Identifizierung schutzvermittelnder Antigene von Aspergillus fumigatus für eine Impfstoffentwicklung zur Verhütung invasiver Aspergillosen bei Leukämie-Patienten

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades "Doctor rerum naturalium" der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Grundprogramm Biologie der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Sahra Herrmann

aus Uslar

Göttingen, 2014

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Uwe Groß

(Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Medizinische Mikrobiologie)

Prof. Dr. Gerhard Braus,

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik)

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. Uwe Groß

(Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Medizinische Mikrobiologie)

Korreferent/in: Prof. Dr. Gerhard H. Braus (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik)

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Ernst Wimmer (Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Entwicklungsbiologie)

Jun.-Prof. Dr. Kai Heimel (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik)

Prof. Dr. Stefanie Pöggeler (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Genetik eukaryotischer Mikroorganismen)

(Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Tierökologie)

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014

PD Dr. Marko Rohlfs

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Utz Reichard dafür danken, dass er mir die Anfertigung dieser sehr interessanten Doktorarbeit ermöglicht hat. Für seine engagierte Betreuung, die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens und nicht zuletzt den persönlichen Kontakt bin ich sehr dankbar.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Uwe Groß für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation im Institut für Medizinische Mikrobiologie, die Anregungen während meiner Jahresberichte und die Übernahme des Referats meiner Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus für die Übernahme des Korreferats und die hilfreichen Diskussionen während meiner Fortschrittsberichte.

Herrn Prof. Dr. Ernst Wimmer, Herrn Jun.-Prof. Dr. Kai Heimel, Frau Prof. Dr. Stefanie Pöggeler und Herrn PD Dr. Marko Rohlfs möchte ich für die Bereitschaft, Mitglied meiner Prüfungskommission zu werden, danken.

Bei Iris Iben möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass wir uns auch privat, fernab des Laborsalltags, so gut verstehen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Brakhage, dass er es mir ermöglicht hat, im Zuge unserer Kooperation, einige Wochen in der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie am Hans Knöll Institut (HKI) in Jena zu arbeiten. Bedanken möchte ich mich außerdem dafür, dass ich währenddessen und einige Zeit darüber hinaus vom HKI finanziert wurde. Vera Pähtz gilt mein Dank für die besonders nette Zusammenarbeit und ihre mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Sylke Fricke danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung im Labor und Dr. Maria Straßburger für die Durchführung der Mausinfektionsversuche.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sven Krappmann dafür bedanken, dass ich eine Woche in seinem Labor in Würzburg arbeiten durfte und dabei die Technik der Komplementierung erlernen konnte.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Frank Ebel (München) für die Überlassung einiger rekombinanter Proteine und Herrn Prof. Dr. Michel Monod (Lausanne, Schweiz) für die Bereitstellung einiger Plasmide zur Proteinexpression.

Für die Finanzierung möchte ich mich bei der José-Carreras Leukämie-Stiftung e. V. bedanken (Projektnummer: DJCLS R 10/31f).

Allen Kollegen danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche und Vorschläge, für ihre Hilfsbereitschaft, für's Zuhören, Aufmuntern und die schöne gemeinsame Zeit.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei meinen Freunden - für die aufmunternden (Telefon-/Skype-) Gespräche, Spaziergänge, Spieleabende, entspannenden Ausritte durch den Solling, die netten Unterhaltungen im Reitstall und die Abende mit dem Kulturticket oder im Kino. Ihr habt versucht, mich zu den richtigen Zeitpunkten zu motivieren, wart für mich da und habt immer an mich geglaubt. Danke!

Bei Katja Reich möchte ich mich außerdem für das sorgfältige Korrekturlesen bedanken.

Schließlich und keineswegs zuletzt, möchte ich meiner Familie - meinen Eltern und meinem Bruder - danken, für ihre großartige Unterstützung, ihren unermüdlichen Zuspruch und ihren Glauben an mich. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie und Morphologie von Aspergillus fumigatus	1
1.2 A.fumigatus und seine ökologische Bedeutung	2
1.3 A.fumigatus als humanpathogener Erreger	2
1.3.1 Invasive Aspergillose	3
1.3.2 Andere durch A. fumigatus hervorgerufene Erkrankungen	4
1.4 Konidienoberfläche und Zellwand	5
1.5 Aspergillus-Abwehr	6
1.5.1 Angeborene Abwehrmechanismen	6
1.5.2 Erworbene Abwehrmechanismen	9
1.6 Vakzinierungsversuche gegen A.fumigatus	11
1.7 Screening-Methoden für die Suche nach schützenden Antigenen	12
1.8 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräteliste	15
2.1.2 Verwendete Software und Internet-Tools	17
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.4 Kommerzielle Kits	19
2.1.5 Chemikalien	19
2.1.6 Enzyme	21
2.1.7 Molekulargewichtsmarker	

	2.1.8 Oligonukleotide	. 22
	2.1.9 Antikörper	. 24
	2.1.10 Organismen und Stämme	. 24
	2.1.11 Plasmide und Proteinexpressionsplasmide	. 24
	2.1.12 Rekombinante Proteine	. 26
	2.1.13 Platten zur Anzucht von Aspergillen	. 27
	2.1.14 Nährmedien und Medienzusätze	. 27
	2.1.15 Lösungen und Puffer	. 30
2	.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	. 34
	2.2.1 Sterilisation	. 34
	2.2.2 Bakterienkultivierung	. 35
	2.2.3 Bestimmung der Zelldichte	. 35
	2.2.4 Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i>	. 35
	2.2.5 Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	. 35
	2.2.6 Lagerung von Bakterien	. 36
	2.2.7 Herstellung einer A.fumigatus-Sporensuspension	. 36
	2.2.8 Bestimmung der Sporenzahl	. 36
	2.2.9 Transformation von A.fumigatus	. 37
2	.3. Molekulargenetische Arbeitsmethoden	. 39
	2.3.1 Isolierung von Transformanten-DNA für PCR-Ansatz	. 39
	2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus A.fumigatus	. 40
	2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	.41
	2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	.41
	2.3.5 Polymerasekettenreaktion	.41
	2.3.6 Nested-PCR	. 42
	2.3.7 Kolonie-PCR	. 43
	2.3.8 Agarosegelelektrophorese	. 43

2.3.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen
2.3.10 DNA-Aufreinigung
2.3.11 Ethanolfällung
2.3.12 Restriktionsverdau
2.3.13 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA45
2.3.14 Ligation von DNA
2.3.15 GeneArt [®] Seamless Cloning and Assembly Kit
2.3.16 Sequenzierung
2.3.17 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde
2.3.18 Southern Blot
2.4 Proteinanalytische Arbeitsmethoden
2.4.1 Produktion und Aufreinigung His-getagter Proteine zur Verimpfung50
2.4.2 Herstellung der HP16-Expressionsplasmide und Test auf rekombinante
Proteinexpression in <i>E.coli</i>
2.4.3 Aufreinigung His-getagter Proteine
2.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2.4.5 Coomassie-Färbung
2.5 Charakterisierung der A.fumigatus Aspf3-Deletionsmutante und
Komplementmutante
2.5.1 Wachstumskontrolle der Aspf3-Deletions- und Komplementmutante
2.6. Tierexperimentelle Arbeiten
2.6.1 Tierhaltung
2.6.2 Immunisierung mit rekombinanten A. fumigatus-Proteinen im Mausmodell. 55
2.6.3 Immunsuppression der Mäuse mit <i>A.fumigatus</i> -Konidien
2.6.4 Infektion der Mäuse mit <i>A.fumigatus</i> -Konidien
3 Ergebnisse
3.1Herstellung von Gen-Deletionsmutanten und Komplementmutanten inA.fumigatus57

3.1.1 Herstellung von ΔHP16
3.1.2 Herstellung von Δ HP16 ^K
3.1.3 Herstellung von $\Delta Aspf3^{K}$
3.2 Biochemische Charakterisierung der Aspf3-Deletionsmutante und -
Komplementmutante
3.3 Herstellung des rekombinanten Proteins HP16
3.3.1 Expression von HP16 in <i>E.coli</i> unter Verwendung eines His-Tags
3.4. Etablierung eines Mausmodells mit Dosisfindungsstudie
3.5 Immunisierung mit rekombinanten A. fumigatus-Proteinen im Mausmodell73
3.6 Virulenztestung der A.fumigatus-Deletionsmutanten im Vergleich zu ihrer
Komplementmutanten und dem Wildtyp D141 80
4 Diskussion
4.1 Deletionsmutante Δ HP16 eines ausgewählten Konidienoberflächenproteins von
A.fumigatus
4.2 Untersuchung des hypothetischen Proteins HP16
4.3 Mausmodell zur invasiven Aspergillose
4.4 Virulenzversuche mit dem hypothetischen Protein HP16
4.5 Rekombinant hergestelltes Protein HP16
4.6 Versuche zu Aspf3
4.7 Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Proteinen
4.8 Einschränkungen und Verbesserungen bei der Impfstoffsuche
5 Zusammenfassung101
6 Literaturverzeichnis103
7 Anhang110
7.1 Molekulargewichtsmarker
7.2 Vektoren
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
A.fumigatus	Aspergillus fumigatus
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.albicans	Candida albicans
CF	Cystischer Fibrose
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,81 m/s ²)
h	Stunde (hora)
HC1	Salzsäure
IA	invasive Aspergillose
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexe
	(major histocompatibility complex)
min	Minute
MM-Medium	Minimal-Medium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NET	neutrophile extrazelluläre Fallen (neutrophil extracellular traps)

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (nickel nitrilotriacetic acid)	
NK-Zellen	Natürlichen Killer-Zellen	
OD_{λ}	optische Dichte der Wellenlänge λ (in nm)	
OM	osmotisches Medium	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)	
Pfu	Pyrococcus furiosus	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der	
	Wasserstoffionenkonzentration	
p.i.	nach einer Infektion (post infectionem)	
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)	
PRR	Pathogen-Erkennungsrezeptoren (pathogen recognition receptor)	
ROI	reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxidant intermediates)	
s.	siehe	
s.c.	unter der Haut (subkutan)	
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium	
	dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	
sec	Sekunde	
Tab.	Tabelle	
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	
Taq	Thermus aquaticus	
TB-Puffer	trapping buffer	
TB-Medium	terrific broth	
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (toll-like receptor)	
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	
U	Unit	
U/min	Umdrehungen pro Minute	
usw.	und so weiter	
V	Volt	
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)	
z.B.	zum Beispiel	

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und Morphologie von Aspergillus fumigatus

Die Spezies *Aspergillus fumigatus* (*A.fumigatus*) wurde zuerst 1863 von Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben. Der Name des Schimmelpilzes *A.fumigatus* lässt sich von lat. *fumus* (der Rauch) ableiten und bezieht sich auf die rauchgrüne Farbe des Pilzes.

Die effiziente Verbreitung von *A.fumigatus* wird durch die Produktion einer großen Zahl asexueller Sporen, so genannter Konidien, gewährleistet. Dabei bildet jedes Konidiophor (Konidienträger) tausende Konidien, die an basipeptalen Ketten aus Phialiden verankert sind (Abb. 1). Diese Konidien werden in die Atmosphäre freigesetzt, haben einen Durchmesser von nur 2-3 µm und sind klein genug, um nach dem Einatmen bis in die Lungenbläschen (Alveolen) zu gelangen [1].



Abb. 1: Morphologie von A.fumigatus in schematischer Darstellung (modifiziert nach [2]).

In feuchter Umgebung und wärmeren Temperaturen kommt es zur Auskeimung ruhender Konidien. Die charakteristische, echinulate Morphologie ruhender Sporen beginnt sich mit der Zeit zu verändern. So zeigen geschwollene Konidien eine deutlich geschnürte Oberflächenstruktur [3]. Der Übergang von der Keimung hin zum vegetativen Wachstum wird von der Ausbildung von Keimschläuchen gekennzeichnet. Es bilden sich Hyphen, aus denen sich dann das Myzel entwickelt. Die Basis des Konidophor wird durch eine Fußzelle gebildet, die senkrecht dem Nährmyzel entspringt. Am distalen Ende des Konidiophors findet sich ein Vesikel, welchem wiederum zu allen Seiten Phialiden aufsitzen.

A.fumigatus wurde lange Zeit zu den Vertretern der Deuteromycota gezählt, da nur sein asexueller Lebenszyklus beobachtet werden konnte. Neuere Erkenntnisse wiesen jedoch auch auf eine sexuelle Reproduktion bei *A.fumigatus* hin. So konnte durch Genomanalysen das Vorhandensein von 215 Genen belegt werden, die in die sexuelle Entwicklung involviert sind, darunter die kreuzungstypspezifischen Gene *MAT1-1* und *MAT1-2*, sowie Gene für Pheromonsynthese und deren entsprechende Rezeptoren [4,5]. Den endgültigen Nachweis erbrachten O'Gorman et al. [6], die im Jahr 2009 einen vollfunktionellen Fortpflanzungszyklus nachwiesen. Sie beobachteten auch die Bildung von Ascosporen in für Ascomyceten typischen Cleistothecien sowie sein Teleomorph *Neosartorya fumigata*.

1.2 A.fumigatus und seine ökologische Bedeutung

Pilze sind eukaryontische Lebewesen mit einer ausgeprägten Zellwand, die anders als bei Pflanzen oft aus relativ hohen Chitinanteilen besteht. Ihren Energiebedarf decken Pilze durch den Abbau organischer Substanzen; ein Vorgang, der als Heterotrophie bezeichnet wird. *A.fumigatus* spielt als ein Vertreter saprophytischer Pilze eine wichtige Rolle bei der Aufbereitung von Kohlenstoff und Stickstoff in der Umwelt [7]. Seine natürliche ökologische Nische ist der Boden. *A.fumigatus* ist eine thermophile Spezies, sein Wachstum wurde bei Temperaturen von bis zu 55°C, sein Überleben sogar bei zu 70°C nachgewiesen (zur Übersicht [1]).

1.3 A.fumigatus als humanpathogener Erreger

Obwohl *A.fumigatus* nur einen geringen Anteil der Schimmelpilzisolate in der Luft eines Krankenhauses ausmacht (0,3 %), findet sich der Pilz bei ca. 44 % der Patientenisolate [8]. Zudem verursacht *A.fumigatus* etwa 90 % aller invasiven Aspergillosen [9]. Auf Grund seiner enormen Kapazität zur Sporulierung ist die Konzentration mit 1-100 Konidien pro Kubikmeter in der Luft sowohl in Innenräumen als auch im Freien sehr hoch [10]. Bei immunkompetenten Menschen verursachen diese Konidien normalerweise keine invasiven Erkrankungen. Sie werden effizient von den Abwehrmechanismen innerhalb der Lunge eliminiert [11]. Dennoch kann das Zusammentreffen zwischen *Aspergillus* und dem Wirt mit einem breiten Spektrum an Krankheiten einhergehen. Die Krankheiten, die von *A.fumigatus* verursacht werden, sind vielfältig und können in drei Kategorien unterteilt werden, welche in Abhängigkeit zur Immunreaktion des Wirtes stehen: (I) invasive Infektionen, die durch das Wachstum von Hyphen in Geweben gekennzeichnet sind; (II) Infektionen, die durch die Besiedlung der Schleimhäute ohne Invasion in das Gewebe einhergehen; und (III) Hypersensitivitätserkrankungen, die durch die Immunantwort des Wirtes hervorgerufen werden (Abb. 2) [12].



Abb. 2: Schematische Darstellung von Krankheiten, die *Aspergillus*-Arten zugeschrieben werden, resultierend aus unterschiedlichen Wirt-Immunantworten (verändert nach Park 2009 [12]).

1.3.1 Invasive Aspergillose

Anders als bei gesunden Personen, bei denen Konidien durch die pulmonale Abwehr beseitigt werden, werden bei immunsupprimierten Patienten die eingeatmeten *Aspergillus*-Konidien nicht oder nur unzureichend phagozytiert. So keimen diese innerhalb weniger Stunden aus, und ihre Hyphen wachsen invasiv in das Lungengewebe ein [13]. Die dabei im Vordergrund stehende Eigenschaft des invasiven *Aspergillus*-Hyphenwachstums hat auch zur Namensgebung der Erkrankung als invasive Aspergillose (IA) geführt. Allgemein hat die Häufigkeit von invasiven, oft tödlich verlaufenden Mykosen in den letzten beiden Jahrzehnten erheblich zugenommen (zur Übersicht [14]). Dies wird auf die steigende Anzahl von Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung schwerer Pilzinfektionen zurückgeführt. Im Vordergrund stehen die Durchführung von Knochenmarkstransplantationen, Organtransplantationen, Blutund größere Operationen, Infektionskrankheiten wie HIV, Tumorerkrankungen, immunsuppressive Therapie, erhöhtes Alter und Frühgeburten (zur Übersicht [15]). Patienten mit dem höchsten Risiko für eine invasive Aspergillose sind diejenigen mit einer signifikanten Reduktion in der Anzahl oder Funktion ihrer Granulozyten, etwa Leukämiepatienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen. Auch Patienten unter Langzeittherapie mit Immunsuppressiva, vor allem bei Behandlung mit Cortison (z.B. Patienten nach Organtransplantation), sind mit einem erhöhten Risiko konfrontiert [16,17]. Trotz der Entwicklung neuer Behandlungen liegt die Sterblichkeit bei Patienten mit IA bei 50 %, in bestimmten Situationen bei bis zu 95 % [11,18].

1.3.2 Andere durch A. fumigatus hervorgerufene Erkrankungen

Neben der beschriebenen IA bei immunsupprimierten Patienten kann *A.fumigatus* noch eine Reihe weiterer Erkrankungen bei immunkompetenten Patienten auslösen. Hierzu zählen Asthma, allergische Sinusitis und allergische Alveolitis. Sie finden sich vor allem nach wiederholter Exposition gegen Konidien oder Antigene von *Aspergillus*, wobei eine Kolonisierung des Wirtes ausbleibt. In den meisten Fällen reicht oft die Vermeidung des Kontakts mit dem Agens aus, um den Erkrankungen vorzubeugen.

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) hingegen ist hiervon abzutrennen, da sie zusätzlich mit einer Besiedlung des Bronchialsystems mit dem Pilz einhergeht. Die Erkrankung manifestiert sich als Asthma bronchiale mit transienten Lungeninfiltraten, wobei die chronische Entzündung oft terminal in einer Lungenfibrose mündet (zur Übersicht [1]). ABPA tritt meist bei Personen auf, die an atopischem Asthma oder Cystischer Fibrose (CF) leiden. Es wird angenommen, dass die Prävalenz von ABPA bei etwa 1-2 % bei Patienten mit Asthma und bei 2-15 % bei Patienten mit CF liegt [19]. Auch beim Aspergillom steht eine Kolonisierung des Wirtes im Vordergrund, jedoch im sind Gegensatz zur ABPA kaum allergische Reaktionen zu beobachten. Das Aspergillom, das auf Grund seiner Erscheinung auch als "Pilzball" bezeichnet wird [20], ist die häufigste und bekannteste Form des Lungenbefalls durch *Aspergillus*. Es besteht aus Pilzmyzel, entzündlichen Zellen, Fibrin, Schleim und Gewebetrümmer, wobei die Entwicklung in der Regel in einem Hohlraum der Lunge stattfindet [21]. Eine Vorerkrankung durch Tuberkulose kann als der häufigste prädisponierende Faktor angesehen werden [21,22]. Dabei bildet sich der Ball in der präformierten Höhle, der Kaverne, aus.

1.4 Konidienoberfläche und Zellwand

Die wichtigste Aufgabe der Zellwand ist ihre Schutzfunktion als äußere Barriere, aber ihr wird auch die Vermittlung von pathogenen Eigenschaften zugeschrieben. So steht die Pilzzellwand in direktem Kontakt mit der Umgebung, wobei es Strukturen gibt, die wiederum als Ziele für das Immunsystem des Wirtes agieren [23]. Die wichtigsten Bestandteile der *A.fumigatus*-Zellwand sind Polysaccharide (mindestens 90 %) [24], die auf Grund ihres Löslichkeitverhaltens in heißen Basen in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Dabei besteht die lösliche Fraktion hauptsächlich aus α -(1,3)-Glukan mit einem geringen Anteil an Galaktomannan. Im Gegensatz dazu besteht die unlösliche Fraktion, die für die Rigidität der Zellwand verantwortlich ist, hauptsächlich aus β -(1,3)- und β -(1,6)-Glukanen. Diese Polysaccharide dienen der Verankerung anderer Polysaccharide, wie Chitin und Galaktomannan [25,26].

Während der Keimphase erfolgt ein kontinuierlicher Umbau der Zellwand [27]. In den ersten Phasen der Keimung (Aufblähung) verursacht die Hydrolyse der Polysaccharide das Weichmachen und Verdünnen der ursprünglichen Wand, der eine *de novo*-Synthese einer neuen Innenschicht folgt. Die wachsenden Hyphen haben nur eine einzige Zellwandschicht. Die Konidien von *A.fumigatus* mit ihrer Funktion als Dauer- und Verbreitungsform haben eine doppelschichtige Zellwand. Im Gegensatz zum Myzel sind Konidien von Hydrophobinen, sogenannten Rodlets, bedeckt. Dies bewahrt sie vor der Erkennung durch Immunzellen und macht die Konidien somit immunologisch inert [28]. Dabei enthält die äußere Zellwandschicht zwei Hydrophobine, RodA und RodB, die als wasserunlösliche Komplexe vorliegen [29]. Konidien einer Δ RodA-

Deletionsmutante bilden keine Rodlet-Schicht aus [30]. Die Deletion des *rodB*-Gens hat hingegen keinen Einfluss auf die Ausbildung der Rodlet-Schicht [29].

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Morphogenese des Pilzes und der Zellwandorganisation [31]. GPI-Anker sind konservierte Modifikationen in Eukaryoten, mit deren Hilfe viele Zelloberflächenproteine, wie Zelloberflächenenzyme, Rezeptoren und Adhesionsmoleküle, in der Zellmembran verankert sind [32]. In einer Arbeit von Cao et al. [33] wurden durch Zuhilfenahme des Tools "GPI-SVM+SignalP-Vote" 115 potentielle GPIverankerte Proteine für A.fumigatus vorhergesagt. Untersuchungen bei A.fumigatus legen nahe, dass mindestens neun GPI-verankerte Proteine orthologe Korrelate in Hefen besitzen [32]. In einer Arbeit von Li et al. konnte durch die Analyse von Mutanten gezeigt werden, dass eine komplette Blockierung der GPI-Anker-Synthese in A. fumigatus zu Zellwanddefekten, abnormalem Hyphenwachstum und schneller Konidienkeimung bei insgesamt abnormaler Konidiation führt. In vivo-Tests zeigten eine reduzierte Virulenz dieser Mutanten in Mäusen. Die GPI-Verankerung von Proteinen ist damit nicht notwendig für die Lebensfähigkeit von A.fumigatus, aber für Zellwandintegrität, Morphogenese und Virulenz [32].

1.5 Aspergillus-Abwehr

Die angeborene Immunität ("innate immunity") wird als die erste Verteidigungslinie betrachtet. Diese aktiviert ihrerseits aber auch erworbene Immunmechanismen ("adaptive immunity") mittels spezifischer Signale. Angeborene und erworbene Immunität sind deshalb eng miteinander verknüpft [34].

1.5.1 Angeborene Abwehrmechanismen

Mechanische Abwehr

Die Abwehr eingeatmeter Konidien beginnt mit Hilfe der physikalischen Barrieren der Atemwege. Dazu gehören die Nasenmuscheln und die Verzweigungsstruktur der Bronchien. Es kommt zu einem turbulenten Luftstrom, so dass sich die meisten Konidien auf der Atemwegs-Oberflächenflüssigkeit absetzen. Anschließend werden die Konidien durch die ziliare Wirkung des respiratorischen Epithels beseitigt. Ist diese mechanische Abwehr allerdings gestört, können die Konidien in tiefer gelegene Lungenabschnitte gelangen und finden sich dann jenseits der Bronchioli in den Alveolen wieder. Nun müssen komplexere Mechanismen der Eliminierung von *A.fumigatus* greifen. Diese beinhalten die antimikrobiellen Mechanismen der ansässigen Lungen-Leukozyten, wie Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen, Rekrutierung anderer Leukozyten und die Aktivierung der rekrutierten Leukozyten nach ihrer Ankunft am Ort der Infektion [12].

