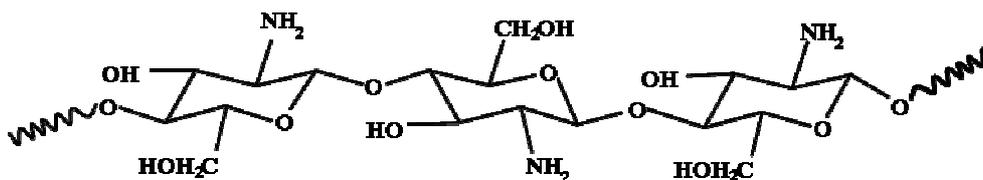


Abb. 55: Struktur von Chitosan. Chitosan besteht aus teilweise deacetylierten N-Acetyl-Glukosamineinheiten, die durch eine β -1,4-Bindung verbunden sind.

Durch die Sekretion von Chitosanase, später Chitinase und β -(1-3)-Endoglucanase versucht *A. fumigatus* möglicherweise, in der Umgebung vorhandene Kohlenstoffquellen zu erschließen. Im natürlichen Lebensraum der Pilze ist Chitin eines der vorherrschenden Polymere. Um die Glukose aus dem Chitosan verwerten zu können, werden die β -1,4-Bindungen zwischen den D-Glukosamin-Resten in partiell acetylierte Chitosaneinheiten gespalten. Das Exoskelett vieler Insekten besteht aus Chitin und Pilze enthalten, abhängig von der Art, in der Zellwand häufig Chitin, Chitosan sowie Glukan und Mannan. Durch die sekretierten Proteine Chitosanase, β -(1-3)-Endoglucanase und Chitinase könnte sich *A. fumigatus* einen Vorteil im Kampf gegen Konkurrenten verschaffen. Sowohl in Hinblick auf vorhandene Nährstoffe als auch als Schutz durch andere Pilze.

Mitogillin ist ein Ribotoxin, das eukaryontische Proteinbiosynthese in zellfreien Extrakten blockieren kann (Fando *et al.*, 1985). Da es während der Infektion zur Sekretion kommt, wird es als eine mögliche Virulenzdeterminante diskutiert (Lamy *et al.*, 1991). Gegen eine solche Vermutung spricht jedoch, dass Mitogillin-Mutanten keine herabgesetzte Virulenz in einem Maus-Modell der invasiven pulmonalen Aspergillose zeigten (Smith *et al.*, 1994). Zudem konnten Ribotoxin-Gene in einer Reihe von nicht-pathogenen Aspergillus-Spezies nachgewiesen werden. *A. giganteus* ist ein Beispiel für einen nicht humanpathogenen Aspergillus-Stamm, der ein Ribotoxin-Gene besitzt (Martinez-Ruiz *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige filamentöse Pilze während des Wachstums Mitogillin bzw. verwandte Proteine sekretieren, das Protein jedoch für die Pathogenität nicht von Bedeutung ist, sondern möglicherweise dem Schutz vor Konkurrenten dient.

Obwohl in einigen Arbeiten beschrieben wurde, dass *A. fumigatus*-Kulturüberstände biologisch aktive Substanzen beinhalten, die sowohl die Hemmung der Sporengermination durch alveolare Makrophagen als auch die Zerstörung der Hyphen durch neutrophile Granulozyten unterdrücken (Murayama *et al.*, 1996; Murayama *et al.*, 1998; Bertout *et al.*, 2002), konnten diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es

gelang nicht, eine toxische Wirkung von Mitogillin-enthaltenden Kulturüberstand auf Vero-Zellen und Zellen einer humanen Lungeneithelzelllinie *in vitro* nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Sekretion des Mitogillins und der Chitosanase gekoppelt sind. In früheren Studien, die *A. fumigatus*-Kulturüberstände benutzten, um Antikörper in Seren von Patienten mit einer invasiven Aspergillose nachzuweisen, konnte neben Mitogillin zumeist auch eine Bande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 28 kDa detektiert werden (Latge *et al.*, 1991; Weig *et al.*, 2001a). Bei diesem Protein handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die, in dieser Arbeit beschriebene Chitosanase, die dasselbe Molekulargewicht besitzt.

Rekombinant hergestelltes Mitogillin wurde bereits in früheren Studien verwendet, um spezifische Antikörper in Seren von Patienten, die an einer *A. fumigatus*-Infektion leiden, zu detektieren (Weig *et al.*, 2001a). Wie bereits erwähnt, wird *in vitro* die Chitosanase zusammen mit dem Mitogillin sekretiert und wahrscheinlich kommt es auch während einer Infektion im Menschen zu einer Sekretion beider Proteine. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit sowohl für die Chitosanase als auch für das Mitogillin gereinigte rekombinante Histidin-gekoppelte Proteine hergestellt. Sieben Seren von Patienten mit einem Aspergillom und vier Seren von Patienten mit einer invasive Aspergillose wurden mit Hilfe einer „Western Blot“-Analyse auf spezifische Antikörpern untersucht. Während in Seren von gesunden Patienten keine Reaktivität detektiert werden konnte, zeigte sich eine deutliche Reaktivität aller Patientenserum sowohl mit Mitogillin als auch mit Chitosanase. Dies zeigt, dass (i) die Chitosanase während einer Infektion zusammen mit dem Mitogillin gebildet wird und (ii) beide Proteine sekretiert werden, da sie in Seren von Patienten nachweisbar sind. Wie bereits erwähnt, konnte in früheren Studien, in denen sekretierte Proteine für die Detektion von *A. fumigatus* spezifischen Antikörper eingesetzt wurden, neben dem Mitogillin ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa nachgewiesen werden (Haynes *et al.*, 1990; Weig *et al.*, 2001a). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann dieses Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit als die Chitosanase identifiziert werden.

Studien, die versuchten *A. fumigatus*-Proteine im Urin von menschlichen Patienten nachzuweisen, zeigten, dass ein 28 kDa-Protein annähernd gleich oft wie das 18 kDa-Protein detektiert werden konnte (Haynes *et al.*, 1990). In infizierten Ratten war ein 27 kDa-Protein sogar gegenüber dem 18 kDa-Protein vorherrschend (Yu *et al.*, 1990). Der Nachweis von Mitogillin und Chitosanase im Urin von Patienten, welche an einer

Aspergillus-Infektion leiden, wird durch den Mangel an spezifischen Nachweismethoden und Reagenzien erschwert. Durch die Antikörper, die in dieser Arbeit gegen die sekretierten Proteine Mitogillin und Chitosanase hergestellt wurden, stehen nun Werkzeuge für weitere Versuche und mögliche Anwendungen in der Diagnostik zur Verfügung.

26 Schlussfolgerung

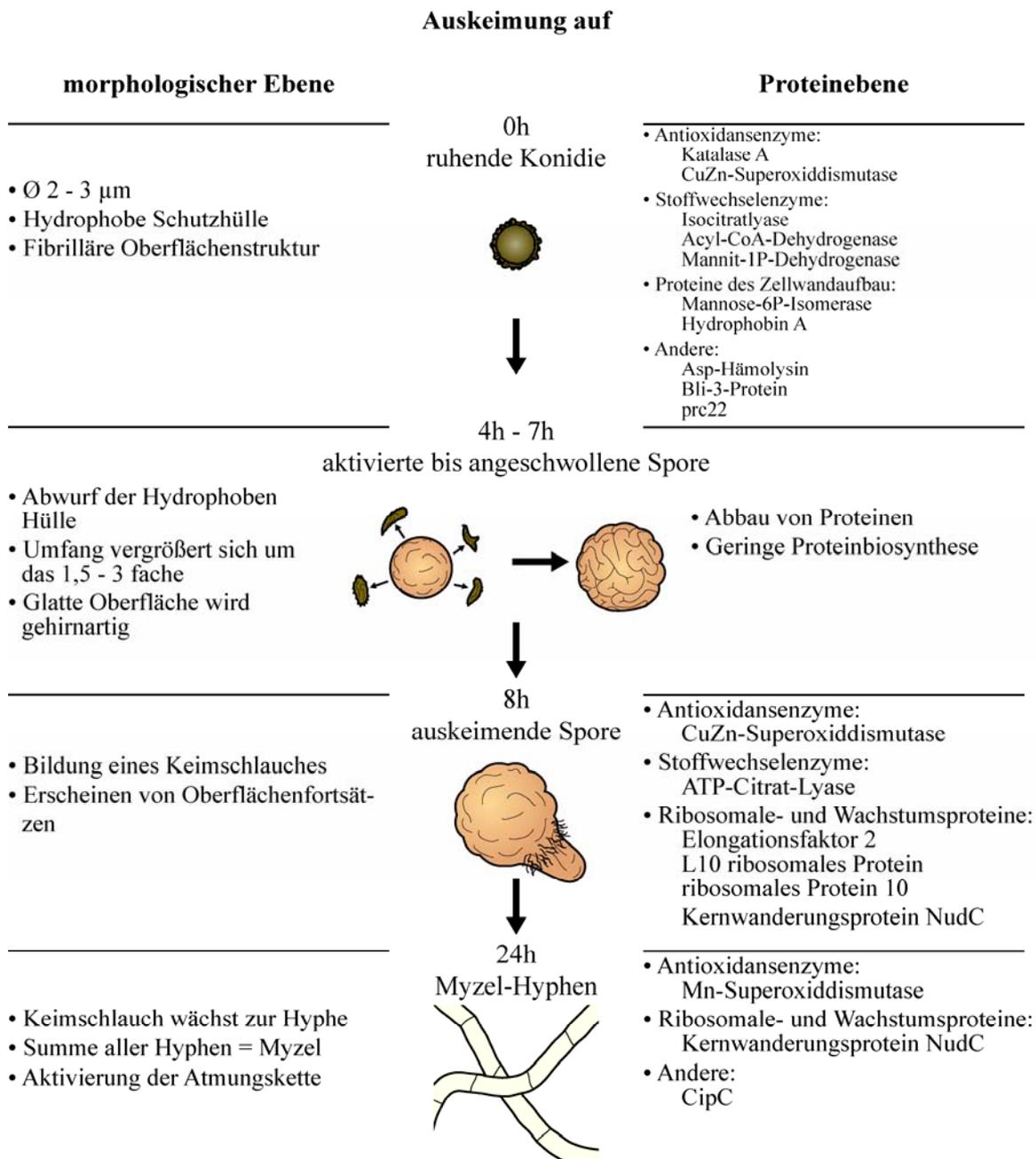


Abb. 56 Schematische Darstellung des Auskeimungsvorganges. Morphologische Veränderungen sind den Vorgängen auf Ebene der Proteine gegenübergestellt.

