

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Klonierung und Expression einer extrazellulären Lipase von
*Aspergillus fumigatus***

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christoph Paasch

aus

Magdeburg

Göttingen 2011

D e k a n: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Reichard

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. Nat. Kube

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung: 21.Mai 2012

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aspergillus
Abb.	Abbildung
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
d	Tage
EL	Extrazelluläre Lipase
et al.	et alii
g	Erdbeschleunigungskonstante
h	Stunde
Ig	Immunglobuline
IFN	Interferon
Il	Interleukin
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
λ	Lambda
M	Molarität (mol/l)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Molecular Weight
mm ³	Kubikmillimeter
OD	optische Dichte
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
T _H	T-Helferzelle
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
[v/v]	volume per volume
[w/v]	weight per volume

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	8
1.1.1 Taxonomie	8
1.1.2 Morphologie.....	8
1.1.3 Vorkommen	9
1.2 Klinische Bedeutung in der Humanmedizin.....	10
1.2.1 Invasive Aspergillose.....	10
1.2.2 Weitere durch <i>A. fumigatus</i> ausgelöste Erkrankungen.....	11
1.2.3 Potentielle Virulenzfaktoren und Antigene von <i>A. fumigatus</i>	12
1.2.4 Natürliche <i>Aspergillus</i> -Abwehr	15
1.2.5 Perspektiven für die Entwicklung eines Impfstoffes.....	16
1.3 Aufgabenstellung	17
2 Materialien.....	19
2.1 Chemikalien und Enzyme	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Restriktionsenzyme.....	22
2.4 Antibiotika	22
2.5 Antikörper.....	22
2.6 Plasmid	23
2.7 Geräte	23
2.8 Stammlösung und Puffer.....	25
2.9 Kultur- und Nährmedien	32
2.10 Bakterienstämme	34
2.11 Oligonukleotidprimer	34
2.12 Phagen.....	35
3 Methoden.....	36
3.1 Herstellung einer digoxigenierten Sonde	36
3.1.1 PCR I.....	36
3.1.2 Nested PCR	37
3.2 Screening einer λ -cDNA-Bank mit langen Sonden	38
3.2.1 Prähybridisierung.....	39
3.2.2 Hybridisierung	39

3.2.3 Detektion von DIG-markierten DNA-Proben.....	40
3.3 Umklonierung der cDNA aus Lambda-Zap in ein Phagemid.....	40
3.4 Polymerasekettenreaktion auf extrazelluläre Lipase kodierende cDNA.....	41
3.5 Restriktionsverdau	42
3.6 Ligation	44
3.7 Elektroporation.....	45
3.8 Kolonie-Screening auf His-getagte Proteine	46
3.9 Anfertigung von Dauerkulturen	47
3.10 Sequenzierung des Inserts von pQE30.....	48
3.11 Produktion und Aufarbeitung HIS-getagter Proteine	48
3.12 Proteinauftrennung mittels eindimensionaler SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.12.1 Verwendete Lösungen und Puffer	50
3.12.2 Herstellung und Beladung der SDS-Gele	50
3.12.3 Coomassie-Brillantblau-Färbung	51
3.13 Immunblot	52
3.13.1 Westernblot	52
3.13.2 Beladung der <i>A. fumigatus</i> -Proteinfraktion mit Antikörpern.....	52
3.14 DNA-Aufarbeitungen.....	54
3.14.1 Horizontale Gelelektrophorese von DNA.....	54
3.14.2 Gelextraktion	54
3.14.3 Aufreinigung einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA.....	55
3.14.4 Plasmid-Minipräparation.....	55
4 Ergebnisse.....	56
4.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde.....	56
4.1.1 PCR I.....	56
4.1.2 Nested-PCR	57
4.2 Sondenscreening einer <i>Aspergillus</i> -cDNA-Bank auf für die extrazelluläre Lipase kodierende cDNA-Abschnitte	58
4.2.1 Screening I mit Digoxigenin-markierter Sonde	59
4.2.2 Screening II mit Digoxigenin-markierter Sonde	59
4.2.3 Screening III mit Digoxigenin-markierter Sonde	60
4.3 Umklonierung der für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA in ein Phagemid.....	61

4.4 Polymerasekettenreaktion auf für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA-Abschnitte	61
4.5 Restriktionsverdau von pQE30 und dem für die extrazelluläre Lipase kodierenden Amplikons.....	62
4.6 Ligation von pQE30 mit dem für die extrazelluläre Lipase kodierenden Amplikon	64
4.7 Koloniescreening auf extrazelluläre Lipase in Rosetta II.....	65
4.8 Ergebnis der Sequenzanalyse von pQE30 mit der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA.....	67
4.9 Produktion und Aufarbeitung der extrazellulären Lipase.....	73
4.10 pBlast (Protein Basic Local Alignment Search Tool) der extrazellulären Lipase im Vergleich zu anderen Lipasen von <i>A. fumigatus</i> und Enzymen verschiedener Organismen	75
5 Diskussion	79
5.1 Extrazelluläre Lipase.....	79
5.1.1 Virulenz-vermittelnde Lipasen in unterschiedlichen Organismen	79
5.1.2 Sequenzanalyse der extrazellulären Lipase von <i>A. fumigatus</i>	82
5.1.3 Sequenzieller und funktioneller Abgleich der extrazellulären Lipase von <i>A. fumigatus</i>	83
5.2 Perspektiven für einen therapeutischen Ansatz	84
5.3 Die Lipase als potenzieller Vakzinekandidat	84
5.3.1 Aktive Vakzinierung	85
5.3.2 Passive Vakzinierung	86
5.4 Perspektiven	88
6 Zusammenfassung	89
7 Literaturverzeichnis	90
Lebenslauf.....	Error! Bookmark not defined.
Danksagung	98

1 Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland nach einer Studie von Müller (1994) etwa 5000 Menschen an der invasiven Aspergillose. In den westlichen Industrienationen steigt die Inzidenz dieser Erkrankung weiter an (Warnock 2007). Der häufigste Erreger ist *Aspergillus fumigatus*. Patienten, die im Rahmen einer Chemotherapie insbesondere beim Vorliegen einer Leukämie oder aufgrund einer Organtransplantation immunsupprimiert werden, sind besonders oft betroffen (Groll et al. 1996; Denning 1998; Latgé 1999; Silveira und Husain 2007). Bei immunkompetenten Menschen verhindern neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen und das Komplementsystem eine Infektion mit *A. fumigatus* (Segal 2009). Die ubiquitär vorkommenden Sporen (Konidien) können nach Inhalation bei ausgeprägter Neutropenie ($< 500/\mu\text{l}$) zu einer schweren diffusen Pneumonie sowie zum disseminierten Befall unterschiedlicher Organe führen (Latgé 1999; Silveira und Husain 2007; Segal 2009). Prädilektionsorgane sind dabei das Zentralnervensystem (ZNS), die Leber und die Nieren. Trotz der stetigen Verbesserung antimykotischer Therapieverfahren verstirbt zurzeit noch etwa die Hälfte der Erkrankten an den Folgen der invasiven Aspergillose (Hohl und Feldmesser 2007; Segal 2009).

Im Tierversuch stellt sich nach überlebter invasiver Aspergillose eine erworbene Immunität ein (Bozza et al. 2002). Es wird deshalb davon ausgegangen, dass der Erreger während der Infektion Antigene, die eine protektive Immunantwort induzieren, exprimiert (Denikus et al. 2005). Mit Infektionsseren von Kaninchen, die an einer invasiven Aspergillose erkrankten, wurde eine *Aspergillus* cDNA-Expressionsbank auf reaktive Antigen-Klone gescreent. Aus dem ca. 10000 Gene umfassenden Genom von *A. fumigatus* wurde die cDNA von 36 verschiedenen Genen, die für reagierende Antigene kodieren, kloniert (Denikus et al. 2005). Unter diesen befanden sich die Antigene Asp f 16 (Bozza et al. 2002) und Asp f 3. Sie gehören zu den insgesamt fünf Antigenen, mit denen eine protektive Immunantwort im Tiermodell bereits induziert werden konnte (Ito et al. 2006). Die Identifikation und Expression weiterer Immunität induzierender Antigene kann als Basis zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die invasive Aspergillose für Risikopatienten dienen.

1.1 *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Taxonomie

Die 1883 erstmalig von Georg Fresenius beschriebene Art *A. fumigatus* ist der Gattung *Aspergillus* zugehörig. Diese wurde 1729 vom italienischen Priester und Biologen Pietro Antonio Micheli begründet und aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit mit einem Weihwasserwedel als *Aspergillus* (lat. Weihwasserwedel) bezeichnet. Die Gattung *Aspergillus* gehört zur Familie der Trichocomaceae, welche in die Klasse der Echten Schlauchpilze (Ascomycetes) einzuordnen sind (Latgé 1999).

1.1.2 Morphologie

A. fumigatus besteht aus Hyphen, fadenförmigen Zellen. Diese werden in ihrer Gesamtheit als Myzel bezeichnet. Vom Nährmyzel ausgehend wird das Luftmyzel gebildet, von dem sich nach Bildung der Fruchtkörper die Sporen abschnüren. Innerhalb einer Woche wachsen aus Sporen von *A. fumigatus* bei 25°C Pilzkolonien von samtiger Textur auf Czapek-ox-Agar (Latgé 1999).

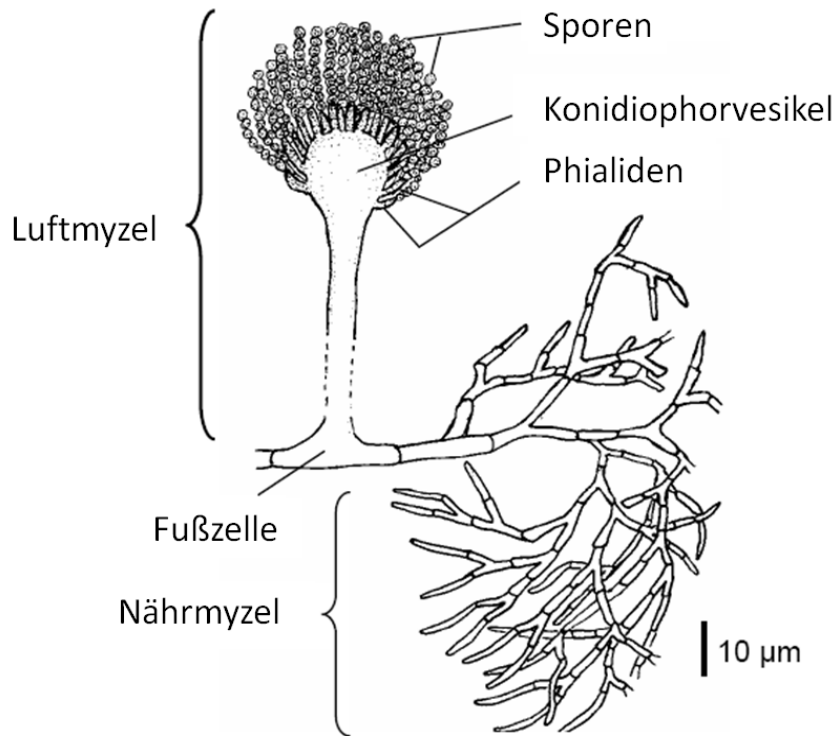


Abbildung 1.1: Morphologie von *A. fumigatus* mit freundlicher Genehmigung von Utz Reichard.

1.1.3 Vorkommen

A. fumigatus ist eine weit verbreitete und ubiquitär vorkommende Spezies, die sich hauptsächlich vegetativ fortpflanzt. O’Gorman et al. (2009) konnten jedoch zeigen, dass auch eine sexuelle Fortpflanzung der Sporen stattfinden kann. Der Pilz und insbesondere dessen vegetative Sporen finden sich von der Antarktis bis zur Sahara grundsätzlich überall. Die durchschnittliche Konzentration der Sporen von *A. fumigatus* innerhalb und außerhalb geschlossener Räume beträgt ca. 2-5 Sporen/m³. Ein Individuum atmet täglich eine Vielzahl dieser Sporen ein (Hospenthal et al. 1998; Latgé 1999). Aufgrund ihres geringen Durchmessers von 2-3 µm gelangen sie mit dem Luftstrom in tiefere Lungenareale bis zu den Alveolen (Samson und van Reenen-Hoekstra 1988). *A. fumigatus* wächst in einem Temperaturbereich von 12-55°C (Reiß 1997). Sein Wachstumsoptimum liegt zwischen 37°C und 42°C; somit ist *A. fumigatus* ein thermophiler Pilz. Es wurde bereits eine Vielzahl von Genen beschrieben, die für thermostabile Enzyme kodieren und das temperaturtolerante Wachstum von *A. fumigatus* mitbegründen (Askew 2008).

1.2 Klinische Bedeutung in der Humanmedizin

A. fumigatus ist mit 90% der herausragende Krankheitsverursacher aller durch *Aspergillen* hervorgerufenen Erkrankungen (Latgé 1999).

1.2.1 Invasive Aspergillose

Der Schweregrad der invasiven Aspergillose korreliert in der Regel positiv mit dem Ausmaß einer Neutropenie. Die Inzidenz der invasiven Aspergillose bei Patienten mit Leukämie beträgt in Europa 5% (Segal 2009), nach allogener Stammzelltransplantation 5-10% (Rivera et al. 2006). In sehr seltenen Fällen betrifft das Auftreten der invasiven Aspergillose auch immunkompetente Menschen insbesondere postoperativ bei Gefäßoperationen und Zahnextraktion (Clancy und Nguyen 1998). Die Erkrankung ist durch einen chronischen Verlauf gekennzeichnet. Im Rahmen der Immunantwort des Immunkompetenten kommt es gehäuft zur Granulombildung (Denning 1998; Pasqualotto und Denning 2006). Bei bestehender Immunsuppression werden die Sporen durch die unspezifische Immunabwehr nicht phagozytiert bzw. im Phagolysosom der Alveolarmakrophagen unzureichend abgebaut. Der Pilz adhäriert im weiteren Verlauf an Wirtszellen, keimt aus und kann als Myzel intravasal wachsen, wodurch das Lungengewebe und alle anderen Organe destruiert werden können. Der isolierte Befall eines Lungenlappens ist ebenso möglich wie der disseminierte Befall der ganzen Lunge. Ein Gefäßverschluss durch Aktivierung des Gerinnungssystems sowie Husten mit blutigem Auswurf durch Zerstörung der Gefäßwände sind weitere Folgen der Auskeimung des Pilzes (Albelda et al. 1985; Pagano et al. 1995). Die Diagnosesicherung kann direkt durch einen Erregernachweis auf Nährböden erfolgen. Die Anzucht des Pilzes vollzieht sich durch Inkubation auf entsprechenden Nährböden bei 26°C bis 37°C. Histologisch sind verzweigte Myzelien mit septierten Hyphen zu erkennen, die bei ausreichender Sauerstoffzufuhr auch Sporen ausbilden können. Durch den *Aspergillus*-Galactomannan-Nachweis im Blut ist mittels Enzymimmunoassay (*engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) ein indirekter Erregernachweis möglich (Maertens et al. 1999; Cordonnier et al. 2009; Segal 2009). Galactomannan ist ein in der *Aspergillus*-Zellwand vorkommendes Glykoprotein, dessen Nachweisgrenze bei ca. 0,5-1 ng/ml liegt (Reiss und Lehmann 1979; Tietz et al. 2005). Mittel der ersten Wahl zur Therapie der invasiven Aspergillose ist derzeit das Antimykotikum Voriconazol (Walsh et al. 2008; Segal 2009). Dieses ist hinsichtlich seiner*

Wirksamkeit und in Bezug auf das Langzeitüberleben dem Amphotericin B, welches die frühere Primärtherapie darstellte, überlegen (Herbrecht et al. 2002). Therapeutika wie Itraconazol, Caspofungin und Amphotericin B finden in der Behandlung dieser Erkrankung als Mittel der zweiten Wahl ihre Verwendung (Tietz et al. 2005). Bei vom umgebenden Gewebe scharf abzugrenzenden Pilzherden können chirurgische Interventionen indiziert sein (Danner et al. 2008). Als Präventivmaßnahme hat sich der Verbleib von Risikopatienten in sporenfreier bzw. sporenarmer Umgebung während des stationären Aufenthalts als wirksam erwiesen. In mit Hepa Particulate Airfilter (HEPA-Filtration) ausgestatteten Räumlichkeiten kann die Gesamtsorenkonzentration von *A. fumigatus* signifikant gesenkt werden (Tietz et al. 2005). Bei Risikopatienten kommen zur Prophylaxe u.a. Azole, besonders das Posaconazol, zum Einsatz. Des Weiteren wird derzeit die prophylaktische Inhalation von Amphotericin B diskutiert (Silveira und Husain 2007; Solé 2008; Segal 2009).

1.2.2 Weitere durch *A. fumigatus* ausgelöste Erkrankungen

A. fumigatus ist häufig Auslöser allergischer Erkrankungen. Dazu gehören das *Aspergillus*-Asthma, die Extrinsische Allergische Alveolitis (EAA) sowie die Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) (Hinson et al. 1952). Bei einer ABPA sind insbesondere Patienten, welche an der zystischen Fibrose oder am Asthma bronchiale leiden, betroffen (Cockrill und Hales 1999; Salez et al. 2000). Der Pilz besiedelt Bronchiallumina. Er wächst jedoch nicht invasiv. Gegen die Antigene von *A. fumigatus* findet eine Immunreaktion vom Allergietyp I, III und IV statt (Latgé 1999). Klinisch wird die ABPA durch asthmatische Episoden, flüchtige pulmonale Infiltrate sowie kutane Hypersensitivitätsreaktionen vom Soforttyp manifest (Cockrill und Hales 1999; Salez et al. 2000). Die überschießende Immunreaktion basiert auf einer erhöhten T_H2-Aktivität und der damit verbundenen Sezernierung von Interleukin (IL) 5. Ein Surfactantprotein-A-Polymorphismus prädispositioniert für das Auftreten einer ABPA. Diese Erkrankung wird durch die kombinierten Gabe von Kortikosteroiden und Azolen behandelt (Gibson 2006). Die EAA und das *Aspergillus*-Asthma werden durch die Inhalation der Sporen hervorgerufen. Als Sonderform kann bei einer EAA eine so genannte Farmer- bzw. Malzarbeiterlunge entstehen. Neben Allergien kann der Pilz auch bei Menschen, die nicht immunsupprimiert sind, zu einem Aspergillom führen. Die Nasennebenhöhlen und die Lunge sind typische Prädilektionsstellen (Ferreiro et al. 1997). Prädispositioniert sind Patienten mit

präformierten Höhlen in den Lungen, die besonders durch Kavernenbildung bei bestehender Tuberkulose, chronischer Bronchitis sowie Bronchiektasien entstehen können.

1.2.3 Potentielle Virulenzfaktoren und Antigene von *A. fumigatus*

Die Ausbreitung von *A. fumigatus* im Wirt hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, welche beispielsweise die Haftung an Epithelzellen des Wirtes oder die Inhibition der Phagozytose von Sporen vermitteln. Diese Eigenschaften werden wahrscheinlich durch Adhäsine, toxische Moleküle und Enzyme vermittelt (Latgé 1999).

1.2.3.1 Adhäsine

Adhäsine ermöglichen *A. fumigatus* an Wirtszellen zu haften. Tronchin et al. beschreiben (1997) einen Lamininrezeptor und Hydrophobine, die wiederum von Thau et al. (1994) identifiziert wurden. Diese Komplementrezeptoren vermitteln u.a. die Interaktion zwischen Pilz- und Wirtszelle.

1.2.3.2 Toxische Moleküle

Zu den so genannten toxischen Molekülen gehört das Hämolyisin. Es wird unter anderem von Fukuchi et al. (1996) näher charakterisiert. Hämolyisin ist zur Lyse von Erythrozyten befähigt. Es erleichtert zudem das Auftreten einer invasiven Aspergillose. Sekundäre Metaboliten, wie beispielsweise das Gliotoxin, vermitteln eine Immunsuppression durch zytotoxische Wirkung auf Makrophagen und T-Lymphozyten (Kupfahl et al. 2006). Auch sie sind Vertreter der toxischen Moleküle (Eichner et al. 1986; Sutton et al. 1996). Es zeigte sich, dass nach Inaktivierung des Gens *GliP*, welches für das Schlüsselenzym der Gliotoxinsynthese kodiert, die zytotoxische Wirkung herabgesetzt war (Hohl und Feldmesser 2007; Askew 2008).

1.2.3.3 Enzyme

Die Pathogenität des Pilzes im Rahmen der invasiven Aspergillose wird wahrscheinlich auch von proteolytisch wirksamen Enzymen vermittelt. Sie sind befähigt, das hauptsächlich aus Elastin und Kollagen bestehende Lungenparenchym zu lysieren (Hogan et al. 1996; Reichard et al. 2008).

Proteasen

Das Alp1 ist eine von *A. fumigatus* sezernierte Serinprotease und wurde u.a. von Reichard et al. (1990) beschrieben. Iadarola et al. (1998) konnten zeigen, dass Alp1 in der Lage ist, *in vivo* und *in vitro* extrazelluläre Matrixkomponenten der Lunge zu spalten. Des Weiteren konnte durch Alp1 das Zytoskelett von Pneumozyten durch Spaltung seiner Aktinfasern beschädigt werden (Kogan et al. 2004). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Virulenz zwischen Alp1-sezernierendem Wildtyp und Alp1-Deletionsmutanten von *A. fumigatus* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Monod et al. 1993; Smith et al. 1994; Shibuya et al. 1999). Pep1 ist eine pepsinähnliche Protease von *A. fumigatus*. Bozza et al. (2009) konnten durch Injektion von Pep1 eine Immunität im Mausmodell induzieren. Es wurde jedoch im Tierversuch festgestellt, dass kein Unterschied hinsichtlich der Virulenz zwischen einer Pep-Gendeletionsmutante und einem parentalen Wildstamm besteht (Reichard et al. 1997).

Katalasen

Katalasen gehören zum Enzymspektrum von *A. fumigatus* (López-Medrano et al. 1995; Calera et al. 1997). Neutrophile Granulozyten zersetzen phagozytierte Sporen peroxidativ und oxidativ. Katalasen entschleunigen durch Reduktion der Peroxidase diesen intrazellulären Abbau von Sporen und Myzel des *A. fumigatus*. Bislang wurden drei unterschiedliche Gene (*CATA*, *CAT1* und *CAT2*) identifiziert, welche jeweils für eine Katalase kodieren. Shibuya et al. (2006) zeigen im Tiermodell, dass das Myzel von *A. fumigatus* in infizierten Ratten mit Deletionen im *CAT1*- und *CAT2*-Gen ein verlangsamtes Wachstum aufweist. Es wurde daher geschlossen, dass diese Katalaseaktivität im Myzel von zentraler Bedeutung bei der Abwehr von *A. fumigatus* gegen das Immunsystem ist. Dies ließ sich allerdings bei Deletionen des *CATA*-Gens nicht nachweisen (Shibuya et al. 2006).

Lipasen

Lipasen sind ubiquitär in Flora und Fauna vorkommende fettspaltende Enzyme. Sie zählen aufgrund ihrer Eigenschaft, die Hydrolyse von Esterbindungen zu katalysieren, zu den Esterasen. Diese gehören zur Familie der Hydrolasen. Die Lipasen werden zu der Gruppe 3.1.1 der EC-Klassifikation (engl. *Enzyme Commission Numbers*) gezählt. Diese Klassifikation kategorisiert numerisch Enzyme

nach Art der Reaktion, die sie katalysieren. Es handelt sich im Wesentlichen um Triacylglycerin-Acylhydrolasen (3.1.1.3), da sie die Hydrolyse der Esterbindungen eines Triacylglycerins beschleunigen. Dieses besteht aus einem mit drei Fettsäuren veresterten Glycerin. Der Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von Esterbindungen besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: zunächst wird das Substrat durch einen nukleophilen Angriff des katalytischen Serins an dieses gebunden und es kommt zur Bildung eines tetrahedralen Übergangszustands. Dieser wird durch Histidin und Aspartat sowie Wasserstoffbrücken der Proteinhauptkette stabilisiert. Der Alkoholrest wird abgespalten und es entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex. Durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls kommt es erneut zur Bildung eines tetrahedralen Übergangszustands, aus welchem die Lipase und die freien Fettsäuren wieder freigesetzt werden (Rassow et al. 2008).