Makrophagen

Alveolarmakrophagen sind die primären phagozytierenden Zellen innerhalb der Atemwege und somit eine wichtige Abwehrkomponente. Allerdings können die Makrophagen nur kurz vor der Aussprossung (Germination) stehende, metabolisch aktive Konidien abtöten [35]. Dieser Zustand wird von den Konidien erst einige Stunden nach Inhalation erreicht, entweder in den terminalen Luftwegen oder noch später in den Phagosomen der Makrophagen. Aspergillus-Sporen werden in einer aktinabhängigen Weise phagozytiert, ein Mechanismus, der mit Hilfe der pathogenassoziierten Erkennungsrezeptoren (PRR; "pathogen recognition receptor") der Wirtszellen einhergeht [36]. PRR-Bindung von Aspergillus-Liganden erzeugt eine proinflammatorische Reaktion, die durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet ist. Der Toll-ähnliche Rezeptor 2 (TLR; "toll-like receptor"), TLR4 und der Dektin-1-Rezeptor sind die am besten charakterisierten PRRs bei der Erkennung von A.fumigatus und der Aktivierung der Wirtszellen [36]. In vitro-Studien haben ergeben, dass Konidien und Hyphen Makrophagen über TLR2 und TLR4 aktivieren, wobei TLR2 sowohl Konidien- als auch Hyphen-Stadien erkennt; TLR4 allerdings nur das Hyphenstadium [37]. Dektin-1 ist der spezifische Rezeptor für das β -(1,3)-Glukan der Pilzzellwand, welches sich allerdings normalerweise nicht auf der Oberfläche von ruhenden Konidien befindet. Aber nach Schwellung der Konidien und dem daraus resultierenden Verlust der hydrophoben proteinösen Zellwand wird β -(1,3)-Glukan nach oberflächlich exponiert [38]. An Glukan gebundenes Dektin-1, unter Mitwirkung der TLRs, aktiviert die Zellen des angeborenen Immunsystems zum Phagozytieren, eliminiert Konidien und löst proinflammatorische Reaktionen aus [36].

Phagozytose durch Makrophagen

Damit Konidien von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden können, wird nach Bindung an einen wie oben erwähnten Rezeptor zuerst die Bildung von Aktinabhängigen Membranerweiterungen und Plasmaausstülpungen um die Konidien erzeugt [39]. Sind die Konidien komplett umschlossen und damit internalisiert, spricht man von einem Phagosom. Dieses verschmilzt anschließend mit einem oder mehreren Lysosomen zum so genannten Phagolysosom [40]. Die Abtötung von *A.fumigatus*-Konidien durch Alveolarmakrophagen beginnt ca. sechs Stunden nach der Phagozytose. Dabei ist das Anschwellen der Konidien die Bedingung für ihre Tötung [41]. Zum Phagozytieren geschwollener Konidien sind außerdem reaktive Sauerstoff-Metabolite (ROI; "reactive oxidant intermediates") und die phagolysosome Ansäuerung Voraussetzung [41]. Nach dem Phagozytieren findet in den Makrophagen eine Reihe von Stoffwechselreaktionen statt, die mit einer massiven Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht. Dieser Prozess wird als respiratorische Entladung ("respiratory burst") bezeichnet [42].

Neutrophile Granulozyten

Als zweite Abwehrlinie gegen die *Aspergillus*-Infektion gelten neutrophile Granulozyten; sie nutzen auch verschiedene PRRs, einschließlich TLRs und Dektin-1, um *A.fumigatus* zu erkennen und auf den Pilz zu reagieren [36]. Wie Makrophagen sind Neutrophile erst dann in der Lage *Aspergillus*-Konidien abzutöten, wenn diese bereits metabolisch aktiv und im Auskeimen begriffen sind [35]. Neutrophile können ganze Pilzelemente auf Grund ihrer Größe nicht mehr phagozytieren. Sie nutzen deshalb neutrophile extrazelluläre Fallen (NET; "neutrophil extracellular traps"), um wachsende Hyphen zu zerstören. Diese setzen sich aus DNA-Fasern, die überzogen sind von Granulat und zytosolischen Proteinen, zusammen [43]. Der Pilz wird von den NETs eingefasst; diese verhindern dessen weitere Ausbreitung und helfen bei der Rekrutierung von Neutrophilen und anderen Immunzellen an den Ort der Infektion [44].

Natürliche Killer-Zellen

Die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) bilden zusammen mit den B- und T-Zellen die Gruppe der Lymphozyten. Auf Grund der fehlenden Antigen-spezifischen Rezeptoren gehören sie zur angeborenen Immunantwort und haben eine Lebensspanne von ungefähr zwei Wochen [45]. Im Gegensatz zu den klassischen B- und T-Zellen benötigen NK-Zellen keine klonale Vermehrung, bevor sie effektiv auf Antigene ansprechen können [34,46]. Die meisten NK-Zellen befinden sich in den vaskulären und interstitiellen Kompartimenten der Lungen und damit auch in unmittelbarer Nähe zu eingeatmeten Aspergillen [47]. Untersuchungen zur Interaktion zwischen NK-Zellen und *A.fumigatus* ergaben, dass NK-Zellen den Pilz direkt durch die Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) schädigen, wobei IFN- γ eine dosisabhängige fungizide Wirkung hat [48].

1.5.2 Erworbene Abwehrmechanismen

Entscheidend für die Abwehr von systemischen Pilzinfektionen sind die angeborenen Abwehrmechanismen in erster Linie durch Granulozyten und Makrophagen. Die Rolle der erworbenen Immunität beim Menschen ist unklar. Im Tierversuch ließ sich jedoch eine erworbene, schützende Immunität gegen systemische Pilzinfektionen erzeugen (zur Übersicht [49]). So entsteht erworbene Immunität im Tier gegen *A.fumigatus* sowohl nach einer überlebten Infektion mit dem Pilz, als auch durch eine Verimpfung von *A.fumigatus*-Kulturüberstand [50-52]. Wenn das Immunsystem nicht erfolgreich gegen die Konidien und die ersten Hyphenstadien angehen konnte, führte die andauernde Antigen-Präsentation und klonale Vermehrung von *Aspergillus*-antigenspezifischen T-Zell-Klonen in den darauffolgenden Tagen zur Ausbildung der erworbenen Immunität [12].

Hierbei erkennen die T-Zell-Rezeptoren auf der Th0–Zelle das von Makrophagen oder dendritischen Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHCII, "major histocompatibility complex") präsentierte Antigen (MHCII-Restriktion). Je nach Antigen kommt es in der Folge zu einer Differenzierung der Th0-Zelle in eine Th1-oder Th2-Zelle (zur Übersicht [10]). Th1-Zellen aktivieren (nach klonaler Proliferation) nun ihrerseits Makrophagen, welche dann in die Lage versetzt werden, *Aspergillus* effizienter abzutöten (zelluläre Immunität). Th2-Zellen führen zu einer klonalen Vermehrung spezifischer B-Zellen, die ihrerseits *Aspergillus*-Antigen-spezifische Antikörper freisetzen (humorale Immunität). Wie bei anderen Pilzen scheint die Produktion von Th1-Zytokinen schützend zu sein, dagegen die Th2-Reaktionen nicht [53].

Zelluläre Immunität

In vivo-Studien haben gezeigt, dass dendritische Zellen sowohl *Aspergillus*-Hyphen als auch Konidien internalisieren und sie von den Atemwegen zu den drainierenden Lymphknoten transportieren [54]. Phagozytose von Konidien induziert die Interleukin-12-(IL-12)-Produktion, während die Phagozytose von Hyphen IL-4 und IL-10 induziert. Nach der Phagozytose wandern die dendritischen Zellen der Lunge zu den drainierenden Lymphknoten und der Milz, durchlaufen eine funktionelle Reifung und stimulieren durch oben genannte Interleukine *naïve* CD4⁺-T-Zellen [11]. Diese vorbereiteten und differenzierten CD4⁺-T-Zellen kehren dann (nach klonaler Proliferation) zurück an den Ort der Infektion, wo sie ihre Zytokine TNF und IFN- γ abgeben, die wiederum die Eliminierung von Konidien und Hyphen durch Aktivierung von Makrophagen und Neutrophile stimulieren [55].

Neben MHCII-vermittelten Immunreaktionen kann auch eine MHCI-vermittelte Reaktion eintreten, wobei MHCI von den meisten menschlichen Zellen exprimiert werden kann und zusammen mit dem Antigen an den T-Zell-Rezeptor vom CD8⁺-Zellen bindet (MHCI-Restriktion). Zytotoxische T-Zellen werden aktiviert. Bei der *Aspergillus*-Abwehr gibt es bis jetzt nur wenige Hinweise für eine MHCI-vermittelte Immunaktivierung. Sun et al. konnten jedoch durch immunologische Untersuchungen zeigen, dass verschiedene eingesetzte Impfpeptide eine wirksame zytotoxische T-Zell-Antwort in CD8⁺-Zellen induzieren konnten und so eine Beschädigung von Konidien und Hyphen bewirkten [56].

Daneben existieren offensichtlich andere T-Zell-Linien, die die Immunantwort auf *A.fumigatus* beeinflussen [55]. Th17-Zellen sind eine Untergruppe der CD4⁺-T-Zellen und unterscheiden sich von Th1- und Th2-Zellen. Sie werden während einer Immunantwort zu einem frühen Zeitpunkt gefunden und sind sowohl bei Th1- als auch Th2-Typ-Antworten beteiligt [53]. Neuere Untersuchungen konnten den Th17-Zellen eine mögliche Rolle bei der immunologischen Abwehr des Hyphenwachstums zuschreiben [57].

Bereits im Jahr 1976 wurde nachgewiesen, dass sich eine protektive Immunreaktion gegen Infektionen mit A.fumigatus ausbilden kann. In Mäusen, die nur einmal mit Konidien, bei gleichzeitiger Gabe von Cortison, infiziert wurden, ließ sich eine systemische Infektion mit Beteiligung von Nieren, Leber und Herz beobachten. Wurden den Mäusen hingegen Konidien intravenös (i.v.) in subletaler Dosis verabreicht, konnte nach überstandener Infektion nach einer späteren zweiten Gabe von Konidien und gleichzeitiger Gabe von Cortison lediglich ein lokalisiertes Wachstum des Pilzes in den Nieren beobachten werden. [50]. Etwa zur gleichen Zeit konnten Corbel und Eades zeigen, dass ältere Mäuse eine deutlich höhere Resistenz gegenüber A.fumigatus-Infektionen aufweisen als junge Mäuse des gleichen Stamms [51]. Auch hier müssen mit dem Alter erworbene Immunmechanismen eine Rolle spielen. Da die Aussichten einen wirksamen Impfstoff zu entwickeln dann besonders hoch sind, wenn bereits eine natürliche Infektion eine protektive Immunreaktion induziert, führten die Ergebnisse dieser beiden Versuche zu mehreren Impfstoff-Studien und eingehenderen immunologischen Untersuchungen [58]. Im Jahr 1993 erbrachte eine subletale i.v. induzierte Infektion eine Immunität in Mäusen, die nicht durch Serum übertragbar war, jedoch durch Makrophagen. Dies wurde durch den Transfer einer Milzzellfraktion von einem immunen auf ein naïves Tier erreicht [59]. Die Rolle der zellulären Immunität konnte durch ein weiteres Experiment belegt werden, bei dem, nach einer im Vorfeld durchgeführten nasalen Impfung, entweder mit A.fumigatus-Konidien oder aufbereitetem Kulturfiltrat, Schutz induziert werden konnte. Die aus diesen Mäusen gewonnenen CD4+-T-Zellen wurden auf naïve Mäuse übertragen, welche daraufhin ebenfalls als geschützt imponierten [52]. Ito et al. erzeugten eine Corticosteroidunabhängige Immunität in Mäusen, indem sie den Mäusen vor der abschließenden nasalen Infektion mit Aspergillus-Konidien zuvor schon einmal Konidien als Impfung verabreichten. Der größte Erfolg stellte sich dabei ein, wenn die Hyphenmasse zuvor Ultraschall-behandelt wurde und die Impfung subkutan statt intranasal erfolgte [60]. Im Jahr 2002 veröffentlichten Bozza et al. die erste Impfstudie, in deren Verlauf Mäuse ein definiertes Impf-Antigen von A.fumigatus erhielten. Dadurch konnte eine protektive Immunantwort werden. gegen IA induziert Als Antigen wurde Aspf16 (AFUA_1G16190, auch als Aspf9 oder Crf1 beschrieben) verwendet (s. unten) [61]. Im Jahr 2009 untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe eine Vielzahl von rekombinanten *A.fumigatus*-Proteinen auf ihre Fähigkeit *in vitro* T-Zellen zu aktivieren, welche anschließend auf Knochenmark-transplantierte Mäuse übertragen wurden. Bei einer nachfolgenden Infektion imponierten diese Mäuse zum Teil als geschützt (s. unten) [62].

Bislang konnte eine protektive Immunantwort nur mit vier verschiedenen *A.fumigatus* Einzel-Antigenen erfolgreich erzeugt werden [58]. So gelang bis jetzt eine Immunisierung mit Aspf3 (AFUA_6G02280; auch als AHP1 beschrieben), Aspf16, Gel1 (AFUA_2G01170) und Pep2 (AFUA_3G11400) [61-63]. Von diesen vier Antigenen wurde insbesondere das Aspf3 bereits mehrfach auf seine Potenz zur Etablierung einer protektiven Immunreaktion getestet [63-65]. Sequenzanalysen legen nahe, dass Aspf3 eine Peroxireduktase ist. Es wurde auf der Konidienoberfläche gefunden und wird ebenso im Hyphenstadium exprimiert [15].

1.7 Screening-Methoden für die Suche nach schützenden Antigenen

Trotz Fortschritten in der antimykotischen Therapie bleibt die IA eine lebensbedrohliche Erkrankung für immunsupprimierte Patienten. Daher würden alternative prophylaktische oder therapeutische Optionen von großem Nutzen sein. Insbesondere die Entwicklung eines Impfstoffes wäre ein alternativer Ansatz. Der erste Schritt hierfür ist die Identifikation schutz-vermittelnder Antigene. Gegen Infektionen, die durch *A.fumigatus* verursacht werden, kann eine erworbene schützende Immunantwort im Tiermodell induziert werden (s. 1.6).

In einer Arbeit von Denikus et al. [66] wurden systematische Versuche unternommen, mögliche Impfstoffkandidaten zu identifizieren. Zehn Kaninchen wurden i.v. mit *A.fumigatus*-Konidien in subletalen Dosen infiziert. Einige von ihnen entwickelten eine schützende Immunantwort gegen weitere systemische Infektionen. Blut der Kaninchen wurde vor Beginn der Versuche entnommen und währenddessen. Anschließend wurde eine cDNA-Expressionsbank auf der Basis von jungen keimenden Konidien mit den rekonvaleszenten Seren der Tiere untersucht. Da die allermeisten Proteine sowohl T- als auch B-Zell-Epitope tragen, bestand die Hoffnung, durch dieses "Antikörper-Screening" (auf B-Zell-Epitope) auch protektive Antigene zu identifizieren [67], wenngleich die eigentliche protektive Reaktion wahrscheinlich auf T-Zell-Epitope zurückzuführen ist [62]. Insgesamt wurden 36 Proteine mit Hilfe dieser Methode identifiziert. Unter ihnen waren die Allergene Aspf16 und Aspf3, für die schutzvermittelnde Eigenschaften gegen eine IA kurz vorher bzw. etwas später von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnten (s. oben) [61,63].

Dieselbe Arbeitsgruppe verwendete die Kaninchenseren für ein 2D-Western Blot-Screening auf Basis von Proteinextrakten aus keimenden *A.fumigatus*-Konidien [2]. Reagierende Spots wurden mit Massenspektrometrie analysiert, dabei konnte eine Liste von 59 verschiedenen Proteinen erstellt werden. Unter diesen Proteinen fand sich wiederum das Allergen Aspf3, jedoch zusätzlich eine 1,3-Glucanosyltransferase (Gel1). Rekombinantes Gel1 wurde als Impfstoff in Mäusen kurz vorher getestet und erbrachte dabei eine schutzvermittelnde Immunreaktion (s. oben) [62].

Basierend auf der Annahme, dass das Immunsystem zuerst in Kontakt mit Oberflächenantigenen, insbesondere *A.fumigatus*-Konidien, kommt, wurden in einer Arbeit von Asif et al. Konidienoberflächenproteine extrahiert [15]. Insgesamt wurden 26 verschiedene Proteine identifiziert. Unter ihnen war auch die Protease Pep2, welche später auch als Protektions-vermittelnd identifiziert wurde [62]. Auch wurde ein weiteres Mal das Aspf3 unter den identifizierten Proteinen gefunden [15]. Bisher konnte eine protektive Immunantwort nur mit vier verschiedenen *A.fumigatus*-Antigenen erfolgreich durchgeführt werden (s. 1.6).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

A.fumigatus-Konidien werden von jedem Menschen eingeatmet. Ihre Konzentration ist mit 1-100 Konidien pro Kubikmeter sowohl in Innenräumen als auch im Freien variabel, aber zum Teil hoch [10]. Bei immunkompetenten Menschen verursachen diese eingeatmeten Konidien normalerweise keine invasiven Erkrankungen. Sie werden effizient von den Abwehrmechanismen innerhalb der Lunge eliminiert [11]. Bei immunsupprimierten Patienten werden die eingeatmeten *Aspergillus*-Konidien nicht oder nur unzureichend phagozytiert und es kann sich eine IA manifestieren. Dabei ist *A.fumigatus* der häufigste Erreger solch invasiver, meist tödlich verlaufender Schimmelpilzmykosen bei Leukämiepatienten. Nach einer subletalen Infektion mit dem Pilz lässt sich im Tierversuch eine protektive Immunreaktion gegenüber einer folgenden, an sich letalen Infektion nachweisen [66,68]. Es wird daher davon ausgegangen, dass Aspergillen während der Infektion Antigene exprimieren, die eine solche schützende Immunantwort induzieren. Die Identifizierung dieser Antigene könnte die Basis für die Entwicklung eines Impfstoffes sein. Zur Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Proteinen standen entsprechende Kandidaten aus Vorarbeiten zur Verfügung bzw. sollten selbst hergestellt werden.

In einer Arbeit von Asif et al. [15] wurden verschiedene Konidienoberflächenproteine identifiziert. Da die Konidienoberfläche den ersten Kontakt mit dem Wirtsorganismus vermittelt, stellen diese Antigene sowohl vielversprechende Impfstoffkandidaten als auch mögliche Virulenzfaktoren dar. Durch die Generation korrespondierender Knockout- und Komplementmutanten mit anschließender Testung im Tierversuch sollte hier eine Überprüfung erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Angabe von Modell und Hersteller

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegel-	Flachgel-Elektrophorese-	Keutz Labortechnik,
Elektrophoresekammer	kammer "Mini"	Reiskirchen
Destillierapparat	Destamat [®]	Heraeus Quarzglas,
		Kleinostheim
Digitaler Graphikdrucker	UP-D890	Biometra, Göttingen
Elektroporationsapparatur	Electro Cell Manipulator [®]	BTX Instrument Division,
	600	Holliston, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiostar plus	ZEISS, Göttingen
Gasbrenner	Gasprofi 1	WLD-TEC, Göttingen
Geldokumentationsstation	BioDoc II TM	Biometra, Göttingen
Geltrocknungsapparatur	DryEase TM Mini-Gel	Novel Experimental
	Drying System	Technology,San
		Diego,USA
Glaswaren, diverse		SCHOTT AG, Mainz
Hochdruckhomogenisator	EmulsiFlex-C5	AVESTIN, Inc.,
		Ontario, Kanada
Hoefer-Kammer zum	Multiple Gel Caster SE200	Hoefer Inc., Holliston,
Gießen von SDS-Gelen	Serie	USA
Homogenisatorgefäß mit	Volumen 5 ml	Sartorius, Göttingen
Glaskolben		
Inkubator	MIR-153	SANYO, Wiesloch
Kompakt-Kältethermostat	RM 6	Lauda, Lauda-Königshofen
Kreisschüttler	KS 260 basic	IKA [®] -Werke GmbH & Co.
		KG, Staufen
Leuchttisch	Typ 101 391	Waldmann, Villingen-
		Schwenningen
Lumineszenz Image	LAS 4000	Fujifilm, Düsseldorf
Reader		
Magnetrührer	RCT basic IKAMAG [®]	IKA [®] -Werke GmbH & Co.
		KG, Staufen
Magnetrührer	REO IKAMAG®	IKA [®] -Werke GmbH & Co.
		KG, Staufen
Mikrowelle	Micromat 5.8	AEG, Frankfurt
Mikroskop	Axoskop 50	ZEISS, Göttingen
NanoDrop	ND-1000	Thermo Scientific,
		Waltham, USA
pH-Meter	MP 225	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	Ultrospec 1000	Biometra, Göttingen

Gerät	Modell	Hersteller
Pipette	Pipetman P5000	GILSON, Middleton, USA
Pipetten	Research 2,5/10/20/100/200/1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-jet	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG , Schwabach
Röntgenfilmkassette	IEC 60406	rego Gollwitzer GmbH & Co. KG, Augsburg
Schüttelwasserbad	GFL-1012	GFL Gesselschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttler mit Inkubationshaube	SM 30 und TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler im Wärmeraum	HAT Tischschüttler	Infors GmbH. Einsbach
SDS-PAGE-System		Hoeffer, Holliston, USA
Sicherheitswerkbank	HERA Safe 09/2	Heraeus GmbH. Hanau
Spannungsgerät	Biometra Standard Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Spannungsgerät	Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Stab-Ultraschallgerät	Branson Sonifer 250	G.HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Überkopfdreher	Test-tube-rotator 34528	Snijders, Tilburg, Niederlande
UV/Weißlicht- Transilluminator	TFP-L/WL, 365 nm	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vakuumofen mit Pumpe	RUT 220	Heraeus GmbH, Hanau
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortexer	RFAX 1DR	Heidolph, Schwabach
Waage	SBC33	Scaltec, Heiligenstadt
Waage	SBC52	Scaltec, Heiligenstadt
Wasserbad	GFL-1083	GFL Gesselschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Western Blot-Kammer	TE Series Transphor Electrophoresis Unit	Hoeffer, Holliston, USA
Zählkammer	Thoma 0,100 mm Tiefe	Assistent, Sondheim / Rhön
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Beckman Avanti J25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus GmbH, Hanau

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge	Universal 30RF	A.Hettrich GmbH&CoKG, Tuttlingen
Zentrifuge	Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik, Wehingen

2.1.2 Verwendete Software und Internet-Tools

Die Software SimVector 3 (Premier Biosoft International, Palo Alto, USA) wurde für die Erstellung der Vektor-Karten verwendet. Die Berechnung der Signifikanz-Werte (Log-rank-Test) wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) vorgenommen.