Durch die Versuche dieser Arbeit konnte der während der Auskeimung ablaufende Differenzierungsprozess des humanpathogenen Schimmelpilzes *A. fumigatus* genauer beschrieben werden. Dies war einmal auf morphologischer Ebene mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie möglich (vgl. Abb. 56, links). Zum anderen wurden mit Hilfe verschiedener Methoden Proteine gefunden, die in den Differenzierungsstadien Sporen, auskeimende Sporen und Hyphen einer unterschiedlichen Regulation unterliegen. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern konnten einige dieser Proteine näher untersucht werden.

Die Sporen sind von einer hydrophoben Hülle umgeben, die sie in den ersten Stunden der Auskeimung in einem aktiven Prozess abwerfen. Dieser Abwurf ist notwendig, um anschwellen zu können. In dieser Phase findet ein bemerkenswert schneller Proteinabbau bestimmter Proteine statt. Beispielsweise wird das sporenspezifische Protein CatA innerhalb von acht Stunden vollständig degradiert. Der Proteinabbau ist ein wichtiger Prozess für die frühe Phase der Auskeimung. Wahrscheinlich findet dabei kaum Proteinbiosynthese statt. Proteine wie CatA könnten der Zelle als Aminosäurespeicher dienen, um in einer späteren Auskeimungsphase eine effektive Proteinbiosynthese zu ermöglichen. Andere Proteine werden nicht abgebaut, wenn sie für das Wachstum benötigt werden. Dies ist z.B. bei der ICL während des Wachstums auf Acetat, anderen C₂-Verbindungen oder möglicherweise auch während einer Infektion der Fall.

Die Phase der auskeimenden Sporen ist morphologisch durch das Erscheinen eines Keimschlauches an einer bestimmten Stelle der angeschwollenen Konidie gekennzeichnet. In dieser Phase werden vor allem ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren und andere Proteine, die für ein schnelles Wachstum benötigt werden, produziert.

In den Hyphen wird insbesondere die MnSOD hochreguliert. Dieses Protein übernimmt in den Mitochondrien eine wichtige Funktion bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies, die in einer funktionierenden Atmungskette anfallen. Die hyphenspezifische Expression dieses Proteins weist darauf hin, dass die Atmung erst in der späten Wachstumsphase eine Rolle bei der Energieproduktion spielt. Die MnSOD, als Allergen Asp f8, ist zudem ein bedeutendes und spezifisches Protein bei der Diagnose einer ABPA-Erkrankung und die differentielle Expression der MnSOD erklärt vermutlich diese diagnostische Bedeutung.

A. fumigatus sekretiert in AMM in der späten Wachstumsphase Proteine, unter anderem das Mitogillin und die Chitosanase. In dieser Arbeit konnte über den Nachweis spezifischer Antikörper Evidenz dafür erbracht werden, dass beide Proteine während einer invasiven

Aspergillose-Infektion sekretiert werden. Spezifische mAk gegen Mitogillin und Chitosanase können daher für die Diagnostik dieser schwerwiegenden Erkrankung bedeutend sein. Diese Antikörper wurden in dieser Arbeit hergestellt und stehen somit für weitere Versuche zu Verfügung.

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, alle Proteine, die in den verschiedenen Differenzierungsstadien unterschiedlich reguliert werden, zu identifizieren. Gründe hierfür waren: (i) MALDI- und LC-MS/MS-Analysen waren erst im letzten Jahr dieser Arbeit möglich. Diese Analysen sind zeitaufwändig und noch sind nicht alle Proben analysiert. (ii) Bei einigen Proben traten technische Probleme auf. (iii) Eine Reihe von Proteinen wurden als hypothetische ORFs identifiziert, die aber keine Homologien zu bekannten Proteinen bzw. Domänen aufwiesen und daher bisher nicht weiter charakterisiert bzw. beschrieben werden konnten.

Weitere Fortschritte, in der Annotierung des Genoms von *A. fumigatus* werden die Identifizierung weiterer Proteine in nachfolgenden Arbeiten sicher erleichtern. Für die nähere Untersuchung dieser und weitere Proteine stellt die generierte Antikörperbank mit Sicherheit ein wertvolles Hilfsmittel dar, das zu schnellen und weiterführenden Ergebnissen bei der Untersuchung dieses Pilzes führen kann.

Insgesamt betrachtet hat der proteomische Ansatz zur Untersuchung der Auskeimung von *A. fumigatus* zu einer Reihe sehr unterschiedlicher Ergebnisse geführt, die bereits zum heutigen Zeitpunkt erste Einblicke in die Regulation biochemischer Prozess ermöglichen, aber auch zu möglichen Anwendungen im diagnostischen Bereich führen können.

ZUSAMMENFASSUNG

A. fumigatus ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der ubiquitär in der Luft verbreitet ist. Die Sporen dieses Schimmelpilzes sind aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage, die Alveolen der Lunge zu erreichen, wo sie im Normalfall durch Immunkomponenten eliminiert werden. *A. fumigatus* ist der häufigste Erreger meist tödlich verlaufender invasiver Schimmelpilzmykosen bei stark immunsupprimierten Patienten, aber auch ein häufiger Mitverursacher von allergisch-asthmatischen Erkrankungen. Die invasive Aspergillose ist die vorherrschende und schwerwiegendste Form der Aspergillose in immunsupprimierten Patienten.

Die Auskeimung von *A. fumigatus*-Sporen wird als initialer Schritt einer invasiven Aspergillose angesehen. Da wenig über die beteiligten Mechanismen bekannt war, wurden sie in dieser Arbeit näher untersucht. Die Untersuchungen beßten sich vor allem mit drei während der Auskeimung auftretende Differenzierungsstadien: die ruhenden Konidien, die auskeimenden Sporen und die Hyphen des Myzels.

Durch die Untersuchungen mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops war es möglich, morphologische Veränderungen zu detektieren. Ruhende Sporen besitzen eine Größe von 2-3µm und sind von einer fibrillären hydrophoben Zellhülle umgeben. Um auskeimen zu können, müssen Sporen diese Hülle in einem aktiven Prozess abwerfen und schwellen dann auf ihren 1,5- 3fachen Umfang an. Angeschwollene Konidien weisen eine „gehirnartige“ Morphologie auf, die sich mit der Bildung eines Keimschlauchs ändert. An jungen Keimschläuchen konnten kurze Oberflächenfortsätze auf den ersten 2-7µm detektiert werden, die am aktiven Adhäsionsprozess der auskeimenden Konidien beteiligt sein könnten.

Mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen SDS-PAGE war es möglich phasenspezifische Proteine zu identifizieren. Dafür musste zunächst eine geeignete Aufschlussmethode etabliert werden. Durch den Aufschluss im MSK-Zellhomogenisator gelang die reproduzierbar Extraktion intakter Proteine aus allen drei Differenzierungsstadien. Anschließend wurde durch den visuellen Vergleich 1D- und 2D-PAGE Gele differentielle Proteine gesucht. Phasenspezifische Proteine wurden mit Hilfe der LC-MS/MS-Analyse vom Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU analysiert. Das Genom von *A. fumigatus* ist noch nicht vollständig annotiert, was ein Problem für diese Arbeit darstellte. So war es nicht möglich jedes Protein eindeutig zu identifizieren. Insgesamt wurden 63 differentielle

Proteine gefunden, von denen 40% den ruhenden Konidien, 28% den auskeimenden Sporen und 32% den Hyphen zugeordnet werden konnten. Auffällig war die Tatsache, dass die meisten phasenspezifischen Proteine in den ruhenden Konidien zu finden waren. In diesem Differenzierungsstadium wurden Proteine für die Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies gefunden, wie die Katalase A und eine CuZn-abhängige Superoxiddismutase. Proteine des Stoffwechsels waren eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, eine Mannit-6-Phosphat-Isomerase und eine Isocitratlyase. Zudem wurde ein Hämolyysin, das an der Lyse von roten Blutkörperchen beteiligt sein könnte und ein Bli-3-homologes Protein, dessen Funktion nicht bekannt ist, identifiziert. Durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern war es möglich, die Katalase A und die Isocitratlyase näher zu untersuchen. Diese Proteine unterliegen im Verlauf der Auskeimung einem raschen Abbau, was zu der Annahme führt, dass diese Proteine sobald sie nicht mehr benötigt werden, effizient abgebaut werden. Versuche mit Inhibitoren zeigten, dass Proteaseaktivität möglicherweise für den Auskeimungsprozess essentiell ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass in der ersten Phase der Auskeimung kaum Proteinbiosynthese stattfindet. Tatsächlich ist die Differenzierungsphase der auskeimenden Sporen geprägt durch die Hochregulation von ribosomalen Proteinen, die für die Proteinbiosynthese und das Wachstum benötigt werden.

Die Proteine der Hyphen werden in zytosolische und sekretierte Proteine unterschieden. Die Mangan-abhängige Superoxiddismutase ist ein Schutzzym gegen freie Sauerstoffradikale. Sie wurde in dieser Arbeit als hyphenspezifisches Protein identifiziert. Außerdem wurde noch ein CipC-homologes Protein gefunden, dessen Funktion noch unklar ist. Die Untersuchung sekretierter Proteine führte zu der Identifizierung des ribotoxins Mitogillin, einer Chitosanase und der Protease Aspergillopepsin i. Die Untersuchung von Seren aus Patienten mit invasiver Aspergillose ergab Evidenz dafür, dass das Mitogillin und die Chitosanase auch im Körper zusammen sekretiert werden. Durch die monoklonalen Antikörper, die in dieser Arbeit u.a. gegen die Mangan-abhängige Superoxiddismutase und die sekretierten Proteine Mitogillin und Chitosanase hergestellt wurden, stehen nun Werkzeuge für weitere Versuche und mögliche Anwendungen in der Diagnostik zur Verfügung.