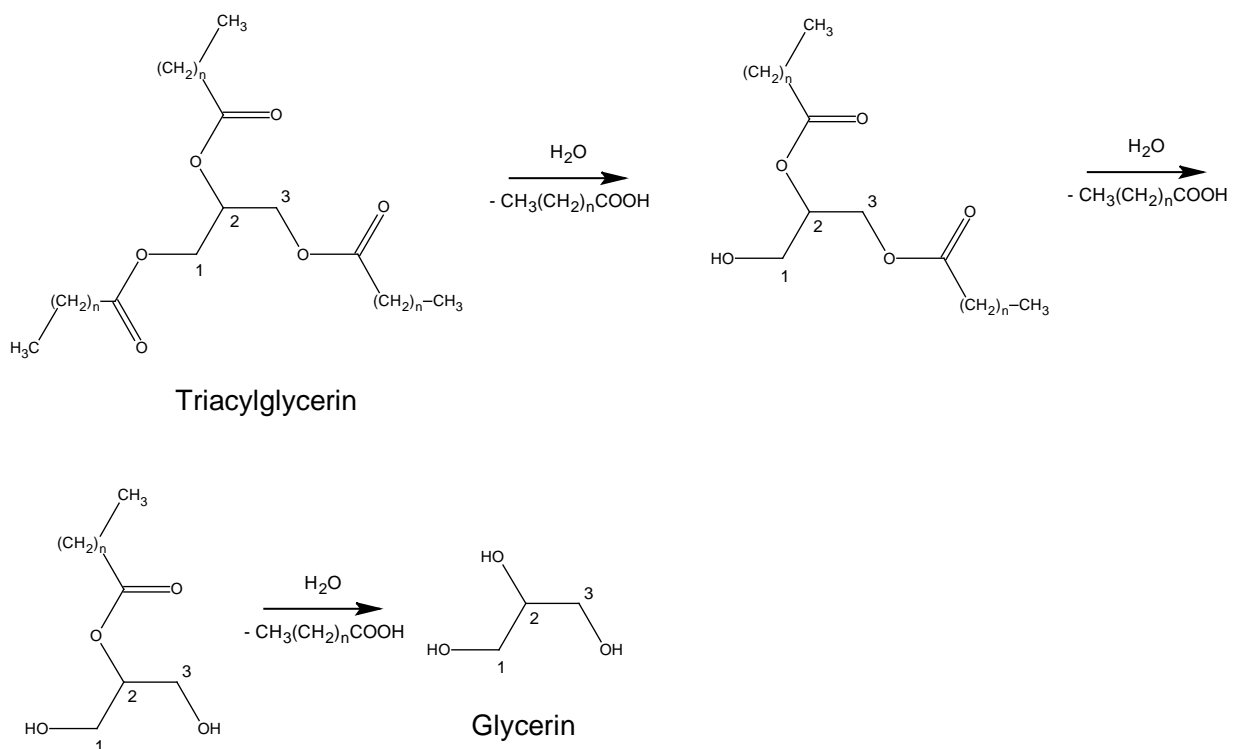


Abbildung 1.2: Hydrolyse eines Triacylglycerins. Zunächst wird die Fettsäure in Position 1 freigesetzt, nachfolgend in Position 3. Durch die Hydrolyse der Esterbindung in Position 2 entsteht ein freies Glycerin. Diese Reaktionsschritte werden durch Lipasen katalysiert.

Lipasen besitzen in der Regel eine aus Ser-Asp(Glu)-His bestehende katalytische Triade (Grochulski et al. 1993). Sie benötigen für ihre Aktivität eine Grenzfläche zwischen einer wässrigen Phase und dem wasserunlöslichen Substrat. Man spricht

auch vom Phänomen der Grenzflächenaktivierung (Sarda und Desnuelle 1958). Auf molekularer Ebene lässt sich dieses durch das Vorhandensein eines „Deckels“ (*lid*) erklären, der häufig aus ein bis zwei α -Helices besteht und erst in Anwesenheit der Grenzfläche zum Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum freigibt (Grochulski et al. 1993).

Kakugawa et al. (2002) unterteilen die Lipasen in zwei Gruppen: den unspezifischen Typ, der die Esterbindung in Triacylglycerinen, wie oben beschrieben, in allen drei Positionen hydrolysiert, und den spezifischen Typ, welcher Esterbindungen nur in den Positionen 1 und 3 hydrolysiert. Die Lipasen von *Candida antarctica* und *Penicillium* gehören beispielsweise zum unspezifischen Typ. Lipasen der *Aspergillus species* gehören vorwiegend zum spezifischen Typ und wurden erst in den letzten Jahren näher charakterisiert (Asif et al. 2006). So klonierten und reinigten Toida et al. (1998) eine 29-kDa-Lipase von *A. oryzae*, die zur Herstellung fermentierter Nahrung in Japan eingesetzt wird. Lipasen von *A. species* sind des Weiteren an Auf- und Abbauprozessen der Zellwand, welche im Wesentlichen aus Chitin besteht, beteiligt. So konnten Mackichan et al. (1995) zeigen, dass in Anwesenheit hoher Konzentrationen freier Fettsäuren die Chitinsynthase von *A. fumigatus*, das Schlüsselenzym der Chitinsynthese, gehemmt wird. Asif et al. (2006) extrahierten eine extrazelluläre Lipase von der Sporenoberfläche des *A. fumigatus* (Accession-Nummer: Q4WE77) mit einem Molekulargewicht von 32 kDa.

1.2.4 Natürliche *Aspergillus*-Abwehr

Die angeborene Immunität besteht aus phagozytierenden Zellen, humoralen Faktoren und anatomisch-physiologischen Gegebenheiten des menschlichen Körpers. Diese bilden die primäre Barriere in der Abwehr einer Infektion durch *A. fumigatus* beim immunkompetenten Individuum (Latgé 1999). Der retrograde Zilienschlag des Flimmerepithels transportiert die Sporen aus dem Respirationstrakt. Die trotz der Zilienbewegung nicht aus der Lunge hinausbeförderten Sporen werden in zweiter Instanz durch das Komplement direkt beschädigt und opsoniert. Komplement liegt sowohl im Blut als auch im Bronchialsekret vor. Durch die Anlagerung des Komplements werden Entzündungsreaktionen vermittelt (Sturtevant und Latgé 1992). Alveolarmakrophagen sind in der Lage, die opsonierten Sporen zu eliminieren (Schaffner et al. 1982; Van De Graaf et al. 1992; Kozel 1996). Darüber hinaus ist die Aktivität von Toll-like-Rezeptoren in Alveolarmakrophagen, der

NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten und die daran gekoppelte Aktivierung und Sezernierung antimikrobieller Proteasen von Bedeutung in der Abwehr einer Infektion mit *A. fumigatus* (Rivera et al. 2006; Segal 2009). Makrophagen eliminieren hauptsächlich auskeimende Konidien (Mircescu et al. 2009). Inhalierter Sporen sprossen erst nach einigen Stunden aus (Aimanianda et al. 2009). Nach 36 Stunden sind diese vollständig abgetötet (Schaffner 1994). Wenn sich aus einer Spore ein Hyphengeflecht ausgebildet hat, heften sich neutrophile Granulozyten an das Geflecht und setzen u.a. Sauerstoffradikale und Defensine frei (Schaffner et al. 1986).

1.2.5 Perspektiven für die Entwicklung eines Impfstoffes

Auskeimende Sporen führen nach Inhalation zu überwiegend unspezifischen Immunreaktionen. Ruhende Sporen von *A. fumigatus* hingegen werden vom Immunsystem nur unvollständig abgetötet (Aimanianda et al. 2009). Aimanianda et al. (2009) konnten nachweisen, dass das Oberflächenhydrophobin Rodlet A, kovalent mit der Sporenwand verbunden, die ruhenden Sporen maskiert und somit vor einer Immunantwort schützt. In Gegenwart dieses Proteins kommt es weder zur Aktivierung von dendritischen Zellen und Alveolarmarkrophagen noch zur Induktion von T_H-Lymphozyten. Das Fehlen von Rodlet A auf der Sporenwand hingegen hat spezifische und unspezifische Immunreaktionen zur Folge. Es wird davon ausgegangen, dass aufgrund der raschen unspezifischen Elimination (Latgé 1999) und der immunologischen Inaktivität der Sporen durch Rodlet A eine spezifische Abwehr bei immunkompetenten Menschen nicht oder nur im geringen Umfang induziert wird. Daher spielt bei einer erstmalig auftretenden invasiven Aspergillose die erworbene Immunität wohl eine untergeordnete Rolle (Denning 1998; Schneemann und Schaffner 1999). Jedoch konnte in mehreren Versuchsreihen nachgewiesen werden, dass die erworbene Immunität von zentraler Bedeutung bei der Abwehr chronischer systemischer Mykosen ist: Lehmann und White (1976) zeigen, dass Mäuse, die mit Sporen von *A. fumigatus* präinfiziert wurden, bei einer zweiten Infektion mit diesem Erreger unter Kortisontherapie keinen disseminierten Krankheitsverlauf aufweisen. Nicht-präinfizierte, mit Kortison immunsupprimierte Mäuse zeigten nach Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* einen disseminierten Befall von Herz, Lunge, ZNS und Nieren. Des Weiteren konnten Corbel und Eades (1977) nachweisen, dass ältere Mäuse im Vergleich zu jüngeren Mäusen resistenter

gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* waren. De Repentigny et al. (1993) induzierten in Mäusen eine Immunität, indem sie die Tiere intravenös mit einer subletalen Dosis von Aspergillussporen infizierten. Diese konnte durch den Transfer des Serums eines immunen Tieres auf ein naives Tier nicht übertragen werden. Es gelang jedoch, eine Immunität durch den Transfer von Milzmakrophagen zu erzielen. Cenci et al. (2000) postulierten daraufhin, dass die protektiven Immunreaktionen weniger humoralen Ursprungs seien, sondern eher zellulär, also durch T_H-1-Lymphozyten und Makrophagen vermittelt werden. In einem Kaninchenmodell einer subletalen invasiven Aspergillose konnte ebenfalls eine protektive Immunreaktion induziert werden. Kaninchen wurden mit Kortikoiden immunsupprimiert und im Abstand mehrerer Wochen mit steigenden *A. fumigatus*-Dosen infiziert. Einige Tiere starben bereits nach initialer Dosis. Der Krankheitsverlauf der Kaninchen, die überlebten, milderte sich im Verlauf der Versuchsreihe deutlich ab (Denikus et al. 2005). Dies erlaubt den Schluss, dass bei sekundären Verläufen, im Vergleich zum erstmaligen Auftreten einer invasiven Aspergillose, die erworbene Immunität eine entscheidende Rolle spielen kann. In der Folge wurde versucht, mit Einzel-Antigenen von *A. fumigatus* eine protektive Immunität im Hinblick auf die Identifizierung potenzieller Totimpfstoffe für immunsupprimierte Menschen zu generieren. Die von *A. fumigatus* während einer Infektion sezernierten Proteine Asp16 und 3 waren die ersten Einzel-Antigene, mit denen eine Immunität im Tiermodell induziert werden konnte (Banerjee et al. 2001; Bozza et al. 2002; Ito et al. 2006). Bozza et al. (2009) gelang es zudem, mit der Aspartase Pep1 und dem Ankerprotein der Zellwand von *A. fumigatus*, Crf1p, eine T_H-1-gewichtete protektive Immunantwort in Mäusen sowie eine Zytokinausschüttung von humanen CD4⁺-T_H-1-Lymphozyten *in vitro* zu induzieren.

1.3 Aufgabenstellung

Lipasen sind als Virulenzfaktoren bei einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* bekannt. Sie trennen die Esterbindungen von Triacylglycerinen und setzen somit freie Fettsäuren und Glycerin frei. Durch die lipolytische Aktivität dieses Enzyms könnte es *A. fumigatus* gelingen, das Wirtsgewebe durch Zersetzung der lipidhaltigen Zellmembranen zu destruieren. Die freien Fettsäuren führen möglicherweise zur

Einstellung des pH-Optimums proteolytisch wirksamer Enzyme und tragen zur Virulenz der Lipasen bei.

Berto et al. (1999) gelang es bereits mit Anti-Lipase-Antikörper Blumenkohlpflanzen passiv gegenüber Sporen des Schimmelpilzes *Alternaria brassicicola* zu vakzinieren. In dieser Arbeit wurde die extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* (Accession-Nummer: Q4WE77, GenID: 74667837), die Asif et al. (2006) aus der Sporenwand erstmalig isolierten, exprimiert und kloniert. Sie soll in weiterführenden Experimenten der Überprüfung auf Immunitätsinduktion im Mausmodell dienen sowie einen sequentiellen Vergleich mit weiteren sezernierten Lipasen von *A. fumigatus* und Lipasen anderer Organismen ermöglichen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie

4-Nitrotetrazoliumchlorid-Blau; NBT-Stamm
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat; BCIP
6X Loading Dye Solution

Hersteller

SIGMA, Deisenhofen
SIGMA, Deisenhofen
FERMENTAS, St. Leon

Acrylamid

ROTH, Karlsruhe

Agarose Seakem®

BIOZYM, Wien

Ammoniumpersulfat

ROTH, Karlsruhe

Antarctic Phosphatase

New England Biolabs,
Schwalbach

Bacto™ Agar

BD, Sparks

Bacto™ Tryptone

BD, Sparks

Bacto™ Yeast Extract

BD, Sparks

Bisacrylamid

ROTH, Karlsruhe

Borsäure

ROTH, Karlsruhe

Bromphenolblau

SIGMA, Deisenhofen

BSA (Fraktion V)

ROTH, Karlsruhe

BSA-Puffer 10x

BIOLABS, Frankfurt/M.

Butanol

ROTH, Karlsruhe

Chloroform

MERCK, Darmstadt

Coomassie® Brilliant Blue R

MERCK, Darmstadt

Digoxigenin-11-UTP (25 nmol)

BOEHRINGER, Ingelheim

Entwickler

KODAK, Stuttgart

Essigsäure

ROTH, Karlsruhe

Ethanol

ROTH, Karlsruhe

Ethidiumbromid

ROTH, Karlsruhe

Ficoll® PM 400	SIGMA, Deisenhofen
Formamid	ROTH, Karlsruhe
Gelatine	ROTH, Karlsruhe
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Glycerin	MERCK, Darmstadt
Guanidin-Hydrochlorid	ROTH, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	ROTH, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)	PEQLAB, Erlangen
Kaliumchlorid	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MERCK, Darmstadt
Magnesiumsulfat	MERCK, Darmstadt
MassRuler™ DNA LADDER, High Range	FERMENTAS, St. Leon
MassRuler™ DNA LADDER, Low Range	FERMENTAS, St. Leon
MassRuler™ DNA LADDER, Mix Range	FERMENTAS, St. Leon
Methanol	ROTH, Karlsruhe
Milchpulver	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
NEB-Buffer 1 - 4 10 x	BIOLABS, Frankfurt/M.
Nucleotid-Mix (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)	LA ROCHE, Mannheim
PCR-Puffer 10 x	BIOLABS, Frankfurt/M..
PEQ LAB Gold IV, Proteinmarker	PEQLAB, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	SIGMA, Deisenhofen

T4-DNA-Ligase	BIOLABS, Frankfurt/M..
Taq-Polymerase	LA ROCHE, Mannheim
Tetramethylethyldiamin, 1,2- Bis(dimethylamino)-ethan	ROTH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	ROTH, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	ROTH, Karlsruhe
Triton X-100	APPLICHEM, Darmstadt
Tween 20	ROTH, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
ECL-System	AMERSHAM, Buckinghamshire
Falcon 2059 Polypropylen-Tube	STRATAGENE, Amsterdam
Gelextraktion von DNA mit Qiaex II Kit	QIAGEN, Hilden
Kodak Biomax Light Film	KODAK COMPANY, New York
Nickel-NTA-Medium, Nitrozellulose-Membranen	QIAGEN, Hilden SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Plastikküvetten	MBT, Gießen
QIAprep Spin [®] Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick [®] PCR Purifikation Kit (50)	QIAGEN, Hilden
Sterilfilter (0,2 µm)	CORNING, New York

2.3 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym

Hersteller

HinD III (Haemophilus influenzae, Stamm Rd)

Erkennungssequenz Restriktionsschnitt

5'-AAGCTT-3' 5'-A AGCTT-3'
3'-TTCGAA-5' 3'-TTCGA A-5'

BIOLABS, Frankfurt/M.

Sph I (Streptomyces phaeochromogenes)

Erkennungssequenz Restriktionsschnitt

5'-GCATGC-3' 5'-GCATG C-3'
3'-CGTACG-5' 3'-C GTACG-5'

BIOLABS, Frankfurt/M.

EcoRI (Escherichia coli Stamm R)

Erkennungssequenz Restriktionsschnitt

5'-GAATTC-3' 5'-G AATTC-3'
3'-CTTAAG-5' 3'-CTTAA G-5'

BIOLABS, Frankfurt/M.

2.4 Antibiotikum

Antibiotikum

Hersteller

Ampicillin

SIGMA, Deisenhofen

Chloramphenicol

SIGMA, Deisenhofen

Kanamycin

SIGMA, Deisenhofen

2.5 Antikörper

Antikörper

Hersteller

Anti-His-Antikörper

DIANOVA, Lausanne

Alkalische Phosphatase

Goat-anti-Mouse-Antikörper

QIAGEN, Hilden

Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Antikörper

ROCHE, Mannheim

2.6 Plasmid

pQE 30

QIAGEN, Hilden

2.7 Geräte

Gerät

Herkunft

Blockthermostat Thermomixer 5436

EPPENDORF, Hamburg

Electro Cell Manipulator 600

Elektroporationssystem

BTX, San Diego

Elektronische Waage SBC 52

SCALTEC, Göttingen

Elektrophoresekammer Scientific TE Series

HOEFER, San Francisco

Mighty small Gel Casters

HOEFER, San Francisco

Mikrowelle

AEG, Hamburg

PCR-Cycler PCR Sprint

HYBAID, Heidelberg

PD10-Säule

QIAGEN, Hilden

pH-Meter Toledo 225

METTLER, Giessen

Photodokumentationsanlage BioDocII

BIOMETRA, Göttingen

Photometer PHARMACIA Ultraspec 1000

BIOTEC, Ebersberg

Schüttelgerät Duomax 1030

HEIDOLPH, Darmstadt

Schüttler HG

BRAUN, Melsungen

Standzentrifuge Rotixa/RP

HETTICH, Lauenau

Thermocycler

BIOMETRA, Göttingen

Tischzentrifuge Zentrifuge 5415 D

EPPENDORF, Hamburg

Tischzentrifuge Z233 MK-2

HERMLE, Wunstorf

Vortexgerät Genie 2

BENDER&HOBEIN, Zürich

Wärmebad 1083

GFL, Burgwedel

Zentrifugalkonzentrator, Vivaspin

Sartorius, Göttingen

2.8 Stammlösung und Puffer

TAE-Puffer 6x:

29.04 g	Tris	(MW 121,14)
6,852 ml	100% Essigsäure	
12 ml	0,5 M EDTA-Lösung pH 8.0	

mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

TBE-Puffer 5x:

54 g	Tris	(MW 121,14)
27,5 g	Borsäure	(MW 61,83)
20 ml	0,5 M EDTA (pH 8.0)	

Mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

Transferpuffer für Westernblot:

6,0 g	Tris	(MW 121,14)
28,8 g	Glycin	(MW 75,07)
300 ml	100% Methanol	(MW 32,04)

mit H₂O auf 2 Liter auffüllen

Coomassiefärbelösung:

10 ml	33% Coomassie Brilliant Blue R (0,5% w/v)	
10 ml	20% Essigsäure	
10 ml	100% Methanol	(MW 32,04)

Trenngelbuffer für die SDS-Gelelektrophorese (1M Tris-HCl pH 8,8):

12,1 g Tris (MW 121,14)

80 ml H₂O

Mit rauchender HCl auf pH 8,8 titrieren und mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Sammelgelbuffer für SDS-Gelelektrophorese (1M Tris-HCl pH 6,8):

12,1 g Tris (MW 121,14)

80 ml H₂O

Mit rauchender HCl auf pH 6,8 titrieren und mit H₂O auf 100 ml auffüllen

10% SDS-Lösung für die SDS-Gelelektrophorese:

1,0 g Natriumdodecylsulfat (MW 288,4)

Mit H₂O auf 10 ml auffüllen

Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

2,0 ml Glycerin (MW 92,09)

5,0 ml 10% SDS-Lösung

3,0 ml Sammelgelbuffer

1,0 ml 1% Bromphenolblau (MW 669,99)

Stammlösung für die SDS-Gelelektrophorese (0,1 M Tris + 0,76 M Glycin):

12,0 g Tris (MW 121,14)

57,6 g Glycin (MW 75,07)

mit H₂O auf einen Liter auffüllen

Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese:

10 ml	10% SDS-Lösung
250 ml	Stammlösung
740 ml	H ₂ O

40% Acrylamid-Stammlösung für die SDS-Gelelektrophorese:

40 g	Acrylamid	(MW 71,08)
1,2 g	Bisacrylamid	(MW 154,17)
Mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen		

10% APS-Lösung für die SDS-Gelelektrophorese:

0,1 g	Ammoniumpersulfat	(MW 228,20)
Mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen		

SM-Puffer:

5,8 g	NaCl	(MW 58,40)
2,0 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(MW 246,48)
50,0 ml	1M Tris-Cl pH 7,5	
100,0 mg	Gelatine	
mit H ₂ O auf einen Liter auffüllen und autoklavieren		

20 X SSC:

175,3 g	NaCl	(MW 58,4)
---------	------	-----------

88,2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (MW 294,1)
In 800 ml H₂O lösen; mit NaOH oder HCl auf pH 7,0 einstellen und auf
1 Liter auffüllen.

Denhards Reagenz 50 X:

5 g Ficoll Typ 400
5 g Polyvinylpyrrolidon
5 g BSA (Fraktion V)
mit H₂O auf 500 ml und sterilfiltrieren

Puffer für das Kolonie-Screening auf His-getagte Proteine

TBS-10-Puffer (150 mM NaCl + 10 mM Tris-Cl pH 7,5):

1,21 g Tris (MW 121,14)
8,76 g NaCl (MW 58,40)
mit H₂O auf einen Liter auffüllen und pH 7,5 mit HCl einstellen

TBS-10-Puffer + 20 mM EDTA:

40 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung
mit 960 ml TBS-10-Puffer versetzen

TBS-20-Puffer (20 mM Tris-Cl pH 7,5 + 500 mM NaCl):

2,42 g	Tris	(MW 121,14)
29,22 g	NaCl	(MW 58,40)

mit H₂O auf einen Liter auffüllen und pH 7,5 mit HCl einstellen

TBS-20-Puffer + Tween/Triton

(20 mM Tris-Cl pH 7,5 + 500 mM NaCl + 0,05% Tween 20 + 0,2% Triton X-100):

2,42 g	Tris	(MW 121,14)
29,22 g	NaCl	(MW 58,40)
500,00 µl	Tween 20	
2000.00 µl	Triton X-100	

mit H₂O auf einen Liter auffüllen und pH 7,5 mit HCl einstellen

Substratpuffer (100 mM Tris-Cl pH 9,5 + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl₂):

12,10 g	Tris	(MW 121,14)
5,84 g	NaCl	(MW 58,40)
1,00 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	(MW 203,30)

mit H₂O auf einen Liter auffüllen und pH 9,5 mit HCl einstellen

Für die Aufarbeitung HIS-getagter Proteine verwendete Puffer

Puffer X (0,1 M NaH₂PO₄ + 0,01 M Tris):

13,79 g	NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O	(MW 137,99)
1,21 g	Tris	(MW 121,10)

In zweifachdestiliertem H₂O auf 1 Liter auffüllen

Puffer A (6 M Guanidin-Hydrochlorid + 0,1 M NaH₂PO₄ + 0,01 M Tris):

80.25 g Guanidin - Hydrochlorid (MW 95,53)
auf 140 ml Gesamtvolumen mit Puffer X auffüllen
pH 8 mit NaOH einstellen

Puffer B (8 M Urea + 0,1 M NaH₂PO₄ + 0,01 M Tris):

12.01 g Harnstoff (Urea) (MW 60,06)
auf 25 ml Gesamtvolumen mit Puffer X auffüllen
pH 8 mit NaOH einstellen

Puffer C (8 M Urea + 0,1 M NaH₂PO₄ + 0,01 M Tris):

12.01 g Harnstoff (Urea) (MW 60,06)
auf 25 ml Gesamtvolumen mit Puffer X auffüllen
pH 6,3 mit rauchender HCl einstellen

Puffer E (8 M Urea + 0,1 M NaH₂PO₄ + 0,01 M Tris):

9,6 g Harnstoff (Urea) (MW 60,06)
auf 20 ml Gesamtvolumen mit Puffer X auffüllen
pH 4,5 mit rauchender HCl einstellen

Puffer F (6 M Guanidine-Hydrochlorid + 0.2 M Essigsäure):

11,47 g	Guanidin-Hydrochlorid	(MW 95,53)
230 µl	Essigsäure	

Auf 20 ml Gesamtvolumen mit H₂O auffüllen

PBS-10x-Puffer:

80 g	NaCl	(MW 58,44)
2 g	KCl	(MW 74,55)
11,5 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(MW 178,01)
2 g	KH ₂ PO ₄	(MW 136,09)

800 ml zweifach destilliertem H₂O auffüllen

Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 7,2; auf einen Liter mit H₂O auffüllen
und anschließend autoklavieren

2.9 Kultur- und Nährmedien

Luria-Bertani-(LB)- Agar

10 g	NaCl	(MW 58,44)
10 g	Bacto®-Tryptone	
5 g	Bacto®-Yeast Extract	
20 g	Bacto®-Agar	
950 ml	H ₂ O	

Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0; mit H₂O auf einen Liter auffüllen und autoklavieren

Luria-Bertani-(LB)-Medium:

10 g	Bacto®-Tryptone	
5 g	Bacto®-Yeast Extract	
10 g	NaCl	(MW 58,44)
950 ml	H ₂ O	

Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0; auf einen Liter mit H₂O auffüllen und autoklavieren

Luria-Bertani-(LB)-Top-Agarose:

10 g	NaCl	
10 g	Bacto®-Tryptone	
5 g	Bacto®-Yeast Extract	
7 g	Agarose Seakem®	
950 ml	H ₂ O	

Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0; auf einen Liter mit H₂O auffüllen und autoklavieren.