Zum Übersetzen von DNA in Aminosäure-Sequenzen wurde das Internet-Tool http://web.expasy.org/translate genutzt. Zum Berechnen der molekularen Proteinmasse wurde der "Protein Molecular Weight Calculator" der Internetseite von Science Gateway, http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm, verwendet.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab.	2: Auflistung	der verwendeten	Verbrauchsmaterialien	
Tab.	2: Auflistung	der verwendeten	Verbrauchsmaterialien	

	Beschreibung	Hersteller
Deckgläser	18x18 mm Nr.1	Gerhard Menzel GmbH,
		Braunschweig
Einmal-Küvetten	1,5 ml PS	Brand GmbH, Wertheim
Entsorgungsbeutel	300x200 mm	Labor-Brand, Gießen
Einmal-Injektions-Kanüle	100 Sterican, Gr. 1, gelb, Ø	B. Braun, Melsungen
	0.90mm x 40mm, G20x1 ¹ / ₂	
Einmal-Injektions-Kanüle	BD Microlance TM , 3 rosa,	BD, Heidelberg
	1,2 mm x 40mm, G18x1 ¹ ⁄ ₂	
Einweg-Impfschlinge	1 µl, 10µl	Sarstedt, Nürmbrecht
Elektroporationsküvette	1 mm	peqlab Biotechnologie
		GmbH, Erlangen
Filtrierpapier	Type 713, 58x58 cm	Machery-Nagel, Düren
Flächendesinfektionsmittel	Biguacid Liquid	Antiseptica chem. pharm.
		Produkte GmbH, Pulheim
Gewebekulturschale	35,0/10 mm,	Greiner bio-one GmbH,
		Frickenhausen
His GraviTrap		GE Healthcare Europe
		GmbH, Freiburg

	Beschreibung	Hersteller
Kryoröhrchen	Microbank TM	Pro-Lab, Richmond,
		Kanada
Labortücher	Kimtech Science	Kimberly-Clark, Mainz
Mikro-Schraubröhre	1,5ml, 2 ml	Sarstedt, Nürmbrecht
Nitrilhandschuhe	Nitril NextGen	Rösner-Mautby Meditrade
		GmbH, Kiefersfelden
Nitrozellulosemembran	Optitran BA-S 83	Schleicher&Schuell,
		Dassel
Objektträger	Menzel-Gläser,	Gerhard Menzel GmbH,
	Superfrost [®]	Braunschweig
Parafilm [®]	"М"	Pechiney Plastic Packaging
		Company, Chicago, USA
Pasteurpipetten	230 mm	WU Mainz, Bamberg
PCR-Reaktionsgefäß	0,2 ml, Flachdeckel	Biozym Scientific GmbH,
		Hess. Oldendorf
PD10-Säule	Desalting Column	GE Healthcare Europe
		GmbH, Freiburg
Petrischale	94/16 mm, 145/20 mm	Greiner bio-one GmbH,
		Frickenhausen
Pipettenspitzen	$20 \ \mu\text{l}, 200 \ \mu\text{l}, 1000 \ \mu\text{l}$	Sarstedt, Nürnbrecht
Polyacrylamid-Gel	NuPAGE [®] Novex [®] 4-12%	Invitrogen, Life
	Bis-Tris Protein Gel	Technologies GmbH,
	0.5.1	Darmstadt
Reaktionsgefaß	0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefaß	1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nurmbrecht
Rontgenfilm	Kodak BioMax [°] light film	Eastman Kodak Company,
	size $13 \text{ cm} \times 18 \text{ cm}$	Rochester, USA
Schutzhandschuhe	Diamond Grip Plus	Microflex Corporation,
<u>Clashalla</u>	Dahlhausan nyöziss	Reno, USA
Skalpene	Daninausen prazisa	P.J. Daninausen & Co.
Spritzo	PD Discordit TM II 2 ml	D Heidelberg
Spritze	BD Discardit II, 2 III	BD, Heidelberg
Spritzenfilter	BD Plastipak 1 III	DD, Heidelberg
Thermonanier	K65HM Pollo	Mitsubishi HiTaa Papar
Thermopapier	K05HW-K0He	GmbH Bielefeld
Vakuumfiltrationseinheit	500 ml Bottle ton Filter	Corning Corning USA
als Flaschenaussatz	45 mm Neck 0.22 µm PFS	Coming, Coming, OSA
(Bottle-Top-Filter)	45 mm Week, 0,22 μm τ L5	
Vakuumfiltrationseinheit	500 ml Bottle ton Filter	Corning Corning USA
als Flaschenaussatz	45 mm Neck 0.45 µm CA	coming, coming, corr
(Bottle-Top-Filter)		
Vivaspin	2. 5000 MWCO PES:	sartorius stedim Biotech
· - · •••P	20, 5000 MWCO PES	GmbH, Göttingrn
Whatman-Papier	GB005, 580x580 mm	Whatman GmbH. Dassel
Zellkulturröhrchen	CELLSTAR [®] 12 ml.	Greiner bio-one GmbH.
	,	Frickenhausen

	Beschreibung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen	Cellstar [®] Tubes, 15 ml	Greiner bio-one GmbH,
		Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	50 ml	Sarstedt, Nürmbrecht

2.1.4 Kommerzielle Kits

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
GeneArt [®] Seamless Cloning and	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Assembly Kit	
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Chemikalien

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose peqGOLD	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumtartrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments	Roche, Mannheim
Antifoam 204	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacto TM -Agar	BD (Becton, Dickinson and Company),
	Heidelberg
Bacto TM -Hefeextrakt	BD (Becton, Dickinson and Company),
	Heidelberg
Bacto TM -Hefestickstoff-Basismedium	BD (Becton, Dickinson and Company),
	Heidelberg
Bacto TM -Trypton	BD (Becton, Dickinson and Company),
	Heidelberg
Blankophor-P, flüssig	Bayer AG, Leverkusen
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serum Albumin (BSA) für	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsverdau	
Bromphenolblau	Pharmacia, Uppsala, Schweden
1-Butanol	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie [®] Brillant Blue R250	Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
Cortisonacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cotrim K- ratiopharm [®] 240mg/5ml Saft	ratiopharm GmbH, Ulm
Diethanolamin	Merck KGaA, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Digoxigenin-11-UTP-Nukleotide	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DNA Probenpuffer 6x (Loading Dye)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
ECL TM Western Blotting Analysis System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Entwickler GBX	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid - Lösung 0,07 % "dropper-bottle"	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Paesel + Lorei GmbH & Co., Duisburg
Ficoll [®] Typ 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fixierer GBX	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Fleischextrakt (trocken)	Merck KGaA, Darmstadt
Formamid	Merck KGaA, Darmstadt
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glykogen	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Guanidine-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Heringsperma-DNA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
8-Hydroxychinolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hygromycin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf
Magermilchpulver (Sucofin)	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MOPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Natriumdihydrogenphosphat

Bezeichnung	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumnitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nucleotide (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer	Invitrogen, Life Technologies GmbH,
(20X)	Darmstadt
NuPAGE [®] Sample Buffer (4X)	Invitrogen, Life Technologies GmbH,
	Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Overnight Express TM Instant TB medium	Merck KGaA, Darmstadt
PCR Nukleotide (dNTP Mix)	Roche, Mannheim
Pepton aus Fleisch	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease-Inhibitortabletten, cOmplete,	Roche, Mannheim
Mini, EDTA-free	
Proteinase K	Roche, Mannheim
Pyrithiamin hydrobromide	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Roche, Mannheim
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Sorbit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Stickstoff, flüssig	AIR LIQUIDE Medical GmbH,
	Düsseldorf
Temed	Merck KGaA, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TiterMax [®] Classic	TiterMax, Norcross, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Cl	Paesel + Lorei GmbH & Co., Duisburg
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween80	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme

 Tab. 5: Verwendete Enzyme (die entsprechend benötigten Puffer wurden von demselben Hersteller bezogen wie die Enzyme)

Bezeichnung	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Glucanex®	Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark
PfuUltra DNA Polymerase AD	Agilent Technologies, Böblingen
Phusion Flash II DNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt

Bezeichnung	Hersteller
RNase Typ XII	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Tab. 6: Verwendete Molekulargewichtsmarker

Bezeichnung	Hersteller
BenchMark TM	Invitrogen, Life Technologies GmbH,
	Darmstadt
DNA molecular-weight marker II	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
digoxigenin-labeled	
GeneRuler TM 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
MassRuler TM DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Prestained SDS-PAGE Standards Low	Bio-Rad, Hercules, USA
Range	

2.1.8 Oligonukleotide

Tab.7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen: gestrichelter Unterstrich- *Sfi*I-Schnittstellen; durchgezogener Unterstrichunterschiedliche Schnittstellen

Name des Primers	Sequenz 5'- 3'
Primer zur Erstellung	von Deletionsplasmiden
HP16-1	TATAT <u>GCGGCCGC</u> TGGTGTAAGTCCATTTTCAAAGC
HP16-2	ATATTACCCGGGGGCCTGAGTGGCCTCATATGAGGACAACAAT
	TCAACG
HP16-3	GAGTAGCCAGGCATGATTGC
HP16-4	CATCCTCAGGGACAGAGACC
HP16-5	ATATTA <u>GAATTCGGCCATCTAGGCCAG</u> TACTAAGCAGGACGCT
	CAACAG
HP16-6	TATCG <u>TTAATTAA</u> CCCTCAGTTACTAGACCCGAAAG
HP16-7	TCTCGTTCCAGCTTGATTGC
HP16-8	AGTTCGCAGGAAGAGAGACG
Primer zur Erstellung	von Plasmiden zur Herstellung der Komplementmutanten
sv831 (HP16)	AATTCGAGCTCGGTACGTTAACTTGGTGTAAGTCCATTTTCAA
	AG
sv832 (HP16)	ATCCCGTAATCAATTAGAATACAAGACTGTGCGTATG
sv833 (HP16)	AACAAAGATGCAAGATTAATAAGCACTTTTCCTTGACATG
sv834 (HP16)	GCCAAGCTTGCATGCC <u>GTTAAC</u> CAAGAGAAGAATACCCTACAA
	сс
sv197 (HP16)	AATTGATTACGGGATCCCATTGG
sv198 (HP16)	CATATTATGTTTGTTTCTACGTTCT

Name des Primers	Sequenz 5'- 3'
Asp3-nested_1	GTGCTATGGGCAAGATTCGT
Asp3-nested_2	GCTCTGACCGGTTGTTGATT
Asp3-nested_3	GAATCAAGGGAGGCATGAAA
Asp3-nested_4	GAGTGCCGGGATACCACTAA
Asp3-nested_5	CTCACAAAGGTGCTCGGTTT
Asp3-nested_6	CCCATACTGGCGACGATACT
Aspf3-Rekom_1	ATTCGAGCTCGGTAC <u>GTTAAC</u> CCACGAGGGAATGGTGTGCTCG
Aspf3-Rekom_2	TCGTTACCAATGGGAGACATCATACGGTTTGATAGGGCG
Aspf3-Rekom_3	TCCCATTGGTAACGAAATGTAAAAGC
Aspf3-Rekom_4	TCTTGCATCTTTGTTTGTATTATAC
Aspf3-Rekom_5	AACAAAGATGCAAGAAGGTAGGAACTACGTCTTAAGTAC
Aspf3-Rekom_6	CCAAGCTTGCATGCC <u>GTTAAC</u> AGCCTGCTGTTCGGCATCACTC
Primer zur Herstellung	rekombinanter Proteine
Afu1g13670_23_	AACTG <u>GGATCC</u> CGTCAGGGTGCAGCAGCATTTGTTA
BamHI	
Afu1g13670_218_	ACTG <u>AAGCTT</u> TTAATTGCTTGCTTTTTTTTCCGGTGCGGC
HindIII	
Afu1g13670_182_	ACTG <u>AAGCTT</u> TTAGCTATTCTGAACTTCTTGACCCTGATGG
HindIII	
HP16_rekom_1	CTCGCGCTGGCGCCTACCGC
HP16_rekom_2	TCACCGGAAACCGAGCACCT
HP16_rekom_3	AAATTT <u>GCATGC</u> GCCTTCGTCACAGTGAACTCG
HP16_rekom_4	ATAATA <u>GTCGAC</u> TCAGCGAGCCTCCTGCTTAGG
Primer für Kolonie-PC	R bei der Herstellung rekombinanter Proteine
HP16-Kolonie-PCR_1	GGGTGAGCAAAAACAGGAAG
HP16-Kolonie-PCR_2	AGACCTTGAGAGCCTTGCAG
Primer zur Herstellung	einer DIG-markierten Sonde
Phle-Pro1	TGCTTTGCCCGGTGTATGAAACC
Phle-Pro2	AAGGGATGGGAAGGATGGAGTATGG
Phle-Pro3	TCTGTAGGGCGTCCAAATATCGTGC
Phle-Pro4	CATGGTGATGTCTGCTCAAGCGG
RekomHP16_Sonde1	GATCCCATTGGTAACGAAATGT
RekomHP16_Sonde2	ACGCCAAAGACGTTACCTAAGA
RekomHP16_Sonde3	GCCGATGTCAGGATGATTTC
RekomHP16_Sonde4	TTGTGAGAGTCCAGCCAAAA
Kontrollprimer der Del	etionsmutanten
Primer HP16_screen_1	TACGGGCATTGTATCTCCAG
Primer HP16_screen_2	GTTTCATACACCGGGCAAAG
Primer HP16_screen_3	CTCCGTAACACCCAATACGC
Primer HP16_screen_4	CAATGCGATGCTGTCAGAGT
Kontrollprimer der Ko	mplementmutanten
HP16_ReplacTrafo_1	CAGATATCGCCTGATGACGA
HP16_ReplacTrafo_2	GTTCTTGGGAGGATGCAAAA
HP16_ReplacTrafo_3	TGGCTGTGTCCCGTATGTAA
HP16_ReplacTrafo_4	ATCAATTTGGCCTTCGTCAC
Aspf3_ReplacTrafo_3	GACAGGTGGCAATGACACAA
Aspf3_ReplacTrafo_4	GTGGGGTGATTTATTATGGAAC

Name des Primers	Sequenz 5'- 3'
Aspf3_ReplacTrafo_5	ATGGCTGTGTCCCGTATGTAA
Aspf3_ReplacTrafo_6	CCAAGCTTGCATGCCGTTA

2.1.9 Antikörper

Tab. 8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments	Roche, Mannheim

2.1.10 Organismen und Stämme

Tab. 9: Verwendete Organismen und Stämme

Aspergillus fumigatus			
D141	Wildtyp/ Klinisches Isolat		
D141 delAspf3-5	Herstellung durch Utz Reichard		
D141 delAspf3-5 komplementiert	eigene Herstellung		
D141 delHP16-8	eigene Herstellung		
D141 delHP16-8 komplementiert	eigene Herstellung		
Escherichia coli			
α-Select	Bioline GmbH, Luckenwalde		
BL21-CodonPlus [®] (DE3)-R L	Stratagene, La Jolla, USA		
BL21(DE3)	Agilent Technologies, Böblingen		
DH5a	Invitrogen GmbH, Karlsruhe		
SURE	Stratagene, La Jolla, USA		
Top10	Invitrogen GmbH, Karlsruhe		
E. coli mit Expressionsplasmiden	Herstellung durch Martin Rosenow und		
	eigene Herstellung		
Versuchstiere			
BALB/cOlaHsd (Inzuchtmäuse)	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande		
HsdWin:NMRI (Auszuchtmäuse)	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande		

2.1.11 Plasmide und Proteinexpressionsplasmide

 Tab. 10: Plasmide zur Herstellung von Deletions- und Komplementmutanten sowie Plasmide zur

 Proteinexpression

Name	Beschreibung/ relevante	Hersteller		
	Merkmale			
Herstellung von Deletions- und Komplementmutanten				
pAN7-1	A.nidulans-Promotor ^p gpdA	P. J. Punt [69]		

Name	Beschreibung/ relevante	Hersteller
	Merkmale	
pBlueskript II SK+ PacI	pBluescript SK+ mit zusätzlicher PacI- Schnittstelle zu Beginn der Multiple Cloning Site	Utz Reichard
pAspf3-del komplementiert	Plasmid zur Herstellung der Komplementmutante: Aspf3-Gen nebst den C- und N-terminal flankierenden Bereichen, ptrA ^R , pptrA, tptrA	eigene Herstellung
pHP16-del	Plasmid zur Herstellung der Deletionsmutante HP16: C- und N-terminal flankierende Bereiche des Gens, loxP, pgpdA, hph ^R , HSV1 TK, ttrpC, amp ^R	eigene Herstellung
pHP16-del komplementiert	Plasmid zur Herstellung der Komplementmutante: HP16-Gen nebst den C- und N-terminal flankierenden Bereichen, ptrA ^R , pptrA, tptrA	eigene Herstellung
pSK275	Insert für Komplementierungsplasmid, ptrA ^R	Sven Krappmann (Erlangen)
pSK397	Insert für Deletionsplasmide <i>Sfi</i> I, loxP, pgpdA, hph ^R , amp ^R , HSV1 TK, ttrpC	Sven Krappmann (Erlangen)
pUC19L	linearisierter pUC19-Vektor zur Herstellung der Komplemen- tierungsplasmide, Amp ^R , 2659 bp	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Herstellung von Proteinexpres	sionsplasmiden	
pET28aHT_Afu1g13670_ 23-182	HP16 (AS 23-182) in pET28a- Derivat kloniert, 6x His-tag, TEV site, Kan ^R	zusammen mit Vera Pähtz (HKI, Jena)
pET28aHT_Afu1g13670_ 23-218	HP16 (AS 23-218) in pET28a- Derivat kloniert, 6x His-tag, TEV site, Kan ^R	zusammen mit Vera Pähtz (HKI, Jena)
pET-BL874	Aspf3 (AHP1)- vollständig rekombinant in pET-Vektor (His- tag)	Michel Monod (Lausanne, Schweiz)
pET-BL875	HSP90-C-Terminus rekombinant in pET-Vektor (His-tag)	Michel Monod (Lausanne, Schweiz)
pET-BL876	Enolase (Aspf22)- vollständig rekombinant in pET-Vektor (His- tag)	Michel Monod (Lausanne, Schweiz)
pMA-T_Afu1g13670_23-218	Synthetisches Gen HP16 in pMA-T-Derivat, Amp ^R	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.12 Rekombinante Proteine

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Proteine wurden, wenn nicht selbst produziert, von Martin Rosenow (Göttingen) hergestellt. Alle Proteine sollten in dieser Arbeit als Vakzine im Mausmodell auf ihre Protektion geprüft werden.

Tab. 11: Rekombinante Proteine aus *E.coli*. Wurden zwei Proteine mit dem gleichen Namen, aber zwei verschiedenen Aminosäure (AS)-Bereichen angegeben, wurde das Protein in zwei Fragmenten exprimiert

Abkürzung	Name	Accession	Hersteller
		Nummer	
AAT	Aspartat-Aminotransferase (AS 69-261)	AFUA_4G10410	M.Rosenow
ADH	Alkohol-Dehydrogenase (AS 29-200)	AFUA_5G06240	M.Rosenow
ADMA	Metalloprotease ADM-A (AS 116- 435)	AFUA_6G14420	M.Rosenow
ALAD	Aldolase ClassII/ Adducin-Domain- Protein (AS8-294)	AFUA_3G09800	M.Rosenow
AP	Aminopeptidase (AS 285-609)	AFUA_4G09030	M.Rosenow
AP5/6	Aminopeptidase (AS 661-849)	AFUA_4G09030	M.Rosenow
Aspf3	Peroxireduktase, vollständig rekombinant (s. Plasmide; 2.1.11)	AFUA_6G02280	eigene Herstellung
BGT	1,3-beta-Glucanosyltransferase Gel1 (AS 25-188)	AFUA_2G01170	M.Rosenow
BGT3/4	1,3-beta-Glucanosyltransferase Gel1 (AS 219-398)	AFUA_2G01170	M.Rosenow
СОА	Coatomer, Delta-Untereinheit (AS 86-406)	AFUA_1G15860	M.Rosenow
DI	Disulfid-Isomerase Pdi1 (AS 26-220)	AFUA_2G06150	M.Rosenow
DI3/4	Disulfid-Isomerase Pdi1 (AS 255-424)	AFUA_2G06150	M.Rosenow
Enolase	Enolase, vollständig rekombinant (s. Plasmide; 2.1.11)	AFUA_6G06770	eigene Herstellung
FBA	Fructosebisphosphataldolase, classII (AS 251-420)	AFUA_3G11690	M.Rosenow
GAPD	Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (AS 63-240)	AFUA_5G01970	M.Rosenow
HP10	Konserviertes hypothetisches Protein (AS 578-742)	AFUA_6G07410	M.Rosenow
HP90	Konserviertes hypothetisches Protein (AS 2-95)	AFUA_1G02290	M.Rosenow
HSP30	Hitzeschockprotein Hsp30 (AS 4-519)	AFUA_3G14540	M.Rosenow
HSP90	Hitzeschockprotein Hsp90, C-terminal (s. Plasmide; 2.1.11)	AFUA_5G04170	eigene Herstellung
HSP70	Hitzeschockprotein Hsp70 (AS 212-533)	AFUA_1G12610	M.Rosenow
Abkürzung	Name	Accession	Hersteller
-----------	--	--------------	------------
		Nummer	
INVO3/4	Involucrin-Repeat-Protein (AS 650- 887)	AFUA_4G11410	M.Rosenow
MIPS	Myo-Inositol-Phosphat-Synthase (AS 4-210)	AFUA_2G01010	M.Rosenow
MPRO5/6	M-Repeatprotein (AS 818-1137)	AFUA_6G08660	M.Rosenow
NDGD	NAD+-abhängigen Glutamat-	AFUA_2G06000	M.Rosenow
	Dehydrogenase (AS 413-699)		
PG	Phosphoglucomutase PgmA	AFUA_3G11830	M.Rosenow
	(AS 49-369)		
PG3/4	Phosphoglucomutase PgmA	AFUA_3G11830	M.Rosenow
	(AS 385-548)		
PGM	Phosphoglyceratmutase (AS 22-248)	AFUA_3G09290	M.Rosenow
PGM3/4	Phosphoglyceratmutase (AS 385-548)	AFUA_3G09290	M.Rosenow
SHMT	Serine-Hydroxymethyltransferase	AFUA_3G09320	M.Rosenow
	(AS 248-439)		
TBP	Thiamin-Biosynthese-Protein Nmt1	AFUA_5G02470	M.Rosenow
	(AS 131-342)		
TK	Transketolase TktA (AS 157-393)	AFUA_1G13500	M.Rosenow

2.1.13 Platten zur Anzucht von Aspergillen

Zum Ausplattieren von *A.fumigatus* wurden Fertigagarplatten der Firma Oxoid GmbH verwendet (PO5096A). Der Sarbouraud-Glucose-Agar enthielt Chloramphenicol (50 μ g/ml) und Gentamicin (100 μ g/ml). Sollten beim Ausplattieren der *A.fumigatus*-Stämme diese speziell auf eine Antibiotikaresistenz (Hygromycin oder Pyrithiamin) gescreent werden, wurden diese auf selbst angesetzten MM-Agarplatten, denen das jeweilige Antibiotikum beigesetzt wurde, ausplattiert.

2.1.14 Nährmedien und Medienzusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen und Puffer in H₂O angesetzt, gelöst und der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Die Prozentzahlen entsprechen, wenn nicht anders angegeben, w/v-Angaben.