ANHANG

SP 2 (1D)

gi|2493538; Score: 173; theoretisches Molekulargewicht 84498 Da; errechneter pI 6,56

1 MATKIAGGLH RAQEVLRQNTS SKSKKLVLDLE **RD**TADAHT**QQ** **PL**TTDHG**VRV** **SNT**DQWLRVT NDRR**TG**PSLL
 61 **ED**QIAREKIH RFDHERIPER VVHARGTGAF GNF**KL**KESIE **DL**TYAG**VL**TD **TS**RNTPVFVR FSTVQGSRG
 121 ADTVRDVRGF AV**KFY**TDEGN **WD**IVGN**NI**PV **FF**IQDAV**K**FP D**FV**HAVKPEP HNEVPQAQTA HNNFWDFVYL
 181 HPEATHMFMW AMSDRAIPRS YRMMQGFQVN TFALVNKEGK RHFVKFWHIP HLG**VH**SLVWD EALKLGGQDP
 241 DFHRKDLMEA IDNKAYPKWD FAIQVIPEEK QDD**FE**FDILD ATKIWPENLV PLRVIGELER NRVNDEFFPQ
 301 TEQVAFCTSH IVP**GI**DFTDD PLLQGRNFSY FDTQISRLGI NWEELPINRP VCPVLNHN**RD** GQMRHR**IT**Q**G**
 421 **TV**NYWPN**RFE** **AV**PPT**GT**KGS **GV**GGG**FT**YP **QR**VEGIKNRA LNDKFREH**HN** QAQLFYNSMS EHEK**LH**MKKA
 481 F**SF**ELDH**CDD** PTVYERLAGH RLAEIDLELA QK**VA**EMV**GAP** IPAKALKQNH GR**RAP**HL**SQT** **EF**IPKNPTIA
 541 **SR**RIAIIGD GYDPVASTGL KTAIKAASAL PFIIGTKRSA IYATEDKTSS **KGI**IPDH**HYD** **GQR**ST**MF**DAT
 601 **FIP**GGPH**VAT** **LR**QNGQIK**YW** **I**SET**FG**HL**KA** LGATGEAVDL VKETLSGTLH VQVASSQSPE PVEWYGVVTA
 661 GGKQKPESFK ES**VQ**ILKGAT D**FV**GK**FF**Y**QI** **SQ**HRNYQREL DGLASTIAF

NCBI-Blast gegen nr (non redundant):

- Katalase A (CatA) (*A. fumigatus*)
Identität = 98%, Homologie = 98%
- Katalase A (CatA) (*A. oryzae*)
Identität = 80%, Homologie = 86%
- Katalase A (CatA) (*A. nidulans*)
Identität = 77%, Homologie = 84%

SP 13 (1D)

glimmer_7014; Score 57; theoretisches Molekulargewicht 42977 Da; errechneter pI 5,63

1 MGKK**AI**Q**FGG** **GN**IGRGFVAE FLHEAGYEVV FIDVVDKIID ALKSTPSYEV TEVSEEGEKT KTITNYRAIN
 71 KTITNYRAIN SKTNEEDVVK EIGTADVVC AVGPVNLKFI APVIAKGIDA RTASKPVAVI ACENAIGATD
 141 TLR**GF**IEQ**NT** **DK**DR**L**SSMSE RARFANSAID **RIV**PN**QP**NA **GL**NVRIEKFY EWTVEQTPFG EFGHPDIPAI
 211 HWVDDLKPYI ERKLFTVNTG HATTAYYGHM RGKK**MI**ADAL **AD**AEIRQIVH KVLEQTAKLI TTK**HE**ITE**QE**
 281 **Q**NEYVD**TIV**K **R**MSNP**F**LEDN **VE**R**V**GRAPLR KLSRNERFIG **PAS**QLA**E**KGL PFDALLGSIE MALRFQNVPG
 351 DEESAELAKI LKEMSAEEAT GKLTGLEK**HH** **PLY**EPVQ**NI** **AK**VQKDSK

NCBI-Blast gegen nr (non redundant):

- Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase (*A. niger*)
Identität = 73%, Homologie = 84%
- Hypothetisches Protein AN5975.2 (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 71%, Homologie= 81%
- Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenase (*Paracoccidioides brasiliensis*)
Identität = 261/388 (67%), Homologie = 303/388 (78%)

AS 1 (1D)

glimmer_934; Score 94; theoretisches Molekulargewicht 39524 Da; errechneter pI 9,64

1 MEMPLCGMPP EIWKQVVGLP MDSISGADIT FQNRPMRCPC SEEHWLEIRN DTKIITK**ISH DVVGR**ARACV
 71 WIRWFTGTDG GTGTSACRRA RRVLRGGLI LSPGRTNTLL RYVDVDCIRD VGKTLVNRTS GLKNANDSLK
 141 GR**IFEVSLAD LQ**ND**EDHAFR** KVK**LRVDEVO GKN**CLTNFHG LDFTTDKLR LVRKWQSLIE ANVTVK**TTDD**
 211 **YLLRLFAIAF TKRRPNQIKK** TTYARSSQIR AIRK**KMIEIM QREAA**SCSLA QLTHK**LIPEV IGR**EIEKATQ
 281 **GIYPLQNVHI R**KVKLLKAPK FDLGALLNLH ELLSRHHVFI DWWC LDSNSI LTEPFYHTTD LVLLP

NCBI-Blast gegen nr (non redundant):

- Konserviertes hypothetisches Protein (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 96%, Homologie = 98%
- Hypothetisches Protein MG06919.4 (*Magnaporthe grisea* 70-15)
Identität = 90%, Homologie = 96%
- Putatives ribosomales Protein 10, zytosolisch (*N. crassa*)
Identität = 89%, Homologie = 96%

AS 7 (1D)

glimmer_8905; Score: 125; theoretisches Molekulargewicht 19524 Da; errechneter pI 10,24

1 **MVSNEYEQLS SEALEAAR**IC ANKYLVKITG KEGFHLRVRV **HPFHVIR**INK MLSCAGADRL QTGM**RGA**FGK
 71 **PQGTVARVNI** GQIILSVRTR DSNRAAAIEA LRRAMYKFPG RQKIIIVSK**NW GFTPVRRE**DY **IQLR**NEGK**LK**
 141 **QDGAYVQFLR** GHGLIEENMK **RFPSAYENLS QA**

NCBI-Blast gegen nr (non redundant):

- Ribosomales L10 Protein (*Paracoccidioides brasiliensis*)
Identität = 85%, Homologie = 94%
- Hypothetisches Protein AN6083.2 (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 79%, Homologie = 82%,
- Hypothetisches Protein MG03136.4 (*Magnaporthe grisea* 70-15)
Identität = 81%, Homologie = 90%

AS 9 (1D)

NCU06785; Score: 197; theoretisches Molekulargewicht 72581 Da; errechneter pI 8,20

1 MPSATTASTN GANGASASPA PGNLSANDNI RRFAAPSRPL SPLPAHALFN DKTRCFVYGL QPRAVQGM**LD**
 71 FDFICKR**STP SVAGIIYTFG GQFVSK**MYWG TSETLLPVYQ EVPKAIAKHP DVDVVVNFAS SRSVYS**STME**
 141 LMEYPQIKTI AIIAEGVPER RAREIAYVAK KKGITIIIGPA TVGGIKPGCF KIGNTGGMMD NIVASKLYRK
 211 GSVGYVSKSG GMSNELNNII SQTTDGVYEG VAIGGD**RYPG TTFIDHLLR**Y QADPDCKILV LLGEVGGV**EE**
 281 YKVIDAVKQG IITKPIVAWA IGTCASMFKT EVQFGHAGAF ANSQLETAAT KNKSMREAGF YVPDTFED**MP**
 351 ALLKQVYDKL VADGTIVPAP EPVVPK**IPID YSWAQELGLI R**KPAAFISTI SDDR**GOELLY AGMPISDVFK**
 421 EEIGIGGVMS LLWFRRRLPD YAAKFLEMVL MLTADHGPAV SGAMNTIITT RAGK**DLISSL VAGLLTIGSR**
 491 FGGALDGAAE EFTKAFDKGL SPREFVD**TMR KQNKLI**PGIG HRVKSRNNPD LRVELVKEYV KAKFPST**KLL**
 561 DYALAVESVT TSKKDNLILN VDGCI**AVCFV DLLR**NCGAFS TEEAEDYLSM GVLNGLFVLG RSIGLIAH**YL**
 631 DQKRLRTGLY RHPWDDITYL LPSLQ**QPGPP GTEGR**VEVQI

Blast gegen nr (non redundant):

- Hypothetisches Protein MG06719.4 (*Magnaporthe grisea* 70-15)
Identität = 85%, Homologie = 88%
- ATP Citrate Lyase, Untereinheit 1 (*Sordaria macrospora*)
Identität = 90%, Homologie 91%

- Mögliche ATP Citrat Lyase Untereinheit 1 (*N. crassa*)
Identität = 91%, Homologie = 91%

AS 10 (1D)

glimmer_8509; Score: 260, theoretisches Molekulargewicht 93139 Da; errechneter pI 6,51