LB-Medium + 0.2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO₄:

10 g	Bacto®-Tryptone
5 g	Bacto®-Yeast Extract
10 g	NaCl

in 900 ml Bidest lösen, pH mit NaOH auf 7.0 einstellen, mit H₂O auf 950 ml auffüllen, autoklavieren. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml Maltose-MgSO₄-Lösung (2 g Maltose + 2.5 g MgSO₄ x 6H₂O in 50 ml H₂O sterilfiltriert).

SOC-Medium:

5 g	Bacto®-Yeast Extract	
20 g	Bacto®-Tryptone	
0,5 g	NaCl	(MW 58.44)
970 ml	H ₂ O	

mit H₂O auf 970 ml auffüllen, autoklavieren und mit folgenden sterilfiltrierten Lösungen komplementieren: 10 ml 1 M MgCl₂ + 10 ml 1 M MgSO₄ + 10 ml 2 M Glucose. Diese Lösungen zuvor in den gewünschten Mengen in Sarstedt-Tubes herstellen:

3.96 g	Glucose C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	(MW 198.17)	mit H ₂ O auf ca. 10 ml
2.03 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	(MW 203.30)	mit H ₂ O auf ca. 10 ml
2.46 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(MW 246.48)	mit H ₂ O auf ca. 10 ml

2.10 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Anwendung	Herkunft
<u><i>E. coli</i></u> SOLR	<i>In-vivo</i> -Umklonierung von Inserts von <i>A. fumigatus</i> λ -ZAP-Express in Plasmide	STRATAGENE, Amsterdam
<u><i>E. coli</i></u> Rosetta II	Expressionsstamm zur Herstellung/Aufreinigung His-getagter Proteine	STRATAGENE, Amsterdam
<u><i>E. coli</i></u> XL1-Blue MRF'	Propagation der λ -ZAP-Phagen der cDNA-Expressionsbank	STRATAGENE, Amsterdam
<u><i>E. coli</i></u> Top-10	Amplifizierung des Plasmids	STRATAGENE, Amsterdam

2.11 Oligonukleotidprimer

Die Primer wurden von der Firma SIGMA hergestellt.

5' - 3'

EL1_66 AAATTTGCATGCCCAGCAATGTTGGCAAAG

EL2_66 TATTATAAGCTTTTATTGACAACCATCAATATGGCCAATATACC

5' - 3'

LIPASE_1 CGCACGATAGACACATGGTT

LIPASE_2 CTACGGGAATCCCTGCTTTC

5' - 3'

LIPASE_3 GGACTTTGGCCTGGACAGTA

LIPASE_4 CCGAAGCTATGGCCAGTAAA

SEQUENZIERPRIMER PQE30

5' - 3'

CGGATAACAATTTTCACACAG

2.12 Phagen

Phage

ExAssist helper phage (1×10^6 pfu / μ l)
aus Lambda-Zap-Kit

Uni-ZAP XR

Premade Library *Aspergillus fumigatus*

Hersteller

STRATAGENE,
Amsterdam, Niederlande

STRATAGENE,
Amsterdam, Niederlande

3 Methoden

3.1 Herstellung einer digoxigenierten Sonde

3.1.1 PCR I

Die Primer Lipase 1 und Lipase 2 wurden in einer Konzentration von 5 pMol/ μ l zu je 2,5 μ l mit 0,5 μ l DNA aus dem NCPF-Stamm (10 ng/ μ l), 12,25 μ l H₂O, 2,5 μ l Nukleotid-Mix, 2,25 μ l PCR-Puffer und 2,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l) in ein 0,2 ml PCR-Tube gegeben. Die Taq-Polymerase wurde zuvor verdünnt, indem 5 μ l PCR-Puffer und 45 μ l H₂O zusammengegeben wurden. Im Anschluss wurden 14,25 μ l dieser Lösung mit 0,75 μ l Taq-Polymerase vermengt.

Die Polymerasekettenreaktion wurde nach folgendem Programm im PCR-Cycler durchgeführt:

95 °C	3 Minuten	Vordenaturierung	ein Zyklus
95 °C	20 Sekunden	Denaturierung	} 35 Zyklen
55 °C	20 Sekunden	Annealing	
72 °C	15 Sekunden	Elongation	
72 °C	7 Minuten		ein Zyklus
4 °C			Haltetemperatur

Das PCR-Produkt wurde zur Größenbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen.

Zusammensetzung und Konzentration des Nukleotid-Mix

(LA ROCHE, Mannheim)

Nukleotid	Konzentration
dGTP	100 mM
dATP	100 mM
dCTP	100 mM
dTTP	100 mM

3.1.2 Nested PCR

Die Primer Lipase 3 und Lipase 4 wurden in einer Konzentration von 5 pMol/ μ l zu je 2,5 μ l mit 0,5 μ l 1:1000 verdünntem PCR-Produkt (siehe Kapitel 3.1.1), 12,25 μ l H₂O, 2,5 μ l Digoxigenin-Nukleotid-Mix, 2,25 μ l PCR-Puffer und 2,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l) in ein 0,2 ml PCR-Tube gegeben. Die Taq-Polymerase wurde zuvor verdünnt, indem 5 μ l PCR-Puffer und 45 μ l H₂O zusammengegeben und 14,25 μ l dieser Lösung mit 0,75 μ l Taq-Polymerase vermischt wurden. Im Anschluss wurde die Polymerasekettenreaktion nach folgendem Programm im PCR-Cycler durchgeführt:

95 °C 3 Minuten	Vordenaturierung	ein Zyklus
95 °C 20 Sekunden	Denaturierung	} 35 Zyklen
55 °C 20 Sekunden	Annealing	
72 °C 10 Sekunden	Elongation	
72 °C 7 Minuten		ein Zyklus
4 °C		Haltemperatur

Das Digoxigenin-markierte PCR-Produkt wurde anschließend zur Größenkontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde dann in der Anzahl der Basenpaare mit dem PCR-Produkt einer Polymerasekettenreaktion mit dem Nukleotid-Mix ohne Digoxigenin im PCR-Ansatz verglichen.

Zusammensetzung Digoxigenin Nukleotid-Mix (2 mM in H₂O),
(LA ROCHE, Mannheim)

Nukleotid	Konzentration	Menge
dGTP	2 mM	2 μ l
dATP	2 mM	2 μ l
dCTP	2 mM	2 μ l
dTTP	1,3 mM	1,3 μ l
Dig-11-dUTP (1 mM)	0,7 mM	25 μ l
H ₂ O		9,85 μ l

3.2 Screening einer λ -cDNA-Bank mit langen Sonden

Auf LB-Agar wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1 Blue MRF⁻ ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Eine Schüttelkultur wurde am nächsten Tag mit einer über Nacht auf LB-Agar gewachsenen Kolonie beimpft. Diese Schüttelkultur bestehend aus dem LB-Medium + 0,2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO₄ und 5 ml sterilem Medium wurde bei 37°C in ein 50 ml Plastik-Tube gegeben und im Kreisschüttler bei 200 U/min für 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Parallel wurden λ -Phagen, welche die cDNA von *A. fumigatus* enthalten, aus dem -80 °C Schrank entnommen, auf Eis aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:5000 im SM-Puffer verdünnt. 20 μ l dieser Phagensuspension wurden in je drei Eppendorf-Tubes gegeben. Je 200 μ l des in 10 mM MgSO₄ gelösten Pellets des Stammes *E. coli* XL1 Blue MRF⁻ wurden in drei mit Phagensuspension gefüllte Eppendorf-Tubes gegeben und unter leichtem Schütteln bei 37 °C für 15 Minuten im Wärmeblock gemischt und inkubiert. Die Phagen-Bakteriensuspensionen wurden anschließend zur zuvor in der Mikrowelle aufgekochten Top-Agarose in 10 ml Plastikubes zu je 3 ml aliquotiert und bei 48 °C im Wasserbad bereitgestellt. Das Phagenagarosegemisch wurde dann unverzüglich auf mindestens 24 Stunden zuvor gegossene LB-Agar-Platten ausgestrichen. Im Anschluss inkubierten diese Platten zwei Stunden bei 37 °C, dann bei 42 °C weitere sieben Stunden und über Nacht bei 37 °C. Die Platten wurden am nächsten Morgen für eine Stunde bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen für zwei bis fünf Minuten auf die Top-Agarose gelegt und mit einer Nadel fünf Löcher am Rand gestochen, um später die Korrelation der Signale mit der signalgebenden Plaque zu gewährleisten. Die Membranen wurden daraufhin zum Trocknen auf Whatman-Papiere gelegt. Die Nitrozellulosemembranen wurden bei Raumtemperatur wie folgt weiterbehandelt:

2 Minuten in 1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH (Denaturierung)

5 Minuten in 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-Cl pH 8,0 (Neutralisation)

10 Sekunden in 0,2 M Tris-Cl pH 7,5

10 Sekunden in SSC-Medium

Die Nitrozellulosemembranen wurden bei 80 °C über 90 Minuten im Vakuumofen erhitzt.

3.2.1 Prähybridisierung

Die Nitrozellulosemembranen wurden in je eine Petrischale gelegt und je 20 ml Prähybridisierungslösung dazugegeben. Zwei Stunden inkubierten sie bei 37 °C.

Lösung	Zusammensetzung
Prähybridisierungslösung pro 10 ml	5 ml 50% Formamid
	3 ml 20 x SCC
	1 ml 50 x Denhardts Reagenz
	0,5 ml 10% SDS
	0,1 ml Heringssperma-DNA (10 ng/ml)
	0,4 ml H ₂ O

3.2.2 Hybridisierung

Von der in 3.1 hergestellten digoxigenierten Sonde wurde 1 µl mit 100 µl H₂O versetzt und für fünf Minuten bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden sofort 100 µl Formamid hinzugegeben, der gesamte Ansatz für fünf Minuten auf Eis gestellt und auf je 20 ml Prähybridisierungslösung, welche sich jeweils auf der Nitrozellulosemembran befand (siehe 3.2.1), pipettiert. Die mit Prä- und Hybridisierungslösung versetzten Nitrozellulosemembranen inkubierten für 24 Stunden bei 37°C. Die Membranen wurden für 2 x 15 Minuten mit Waschpuffer I bei 37°C und anschließend 2 x 30 Minuten mit Waschpuffer II bei 57°C äquilibriert.

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer I	2 x SCC-Medium, 0,5% SDS
Waschpuffer II	0,1 x SCC-Medium, 0,5% SDS

3.2.3 Detektion von DIG-markierten DNA-Proben

Die Nitrozellulosemembranen wurden eine Minute bei Raumtemperatur in PBS-Puffer (pH 7,2) und eine Stunde bei Raumtemperatur in 10 ml Blockpuffer, bestehend aus PBS + 5% Milchpulver, mit 0,1% Tween 20 äquibriert. Parallel wurden 10 µl eines Peroxidase-markierten Antikörpers (150 U/ml) in 10 ml Blockpuffer im Verhältnis von 1:1000 verdünnt und anschließend auf die Nitrozellulosemembranen gegeben, um diese zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Die Antikörper binden in diesem Schritt an das Digoxigenin der in 3.1 hergestellten Sonde. Nach der zweistündigen Inkubation wurden die Membranen für 3 x 10 Minuten mit PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und danach eine Minute bei Raumtemperatur mit den ECL-Reagenzien, welche zuvor zu gleichen Teilen vermengt wurden, inkubiert. Die ECL-Lösung markiert den Antikörper. Auf dem Röntgenfilm erscheinen die entsprechenden Plaques durch eine Photoreaktion als Lichtblitz.

In einer Dunkelkammer wurden die Membranen anschließend unter eine sich in einer Filmkassette befindliche Klarsichtfolie geschoben, wobei ein Röntgenfilm (Kodak Bio Max Light Film) fünf Minuten auf diese gelegt wurde. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte, indem dieser zunächst zwei Minuten im Entwickler, zwei Minuten in 5% Essigsäure sowie zwei Minuten in zweifach destilliertem H₂O inkubiert. Der Film wurde anschließend den Markierungen entsprechend auf die Platten gelegt, die Plaques, welche sich als Lichtblitzreaktion auf dem Röntgenfilm zeigten, mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze als ca. 4-5-mm³-Würfel ausgestochen und jeweils in ein 1,5-ml-Tube mit je 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform gegeben, gevortext und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Diese Phagenstammlösung ist bei 4°C sechs Monate stabil.

3.3 Umklonierung der cDNA aus Lambda-Zap in ein Phagemid

Der für das gesuchte Protein kodierende DNA-Abschnitt der in 3.2 gescreenten Phagenklone wurde in Plasmide umkloniert. Der Bakterienstamm XL1-Blue MRF' wurde auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 5 bis 10 ml LB-Medium + 0,2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO₄ gegeben. Nach sechs Stunden wurde die Schüttelkultur bei 1000 x g 10 Minuten zentrifugiert und die Zellen in 10 mM MgSO₄ zu einer OD₆₀₀ von 1,0

resuspendiert. Mit einer MgSO_4 -Lösung wurde der Leerwert im Photometer bestimmt. In ein Falcon 2059-Tube wurden dann nacheinander 200 μl der in MgSO_4 -Lösung befindlichen XL1-Blue MRF-Bakterien, 250 μl Phagenlösung in SM-Puffer ($> 1 \times 10^5$ Phagen) und 1 μl ExAssist helper phage gegeben. Für 15 Minuten inkubierte dieser Ansatz bei 37°C . Anschließend wurden 3 ml LB-Medium hinzupipettiert und bei 37°C über drei Stunden geschüttelt. Um die XL1-Blue MRF-Bakterien abzutöten, wurde der Ansatz nach Ablauf der drei Stunden für 20 Minuten bei 68°C inkubiert. Daraufhin wurde dieser mit $1000 \times g$ über 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert und enthielt das pBK-CMV Phagemid.

Ein zuvor auf LB-Ampicillin-Agar ausplattierter SOLR-Bakterienstamm wurde gepickt und im LB-Medium + 0,2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO_4 über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit $1000 \times g$ wurde der Ansatz am folgenden Tag zentrifugiert und das entstandene Pellet zu 1,0 OD_{600} mit 10 mM MgSO_4 resuspendiert. In ein Falcon 2059-Tube wurden 200 μl des SOLR-Bakterienstamms (OD_{600} 1,0) mit 100 μl des pBK-CMV Phagemid versetzt und bei 37°C über 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden zu jeder Bakterien-Plasmid-Suspension 300 μl LB-Medium + 0,2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO_4 gegeben und für weitere 45 Minuten bei 37°C inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden jeweils 200 μl der Suspensionen fraktioniert, auf einem LB-Ampicillin-Agar (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Drei plasmidtragende Kolonien wurden am nächsten Tag in je 3 ml LB-Medium + 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bei 37°C in einer Schüttelkultur bebrütet und entsprechend 3.14.4 aufgereinigt. Das gereinigte Plasmid wurde sequenziert.

3.4 Polymerasekettenreaktion auf extrazelluläre Lipase kodierende cDNA

Um das Insert, welches für das gesuchte Protein kodiert, zu amplifizieren und es endständig mit den gewünschten Restriktionssites zu versehen, wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

Es wurden 2,0 μl DNA-Probe mit 2,5 μl PCR-Puffer, 2,5 μl Nukleotid-Mix (2 mM in H_2O), 2,5 μl EL1_66 Primer (5 pMol/ μl), 2,5 μl EL2_66 Primer (5 pMol/ μl), 12,5 μl H_2O und 0,3 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl) in ein 0,2 ml PCR-Tube versetzt und die Polymerasekettenreaktion nach folgendem Programm im PCR-Cycler durchgeführt:

95°C 1 Minuten	Vordenaturierung	ein Zyklus
95°C 45 Sekunden	Denaturierung	} 20 Zyklen
57°C 45 Sekunden	Annealing	
72°C 54 Sekunden	Elongation	
72°C 10 Minuten		ein Zyklus
4°C		Haltetemperatur

Das PCR-Produkt wurde anschließend zur Größenkontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.14.1) und sequenziert.

3.5 Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsnukleasen vom Typ II verwendet, welche an der Erkennungsstelle oder in enger Nachbarschaft die DNA spalten, so dass ein 5'-Phosphat- und ein 3'-OH-Ende entsteht.

Für den Restriktionsverdau wurden *HinDIII* (*Haemophilus influenzae*, Stamm Rd) und *SphI* (*Streptomyces phaeochromogenes*) verwendet. Zunächst erfolgte die Behandlung des Plasmids pQE30 mit der Restriktionsendonuklease *SphI*. Eingesetzt wurden 1,5 µg Plasmid, 1,5 µl *SphI* (10 U/µl), 4 µl BSA 10x Puffer (acetyliert; 1mg/ml), 4 µl NEB 2x Puffer. Mit zweifach destilliertem H₂O wurde der Gesamtansatz auf 40 µl gebracht. Dieser inkubierte für 4 Stunden bei 37°C im PCR-Cycler. Anschließend wurde die DNA mit dem Qiaquick-PCR-Purifikation-Kit aufgereinigt und mit 40 µl Elutions-Puffer eluiert.

Das Eluat wurde in ein 1,5-ml-Tube gegeben und mit 5 µl BSA 10x Puffer, 5 µl NEB 2x Puffer, 0,5 µl H₂O und 1,5 µl *HinDIII* (20 U/µl) versetzt. Der Gesamtansatz inkubierte im PCR Cycler für vier Stunden bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden 6 µl Phosphatase-Puffer, 2 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl) und 2 µl H₂O hinzugegeben. Anschließend folgte eine weitere, zweistündige Inkubation bei 37°C im PCR-Cycler. Der Gesamtansatz (60 µl) wurde anschließend zur Inaktivierung der Antarctic Phosphatase für 10 Minuten in ein 70°C-Wärmebad gegeben, mit dem Qiaquick PCR Purifikation Kit gereinigt und mit 20 µl Elution-Puffer

aufgereinigt. Im Photometer wurde die Konzentration bestimmt. Die Plasmid-DNA-Konzentration sowie auch die Qualität der Probe wurden spektroskopisch mit dem Photometer bestimmt. Bei der Messung wurde die Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. DNA hat bei einer Wellenlänge von 260 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum, Proteine bei 280 nm . Eine Extinktion von $1,0$ bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ entspricht einer dsDNA-Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$, einer ssDNA-Konzentration von $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ und einer RNA-Konzentration von $33 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Durch den Quotienten der OD $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ lässt sich die Reinheit einer DNA-Probe bestimmen. Eine saubere DNA-Probe sollte einen Quotienten $> 1,8$ besitzen. Die DNA-Probe wurde im Verhältnis von $1:100$ mit zweifach destilliertem H_2O verdünnt und in einer Quarzküvette bei beiden Wellenlängen mit dem Photometer (Photometer PHARMACIA Ultraspec 1000, BIOTEC) gemessen.

In ein $1,5\text{-ml}$ -Tube wurden $2,5 \text{ }\mu\text{l}$ der Probe und $97,5 \text{ }\mu\text{l}$ H_2O gegeben, um diese bei einer Wellenlänge von 260 nm nach vorheriger Eichung mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ H_2O zu bestimmen. Das Ergebnis wird in $\text{ng}/\mu\text{l}$ angegeben. Im Folgenden wurde das PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuclease *SphI* behandelt. Eingesetzt wurden $1,5 \text{ }\mu\text{g}$ des PCR-Produkts, $1,5 \text{ }\mu\text{l}$ *SphI* ($10 \text{ U}/\mu\text{l}$) $4 \text{ }\mu\text{l}$ BSA $10\times$ Puffer und $4 \text{ }\mu\text{l}$ NEB $2\times$ Puffer. Mit zweifach destilliertem H_2O wurde der Gesamtansatz auf $40 \text{ }\mu\text{l}$ gebracht. Dieser inkubierte für 4 Stunden bei 37°C im PCR-Cycler. Anschließend wurde die DNA mit dem Qiaquick-PCR-Purification-Kit und mit $40 \text{ }\mu\text{l}$ Elutions-Puffer aufgereinigt. Diese $40 \text{ }\mu\text{l}$ wurden in ein $1,5\text{-ml}$ -Tube gegeben und mit $6 \text{ }\mu\text{l}$ BSA $10\times$ Puffer, $6 \text{ }\mu\text{l}$ NEB $2\times$ Puffer, $6 \text{ }\mu\text{l}$ H_2O und $2 \text{ }\mu\text{l}$ *HinDIII* ($10 \text{ U}/\mu\text{l}$) versetzt. Der Gesamtansatz inkubierte für vier Stunden bei 37°C . Mit dem Qiaquick-PCR-Purification-Kit wurde der $60 \text{ }\mu\text{l}$ Gesamtansatz aufgereinigt und mit $20 \text{ }\mu\text{l}$ Elutions-Puffer eluiert. Im Photometer wurde die Konzentration bestimmt. $2,5 \text{ }\mu\text{l}$ der Probe und $97,5 \text{ }\mu\text{l}$ H_2O wurden in ein $1,5\text{-ml}$ -Tube gegeben, um bei einer Wellenlänge von 260 nm nach vorheriger Eichung mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ H_2O die Bestimmung vorzunehmen. Dabei wurde das Messergebnis mit dem Faktor 2000 multipliziert. Das Ergebnis wird in $\text{ng}/\mu\text{l}$ angegeben. Nach jeder Reinigung wurden je $2 \text{ }\mu\text{l}$ des Eluats entnommen. Diese Proben wurden zur abschließenden Beurteilung der Restriktion auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt (siehe 3.14.1).

3.6 Ligation

Durch Ligation wurde das PCR-Produkt in das Plasmid pQE30 transferiert. Das 5'- und das 3' Ende des PCR-Produkts sowie des Plasmids pQE30 wurden nach dem Restriktionsverdau mit *HinDIII* und *SpHI* so geschnitten bzw. linearisiert, dass die Enden jeweils zueinander passen und bindungsfähig sind. Das Plasmid und das Insert müssen im Ligationsansatz äquimolar (1:1) vorliegen. Von dem Vektor wurden 100 ng eingesetzt. Die einzusetzende Menge des Vektors in μl ergibt sich durch Division der Konzentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) mit 100 ng. Nach folgender Formel wird die einzusetzende Menge an Insert berechnet:

$$\text{Insert (ng)} = [\text{Vektor (ng)} \times \text{Insert (Kbp)} / \text{Vektorgröße (Kbp)}] \\ \times \text{molare Ratio Insert/Vektor}$$

Nach Berechnung der einzusetzenden Mengen des Vektors und des Inserts, wurden diese gemeinsam in ein 1,5-ml-Tube gegeben und bei 50°C im Wärmebad inkubiert. Während dieses Schrittes werden erste über Wasserstoffbrückenbindung entstandene Insert/Insert- und Plasmidbindungen gelöst. Nach fünf Minuten wurden je 1 μl T₄ Ligasepuffer und T₄ DNA Ligase (4 U/ μl) zum Gesamtansatz hinzugegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Im Kontrollansatz wurde statt des Inserts in gleicher Menge H₂O für die Ligation eingesetzt.

3.7 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden durch einen elektrischen Puls Poren in der Zytoplasmamembran von Bakterien erzeugt. Die Lipid-Doppelschicht der Membran wird unterbrochen und die hydrophilen Enden kleiden die Porenwandung aus. Durch die Öffnung kann DNA in die Zelle gelangen.