<u>Glucosebouillon</u>	0,5 % NaCl 1 % Glucose 1 % Pepton (aus Fleisch) 1 % Fleischextrakt trocken in H ₂ O ansetzen, titrieren auf pH 7,2 und autoklavieren
<u>LB-Agar</u>	2,0 % Agar in LB-Medium ansetzen und autoklavieren
<u>LB-Medium:</u>	1,0 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 1,0 % NaCl in H ₂ O ansetzen, titrieren auf pH 7,0 und autoklavieren
MM-Agar ^{Hygromycin}	1 M Saccharose 2 % Agar in MM-Medium ansetzen und autoklavieren für 20 min bei 105°C
<u>MM-Agar^{Pyrithimain}</u>	1 % Glucose 1x AspA 1 mM MgSO ₄ x H ₂ O 0,1 % Spurenelement-Lösung H ₂ O ad 10 ml 1,2 M Sorbit (einzeln autoklariert) 2 % Agar (einzeln autoklaviert)
<u>MM-Medium</u>	1 % Glucose 0,092 % Ammoniumtartrat 0,052 % KCl 0,052 % MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,152 % KH ₂ PO ₄ 0,1 % Spurenelement-Lösung in H ₂ O ansetzen, titrieren auf pH 6,8 und autoklavieren
MM-Top-Agar ^{Hygromycin}	1 M Saccharose 0,7 % Agar in MM-Medium ansetzen und autoklavieren für 20 min bei 105°C

<u>MM-Top-Agar^{Pyrithiamin}</u>	1 % Glucose 1x AspA 1 mM MgSO ₄ x H ₂ O 0,1 % Spurenelement-Lösung H ₂ O ad 10 ml 1,2 M Sorbit (einzeln autoklariert) 0,7 % Agar (einzeln autoklaviert)
PEG-Lösung	60 % Polyethylenglykol PEG3350 in MSC lösen und sterilfiltrieren
<u>SOC-Medium</u>	0,5 % Bacto-Hefeextract 2 % Bacto-Trypton 0,05 % NaCl in H ₂ O ansetzen und autoklavieren + 0,1 % 1 M MgCl ₂ -Lösung (steril) + 0,1 % 1 M MgSO ₄ -Lösung (steril) + 0,1 % 2 M Glucose-Lösung (steril)
<u>TB-Medium</u>	6 % TB 1,26 % Glycerol 30 sec in der Mikrowelle aufkochen
YNB-Medium	0,67 % Hefestickstoff-Basismedium in H_2O ansetzen, titrieren auf pH 6,8 und autoklavieren

Antibiotikazusätze

Die verwendeten Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Sie wurden dem autoklavierten Medium bzw. Agar nach Abkühlen auf etwa 55°C unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Dabei wurden folgende Endkonzentrationen verwendet:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 μg/ml
Hygromycin B	200 µg/ml
Kanamycin	50 μg/ml
Pyrithiamin	2 µg/ml
Tetracyclin	12,5µg/ml

2.1.15 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen und Puffer in H₂O angesetzt und der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Die Prozentzahlen entsprechen, wenn nicht anders angegeben, w/v-Angaben.

<u>AspA 50x</u>	3,5 M NaNO ₃ 350 mM KCl 550 mM KH ₂ PO ₄ titrieren auf pH 5,5 und autoklavieren
Denhardts Reagenz	1,0 % Ficoll Typ 400 1,0% Polyvinylpyrrolidon 1,0% BSA sterilfiltrieren
<u>EDTA (0,5 M)</u>	0,5 M Na-EDTA titrieren auf pH 8,0 und autoklavieren
Lysispuffer für die Aufarbeitung g	enomischer Aspergillus-DNA
	0,1 M NaEDTA 0,2 m TrisCl 1 % SDS titieren auf pH 8,5
Lysispuffer für Transformation	0,4 M NaCl 0,2 M Tris-Cl pH 8.0 0,4 % SDS 10 mM EDTA
<u>MS</u>	10 mM MOPS 1 M Sorbit titrieren auff pH 6,5 und sterilfiltrieren
<u>MSC</u>	10 mM MOPS 1 M Sorbit 20 mM CaCl ₂ titrieren auf pH 6,5 und sterilfiltrieren
<u>Na-Acetat-Lösung (3 M)</u>	3 M Na-Acetat titrieren auf pH 5,2

Na-Acetat-Lösung (8 M)	17,4 M Eisessig titrieren auf pH 4,2
<u>NaCl-Lösung (2 M)</u>	2 M NaCl autoklavieren
<u>NaCl-Tween</u>	0,9 % NaCl 0,1 % Tween 80
<u>Na₂EDTA-SDS-Lösung</u>	50 mM Na ₂ EDTA 0,25 % SDS
<u>OM-Puffer</u>	10 mM Na ₃ PO ₄ 1.2 M MgSO ₄ x H ₂ O titrieren auf pH 8,5 und sterilfiltrieren
<u>PBS 10x</u>	8 % NaCl 0,2 % KCl 1,44 % Na ₂ HPO ₄ 0,24 % KH ₂ PO ₄ titrieren auf pH 7,4 und autoklavieren
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	1 Volumen Phenol-Lösung 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gut mischen und Phasentrennung abwarten
<u>Phenol-Lösung</u>	500g Phenol (fest) 0,5 g 8-Hydroxychinolin im 65°C Wasserbad erwärmen + 1 Volumen 1 M TrisCl (pH 8,0) schütteln und mischen, Phasentrennung abwarten, obere Phase verwerfen + 1 Volumen 1 M TrisCl (pH 8,0) schütteln und mischen, Phasentrennung abwarten, obere Phase verwerfen, pH 7,8 soll vorliegen, sonst Vorgang wiederholen wie folgt aliquotieren: 40 ml Phenol 8 ml 0,1 M TrisCl 8 μl β-Mercaptoethanol

<u>Prähybridisierungslösung</u>	50 % Formamid, 6x SSC 5x Denhardts Reagenz 0,5 % SDS 100 μg/ml Heringsperma-DNA
Protein-Produktion-Puffer A	6 M Guanidine-Hydrochlorid 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris titrieren auf pH 8,0
Protein-Produktion-Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris titrieren auf pH 8,0
Protein-Produktion-Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris titrieren auf pH 6,3
Protein-Produktion-Puffer E	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris titrieren auf pH 4,5
<u>SDS 10 %</u>	10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Entfärbelösung	7,5 % Essigsäure
SDS-Färbelösung	0,17 % Coomassie Brillant Blue R250 6,7 % Essigsäure 33,3 % Methanol
SDS-Laufpuffer	0,3 % Tris 1,44 % Glycin 1 % SDS 10 %
SDS- Probenpuffer	20 % Glycerol 50 % SDS 10 % 30 % SDS-Sammelgelpuffer 0,01 % Bromphenolblau

SDS-Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 einstellen
SDS-Trenngelpuffer	1 M Trís titrieren auf pH 8,8
SDS-Trocknungslösung	20 % Methanol 5 % Glycerol
Southern Blot-Blockpuffer	5 % Milchpulver 0,1 % Tween20 in 1x PBS ansetzen, titrieren auf pH 7,4
Southern Blot-Denaturierungslsg.	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Southern Blot-Depurinierungslsg.	0,25 M HCl
Southern Blot-Neutralisierungslsg.	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-Cl
Southern Blot-Waschpuffer I	2x SSC 0,5 % SDS
Southern Blot-Waschpuffer II	0,1x SSC 0,5 % SDS
<u>Spurenelemente-Lösung</u>	0,004 % Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O 0,04 % CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,08 % FePO ₄ x 2 H ₂ O 0,08 % MnSO ₄ x 2 H ₂ O 0,08 % Na2MoO ₄ x 2 H ₂ O 0,8 % ZnSO ₄ x 7 H ₂ O sterilfiltrieren
<u>SSC 20x</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat Titrieren auf pH 7,0

<u>TAE 6x</u>	2,90 % Tris 0,69 % Essigsäure 1,20 % 0,5 M EDTA (pH 8,0)
<u>TB</u>	100 mM MOPS 0,6 M Sorbit titrieren auf pH 7,5 und sterilfiltrieren
<u>TBE 5x</u>	5,4 % Tris 2,75 % Borsäure 2 % 0,5 M EDTA (pH 8,0)
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA titrieren auf pH 8,0 und autoklavieren
<u>Tris-EDTA-Puffer</u>	0,1 M EDTA mit festem Tris (etwa 1,25 %) auf pH 7,4 titrieren
Western Blot- Blockpuffer	10 % Milchpulver 0,1 % Tween20 in 1x PBS ansetzen
Western Blot-Substratpuffer	80 % 0,9 % NaCl 2 % Diethanolamin 0,02 % 4,9 M MgCl ₂
Western Blot- Transferpuffer	0,3 % Tris 1,44 % Glycin 15 % Methanol

2.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Sterilisation

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Medien, Puffer, Glas- und Plastikgefäße für 20 min bei 121°C dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert.

2.2.2 Bakterienkultivierung

Für flüssige Bakterienkulturen wurden 2,5 ml LB-Medium in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt. Die Animpfung erfolgte entweder aus einer Glycerolkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte mit einer sterilen Impföse. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Für die Kultivierung von Bakterien auf festem Medium wurde LB-Agar verwendet, dem, wenn nötig, entsprechende Antibiotika zugesetzt wurden.

2.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch Messung der OD bei 600 nm im Photometer bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht hierbei einer Zellzahl von etwa 1×10^9 Zellen pro ml Kultur.

2.2.4 Herstellung elektrokompetenter E.coli

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen wurden 220 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 4-5 *E.coli*-Kolonien angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,35-0,4 inkubiert. Direkt danach wurde die Kultur für 20 Minuten in ein Eiswasserbad gestellt und während dieser Zeit gelegentlich leicht geschüttelt. Es folgten mehrere Zentrifugationsschritte (4°C, 4000 x g, 15 min) und anschließendes Resuspensieren des Pellets in eiskaltem, sterilem H₂O. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in eiskaltem 10 %-igem Glycerol aufgenommen. Die so resuspendierten Zellen wurden zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schnellst möglich gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Transformation kompetenter E.coli

Nach dem Auftauen eines Aliquots elektrokompetenter *E.coli* auf Eis wurden davon 40 µl mit 1,5 µl Ligationsansatz (bzw. 1,2 µl Plasmid-DNA; 1-100 ng/µl) gemischt. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit folgenden Einstellungen transformiert:

50 µF
R5 (129 Ohm)
1,3-1,5 kV
5-6 msec

Anschließend wurden 500 μ l SOC-Medium dazugegeben, vorsichtig gemischt, und der Transformationsansatz wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte die Inkubation bei 37°C für 1 h unter Schütteln. Von dem Ansatz wurden verschiedene Volumina (meinst 10 μ l und 100 μ l) auf die zuvor vorbereiteten LB-Agar-Platten gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Lagerung von Bakterien

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien wurden diese über Nacht in LB-Medium wachsen gelassen. Von dieser Über-Nacht-Kultur wurden 20 μ l zu 2,5 ml LB-Medium gegeben. Diese Subkultur wurde nach 2-3 h gestoppt und 828 μ l wurden entnommen und zu 172 μ l sterilem Glycerol (87 %) gegeben. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgt bei -80°C. Eine kurzfristige Lagerung von bis zu 2 Wochen erfolgte bei 4°C auf LB-Agar-Platten.

2.2.7 Herstellung einer A.fumigatus-Sporensuspension

Um Sporen von *A.fumigatus* zu gewinnen, wurden Sabouraud- oder selbst hergestellte MM-Agarplatten beimpft und für mindestens 2 Tage bei 37°C inkubiert. Sporen wurden mit etwa 7-15 ml sterilem MM-Medium oder steriler 0,9 %-iger NaCl -Lösung (jeweils 0,1 % Tween80 zugesetzt) überschichtet und mit Hilfe einer Impföse vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.8 Bestimmung der Sporenzahl

Die Sporenzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde aus der Sporen-Stammsuspension eine 1:200-Verdünnung in sterilem PBS hergestellt und 10 µl davon wurden in die Zählkammer eingebracht. Es wurden jeweils 6 Großquadrate

(ein Großquadrat besteht aus 16 Kleinstquadraten) ausgezählt. Die Zahl der Sporen pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

Sporen/ml: [Mittelwert aus den Großquadraten/16] x $[4 \times 10^6]$

2.2.9 Transformation von A.fumigatus

Pro Transformation wurden zwei Ansätze 250 ml gekühltes MM-Medium in jeweils 2-Liter-Schikanekolben gegeben und mit der Sporenmenge von zwei Agarplatten beimpft. Die Kolben wurden bei 4°C zwischengelagert und abends bei 30,5°C und 80 U/min über Nacht für ca. 10 h in den Inkubator gegeben. Am nächsten Morgen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle; die Konidien sollten aufgebläht und kurz vor der Aussprossung sein. Das Kulturmedium wurde mit einem Bottle-Top-Filter (0,45 µm) abfiltriert, die Aspergillen anschließend mit 10 ml eiskaltem OM-Puffer gewaschen. Etwa 1,0-2,0 g gewaschene Pilzmasse wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gewogen und anschließend in 10 ml OM-Puffer resuspendiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5 min bei 4000 x g und 4°C. Die Waschung in OM-Puffer wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 8,5 ml OM-Puffer resuspendiert und gründlich gevortext. Inkubation für 5 min auf Eis nach Zugabe von 1 ml Glucanex[®] (50 mg/ml in OM). Für ein Gesamtvolumen von 10 ml wurden 0,5 ml BSA-Lösung (3 mg BSA/ ml in OM) hinzugegeben und für 3 h bei 30-33°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig mit 10 ml TB-Puffer überschichtet und für 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Sphäroplasten befanden sich dann als eher unscharfe Bande im Interface der Lösungen, die vorsichtig abpipettiert wurden (etwa 4-5 ml). Zu 1 Volumen Sphäroplasten-Suspension wurden 9 Volumen MS hinzugemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 1000 x g und 4°C, gefolgt von zweimaligem Waschen des Pellets mit 20 ml MSC und anschließendem Zentrifugieren für 7 min bei 1000 x g und 4°C. Abschließend wurde das Pellet in 110 µl MSC resuspendiert.

Transformationsansatz:	Negativkontrolle:
etwa 100 µl Sphäroplasten	10 µl Sphäroplasten
	90 µl MSC
30 µl PEG	30 µl PEG
30 µl geschnittendes Plasmid	30 µl EB-Puffer
(2-10 µg in EB-Puffer)	·

Für die Transformation wurden folgende Ansätze pipettiert und vorsichtig gemischt:

Beide Ansätze wurden für 20-30 min auf Eis inkubiert. Es wurden jeweils 900 μ l PEG hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad. Im Anschluss wurden die Ansätze für 15 min bei 5000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand vom Sphäroplasten-Pellet wurde komplett entfernt. Der Transformationsansatz wurde in 500 μ l MSC und die Negativkontrolle in 50 μ l MSC resuspendiert.

Transformanten mit Hygromycin B-Resistenz

Für die Transformanten mit Hygromycin B-Resistenz wurden 2,0 ml-Reaktionsgefäße bereitgestellt und 16-mal mit einem Ansatz mit jeweils 30 µl Sphäroplasten befüllt. Als Negativkontrolle wurden einmal 25 µl und einmal 30 µl der Sphäroplasten vorgelegt. 1,6 ml MM-Top-Agar^{Hygromycin} wurden jeweils hinzugegeben, gemischt, auf vorgewärmte (37°C) MM-Agarplatten^{Hygromycin} gegeben und sorgfältig verteilt. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Platten für 20 h bei Raumtemperatur bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit MM-Top-Agar überschichtet, in den 20 µl Hygromycin B (50 mg/ml) je ml Agar gemischt wurden. Nach Erstarren dieser zweiten Top-Agar-Schicht wurden die Platten bei 21°C in den Inkubator gestellt. Wurden Einzelkolonien an der Agaroberfläche sichtbar, wurden die Platten für weitere 16 h bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Transformanten ausgehend von mononukleären Sporen zwei weitere Male erneut auf MM-Hygromycin-Platten ausplattiert.

Transformanten mit Pyrithiamin-Resistenz

Für die Transformanten mit Pyrithiamin-Resistenz wurden 50 ml-Zentrifugenröhrchen bereitgestellt und nacheinander mit jeweils 5 ml MM-Top-Agar^{Pyrithiamin} befüllt. Es wurden jeweils unterschiedliche Volumina Transformations-Ansatz (1x 10 μ l, 1x 25 μ l, 1x 50 μ l, 1x 100 μ l und der restliche Ansatz) und Negativkontrolle (1x 25 μ l und 1x 30 μ l) hinzugeben, gemischt, auf vorgewärmte (37°C) MM-Agarplatten^{Pyrithimamin}

gegeben und sorgfältig verteilt. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Platten für 2-3 Tage bei 30°C im Inkubator bebrütet. Nach Inkubation wurden Transformanten erneut auf MM-Pyrithiamin-Platten ausplattiert und anschließend noch ein weiteres Mal neu überimpft.

2.3. Molekulargenetische Arbeitsmethoden

2.3.1 Isolierung von Transformanten-DNA für PCR-Ansatz

Zur Aufarbeitung von *Aspergillus*-DNA wurden 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 2 ml YNB + 1 % Glucose bereitgestellt und jeweils mit den Sporen einer Transformante angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C über Nacht als Schüttelkultur inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Kulturen aufgeschüttelt und 500 μ l der Übernachtkultur in ein 1,5 ml-Schraub-Reaktionsgefäß überführt. Die Kultur wurde für 5 Minuten bei maximaler Drehzahl (13.200 rpm; 16.100 x g) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 75 μ l TE-Puffer auf das Pilzpellet pipettiert. Die Pilzsuspension wurde zehnmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wiederaufgetaut. Es erfolgte eine Zugabe von 100 μ l Lysispuffer und 16 μ l Proteinase K-Lösung (25 mg/ml). Die Ansätze wurden über Nacht bei 56°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 95°C in den Thermomixer gegeben. Die Suspensionen wurden 5 Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert und der Überstand (ca. 180 μ l) in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden mit 180 μ l Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Gemisch versetzt, 15 s gevortext und 5 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Die obere Phase (ca. 100 μ l) wurde abgezogen und in vorbereitete Reaktionsgefäße mit 100 μ l Chloroform gegeben. Das Ganze wurde 15 s gevortext, 1 Minute zentrifugiert, der Überstand (ca. 95 μ l) abgezogen und 2 μ l Glykogen (5 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit zwei Volumen (190 μ l) Ethanol 100 % gefällt, gevortext und für 10 min bei -20°C gefroren. Die Proben wurden für 15 min bei höchster Drehzahl und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abpipettiert und das Pellet im Thermomixer bei 37°C vollständig getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 50 μ l TE gelöst. Das Screening auf homologe Rekombination der Transformanten erfolgte mit jeweils 2,5 μ l der jeweiligen Transformanten-DNA.

2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus A.fumigatus

Von einer gut bewachsenen Sabourand-Platte wurden mit 3-4 ml 0,9 % NaCL + 0,1 % Tween80 die Konidien aufgeschwemmt. Die Suspension wurde zu zwei gleichen Teilen zu jeweils 200 ml vorgewärmter Glucosebouillon (in 2 L-Flaschen) gegeben und für ca. 20 h bei 41°C und etwa 90 U/min inkubiert.

Nach Filtrierung des Myzels erfolgte dessen Waschung mit Tris-EDTA-Puffer. Zur Weiterverarbeitung wurden 5-6 g des Myzels verwendet und in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser und einem Pistill fein zerrieben. Das Pulver wurde mit 70 μ l Diethylpyrocarbonat und 20 ml auf 68°C vorgewärmter Na₂EDTA-SDS-Lösung gemischt und bei 68°C für 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Das gesamte Gemisch wurde mit 2 ml 8 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,2) versetzt, um Proteine auszufällen. Nach Inkubation des Gemisches für 10 Minuten auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min; 4000 x g; 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, 1:1 mit Isopropanol überschichtet und etwa zehnmal über Kopf geschüttelt. Die gefällte DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugenröhrchen invertiert für 2 min auf ein Zellulosetuch gestellt. Die DNA wurde in 10 ml Lysispuffer gelöst und mit 140 μ l Proteinase K (50 mg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 56-60°C im Schüttelwasserbad über Nacht.

Die in Lysispuffer gelöste DNA wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol überschichtet, gemischt und für 30 min bei 4000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 2 M NaCl und 2 Volumen 100 %-igem Ethanol gemischt. Nach kurzem Zentrifugieren für 1 min bei 150 x g wurde das Pellet drainiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml TE-Puffer bei 60°C gelöst. Zu der gelösten DNA wurden 100 µl RNAse (10 mg/ml) hinzugegeben. Anschließend Inkubation für 90 min bei 37°C im Schüttelwasserbad. Es folgten Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholmehrere Waschungen und Ethanolfällungen. Die DNA wurde ein weiteres Mal in 4 ml TE gelöst, später zweimal in 0,5 ml TE. Danach wurde die Ethanolfällung zweimal mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 2 Volumen 100 %-igem Ethanol, gefolgt vom Lösen der DNA in 450 µl TE, durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch kaltes 70 %-iges Ethanol (4°C) gezogen und bei 60°C für 30 min auf dem Thermomixer getrocknet. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet in 100-200 µl TE gelöst. Die so isolierte DNA wurde für Southern Blots und PCR verwendet.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur Isolierung bzw. Kontrolle von Plasmiden aus *E.coli* wurde eine Über-Nacht-Schüttelkultur der Transformanten in 2,5 ml LB-Medium angesetzt. Am folgenden Tag wurde die Kultur bei 3500 x g über 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers.

2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop ND-1000 gemessen. Für die Messung genügt bereits 1 μ l der zu messenden DNA. Die Messung erfolgte gegen den jeweiligen Elutionspuffer als Referenzwert.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eingesetzt, um DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Ihr Prinzip ist die zyklische Wiederholung von drei verschiedenen Reaktionsschritten: Denaturierung der Template-DNA, Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Annealing) und Synthese einer komplementären DNA-Kopie durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Elongation). Durch die Verwendung von Oligonukleotiden, die mit zuvor festgelegten Bereichen der DNA-Stränge hybridisieren, wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt definiert. Folgende Bedingungen wurden gewählt:

10-100 ng DNA
2,5 μl 10x PCR-Puffer (optional additiv 2,5 μl MgCl₂ 15mM)
0,5 μl Nukleotid-Mix (dNTPs jeweils 10 mM)
2,5 μl Primer 1 (5 pmol/μl)
2,5 μl Primer 2 (5 pmol/μl)
1 U Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase)
mit H₂O ad 25 μl

Alle durchgeführten Polymerasekettenreaktionen wurden in PCR-Cyklern mit Deckelheizung (105°C) durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm wurde je nach Amplifikatlänge und Oligonukleotid-Schmelztemperatur modifiziert:

 Tab.
 12:
 PCR-Programm
 zur
 Amplifikation
 von
 DNA-Fragmenten
 (beispielhaft
 für
 die

 Verwendung von
 Taq-Polymerase)
 Image: Comparison of the second second

Temperatur	Zeit		Funktion
95°C	2 min		Denaturierung
95°C	30 sec	J	Denaturierung
X°C	30 sec	25-35	Annealing
72°C	Y sec	Zyklen	Elongation
72°C	7-10 min	J	finale Elongation
4°C	x		Kühlung

Die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotide wurde ausgehend von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (t_m) berechnet. Dazu wird die Anzahl der Adenosine (A) und Thymidine (T) bzw. der Guanosine (G) und Cytidine (C) bestimmt. Die Anzahl von (A+T) wird mit 2, die von (G+C) mit 4 multipliziert. Die Addition ergibt die Schmelztemperatur in °C:

Schmelztemperatur in $^{\circ}C = (A + T)^{*2} + (G + C)^{*4}$

Die verwendete Annealing-Temperatur (\mathbf{X}) wurde 5°C unter der niedrigsten errechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide-Paare gewählt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab.7 aufgeführt. Primer Nummer 1 wurde stets mit 2 gepaart, 3 mit 4, 5 mit 6 und 7 mit 8 usw. Die Elongationszeit (\mathbf{Y}) richtete sich nach der Länge des Fragments und betrug als Richtwert etwa 1 min pro 1000 bp.

2.3.6 Nested-PCR

Die nested-PCR wurde wie zuvor beschrieben (s. 2.3.5) angesetzt, jedoch wurde anstelle genomischer DNA, etc. das PCR-Produkt der ersten PCR als Template-DNA (1:4 verdünnt) eingesetzt.

2.3.7 Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung auf Plasmid-Konstruktion und Transformation wurde mit den *E.coli*-Klonen eine Kolonie-PCR durchgeführt. Von der Einzelkolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein kleiner Teil abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß abgestrichen. Die *E.coli*-Kolonie wurde mit 30 μ l H₂O für 2 min bei 98°C erhitzt. Davon wurden dann 2-3 μ l als Template in den PCR-Ansatz pipettiert.