1 MVNFTIEEIR SLMDRPTNIR NMSVIAHVDH GKSTLTDSMI QRAGIISAAC AGEGRYMDTR PDEQDRGITI
 71 KSTAISLYAK FPDPEDLKEI PQKVDGAEFL VNLIDSPGHV DFSSEVTAAL RVTDGALVVV DCVEGVCVQT
 141 ETVLRQALTE RIKPVLIIINK VDRALLELQV SK**EDLYQSFS** RTVESVNVII ATYHDK**ALGD** VQVYPDRGTV
 211 AFGSGLHGWA FTVRQFAVKY AKKFGVDRKK MLER**LWGDNY** FNPQTKKWK TGEPEQRAFV MFILDPIFKI
 281 **FAAVNNDKTE** **EIHK**LVEKLE IKLASDEKDL K GKALLKVIM RKFLPAADAM LEMICIHLPV PVTAQKYRAE
 351 TLYEGPMDDE CAIGIRDCDP **KAPLMLYVSK** MVPTSDKGRF **YAFGRV**FSGI VKSGLKVRIQ GPNYIPGKKD
 421 DLFVKAIQRT ILMGRFVPEP IEDVPAGNIV GLVGVDQFLL KSGTLTTSET AHNKLVK**FS** **VSPVVQR**GVE
 491 VKNAQDLPKL VEGLKRLSKS DPCVLTMINI SGQHIVAGAG ELHLEICL**KD** **LEEDHAGVPL** RISDPVVSRY
 561 ETVGGESSMT ALSKSPNKHN RLYVTAQPLG EEVSLAIESG KINPRDDFKA RAR**LLADDYG** **WDVTDARKI**W
 631 CFGPDTTGAN LLVDQTKAVQ YLNEIKDSFV SGFQWATREG PIAEPMRSI RFNILDVTLH ADAIHRGGGQ
 701 **IIP**TARRVLY AATLLAEPVSL LEPIFNVEIQ VPEQAMGGIY GVLTRR**RGHV** **YSEEQRP**GTP **LFNVKAYLPV**
 771 **NESFGFN**DL RQATGGQAFP QSVFDHWSIL PGGSPLDPTT KPGQTVAEMR KRKGLK**EQVP** **GYDNY**YDKL

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Elongations Faktor 2 (*Candida albicans*)
Identität = 77%, Homologie = 85%
- Elongations Faktor 2 (*Candida glabrata*)
Identität = 77%, Homologie = 86%
- Elongations Faktor 2 (*Candida tropicalis*)
Identität = 76%, Homologie = 85%

MY 16 (1D)

gi|12231036; Score: 154; theoretisches Molekulargewicht 23363 Da ; errechneter pI 7,14

1 MSQQYTLPLP PYPYDALQPY ISQQIMELHH KKHHTQYVNG LNAALEAQKK AAEATDVPKL VSVQQAIFKN
 71 GGGHINSLF WKNLAPEKSG G GKIDQAPVL KAAIEQRWGS FDKFKDA**FNT** **TLLGIQGS**GW **GWL**VTDGPKG
 141 **KLDIT**TTTHDQ **DPVTGAAPVF** **GVDMWEHAYY** **LQYL**NDKASY AKGIWNVINW **AEAENR**YIAG DKGGHPPMKL

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Mangan abhängige Superoxid Dismutase (*A. fumigatus*)
Identität = 93%, Homologie = 93%
- Superoxid Dismutase [Mn], mitochondrial (Allergen Asp f6)
Identität = 93%, Homologie = 93%
- Mangan abhängige Superoxid Dismutase (*A. oryzae*)
Identität = 64%, Homologie = 76 %

MY 17 (1D)

glimmer 1056; Score: 95; theoretisches Molekulargewicht 12237 Da; errechneter pI 6,16

1 MAWGWEQSDE AHRVYGERR HESSLSHELI AGAASFAGMK AWEDHQKKEG KPVSHAFKAE ALAGFVGAEV
71 DKLIETKGLD EADKIRARRH AKENAERIQH TKIIDSVTP

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Unbenanntes Protein Produkt (*Debaryomyces hansenii*)
Identität = 61%, Homologie = 76%
- Hypothetisches Protein CNBC1030 (*Cryptococcus neoformans*)
Identität = 56%, Homologie = 68%
- CipC protein (*Aspergillus nidulans*)
Identität = 50%, Homologie = 60%

SP 1 (2D)

AN6595.2, Score: 48; theoretisches Molekulargewicht 94604 Da; errechneter pI 9

1 MSASTRIPI AQPFFVSDRAK RVLDLVEEFV EKDCIPAEAV FQAQLGEGEK RWQTNPAVLE ELKAKARKLG
71 LWNMFLPKNH FSQGAGFSNL EYGLMAEYLG KSKLASEATN NSAPDTGNME VLAKYGNEAQ KKQWLAPLLD
141 GKIRSAFLMT EPDVASSDAT NIELNIRREG NEYVLNGSKW WSSGAGDPRC AIYLVMGKSD PTNPDPYRQQ
211 SVILVPAGLP GITVHRMLTV YGYDDAPHGH GHISFNVRV PVSNIIVLGEV RGFEEIQGRL GPGRIHHAMR
281 TIGAAEKALE WLIARVNDDR KKTFFGKPLSA HGVILEWIAK SRIEIDAARL IVLNAAIKID QGDAKSALKE
351 IAQAKVLVPQ TALTVIDRAV QAYGAAGVCQ DTPLANLWAM IRTLRIADGP DEVHLQQLGR RENKSRQDAI
421 VAKLKYQKEE AERLLLANGF QKPKSHL

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Hypothetisches Protein AN2264.2 (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 81%, Homologie = 91%
- Acyl-CoA Dehydrogenase (*Oceanobacillus iheyensis* HTE831)
Identität = 57%, Homologie = 71%

SP3 (2D)

glimmer_7619; Score: 77; theoretisches Molekulargewicht 14355 Da; errechneter pI 4.46

1 MASTTGQQLF DIEIKDDMNG EFYREGDQND TLTTDDIEDM IIRHNGGLRH VCSCGEEKGF KGLQGTIDLI
71 DDV KDAKICT LEWNAPEPG KRNTFMLRDQ DPRYHIDIGQ WNESGILGKV PVTISDE

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Hämolysin (*A. fumigatus*)
Identität = 31%, Homologie = 54%

SP 4 (2D)

glimmer_6042; Score 235; theoretisches Molekulargewicht 22708 Da; errechneter pI 9.02

1 MKSIWDVIMT IAAWPEFLTI IYPLKRKRIP TQCHQYRLAF KILTLKRTAI SRMPK**AYFDH DPITLQEGSH**
 71 **IGAVVGDKTI EPDGMEMVTG EVDR**VIIIRKS **SDSTLELKCT** QDVRFPMPGEQ VILQQLDPVV YAAIGMKS GK
 141 EVEFKETK GK LALNLGLGHY NIVRTNAAFS AMKAEQWAAM GLIFRINIQT TEDKTPLHVA TG

In NCBI wurden keine signifikanten Homologien gefunden

65.2 %: zytoplasmatisch

17.4 %: im Zellkern

8.7 %: mitochondrial

4.3 %: Endoplasmatisches Reticulum

4.3 %: Vesikel des Sekretionssystems

SP 5 2D

AfA31E11.020c; Score 209; theoretisches Molekulargewicht 22103 Da; errechneter pI 5.40

1 MSSTINTSTG NKPVDPYKAK SLEDPPLOQK VEDMVNFISE TK**FGMLTTKL SNSDLLT SRC** MALAGK**EHGG**
 71 **IDLIFHTNLF SSK**TMDLAVH PSEVNMSFLD PVSWSWASIS GTAALVADQE TVKRYSPAL QAWLGDLDGD
 141 VHDGGPGDPR IGVIKLEAKL **ATYAITR**KGM IGRAVETVKS VSK**GDVPAIN SLRELTEEEL** AECKSI

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Putatives Bli-3-Protein (*A. fumigatus*)
 Identität = 92%, Homologie = 92%
- Bli-3-Protein (*N. crassa*)
 Identität = 42%, Homologie = 63%
- Hypothetisches Protein FG09627.1 (*Gibberella zeae PH-1*)
 Identität = 44%, Homologie = 63%

Mit Pyridoxamin 5'-Phosphat Oxidase Domäne in allen drei Proteinen

SP 6 (2D)

glimmer_10157; Score 81; theoretisches Molekulargewicht 30061 Da; errechneter pI 6.71

1 MHRIGQMNC D QRRTFHGQHL ANHHSSKSW EILESWLWEH KNHDNNKNHD NNALSTTTTT TTTTKSFFSN
 71 TNSLTSSLYT FKMSLFHTFH TPGDFAPLFR LLDDYDFHRS TRNQASSVRS FAPRFDVRET NDAYLLDGEL
 141 PGIANKDIEI EFSNDTLVI KGRSER**EYHS GTPEQATQES** **SDDKQK**ESTE VVKSGDKQVS KSDNKKHRFW
 221 VSERSVGEFH RTFQFPTPVD QDNVKASLKN GILSIVVPK **VVNTGARKIT** VE

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- HS30_EMENI 30 kD Hitzeschock-Protein (*A. nidulans FGSC A4*)
 Identität = 66%, Homologie = 79%
- Hitzeschock Protein 30 (*A. oryzae*)
 Identität = 66%, Homologie = 75%
- HS30_EMENI 30 kD Hitzeschock-Protein (*A. nidulans FGSC A4*)
 Identität = 66%, Homologie = 78%

SP 7 (2D)

glimmer_5262; Score: 65; theoretisches Molekulargewicht 25015 Da; errechneter pI 5.78

1 MPDIQPITVY GKGGENPPRV **AII LAELDLP** **HK**VIEVPLSK VKEPDYVAIN PNGRIPAIYD PNTDLTLWES
 71 GAIVEYLVSH YDPDHRISFP AGSNLAALAT QWLFFQASGQ GPYYGQASWF KKFHHEKVPS AIERYVKEIN
 141 RVTGVLEGLH SRQKVAADGD GPWLVGGKCS FADLAWIPWQ VIVTAAIQPE DGYTVEDYPH VKNWLDMMMA
 211 RPGVQKGMAD IFPST