Zunächst wurde ein 50 µl Zellaliquot von *E. coli* Rosetta II auf Eis aufgetaut. Die für die Elektroporation notwendige Transformationsküvette, der Ligations- sowie der Kontrollansatz wurden 60 Minuten auf Eis vorgekühlt. 1,2 µl des Ligationsansatzes und des Kontrollansatzes wurden jeweils vorsichtig in einen 50 µl Zellaliquot von *E. coli* Rosetta II pipettiert. Die 51,2 µl Ansätze wurden im Anschluss in die vorher gekühlten Transformationsküvetten gegeben.

Der *E. coli*-Transporator BTX 600 wurde angeschlossen und in folgender Einstellung verwendet:

- T = 2,5 kV/Resistance High Voltage (HV)
- C = voreingestelltes Setting mit 50 µF in HV
- R = R5 (129 Ohm)
- S = 1,3 – 1,5 kV für 1mm Küvette
- t = 5 – 6 msec
- E = 13 – 15 kV/cm (1mm) oder 12,25 kV/cm (2mm).

Die Transformationsküvetten wurden abgetrocknet, in den Transformator gegeben und der Stromimpuls ausgelöst. Sofort wurden je 500 µl eines SOC-Mediums, welches zuvor bei Raumtemperatur inkubierte, zur Regeneration der Bakterienzellen in die Transformationsküvetten pipettiert. Die Ansätze wurde danach jeweils in ein Sarstedt-Tube gegeben und unter Schütteln 60 Minuten bei 30°C mit leicht geöffnetem Deckel inkubiert. Auf Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) wurden jeweils 200 µl, 150 µl, 50 µl der Probe und 200 µl des Kontrollansatzes ausgestrichen.

3.8 Kolonie-Screening auf His-getagte Proteine

Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta II transfiziert, im SOC-Medium für 90 Minuten bei 30°C regeneriert und anschließend auf Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) ausplattiert. Dieser inkubierte bei 30°C über Nacht. Der Agar trocknete am nächsten Tag mit leicht geöffnetem Deckel, bis sich kleine Falten auf der Oberfläche des Agars ausbildeten. Für weitere 30 Minuten wurde die Agar-Platte bei Raumtemperatur getrocknet. Auf den Agar, auf dem über Nacht die Bakterienkolonien gewachsen waren, wurde ein runder Nitrozellulosefilter aufgelegt. Dabei wurde der Filter mit zwei Pinzetten u-förmig mittig aufgelegt, sanft fallen gelassen und mit einer Spritznadel am Rand mehrfach durchstoßen, so dass später eine Wiederauflegung des Nitrozellulosefilters möglich war. Anschließend wurde der Filter, auf dem sich nun die Bakterienkolonien befanden, abgezogen und auf zuvor mit IPTG (840 mM) behandelten Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) gelegt. Dabei zeigten die Bakterienkolonien nach oben. Währenddessen regenerierte der Agar, auf den der Filter gelegt wurde, bei 30°C. Der Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) mit dem Nitrozellulosefilter wurde anschließend für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Der Nitrozellulosefilter wurde nach Ablauf der Inkubationszeit nacheinander in folgender Reihenfolge in mit 3 mm Whatman-Papier bestückte Petrischalen gelegt:

10% SDS	(10 Minuten)
0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl	(5 Minuten)
1,5 M NaCl + 0,5 M Tris - HCL pH 7.4	(5 Minuten)
1,5 M NaCl + 0,5 M Tris - HCL pH 7.4	(5 Minuten)
SSC 1x	(15 Minuten)
SSC 1x	(15 Minuten)

Der getrocknete Nitrozellulosefilter wurde zunächst zweimal für 10 Minuten im TBS-10-Puffer gewaschen und anschließend über eine Stunde im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovine Serum Albumin (BSA), unter leichtem Schütteln in einer Petrischale inkubiert. Der Nitrozellulosefilter wurde zweimal für je 10 Minuten im TBS-20-Puffer Tween/Triton und anschließend 10 Minuten im TBS-10-Puffer gewaschen. Danach wurde der Nitrozellulosefilter über eine Stunde bei Raumtemperatur im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovinem Serum-Albumin und 1:2000 verdünntem Anti-His-Antikörper, unter leichtem Schütteln in einer Petrischale inkubiert. Die Anti-His-Antikörper binden in diesem Schritt an den Histidinteil des Proteins. Der Nitrozellulosefilter wurde zweimal für je 10 Minuten im TBS-20-Puffer Tween/Triton und im Anschluss für 10 Minuten im TBS-10-Puffer gewaschen. Im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovinem Serum-Albumin und 1:1000 verdünntem Antikörper Alkalische Phosphatase Goat-anti-Mouse, wurde der Nitrozellulosefilter nun über zwei Stunden bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Der Antikörper Alkalische Phosphatase Goat-anti-Mouse bindet in diesem Reaktionsschritt an den Fc-Teil des Anti-His-Antikörpers. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter dreimal für je 10 Minuten mit dem TBS-20-Puffer Tween/Triton sowie für zwei Minuten in Substratpuffer gewaschen. Um eine Antikörper Goat-anti-Mouse-vermittelte Farbentwicklung auszulösen, wurde die Membran in 10 ml Substratpuffer mit 66 µl NBT-Stamm und 33 µl BCIP-Stamm gegeben und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die mit einem Histidinrest versehenen Proteine erschienen als deutlich sichtbarer Punkt auf dem Nitrozellulosefilter. Diese wurden auf den korrespondierenden Platten zugeordnet, gepickt und in eine Dauerkultur gebracht (siehe 3.9).

3.9 Anfertigung von Dauerkulturen

In eine 2-ml-LB-Medium-Schüttelkultur mit Ampicillin in einer Konzentration von 80 µg/ml und Chloramphenicol in einer Konzentration von 50 µg/ml wurde eine im Koloniescreening auf HIS-getagte Proteine (siehe 3.11) positiv befundene Rosetta-II-Kolonie gegeben und für vier Stunden unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit 150 µl sterilfiltriertem Glycerol wurden 850 µl der Schüttelkultur versetzt. Die Aufbewahrung dieser Dauerkultur erfolgte bei -80°C.

3.10 Sequenzierung des Inserts von pQE30

Auf Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) wurde der in Dauerkultur befindliche plasmidtragende Bakterienstamm (Rosetta II) ausgestrichen und bei 37°C bebrütet. Mit einer auf dem Agar gewachsenen Bakterienkolonie wurden 3 ml LB-Medium + 80 µg/ml Ampicillin + 20 µg/ml Chloramphenicol beimpft und über Nacht bei 37°C als Schüttelkultur inkubiert. Das Plasmid wurde aufgereinigt (siehe 3.14.4). Im Anschluss wurde der Ansatz auf ein Agarosegel gegeben und das Plasmid pQE30 extrahiert (3.14.2). Daraufhin wurden 600 ng des aufgereinigten Plasmids, 1 µl Sequenzierprimer mit zweifach destilliertem H₂O, auf einen Gesamtansatz von 7 µl gebracht und zum Sequenzieren zur Firma SeqLabs (Göttingen) geschickt.

3.11 Produktion und Aufarbeitung HIS-getagter Proteine

Um HIS-getagte Proteine aufzureinigen, müssen diese mit ihrem Histidinrest an ein Nickel-NTA-Medium binden. Diese Bindung löst sich bei einem pH-Wert von 4,5 wieder. Das Nickel-NTA-Medium wird in eine Säule gegeben. Durch Zugabe verschiedener Puffer in die Säule werden nicht-HIS-getagte Proteine herausgewaschen; durch Zugabe eines Puffers mit einem pH-Wert von 4,5 wird das HIS-getagte Protein eluiert und aus seiner Bindung mit dem Nickel-NTA-Medium gelöst. Der in Dauerkultur befindliche Bakterienstamm Rosetta II (siehe 3.9) wurde auf Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar (Chloramphenicol 20 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen, über Nacht bei 30°C inkubiert und mit einer Schüttelkultur beimpft. Die Schüttelkultur benötigt eine Konzentration von 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Chloramphenicol im 2-3 ml LB-Medium. Diese wurde über Nacht bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In einen Schikanekolben wurden 250 ml LB-Medium, 200 µl Ampicillin (80 µg/ml Endkonzentration), 500 µl Chloramphenicol (50 µg/ml) sowie die Schüttelkultur gegeben. Bei 30°C inkubierte der Ansatz unter leichtem Schütteln. 0,5 ml einer 0,5 mM IPTG-Stammlösung wurden nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 hinzugegeben. Es wurde 1 ml vor und stündlich 1 ml nach IPTG-Zugabe aus dem Ansatz entnommen, um diesen später auf einem Coomassie-Gel zu analysieren. Vier Stunden nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG wurde die Kultur entnommen und in einer Zentrifuge mit 1500 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml PBS-Puffer

resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 50-ml-Tube überführt und anschließend in einer Zentrifuge mit 1500 x *g* über 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 25 ml Puffer A (siehe 2.8) resuspendiert, eine Minute gevortext und bei 37°C unter sanftem Schütteln zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 10000 x *g* hochtourig für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand und 1,5 ml Nickel-NTA-Medium wurden in ein 50-ml-Tube zusammengegeben und bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. In diesem Schritt bindet der Histidinrest des HIS-getagten Proteins an das Nickel-NTA-Medium. Mit 700 x *g* wurden beide Flüssigkeiten voneinander getrennt. Anschließend wurde das Nickel-NTA-Medium in eine aus Plastik bestehende Säule pipettiert und mit 15 ml Puffer A gewaschen. Die Säule wurde dann sukzessiv mit 25 ml Puffer B und anschließend mit 25 ml Puffer C gewaschen. Die an das Nickel-NTA-Medium unspezifisch bindenden nicht-HIS-getagten Proteine wurden dabei durch Zugabe von 20 ml Puffer E (pH 4,5) aus ihrer Bindung gelöst. Das Nickel-NTA-Medium lässt sich durch aufeinander folgendes Spülen mit 20 ml Puffer F, 25 ml H₂O und 25 ml 30% Ethanol konservieren und mehrfach benutzen. Das Eluat wurde anschließend in einem Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 20 ml, 10000 kDa) mit 5000 x *g* zentrifugiert, mit H₂O gewaschen und auf 1 ml eingeeengt. Das aufgereinigte Protein kann im Gegensatz zu den im Eluat enthaltenen Salzen die im Zentrifugalkonzentrator befindliche Membran nicht passieren. Während der Zentrifugation wird diese von Salzen und H₂O passiert.

3.12 Proteinauftrennung mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von *Aspergillus*-Proteinen erfolgte anhand einer SDS-PAGE in einem vertikalen Elektrophoresesystem (Elektrophoresekammer Scientific TE Series HOEFER).

3.12.1 Verwendete Lösungen und Puffer

40% Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid 38,8% (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid 1,2% (w/v)
APS-Lösung 10%	Ammoniumpersulfat 10% (w/v)
SDS 10%	Natriumdodecylsulfat (SDS) 10% (w/v)
Bromphenolblau-Lösung	Bromphenolblau 1% (w/v)
Trenngelpuffer	1 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	

Tabelle 3.1: Lösungen und Puffer für die eindimensionale SDS-PAGE

3.12.2 Herstellung und Beladung der SDS-Gele

Zunächst wurde die Gelgießkammer („Mighty-Small“-System) für zwei Gele (10 x 8 cm) nach Herstellerangaben zusammengebaut. Es folgte das Ansetzen der Trenngellösung mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5%. Dabei wurden nacheinander 9,4 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (40 g Acrylamid und 1,2 g

Bisacrylamid mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt), 11,3 ml Trenngelpuffer, 8,8 ml H₂O, 300 µl SDS 10%, 75 µl Bromphenolblau 1% in ein 50 ml-Tube gegeben. 30 µl Temed und 255 µl APS 10% wurden zuletzt hinzugegeben. Die Trenngellösung (unteres Gel) wurde daraufhin in die vorbereitete Gelgießkammer gegossen, so dass vom Oberrand der Aluminiumplatte 1,5 - 2 cm bis zum unteren Gel verblieben. Mit 2 x 150 µl n-Butanol wurde die Trenngellösung beschichtet, um anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur zu polymerisieren. Die Sammelgellösung (oberes Gel) wurde nach folgender Rezeptur angesetzt: in ein 50-ml-Tube werden nacheinander 2 ml einer 40%-Acrylamid-/Bisacrylamidlösung, 2 ml Sammelgelpuffer, 11,6 ml zweifach destilliertes Wasser, 160 µl SDS 10% und 40 µl 1% Bromphenolblau hinzugegeben. Bei der Herstellung des oberen Gels werden im letzten Schritt 10 µl Temed und 160 µl APS 10% hinzugegeben. Nach dem Abgießen des Butanols wurde die Sammelgellösung bis zum Erreichen des oberen Glasrandes auf das bereits polymerisierte Trenngel aufgetragen und Taschenkämme aus Kunststoff mit je 14 Taschen zwischen die Glas- und Teflonplatten gesteckt. Nach ca. 1,5 Stunden konnten die polymerisierten Gele verwendet werden. Das eingesetzte Probenvolumen betrug je 30 µl DNA-Probenpuffergemisch und 5 µl des Proteinmarkers. Für die Probenvorbereitung wurden 180 µl Probenpuffer in ein Tube gegeben und mit 20 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Mit 15 µl Probenpuffer wurden 15 µl einer Probe mit aufgereinigter DNA versetzt, für 10 Minuten bei 95°C im Wärmeblock erhitzt, kurz gevortexet und im Anschluss auf das Gel in die jeweiligen Taschen pipettiert. Der SDS-Laufpuffer wurde auf die Elektrophoresekammer gegossen und es wurde Spannung angelegt. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei 40 V; nachdem die Proben das Sammelgel (oberes Gel) passiert hatten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Dieser Vorgang dauerte etwa zweieinhalb Stunden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt und geblottet.

3.12.3 Coomassie-Brillantblau-Färbung

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine können durch die Färbung mit Coomassie-Brillantblau sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Gele auf einem Orbitalschüttler für mehrere Stunden in der Färbelösung geschwenkt und die Lösung (30 ml) unmittelbar vor ihrer Verwendung hergestellt. Man pipettiert 10 ml 33,33% Coomassie Brilliant Blue R (0,5% in H₂O), 10 ml 20%-ige Essigsäure und 10 ml 100% Methanol zu einem Gesamtansatz. Das Gel wurde über mindestens zwei Stunden

unter leichtem Schütteln gefärbt und anschließend mit 10 ml einer 7,5%-iger Essigsäure entfärbt. Dem Entfärber kann zu ca. 1/3 seines Gesamtvolumens Methanol hinzugefügt werden. Anschließend wurde das Gel getrocknet und zur Dokumentation fotografiert sowie eingescannt.

3.13 Immunblot

Der Immunblot dient dazu, Proteine, welche auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran zu bringen und mit reagierenden Antikörpern sichtbar werden zu lassen. Diese auf der Membran befindlichen Proteine wurden im weiteren Verlauf mit Antikörpern markiert.

3.13.1 Westernblot

Das durchgelaufene Gel der SDS-PAGE wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und in die Blotkammer zwischen zwei Whatman-Papiere, welche wiederum zwischen zwei Spanntüchern gespannt wurde, geschoben. Dabei muss die Nitrozellulosemembran in Richtung der Anode zeigen. Es sollten keine Luftblasen zwischen SDS-PAGE und Nitrozellulosemembran sein. Sowohl die Membran als auch die Whatman-Papiere wurden vorher einige Minuten in zweifach destilliertem Wasser und anschließend für 5 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Der Transferpuffer wurde durch das Zusammengeben von 6 g Tris, 28,8 g Glycin, 300 ml 100% Methanol und dem anschließenden Auffüllen auf 2 Liter Gesamtvolumen mit zweifach destilliertem H₂O hergestellt. Über Nacht wurde bei 30 Volt geblottet und damit der Proteintransfer vollzogen. Die Dauer und Spannungshöhe des Westernblots sind prinzipiell von der Acrylamidgesamtkonzentration und dem Durchmesser des Gels abhängig. Das Gel wurde am nächsten Morgen der Blotkammer entnommen und getrocknet.

3.13.2 Beladung der *A. fumigatus*-Proteinfraktion mit Antikörpern

Beim Immunblot wurden *A. fumigatus*-Proteinfraktionen, die zuvor auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurden und anschließend im Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran gebracht wurden, mittels Anti-His-Antikörper und Alkalische Phosphatase Goat-anti-Mouse-Antikörper markiert, so dass diese auf der

Nitrozellulosemembran durch Hinzugabe von 4-Nitrotetrazoliumchlorid-Blau (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat sichtbar (BCIP) wurden. Die nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden alle auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Die getrocknete Nitrozellulosemembran wurde zunächst zweimal für 10 Minuten im TBS-10-Puffer und anschließend für eine Stunde im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovine Serum Albumin (BSA), unter leichtem Schütteln in einer Petrischale inkubiert.

Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal für je 10 Minuten im TBS-20-Puffer Tween/Triton gewaschen und anschließend für 10 Minuten im TBS-10-Puffer gewaschen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran über eine Stunde bei Raumtemperatur im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovine Serum Albumin und 1:2000 verdünntem Anti-His-Antikörper, unter leichtem Schütteln in einer Petrischale inkubiert. Die Anti-His-Antikörper binden in diesem Schritt an den Histidinanteil des gesuchten HIS-getagten Proteins. Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal für je 10 Minuten im TBS-20-Puffer Tween/Triton und anschließend für 10 Minuten im TBS-10-Puffer gewaschen. Im Blockpuffer, bestehend aus TBS-10-Puffer mit 3% Bovine Serum Albumin und 1:1000 verdünntem Antikörper Alkalische Phosphatase Goat-anti-Mouse, wurde die Nitrozellulosemembran nun über zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Antikörper Alkalische Phosphatase Goat-anti-Mouse bindet in diesem Reaktionsschritt an den Fc-Teil der Anti-His-Antikörper. Im Anschluss wurde dreimal für je 10 Minuten die Nitrozellulosemembran mit TBS-20-Puffer Tween/Triton und für zwei Minuten mit Substratpuffer gewaschen. Um eine Farbentwicklung auszulösen, wurde die Membran in 10 ml Substratpuffer mit 66 µl NBT-Stamm und 33 µl BCIP-Stamm gegeben und unter leichtem Schütteln bebrütet. Die HIS-getagten Proteine erschienen als deutlich sichtbare Bande. Die Reaktion wurde durch Überführung der Nitrozellulosemembran in eine Petrischale mit TBS-10-Puffer + 20 mM EDTA gestoppt.

3.14 DNA-Aufarbeitungen

3.14.1 Horizontale Gelelektrophorese von DNA

Zum Nachweis der PCR-Produkte und zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode. Eine Gelmatrix bewirkt, dass die Laufgeschwindigkeit der Moleküle im elektrischen Feld mit steigender Molekülgröße abnimmt, wodurch eine Größentrennung der DNA-Fragmente erfolgt. Durch einen parallel mitgeführten Standard ist eine vergleichende Größenbestimmung möglich. Agarose, die durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst wird, bildet nach dem Abkühlen ein Netzwerk aus Zuckerketten, wodurch eine Gelmatrix entsteht. Ihre Porengröße kann durch die Agarose-Konzentration variiert werden. Nach kurzem Abkühlen der aufgekochten Agarose wurde diese mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelträger überführt und ein Kamm zur Ausbildung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erkalten und Verfestigen wurde die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und die mit Probenpuffer (Stoppmix) beschwerten Proben in die durch den Kamm entstandenen Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 50 - 120 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (230 - 360 nm) mit einem Video-Dokumentationssystem fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngiger DNA und fluoresziert unter UV-Licht.

3.14.2 Gelextraktion

Mit BSA 10 x sowie NEB 2 x Puffer wurden 5 µg des Plasmidkonzentrats aus der Minipräparation versetzt, mit dem Restriktionsenzym *HinDIII* geschnitten und linearisiert. 6x DNA Loading Dye wurde in einer Menge von 1/6 zum Gesamtansatz hinzugegeben und auf ein Agarosegel aufgetragen. Eine Tasche wurde mit ca. 30 µl der Probe gefüllt.

Die Gelextraktion der DNA wurde unter Verwendung eines Kitsystems der Firma Qiagen (QIAEX[®] II Gel Extraction Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.14.3 Aufreinigung einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA

Die DNA wurde unter Verwendung eines Kitsystems der Firma Qiagen (Qiaquick PCR-Purifikation Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte fand das Kit-System in dieser Arbeit seine Anwendung.

3.14.4 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation wurde unter Verwendung eines Kitsystems der Firma Qiagen (QIAprep Spin[®] Miniprep Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch die DNA-Konzentration des Plasmids bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase (Accession-Nummer: Q4WE77) kodierenden DNA-Abschnitte aus einer Uni-ZAP XR Premade Library *A. fumigatus* (Fa. Stratagene) wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt.

Hierfür wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Das doppelsträngige Amplifikat der PCR I wurde als Matrize in die Nested PCR eingesetzt. Mit nach innen versetzt bindenden Primern erfolgte die Durchführung einer zweiten Amplifikation unter Verwendung eines digoxigeninhaltigen Nukleotid-Mix. Dabei wurde ein kürzerer, spezifischer DNA-Abschnitt amplifiziert.

4.1.1 PCR I

Zunächst wurde mit den Primern LIP_1 und LIP_2 (siehe 2.11) unter Zuhilfenahme einer Polymerasekettenreaktion mit genomischer DNA als Template aus dem NCPF-Stamm (10 ng/μl) ein Amplikon mit ca. 250 bp generiert. Dieser DNA-Abschnitt kodiert für ca. 1/3 der insgesamt 300 Aminosäuren der extrazellulären Lipase. Das mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigte PCR-Produkt (siehe 3.14.3) wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis der PCR I.

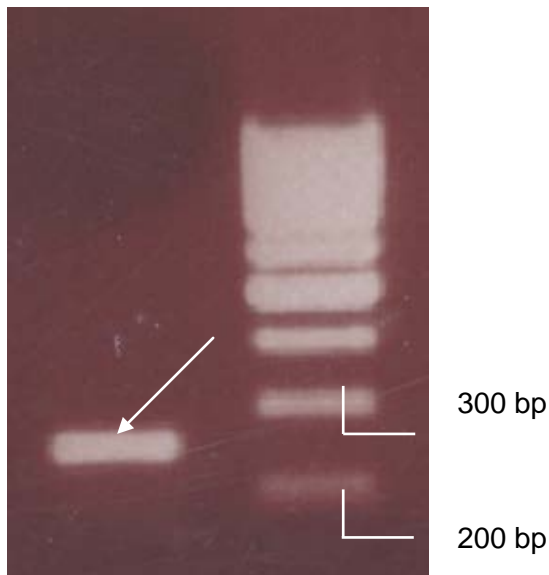


Abbildung 4.1: Ergebnis der PCR I mit dem Primerpaar LIP_1 und LIP_2. Auf der rechten Seite des Bildes befindet sich die als Längenstandard aufgetragene DNA-Ladder Low (MassRuler™ DNA LADDER, Low Range, FERMENTAS). Das mit dem Pfeil markierte Amplikon mit ca. 250

Basenpaaren kodiert für ca. 1/3 der insgesamt 300 Aminosäuren der extrazellulären Lipase und diente als Matrize für die Nested-PCR.

4.1.2 Nested-PCR

Das Produkt der PCR I wurde im Verhältnis von 1:1000 verdünnt in der Nested-PCR eingesetzt. Das hierbei verwendete Primerpaar LIP_3, LIP_4 (siehe 2.11) bindet im Vergleich zu LIP_1 und LIP_2 auf der Matrize nach innen versetzt. Das in der Nested-PCR amplifizierte Produkt hat eine Länge von ca. 190 Basenpaaren und kodiert entsprechend für ca. 1/5 der insgesamt 300 Aminosäuren der extrazellulären Lipase.