2.3.8 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese lassen sich PCR-Produkte oder Restriktionsansätze im elektrischen Feld auftrennen und ihre Größe und Menge durch den Vergleich mit DNA-Molekülen bekannter Größe und Menge abschätzen.

Die Agarose wurde in 1x TAE in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgekocht und nach dem Abkühlen der Lösung wurden zwei Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (0,7 mg/ml) zugegeben. Die Agarose wurde in eine Gelgießkammer gegossen und ein Kamm zur Formung der Probentaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gegeben, die Gelkammer mit 1x TAE gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Taschen im Gel pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde außerdem ein geeigneter Molekulargewichtsmarker ins Gel pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel bei einer konstanten Spannung von 120 V, wobei die Laufzeit ungefähr 35-45 min betrug. Die DNA-Banden wurden bei einer Wellenlänge von 312 nm durch Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids dargestellt, fotographisch dokumentiert oder gegebenenfalls zusätzlich als Datei gespeichert.

2.3.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus dem Gelstück wurde das QIAEX[®]II Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.10 DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung wurde mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.11 Ethanolfällung

Bei komplizierten Klonierungen folgte auf die DNA-Extraktion aus Agarosegelen oder der DNA-Aufreinigung mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit eine Ethanolfällung. Hierzu wurden zu 50 μ l Eluat, 2 μ l Glykogen (5 mg/ml), 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Volumen Ethanol 100 % gegeben. Der Ansatz wurde bei -20°C für 20 min belassen und anschließend bei höchster Drehzahl (16.100 x g) und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 40°C für 5 min abgedampft. Abschließend erfolgte die Aufnahme der DNA in EB.

2.3.12 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurde die entsprechende Restriktionsendonuklease mit dem entsprechenden Puffer, BSA (optional), H₂O und der zu verdauenden DNA zusammengefügt und je nach Temperaturoptimum der Restriktionsendonuklease für 4 h inkubiert (beispielhafter Ansatz):

μg DNA
 1/10 Volumen Restriktionspuffer
 1/10 Volumen BSA 10x
 5 U Restriktionsendonuklease
 optional zweite Restriktionsendonuklease
 mit H₂O ad 40 μl

Restriktionsendonukleasen, die nicht zum Doppelverdau geeignet waren, wurden einzeln nacheinander verwendet. Dabei wurde ein Inaktivierungsschritt für die erste Restriktionsendonuklease eingeschoben. Gegebenfalls erfolgte eine DNA-Zwischenreinigung mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit und ein zweiter Inkubationsansatz mit passendem Puffer.

Die Restriktionsendonukleasen wurden, falls möglich, durch Erhitzen z.B. bei 65°C für 20 min inaktiviert. Zur Entfernung der Restriktionsendonukleasen aus dem

Restriktionsansatz wurde anschließend eine Reinigung mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit durchgeführt. Die Größe der geschnitten Vektoren und Inserts wurde auf einem Agarosegel durch Vergleich mit einem DNA-Standard abgeschätzt.

Um zu prüfen, ob ein Insert in einen Vektor einkloniert wurde, wurde ein Kontrollrestriktionsverdau mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l angesetzt, wobei für die DNA, unter Anpassung der Mengenverhältnisse, eine Konzentration von 0,2 μ g gewählt wurde.

2.3.13 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Religation eines Vektors bei der Ligation zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden des zuvor mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektors. Hierzu wurde Antarktische Phosphatase wie folgt verwendet:

> linearisierte Vektor-DNA (1-1,5 μ g) + 1/10 Volumen Antarktische Phosphatase (5 U/ μ l pro μ g DNA) + 1 μ l Phosphatase-Puffer 10 x mit H₂O ad 10 μ l

Der 10 µl-Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Phosphatase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die Vektor-DNA wurde mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit gereinigt und konnte dann für die Ligation eingesetzt werden.

2.3.14 Ligation von DNA

Die Ligation von dephosporyliertem Vektor und Insert wurde mit Hilfe der T4 DNA Ligase durchgeführt. In der Regel wurden 100 ng Vektor und die äquimolare Menge Insert verwendet. Dazu wurden folgende Komponenten zusammenfügt:

100 ng geschnitter Vektor
x ng geschnittenes Insert
mit H₂O ad 8 μl
Inkubation für 5 min bei 45°C
+ 1 μl Ligase-Puffer (inkl. ATP)
+ 1 μl T4 DNA Ligase (4 U/μl)
Inkubation über Nacht bei 16°C

Zur Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt.

2.3.15 GeneArt[®] Seamless Cloning and Assembly Kit

Zur Herstellung der *A.fumigatus*-Komplementmutanten wurde das GeneArt[®] Seamless Cloning and Assembly Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden jeweils drei DNA-Fragmente gleichzeitig ohne Subklonierungen in den linearen pUC19-Vektor (2659 bp) eingebracht. Die entsprechende Menge an PCR-Amplifikaten wurde nach folgender Formel berechnet:

X ng PCR-Produkt = [2x(bp PCR-Produkt)x(100 ng linearisierter Vektor)]/[bp Vektor]

Für die Klonierung wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

x ng der entsprechenden PCR-Produkte + 2 µg linearer pUC19L-Vektor + 5 µl Reaktionspuffer mit H₂O ad 18 µl + 2 µl 2x Enzym Mix

Von dem Ansatz wurden 7 µl in den mit dem Kit gelieferten *E.coli*-Top10-Stamm transformiert und die Plasmide anschließend über Restriktionsanalysen im Agarosegel kontrolliert.

2.3.16 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Dabei wurden in einem Volumen von 7 μ l, 500-700 ng DNA mit 20 pmol Sequenzierprimer versetzt.

2.3.17 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Für die Herstellung der DIG-markierten Sonde wurde zunächst der folgende Nukleotid-Mix angesetzt:

dGTP	2,0 mM
dATP	2,0 mM
dCTP	2,0 mM
dCTP	1,3 mM
Dig-11-dUTP	0,7 mM

Es wurden zwei verschiedene Sonden (Sonde I und Sonde II) verwendet:

Sonde I: Southern Blot (Deletionsmutanten)

Ausgehend von dem Plasmid pAN7-1 als Template wurde die erste PCR für die Sondenherstellung angesetzt:

5 ng Plasmid pAN7-1 2,5 μl 10x *Taq* Puffer 0,5 μl Nukleotid-Mix (dNTPs jeweils 10 mM) 2,5 μl Primer Phle-Pro3 (5 pmol/μl) 2,5 μl Primer Phle-Pro4 (5 pmol/μl) 0,25 μl *Taq* Polymerase mit H₂O ad 25 μl

Temperatur	Zeit	
94°C	2 min	
94°C	30 sec)
59°C	30 sec	35
72°C	30 sec	Zyklen
72°C	7 min	J
4°C	∞	

Tab. 13: Erstes PCR-Programm zur Herstellung der DIG-markierten Sonde

Im Anschluss wurde eine nested-PCR mit dem verdünnten PCR-Produkt aus der ersten PCR gefahren:

2,5 μl PCR-Produkt aus der ersten PCR (s. oben) 1:1000 verdünnt
2,5 μl 10x *Taq* Puffer
2,5 μl Digoxigenin-Mix
2,5 μl Primer Phle-Pro1 (5 pmol/μl)
2,5 μl Primer Phle-Pro2 (5 pmol/μl)
0,25 μl *Taq* Polymerase
mit H₂O ad 25 μl

Das zweite PCR-Programm entsprach den Bedingungen bei der ersten PCR (s. oben).

Sonde II: Southern Blot (Komplementierung der Deletionsmutante)

Die Sonde für den Southern Blot wurde auf das *ptrA*-Gen (Selektionsmarker) generiert. Dafür wurde das Komplementierungsplasmid pHP16-del-komplementiert verwendet, das, mit *Hpa*I geschnitten, zuvor für die Transformation zur Komplementierung der Deletionsmutante genutzt wurde: 2,0 μl Plasmid pHP16-del-komplementiert 1:200 verdünnt 2,5 μl 10x *Taq* Puffer 0,5 μl Nukleotid-Mix (dNTPs jeweils 10 mM) 2,5 μl Primer RekomHP16_Sonde1 (5 pmol/μl) 2,5 μl Primer RekomHP16_Sonde2 (5 pmol/μl) 0,25 μl *Taq* Polymerase mit H₂O ad 25 μl

Im Anschluss wurde eine nested-PCR mit dem verdünnten PCR-Produkt aus der ersten PCR gefahren:

5,0 μl PCR-Produkt aus der ersten PCR (s. oben) 1:1000 verdünnt
2,5 μl 10x *Taq* Puffer
2,5 μl Digoxigenin-Mix
2,5 μl Primer RekomHP16_Sonde3 (5 pmol/μl)
2,5 μl Primer RekomHP16_Sonde4 (5 pmol/μl)
0,25 μl *Taq* Polymerase
mit H₂O ad 25 μl

Die PCR-Programme entsprachen den Bedingungen bei der Herstellung der Sonde für den Southern Blot zur Testung der Deletionsmutanten (s. oben).

2.3.18 Southern Blot

Genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, mit Phenolchloroformextraktion gereinigt und anschließend gelelektrophoretisch getrennt. Hierfür wurde ein 0,7 %-iges Agarosegel in 0,5x TBE verwendet und eine Spannung von 0,5-1,0 V/cm angelegt (Dauer etwa 8 h). Anschließend wurde das Gel für 10 min mit Depurinierungslösung, zweimal für 20 min mit Denaturierungslösung und zweimal für 20 min mit Neutralisierungslösung gewaschen. Der DNA-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte für 16-24 h mit Hilfe eines Kapillarblots (Abb. 3).



Abb. 3: Schematischer Aufbau des Kapillarblots.

Beim Kapillarblot wird ein Flüssigkeitsstrom (Kapillareffekt) genutzt, der, ausgehend von einem Reservoir an Pufferlösung (20 x SSC), über das Gel und die Membran bis hin zu einem Stapel von Papiertüchern läuft. Die DNA wird dabei mitgeführt und bleibt auf der Oberfläche der Nitrozellulosemembran hängen. Nach dem Blot wurde die Membran für 5 min in 6x SSC gewaschen, für 30 min luftgetrocknet und anschließend zwischen zwei Lagen Whatman-Papier für 1-2 h im Vakuumofen getrocknet.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte mit 20 ml Prähybridisierungslösung in einer kleinen Glasschale für 2 h. Kurz vor Ablauf der 2 h wurden 3 μ l DIG-markierte Sonde in 100 μ l H₂O aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend sofort mit 100 μ l Formamid versetzt und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde zu der Prähybridisierungslösung geben und es folgte eine Inkubation für 18-24 h bei 42°C im Schüttler (Hybrisierung).

Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal für jeweils 15 min mit Waschpuffer I bei 37°C im Wärmeraum gewaschen, und anschließend folgten zwei weitere Waschschritte mit Waschpuffer II, jeweils 30 Minuten bei 68°C im Schüttelwasserbad.

Detektion von Digoxigenin-markierten DNA-Proben

Die Membran wurde anschließend für 1 min bei Raumtemperatur in PBS äquilibriert und mittels eines Blockpuffers für 60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Der POD-markierte Antikörper gegen DIG wurde verdünnt (30 ml Blockpuffer + 22,5 µl POD-markierter AK gegen DIG) und die Membran darin für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Kreisschüttler inkubiert. Die Membran wurde daraufhin dreimal mit PBS + 0,1 % Tween 20 für jeweils 7-10 min gewaschen. In der Dunkelkammer wurden die ECL-Reagenzien 1 und 2 zu gleichen Teilen (jeweils 1 ml) gemischt und die Membran zwischen zwei Kopierfolien mit den ECL-Reagenzien inkubiert. Es folgte die Belichtung des Röntgenfilms in einer Röntgenfilmkassette für 1 min bis mehrere Stunden. Der Film wurde für 2 Minuten entwickelt, wobei diese Reaktion durch ein Bad für 20 Sekunden in Essigsäure (5 %) gestoppt wurde. Danach wurde der Film für 2-5 min in Fixierer geschwenkt und abschließend für etwa 5 min in Leitungswasser gewässert und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4 Proteinanalytische Arbeitsmethoden

2.4.1 Produktion und Aufreinigung His-getagter Proteine zur Verimpfung

Nach Transformation der Expressionsplasmide in *E.coli* wurden Über-Nacht-Schüttelkulturen der jeweiligen Stämme in 2,5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt. Diese Über-Nacht-Kulturen wurden am nächsten Morgen zu 250 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusatz) gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 angezogen. Ein 1 ml-Aliquot wurde von der Kultur entnommen und für 5 min bei 6000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (Negativkontrolle ohne IPTG) zur späteren Analyse im SDS-Gel weggefroren. Zu den Kulturen wurden jeweils 0,5 ml 0,5 M IPTG hinzugefügt. Inkubation für weitere 4 h bei 37°C. Die Kulturen wurden anschließend bei 4°C für 20 min bei 1500 x *g* zentrifugiert. Das Pellet konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C zwischengelagert werden.

Nach dem Auftauen des Pellets wurde das induzierte Protein gereinigt. Das Pellet wurde hierfür in 25 ml Puffer A resuspendiert, mit 2 Protease-Inhibitortabletten versetzt und mindestens über 1 min gevortext. Es folgte eine Inkubation für 2 h auf dem Drehrad. Während der Inkubation wurde die Ni-NTA-Agarose vorbereitet, indem sie auf eine PD10-Säule gegeben wurde und nach dem Sedimentieren nacheinander mit 25 ml 30 %-igem Ethanol, 25 ml H₂O und 25 ml Puffer A gespült wurde. Die Kultur wurde nach Ablauf der 2 h für 10 min bei 4000 x *g* zentrifugiert und der Überstand zu der vorbereiteten Ni-NTA-Agarose gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Drehrad.

Am nächsten Morgen wurde die Über-Nacht-Kultur für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde wieder auf die PD10-Säule gegeben und nacheinander mit 5 ml Puffer A, 25 ml Puffer B und 25 ml Puffer C gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 20 ml Puffer E. Nach Entsalzung und Volumeneinengung durch Zentrifugation mittels Vivaspin 20- bzw. 2-Säulen bei 4000 x g bei 17°C folgte die Analyse der Proben "vor" und "nach" IPTG-Zugabe in einem SDS-Gel.

2.4.2 Herstellung der HP16-Expressionsplasmide und Test auf rekombinante Proteinexpression in *E.coli*

Herstellung der HP16-Expressionsplasmide

Der unter Punkt 2.4.2 beschriebene Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Frau Pähtz, Doktorandin in der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Brakhage am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans Knöll Institut (HKI, Jena) durchgeführt.

Das in Auftrag gegebene synthetisch hergestellte Gen HP16 mit optimiertem "Codon-Usage" für E.coli wurde aus dem Vektor Afu1g13670 23-218 mit dem Primerpaar Afu1g13670_23BamHIf/ Afu1g13670_182HindIIIr für eine kurze Version des Proteins (AS 23-182) bzw. mit dem Primerpaar Afu1g13670_23BamHIf/ Afu1g13670_218HindIIIr für eine lange Version des Proteins (AS 23-218) mittels PCR mit einer Phusion Flash II High-Fidelety Polymerase amplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden nach Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Sowohl die gereinigten PCR-Produkte als auch der Vektor, der die Fusion des Proteins mit dem His-Tag ermöglichen sollte, wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII geschnitten. Nach Dephosphorylierung des Vektors erfolgte die Ligation mit jeweils der kurzen bzw. der langen Version des Proteins. Nach Transformation in E.coli a-Select wurden einzelne Klone gepickt und nach Plasmidisolierung durch Restriktionsverdaue und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert. Nach Transformation des Expressionsplasmids in E.coli BL(DE3) wurde im Weiteren mit einem Mini-Expressionsversuch getestet, ob das Protein exprimiert wurde.

Mini-Expressionsversuch

Dafür wurde eine Über-Nacht-Schüttelkultur des Stammes in 3 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Von diesen Kulturen wurden am nächsten Morgen 400 μ l in jeweils 10 ml TB-Medium (Autoinduktionsmedium) gegeben. Parallel dazu erfolgte die Beimpfung von 10 ml LB-Medium mit 400 μ l der Vorkultur als Kontrolle. Die Hauptkulturen wurden bei 25°C für 24 h bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die OD₅₅₀ gemessen, von jedem Ansatz eine OD von 10 berechnet und die entsprechenden Kulturmengen in jeweils 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 18.188 x *g* für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden für mindestens 20 min bei -20°C weggefroren. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml Lysepuffer (20 mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, 1mM AEBSF) durch Auf- und Abpipettieren gelöst und die *E.colis* mit einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 15.682 x g und 4°C. Die Überstände (lösliche Fraktionen) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zusätzlich wurden die Pellets der TB-Kulturen in 1 ml Lysepuffer gelöst (unlösliche Fraktionen). Jeweils 30 μ l der LB- (nur lösliche Fraktionen) und TB-Kulturen (lösliche und unlösliche Fraktionen) wurden zusammen mit jeweils 10 μ l Ladepuffer und 2 μ l Dithiothreitol versetzt. Zur elektrophoretischen Trennung der kurzen und langen Version des Proteins wurden NuPAGE Bis-Tris-Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.3 Aufreinigung His-getagter Proteine

Auch dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Frau Pähtz durchgeführt.

Über-Nacht-Schüttelkulturen der entsprechenden Stämme wurden in 3 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Von diesen Kulturen wurde am nächsten Morgen jeweils 1 ml in jeweils 100 ml TB-Medium in einen 2-L-Schikanekolben gegeben. Um das Schäumen der Kulturen über Nacht zu verhindern, wurde den Ansätzen noch zusätzlich jeweils ein Tropfen Antifoam 204 zugesetzt. Diese Hauptkulturen wurden bei 25°C für 24 h bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die OD_{550} gemessen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von jeweils 50 ml-Kulturmenge bei 3890 rpm für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden bei -80°C weggefroren. Die Pellets wurden in 35 ml Puffer A (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM Imidiazol mit 1 mM AEBSF) resuspendiert, gefolgt von einem Zellaufschluss mit der EmulsiFlex EFC5, einem Hochdruckhomogenisator. Unlösliche Bestandteile wurden bei 14.310 x *g* über 20 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und durch einen 1,2 µm Spritzenfilter gepresst.

Der zellfreie Extrakt wurde über eine His GraviTrap aufgereinigt. Dazu wurde die Säule mit 5 ml Puffer A äquilibriert und dann beladen. Die Säule wurde folgend mit 5 ml Puffer A, 4 ml Puffer B (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 50 mM Imidiazol) und 1 ml Puffer C (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM Imidiazol) gewaschen und mit 3 ml Puffer C eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden separat gesammelt, um sie anschließend in einer SDS-PAGE (NuPAGE) zu analysieren.

2.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Rekombinant hergestellte Proteine wurden mit der SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie Färbung weiter analysiert. Verwendet wurden 12,5 %-ige SDS-Trenngele (7-8 ml pro Gel). Die in der folgenden Tabelle angegebenen Komponenten (Tab. 14) des Trenngels wurden gemischt und in die vorbereitete Höfer-Kammer zum Gießen von SDS-Gelen pipettiert, wobei immer zwei Gele parallel gegossen wurden. Jedes Gel wurde anschließend mit 200 µl 1-Butanol überschichtet. Nach Erstarren des Trenngels wurde das 1-Butanol abgegossen, mit H₂O gespült und eventuelle Reste mit Filterpapier Anschluss wurde Sammelgel abgesaugt. Im das gegossen. Die Polyacrylamidkonzentration in den verwendeten Sammelgelen betrug 4 %. Die entsprechenden Volumina sind ebenfalls der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Für die Probenvorbereitung wurden 180 μ l SDS-Probenpuffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 20 μ l β -Mercaptoethanol versetzt. 1-10 μ l des zu testenden Proteins wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l gebracht und anschließend mit 5 μ l des mit β -Mercaptoethanol versetzten SDS-Probenpuffers gemischt. Es folgte eine Inkubation über 5 min bei 95°C im Thermomixer. Sollte eine Probe z.B. "vor IPTG-Zugabe" kontrolliert werden, wurden dem Pellet stattdessen 100 μ l mit β -Mercaptoethanol versetzter SDS-Probenpuffer zugesetzt und hiervon 15 μ l einpipettiert.

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in die Probentaschen des SDS-Gels einpipettiert. Die Elektrophorese fand in einer mit SDS-Laufpuffer gefluteten Kammer bei 120 V statt und wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreichte. Anschließend wurde das Gel gefärbt oder in einem Western Blot eingesetzt.

	SDS-Trenngel 12,5 %	SDS-Sammelgel 4,0 %
30 % Bisacrylamid	8,0 ml	1067 µl
SDS Trenngelpuffer	7,5 ml	
SDS Sammelgelpuffer		1,0 ml
10 % SDS	200 µl	80 µl
H ₂ O	4,2 ml	5,7 ml
1 % Bromphenolblau		20 µl
10 % APS	170 µl	80 µl
Temed	20 µl	10 µl

Tab. 14 Komponenten für SDS-Gele

2.4.5 Coomassie-Färbung

Um die getrennten Proteine in einem SDS-Gel dazustellen, eignet sich die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Dazu wurde das Gel nach der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese für 1 h in die SDS-Coomassie-Färbelösung gelegt. Danach wurde es solange in SDS-Entfärbelösung geschwenkt (meist über Nacht), bis der Hintergrund vollständig entfärbte und die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Um das Gel zu trocknen, wurde es zuerst für etwa 1 h in einer Trocknungslösung gebadet, luftblasenfrei zwischen zwei in Trocknungslösung getauchte Zellophanfolien gelegt und abschließend über Nacht in einen Rahmen eingespannt.

2.5 Charakterisierung der *A.fumigatus* Aspf3-Deletionsmutante und Komplementmutante

2.5.1 Wachstumskontrolle der Aspf3-Deletions- und Komplementmutante

Die Aspf3-Deletionsmutante und ihre -Komplementmutante wurden im Vergleich zum *A.fumigatus*-Wildtyp D141 auf ihr Wachstum unter oxidativen Stress getestet. Zu diesem Zweck wurden die Stämme auf MM-Agar (Petrischale, 94/16 mm) ausplattiert. Auf den MM-Agarplatten wurden jeweils 1×10^5 Konidien ausplattiert. Dazu wurden 100 µl einer Sporensuspension mit der Konzentration 1×10^6 Konidien/ml verwendet. Anschließend wurden mit einer umgedrehten 10 µl-Pipettenspitze Löcher in die Plattenmitten gestanzt. In diese Löcher wurden 20 µl verschiedener Konzentrationen der zu testenden H₂O₂-Lösung pipettiert. Nach Inkubation der Platten über 48 h bei 30°C wurden die Hemmhofdurchmesser verglichen.

2.6. Tierexperimentelle Arbeiten

2.6.1 Tierhaltung

Für die Immunisierungs- bzw. Infektionsversuche wurden weibliche, ca. 6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden auf Sägespäneeinstreu in Standardkäfigen gehalten, *ad libitum* mit einem pelletierten, kommerziellen Alleinfuttermittel gefüttert und über Flaschentränken mit Wasser versorgt.

2.6.2 Immunisierung mit rekombinanten A. fumigatus-Proteinen im Mausmodell

Mehrere Proteine von *A.fumigatus*, in *E.coli* rekombinant exprimiert, wurden aufbereitet und an Mäuse verimpft. Die Impfstoffe (Gesamtvolumen der Impfdosis: 25 μ l Impfstoff + 25 μ l Adjuvans TiterMax[®]) bestanden jeweils aus insgesamt drei unterschiedlichen Proteinen (Kombinationsimpfstoff). Jedes Protein lag dabei in einer absoluten Menge von 15 μ g vor (45 μ g insgesamt pro Impfdosis).