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Hypothetisches Protein MG09138.4 (*Magnaporthe grisea* 70-15) mit Glutathion S-transferase Domäne
 Identities = 60%, Homologie = 74%
- Hypothetisches Protein (*N. crassa*) mit Glutathion S-Transferase Domäne
 Identities = 50%, Homologie = 71%
- Glutathion-S-Transferase (*Botryotinia fuckeliana*)
 Identities = 43%, Homologie = 61%

SP 8 (2D)

glimmer_10157; Score: 269; theoretisches Molekulargewicht 30061 Da; errechneter pI

1 MHRIGQMNCD QRRTFHGQHL ANHHSSKSW EILESWLWEH KNHDNNKNHD NNALTSTTTT TTTTKSFFSN
 71 TNSLTSSLYT FKMSLFHTFH TPGDFAPLFR **LLDDYDFHRS** TRNQASSVRS FAPRFDVRET **NDAYLLDGEL**
 141 **PGIANKDIEI** **EFSDNMTLVI** **KGRSEREYHS** **GTPEQATQES** **SDDKQKESTE** VVKSGDKQVS KSDNKKHRFW
 211 VSERSVGEFH **RTFQFPTVD** **QDNVKASLKN** **GILSIVVPPK** **VVNTGARKIT** VE

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- HS30_EMENI 30 kD Hypothetisches Protein (*A. nidulans* FGSC A4)
 Identität = 66%, Homologie = 79%
- Hypothetisches Protein 30 (*A. oryzae*)
 Identität = 66%, Homologie = 75%
- HS30_EMENI 30 kD Hypothetisches Protein (*A. nidulans* FGSC A4)
 Identität = 66%, Homologie = 78%

SP 9 (2D)

glimmer_318; Score : 115 ; theoretisches Molekulargewicht 21106 Da; errechneter pI 5.97

1 MYTSGPICSH RGREGRSHKL ARIPIPPSEL LLQSTRNKNK AGLFFFYLYS RHPSFDIMVK FGPTVGGNGG
 71 AEYKSFRERP VEQLDVWYGN GTGDNVNKYT ILRGLRIRWA GGEQSRPIGY CPDEEEARVL **HTSFDFERN**
 141 **DDLLESMDIY** **GSASR**VDSLRLVTKDEMDHF EAGGSSIIDS ISVALQLAA

NCBI Blast gegen nr (non redundant):

Es wurden keine signifikanten Homologien zu Proteinen aus NCBI gefunden

Vorhersage aus PSORT II

- 52.2 %: zytoplasmatisch
- 21.7 %: im Zellkern
- 8.7 %: Vesikeln des sekretorischen Sstems
- 4.3 %: Endoplasmatisches Reticulum
- 4.3 %: Vakuolar

4.3 %: Zytoskeletal
4.3 %: Mitochondrial

SP 10 (2D)

glimmer_2635; Score: 77; theoretisches Molekulargewicht 12160 Da; errechneter pI 8.98

1 MGSNQPFKKA NQQSTGHQIN TFTMTSNYNL RRAANPAQNQ AEGLAGEPNL QSQSQTTPGL QSQTSQQK**SO**
71 **QSTFQSSSEST K**QCLGDESKA AWIVPFHQGP TVSSSGVMML YV

NCBI lieferte keine signifikanten Homologien

PSORT II

52.2 %: mitochondrial
34.8 %: im Zellkern
8.7 %: zytoplasmatisch
4.3 %: ER

SP 11 (2D)

glimmer_6158; Score: 56 theoretisches Molekulargewicht 29611 Da; errechneter pI 7.85

1 MRKELEGKLLK RIDTRNFADI EQLKRPEEGY RAIRSSRDDI **RSLPSAEDYK** MHRGLSLLWR HFGIIRATRS
71 LNPVPIAST IYCKKYPHQA FHHNVGKMSS FDKFNGNTAD KPPKNEMVYL PGVMSPNR**KF G**VFRKVLHTG
141 **YSQLVAMEV PVKGEIGDEI HTVDQTLIFT HGR**GKAIVAG KEQEIKDGDV VIVPAGTQHQ FLNIGDVPLE
211 TIYAPAEH YPSTMHQTKA EGDAQEEK**GE DEAPEWSQRS** KAENEKLGVLV KGE

NCBI Blast gegen nr (non redundant):

- Hypothetisches Protein AN5332.2 (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 67%, Homologie = 76%
- Mannose-6-Phosphat Isomerase (*Dechloromonas aromatica*)
Identität = 42%, Homologie = 60%
- Mannose-6-Phosphat Isomerase (*Methanosarcina barkeri str.fusaro*)
Identität = 40%, Homologie = 57%

SP 12 (2D)

Durch Ansequenzierung wurde folgende Peptidsequenz gefunden: PVPDDITVK

>Contig41

Identität = 100%, Homologie = 100%

Query: 1 PVPDDITVK 9
PVPDDITVK

Sbjct: 1465938 PVPDDITVK 1465912

Nach Genscan und NCBI-Datenbanksuche wurde folgende Sequenz erhalten

1 MKFSLSAAVL AFAVSVAALP QHDVNAAGNG VGNKGNANVR **FVPDDITVK** QATEKCGDQA QLSCCNKATY
71 AGDVTDIDEG ILAGTLKNLI GGGSGTEGLG LFNQCSNVDL QIPVIGIPIQ ALVNQKCKQN IACCQNSPSD
141 ASGSLIGLGL PCIALGSIL

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Hydrophobin precursor (Rodlet protein) [rodA] (*A. fumigatus*)
Identität = 113/159 (71%), Homologie = 113/159 (71%)

- Hydrophobin (Fragment) (*A. fumigatus*)
Identität = 92/109 (84%), Homologie = 94/109 (85%)
- Hydrophobin (Fragment) (*A. fumigatus var. ellipticus*)
Identität = 92/109 (84%), Homologie = 94/109 (85%)

SP 14 (2D)

glimmer_1079; Score: 73 theoretisches Molekulargewicht 13903 Da; errechneter pI 7.75

1 MSTSSVTPT AAPPVLTVC PLPINPYGKT **HGAPEDSERH VGD LGNFETD AEGNAVGSKQ** DKLIK**LIGAE**
71 **SVLGRTLVVH AGTDDLGRGG NEESK**KTGNA GARPACGKCI SVYGHKRRMY VNLLSLSTGV IGIAA

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Cu,Zn Superoxiddismutase (*A. fumigatus*)
Identität = 100%, Homologie = 100%
- Cu,Zn Superoxiddismutase (*A. fumigatus*)
Identität = 100%, Homologie = 100%
- SODC_ASPFU Superoxiddismutase (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 88%, Homologie = 94%

SP 16 (2D)

experimentell MG: 11/ pI 6,1

YSSQQA

Es konnte keine Sequenz ermittelt werden in TIGR, somit kein Identifizierten des Proteins möglich

SP 18 (2D)

glimmer_10674; Score: 100 theoretisches Molekulargewicht 17829 Da; errechneter pI 5.07

1 MSGLK**AGDSF PSDVVFSYIP WSEDK**GEITA CGIPINYNAS KEWADKKVIL **FALPGAFTPV CSARHVPEYI**
71 **EK**LPEIRAKG VDVVAVLAYN DAYVMSAWGK **ANQVTGDDIL FLSDPDARFS** K**SIGWADEEG** R**TKRYALVID**
141 **HGKITYAALE PAK**NHLEMPA WD

NCBI Blast gegen nr (non redundant):

- Putatives peroxisomales Membranprotein PMP20 (Allergen Aspf 3)
Identität = 98%, Homologie = 98%
- PM20_ASPFU Putatives peroxisomales Membranprotein PMP20 (Allergen Aspf 3) (*A. nidulans* FGSC A4)
Identität = 88), Homologie = 96%
- Peroxisomales Membranprotein (*Penicillium citrinum*)
Identität = 82%, Homologie = 89%

SP 25(2D)

AN0297.2, Score: 28 theoretisches Molekulargewicht 22007 Da; errechneter pI 5,8

1 MAPKIAIVFY SMYGHVEKLA QAELKGIQAA GGNADLYQIQ ETLPEEV LAK MHAPPKSSVP
 61 TLEKPEQLLE **YDAVLFGIPT RYGNFPAQWK** AFWDR TGGIW ATGGFFGKYA GLFVSTGTLG
 121 GGQESTAI AA MSTLTHHGFL YVPLGYKTAF PLLSNLE EIH GGS AWGAGTF AGADGSRQPT
 181 KLELEIAETQ GKSFYEHVSR VNFA

NCBI Blast gegen nr (non redundant):

- Y20 Protein (*P. brasiliensis*)
 Identität = 77%, Homologie = 86%
- Allergen Alt a7 (*Alternaria alternata*)
 Identität = 77%, Homologie = 86%
- Mögliche 1,4-Benzquinon-Reduktase (*N. crassa*)
 Identität = 65%, Homologie = 79%

AS 5 (2D)

glimmer_10674; Score: 100; theoretisches Molekulargewicht 17829 Da; errechneter pI 5.07

1 MSGLK**AGDSF PSDVVF**SYIP **WSEDK**GEITA CGIPINYNAS KEWADKK**VIL FALPGAFTPV CSARH**VPEYI
 71 **EKL**PEIRAKG VDVVAVLAYN DAYVMSAWGK **ANQVTGDDIL FLSDPDARFS K**SIGWADEEG **RTKRYAL**VID
 141 **HGKIT**YAALE **PAK**NHLEMPA WD

NCBI-Blast gegen nr (non redundant):

- Putatives peroxisomales Membranprotein PMP20 (Allergen Aspf 3)
 Identität = 98%, Homologie = 98%
- PM20_ASPFU Putatives peroxisomales Membranprotein PMP20 (Allergen Aspf 3) (*A. nidulans* FGSC A4)
 Identität = 88), Homologie = 96%
- Peroxisomales Membranprotein (*Penicillium citrinum*)
 Identität = 82%, Homologie = 89%

AS 7 (2D)

glimmer_4462; Score 80; theoretisches Molekulargewicht 25437 Da; errechneter pI 5.17