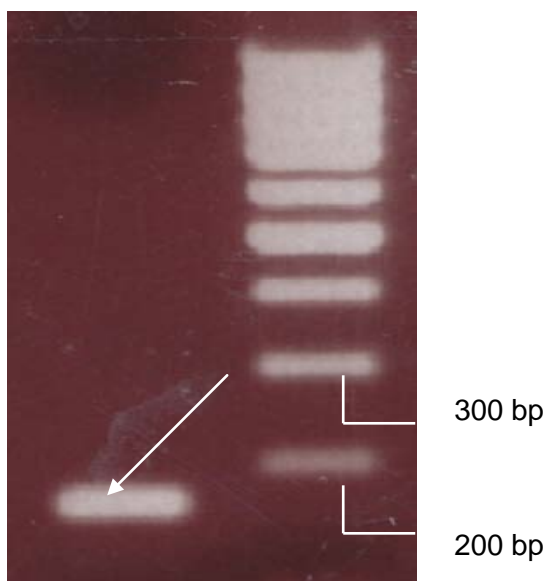


Abbildung 4.2: Als Längenstandard wurde die DNA-Ladder Low (MassRuler™ DNA LADDER, Low Range, FERMENTAS) aufgetragen. Das Amplikon mit ca. 190 Basenpaaren ist mit dem Pfeil markiert. Dieses Amplikon kodiert für ca. 1/5 der insgesamt 300 Aminosäuren der extrazellulären Lipase und stellt ein im Vergleich zum Amplikon der PCR I kürzeres, spezifisches, doppelsträngiges Amplikon dar.

Durch die Verwendung eines digoxigeninhaltigen Nukleotid-Mix in der Nested-PCR wurde das entstehende Amplikon mit Digoxigenin markiert. Dies führte zu der Herstellung einer digoxigenierten Sonde, die zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA-Abschnitte verwendet wurde. Abbildung 4.3 zeigt das auf ein Agarosegel aufgetragene Produkt der Nested-PCR mit verwendetem digoxigeninhaltigen Nukleotid-Mix im Vergleich zur Nested-PCR mit einem eingesetzten Nukleotid-Mix ohne Digoxigenin. Das PCR-Produkt der Nested-PCR ohne Digoxigenin hat im Vergleich zum PCR-Produkt der Nested-PCR mit digoxigeninhaltigem Nukleotid-Mix ein niedrigeres Molekulargewicht und daher

während der Gelelektrophorese eine entsprechend höhere Laufgeschwindigkeit. Das nicht Digoxigenin-markierte PCR-Produkt der Nested-PCR erscheint in der Abbildung daher als niedriger gelegene Bande.

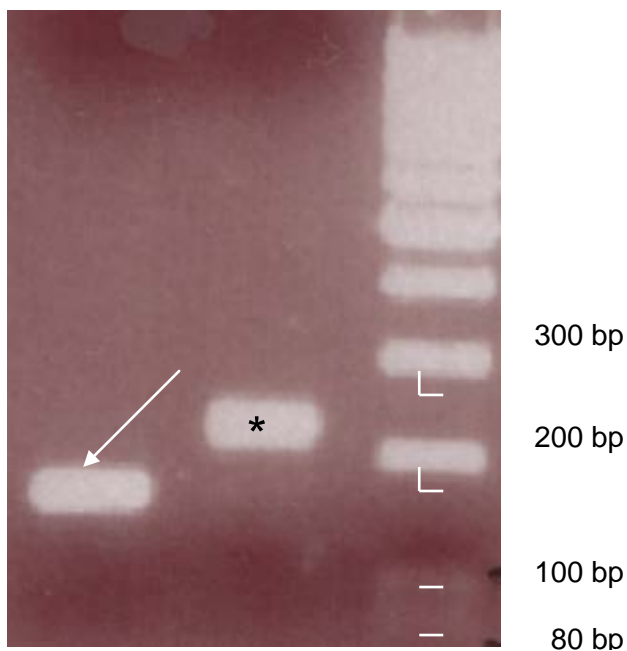


Abbildung 4.3: Das Ergebnis der Nested-PCR mit Digoxigenin-haltigem Nukleotid-Mix im Vergleich zur Nested-PCR mit eingesetztem Nukleotid-Mix ohne Digoxigenin. Auf der rechten Seite der Abbildung befindet sich die als Längenstandard aufgetragene DNA-Ladder Low (MassRuler™ DNA LADDER, Low Range, FERMENTAS). Die mit dem Pfeil markierte Bande ist das Amplikon der Nested-PCR ohne Digoxigenin im verwendeten Nukleotid-Mix. Sie liegt auf einer Höhe von ca. 190 Basenpaaren. Die mit dem Stern (*) markierte Bande auf einer Höhe von ca. 250 Basenpaaren ist das Amplikon der Nested-PCR mit digoxigeninhaltigen Nukleotid-Mix.

4.2 Sondenscreening einer *Aspergillus*-cDNA-Bank auf für die extrazelluläre Lipase kodierende cDNA-Abschnitte

Mit Hilfe der hergestellten Digoxigenin-markierten Sonde wurde die Uni-ZAP XR Premade Library *A. fumigatus* auf für die extrazelluläre Lipase kodierende DNA-Abschnitte gescreent. *E. coli* des XL1-Blue MRF'-Stammes wurden mit den Phagen der Uni-ZAP XR Premade Library *A. fumigatus* infiziert und auf LB-Agar ausgestrichen. Auf diesen wurden anschließend Nitrozellulosemembranen gelegt und die nun darauf befindlichen Plaques mit der digoxigeninhaltigen Sonde inkubiert (siehe 3.2). Positiv reagierende cDNA-Plaques sind solche, welche mit der verwendeten Sonde reagiert haben. Der Antikörper Anti-Digoxigenin-Peroxidase markierte die Sonde. Durch ECL-Reagenzien wurde eine Lichtreaktion mit den

Antikörpern ausgelöst, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar ist. Zum Zwecke der Umklonierung in einen Phagemid wurden positiv reagierende cDNA-Plaques aus dem Agar ausgestochen.

4.2.1 Screening I mit Digoxigenin-markierter Sonde

Abbildung 4.4 zeigt das Ergebnis des ersten Screenings der λ -Phagen-cDNA-Plaques zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase kodierenden Abschnitte mit durch Nested-PCR hergestellter Digoxigenin-markierter Sonde.

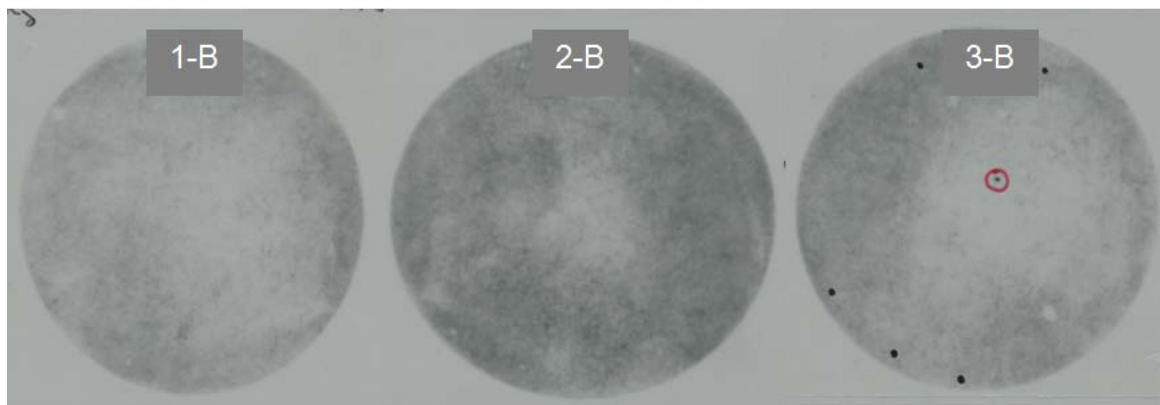


Abbildung 4.4: Ergebnis des ersten Screenings der λ -Phagen-cDNA-Plaques zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA-Abschnitte. Auf den Platten befinden sich jeweils mehrere tausend cDNA-Plaques. Mit einer durch Nested-PCR hergestellten Digoxigenin-markierten Sonde wurde nach positiv reagierenden cDNA-Plaques auf den Nitrozellulosemembranen gescreent (siehe 3.2). Auf der Platte 3-B sind im Gegensatz zu 1-B und 2-B positiv reagierende cDNA-Plaques. Diese sind in der Abbildung rot umrandet. Die positiv reagierenden Klone wurden ausgestochen und anschließend zum weiteren Screening aufgereinigt.

4.2.2 Screening II mit Digoxigenin-markierter Sonde

E. coli XL1-Blue MRF' wurde mit den aus den positiv reagierenden cDNA-Plaques extrahierten Phagen des 1. Screenings infiziert, auf LB-Agar ausgestrichen und mit Hilfe der Digoxigenin-markierten Sonde erneut auf für die extrazelluläre Lipase kodierende cDNA-Abschnitte gescreent. In einer weitaus geringeren Konzentration befanden sich die cDNA-Plaques nach dem Ausstreichen auf der Platte. Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis des zweiten Screenings.

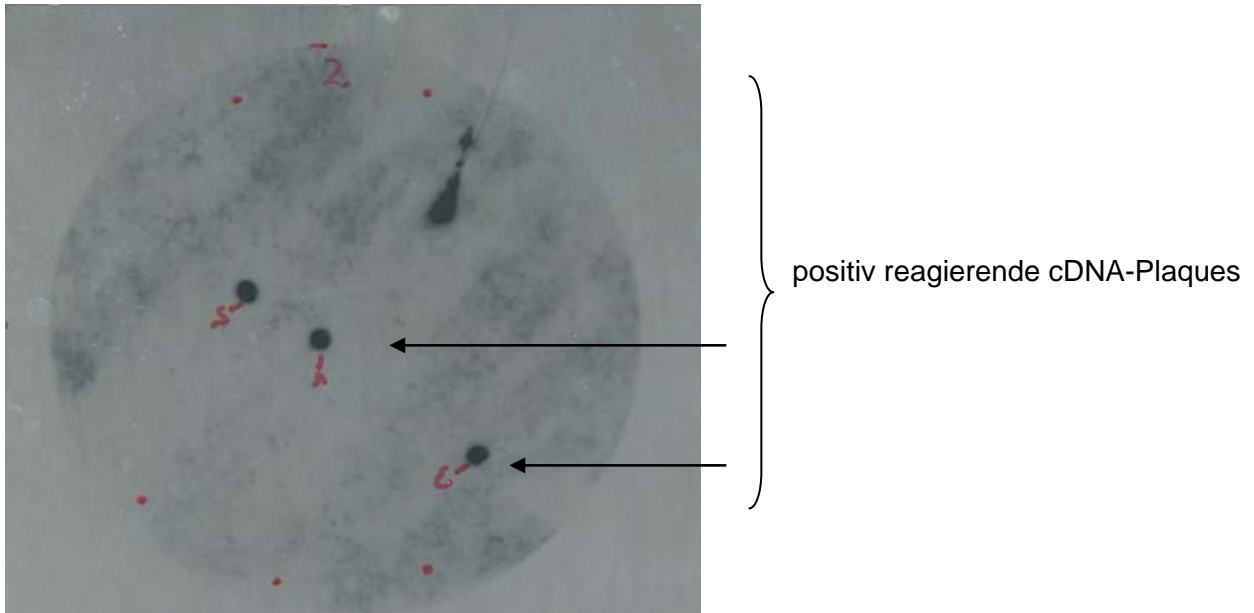


Abbildung 4.5: Ergebnis des zweiten Screenings der λ -Phagen-cDNA-Plaques zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA-Abschnitte mit Digoxigenin-markierter Sonde. Mit dem schwarzen Pfeil markiert sind positiv reagierende DNA-Plaques auf einer Nitrozellulosemembran, welche isoliert und zum Zwecke der Konservierung mit SM-Puffer und Chloroform versetzt wurden.

4.2.3 Screening III mit Digoxigenin-markierter Sonde

E. coli XL1-Blue MRF['] wurden mit den Phagen des 2. Screenings infiziert, welche positiv reagierende cDNA-Plaques enthielt, auf LB-Agar ausgestrichen und mit Hilfe der Digoxigenin-markierten Sonde erneut auf für die extrazelluläre Lipase kodierende cDNA-Abschnitte gescreent. Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis des dritten Screenings. Eine Vielzahl positiv reagierender Plaques ist auf dem LB-Agar lokalisiert.

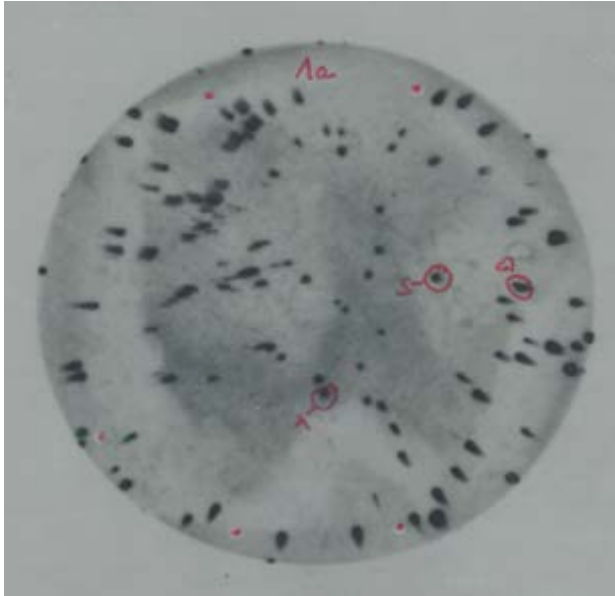


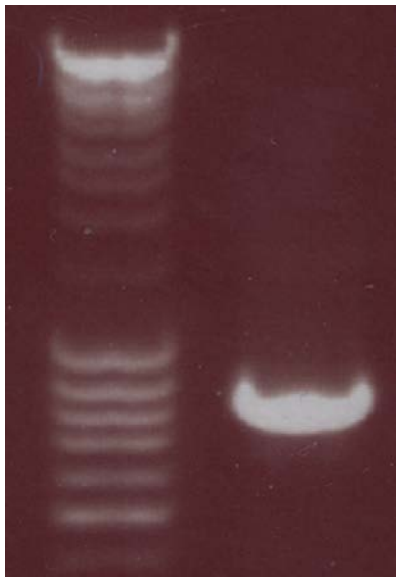
Abbildung 4.6: Ergebnis des dritten Screenings der λ -Phagen-DNA-Plaques zur Detektion der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA-Abschnitte mit Digoxigenin-markierter Sonde auf einer Nitrozellulosemembran (siehe 3.2). Von dieser Platte konnten Plaques einzeln gepickt werden, so dass diese monoklonaler Natur waren. Rot umrandete positive DNA-Plaques wurden zu einem 4-5-mm³-Würfel ausgestochen, mit SM-Puffer und Chloroform zum Zwecke der Konservierung und weiteren Umklonierung in einen Phagemid versetzt.

4.3 Umklonierung der für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA in ein Phagemid

Der für die extrazelluläre Lipase kodierende cDNA-Abschnitt der Phagenklone, welcher ausschließlich mit der Digoxigenin-markierten Sonde reagierte, wurde in Plasmide umkloniert (siehe 3.3). Das Plasmid wurde im Anschluss gereinigt, sequenziert und unter Verwendung der TIGR-Datenbanken (The Institute of Genomic Research) erfolgreich auf Richtigkeit überprüft.

4.4 Polymerasekettenreaktion auf für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA-Abschnitte

Das Primerpaar EL_1 und EL_2 (siehe 2.11) wurde zur Amplifikation des für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA-Abschnitts im Rahmen der Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Dieser DNA-Abschnitt besteht aus 900 Basenpaaren. Abbildung 4.7 zeigt das auf einem Agarosegel aufgetragene Amplikon der PCR, welches im Anschluss mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigt wurde.



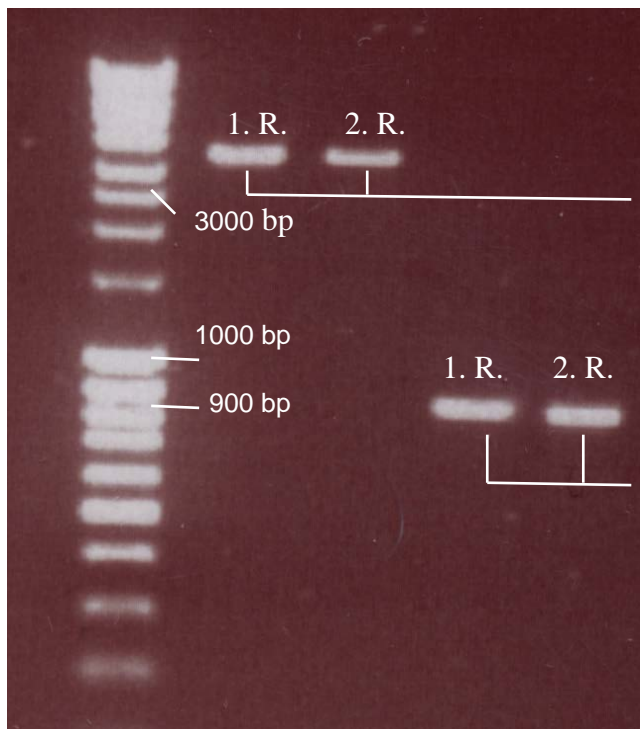
Amplikon des für die extrazelluläre
Lipase kodierenden DNA-Abschnitts

900 bp

Abbildung 4.7: Ergebnis der Polymerasekettenreaktion mit dem Primerpaar EL_1, EL_2 zur Amplifizierung des für die extrazelluläre Lipase kodierenden DNA-Abschnitts. Der Ladder Mix (MassRuler™ DNA LADDER MIX, 100-100.000 bp, FERMENTAS) wurde als Längenstandard aufgetragen. Das Amplikon befindet sich auf der rechten Seite der Abbildung auf einer Höhe von 900 Basenpaaren.

4.5 Restriktionsverdau von pQE30 und dem für die extrazelluläre Lipase kodierenden Amplikons

Das Plasmid pQE30 (QIAGEN, Hilden) sowie das für die extrazelluläre Lipase kodierende Amplikon aus der Polymerasekettenreaktion wurden nacheinander mit den Restriktionsenzymen *HinDIII* (*Haemophilus influenzae*, Stamm Rd, BIOLABS) und *SpHI* (*Streptomyces phaeochromogenes*, BIOLABS) an jeweiligen spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten. Hierbei entstanden am Amplikon und am Plasmid pQE30 jeweils 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden. Zur Darstellung klonierter Fragmente nach Restriktionsverdau wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 4.8).



pQE30 nach 1. und 2. Restriktion;
(1.R., 2. R.)

Für die extrazelluläre Lipase
kodierende Amplikons nach 1. und 2.
Restriktion; (1.R., 2. R.)

Abbildung 4.8: Ergebnis des Restriktionsverdaus des Plasmids pQE30 und des für die extrazelluläre Lipase kodierenden Amplikons der Polymerasekettenreaktion mit den Restriktionsenzymen *HinDIII* und *SpHI*. Auf der linken Seite der Abbildung befindet sich der als Längenstandard aufgetragene Ladder Mix (MassRuler™ DNA LADDER MIX, 100-100.000 bp, FERMENTAS). Das Plasmid pQE30 besitzt ca. 3400 Basenpaare. Das für die extrazelluläre Lipase kodierende Amplikon liegt auf einer Höhe von 900 Basenpaaren.

4.6 Ligation von pQE30 mit dem für die extrazelluläre Lipase kodierenden Amplikon

Das durch die Restriktionsenzyme *HinDIII* und *SpHI* geschnittene Plasmid pQE30 und das für die extrazelluläre Lipase kodierende Amplikon wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (BIOLABS, Frankfurt) ligiert, so dass jeweils ein für die extrazelluläre Lipase kodierender cDNA-Abschnitt in einem wieder zum Ring geschlossenen Plasmid vorlag.

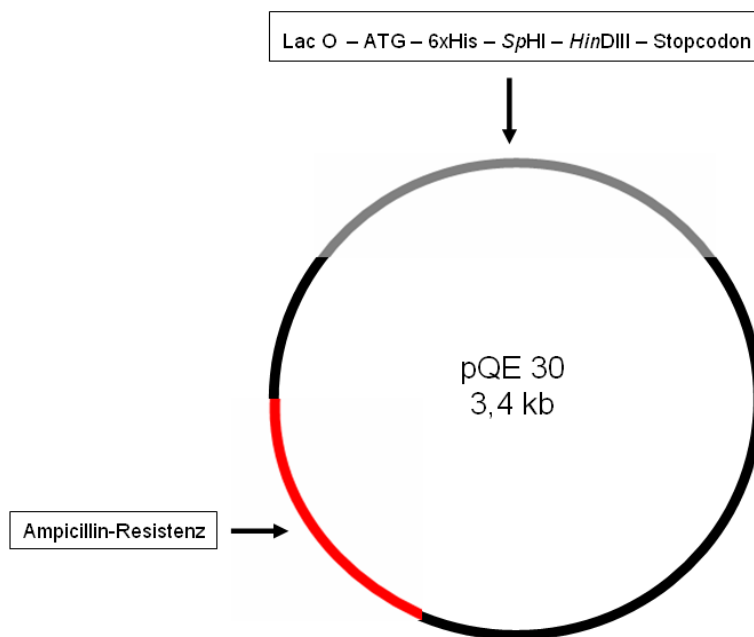


Abbildung 4.9: Die Abbildung zeigt das Plasmid pQE 30 (QIAGEN, Hilden) schematisch vor der Ligation mit dem für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA-Abschnitt. Dieser wurde zwischen die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SpHI* und *HinDIII* hineinligiert.

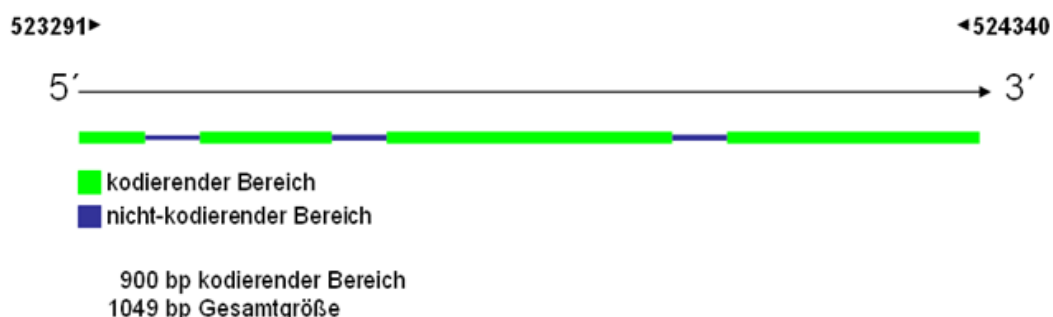


Abbildung 4.10: Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die für die extrazelluläre Lipase kodierende genomische DNA. Dieser DNA-Abschnitt befindet sich auf Chromosom 5 von *A. fumigatus*. Die DNA wurden mit dem Plasmid pQE 30 ligiert.

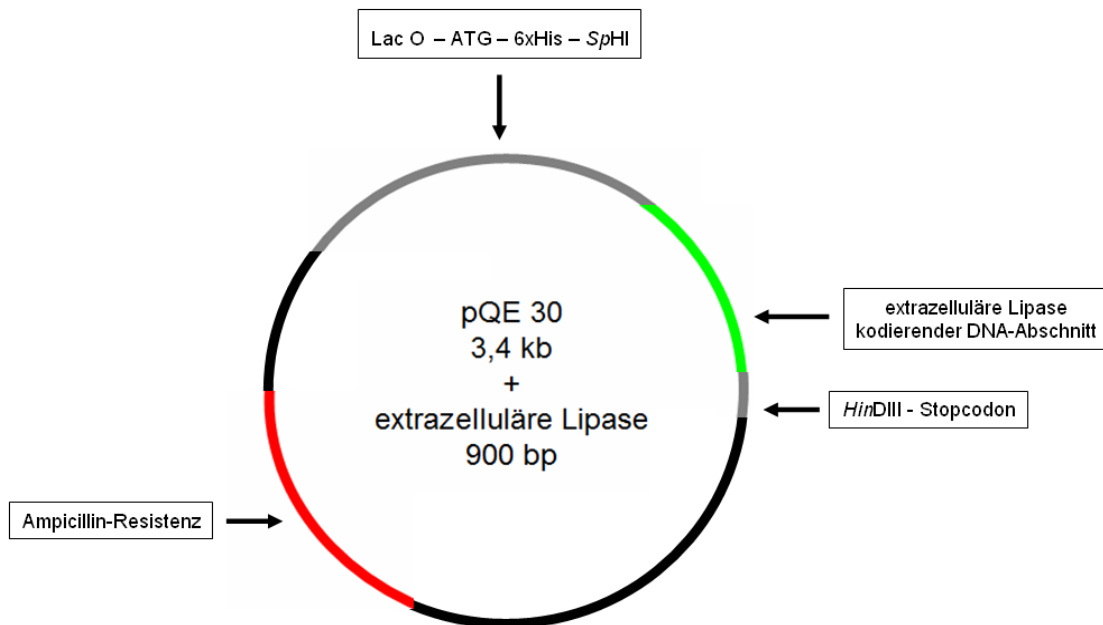


Abbildung 4.11: Die Abbildung zeigt das Plasmid pQE 30, nachdem die für die extrazelluläre Lipase kodierende DNA hineinligiert wurde. Er ist aufgrund der Position des Inserts mit einem 6xHistidin-Teil versehen.