Die Antigene für mehrere Mäuse wurden mit einer 2 ml-Spritze und einer 18 Gauge-Nadel aufgezogen. In einem Reaktionsgefäß erfolgte die Vermischung der Antigene mit dem TiterMax[®] durch wiederholtes Aufziehen der Spritze. Zur Verimpfung wurde die milchige Suspension mit einer 1 ml-Spritze aufgezogen, und 50 µl der entsprechenden Suspension wurden an Mäuse s.c. (subkutan, unter die Haut) in die Rückenfalte verimpft. Die Kontrollgruppe bekam TiterMax[®] 1:1 mit 1x PBS gemischt gespritzt. Die Immunisierung wurde nach 14 Tagen einmal wiederholt. Weitere 21 Tage später erfolgt die Immunsuppression, weitere drei Tage später eine weitere Immunsuppression und die Infizierung der Mäuse.

2.6.3 Immunsuppression der Mäuse mit A.fumigatus-Konidien

An den Tagen der Immunsuppression (Tag -3 und 0) wurden die Mäuse gewogen (alle Mäuse zwischen 20 und 23 Gramm, leichtere Mäuse wurden aussortiert) und die Cortisonacetat-Lösung hergestellt. Dazu wurde die Lösung in 1x PBS (125 mg/ml) in ein 12 ml-Zellkulturröhrchen (mit rundem Boden) angesetzt. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung mit dem Stab-Ultraschallgerät auf Eis über 5 min auf Output Stufe 2,5 bei einem Unterbrechungszyklus von 30 %. Die Suspension wurde vor

Verabreichung für mindestens 30 min auf dem Drehrad gemischt. Die Mäuse wurden drei Tage vor der Infektion und am Tag der Infektion mit 25 mg Cortisonacetat-Lösung immunsupprimiert (Abb. 4). Pro Maus wurden 200 µl der Cortisonacetat-Lösung intraperitoneal (i.p.) gespritzt.



Abb. 4: Zeitschema zur Immunsuppression und Infektion der Mäuse.

2.6.4 Infektion der Mäuse mit A. fumigatus-Konidien

Am Tag der Infektion wurde eine *A.fumigatus*-Sporensuspension hergestellt (s. 2.2.7). Für die Induktion einer IA mit *A.fumigatus* wurden die in CO₂-Atmosphäre betäubten, auf dem Rücken liegenden Mäuse mit 35 μ l Konidiensuspension (3x10⁶) nasal infiziert. Um eine bakterielle Infektion zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser CotrimK zugesetzt (0,8 mg/ml Sulfamethoxazol und 0,16 mg/ml Trimethoprim) [64]. Die Tiere wurden zehn Tagen nach Infektion, oder aber beim Auftreten schwerer Krankheitszeichen auch vorzeitig, in CO₂-Atmosphäre getötet. Zur Ermittlung der Belastung dienten neben der regelmäßigen Beurteilung von Allgemeinzustand und Spontanverhalten das Auftreten einer Atemnot, sowie die tägliche Gewichtskontrolle. Bei ca. 20 % Gewichtsverlust (innerhalb von 48 h) wurden die Tiere getötet. Getötete Tiere wurden seziert, die Lungen homogenisiert und die Extrakte auf die Anzahl der Kolonie-formenden Einheiten (CFU) untersucht. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit physiologischer NaCl in 1:10-Stufen hergestellt (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³). Von diesen Verdünnungsreihen wurden auf drei Sabouraud-Platten jeweils 100 μ l ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Gen-Deletionsmutanten und Komplementmutanten in *A.fumigatus*

3.1.1 Herstellung von \Delta HP16

Deletionsplasmid

Für die prominentesten Spots aus der Proteomanalyse (diese konnten einem einzelnen Protein (HP16) zugeordnet werden) ([15]; s. Einleitung 1.7) wurde eine Single-Knockout Mutante generiert. Dazu wurde das kodierende Gen AFUA_1G13670 (hier bezeichnet als *HP16*) des hypothetischen Proteins HP16 mit Hilfe einer Gen-Replacement-Strategie selektiv durch homologe Rekombination aus dem Genom von *A.fumigatus* entfernt (Abb. 5).



Abb. 5: a) Verwendete Cross-over Strategie bei der homologen Rekombination zur Generierung der Deletionsmutante HP16. b) \triangle HP16-Genom mit den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen (*Cla*I und *Eco*RI), mit denen der Verdau für den Southern Blot durchgeführt wurde.

Die beiden flankierenden Bereiche des Gens, an denen das Cross-over stattfinden sollte, wurden mittels nested-PCR amplifiziert (Tab.7: Primer HP16-1 bis HP16-8). Eine Zwischenklonierung der Amplifikate erfolgte in den pBlueskript II SK+*Pac*I-Vektor (Abb. 6a, s. Anhang; Abb. 41). Im folgenden Schritt wurde dieser Vektor mit *Sfi*I geschnitten. Ebenso wurde der Vektor psk397 (s. Anhang Abb. 42) mit *Sfi*I verdaut. Zwischen die beiden flankierenden Sequenzen wurde das Resistenz-liefernde Insert aus pSK397 kloniert. Das Insert enthält als Selektionsmarker das *hph*-Gen, wodurch eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B vermittelt wird. Das so erstellte Deletionsplasmid pHP16-del (Abb. 6b) wurde über Restriktionsanalysen im Agarosegel kontrolliert. Die erwarteten Fragmentgrößen nach einem Restriktionsverdau mit *Sal*I lagen bei 1198 bp, 3385 bp und 4222 bp (Abb. 6c).



Abb. 6: a) pBlueskript II SK+*Pac*I-Vektor mit einklonierten flankierenden Bereichen des Gens. b) Deletionsplamid pHP16-del mit den Restriktionsschnittstellen *Sal*I, *NotI/Pac*I bzw. *Xho*I. Das Deletionsplasmid hatte eine Größe von 8805 bp. c) Kontrolle der extrahierten Plasmide 1-6 aus verschiedenen *E.coli*-Kulturen nach *Sal*I-Verdau. d) Kontrolle des Deletionsplasmids 1 nach einem *NotI/Pac*I-Doppelverdau bzw. einem Verdau mit *Xho*I. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTMDNA Ladder Mix verwendet.

Das Deletionsplasmid pHP16-del/1 wurde, zur zusätzlichen Kontrolle, noch in einem Doppelverdau mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Not*I und *Pac*I und des Weiteren noch mit *Xho*I verdaut. Die erwarteten Fragmentgrößen von 2899 bp und 5906 bp, nach dem Verdau mit *Not*I und *Pac*I, und auch die Fragmentgrößen von 275 bp (hier nicht sichtbar dargestellt), 3898 bp und 4632 bp für den Restriktionsverdau mit *Xho*I konnten bestätigt werden (Abb. 6d).

Transformation von A. fumigatus-Sphäroplasten mit dem Deletionsplasmid pHP16-del

Das Deletionsplasmid pHP16-del wurde mit NotI und PacI verdaut (Abb. 6b), wodurch die Transformationskassette ausgeschnitten wurde. Um die Kassette in das Genom von A.fumigatus einschleusen zu können, wurden zunächst Sphäroplasten des Aspergillus-Stammes D141 gewonnen (s. 2.2.9). Nach der Transformation konnten die hygromycinresistenten Transformanten durch ihr Wachstum auf hygromycinhaltigen Hierzu Agarplatten selektiert werden. wurde außerdem der Wildtyp als Negativkontrolle mitgeführt. Da Sphäroplasten von A. fumigatus multinukleär sind, waren aller Wahrscheinlichkeit nach die produzierten Transformanten heterokaryotisch. A.fumigatus bildet uninukleäre Konidien, so dass, um genetisch reine Transformanten zu erhalten, der zweimalige Transfer von Kolonien via Konidien auf Selektivagar erfolgte. Die Transformanten wurden mit den Primern HP16_screen_1 bis HP16_screen_4 (Tab.7) zunächst mittels PCR auf das gewünschte Replacementereignis gescreent (Abb. 7).



Abb. 7: Schema der Lage der Kontrollprimer HP16_screen_1 bis HP16_screen_4 nach Deletion des *HP16*-Gens.

Anhand der Abb. 8 ließ sich erkennen, dass nach der PCR-Kontrolle der Transformanten mit dem Primerpaar HP16_screen_1/2 bzw. HP16_screen_3/4 die Klone 4, 8, 10, 20 und 28 als positiv anzusehen waren.



Abb. 8: a) PCR auf Mutanten-DNA nach Deletion von HP16 mit Primerpaar HP16_screen_1 und HP16_screen_2. Die erwartete Bandengröße betrug 1446 bp. b) PCR auf Mutanten-DNA nach Deletion von HP16 mit Primerpaar HP16_screen_3 und HP16_screen_4. Die erwartete Bandengröße betrug 1430 bp. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTM DNA Ladder Mix verwendet.

Kontrolle mittels Southern Blot

Von den fünf mittels PCR identifizierten Transformanten, mit wahrscheinlich homologer Integration der Replacementkassette, wurden die beiden Transformanten 8 und 28 zur weiteren Analyse im Southern Blot ausgewählt. Die extrahierte und gereinigte DNA der Transformanten wurde mit den Restriktionsenzymen *Cla*I bzw. *Eco*RI geschnitten (Abb. 5 b) und im Agarosegel getrennt. Nach dem Blotten der DNA auf Nitrozellulose erfolgte die Hybridisierung mit einer digoxigenierten Sonde, die mit dem *A.nidulans*-Promotor pgpdA des Resistenz-liefernden Gens hybridisierte. Beide Transformanten 8 und 28 zeigten die erwarteten Bandengrößen von 2,6 kb für die Restriktionsendonuklease *Eco*RI und 7,3 kb für *Cla*I (Abb. 9).



Abb. 9: Southern Blot auf △HP16-Transformanten 8 und 28 jeweils geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *Cla*I bzw. *Eco*RI. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der DIG-markierte DNA Marker II verwendet.

3.1.2 Herstellung von Δ **HP16^K**

Herstellung des Komplementierungsplasmids

Für die Komplementierung der Deletionsmutante Δ HP16 (Abb. 13 a) wurden das *HP16*-Gen und seine flankierenden Bereiche durch PCR mit den Primerpaaren sv831/sv832 bzw. sv833/sv834 (Tab.7) amplifiziert. Ebenso wurde das *ptA*-Gen, das die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Pyrithiamin vermittelt, durch PCR (Primer sv197 und sv198) aus dem psk275-Vektor gewonnen (s. Anhang; Abb. 43). Alle PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe des GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kits mit dem linearen pUC19L (s. Anhang Abb. 44) zu einem Komplementierungsplasmid zusammenkloniert. Das so erstellte Plasmid (Abb. 10) wurde über Restriktionsanalysen im Agarosegel verifiziert.



Abb. 10: Komplementierungsplasmid pHP16-del-komplementiert mit den Restriktionsschnittstellen *Cla*I, *Eco*RI, bzw. *Hpa*I. Das Komplementierungsplasmid hatte eine Größe von 8291 bp.

Die erwarteten Fragmentgrößen nach einem Restriktionsverdau mit *Cla*I lagen bei 70 bp, 2398 bp und 5823 bp. Nach einem Restriktionsverdau mit *Eco*RI wurden Fragmente von 2402 bp, 2677 bp und 3212 bp erwartet. Dies traf auf das Komplementierungsplasmid 17 zu (Abb. 11).



Abb. 11: Kontrolle des Komplementierungsplasmids 17 nach *Cla*I- bzw. *Eco*RI- Verdau. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTM DNA Ladder Mix verwendet.
Transformation von A.fumigatus-Sphäroplasten mit dem Komplementierungsplasmid

Das Komplemtierungsplasmid pHP16-del-komplementiert wurde mit der Restriktionsendonuklease HpaI verdaut (Abb. 10), um das Plasmid zu linearisieren und die Transformationskassette auszuschneiden. Durch anschließende homologe Rekombination wurde es im Zuge der Transformation in die Deletionsmutante Δ HP16 (Transformante 8) eingebracht. Um die Kassette in das Genom von A.fumigatus einzuschleusen, wurden zunächst Sphäroplasten der Aspergillus-Knockoutmutante ΔHP16 generiert. Nach der Transformation konnten die pyrithiaminresistenten Transformanten durch ihr Wachstum auf pyrithiaminhaltigen Agarplatten selektiert werden. Hierzu wurde außerdem der Wildtyp D141 als Negativkontrolle mitgeführt. Die Transformanten wurden mit den Primern HP16_ReplacTrafo_1 bis HP16_ReplacTrafo_4 (Tab.7) mittels PCR auf das gewünschte Replacementereignis gescreent. Anhand der Abb. 12 lässt sich erkennen, dass nach der PCR-Kontrolle der HP16_ReplacTrafo_1/2 Transformanten mit dem Primerpaar bzw. HP16 ReplacTrafo 3/4 die Klone 11,13,14,18,19 und 30 als positiv anzusehen waren.



Abb. 12: a) PCR auf Mutanten-DNA nach Komplementierung von △HP16 mit Primerpaar HP16_ReplacTrafo_1 und HP16_ReplacTrafo_2. Die erwartete Bandengröße betrug 1403 bp. b) PCR auf Mutanten-DNA nach Komplementierung von △HP16 mit Primerpaar HP16_ReplacTrafo_3 und HP16_ReplacTrafo_4. Die erwartete Bandengröße betrug 1695 bp. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTM DNA Ladder Mix verwendet.

Kontrolle mittels Southern Blot

Von den sechs durch PCR identifizierten Transformanten mit wahrscheinlich homologer Integration wurden die Transformanten 11, 18 und 30 zur weiteren Analyse im Southern Blot ausgewählt. Die extrahierte und gereinigte DNA der Transformanten wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RV bzw. *Stu*I geschnitten (Abb. 13 b) und im Agarosegel getrennt. Nach dem Blotten der DNA auf Nitrozellulose erfolgte die Hybridisierung mit einer digoxigenierten Sonde, die den *A.oryzae*-Promotor pptrA des Resistenz-liefernden Gens als Ziel hatte. Die Transformante 18 erbrachte die erwarteten Bandengrößen von 4,6 kb für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV und 5,5 kb für *Stu*I (Abb. 14).



Abb. 13: a) Verwendete Cross-over Strategie bei der homologen Rekombination zur Generierung der HP16-Komplementmutante. b) Genom der Komplementmutante mit den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen (*Eco*RV und *Stu*I), mit denen der Verdau für den Southern Blot durchgeführt wurde.



Abb. 14: Southern Blot auf HP16-Komplementmutante. Transformanten 11, 18 und 30, jeweils geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RV bzw. *Stu*I. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der DIG-markierte DNA Marker II verwendet.

3.1.3 Herstellung von \Delta Aspf3^K

Herstellung des Komplementierungsplamids

Für die Komplementierung der Deletionsmutante Δ Aspf3 (Abb. 15) wurden das *Aspf3*-Gen und die flankierenden Bereiche durch nested-PCR auf der genomischen DNA des *A.fumigatus* Wildtyps D141 mit den Primerpaaren Aspf3-Rekom_5/Aspf3-Rekom_6 (1.PCR: Aspf3-nested_1/Aspf3-nested_2) bzw. Aspf3-Rekom_1/Aspf3-Rekom_2 (1.PCR: Aspf3-nested_3/Aspf3-nested_4) amplifiziert. Siehe dazu auch die Tab.7. Außerdem wurde das *ptA*-Gen, das die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Pyrithiamin vermittelte, mittels PCR mit den Primern Aspf3-Rekom_3 und Aspf3-Rekom_4 (1. PCR: Aspf3-nested_5/Aspf3-nested_6) amplifiziert.



Komplementmutante Aspf3

Abb. 15: Verwendete Cross-over Strategie bei der homologen Rekombination zur Generierung der Komplementmutante Aspf3.

Alle PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe des GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kits mit dem linearen pUC19L (s. Anhang Abb. 44) zu einem Komplementierungsplasmid zusammenkloniert. Das so erstellte Plasmid Aspf3-delkomplementiert (Abb. 16) wurde über Restriktionsanalysen im Agarosegel kontrolliert.



Abb. 16: Komplementierungsplasmid pAspf3-del-komplementiert mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI, *Kpn*I bzw. *Hpa*I. Das Komplementierungsplasmid hatte eine Größe von 10186 bp.

Die erwarteten Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI lagen bei 1880 bp und 8306 bp. Nach Restriktionsverdau mit *Kpn*I wurden Fragmente von 4681 bp und 5505 bp erwartet. Dies traf auf das Komplementierungsplasmid 11 zu (Abb. 17). Dieses Plasmid wurde dann mit der Restriktionsendonuklease *Hpa*I linearisiert und abschließend durch homologe Rekombination im Zuge der Transformation in die Deletionsmutante Δ Aspf3 (Transformante 5) eingebracht.



Abb. 17: Kontrolle der Komplementierungsplasmide 9 und 11 nach einem *Bam*HI-, bzw. *Kpn*I-Verdau. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTM DNA Ladder Mix verwendet.

Transformation von A.fumigatus-Sphäroplasten mit Aspf3-Komplemtierungsplasmid

Das Komplementierungsplasmid pAspf3-del-komplementiert wurde mit HpaI verdaut (Abb. 16), um das Plasmid zu linearisieren und die Transformationskassette auszuschneiden. Um die Kassette in das Genom von A.fumigatus einschleusen zu können, wurden zunächst Sphäroplasten der Aspergillus-Knockoutmutante Δ Aspf3 Transformation gewonnen. Nach der konnten die pyrithiaminresistenten Transformanten durch ihr Wachstum auf pyrithiaminhaltigen Agarplatten selektiert werden. Hierzu wurde außerdem der Wildtyp D141 als Negativkontrolle mitgeführt. Die Transformanten wurden mit den Primern Aspf3_ReplacTrafo_3 bis Aspf3_ReplacTrafo_6 (Tab.7) mittels PCR auf das gewünschte Replacementereignis gescreent (Abb. 18).



Abb. 18: Schema der Lage der Kontrollprimer Aspf3_ReplacTrafo_3 bis Aspf3_ReplacTrafo_6 nach erfolgter Transformation.

Anhand der Abb. 19 ließ sich erkennen, dass nach der PCR-Kontrolle der Transformanten mit dem Primerpaar Aspf3_ReplacTrafo_3/4 bzw. Aspf3_ReplacTrafo_5/6 die Klone 8,18 und 30 als positiv anzusehen waren.



Abb. 19: a) PCR auf Mutanten-DNA nach Komplementierung von △Aspf3 mit Primerpaar Aspf3_ReplacTrafo_3/4. Die erwartete Bandengröße betrug 2060 bp. b) PCR auf Mutanten-DNA nach Komplementierung von Aspf3 mit Primerpaar Aspf3_ReplacTrafo_5/6. Die erwartete Bandengröße betrug 2620 bp. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde der MassRulerTM DNA Ladder Mix verwendet.

3.2 Biochemische Charakterisierung der *Aspf*3-Deletionsmutante und – Komplementmutante

Die Aspf3-Deletionsmutante wurde im Vergleich mit der Komplementmutante und dem Wildtyp D141 auf ihr Wachstum unter oxidativem Stress getestet. Dies wurde mit einem Agar-Diffusionstests unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an H_2O_2

untersucht. Bei der Deletionsmutante konnte ein deutlich größerer Hemmhof festgestellt werden als bei den beiden anderen ausplattierten Stämmen. Bei einem Vergleich des Wachstums der Komplementmutante und des Wildtyps konnte kein Unterschied in der Größe des Hemmhofdurchmessers ausgemacht werden (Abb. 20), allerdings sporulierte die Komplementmutante nicht so stark wie der Wildtyp (Abb. 21).



Abb. 20: Auswertung des Agardiffussionstests, dabei ist der Hemmhofdurchmesser gegen die jeweilige Konzentration an H_2O_2 aufgetragen.



Abb. 21: Beispielhafter Agardiffusionstest mit 20µl einer 3,3 %- und 10 %-igen H₂O₂-Lösung im Vergleich mit Δ Aspf, Δ Aspf3^K und dem Wildtyp D141

3.3 Herstellung des rekombinanten Proteins HP16

3.3.1 Expression von HP16 in E.coli unter Verwendung eines His-Tags

Die unter diesem Punkt 3.3.2 beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Frau Pähtz, Doktorandin in der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Brakhage am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans Knöll Institut (HKI, Jena) durchgeführt.

Der Vektor pMA-T_Afu1g13670_23-218 (HP16), mit dem synthetisch hergestellten Genabschnitt, wurde mit dem Primerpaar Afu1g13670_23*Bam*HIf/ Afu1g13670_182*Hin*dIIIr für eine kurze Version des Proteins (AS 23-182), bzw. dem Primerpaar Afu1g13670_23*Bam*HIf/ Afu1g13670_218*Hin*dIIIr (Primer s. Tab.7), für eine lange Version des Proteins (AS 23-218) mittels PCR amplifiziert (Abb. 22). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pET28aHT-Vektor kloniert, der eine N-terminale Fusion mit dem His-Tag erlaubte. (s. Anhang, Abb. 45 a und b).



Abb. 22: Vektor pMA-T_Afu1g13670_23-218 mit synthetisch hergestellter kodierender Nukleotidsequenz (AS 23-218) und Schema der Lage der Primer Afu1g13670_23BamHI, Afu1g13670_182HindIII und Afu1g13670_218HindIII.

Die transformierten BL21(DE3)-Expressionsstämme wurden in einem Mini-Expressionsversuch getestet. Die SDS-PAGE (Abb. 23, durch rote Markierungen gekennzeichnet) zeigt deutlich die kurze (22,37 kDa) als auch lange Version (26,2 kDa) des Proteins.



Abb. 23: SDS-PAGE des Mini-Expressionsversuchs unter Verwendung des His-Tags. Lösliche und unlösliche Proteinfraktionen wurden dabei getrennt.

Sowohl die kurze als auch lange Version des Proteins konnten im Mini-Expressionsversuch erzeugt werden. Die SDS-PAGE (Abb. 23) zeigte, dass das Protein sich in der löslichen Zellfraktion befindet. Es folgte eine Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-Sepharose mit Hilfe einer His GraviTrap-Säule. Dafür wurde sowohl die kurze als auch die lange Version des Proteins mit dem fusionierten His-Tag genutzt (Abb. 24).



Abb. 24 SDS-PAGE des exprimierten rekombinanten HP16-Proteins (mit His-Tag) nach der Ni-Affinitätschromatographie. Alle Proben stammen aus löslichem Zellextrakt und nach vorhergehender Anzucht in TB-Medium. Proben 1-5 für die verkürzte Version und 7-10 für die längere Version des Proteins.

3.4. Etablierung eines Mausmodells mit Dosisfindungsstudie

Zur Etablierung eines Mausmodells für die invasive Aspergillose wurden die ersten Vorversuche in Anlehnung an Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen durchgeführt. Nach weiteren Optimierungen wurde ein eigenes modifiziertes Mausmodell etabliert.

Für den ersten Vorversuch wurden NMRI Mäuse verwendet, die mit unterschiedlichen Mengen an Konidien nasal infiziert wurden. Die Mengen beliefen sich auf 5×10^6 , $3,33 \times 10^5$ bzw. $2,22 \times 10^4$ Konidien. Das Cortisonacetat wurde, um es einfacher in die Maus injizieren zu können, in einem Ultraschallbad vorbehandelt. Stellt man den prozentualen Anteil überlebender Mäuse nach einer Infektion (p.i.; *post infectionem*) in den drei Gruppen gegenüber (Abb. 25), wird deutlich, dass die Mäuse der Gruppe 1 spätestens an Tag 3 verstarben bzw. getötet werden mussten, dabei waren acht von zehn Mäusen an dem Tag betroffen. In Gruppe 2 starben vier von zehn Mäusen bzw. mussten getötet werden. In Gruppe 3 überlebten alle Mäuse bis auf eine.



Abb. 25: Prozentualer Anteil überlebender Mäuse je Tag p.i. bei unterschiedlichen Dosen von Konidien in den einzelnen Gruppen bei der Durchführung des ersten Vorversuchs.