1 MSSTDLEQDP TPKDIAQREL EEKERK**AKED AEQAQLPYKW TQTIRDVDVT IPVPANIKGR** DLDVVLTGTK
 71 IKVAIK**GQEA LIEGDFPHPI IVDESSW TLE TTSQPPGKEV** SVHLDKVNKM **EWVAHVTTA PKIDVSKITP**
 141 **ENSSLSDLDG ETR**AMVEKMM YDQRQKEMGG LTSDEQRKMD ILKKFQAEHP GMLPSRLGVV YGLMSCRDGL
 211 LECKDWLRWC GSTAC

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- NudC Protein (*A. fumigatus*)
 Identität = 88%, Homologie = 88%
- NUDC_EMENI Nuclear Movement Protein NudC (*A. nidulans* FGSC)
 Identität = 73%, Homologie = 79
- Hypothetisches Protein (*N. crassa*)
 Identität = 68%, Homologie = 81%

MY 1 (2D)

glimmer_1056; Score 344; theoretisches Molekulargewicht 12237 Da; errechneter pI 6.16

1 MAWGWEQSDE AHEVYGERR HESSLSHELI AGAASFAGMK AWEDHQKKEG KPVSHAFKE ALAGFVGAEV
71 DKLIETKGLD EADKIRARRH AKENAERIQH TKIIDSVTP

NCBI-Blast gegen nr (non redundant)

- Unbenanntes Protein Produkt (*Debaryomyces hansenii*)
Identität = 61%, Homologie = 76%
- Hypothetisches Protein CNBC1030 (*Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A*)
Identität = 56%, Homologie = 68%
- CipC Protein (Concanamycin induziertes Protein) (*A. nidulans*)
Identität = 50%, Homologie = 60%

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams,I.P., Dack,S., Dickinson,F.M., and Ratledge,C.** (2002). The distinctiveness of ATP:citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1597, 36-41.
- Ainsworth,G.C. and Sussman,A.S.** (1966). *The Fungi: An Advanced Treatise. Volume II. The Fungal Organism.* (New York, NY.: Academic Press), p. 805p.
- Amitani,R., Murayama,T., Nawada,R., Lee,W.J., Niimi,A., Suzuki,K., Tanaka,E., and Kuze,F.** (1995). *Aspergillus* culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro. *Eur. Respir. J.* 8, 1681-1687.
- Asgeirsdottir,S.A., Halsall,J.R., and Casselton,L.A.** (1997). Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the oid-1 mutation. *Fungal. Genet. Biol.* 22, 54-63.
- Basich,J.E., Graves,T.S., Baz,M.N., Scanlon,G., Hoffmann,R.G., Patterson,R., and Fink,J.N.** (1981). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 98-102.
- Bernard,M., Mouyna,I., Dubreucq,G., Debeaupuis,J.P., Fontaine,T., Vorgias,C., Fuglsang,C., and Latge,J.P.** (2002). Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 148, 2819-2829.
- Bertout,S., Badoc,C., Mallie,M., Giaimis,J., and Bastide,J.M.** (2002). Spore diffusate isolated from some strains of *Aspergillus fumigatus* inhibits phagocytosis by murine alveolar macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33, 101-106.
- Bjellqvist,B., Ek,K., Righetti,P.G., Gianazza,E., Görg,A., Westermeier,R., and Postel,W.** (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317-339.
- Blum,H., H.,B., and H.J.,G.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bochtler,M., Ditzel,L., Groll,M., Hartmann,C., and Huber,R.** (1999). The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 295-317.
- Boveris,A.** (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 78, 67-82.
- Bowman,E.J., Siebers,A., and Altendorf,K.** (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7972-7976.
- 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., Langfelder,K., Wanner,G., Schmidt,A., and Jahn,B.** (1999). Pigment biosynthesis and virulence. *Contrib. Microbiol.* 2, 205-215.
- Brambl,R. and Josephson,M.** (1977). Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiratory cytochromes of dormant and germinating spores of *Botryodiplodia*. *J. Bacteriol.* 129, 291-297.
- Braun,E.J. and Howard,R.J.** (1994). Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasma* 181, 202-212.
- Brown,A.D. and Simpson,J.R.** (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72, 589-591.
- Bruneau,J.M., Magnin,T., Tagat,E., Legrand,R., Bernard,M., Diaquin,M., Fudali,C., and Latge,J.P.** (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 22, 2812-2823.
- Caillot,D., Casasnovas,O., Bernard,A., Couaillier,J.F., Durand,C., Cuisenier,B., Solary,E., Piard,F., Petrella,T., Bonnin,A., Couillault,G., Dumas,M., and Guy,H.** (1997). Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J. Clin. Oncol.* 15, 139-147.
- Calvo,A.M., Wilson,R.A., Bok,J.W., and Keller,N.P.** (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447-59, table.
- Carlile,M.J. and Watkinson,S.C.** (1994). *The fungi*. Academic Press Ltd, London. pp. 329-340.
- Chance,B. and Schonbaum,G.R.** (1962). The nature of the primary complex of catalase. *J. Biol. Chem.* 237, 2391-2395.
- Chary,P. and Natvig,D.O.** (1989). Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* 171, 2646-2652.
- Chaturvedi,V.P., Chaturvedi,S., Khan,Z.U., and Randhawa,H.S.** (1989). Efficacy of immunoprecipitation methods for rapid serodiagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycoses* 32, 136-138.
- Chazalet,V., Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Lortholary,J., Ribaud,P., Shah,P., Cornet,M., Vu,T.H., Gluckman,E., Brucker,G., and Latge,J.P.** (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1494-1500.
- Cove,D.J.** (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 51-56.

- Cramer, R.** (2002). Molecular cloning of *Aspergillus fumigatus* allergens and their role in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chem. Immunol.* 81, 73-93.
- Cramer, R. and Blaser, K.** (1996). Cloning *Aspergillus fumigatus* allergens by the pJuFo filamentous phage display system. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110, 41-45.
- Cramer, R., Faith, A., Hemmann, S., Jaussi, R., Ismail, C., Menz, G., and Blaser, K.** (1996). Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.* 184, 265-270.
- Cramer, R., Hemmann, S., Ismail, C., Menz, G., and Blaser, K.** (1998). Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int. Immunol.* 10, 1211-1216.
- Cunha, A.F., Sousa, M.V., Silva, S.P., Jesuino, R.S., Soares, C.M., and Felipe, M.S.** (1999). Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 37, 115-121.
- Cutler, P., Bell, D.J., Birrell, H.C., Connelly, J.C., Connor, S.C., Holmes, E., Mitchell, B.C., Monte, S.Y., Neville, B.A., Pickford, R., Polley, S., Schneider, K., and Skehel, J.M.** (1999). An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis* 20, 3647-3658.
- d'Enfert, C.** (1997). Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *A. nidulans* and *N. crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 21, 163-172.
- d'Enfert, C., Diaquin, M., Delit, A., Wuscher, N., Debeaupuis, J.P., Huerre, M., and Latge, J.P.** (1996). Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 64, 4401-4405.
- d'Enfert, C. and Fontaine, T.** (1997). Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* treA gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* 24, 203-216.
- D'Souza, C.A. and Heitman, J.** (2001). Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 349-364.
- Dakin, H.** (1912). *Oxidations and Reductions in the Animal Body*. Longmans, Green London.
- DeHart, D.J., Agwu, D.E., Julian, N.C., and Washburn, R.G.** (1997). Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes. *J. Infect. Dis.* 175, 146-150.
- Denning, D.W.** (1998). Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26, 781-803.
- Denning, D.W., Anderson, M.J., Turner, G., Latge, J.P., and Bennett, J.W.** (2002). Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect. Dis.* 2, 251-253.

- Denning,D.W., Tucker,R.M., Hanson,L.H., and Stevens,D.A.** (1989). Treatment of invasive aspergillosis with itraconazole. *Am. J. Med.* 86, 791-800.
- Denning,D.W. and Williams,A.H.** (1987). Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed by blood culture and successfully treated. *Br. J. Dis. Chest* 81, 300-304.
- Ebbole,D.J.** (1997). Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol.* 5, 405-408.
- Eberle,J. and Russo,V.E.** (1994). *Neurospora crassa* blue light-inducible gene bli-3. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34, 737-744.
- Ebina,K., Sakagami,H., Yokota,K., and Kondo,H.** (1994). Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 148-150.
- Eisenstein,D.J., Biddinger,P.W., and Rhodes,J.C.** (1990). Experimental murine invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 93, 510-515.
- Eom,T.K. and Lee,K.M.** (2003). Characteristics of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KB-1. *Arch. Pharm. Res* 26, 1036-1041.
- Fando,J.L., Alaba,I., Escarmis,C., Fernandez-Luna,J.L., Mendez,E., and Salinas,M.** (1985). The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur. J. Biochem.* 149, 29-34.
- Farabaugh,P.J., Schmeissner,U., Hofer,M., and Miller,J.H.** (1978). Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 126, 847-857.
- Fillinger,S., Chaveroche,M.K., Shimizu,K., Keller,N., and d'Enfert,C.** (2002). cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 44, 1001-1016.
- Fluckiger,S., Scapozza,L., Mayer,C., Blaser,K., Folkers,G., and Cramer,R.** (2002). Immunological and structural analysis of IgE-mediated cross-reactivity between manganese superoxide dismutases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 292-303.
- Franco,M.** (1986). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25, 5-18.
- Fridovich,I.** (1978). Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical. *Ciba Found. Symp.* 77-93.
- Fridovich,I.** (1989). Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 557-558.