Der Ligationsansatz wurde durch Elektroporation in den Bakterienstamm Rosetta II transfiziert, anschließend auf mit IPTG versehenem Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agar-Platte diente dem weiteren Koloniescreening auf HIS-getagte Proteine.

4.7 Koloniescreening auf extrazelluläre Lipase in Rosetta II

Es folgte das Kolonie-Screening auf HIS-getagte Proteine. Eine Nitrozellulosemembran wurde auf den Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar gelegt, um den apikalen Anteil der Bakterienkolonien entnehmen zu können. Zunächst wurde der Anti-His-Antikörper und daraufhin der Goat-anti-Mouse-Antikörper auf die Nitrozellulosemembran gegeben, um im Anschluss die Bakterienkolonien, welche His-getagte Proteine exprimiert haben, mit BCIP- und NBT-Stamm farblich zu markieren (siehe 3.8). Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis des Koloniescreenings auf His-getagte Proteinprodukte.

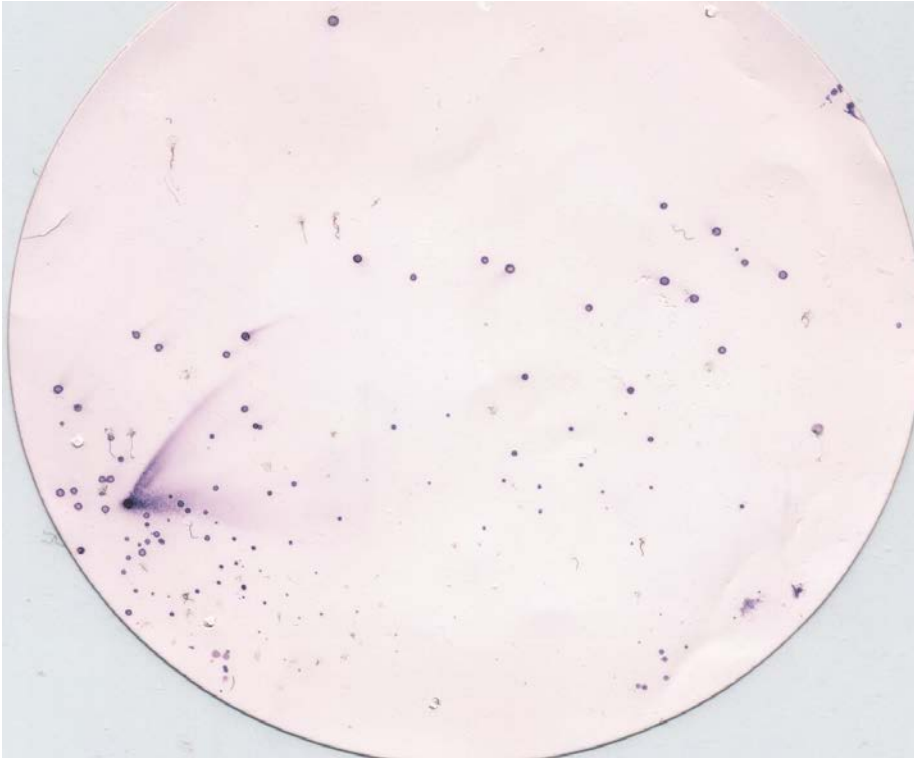


Abbildung 4.12: Ergebnis des Kolonie-Screenings auf HIS-getagte Proteine. Die durch aufeinander folgende Inkubation mit Antikörper Anti-HIS, Goat-Anti-Mouse und BCIP-, NBT-Stamm farblich markierten Bereiche zeigen die auf einer Nitrozellulosemembran (Protran BA 83 0,2 μm ; 82 mm, SCHLEICHER) nach Abklatsch vom LB-Agar befindlichen Plaques, welche HIS-getagte Proteine exprimiert hat. Eine dieser Kolonien wurde isoliert und deren Plasmid zur Sequenzierung gereinigt (siehe 3.14).

LB-Medium wurde mit jeweils vier auf Chloramphenicol/Ampicillin-LB-Agar gewachsenen Bakterienkolonien beimpft, über Nacht inkubiert und abzentrifugiert.

4.8 Ergebnis der Sequenzanalyse von pQE30 mit der für die extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA

Abbildung 4.13 zeigt die für die extrazelluläre Lipase kodierende Sequenz und die entsprechenden Aminosäuren.

1	ATG	GTT	CAC	TTT	AAG	TCT	GTC	TGT	ACG	CTG	GCT	GTT
1	<i>Met</i>	<i>Val</i>	<i>His</i>	<i>Phe</i>	<i>Lys</i>	<i>Ser</i>	<i>Val</i>	<i>Cys</i>	<i>Thr</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Val</i>
37	ACG	GCG	TTT	GCT	GCG	CTG	GGT	GCT	GCG	GCG	CCA	GCA
13	<i>Thr</i>	<i>Ala</i>	<i>Phe</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	<i>Gly</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Pro</i>	<i>Ala</i>
73	ATG	TTG	GCA	AAG	CGA	GAC	GTG	TCC	TCG	TCG	GTG	CTG
25	<i>Met</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Lys</i>	<i>Arg</i>	<i>Asp</i>	<i>Val</i>	<i>Ser</i>	<i>Ser</i>	<i>Ser</i>	<i>Val</i>	<i>Leu</i>
109	CAA	AAA	CTG	TCA	CTG	TTT	GCG	CAA	TAC	TCT	GCT	GCC
37	<i>Gln</i>	<i>Lys</i>	<i>Leu</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Phe</i>	<i>Ala</i>	<i>Gln</i>	<i>Tyr</i>	<i>Ser</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>
145	TCC	TAT	TGT	ACC	AAC	AAC	ATC	AAT	TCC	ACG	GGC	AAC
49	<i>Ser</i>	<i>Tyr</i>	<i>Cys</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	<i>Asn</i>	<i>Ile</i>	<i>Asn</i>	<i>Ser</i>	<i>Thr</i>	<i>Gly</i>	<i>Asn</i>
181	AAG	CTG	ACA	TGC	TCC	TCT	GGA	GAG	TGC	CCG	CTG	GTC
61	<i>Lys</i>	<i>Leu</i>	<i>Thr</i>	<i>Cys</i>	<i>Ser</i>	<i>Ser</i>	<i>Gly</i>	<i>Glu</i>	<i>Cys</i>	<i>Pro</i>	<i>Leu</i>	<i>Val</i>
217	GAG	GCA	GCC	AAC	ACC	AAG	ACC	CTT	TCG	GAA	TTC	TAC
73	<i>Glu</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Asn</i>	<i>Thr</i>	<i>Lys</i>	<i>Thr</i>	<i>Leu</i>	<i>Ser</i>	<i>Glu</i>	<i>Phe</i>	<i>Tyr</i>
253	GAA	GTT	GGT	AGT	GAT	TCC	GCG	TAT	GGA	GAC	GTC	GCA
85	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Gly</i>	<i>Ser</i>	<i>Asp</i>	<i>Ser</i>	<i>Ala</i>	<i>Tyr</i>	<i>Gly</i>	<i>Asp</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>
289	GGC	TTC	TTG	GTT	GCA	GAC	ACC	ACG	AAC	AAG	CTA	CTT
97	<i>Gly</i>	<i>Phe</i>	<i>Leu</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	<i>Asp</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	<i>Lys</i>	<i>Leu</i>	<i>Leu</i>
325	GTG	GTC	TCT	TTC	AGA	GGA	AGC	CGC	ACG	ATA	GAC	ACA
109	<i>Val</i>	<i>Val</i>	<i>Ser</i>	<i>Phe</i>	<i>Arg</i>	<i>Gly</i>	<i>Ser</i>	<i>Arg</i>	<i>Thr</i>	<i>Ile</i>	<i>Asp</i>	<i>Thr</i>
361	TGG	TTG	GCG	AAC	CTG	GAC	TTT	GGC	CTG	GAC	AGT	ATC
121	<i>Trp</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Asn</i>	<i>Leu</i>	<i>Asp</i>	<i>Phe</i>	<i>Gly</i>	<i>Leu</i>	<i>Asp</i>	<i>Ser</i>	<i>Ile</i>
397	AGT	GAT	GTT	TGC	AGC	GGA	TGT	GCG	GTA	CAT	AAG	GGA
133	<i>Ser</i>	<i>Asp</i>	<i>Val</i>	<i>Cys</i>	<i>Ser</i>	<i>Gly</i>	<i>Cys</i>	<i>Ala</i>	<i>Val</i>	<i>His</i>	<i>Lys</i>	<i>Gly</i>
433	TTC	TGG	AAG	TCC	TGG	GAA	GTC	GTT	GCC	AAT	GCA	CTA
145	<i>Phe</i>	<i>Trp</i>	<i>Lys</i>	<i>Ser</i>	<i>Trp</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	<i>Asn</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>
469	ACG	ACC	GAG	CTA	AAC	TCT	GCC	CTT	GCA	ACT	TAC	AGT

157	Thr	Thr	Glu	Leu	Asn	Ser	Ala	Leu	Ala	Thr	Tyr	Ser
505	GGC	TAT	ACC	GTT	GTC	TTT	ACT	GGC	CAT	AGC	TTC	GGC
169	Gly	Tyr	Thr	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser/Ser	Phe	Gly
541	GCT	GCT	CTT	GCA	ACG	CTG	GGG	GCT	GCT	ACG	TTG	CGG
181	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Arg
577	AAA	GCA	GGG	ATT	CCC	GTA	GAG	CTG	TAT	GGT	TAC	GGA
193	Lys	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Gly
613	TCC	CCG	CGT	GTT	GGA	AAT	AAG	GCC	TTG	GCA	ACA	TTC
205	Ser	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Phe
649	ATC	ACC	GGA	CAG	GGT	TCC	AAT	TAC	CGT	GTC	ACA	CAC
217	Ile	Thr	Gly	Gln	Gly	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Thr	His
685	ACA	AAC	GAC	ATT	GTC	CCC	AGA	CTC	CCG	CCC	CGA	GTC
229	Thr	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Val
721	TTT	GGC	TTC	AGC	CAC	ATT	AGC	CCA	GAG	TAC	TGG	ATC
241	Phe	Gly	Phe	Ser	His	Ile	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile
757	ACG	AGC	GGT	GAC	AAC	GCT	CCT	GTC	ACG	ACG	TCT	GAT
253	Thr	Ser	Gly	Asp	Asn	Ala	Pro	Val	Thr	Thr	Ser	Asp
793	GTC	ACG	GTT	GTC	CAG	GGA	ATC	GAC	TCA	AGC	GGT	GGA
265	Val	Thr	Val	Val	Gln	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly
829	AAT	GCG	GGC	GAG	GAT	TCT	ACC	AGC	ATT	GAG	GCC	CAT
277	Asn	Ala	Gly	Glu	Asp	Ser	Thr	Ser	Ile	Glu	Ala	His
865	AAT	TGG	TAT	ATT	GGC	CAT	ATT	GAT	GGT	TGT	CAA	TAA
289	Asn	Trp	Tyr	Ile	Gly	His	Ile	Asp	Gly	Cys	Gln	Term

Abbildung 4.13: Die Abbildung zeigt die Sequenz der für extrazelluläre Lipase kodierenden cDNA. Das Ergebnis wurde unter Verwendung der TIGR-Datenbanken für *A. fumigatus* abgeglichen. Das Plasmid wurde an seinem 5' Ende beginnend durchsequenziert. Die blau markierten Basen bilden die Primersequenz. Die orange dargestellten Basen zu Beginn der Sequenz kodieren für das Signalpeptid. Die lila dargestellten Aminosäure Alanin in Position 21 und 22 bilden die Schnittstelle des Signalpeptids. Die gelb markierten Aminosäuren Ser-Asp-His bilden die katalytische Triade des Proteins. Die blau unterlegten Aminosäuren sind für die Ausbildung des Deckels (siehe 1.2.3.3) verantwortlich. Die grün dargestellten Aminosäuren bilden das nukleophile Zentrum.

Zur Detektion des hypothetischen Signalpeptids wurde das Internetprogramm SignalP 3.0 Server der technischen Universität Dänemark verwendet. Abbildung 4.14 zeigt

die Position des hypothetischen Signalpeptids und die dazugehörige Schnittstelle (von Heijne 1986).

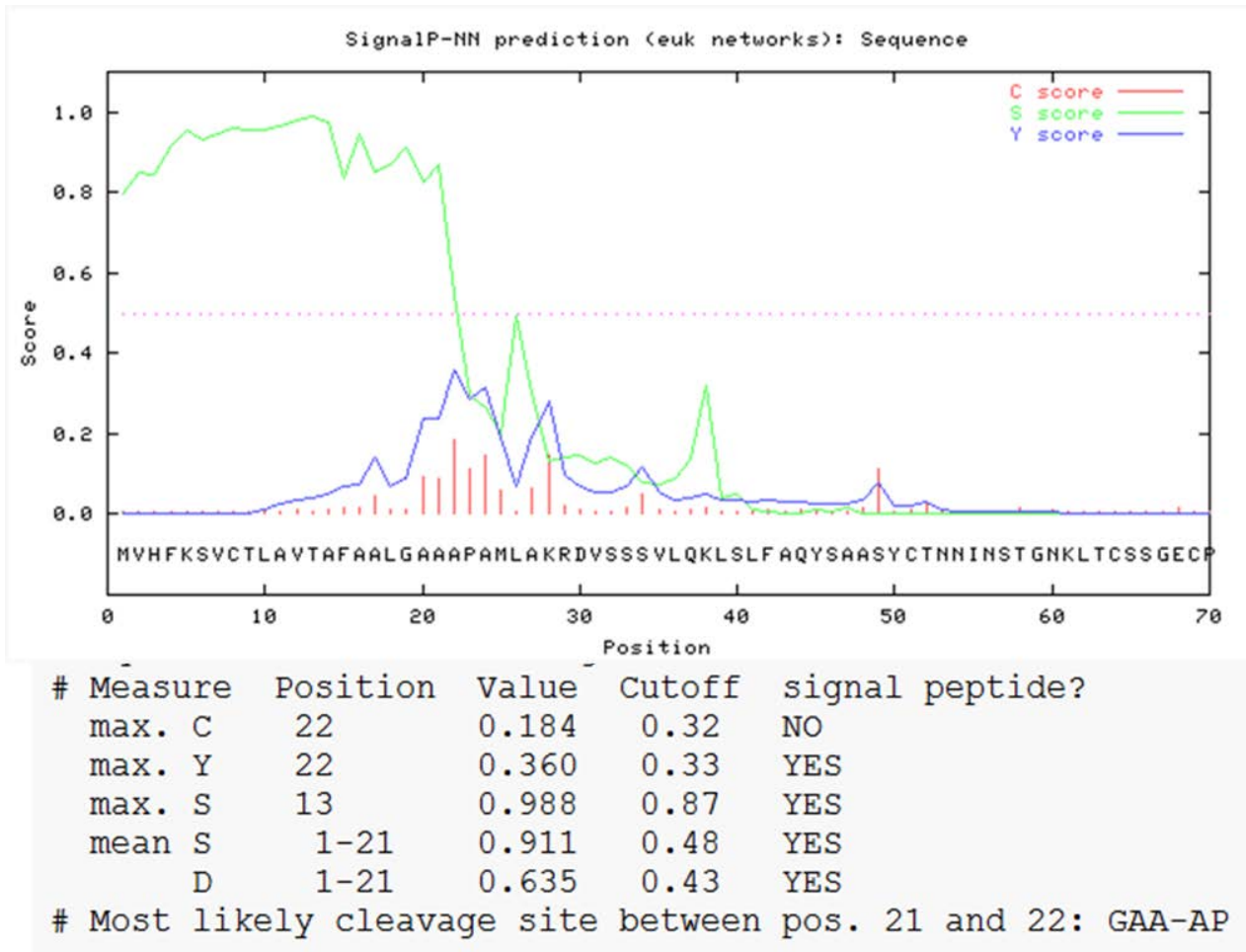


Abbildung 4.14: Die Abbildung zeigt die Position des hypothetischen Signalpeptids und die dazugehörige Schnittstelle. Die grüne Kurve zeigt den S-Score, welcher das Signalpeptid darstellt. Der Legende ist zu entnehmen, dass sich dieses auf Position 1-21 befindet (siehe *mean S 1-21*). Der C-Score, in der Abbildung als rote vertikalverlaufende Linien gekennzeichnet, zeigt mit seinem höchsten Anstieg in Position 22 (siehe Legende) die Schnittstelle des Signalpeptids. Der Y-Score ist als blaue Kurve unterlegt und dient zur Verifizierung des C-Scores ($\text{max. C} \cong \text{max. Y}$ in Position 22).

Mittels NCBI wurde die Sequenz der Lipasen, welche nach EC-Klassifikation in die Gruppe 3.1.1.3 eingeteilt werden, hinsichtlich der Lokalisation der katalytischen Triade, dem Deckel (*lid*) und dem nukleophilen Zentrum näher untersucht und graphisch dargestellt. Abbildung 4.15 zeigt hierbei die 3D-Struktur der Lipasen.

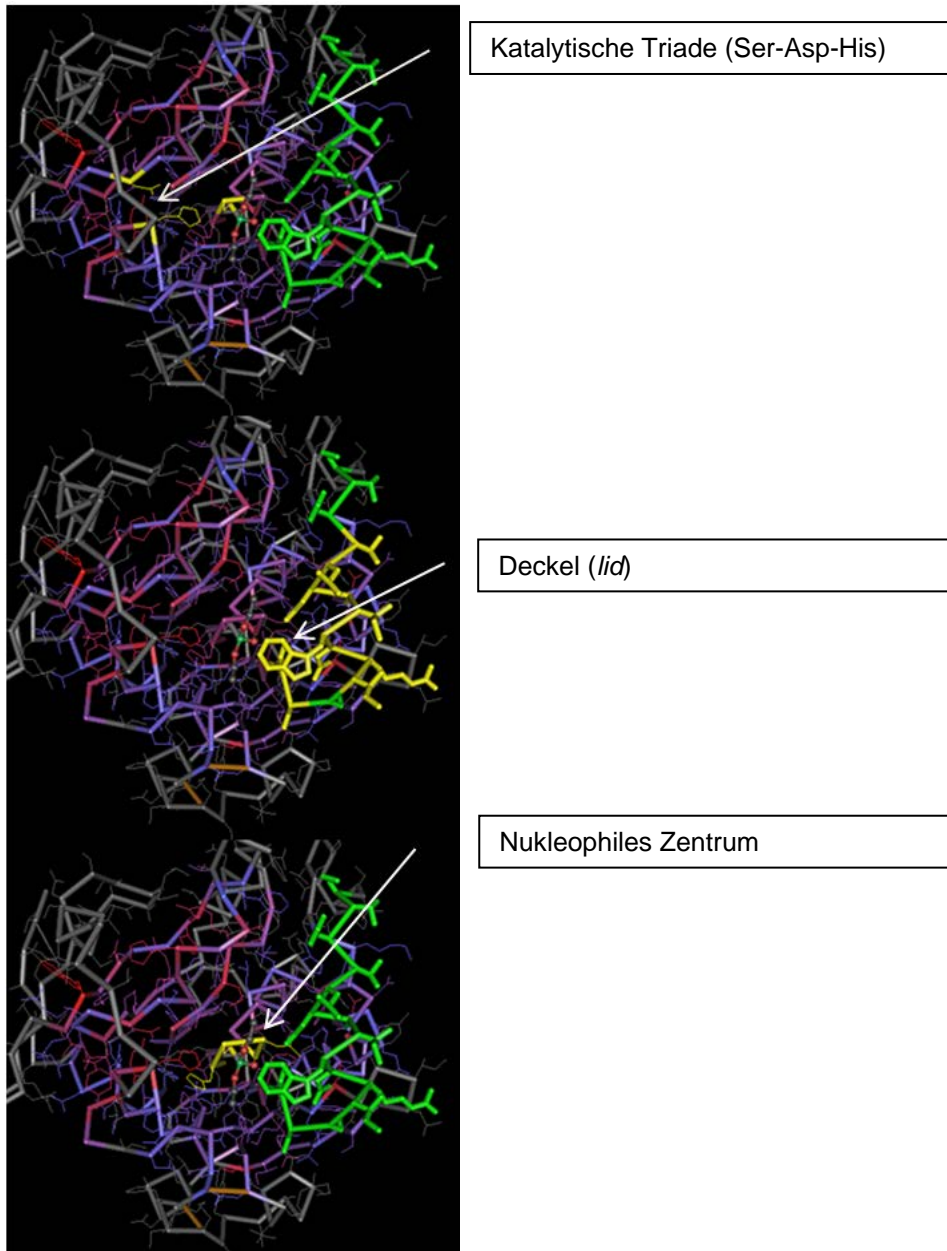


Abbildung 4.15: Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur der Lipasen, welche nach EC-Klassifikation in die Gruppe 3.1.1.3 eingeteilt werden. Zu dieser gehört auch die in dieser Arbeit rekombinant hergestellte extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus*. Die Grafik wurde mit Hilfe der NCBI-Datenbank erstellt (www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Pfeile markieren die gelben Bereiche, in denen die katalytische Triade (Ser-Asp-His), der nukleophile Bereich und der Deckel (*lid*) lokalisiert sind.

Zur Darstellung konservierter Domänen der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* erfolgte ein Abgleich (*Alignment*) der Lipase unter Verwendung der NCBI-Datenbank mit den in Tabelle 4.1 aufgelisteten Enzymen.

Organismus	Enzym	GENID
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Extrazelluläre Lipase	74667837
<i>Penicillium Camembertii</i>	Triacylglycerol Acylhydrolase	9998721 (TIA)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	unbekannt	49650645
<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica cultivar-group</i>)	unbekannt	32488294
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	hypothetical protein VP0626	28897400

Tabelle 4.1: Die Tabelle zeigt die vier Enzyme, mit denen ein Abgleich (*Alignment*) zur Detektion konservierter Domänen durchgeführt wurde (siehe Abbildungen 4.16 – 4.18).



Abbildung 4.16: Die Abbildung zeigt das *Alignment* der in Tabelle 4.1 aufgelisteten Enzyme. Das Wort Query am linken Rand der Abbildung meint die Lipase von *A. fumigatus*. Die rot unterlegten

Aminosäuren sind konservierte Domänen. Die mit dem schwarzen Pfeil markierten fünf Rauten bilden das gemeinsame nukleophile Zentrum der jeweiligen Enzyme (bei der Lipase von *A. fumigatus* folglich in Position 176-180).



Abbildung 4.17: In dieser Abbildung sind die drei Aminosäuren Ser-Asp-His mit Rauten und Pfeilen markiert. Sie bilden die katalytische Triade der in Tabelle 4.1 aufgelisteten Enzyme.



Abbildung 4.18: In dieser Abbildung ist die Aminosäureabfolge, welche den Deckel (*lid*) der jeweiligen Enzyme bildet, mit Raute und schwarzem Pfeil markiert.

4.9 Produktion und Aufarbeitung der extrazellulären Lipase

Eine Bakterienkolonie, welche im Rahmen des Kolonie-Screenings nachweislich HIS-getagte Proteine exprimiert hat, wurde mit LB-Flüssigmedium im 250 ml Ansatz beimpft. Unter IPTG-Zugabe wurde die Expression der extrazellulären Lipase induziert und das LB-Flüssigmedium mit den Bakterien, die dieses Protein exprimiert haben, zentrifugiert. Die Zentrifugation führte zur Bakterienlyse und damit zur Freisetzung der Lipasen. Das Pellet wurde mit PBS-Puffer versetzt. Mit dem Nickel-NTA-Medium wurden die HIS-getagten Proteine von nicht HIS-getagten Proteinen in einer Säule getrennt. Das Eluat mit den HIS-getagten Proteinen wurde mit Probenpuffer versetzt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Anschluss mit Hilfe eines Westernblots auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 3.13).

Drei Basen kodieren für eine Aminosäure, die ein durchschnittliches Molekulargewicht von 110 Dalton (Da) besitzt. Das Molekulargewicht der extrazellulären Lipase, dessen kodierender DNA-Abschnitt aus 900 bp besteht, ergibt sich aus folgender Berechnung:

$$[900: 3] \times 110 = 32670 \text{ Da}; \underline{33 \text{ kDa}}$$

Dies entspricht einem Protein, welches 33 kDa groß ist. Abbildung 4.19 zeigt das Ergebnis des Immunblots der Nitrozellulosemembran.