Nach dem ersten Vorversuch wurden einzelne Parameter geändert. Es wurden BALB/c Mäuse (Inzuchtmäuse) verwendet, und das Cortisonacetat wurde, um eine noch feinere Suspension zu erreichen, mit einem Stab-Ultraschallgerät behandelt. Die Mengen an Konidien beliefen sich bei dem zweiten Vorversuch auf $4x10^6$, $2x10^6$ bzw. $1x10^6$. Der Verlauf für den prozentualen Anteil überlebender Mäuse (Abb. 26) ist für die Gruppen 1 und 2 besser verteilt als für Gruppe 3, so wurde die Menge an Konidien auf $3x10^6$ für alle nachfolgenden Versuche festgesetzt.



Abb. 26: Prozentualer Anteil überlebender Mäuse je Tag p.i. bei unterschiedlichen Dosen von Konidien in den einzelnen Gruppen bei der Durchführung des zweiten Vorversuchs.

3.5 Immunisierung mit rekombinanten *A.fumigatus*-Proteinen im Mausmodell

Die rekombinant hergestellten Proteine wurden im Tierversuch auf ihre Potenz zur Induktion einer protektiven Immunantwort untersucht. Wegen der bekannten Streuung der Ergebnisse war das Mitführen einer Negativ-Kontrollgruppe bei jedem Versuch notwendig. Dieser Negativgruppe wurde nur das Adjuvans TiterMax® in PBS ohne Impfstoff injiziert. Alle Mäuse wurden regelmäßig Beurteilung des zur Allgemeinzustandes gewogen, wobei eventuelle Gewichtversänderungen erfasst wurden (nicht dargestellt). Nachfolgend genannte Proteine wurden vorwiegend teilexprimiert verwendet (s. Tab. 11).

Impfgruppe 1 (AAT, PG, PG3/4)

Der Impfstoff für die Gruppe 1 bestand aus dem Protein Aspartat-Aminotransferase (AAT) und dem in zwei Teilen exprimierten Protein der Phosphoglucomutase PdcA (PG und PG3/4). Ein Vergleich der Überlebenskurven (Abb. 27) von Impf- und Kontrollgruppe erbrachte keine signifikante Protektion durch den Impfstoff (P=0,7667).



Abb. 27: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppe 1 im Vergleich zu der Negativ-Kontrollgruppe.

Impfgruppe 2 (Aspf3) und Impfgruppe 3 (Enolase, HSP90, TBP)

Der Impfstoff für die Gruppe 2 bestand aus dem rekombinanten Protein Aspf3 (Peroxireduktase). Für die Impfgruppe 3 wurden die rekombinanten Proteine Enolase, HSP90 und Thiamin-Biosynthese Protein Nmt1 (TBP) verwendet. Ein Vergleich der Überlebenskurven erbrachte, dass in den beiden Impfgruppen weniger Mäuse als in der Negativ-Kontrollgruppe starben bzw. getötet werden mussten (Abb. 28). Sowohl für die Impfgruppe 2 (*P=0,0412) als auch für die Impfgruppe 3 (*P=0,0121) wurde ein signifikant protektiver Effekt durch Injektion des Impfstoffes erzielt. Nach Aufarbeitung der Lungen und dem sich anschließenden Vergleich des Ergebnisses der Kolonie formenden Units pro Maus pro Gruppe konnte festgestellt werden, dass bei der

Impfgruppe 3 auch die Besiedelung mit *A.fumigatus* im Laufe der zehn Beobachtungstage abnahm (nicht dargestellt).



Abb. 28: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppen 2 und 3 im Vergleich zu der Negativ-Kontrollgruppe.

Impfgruppe 4 (ADH, AP, AP5/6) und Impfgruppe 5 (COA, DI, DI3/4)

Der Impfstoff für die Gruppe 4 bestand aus dem Protein Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und dem in zwei Teilen exprimierten Protein Aminopeptidase (AP und AP5/6). Für die Impfgruppe 5 wurden die rekombinanten Proteine Coatomer, Delta-Untereinheit (COA) und das in zwei Teilen exprimierte Protein Disulfid-Isomerase Pdi1 (DI und DI3/4) verwendet. Ein Vergleich der Überlebenskurven (Abb. 29) ergab, dass in der Impfgruppe 4 mehr Mäuse als in der Negativ-Kontrollgruppe starben bzw. getötet werden mussten. Auch ein Vergleich von Impfgruppe 5 und Kontrollgruppe erbrachte keine Protektion durch den Impfstoff (P=0,9677).



Abb. 29: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppen 4 und 5 im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe.

Impfgruppe 6 (INVO3/4, BGT, BGT3/4), Impfgruppe 7 (MIPS, PGM, PGM3/4) und Impfgruppe 8 (ALAD, TK, HP90)

Der Impfstoff für die Gruppe 6 bestand aus dem Involucrin-Repeat-Protein (INVO3/4) und dem in zwei Teilen exprimierten Protein 1,3-beta-Glucanosyltransferase (BGT und BGT3/4). Für die Impfgruppe 7 wurden das rekombinante Protein Myo-Inositol-Phosphat-Synthase (MIPS) und in zwei Teilen exprimierte das Protein Phosphoglyceratmutase (PGM und PGM3/4) verwendet. Der Impfstoff für die Gruppe 8 Aldolase ClassII/ Adducin-Domain-Protein bestand aus dem (ALAD), der Transketolase TktA (TK) und dem konservierten hypothetischen Protein Hp90 (HP90). In der Impfgruppe 7 starben weniger Mäuse als in der Negativ-Kontrollgruppe bzw. mussten getötet werden. Die Auswertung der Überlebenskurven (Abb. 30) der jeweiligen Impfgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte jedoch keine Protektion durch einen der Impfstoffe (Impfgruppe 6: P=0,571; Impfgruppe 7: P=0,2788; Impfgruppe 8: P=0,5831).



Abb. 30: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppen 6, 7 und 8 im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe.

Impfgruppe 9 (HP10, HSP30,GAPD), Impfgruppe 10 (HP70, SHMT, MPRO5/6) und Impfgruppe 11 (ADMA, NDGD, FBA)

Der Impfstoff für die Gruppe 9 bestand aus dem konservierten hypothetischen Protein Hp10 (HP10), dem Hitzeschockprotein Hsp30 (HSP30) und der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPD). Für die Impfgruppe 10 wurden das hypothetische Protein Hp70 (HP70), die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) und das M-Repeatprotein (MPRO5/6) verwendet. Der Impfstoff für die Gruppe 11 bestand aus der Metalloprotease ADM-A (ADMA), der NAD+-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (NDGD) und Fruktosebiphosphataldolase, classII (FBA). Ein Vergleich der Überlebenskurven (Abb. 31) der jeweiligen Impfgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte keinen protektiven Effekt durch einen der Impfstoffe (Impfgruppe 9: P=0,8086; Impfgruppe 10: P=0,5231; Impfgruppe 11: P=0,6871).



Abb. 31: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppen 9, 10 und 11 im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe.

Vereinzelte Verimpfung der Proteine des Impfstoffes 3 (Enolase, HSP90, TBP)

Der verabreichte Impfstoff 3 schien Erfolg versprechend (Abb. 28) und wurde daher, statt zu drei Proteinen in einem Kombinationsimpfstoff, verschiedenen Mausgruppe einzeln verimpft. So bekam eine Mausgruppe die Enolase verimpft, die Gruppe 2 HSP90, und der TBP wurde der Gruppe 3 verabreicht. Ein Vergleich der Kurvenverläufe (Abb. 32) ergab, dass mehr Mäuse in der Kontrollgruppe starben als in den jeweils anderen Gruppen. Doch die Auswertung der Überlebenskurven der jeweiligen Impfgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte keine signifikante Protektion durch einen der einzelnen Impfstoffe (Enolase: P=0,4379; TBP: P=0,1450; HSP90: P=0,0848).



Abb. 32: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für drei verschiedene Gruppen, denen einzelne Impfproteine verabreicht wurden im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe.

Wiederholung der Impfgruppe 3 (Enolase, HP90, TBP) und Impfgruppe 7 (MIPS, PGM, PGM3/4)

Die verabreichten Impfstoffe 3 und 7 sahen in Bezug auf den prozentualen Anteil überlebender Mäuse je Tag p.i. in den einzelnen Gruppen sehr vielversprechend aus (Abb. 28 und Abb. 30) und die Verimpfung dieser beiden Impfstoffe wurde zur Bestätigung ein zweites Mal durchgeführt. Ein Vergleich der Überlebenskurven (Abb. 33) von Impfgruppe 3 bzw. 7 und der Kontrollgruppe erbrachte keinen schützenden Effekt durch einer der jeweiligen Impfstoffe (Impfgruppe 3: P=0,2510 und Impfgruppe 7: P=0,5785).



Abb. 33: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Impfgruppe 3 und 7 im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe.

3.6 Virulenztestung der *A.fumigatus*-Deletionsmutanten im Vergleich zu ihrer Komplementmutanten und dem Wildtyp D141

Erste Testung: Deletionsmutante AHP16 im Vergleich zum Wildtyp D141

Zehn Mäuse wurden mit der Deletionsmutante Δ HP16 infiziert und mit einer Gruppe von zehn mit dem Wildtyp D141 infizierten Mäusen verglichen. In Abb. 34 sind die Ergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen dargestellt. In der Gruppe, die den Wildtyp D141 verabreicht bekam, starben alle Mäuse bis auf eine in den ersten 7 Tagen. Im Gegensatz dazu starben in der Gruppe, die mit der Deletionsmutante infiziert wurde, nur vier von zehn Mäusen. Der Virulenzunterschied ist als signifikant anzusehen (*P=0,0115).



Abb. 34: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Infizierung mit der Deletionsmutante ∆HP16 im Vergleich zu Wildtyp D141.

<u>Zweite Testung: Deletionsmutante Δ HP16, Komplementmutante Δ HP16^K und Wildtyp</u>

Auf Grund der signifikanten Virulenzminderung der Deletionsmutante AHP16 wurde zur Bestätigung der molekularen Kausalität eine Komplementmutante $\Delta HP16^{K}$ zu dieser hergestellt (s. 3.1.2). Alle Mutanten und der Wildtyp D141 wurden anschließend im Vergleich von der kooperierenden Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Brakhage am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans Knöll Institut (HKI) in Jena, hinsichtlich ihrer Virulenz im Mausmodell getestet. Der Versuch wurde mit CD-1 Mäusen (Auszuchtstamm, 18-20g, 6-8 Wochen), die in individuell ventilierten Käfigen gehalten wurden, durchgeführt. Die Versuchsdurchführung entsprach ansonsten weitestgehend der unter 2.6.3 und 2.6.4 beschriebenen Vorgehensweise.

Je zehn Mäuse wurden mit der Deletionsmutante Δ HP16, der Komplementmutante Δ HP16^K und dem Wildtyp D141 infiziert. Außerdem wurde noch eine weitere Kontrollgruppe eingesetzt, die mit keinem der *Aspergillus*-Stämme infiziert wurde und stattdessen nur PBS verabreicht bekam. In Abb. 35 sind die Ergebnisse nach einem

Beobachtungszeitraum von 14 Tagen dargestellt. In den Gruppen, die die Komplementmutante bzw. den Wildtyp D141 verabreicht bekamen, starben mehr Mäuse bzw. mussten mehr Mäuse getötet werden. Dies waren neun von zehn Mäusen für die Komplementmutante und alle Mäuse für den Wildtyp. Die bereits im ersten Versuch festgestellte signifikante Virulenzminderung ließ sich bestätigen. Es sind sowohl der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ HP16 und dem Wildtyp D141 (**P=0,0019), als auch der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ HP16 und der Komplementmutante Δ HP16^K (**P=0,0043) als hoch signifikant anzusehen. Die Komplementmutante zeigte sich hingegen mit nicht signifikanter Virulenzminderung gegenüber dem Wildtyp (P=0,4435).



Abb. 35: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der 14 Beobachtungstage für die Infizierung mit der Deletionsmutante \triangle HP16, der Komplementmutante \triangle HP16^K, dem Wildtyp D141 und der Kontrollgruppe.

Deletionsmutante Δ Aspf3, Komplementmutante Δ Aspf3^K und Wildtyp D141

Elf Mäuse wurden mit der Deletionsmutante $\Delta Aspf3$ bzw. der Komplementmutante $\Delta Aspf3^{K}$ infiziert und mit einer Gruppe von elf mit dem Wildtyp D141 infizierten Mäusen verglichen. In Abb. 36 sind die Ergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen dargestellt. In der Gruppe, die den Wildtyp D141 verabreicht bekam,

starben alle Mäuse bis auf eine in den ersten 7 Tagen. Im Gegensatz dazu überlebten in der Gruppe, die mit der Deletionsmutante infiziert wurde, alle Mäuse. In der Gruppe, welche die Komplementmutante verabreicht bekam, starben vier von 11 Mäusen.

(***P=0,0001). D141 ist höchst signifikant Dahingegen zeigte sich der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante $\Delta Aspf3$ und der Komplementmutante $\Delta Aspf3^{K}$ nur als hoch signifikant (**P=0,0306). Somit konnte bei der Komplementmutante keine vollständige Restauration der Virulenz erzielt werden.



Abb. 36: Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen aufgeführt für jeden der zehn Beobachtungstage für die Infizierung mit der Deletionsmutante \triangle Aspf3 und der Komplementmutante \triangle Aspf3^K im Vergleich zu Wildtyp D141.

4 Diskussion

4.1 Deletionsmutante ΔHP16 eines ausgewählten Konidienoberflächenproteins von *A.fumigatus*

A.fumigatus ist als ein fakultativ pathogener Schimmelpilz anzusehen, denn beim gesunden immunkompetenten Menschen werden die eingeatmeten Konidien durch die angeborene Immunität abgetötet. Doch bei immunsupprimierten Menschen, z.B. organtransplantierten Patienten oder Patienten mit Leukämie, kann diese Resistenz versagen und eine invasive Infektion sich etablieren [70]. Dabei ist A.fumigatus der häufigste Erreger invasiver, meist tödlich verlaufender Schimmelpilzmykosen stark immunsupprimierter Patienten. Für das Verständnis der Pathogenese ist dabei die Suche an ihr beteiligten Faktoren entscheidend. Dabei vermittelt die nach den Konidienoberfläche den ersten Kontakt mit menschlichen Zellen und ist so in die primäre Phase der Infektion eingebunden [15]. Oberflächenproteine könnten in dieser initialen Phase der Infektion z.B. über eine Beeinflussung von Adhärenz und Phagozytose oder auch immunologische Modulationen (z.B. Antigenmaskierung) gegebenenfalls als pharmakologische Targets wirken und so oder auch Impfstoffkandidaten in Frage kommen.

In dieser Arbeit konnte im Tierversuch bewiesen werden, dass das hypothetische Konidienoberflächenprotein (HP) HP16 entscheidend an der Virulenz von A.fumigatus beteiligt ist. Das Protein HP16 wurde zur Untersuchung ausgewählt, da es zuvor in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Utz Reichard (Göttingen) [15] mit Hilfe einer dominanten zweidimensionalen Gelektrophorese (2-D) als eines der Konidienoberflächenproteine dargestellt (Abb. 37) werden konnte. Für das 2-D-Gelbild wurden die Proteine eines Extraktes der Konidienoberfläche anhand ihres isoelektrischen Punktes und nach Größe getrennt. Die Proteine wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert und mit Hilfe des Genomprojektes identifiziert [71]. Die Funktion einiger dieser Proteine ist unbekannt. Bei Betrachtung des 2-D-Gelbildes imponiert das Protein 18 (Abb. 37, durch grüne Pfeile markiert). Es handelt sich hierbei um ein bekanntes Protein, das RodA (AFUA_5G09580), das einen wichtigen Teil der konidialen Zellwand, die sogenannte Rodlet-Schicht, ausbildet [30]. Eine weitere prominente Spotgruppe konnte dem HP16 (Abb. 37, durch rote Markierungen gekennzeichnet) zugeordnet werden. Diese multiplen Spots könnten z.B. durch partielle Degradation oder verschiedene Glykolisierungszustände bedingt sein. Das für HP16 kodierende Gen wurde in dieser Arbeit durch ein Gen-Replacement selektiv aus dem Genom von *A.fumigatus* entfernt (Abb. 5).



Abb. 37: 2-D-Gelbild von extrahierten *A.fumigatus*-Konidienoberflächenproteinen nach Auftrennung anhand ihres isoelektrischen Punktes und ihrem Molekulargewicht. Grüne Pfeile: RodA; rote Markierungen: HP16.

4.2 Untersuchung des hypothetischen Proteins HP16

Das Protein HP16 wurde zuvor als Konidienoberflächenprotein identifiziert [15]. Suh et al. untersuchten 2012 die Proteine des Konidien-Proteoms zu verschiedenen Zeitpunkten der Konidienentwicklung [72], wobei HP16 ausschließlich auf ruhenden Konidien gefunden wurde.

Das Protein HP16 ist somit kein "hypothetisches" Protein mehr, sondern ein real existierendes Protein mit noch nicht vollständig bekannter Funktion (es wir hier aber weiter als HP16 bezeichnet). Da bei der *de novo*-Sequenzierung im Zusammenhang mit der Spotanalyse von Asif et al. [15] keine vollständige Sequenzierung des Proteins

erfolgte, wurden die im Genomprojekt [71] anotierten und abgeleiteten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit gängigen Onlinetools untersucht (Abb. 38). Die Nukleotid-Sequenz umfasst 757 bp und beinhaltet ein hypothetisches Intron (16-64). Die AS-Sequenz umfasst 235 AS, wobei die errechnete Molekularmasse bei 25,5 kDa liegt. Das Protein besitzt sechs Cysteinreste, die theoretisch die Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken zulassen.

ATG W	CAT H	TAC V	TCT		<mark>gtg</mark>	agc.	tct.		<mark>gtg</mark>			agg.	agc.	tgg		att	gct.	gat		<u>cca</u>	g	TTC F
n ama	п	I		V Tran		000		ama			1.00					000						r
U U	T	W GIG	oca a	S S	000 0	L L	800 8	L IG	a a	P	T	a a	W GIT	W	a a	R B		G	ð ð	a a	à CCC	F
erre.	1	erre.	- 	TCC	A TA		CTT.	TOT	- 	2 2 2	1	CTC.	× ccc	× • • • •	<u> </u>	ATC	× ATC	0 0 0 T	<u></u>	⇔ cca	- 	1
v GIC	T	V V	N	S	T	D	V U		P	K	K K	V V	à a	O CAG	E	T	T	N N	P	GGR	P	K K
• •	-	• • • • •	 	~ ~~~~	-	ACT	• •	C & T	- 	070		• ****		~ ~ ~ T	-	-	-		- 700		- 	220
V	V	T	T	P	V V	T		D	O A A	V	K	L.	G	H	GGC	L	D	V	S	V V	W N	N N
TTC	CAC.	- 1 TC	- ChC	-	- CTC	- NCC	11C	CIC.	100		CCT	TAC	TGC	110	GCT	CTC.	110	стс	TTT	CAC.	- 	Ch h
F	D	T	E	P	L.	T	K	D	T	F	P	v	C	K	A A	L	K	v	тт F	D	N	E
-	TCC	- eme	-	TTC	COT	-	TT A	TCC	ATC.	-	-	-	- 200		CTTT.	- 		- 	TOO	- 	CCT.	-
G	C	L	G	F	P	T	L	U U	I	P	L	E	S	P	L	E	D	K	C	I	P	E
CAC	TAC	TTC	NGC	CAC.	C N N	CTC.	110	TOT	ATC.	TCC	TTC	CIG	CTT	CAT.	TCC	- cee	CIC.	C.M.C.	ecc.	COT	- CTC	110
H	Y	F	S	D	E	V	K	S	I	S	F	0	L	D	C	R	E	D	A	P	V	K
0 0 G	GIG	CCN	TAT	aac	CCT	aac.	GIG.	000	GCT	GAA	CAA	TCT	CC 1	cca	C IG	GC N	616	CAT	AGT.	ACT.	1 1G	CIG
K	E	P	Y	G	P	K	E	G	A	E	0	S	A	P	0	A	E	H	S	T	K	0
GIC	- CCT	- C 3 3	CIG	COT	TCT	CIC	CIG	CGN	CIG	CIG.	ara	CIG	110	- NGC	CCT	116	CIG	CIG.	CCT	- CCC	C 1 1	COT
D	A	Q	Q	G	S	H	Q	G	Q	E	V	Q	N	S	P	K	Q	E	A	R	Q	G
TCC	166	CCG	GCN	GIG	GCT	GCT	ССТ	116	CIG	GIG	CIG	GNN	GCT	GIG	C 8 8	GCT	тст	GIG	GC 1	ece.	CCC.	<u>aia</u>
S	R	P	A	E	A	A	P	K	Q	E	Q	E	A	E	Q	A	S	E	A	A	P	E
AAA	AAG	GCC	TCA	AAC	CCT	GCT	GAC	AGT	СТС	GGC	CTG	GGC	GAA	СТС	ACA	AAG	GTG	СТС	GGT	TTC	CGG	TGA
K	К	A	S	Ν	P	A	D	S	L	G	L	G	E	L	Т	K	V	L	G	F	R	*
																						- L
757	Nukl	leot:	ide	(ink)	lusiv	7 Int	tron	und	Stop	pcodo	on)											
235	AA	(25,5	5 kDa	a)																		

Abb. 38.: Nukleotid- und Proteinsequenz von HP16. Start- und Stoppcodon sind rot und die Cysteinreste grün markiert. Das Intron ist kursiv dargestellt und die wahrscheinliche Schnittstelle für die Signalpeptidase ist mit einem blauen Balken markiert (in Anlehnung an *Aspergillus* Genome Database; http://www.*aspgd*.org/).

Mit dem NCBI-BLAST-Programm (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) konnten deutliche Homologien mit konservierten, hypothetischen, nicht-charakterisierten Proteinen anderer *Aspergillus*-Arten gefunden werden. Die Proteine mit der größten Übereinstimmung gehören zu den folgenden Spezies: *A.fischerianus* (83 %), *A.clavatus* (36 %) *und A.nidulans* (29 %). Der Kyte/Doolittle-Hydropathie-Plot von HP16 erbrachte ein hydrophobes Profil am N-Terminus von HP16 (ProtScale; http://web.expasy.org/protscale). Für die Abschätzung der Hydrophobizität einzelner Sequenzabschnitte wird häufig der GRAVY-Wert genutzt, der einen repräsentativen Hydrophobizitäts-Mittelwert der AS-Zusammensetzung angibt [73]. Ein positiver GRAVY-Wert entspricht dabei einem hydrophoben Protein, während ein negativer GRAVY-Wert für ein hydrophiles Protein steht. Der Protein-GRAVY für HP16 liegt bei -0,543 (GRAVY Calculator; http://www.gravy-calculator.de). HP16 wird wahrscheinlich sezerniert, eine hypothetische Schnittstelle für die Signalpeptidase findet sich nach AS 22 (SignalP 4.1 Server; http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). Mit Hilfe des "GPI prediction Tool" (http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred_fungi.cgi) konnte keine eindeutige GPI-Modifikationsstelle erkannt werden. Der beste Score fand sich für die AS 218.

4.3 Mausmodell zur invasiven Aspergillose

Das Mausmodell zur IA ist weltweit das gebräuchlichste und auch das einzige, an dem die intranasale Infektion mit *A.fumigatus*-Konidien standardisiert ist. Der Verlauf der Infektion kommt der Lungen-Aspergillose beim Menschen sehr nahe. *In vitro*-Versuche an Zelllinien hingegen lassen keinen Rückschluss auf komplexe Immunreaktionen zu. Aus ethischen Gründen verbieten sich, in der jetzigen Phase der Untersuchungen, Versuche am Menschen.