- Gainey,L.D., Connerton,I.F., Lewis,E.H., Turner,G., and Ballance,D.J.** (1992). Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of *Aspergillus nidulans* (*acuD*) and *Neurospora crassa* (*acu-3*). *Curr. Genet.* 21, 43-47.
- Goldberg,I. and Hochman,A.** (1989). Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta* 991, 330-336.
- Görg,A., Postel,W., and Günther,S.** (198). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): Method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Görg,A., Postel,W., Westermeier,R., Gianazza,E., and Righetti,P.G.** (1980). Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers. *J. Biochem. Biophys. Methods* 3, 273-284.
- Görg,A., Weser,J., Westermeier,R., Postel,W., Weidinger,S., Patutschnick,W., and Cleve,H.** (1983). Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin (Tf) subtypes and variants. *Hum. Genet.* 64, 222-226.
- Grandori,R. and Carey,J.** (1994). Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Sci.* 3, 2185-2193.
- Greenberger,P.A., Liotta,J.L., and Roberts,M.** (1989). The effects of age on isotypic antibody responses to *Aspergillus fumigatus*: implications regarding in vitro measurements. *J. Lab Clin. Med.* 114, 278-284.
- Greenberger,P.A., Miller,T.P., Roberts,M., and Smith,L.L.** (1993). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with and without evidence of bronchiectasis. *Ann Allergy* 70, 333-338.
- Greenberger,P.A. and Patterson,R.** (1987). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Model of bronchopulmonary disease with defined serologic, radiologic, pathologic and clinical findings from asthma to fatal destructive lung disease. *Chest* 91, 165S-171S.
- Griffin,D.H.** (1994). *Fungal Physiology*. 2nd. Wiley-Liss, New York.
- Hamilton,A.J. and Holdom,M.D.** (1999). Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol.* 37, 375-389.
- Hamilton,A.J., Holdom,M.D., and Jeavons,L.** (1996). Expression of the Cu,Zn superoxide dismutase of *Aspergillus fumigatus* as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14, 95-102.
- Hancock,R.E. and Nikaido,H.** (1978). Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.* 136, 381-390.
- Hawley,E.S. and Greenawalt,J.W.** (1975). Biogenesis of mitochondrial membranes in *Neurospora crassa*. Mitochondrial protein synthesis during conidial germination. *Eur. J. Biochem.* 54, 585-601.

Haynes,K.A., Latge,J.P., and Rogers,T.R. (1990). Detection of *Aspergillus* antigens associated with invasive infection. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2040-2044.

Haynes,K.A., Rogers,T.R., Latge,J.P., and Barnes,R.A. (1992). Antigen detection in invasive aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 211.

Hearn,V.M. and Mackenzie,D.W. (1980). Mycelial antigens from two strains of *Aspergillus fumigatus*: an analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen* 23, 549-562.

Hemmann,S., Menz,G., Ismail,C., Blaser,K., and Cramer,R. (1999). Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 601-607.

Holdom,M.D., Lechenne,B., Hay,R.J., Hamilton,A.J., and Monod,M. (2000). Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J. Clin. Microbiol.* 38, 558-562.

Hollomon,D.W. (1970). RNA synthesis during fungal spore germination. *J. Gen. Microbiol.* 62, 75-87.

Hospenthal,D.R., Kwon-Chung,K.J., and Bennett,J.E. (1998). Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med. Mycol.* 36, 165-168.

Hult,K., Veide,A., and Gatenbeck,S. (1980). The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol.* 128, 253-255.

Jahn,B., Koch,A., Schmidt,A., Wanner,G., Gehringer,H., Bhakdi,S., and 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.

Jeu,L., Piacenti,F.J., Lyakhovetskiy,A.G., and Fung,H.B. (2003). Voriconazole. *Clin. Ther.* 25, 1321-1381.

Kamei,K., Watanabe,A., Nishimura,K., and Miyaji,M. (2002). Cytotoxicity of *Aspergillus fumigatus* culture filtrate against macrophages. *Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi* 43, 37-41.

Kawasaki,L., Wysong,D., Diamond,R., and Aguirre,J. (1997). Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179, 3284-3292.

Klis,F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-869.

Knoop, F. (1904). Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr.Chem.Physiol.Pathol.* 6, 150-162.

Knutsen,A. and Slavin,R.G. (1992). Allergic bronchopulmonary mycosis complicating cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* 7, 179-192.

Krasnick,J., Patterson,R., and Roberts,M. (1995). Allergic bronchopulmonary aspergillosis presenting with cough variant asthma and identifiable source of *Aspergillus fumigatus*. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 75, 344-346.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamy,B., Moutaouakil,M., Latge,J.P., and Davies,J. (1991). Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. *Mol. Microbiol.* 5, 1811-1815.

Latge,J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310-350.

Latge,J.P., Moutaouakil,M., Debeaupuis,J.P., Bouchara,J.P., Haynes,K., and Prevost,M.C. (1991). The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 59, 2586-2594.

Lengeler,K.B., Davidson,R.C., D'Souza,C., Harashima,T., Shen,W.C., Wang,P., Pan,X., Waugh,M., and Heitman,J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 746-785.

Loo,M. (1976). Some required events in conidial germination of *Neurospora crassa*. *Dev. Biol.* 54, 201-213.

Lorenz,M.C. and Fink,G.R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412, 83-86.

Lorenz,M.C. and Fink,G.R. (2002). Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot. Cell* 1, 657-662.

Lynen,F. (1942). Zum biologischen Abbau der Essigsäure.I. Über die Induktionszeit bei verarmter Hefe. *Liebig's Ann.* 552, 270-306.

Mabey,J.E., Anderson,M.J., Giles,P.F., Miller,C.J., Attwood,T.K., Paton,N.W., Bornberg-Bauer,E., Robson,G.D., Oliver,S.G., and Denning,D.W. (2004). CADRE: the Central *Aspergillus* Data REpository. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue, D401-D405.

MacConnell,W.P. and Kaplan,N.O. (1980). The role of ethanol extractable proteins from the 80S rat liver ribosome. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 92, 46-52.

MacConnell,W.P. and Kaplan,N.O. (1982). The activity of the acidic phosphoproteins from the 80 S rat liver ribosome. *J. Biol. Chem.* 257, 5359-5366.

Madan,T., Eggleton,P., Kishore,U., Strong,P., Aggrawal,S.S., Sarma,P.U., and Reid,K.B. (1997). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 65, 3171-3179.

Marklund,S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 7634-7638.

Marr,K.A., Patterson,T., and Denning,D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 16, 875-894.

Martinez-Ruiz,A., Kao,R., Davies,J., and Martinez,d.P. (1999). Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* 37, 1549-1563.

Meier,A., Kirschning,C.J., Nikolaus,T., Wagner,H., Heesemann,J., and Ebel,F. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* 5, 561-570.

Melin,P., Schnurer,J., and Wagner,E.G. (1999). Changes in *Aspergillus nidulans* gene expression induced by bafilomycin, a *Streptomyces*-produced antibiotic. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1115-1122.

Melin,P., Schnurer,J., and Wagner,E.G. (2002). Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol. Genet. Genomics* 267, 695-702.

Melin,P., Schnurer,J., and Wagner,E.G. (2004). Disruption of the gene encoding the V-ATPase subunit A results in inhibition of normal growth and abolished sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 150, 743-748.

Michan,S., Lledias,F., Baldwin,J.D., Natvig,D.O., and Hansberg,W. (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 521-532.

Mirkes,P.E. (1974). Polysomes, ribonucleic acid, and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. *J. Bacteriol.* 117, 196-202.

Morozova,E.V., Kozlov,V.P., Tereshina,V.M., Memorskaia,A.S., and Feofilova,E.P. (2002). Changes in lipid composition and carbohydrate composition of *Aspergillus niger* conidia during germination. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 38, 149-154.

Murayama,T., Amitani,R., Ikegami,Y., Kawanami,R., Lee,W.J., and Nawada,R. (1998). Effects of *Aspergillus fumigatus* culture filtrate on antifungal activity of human phagocytes in vitro. *Thorax* 53, 975-978.

Murayama,T., Amitani,R., Ikegami,Y., Nawada,R., Lee,W.J., and Kuze,F. (1996). Suppressive effects of *Aspergillus fumigatus* culture filtrates on human alveolar macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Eur. Respir. J.* 9, 293-300.

Nicholson,R.L. (1992). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey, J.A. and Jeger, M.J., Eds.). Wallingford: CAB International, pp. 186-202.

Noventa-Jordao,M.A., Couto,R.M., Goldman,M.H., Aguirre,J., Iyer,S., Caplan,A., Terenzi,H.F., and Goldman,G.H. (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology* 145 (Pt 11), 3229-3234.

Nowrousian,M., Masloff,S., Poggeler,S., and Kuck,U. (1999). Cell differentiation during sexual development of the fungus *Sordaria macrospora* requires ATP citrate lyase activity. *Mol. Cell Biol.* 19, 450-460.

O'Farrell,P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.

Osheroov,N. and May,G. (2000). Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155, 647-656.

Osheroov,N. and May,G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 153-160.

Paris,S., Boisvieux-Ulrich,E., Crestani,B., Houcine,O., Taramelli,D., Lombardi,L., and Latge,J.P. (1997). Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* 65, 1510-1514.

Paris,S., Debeaupuis,J.P., Crameri,R., Carey,M., Charles,F., Prevost,M.C., Schmitt,C., Philippe,B., and Latge,J.P. (2003a). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1581-1588.

Paris,S., Wysong,D., Debeaupuis,J.P., Shibuya,K., Philippe,B., Diamond,R.D., and Latge,J.P. (2003b). Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 71, 3551-3562.

Proudfoot,A.E., Payton,M.A., and Wells,T.N. (1994). Purification and characterization of fungal and mammalian phosphomannose isomerases. *J. Protein Chem.* 13, 619-627.

Raha,S. and Robinson,B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508.

Raper,K. and Fennell,D. (1965). *The genus Aspergillus.* Williams & Wilkins, Baltimore.

Reichard,U., Monod,M., and Ruchel,R. (1995). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 69-74.

Reiß,J. (1998). *Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung.* Berlin: Springer-Verlag.

Rich,B.E. and Steitz,J.A. (1987). Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol. Cell Biol.* 7, 4065-4074.