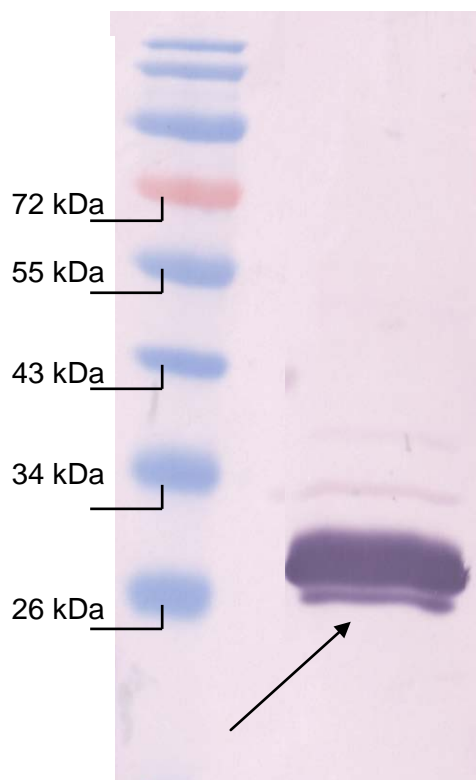


Abbildung 4.19: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Inkubation mit Anti-His- und Goat-Anti-Mouse-Antikörpern nach erfolgtem Westernblot, der mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte Proteinfractionen einer Rosetta-II-Bakterienkolonie zeigt, welche im Koloniescreening auf HIS-getagte Proteine diese exprimiert haben. Als Längenstandard wurde der PEQ-LAB-IV-Proteinmarker verwendet. Die mit dem Pfeil markierte Bande liegt in Bezug auf den aufgetragenen Längenstandard auf einer Höhe von 28-33 kDa. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der extrazellulären Lipase.

Zur Quantifizierung der extrazellulären Lipase wurde in drei verschiedenen Konzentrationen aus dem Nickel-NTA-Medium eluiertes HIS-getagtes Protein mit Probenpuffer auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die im SDS-Gel aufgetrennten unterschiedlichen Proteinfractionen wurden mit einer sich anschließenden Coomassie-Brilliantblau-Färbung angefärbt (siehe Abbildung 4.20).

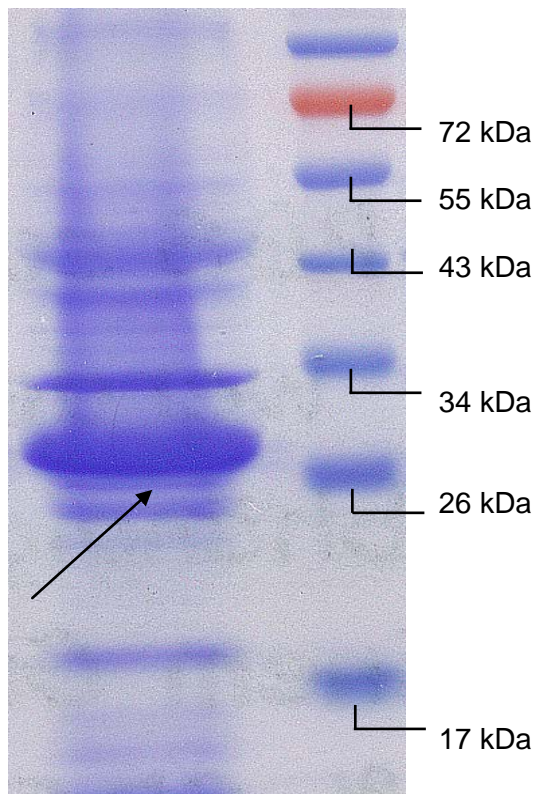


Abbildung 4.20: Ergebnis einer Coomassie-Brilliantblau-Färbung. Auf der rechten Seite der Abbildung wurde als Längenstandard ein Proteinmarker aufgetragen (PEQ LAB IV Gold Proteinmarker). Die mit dem Pfeil markierte Proteinfraction liegt in Bezug auf den Längenstandard auf einer Höhe von 28-33 kDa. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der extrazellulären Lipase.

4.10 pBlast (Protein Basic Local Alignment Search Tool) der extrazellulären Lipase im Vergleich zu anderen Lipasen von *A. fumigatus* und Enzymen verschiedener Organismen

Mittels NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) erfolgte der aminosequenzielle Abgleich der in dieser Arbeit klonierten und exprimierten extrazellulären Lipase (GenID: 74667837 / Accession-Nummer: Q4WE77) von *A. fumigatus* mit anderen extrazellulären Lipasen von *A. fumigatus*. Insgesamt wurden vier weitere sezernierte Lipasen gefunden, welche nach EC-Klassifikation in die Gruppe 3.1.1.3 eingeordnet

werden. Dies entspricht der Gruppe der in dieser Arbeit untersuchten extrazelluläre Lipase von *A.fumigatus*. Es zeigte sich bei der extrazellulären Triacylglycerol-Lipase (Accession-Nummer: Q4WNF9) mit 89 Scores (14,5%) die höchste aminosequenzielle Übereinstimmung (siehe Tabelle 4.2). Des Weiteren wurden die Homologien in absteigender Reihenfolge illustriert (siehe Tabelle 4.3).

	Genlocus	Accession- Nummer	EC- Klassifikation	pBlast im Vergleich mit der untersuchten extrazellulären Lipase
Extrazelluläre Lipase	Chromosom 5	Q4WE77	3.1.1.3	612 (100%)
Extrazelluläre Triacylglycerol-Lipase	Chromosom 6	Q4WNF9	3.1.1.3	89,0 (14,5%)
Extrazelluläre Lipase	Chromosom 3	Q4WYQ5	3.1.1.3	18,5 (3%)
Extrazelluläre Lipase	Chromosom 7	Q4WAG0	3.1.1.3	16,9 (2,7%)
Extrazelluläre Lipase	Chromosom 8	Q4WBJ7	3.1.1.3	16,2 (2,6%)

Tabelle 4.2: Übersicht über alle extrazellulären Lipasen von *Aspergillus fumigatus* und deren Score im Vergleich zu der in dieser Arbeit klonierten und aufgereinigten extrazellulären Lipase (Accession-Nummer: Q4WE77) von *A. fumigatus*.

	GenID/Accession- Nummer	pBlast im Vergleich mit der untersuchten extrazellulären Lipase
Extrazelluläre Lipase [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	74667837	612 (100,0%)
Extrazelluläre Lipase [<i>Neosartorya fischeri</i>]	4593151	527 (86,10%)
Extrazelluläre Lipase [<i>Aspergillus clavatus</i>]	4708487	421 (68,70%)
Hypothetical protein [<i>Aspergillus nidulans</i>]	2869196	399 (65,10%)
Lipase precursor [<i>Aspergillus terreus</i>]	4354322	335 (54,70%)

	GenID/Accession- Nummer	pBlast im Vergleich mit der untersuchten extrazellulären Lipase
Hypothetical protein [<i>Aspergillus oryzae</i>]	5990665	331 (54,10%)
Pc21g14620 [<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Wisconsin</i>]	8308447	328 (53,50%)
Hypothetical protein [<i>Aspergillus niger</i>]	4988581	323 (52,70%)
Triacylglycerol-lipase A [<i>Aspergillus niger</i>]	ABG73613	323 (52,70%)
Triacylglycerol-lipase precursor [<i>Aspergillus niger</i>]	ABG37906	320 (52,20%)
Triacylglycerol-lipase B [<i>Aspergillus niger</i>]	6587566	320 (52,20%)
Extracellular lipase, putative [<i>Aspergillus flavus</i>]	7909206	318 (51,90%)
Hypothetical protein [<i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>]	5992361	318 (51,90%)
Hypothetical protein [<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>]	4983749	317 (51,80%)
Lipase 2 [<i>Aspergillus niger</i>]	ACL68188	317 (51,80%)
Extracellular lipase, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i>]	8109494	293 (47,80%)
Lipase [<i>Thermomyces lanuginosus</i>]	AAC08588	291 (47,50%)
Extracellular lipase, putative [<i>Penicillium marneffe</i>]	7024783	288 (47,00%)

	GenID/Accession- Nummer	pBlast im Vergleich mit der untersuchten extrazellulären Lipase
Lipase [<i>Thermomyces lanuginosus</i>]	ABV69591	273 (44,60%)
Lipase precursor [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>]	6339771	257 (40,00%)
Hypothetical protein [<i>Phaeosphaeria nodorum</i>]	5973751	252 (41,10%)
Mono- and Diacylglycerol lipase precursor [<i>Penicillium cyclopium</i>]	AAF99710	248 (40,50%)
Mono- and Diacylglycerol lipase precursor [<i>Penicillium camemberti</i>]	BAA14345	248 (40,50%)
Extracellular lipase, putative [<i>Aspergillus flavus</i>]	7911958	248 (40,50%)
Pc21g06680 [<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Wisconsin</i>]	8313883	241 (39,40%)
Lipase [<i>Penicillium camembertii</i>]	AAB26004	233 (38,00%)
Extrazelluläre Lipase [<i>Aspergillus parasiticus</i>]	AAO17920	226 (36,9%)

Tabelle 4.3: Übersicht über bestehende Homologien mit der in dieser Arbeit klonierten und aufgereinigten extrazellulären Lipase von *A. fumigatus*.

5 Diskussion

Mittels einer Sonde wurde eine λ -Phagen-cDNA-Bank von *Aspergillus fumigatus* auf cDNA gescreent, die für eine extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* kodiert. Diese wurde in einen Expressionsvektor umkloniert und in der Folge in Expressionsstämme von *E. coli* transferiert. Anschließend wurde das Expressionsprodukt affinitätschromatographisch gereinigt. Im Rahmen der Sequenzanalyse mittels NCBI erfolgte u.a. die Bestimmung des Signalpeptids, des katalytischen Zentrums und ein Homologienvergleich der 300-AS-Lipase mit Enzymen unterschiedlicher Organismen.

5.1 Extrazelluläre Lipase

5.1.1 Virulenz-vermittelnde Lipasen in unterschiedlichen Organismen

In der Fachliteratur sind Virulenz-vermittelnde extrazelluläre Lipasen von verschiedenen Bakterien- und Pilzarten beschrieben. So konnten Rollof et al. (1988) zeigen, dass eine extrazelluläre Lipase von *Staphylococcus aureus* mit humanen Granulozyten interagiert. Die mit einer Lipase präinkubierten Granulozyten zeigten *in vitro* eine verminderte phagozytotische Aktivität sowie eine inhibierte Chemotaxis. Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass extrazelluläre Lipasen eine Granulozytenaggregation induzieren, welche in einer herabgesetzten Aktivität dieser Zellen mündet (Rollof et al. 1988). König et al. (1996) postulierten des Weiteren, dass auch extrazelluläre Lipasen von *Pseudomonas aeruginosa* Virulenz vermitteln. Diese interagieren mit Phospholipasen dieses Bakteriums und induzieren die Bildung und Ausschüttung von Leukotrien B₄ und 12-Hydroxyeicosatetraenoic Säure, welche im Rahmen entzündlicher und allergischer Prozesse von Thrombozyten und Leukozyten sezerniert werden (König et al. 1996). Ferner spielen lipolytisch wirksame Enzyme vom *Mycobacterium tuberculosis* bei der Entstehung einer postprimären Tuberkulose eine entscheidende Rolle. In der Regel werden die grampositiven Bakterien im immunkompetenten Menschen in einem tuberkulösen Granulom in der Lunge konserviert. Dieses Granulom besteht neben Epitheloidzellen, Langhans-Riesenzellen und Lymphozyten auch aus Triacylglyceriden. In diesem Stadium spricht man von einer Primärtuberkulose (Hall et al. 2009). Beim Übergang in eine postprimäre Tuberkulose konnte *in vitro* gezeigt werden, dass für Lipase kodierende Genbereiche des *Mycobacterium tuberculosis*

häufig transkribiert werden. Diese Lipasen verstoffwechseln Triacylglycerole und tragen somit zur Freisetzung der Mykobakterien aus dem tuberkulösen Graulom bei (Côtés et al. 2008). In der Mykologie wurden ebenfalls einige Lipasen näher untersucht. So stellten Santi et al. (2010) heraus, dass zwei unterschiedliche extrazelluläre Lipasen an der Oberfläche von Konidien des Pilzes *Metarhizium anisopliae* die Penetration in Insektenzellen ermöglichen. *Metarhizium anisopliae* gehört zu den bekannten insektenpathogenen Pilzarten. Weltweit zählt *Metarhizium anisopliae* heute zu den am meisten produzierten und in der biologischen Schädlingsbekämpfung verwendeten insektenpathogenen Pilzen (Freimoser et al. 2003). *Hortaea werneckii* hingegen ist ein zu den schwarzen Hefen gehörender Schlauchpilz und ein Verursacher der Dermatophytose Tinea nigra (Bonifaz et al. 2008). Göttlich et al. (1995) zeigten, dass dieser Pilz hydrophobe Zellwände besitzt und unter Beteiligung von Lipasen an der ebenfalls hydrophoben Epidermis haften kann. Auch der fakultativ humanpathogene Pilz *Candida albicans* sezerniert während einer Infektion Lipasen. Stehr et al. (2004) konnten erstmalig die Expression und Sezernierung extrazellulärer Lipasen während der oralen Candidose beim Menschen nachweisen. Zehn dieser Lipasen (LIP1-10) mit einer Anzahl von 427-472 Aminosäuren wurden von Schaller et al. (2005) näher charakterisiert. Sie sind in ihrer DNA-Sequenz zu 80% untereinander identisch. Des Weiteren zeigten sie im Mausmodell, dass das Expressionsprofil dieser Lipasen mit Ausnahme von LIP5 und LIP8 vom Infektionsstadium abhängig ist. Diese beiden Lipasen werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in jedem Entwicklungsstadium exprimiert. Es wird angenommen, dass Lipasen, die in frühen Infektionsstadien sezerniert werden, die Adhäsion an Leberzellen im Verlauf einer systemischen Candidose, vermitteln. Die in späteren Infektionsstadien exprimierten Lipasen erniedrigen durch die Lipolyse von Mono- und Triacylglycerinen und der damit verbundenden Bereitstellung von freien Fettsäuren den pH-Wert und könnten durch diese Milleubeeinflussung das pH-Optimum für unterschiedliche Enzyme von *Candida albicans* gewährleisten (Stehr et al. 2004). Paraje et al. (2008) klonierten und reinigten zudem eine zuvor nicht näher untersuchte 70 kDa-Lipase von *Candida albicans*, welche gegenüber Hepatozyten und Makrophagen *in vitro* eine Zytotoxizität induzierte. Auch einige Lipasen von Schimmelpilzen wurden hinsichtlich ihrer Virulenz-vermittelnden Eigenschaften näher untersucht. So klonierten Voigt et al. (2005) das Gen *FGL1*, welches für eine extrazelluläre Lipase des Schimmelpilzes *Fusarium graminearum* kodiert. Dieser Pilz

ist Auslöser der Taubährigkeit (engl. Fusarium head blight) und sorgte durch den Befall von Weizen und Mais in der Vergangenheit für beträchtliche Ernteauffälle weltweit (Prandini et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen 24 Stunden nach dem Befall von Weizenpflanzen vermehrt transkribiert wird. Bei einer Erniedrigung der lipolytischen Aktivität von *Fusarium graminearum* durch den Einsatz von Ebelactone B, einem bekannten Lipaseinhibitor, zeigte sich eine verminderte Virulenz gegenüber Weizen- und Maiszellen (Voigt et al. 2005). Yu et al. (2003) untersuchten den Einfluss der Expression von Lipasen auf die Produktion von Aflatoxin in *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Sie beschrieben, dass die Expression der Lipasen dieser *Aspergillus species* durch Einstellung eines aziden Mediums mittels Lipolyse auf den Aufbau und Konformationszustand des Aflatoxins Einfluss nimmt und somit indirekt Virulenz vermittelt. Aflatoxin ist ein u.a. von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* sezerniertes Mykotoxin. Es wirkt leberschädigend und kanzerogen. Tabelle 5.1 gibt eine zusammenfassende Übersicht über Virulenz-vermittelnde Lipasen unterschiedlicher Organismen.

Autoren	Organismus	Eigenschaften der Lipasen
	Bakterien	
Rollof et al. 1988	<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibition phagozytotischer Aktivität und Chemotaxis humaner Granulozyten
König et al. 1996	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Induktion der Bildung und Ausschüttung von Leukotrien B ₄ und 12-Hydroxyeicosatetraenoic Säure, welche im Rahmen entzündlicher und allergischer Prozesse von Thrombozyten und Leukozyten sezerniert werden
Côtes et al. 2008, Hall et al. 2009	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Freisetzung der Mykobakterien im Stadium der postprimären Tuberkulose durch Lipolyse der Granulomwandschichten
	Pilze	

Freimoser et al. 2003, Santi et al. 2010	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Vermittlung der Penetration in Insektenzellen
Göttlich et al. 1995, Bonifaz et al. 2008	<i>Hortaea werneckii</i>	Vermittlung der Haftung an die Epidermis im Rahmen der Tinea nigra
Stehr et al. 2004, Schaller et al. 2005, Paraje et al. 2008	<i>Candida albicans</i>	Vermittlung der Adhäsion an Leberzellen im Rahmen einer systemischen Candidose; Zytotoxizität gegenüber Makrophagen und Hepatozyten pH-Optimum für Virulenz-vermittelnde Enzyme
Voigt et al. 2005, Prandini et al. 2009	<i>Fusarium graminearum</i>	Reduktion der Virulenz gegenüber Weizen- und Maispflanzen nach Inhibition der Lipase
Yu et al. 2003	<i>Aspergillus flavus</i>	Beeinflussung des Konformationszustandes des Mykotoxins Aflatoxin
Yu et al. 2003	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Beeinflussung des Konformationszustandes des Mykotoxins Aflatoxin

Tabelle 5.1: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die in 5.1.1 näher charakterisierten Virulenz-vermittelnden Lipasen unterschiedlicher Organismen.

Ob die in dieser Arbeit rekombinant hergestellte Lipase von *A. fumigatus* Virulenz vermittelt, ist bislang unklar. Denkbar ist jedoch auf Grund des Nachweises der Virulenzvermittlung anderer Lipasen (siehe Tabelle 5.1), dass die Lipase von *A. fumigatus* ähnliche Eigenschaften aufweist. Die Invasivität des Pilzes könnte beispielsweise durch Destruktion der lipidhaltigen Membranen des Wirtsgewebes durch lipolytisch wirksame Enzyme vermittelt werden. Durch Senkung des pH-Werts mittels Lipolyse könnten in direkter Umgebung des Pilzes Proteasen wie beispielsweise Pep (Sriranganadane et al. 2011) in ihr Aktivitätsoptimum gebracht und die Invasivität von *A. fumigatus* auf diese beeinflusst werden.

5.1.2 Sequenzanalyse der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus*

In dieser Arbeit wurde auf Grundlage einer hypothetischen Sequenz auf dem Boden des entschlüsselten Genoms von *Aspergillus fumigatus* (Denning et al. 2002; Nierman et al. 2005) eine extrazelluläre Lipase kloniert und exprimiert. Das Enzym besteht aus insgesamt 900 Triplets, die für 300 Aminosäuren kodieren. Zur Detektion des hypothetischen Signalpeptids, welches die Aminosäurepositionen 1-21 einnimmt,

wurde die Methode von von Heijne (1986) angewendet. Das Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass es sich tatsächlich um ein sezerniertes Enzym handeln könnte. Des Weiteren zeigte sich beim Sequenzvergleich (*Alignment*) mit Enzymen anderer Organismen (siehe 4.8) konservierte Domänen, zu denen auch der Deckel (*lid*), das nukleophile Zentrum und die katalytische Triade zählen. Der Anteil konservierter Domänen erlaubt somit die Zugehörigkeit zu den Lipasen, welche nach EC-Klassifikation in die Gruppe 3.1.1.3 eingeteilt werden.

5.1.3 Sequenzieller und funktioneller Abgleich der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus*

Beim sequenziellen Abgleich der in dieser Arbeit klonierten extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* mit der von Yu et al. (2003) beschriebenen Virulenz-vermittelnden Lipase von *Aspergillus parasiticus* mittels NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ergab sich mit 226 (36,9%) der höchste Score. Zwischen der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* und den Lipasen von *Candida albicans* bestehen hingegen keine signifikanten Homologien in den jeweiligen Aminosäuresequenzen. Die Lipasen von *Candida albicans* werden jedoch, wie auch die von *Aspergillus parasiticus* und *fumigatus*, in der Enzymklasse EC 3.1.1.3 als Triacylglycerin-Acylhydrolasen zusammengefasst. Diese Klassifikation gruppiert Enzyme nach Art der Reaktion, die von ihnen katalysiert wird (siehe 1.2.3.3). Da die extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* aber analoge Reaktionen zu den durch Stehr et al. (2004) beschriebenen Lipasen von *Candida albicans* katalysiert, könnten sich ähnliche Virulenz-vermittelnde Eigenschaften zeigen. Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften und die Homologien der Lipasen von *Candida albicans*, *Aspergillus parasiticus* und *Aspergillus fumigatus*.

Accession-Nummer	Spezie	Bezeichnung	Enzymklasse	Funktion	pBlast-Score gegenüber Q4WE77
Q4WE77	<i>Aspergillus fumigatus</i>	extrazelluläre Lipase	EC 3.1.1.3	Unbekannt	612 (100%)
AAO17920	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Lipase	EC 3.1.1	Beteiligung an der Aflatoxinsynthese	226 (36,9%)
	<i>Candida albicans</i>	LIP 1-10	EC 3.1.1.(3)	Zytotoxizität gegenüber Makrophagen und Hepatozyten	<17 (< 2,8%)

Tabelle 5.2: Übersicht über die extrazellulären Lipasen von *Aspergillus fumigatus*, *parasiticus* und *Candida albicans* (LIP 1-10) im sequenziellen und funktionellen Vergleich zu der in dieser Arbeit

gereinigten und klonierten extrazellulären Lipase von *A. fumigatus*. Der pBlast-Score wurde mittels NCBI/BLAST/blastp Suite (www.ncbi.nlm.nih.gov) ermittelt.

5.2 Perspektiven für einen therapeutischen Ansatz

Die Behandlung der invasiven Aspergillose beschränkt sich derzeit auf den Einsatz weniger Therapeutika wie beispielsweise Voriconazol und Amphotericin B. Diese Medikamente haben jedoch insgesamt unbefriedigende therapeutische Wirksamkeit. Zudem weisen diese Arzneimittel eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf. Amphotericin B ist insbesondere nephro- und hepatotoxisch; Voriconazol zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Arzneimittelinteraktionen aus (Tietz et al. 2005). Daher ist die Identifikation weiterer potenzieller Angriffspunkte für Arzneimittel hinsichtlich der hohen Letalität der invasiven Aspergillose bedeutsam.

In der Fachliteratur werden Fälle beschrieben, in denen Lipasen als Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie dienen. So infizierten Trofa et al. (2009) *in vitro* humane Zellen mit *Candida species*. Anschließend wurden diese Zellen mit Acetylsalicylsäure (ASS) in einer für Menschen therapeutischen Konzentration inkubiert. Dabei zeigte sich, dass mit Acetylsalicylsäure behandelte infizierte Zellen einen geringeren Schaden gegenüber ebenfalls infizierten Zellen aufwiesen, die nicht mit ASS inkubiert wurden. Trofa et al. (2009) beobachteten zudem, dass gereinigte Lipasen von *Candida antarctica* und *cylindracea* mit ASS *in vitro* inhibiert werden konnten. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Inhibition ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass einzelne Reaktionsschritte (siehe 1.2.3.3) der Hydrolyse von Esterbindungen durch die Wirkung von ASS inhibiert werden. Passend hierzu gelang es Trofa et al. (2009) außerdem, durch die Gabe von bekannten Lipaseinhibitoren wie Ebelactone B den Zellschaden und das Wachstums von *Candida species in vitro* zu reduzieren.

5.3 Die Lipase als potenzieller Vakzinekandidat

Bislang konnte mit den Einzelantigenen Asp16, Asp3, Crf1p und Pep1 von *A. fumigatus* im Mausmodell eine T_H1 -gewichtete protektive Immunantwort gegenüber einer invasiven Aspergillose induziert werden (Bozza et al. 2002; 2009). Damit wurde der Beweis erbracht, dass sich eine aktive Immunisierung im Tiermodell erzielen lässt. Eine Antikörper-vermittelte Immunität konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Die Möglichkeiten passiver und aktiver Vakzinierung unter Zuhilfenahme der in dieser Arbeit klonierten extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* werden im Folgenden näher diskutiert.