- Robinson,B.W., Venaille,T.J., Mendis,A.H., and McAleer,R.** (1990). Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86, 726-731.
- Rohde,M., Schwienbacher,M., Nikolaus,T., Heesemann,J., and Ebel,F.** (2002). Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 99-105.
- Rüchel,R. and Reichard,U.** (1999). Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. *Contrib. Microbiol.* 2, 21-43.
- Samson,R.A.** (1999). The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib. Microbiol.* 2, 5-20.
- Sanchez-Madrid,F., Reyes,R., Conde,P., and Ballesta,J.P.** (1979). Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cells. Effect on ribosomal functions. *Eur. J. Biochem.* 98, 409-416.
- Schaffner,A., Davis,C.E., Schaffner,T., Markert,M., Douglas,H., and Braude,A.I.** (1986). In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J. Clin. Invest* 78, 511-524.
- Schaffner,A., Douglas,H., and Braude,A.** (1982). Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J. Clin. Invest* 69, 617-631.
- Schlegel,H.** (1992). *Allgemeine Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York. pp. 271-274.
- Schmit,J.C. and Brody,S.** (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev.* 40, 1-41.
- Sela-Buurlage,M.B., Epstein,L., and Rodriguez,R.J.** (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 345-352.
- Smith,D.J. and Payton,M.A.** (1994). Hyphal tip extension in *Aspergillus nidulans* requires the manA gene, which encodes phosphomannose isomerase. *Mol. Cell Biol.* 14, 6030-6038.
- Smith,J.M., Tang,C.M., Van Noorden,S., and Holden,D.W.** (1994). Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* 62, 5247-5254.
- Sporik,R.B., Arruda,L.K., Woodfolk,J., Chapman,M.D., and Platts-Mills,T.A.** (1993). Environmental exposure to *Aspergillus fumigatus* allergen (Asp f I). *Clin. Exp. Allergy* 23, 326-331.

- Stade,S. and Brambl,R.** (1981). Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 147, 757-767.
- Stoop,J.M. and Mooibroek,H.** (1998). Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4689-4696.
- Sundstrom,P.** (1999). Adhesins in *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 2, 357.
- Taramelli,D., Malabarba,M.G., Sala,G., Basilico,N., and Cocuzza,G.** (1996). Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae. J. Med. Vet. Mycol. 34, 49-56.
- Thau,N., Monod,M., Crestani,B., Rolland,C., Tronchin,G., Latge,J.P., and Paris,S.** (1994). rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 62, 4380-4388.
- Thines,E., Weber,R.W., and Talbot,N.J.** (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 12, 1703-1718.
- Thurston,J.R., Cysewski,S.J., and Richard,J.L.** (1979). Exposure of rabbits to spores of *Aspergillus fumigatus* or *Penicillium* sp: survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. Am. J. Vet. Res 40, 1443-1449.
- Touster,O. and Shaw,D.R.** (1962). Biochemistry of the acyclic polyols. Physiol Rev. 42, 181-225.
- Tronchin,G., Bouchara,J.P., Ferron,M., Larcher,G., and Chabasse,D.** (1995). Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. Can. J. Microbiol. 41, 714-721.
- Tronchin,G., Bouchara,J.P., Larcher,G., Lissitzky,J.C., and Chabasse,D.** (1993). Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. Biol. Cell 77, 201-208.
- Tsai,H.F., Chang,Y.C., Washburn,R.G., Wheeler,M.H., and 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.
- Uchiumi,T., Kikuchi,M., and Ogata,K.** (1986a). Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. J. Biol. Chem. 261, 9663-9667.
- Uchiumi,T., Kikuchi,M., Terao,K., Iwasaki,K., and Ogata,K.** (1986b). Cross-linking of elongation factor 2 to rat-liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane. Eur. J. Biochem. 156, 37-48.
- Uchiumi,T. and Ogata,K.** (1986). Cross-linking study on localization of the binding site for elongation factor 1 alpha on rat liver ribosomes. J. Biol. Chem. 261, 9668-9671.

- Van Etten,R.A., Bird,J.W., and Clayton,D.A.** (1983). Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA^{Leu}UUR. *J. Biol. Chem.* 258, 10104-10110.
- Wardlaw,A. and Geddes,D.M.** (1992). Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. *J. R. Soc. Med.* 85, 747-751.
- Weig,M., Frosch,M., Tintelnot,K., Haas,A., Gross,U., Linsmeier,B., and Heesemann,J.** (2001a). Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1721-1730.
- Weig,M., Reichard,U., and Gross,U.** (2001b). Congress report. *Aspergillus fumigatus* - virulence and opportunism? *Mycoses* 44, 351-355.
- Wilkins,M.R., Gasteiger,E., Sanchez,J.C., Bairoch,A., and Hochstrasser,D.F.** (1998). Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19, 1501-1505.
- Wilkins,M.R., Sanchez,J.C., Gooley,A.A., Appel,R.D., Humphery-Smith,I., Hochstrasser,D.F., and Williams,K.L.** (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50.
- Witteveen,C.F. and Visser,J.** (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 57-62.
- Xiang,X., Osmani,A.H., Osmani,S.A., Roghi,C.H., Willins,D.A., Beckwith,S., Goldman,G., Chiu,Y., Xin,M., Liu,B., and et al.** (1995). Analysis of nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60, 813-819.
- Yu,B., Niki,Y., and Armstrong,D.** (1990). Use of immunoblotting to detect *Aspergillus fumigatus* antigen in sera and urines of rats with experimental invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1575-1579.
- Zhang,M.Y., Huang,N.N., Clawson,G.A., Osmani,S.A., Pan,W., Xin,P., Razzaque,M.S., and Miller,B.A.** (2002). Involvement of the fungal nuclear migration gene nudC human homolog in cell proliferation and mitotic spindle formation. *Exp. Cell Res* 273, 73-84.
- Zhang,X.Y., Dai,A.L., Kuroiwa,K., Kodaira,R., Nogawa,M., Shimosaka,M., and Okazaki,M.** (2001). Cloning and characterization of a chitosanase gene from the koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 977-981.
- Zhu,D. and Scandalios,J.G.** (1992). Expression of the maize MnSod (Sod3) gene in MnSOD-deficient yeast rescues the mutant yeast under oxidative stress. *Genetics* 131, 803-809.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank...

... Prof. Dr. Wolfgang Höll für seine Bereitschaft diese Arbeit am Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu vertreten.

... PD Dr. Frank Ebel für seine tatkräftige und immer diskussionsbereite Betreuung meiner Arbeit. Das Arbeitsklima, das durch seine kollegiale Anleitung ermöglicht wurde, hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Durch seine aufmerksame Art hat er es auch in schwierigen Zeiten verstanden mich zu motivieren. Er hat mir gezeigt, dass negative Aspekte unter einem anderen Blickwinkel gar nicht mehr so schlimm sein müssen und dass einen jedes Ergebnis weiterbringt. Merci für die schöne Zeit!

... Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Ermöglichung, in seinem Haus und mit seiner Unterstützung diese Arbeit anzufertigen.

... Prof. Dr. Siegfried Scherer, für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

... Dr. Manfred Rhode (GBF, Braunschweig) für die Durchführung der Elektronenmikroskopie, die mir *Aspergillus fumigatus* näher gebracht hat.

... Carsten Lück für das Durchsehen des 2D-Abschnitts meiner Arbeit.

... den Mitarbeitern des Zentrallabors für Proteinanalytik Jörg Regula, Axel Imhof und Lars Israel, ohne deren Unterstützung die Identifizierung so mancher Proteine nicht möglich gewesen wäre.

... den fleißigen Korrekturlesern: Silke, Bärbel, Miria und Hubi, die sich bemüht haben Zeichen zu setzen, kritische Diskussionen zu führen, nichts zu übersehen und die auf jeden Fall 100% für meine Arbeit gegeben haben. Vielen Dank, nicht nur fürs Lesen, sondern auch dafür, dass ihr immer für mich da seid!

... meinem kleinen Bruder Markus, dass er mir mit seiner Begabung für Abbildungen, seinen Computerkenntnissen und seinem stets offenen Ohr eine große Hilfe war. Dank auch meinen anderen Geschwistern Gudrun, Christian und Michael für ihre liebevolle Unterstützung.

DANKSAGUNG

... allen, denen ich im Laufe meiner Arbeit im Labor des Max-von-Pettenkofer-Institutes begegnen durfte. Vor allem meinen Labormäusen KvE, KL, KS, Chrissie, Kristina, Isabel, Christine, Anela, Svenja und Leonie für die vielen konstruktiven Gespräche, vor allem aber dafür, dass sie immerzu bereit waren ausweglose und manchmal deprimierende Situationen in eine heitere Begebenheit umzuwandeln.

... allen meinen lieben Freunden, die ich während der Zeit dieser Arbeit oft vernachlässigt habe. Ihr wart unaufhörlich in meinem Herzen und habt mir viel Kraft geschickt. Ich hoffe wir können die Zeit irgendwie nachholen!

... Gerhard, für sein Sein, neben mir und hinter mir, und vor allem für seine Unerschütterlichkeit.

... nicht zuletzt meinen Eltern, die durch ihre unermüdliche Aufopferung mir ermöglicht haben, meinen eigenen Weg zu gehen. Die versuchen mich in jeder Situation zu unterstützen und die stets hinter mir stehen. Die mir ein Zuhause geben, in das ich immer wieder zurückkehren kann. Unermesslichen Dank!

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name: Monika Anna Schwienbacher
Geburtsdatum 06.09.1975
Geburtsort Schlanders/ Italien

Ausbildung

1981-1984 Grundschule Laas
1984-1986 Grundschule „Vinzenz Goller“ in Brixen
1986-1989 Mittelschule „Michael Pacher“ in Brixen
1989-1994 Allgemeine Hochschulreife, Lehrerbildungsanstalt „Josef Gasser“ in Brixen
1994-2001 Studium der Biologie (Diplom) an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck
2000-2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bakteriologie im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, LMU München (Prof. Dr. Dr. J. Heesemann):
Thema: „Identifizierung germinationsspezifischer Proteine des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* .“
seit 09/ 2001 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Bakteriologie im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, LMU München (Prof. Dr. Dr. J. Heesemann) unter Anleitung von PD Dr. Frank Ebel