5.3.1 Aktive Vakzinierung

Zur Generierung einer bleibenden antiinfektiösen Immunität werden in der Medizin unterschiedliche intra- und extrazelluläre Komponenten jeweiliger Erreger verwendet. Häufig handelt es sich dabei um sezernierte und auf der Erregeroberfläche befindliche Antigene, welche den ersten Erregerkontakt vermitteln und somit als Angriffspunkte für das Immunsystem fungieren. Vakzine, welche eine Immunität beispielsweise gegenüber Influenzaviren, *Haemophilus Influenzae* Typ b und Pneumokokken induzieren, beinhalten Oberflächenantigene (siehe Tabelle 5.3).

Erreger	Erkrankung	Impfstoff	Autor
Viren			
<i>Hepadnaviridae</i> Hepatitis-B-Virus A - H	Hepatitis B	HbsAg Glykoprotein der Virusoberfläche	Barry und Cooper (2007)
<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A + B	Virusgrippe/ „echte“ Grippe	Haemagglutinin + Neuroaminidase Glykoprotein der Virusoberfläche	Myers et al. (2011), Xuan et al. (2011)
Bakterien			
<i>Haemophilus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Typ b	Epiglottitis, Bronchitis, Meningitis	Kapselpolysaccharid b	Spiess und Heininger (2005), Xu et al. (2005)
<i>Streptococcus</i> Pneumokokken	Pneumonie, Meningitis	Kapselpolysaccharide	Huss et al. (2009), Van Gils et al. (2010)

Tabelle 5.3: Übersicht über die Impfstoffbestandteile, mit denen aktiv gegenüber Influenzaviren, den Hepatitis-B-Viren A-H, *Haemophilus Influenzae* Typ b und Pneumokokken immunisiert werden kann.

Die in dieser Arbeit klonierte extrazelluläre Lipase wurde von Asif et al. (2006) nicht-kovalent gebunden auf der Konidienoberfläche von *A. fumigatus* nachgewiesen. Somit ist es denkbar, dass auch die extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* als Oberflächenantigen einen Angriffspunkt für das Immunsystem darstellt. Ob sich tatsächlich eine protektive antiinfektiöse Immunität vermitteln lässt, könnte z.B. durch

mehrfache subkutane Gabe des in dieser Arbeit klonierten Proteins an Mäuse in einem für die Ausbildung einer Immunität typischen zeitlichen Intervall unter Verabreichung letaler Dosen von Aspergillussporen geprüft werden. Im Anschluss vergleicht man den Krankheitsverlauf mit und ohne vorangegangener Gabe der extrazellulären Lipase.

5.3.2 Passive Vakzinierung

In der Fachliteratur wurde die gezielte Antikörpergabe als passive Immunisierungsversuche gegenüber unterschiedlichen Pilzarten mehrfach beschrieben. So konnten Cabezas et al. (2010) im Tiermodell zeigen, dass die Gabe eines gegen das Hitzeschockprotein 90 von *Candida albicans* gerichteten humanen Antikörpers den Krankheitsverlauf einer invasiven Candidose günstig beeinflusst. Darüber hinaus postulierten Torosantucci et al. (2009), dass nach Verabreichung von Anti-Beta-Glucan-Antikörpern sich im Rahmen dieser quasi passiven Immunisierung im Tiermodell ein abgemilderter Verlauf der systemischen Candidose zeigte. Glucane sind Bestandteile der Zellwand verschiedener Pilzspecies wie *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* sowie *Aspergillus fumigatus*. Prinzipiell erscheinen daher auch humorale Immunmechanismen in der Abwehr von Pilzinfektionen bedeutsam.

Dazu passend konnte mit Antikörpern gegen eine 60 kDa-Lipase des Schimmelpilzes *Botrytis cinerea* eine Immunisierung in Tomatenpflanzen erreicht werden (Comménil et al. 1995; 1998). Berto et al. (1999) beobachteten, dass diese Antikörper mit einer extrazellulären Lipase von *Alternaria brassicicola* kreuzreagierten. Dieser Schimmelpilz befällt Blumenkohlpflanzen und führt weltweit zu Ernteaussfällen. Für den Versuch wurden Blumenkohlpflanzen mit diesen Antilipase-Antikörper-präinkubierten Sporen von *Alternaria brassicicola* infiziert. Es zeigte sich durch diese passive Immunisierung ein deutlich geringerer Pilzbefall. Da die Lipase vom Schimmelpilz *Botrytis cinerea* ebenso wie die in dieser Arbeit klonierte Lipase von *A. fumigatus* auf der Sporenwand lokalisiert ist (Asif et al. 2006), zur Gruppe 3.1.1.3 der EC-Klassifikation gezählt wird und folglich analoge Reaktionen katalysiert, erscheint ein vergleichbarer Versuchsaufbau mit Antilipase-Antikörpern zur Prüfung auf passive Vakzinierung denkbar.

Die invasive Aspergillose manifestiert sich primär pulmonal (Latgè 1999). Derzeit findet die inhalative Gabe von Amphotericin B als Prophylaxe Verwendung, jedoch

traten darunter weiterhin schwere Krankheitsverläufe auf (Monforte et al. 2010). Bislang wird eine Vernebelung und Inkubation von Antikörpern im Sinne einer passiven Vakzinierung gegenüber *A. fumigatus* nicht durchgeführt; jedoch könnte dieses als Möglichkeit der Prophylaxe und Frühtherapie möglich sein. So konnte beispielsweise Breitbach (2004) durch intranasale sowie -tracheale Gabe von Immunglobulinen Mäuse gegenüber *Burkholderia pseudomallei* passiv vakzinieren. Diese Immunglobuline vom IgG-Typ besaßen Spezifität für ein Exopolysaccharid, das auf der Bakterienoberfläche gebunden vorliegt. *Burkholderia pseudomallei* ist ein gram-negatives Bakterium, welches ätiologisch für den Krankheitskomplex der Melioidose verantwortlich ist (Breitbach et al. 2006). Die in dieser Arbeit klonierte extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* liegt nicht-kovalent gebunden auf der Konidienoberfläche vor (Asif et al. 2006) und könnte somit einen potenziellen Angriffspunkt für eine Antikörpertherapie darstellen. Ein Vergleich der Sequenzen der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* mit humanen Lipasen mittels NCBI/BLAST/blastp suite (www.ncbi.nlm.nih.gov) zeigte keine signifikanten Übereinstimmungen. Dies lässt erwarten, dass Antilipase-Antikörper, die sich gegen die extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* richten, nicht mit humanen Lipasen kreuzreagieren und unerwünschte Nebenwirkungen ausbleiben. Von den Beobachtungen durch Breitbach (2004) ausgehend sowie unter Berücksichtigung des Bedarfs einer Prophylaxe und Frühtherapie einer invasiven Aspergillose, insbesondere für immunsupprimierte Menschen, sollte die intranasale und tracheale Gabe von Antilipase-Antikörpern im Tiermodell auf Wirksamkeit geprüft werden.

5.4 Perspektiven

Lipasen unterschiedlicher Organismen können Virulenz vermitteln. Zur Klärung der Frage, ob die Lipase von *A. fumigatus* ebenfalls Virulenz vermittelt, sollte im Hinblick auf Wachstum und Pathogenität der Wildtyp mit einer Lipase-Deletionsmutante von *A. fumigatus* verglichen werden.

Zur Induktion einer bleibenden antiinfektiösen Immunität gegenüber einer invasiven Aspergillose wird in der Impfmedizin eine Vielzahl von Oberflächenantigenen unterschiedlicher Erreger verwendet. Da sich die in der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellte extrazelluläre Lipase von *A. fumigatus* auf der Sporenoberfläche befindet, ist es denkbar, dass diese als Oberflächenantigen einen Angriffspunkt für das Immunsystem darstellt. Ob sich tatsächlich eine protektive antiinfektiöse Immunreaktion vermitteln lässt, könnte z.B. durch mehrfache subkutane Gabe der in dieser Arbeit klonierten Lipase an Mäuse geprüft werden. In einem für die Ausbildung einer Immunität typischen zeitlichen Intervall werden letale Dosen von Aspergillussporen verabreicht.

Mit Antikörpern gegen eine Lipase des pflanzenschädigenden Schimmelpilzes *Botrytis cinerea* konnte eine quasi passive Immunisierung in Tomatenpflanzen erreicht werden. Die Lipase befindet sich, ebenso wie die Lipase von *A. fumigatus*, auf der Konidienoberfläche und katalysiert analoge Reaktionen. Im Hinblick auf die Prüfung passiver Vakzinierung mit der extrazellulären Lipase von *A. fumigatus* könnten immunsupprimierte Mäuse mit Antilipase-Antikörper geimpft werden und in einem sich anschließenden Infektionsversuch mit nicht-geimpften Mäusen verglichen werden.

Eine Detektion von Antikörpern in Infektionsseren, die sich gegen die Lipase von *A. fumigatus* richten, könnte zur Klärung der Frage herangezogen werden, ob diese extrazelluläre Lipase während einer Infektion mit *A. fumigatus* sezerniert wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass selbst ein fehlender Nachweis von Anti-Lipase-Antikörpern die Eignung der Lipase als Impfantigen keineswegs ausschließt.

6 Zusammenfassung

Christoph Paasch (2011): Klonierung und Expression einer extrazellulären Lipase
von *Aspergillus fumigatus*

Jährlich erkrankt in Deutschland eine Vielzahl von Menschen an einer durch *Aspergillus fumigatus* ausgelösten invasiven Schimmelpilzmykose. Fast ausschließlich betroffen sind schwer immunsupprimierte Patienten. Die Infektion mit *A. fumigatus* findet in der Regel über die Aufnahme von Sporen in die Lunge statt. Während beim Menschen die angeborene Immunität die entscheidende Rolle in der Abwehr des Pilzes spielt, stellt sich in Mäusen nach überlebter invasiver Aspergillose eine erworbene Immunität ein. In verschiedenen Studien konnte mit Einzelantigenen von *A. fumigatus* im Tiermodell bereits eine Immunität induziert werden. Mittels dieser Einzelantigene sowie der Identifizierung weiterer Immunität induzierender Antigene könnte die Basis für die spätere Entwicklung eines Impfstoffs gegenüber dieser Erkrankung geschaffen werden. Eine wichtige Gruppe erfolgversprechender Impfantigene sind Lipasen. So wurden für andere Organismen Lipasen als Virulenz- und Immunitäts-vermittelnd klassifiziert. In dieser Arbeit gelang es durch Sondenscreening einer Lambda-Phagen-cDNA-Bank die für eine Lipase von *A. fumigatus* kodierende cDNA zu extrahieren. Diese wurde anschließend gereinigt, mit Restriktionsenzymen behandelt und in ein Plasmid kloniert. Es erfolgte der Transfer in einen bakteriellen Expressionsstamm. Nach ihrer Expression wurde diese Lipase affinitätschromatographisch gereinigt. Die Sequenzanalyse erbrachte ein hypothetisches Signalpeptid und eine Vielzahl konservierter Domänen. So konnten das katalytische Zentrum, der Deckel (*lid*) sowie das nukleophile Zentrum identifiziert werden. Diese konservierten Domänen verweisen u.a. auf die Zugehörigkeit des klonierten Enzyms zu Lipasen, die nach EC-Klassifikation in die Gruppe 3.1.1.3 eingeteilt werden.

Die vorliegende Arbeit soll als Grundlage dienen, im Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffs gegenüber *A. fumigatus* die extrazelluläre Lipase im Tiermodell auf Induktion einer protektiven Immunität zu untersuchen. Ebenso soll sie dazu beitragen Lipase-knockout-Mutanten herzustellen. Diese sollten mit dem Wildtyp verglichen werden, um auf eine mögliche Rolle der Lipase während der Pathogenese rückschließen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé JP (2009): Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117-1121

Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL, Miller WT, Cassileth PA (1985): Pulmonary cavitation and massive hemoptysis in invasive pulmonary aspergillosis. Influence of bone marrow recovery in patients with acute leukemia. *Am Rev Respir Dis* 131, 115-120

Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U (2006): Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Proteome Res* 5, 954-962

Askew DS (2008): *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Curr Opin Microbiol* 11, 331-337

Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Johnson BD, Fink JN (2001): Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin Exp Allergy* 31, 761-770

Barry M, Cooper C (2007): Review of hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine safety and efficacy. *Expert Opin Biol Ther* 11, 1731-37

Berto P, Comménil P, Belingheri L, Dehorter B (1999): Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol Lett* 180, 183-189

Bonifaz A, Badali H, de Hoog GS, Cruz M, Araiza J, Cruz MA, Fierro L, Ponce RM (2008): *Tinea nigra* by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. *Stud Mycol* 61, 77-82

Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, Montagnoli C, Bacci A, Di Francesco P, Kurup VP, Wagner H, Romani L (2002): Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect* 4, 1281-1290

Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, D'Angelo C, Perruccio K, Bonifazi P, Zagarella S, Moretti S, Bistoni F, Latgé JP, Romani L (2009): Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J Immunol* 183, 2407-14

Breitbach K (2004): Molekulare Untersuchungen zur Pathogenese der Melioidose. Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover; Dissertation

Breitbach K, Klocke S, Tschernig T, van Rooijen N, Baumann U, Steinmetz I (2006): Role of inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in early control of *Burkholderia pseudomallei* infection in mice. *Infect Immun* 74, 6300-6309

Cabezas J, Albaina O, Montañez D, Sevilla MJ, Moragues MD, Pontón J (2010): Potential of anti-*Candida* antibodies in immunoprophylaxis. *Immunotherapy* 2, 171-183

- Calera JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeauvais JP, Diaquin M, López-Medrano R, Leal F, Latgé JP (1997): Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 65, 4718-24
- Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L (2000): T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* 165, 381-388
- Clancy CJ, Nguyen MH (1998): Acute community-acquired pneumonia due to *Aspergillus* in presumably immunocompetent hosts: clues for recognition of a rare but fatal disease. *Chest* 114, 629-634
- Cockrill BA, Hales CA (1999): Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Annu Rev Med* 50, 303-316
- Comménil P, Belingheri L, Sancholle M, Dehorter B (1995): Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* 30, 351-356
- Comménil P, Belingheri L, Dehorter B (1998): Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 1-14
- Corbel MJ, Eades SM (1977): Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* 60, 79-85
- Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, Pautas C, Maury S, Kuentz M, Hicheri Y, Bastuji-Garin S, Bretagne S (2009): Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 15, 81-86
- Côtes K, Bakala N'goma JC, Dhouib R, Douchet I, Maurin D, Carrière F, Canaan S (2008): Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 741-749
- Danner BC, Didilis V, Dörge H, Mikroulis D, Bougioukas G, Schöndube FA (2008): Surgical treatment of pulmonary aspergillosis/mycosis in immunocompromised patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 7, 771-776
- Denikus N, Orfaniotou F, Wulf G, Lehmann PF, Monod M, Reichard U (2005): Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. *Infect Immun* 73, 4704-4713
- Denning DW (1998): Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 26, 781-805
- Denning DW, Anderson MJ, Turner G, Latgé JP, Bennett JW (2002): Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect Dis* 2, 251-253
- De Repentigny L, Petitbois S, Boushira M, Michaliszyn E, Sénéchal S, Gendron N, Montplaisir S (1993): Acquired immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infect Immun* 61, 3791-3802
- Eichner RD, Al-Salami M, Wood PR, Müllbacher A (1986): The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int J Immunopharmacol* 8, 789-797
- Ferreiro JA, Carlson BA, Cody DT 3rd (1997): Paranasal sinus fungus balls. *Head Neck* 19, 481-486

Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St Leger RJ (2003): Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149, 239-247

Fukuchi Y, Kumagai T, Ebina K, Yokota K (1996): Apolipoprotein B inhibits the hemolytic activity of asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biol Pharm Bull* 19, 547-550

Gibson PG (2006): Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 27, 185-191.

Göttlich E, de Hoog GS, Yoshida S, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M (1995): Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses* 38, 489-94.

Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B, Cygler M (1993): Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268, 12843-47

Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K (1996): Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 33, 23-32

Hall RG, Leff RD, Gumbo T (2009): Treatment of active pulmonary tuberculosis in adults: current standards and recent advances. Insights from the Society of Infectious Diseases. Pharmacists. *Pharmacotherapy* 29, 1468-81

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B (2002): Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 347, 408-415

Hinson KF, Moon AJ, Plummer NS (1952): Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax* 7, 317-333

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM (1996): Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 9, 469-488

Hohl TM, Feldmesser M (2007): *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* 6, 1953-63

Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE (1998): Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol* 36, 165-168

Huss A, Scott P, Stuck AE, Trotter C, Egger M (2009): Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ* 180, 48-58

Iadarola P, Lungarella G, Martorana PA, Viglio S, Guglielminetti M, Korzus E, Gorrini M, Cavarra E, Rossi A, Travis J, Luisetti M (1998): Lung injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. *Exp Lung Res* 24, 233-251

Ito JI, Lyons JM, Hong TB, Tamae D, Liu YK, Wilczynski SP, Kalkum M (2006): Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 3 Protect mice against invasive aspergillosis. *Infect Immun* 74, 5075-84

- Kakugawa K, Shobayashi M, Suzuki O, Miyakawa T (2002): Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 978-85
- Kogan TV, Jadoun J, Mittelman L, Hirschberg K, Osherov N (2004): Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J Infect Dis* 189, 1965-73
- König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W (1996): Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun* 64, 3252-3258
- Kozel TR (1996): Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 9, 34-46
- Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, Ruppert T, Härtl A, Hof H, Brakhage AA (2006): Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Mol Microbiol* 62, 292-302
- Latgé JP (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12, 310-350
- Lehmann PF, White LO (1976): Acquired immunity to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 13, 1296-98
- López-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA, Puente P, Leal F (1995): An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun* 63, 4774-4780
- Mackichan J, Thomsen L, Kerwin J, Latgé JP, Beauvais A (1995): Unsaturated fatty acids are the active molecules of a glucan-synthase-inhibitory fraction isolated from entomophthorean protoplasts. *Microbiology* 141, 2757-62
- Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, Van Eldere J, Verbist L, Boogaerts M (1999): Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 37, 3223-28
- Mircescu MM, Lipuma L, van Rooijen N, Pamer EG, Hohl TM (2009): Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis* 200, 647-656
- Monforte V, Ussetti P, Gavaldà J, Bravo C, Laporta R, Len O, García-Gallo CL, Tenorio L, Solé J, Román A (2010): Feasibility, tolerability, and outcomes of nebulized liposomal amphotericin B for *Aspergillus* infection prevention in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 29, 523-530
- Monod M, Paris S, Sarfati J, Jatou-Ogay K, Ave P, Latgé JP (1993): Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 106, 39-46
- Müller J (1994): Epidemiology of deep-seated, domestic mycoses. *Mycoses* 37, 1-7

Myers ER, Misurski DA, Swamy GK (2011): Influence of timing of seasonal influenza vaccination on effectiveness and cost-effectiveness in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 204, 128-140

Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Perteua M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW (2005): Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156

O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS (2009): Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471-474

Pagano L, Ricci P, Nosari A, Tonso A, Buelli M, Montillo M, Cudillo L, Cenacchi A, Savignana C, Melillo L (1995): Fatal haemoptysis in pulmonary filamentous mycosis: an underevaluated cause of death in patients with acute leukaemia in haematological complete remission. A retrospective study and review of the literature. *Gimema Infection Program (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto)*. *Br J Haematol* 89, 500-505

Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE (2008): *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol* 54, 647-59

Pasqualotto AC, Denning DW (2006): Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 12, 1060-76

Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G (2009): Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem Toxicol* 47, 927-931

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie 2.*, aktualisierte Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008

Reichard U, Büttner S, Eiffert H, Staib F, Rüchel R (1990): Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol* 33, 243-251

Reichard U, Monod M, Odds F, Rüchel R (1997): Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 35, 189-196

Reichard U, Jousson O, Monod M (2008): Secreted proteases from the mold *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 51, 30-32

Reiss E, Lehmann PF (1979): Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 25, 357-365

Reiß J: Schimmelpilze. 2. Aufl Verlag Springer, Berlin 1997

Rivera A, Hohl T, Pamer EG (2006): Immune responses to *Aspergillus fumigatus* infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 47-49

Rollof J, Braconier JH, Söderström C, Nilsson-Ehle P (1988): Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7, 505-10

Salez F, Lamblin C, Wallaert B (2000): Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Rev Mal Respir* 17, 265-278

Samson RA, Van Reenen-Hoekstra ES (1988): Introduction to food-borne fungi. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences

Santi L, Beys da Silva WO, Berger M, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH (2010): Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 55, 874-880

Sarda L, Desnuelle P (1958): Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim Biophys Acta* 30, 513-521

Schaffner A, Douglas H, 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

Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AI (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 (1994): Macrophage-*Aspergillus* interactions. *Immunol Ser* 60, 545-552

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B (2005): Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48, 365-77

Schneemann M, Schaffner A (1999): Host defense mechanism in *Aspergillus fumigatus* infections. *Contrib Microbiol* 2, 57-68

Segal BH (2009): Aspergillosis. *N Engl J Med* 360, 1870-84

Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, Wakayama M, Yamaguchi H, Takahashi K, Paris S, Latgé JP, Naoe S (1999): Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microb Pathog* 27, 123-131

Shibuya K, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, Latgé JP (2006): Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47, 249-255

Silveira FP, Husain S (2007): Fungal infections in solid organ transplantation. *Med Mycol* 45, 305-320

Smith JM, Tang CM, Van Noorden S, Holden DW (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, 5247-54

Solé A (2008): Invasive fungal infections in lung transplantation: role of aerosolised amphotericin B. *Int J Antimicrob Agents* 32, 161-165

Spiess H, Heininger U: *Impfkompodium*. 6. Auflage; Thieme Verlag Stuttgart 2005

Sriranganadane D, Reichard U, Salamin K, Fratti M, Jousson O, Waridel P, Quadroni M, Neuhaus JM, Monod M (2011): Secreted glutamic protease rescues aspartic protease Pep deficiency in *Aspergillus fumigatus* during growth in acidic protein medium. *Microbiology* 157, 1541-1550

Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, Hube B, Schäfer W (2004): Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4, 401-408

Sturtevant J, Latgé JP (1992): Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* 166, 580-586

Sutton P, Waring P, Müllbacher A (1996): Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunol Cell Biol* 74, 318-322

Thau N, Monod M, Crestani B, Rolland C, Tronchin G, Latgé JP, Paris S (1994): rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 62, 4380-4388

Tietz HJ, Nenoff P, Ullmann AJ: *Organmykosen auf einen Blick: Diagnostik und Therapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen*. (UTSB), 1. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Toida J, Arikawa Y, Kondou K, Fukuzawa M, Sekiguchi J (1998): Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 759-763

Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A (2009): Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* 4, 5392

Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schäfer W, Rykunov D, Fiser A, Hamari Z, Nosanchuk JD, Gácsér A (2009): Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *Microbes Infect* 11, 1131-9.

Tronchin G, Esnault K, Renier G, Filmon R, Chabasse D, Bouchara JP (1997): Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 65, 9-15

Van de Graaf EA, Jansen HM, Bakker MM, Alberts C, Eeftinck Schattenkerk JK, Out TA (1992): ELISA of complement C3a in bronchoalveolar lavage fluid. *J Immunol Methods* 147, 241-250

Van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Rodenburg GD, Keijzers WC, Bogaert D, Trzcinski K, Bruin JP, van Alphen L, van der Ende A, Sanders EA (2010): Pneumococcal conjugate

vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA* 304, 1099-106

Voigt CA, Schäfer W, Salomon S (2005): A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J* 42, 364-375

Von Heijne G (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14, 4683-4690

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF (2008): Treatment of Aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46, 327-360

Warnock DW (2007): Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48, 1-12

Xuan C, Shi Y, Qi J, Zhang W, Xiao H, Gao GF (2011): Structural vaccinology: structure-based design of influenza A virus hemagglutinin subtype-specific subunit vaccines. *Protein Cell* 2, 997-1005

Xu X, Henninger T, Abbanat D, Bush K, Foleno B, Hilliard J, Macielag M (2005): Synthesis and antibacterial activity of C2-fluoro, C6-carbamate ketolides, and their C9-oximes. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 883-887

Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE (2003): Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 95, 1334-42

Danksagung

Herrn Prof. U. Reichard danke ich für die interessanten, fördernden, konstruktiven Gespräche, das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde, und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Uwe Groß gilt mein besonderer Dank für die Vermittlung dieser Arbeit.

Birgit Riemschneider möchte ich für die Einarbeitung in die Labormethoden und den herzlichen Umgang danken.

Martin Rosenow danke ich für die hilfreichen Hinweise bezüglich der Verfassung der Promotion und der Durchführung der Labormethoden.

Ebru Aileen Alsat danke ich für die vielen Tipps und Durchsichten.

Clemens Gürke möchte ich für die Kontrolle der Promotionsarbeit hinsichtlich Orthographie und Rechtschreibung danken.