Primär entscheidend für die Abwehr von *A.fumigatus*-Infektionen sind unspezifische Mechanismen des angeborenen Immunsystems durch Granulozyten, Makrophagen und Komplementsystem [74]. Allerdings lässt sich im Tierversuch auch eine erworbene, schützende Immunität gegen die Infektion induzieren. So bildet sich diese im Tier aus, sowohl nach einer überlebten systemischen Infektion mit dem Pilz, als auch nach einer Verimpfung von *A.fumigatus*-Kulturüberstand. Bei dieser protektiven Immunreaktion sind besonders die Th1-Zellen mit ihren Zytokinen beteiligt [50-52].

Zur Etablierung eines Mausmodells zur IA wurden die ersten Vorversuche in Anlehnung an Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen durchgeführt [41,64,75,76], und nach einigen Optimierungen konnte ein eigenes modifiziertes Mausmodell etabliert werden. Dabei musste die Frage nach der Verwendung eines leukopenischen oder nichtleukopenischen Mausmodells beantwortet werden. Für das leukopenische Mausmodell wird zur Immunsuppression sowohl Cortisonacetat als auch Cyclophosphamid verwendet [75,77,78]. Das nicht-leukopenische Mausmodell verwendet dahingegen nur Cortisonacetat zur Immunsuppression [41,77,79]. Im leukopenischen Modell ist eine zelluläre Immunantwort praktisch nicht vorhanden und die Entwicklung der IA ist gekennzeichnet durch umfangreiches invasives Pilzwachstum [80]. Es eignet sich zur Überprüfung von Virulenzfaktoren auf Pilzseite, allerdings nicht zur Beurteilung einer Immunreaktion auf Wirtsseite [77]. Im Gegensatz dazu ermöglicht das Cortisonacetat-Modell die Rekrutierung von Leukozyten aller Art, die, trotz teilweise eingeschränkter Phagozytose, Pilzzellen angreifen und die schnelle Pilzverbreitung verhindern [81]. Erworbene Immunreaktionen können nach wie vor stattfinden. Das nicht-leukopenische Modell eignet sich deshalb sowohl zur Beurteilung einer Immunreaktion als auch für Virulenztestungen. In unserem Fall wurde deshalb dieses Modell etabliert.

Der erste Versuch zur Dosisfindungsstudie (s. 3.4) erfolgte zunächst mit NMRI-Mäusen (Auszuchtstamm). Da eine relativ weite Spreizung bei der Suche nach der optimalen Infektionsdosis beobachtet wurde, trafen wir dann die Entscheidung, auf Wirtsseite eine größere Uniformität durch die Verwendung von Inzuchtmäusen (BALB/c) zu gewährleisten.

In der Literatur sind die Mengenangaben verabreichter Konidien im Zuge der Infektion sehr verschieden. Die Infektionsdosen lagen bei 10^5 , 10^6 , $2x10^6$ oder $3x10^6$ Konidien, wobei auch unterschiedliche Mäusestämme verwendet wurden [60,63,64,76,82]. Die Dosisfindungsstudie (s. 3.4) war auch notwendig, da *A.fumigatus*-Wildstämme unterschiedliche natürliche Virulenzen aufweisen [83]. In jedem Fall musste die optimale Infektionsdosis in Abhängigkeit von den von uns verwendeten Bedingungen auf Wirts- und Pathogenseite eruiert werden. Der Verlauf des prozentualen Anteils überlebender Mäuse war für die Maus-Gruppe, die mit $3x10^6$ Konidien infiziert wurde, am besten verteilt (Abb. 26). Die Infektion mit den Konidien erfolgte dabei intranasal, was dem natürlichen Infektionsweg entspricht.

4.4 Virulenzversuche mit dem hypothetischen Protein HP16

Je zehn Mäuse wurden mit der Deletionsmutante Δ HP16 infiziert und mit einer Gruppe von zehn mit dem Wildtyp D141 infizierten Mäusen verglichen (Abb. 34). In der Gruppe, die mit der Deletionsmutante infiziert wurde, starben weniger Mäuse. Der Virulenzunterschied ist als signifikant anzusehen (*P=0,0115). Somit liegt eine deutlich verminderte Virulenz der Deletionsmutante vor. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde die Deletionsmutante Δ HP16 zusammen mit der Komplementmutante Δ HP16^K in einem zweiten Versuch hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht (Abb. 35). Beim Vergleich der Überlebenskurven wurde deutlich, dass der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ HP16 und dem Wildtyp D141 dieses Mal sogar als hoch signifikant anzusehen ist (**P=0,0019). Auch der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ HP16 und der Komplementmutante Δ HP16^K erbrachte ein hoch signifikantes Ergebnis (**P=0,0043). Um den kausalen Einfluss von HP16 auf die Virulenz nachzuweisen, sollten die Kernkriterien, der sogenannten Henle-Koch'schen-Postulate, auf molekularer Ebene erfüllt sein [84]. Hierbei sollte die Deletion des entsprechenden Gens (Deletionsmutante Δ HP16) einen attenuierten oder avirulenten Phänotyp herbeiführen. Die Wiederherstellung der Genfunktion hingegen sollte zur vollständigen Rückkehr der ursprünglichen Virulenzeigenschaften führen. Mit Hilfe des Versuchsergebnisses konnte eine solche restaurierte Virulenz der korrespondierenden Komplementmutante gezeigt werden.

Durch die HP16-assoziierte Virulenz bietet sich HP16 als mögliches neues Therapie-Target an. Da HP16 zumindest *in vitro* vorwiegend auf Konidien lokalisiert zu werden scheint [15,72], könnte sich hier ein Angriffspunkt insbesondere für eine präemptive Therapie bzw. für eine Prophylaxe ergeben. Vorstellbar wäre, dass ein entsprechendes Effektormolekül zielgerichtet eine Funktion des HP16 blockiert oder alternativ seine Struktur maskiert. Da im Menschen keine dem PHP16 eng verwandten Proteine vorhanden sind (s. 4.2), besteht hier die Hoffnung, dass potenzielle Pharmaka keine oder wenige kreuzreagierende menschliche Strukturen finden. Dieses erhöht, zumindest theoretisch, die Chance auf die Entwicklung eines nebenwirkungsarmen Medikaments.

4.5 Rekombinant hergestelltes Protein HP16

Kann einem Molekül eine Virulenz-vermittelnde Eigenschaft zugesprochen werden, könnte dieses eventuell auch als Impfstoff geeignet sein. Vorstellbar wäre hier zum Beispiel eine Blockierung seiner Funktion durch Antikörper. Da im Mausmodell eine HP16-assoziierte Virulenz bewiesen wurde, sollte HP16 auch als rekombinantes Protein hergestellt werden, um dieses später im Mausmodell zu verimpfen und auf die Eignung als Impfstoff zu untersuchen.

Die Herstellung des rekombinanten Proteins HP16 erwies sich als sehr komplex. Trotz erfolgreicher Klonierungen ließ sich HP16 nur unzureichend exprimieren. Daher wurde im weiteren Verlauf des Versuchs ein synthetisches Gen mit optimierter "Codon Usage" für *E.coli* verwendet. Das synthetische Gen wurde dafür noch weiter verändert. So fehlt dem Gen der Bereich des Signalpeptids (AS 1-22). Mit Hilfe des "GPI prediction Tool" konnte zwar keine eindeutige GPI-Modifikationsstelle für HP16 erkannt werden, aber der beste Score wurde für die AS 218 festgelegt. Um eventuelle Probleme bei der rekombinanten Expression des Proteins zu umgehen, wurde das Gen daher um diese Sequenz (AS 219-235) verkürzt. Die sogenannte lange Version umfasste somit den AS-Bereich von 23-218.

Ein Vergleich der AS-Sequenz von HP16 mit dem Hydrophobin RodA (Abb. 39) erbrachte eine interessante Auffälligkeit, die möglicherweise doch auf eine GPI-Verankerung von HP16 deuten könnte. Die beiden Sequenzen stimmten in einem kleinen Bereich überein. So ist AS 180-183 von HP16 identisch mit den AS 135-138 von RodA.

RodA MKFSLSAAVL-AFAVSVAALPQHDVNAAGNGVGNKGNANVRFPV 43 HP16 MHYSQFVTVASALALAPTAVVARQGAAAFVTVNSIDVCPKKVAQEIINPG 50 *::* :* :* :* RodA PDDITVKQATEKCGDQAQLSCCNK-ATYAGDVTDIDEGILAGTLKNLIGG 92 HP16 PKVVTTPYTCDQVKLGHGLDVSYNFDIEPITKDTFPY								
HP16 MHYSQFVTVASALALAPTAVVARQGAAAFVTVNSIDVCPKKVAQEIINPG 50 *::* <	RodA	MKFSLSAAVL-AFAVSVAALPQHDVNAAGNGVGNKGNANVRFPV 43						
<pre>*::* .:* *:*: :*: :** :* :** RodA PDDITVKQATEKCGDQAQLSCCNK-ATYAGDVTDIDEGILAGTLKNLIGG 92 HP16 PKVVTTPYTCDQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPY 88 *. :*. **.: **: :* ::::::** RodA GSGTEGLGLFNQCSKLDLQIPIIGIPIQDLVNQKCKQN</pre>	HP16	MHYSQFVTVASALALAPTAVVARQGAAAFVTVNSIDVCPKKVAQEIINPG 50						
RodA PDDITVKQATEKCGDQAQLSCCNK-ATYAGDVTDIDEGILAGTLKNLIGG 92 HP16 PKVVTTPYTCDQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPY		*::* .:* *:*:: :* ** :* :: *						
HP16 PKVVTTPYTCDQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPY	RodA	PDDITVKQATEKCGDQAQLSCCNK-ATYAGDVTDIDEGILAGTLKNLIGG 92						
<pre>*. :*. **.:*: * *: : : RodA GSGTEGLGLFNQCSKLDLQIPIIGIPIQDLVNQKCKQN 130 CKALKVFDNEGCLGFPTLWIPLESPLEDKCIPEHYFSDEVKSISF 133</pre>	HP16	PKVVTTPYTCDQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPY 88						
RodA GSGTEGLGLFNQCSKLDLQIPIIGIPIQDLVNQKCKQN		*. :*. **.:* : * *: : :. :.						
HP16 CKALKVFDNEGCLGFPTLWIPLESPLEDKCIPEHYFSDEVKSISF 133 RodA -IACC	RodA	GSGTEGLGLFNOCSKLDLOIPIIGIPIODLVNOKCKON 130						
<pre>:.* :*:: * :* : **:: :::** : RodA -IACC</pre>	HP16	CKALKVFDNEGCLGFPTLWIPLESPLEDKCIPEHYFSDEVKSISF 133						
RodA -IACC		· * ·*·· * ·* · **·· · ···** ·						
HP16 QLDCREDAPVKKEPYGPKEGAEQSAPQAEHSTKQDAQQGSHQGQEVQNSP 183 : * ***** RodA SDASGSLIGLGLPCIALG 156 HP16 KQEARQGSRPAEAAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLG 233 .: * RodA SIL 159 HP16 -FR 235 .: * Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	RodA	-IACCONSP 138						
<pre>RodA SDASGSLIGLGLPCIALG 156 HP16 KQEARQGSRPAEAAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLG 233 .: RodA SIL 159 HP16 -FR 235 .: Potential GPI-modification site was found. Quality of the site: S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site: 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.</pre>	HP16	OLDCREDAPVKKEPYGPKEGAEOSAPOAEHSTKODAOOGSHOGOEVONSP 183						
RodA SDASGSLIGLGLPCIALG 156 HP16 KQEARQGSRPAEAAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLG 233 .: * :*** RodA SIL 159 HP16 -FR 235 .: Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site: 1.45 (PValue = 5.257239e-04) None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.		· * ****						
HP16 KQEARQGSRPAEAAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLG 233 .: * :*** RodA SIL 159 HP16 -FR 235 .: Sequence position of the omega-site : Score of the best site: 137 Score of the best site: 1.45 (PValue = 5.257239e-04) None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Roda	SDASCSLICICI.PCTALC 156						
<pre>In to Regarded Strand Region Stand Extra Strand Stran</pre>	HP16	KOEAROGSRDAFAADKOFOFAFOASFAADFKKASNDADSLGLGELTKULG 233						
RodA SIL 159 HP16 -FR 235 : Potential GPI-modification site was found. Quality of the site : S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.		KUERKUGSKERERKENUEUNSEREEKKASKEEKKASKERDSIGISEDIKVIG 255						
HP16 -FR 235 Potential GPI-modification site was found. Quality of the site: S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site: 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Reda	CTT 150						
Potential GPI-modification site was found. Quality of the site : S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	HD16	SIL 139						
: Potential GPI-modification site was found. Quality of the site : S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	HI 10	-FR 235						
Potential GPI-modification site was found. Quality of the site : S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.								
Quality of the site S Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Betential CDT	-modification site was found						
Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Potential GPI	-modification site was found.						
Sequence position of the omega-site : 137 Score of the best site : 1.45 (PValue = 5.257239e-04) N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Quality of the							
None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Sequence position of the omega-site : 137							
N None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	Score of the be	st site \dots : 1.45 (PValue = 5.257239e-04)						
None potential GPI-modification site was found. Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.								
Among all positions checked, sequence position 218 had the best score.	N None potentia	I GPI-modification site was found.						

Abb. 39: Alignment der AS-Sequenz von HP16 mit RodA. Zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Hortschansky, aus der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans Knöll Institut (HKI) in Jena (geringfügig modifiziert). Die Sequenzen wurden so gegenübergestellt, dass eine möglichst gute Übereinstimmung entsteht. Alle Cystein-Reste sind gelb unterlegt, alle weiteren identischen Aminosäuren mit einem Stern markiert. Das in der Abb. 39 rot markierte Serin (AS 137) charakterisiert bei RodA die GPI-Ankersequenz. Dies war ausschlaggebend dafür, eine verkürzte Variante des synthetischen Gens herzustellen. Die sogenannte kurze Version umfasste somit den AS-Bereich von 23-182.

Viele Faktoren beeinflussen die Menge und Löslichkeit rekombinanter Proteine. Beispielhaft zu nennende Faktoren sind dabei die Art des Induktors, die Induktorkonzentration, die Lokalisierung des exprimierten Proteins und die gewählte Temperatur nach der Induktion [85,86].

Die Aufreinigung von HP16 erfolgte über den His-Tag am N-Terminus mittels Ni-Sepharose. Bei der Herstellung des rekombinanten HP16 wurde die native Methode verwendet, bei der die Konformation des Proteins nicht zerstört wird. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie durch das Histidin-Analogon Imidazol, wobei zur Elution des Proteins eine ansteigende Konzentration an Imidazol verwendet wurde.

Eine geringere Wachstumstemperatur (niedriger als 37° C) kann zu einem höheren Anteil an löslichem Protein führen [87]. So wurden die Hauptkulturen über Nacht bei 25° C inkubiert (s. 2.4.2). Eine besondere Form der Induktion des Proteins stellt die Verwendung eines Autoinduktionsmediums dar [88]. Das Medium besteht aus LB-Medium mit Glukose, Glycerol, Laktose, Phosphatpuffer und MgSO₄. Glukose ist das bevorzugte Substrat von *E.coli* und wird so zuerst verbraucht. Ist keine Glukose mehr vorhanden, stellt sich der Stoffwechsel auf Laktose um. In der Zwischenzeit dient Glycerol als Kohlenstoff-Quelle. Die Laktose wird zu Glukose und Galaktose verstoffwechselt, wobei letzteres die Proteinexpression induziert. Der Phosphatpuffer verhindert ein Absinken des pH-Werts im Verlauf der Kultivierung, und das MgSO₄ ist bei *E.coli* essenziell für das Erreichen höherer Zelldichten.

Im Gegensatz zur IPTG-Induktion, bei der in der Regel bei einer relativ niedrigen OD von 0,5 die Protein-Expression induziert wird, wachsen die Zellen bei der Verwendung eines Autoinduktionsmediums zunächst zu einer hohen Dichte an, bevor die Proteinexpression induziert wird. Dadurch kann eine insgesamt höhere Zelldichte erreicht werden. Die Hauptkultur wird mit einer Kolonie oder mit einer Vorkultur beimpft und kann nach ca. 16 h weiter bearbeitet werden, ohne dass man auf den richtigen Zeitpunkt, wie bei einer IPTG-basierten Induktion erforderlich, achten muss.

4.6 Versuche zu Aspf3

Die Deletionsmutante Δ Aspf3 zeigte im Tierversuch eine stark verminderte Virulenz, und durch die Verwendung von Aspf3 als Impfstoff konnte sowohl in eigenen Versuchen als auch in Versuchen einer anderen Arbeitsgruppe [63] eine protektive Immunreaktion ausgelöst werden.

Alveolarmakrophagen sind die primären phagozytierenden Zellen innerhalb der Atemwege und somit eine wichtige Abwehrkomponente. An der Abtötung geschwollener Konidien durch Makrophagen sind unter anderem reaktive Sauerstoff-Metabolite (ROI) beteiligt [41]. Konidien, die den Alveolarmakrophagen entgangen sind, wachsen aus und werden durch Neutrophile angegriffen. Neutrophile heften sich an die Oberfläche der Hyphen. Dieser Kontakt zwischen Neutrophilen und Hyphen löst unter anderem die respiratorische Entladung und die Sekretion der ROI aus (zur Übersicht [89]). Mehrere Gene, die an der Abwehr gegen die ROI bei A.fumigatus beteiligt sind, konnten charakterisiert werden. Obwohl eine Deletion dieser Gene die Empfindlichkeit der jeweiligen Mutante gegenüber der ROI erhöht, konnte durch keine dieser Mutanten eine reduzierte Virulenz im Mausmodell herbeigeführt werden. Große Wichtigkeit wurde auch dem Schlüsseltranskriptionsregulator AfYap1 zugesprochen, der an der Regulation mehrerer Abwehrgene gegen ROI beteiligt ist [89]. Auch Aspf3 scheint zum Teil der AfYap1-Kontrolle zu unterliegen. Für dieses Molekül stand bislang jedoch eine genauere Untersuchung bezüglich seines Einflusses auf die Virulenz von Aspergillus aus.

Das Allergen Aspf3 wird von dem Pilz produziert [90], und es wird vermutet, dass es sich um ein peroxisomales Membranprotein handelt [91]. Es wurde jedoch auch in größerer Menge auf der Konidienoberfläche gefunden [15] und ruft sowohl bei einer experimentellen Infektion im Tier als auch nach einer invasiven Aspergillose im Menschen eine regelhafte Antikörperreaktion hervor [66]. Deshalb kann auch mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Produktion im Hyphenstadium ausgegangen werden.

Wachstum unter oxidativem Stress

Ausgehend von der hypothetischen Funktion von Aspf3 wurde von uns vermutet, dass es am Schutz der Pilze gegen oxidativen Stress durch Inaktivierung entsprechender Radikale beteiligt ist. Die Deletionsmutante Δ Aspf3 wies im Phänotyp eine starke Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (Abb. 20) im Vergleich zu der Komplementmutante $\Delta Aspf3^{K}$ oder dem Wildtyp D141 auf. Dies legt ebenfalls nahe, dass Aspf3 für eine Peroxireduktase kodiert. Da an der Abwehr von Sauerstoffradikalen eine Reihe weiterer Effektoren beteiligt sind [89], war eine so deutlich gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (Abb. 20) nicht zwangsläufig zu erwarten. Dabei war zwar der Phänotyp der von uns generierten Komplementmutante $\Delta Aspf3^{K}$ mit vollständig wieder hergestellter Resistenz des Hyphenwachstums unter Bedingungen des oxidativen Stresses ausgestattet. Jedoch fand sich bei den Wasserstoffperoxidkonzentrationen, bei denen die Deletionsmutante überhaupt kein Wachstum mehr zeigte, eine noch leicht eingeschränkte Sporulation (Abb. 21). Dieses könnte am ehesten darauf hinweisen, dass die erreichte Komplementierung funktionell nicht ganz vollständig gewesen ist, was auch die inkomplette Restauration der Virulenz im Tierversuch erklären könnte (s. unten).

Virulenzversuche

Mit den Aspf3-Mutanten wurde ein Virulenzversuch durchgeführt. Mäuse wurden mit der Deletionsmutante Δ Aspf3, der Komplementmutante Δ Aspf3^K oder dem Wildtyp D141 infiziert (Abb. 36). Der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ Aspf3 und dem Wildtyp D141 ist höchst signifikant (***P=0,0001), was einer drastischen Verminderung der Virulenz entspricht. Die Komplementmutante Δ Aspf3^K zeigte allerdings nur eine teilweise wiederhergestellte Virulenz und somit keine vollständige Restauration.

Der aufgetretene Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ Aspf3 und der Komplementmutante Δ Aspf3^K war eigentlich nicht zwangsläufig zu erwarten, denn eine Deletion des übergeordneten Schlüsseltranskriptionsregulators AfYap1 erbrachte keine Virulenzminderung im Mausmodell [89]. Es ist somit anzunehmen, dass sich Aspf3 in entscheidenden Situationen des Infektionsprozesses der übergeordneten Regulierung durch AfYap1 entzieht und autonom anders reguliert wird.

Aspf3 als Impfstoff

Ito et al. [63] konnten durch Verimpfung von rekombinantem Aspf3 im Tierversuch eine protektive Immunreaktion auslösen. Der von uns durchgeführte Vakzinierungsversuch mit rekombinantem Aspf3 (Abb. 28, Impfgruppe 2) erbrachte ebenfalls einen signifikant protektiven Effekt durch den Impfstoff (*P=0,0412). Eine

NCBI-BLAST-Suche (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) von Aspf3 erbrachte etliche Übereinstimmungen mit anderen *Aspergillus*-Arten. Die am stärksten homologen Proteine gehören zu den folgenden Spezies: *A.fischerianus* (99 %), *A.clavatus* (93 %) *und A.terreus* (92 %). Es ist daher möglich, dass ein Aspf3-basierter Impfstoff auch Schutz gegenüber verschiedenen Pilzpathogenen vermitteln könnte [63].

Da für die Komplementmutante $\Delta Aspf3^{K}$ nur ein teilweise wieder hergestellter Phänotyp aufgezeigt werden konnte, wurde das entsprechende Komplementierungsplasmid (Abb. 16, pAspf3-del-komplementiert) im Bereich des Gens Aspf3 sequenziert. Durch einen Vergleich mit der Originalsequenz (Aspergillus Genome Database; http://www.aspgd.org/) wurde der Austausch von fünf Basen festgestellt. Es handelt sich hierbei eventuell um nicht kodierungsrelevante Unterschiede des von uns verwendeten Wildstamms D141 im Vergleich zum Sequenzierstamm. Allerdings ist es ebenfalls möglich, dass die Basenaustausche PCRbedingte Amplifikatfehler darstellen. Diese könnten z.B. zu einem insuffizienten Spleißen beitragen [92] und damit zu einer möglichen funktionellen Beeinträchtigung führen, die den unvollständig restaurierten Phänotyp erklären könnte.

Die stark verminderte Virulenz der Deletionsmutante Δ Aspf3, bei zumindest teilrestaurierter Virulenz durch die Komplementmutante Δ Aspf3^K, lässt vermuten, dass Aspf3 eine entscheidende Rolle während der Pathogenese spielt. Ohne den künstlichen Zusatz von Sauerstoffradikalen *in vitro* lässt sich zudem kein veränderter Phänotyp erkennen, so dass man es wagen kann, der Peroxireduktase eine spezifische Rolle während des Infektionsprozesses zuzuweisen und sie deshalb auch als "Virulenzfaktor" zu bezeichnen. Eine spezifische Inhibition im Sinne einer pharmakologischen "Targetierung" könnte deshalb alternative Therapieoptionen bieten. Sofern sich eine Therapiemöglichkeit bestätigt, dürfte die relativ geringe Homologie zu menschlichen Proteinen (ähnelt mit 31 % am stärksten dem humanen Peroxiredoxin des Typs V) eine gute Chance dafür bieten, dass ein entsprechendes Therapeutikum wenige Kreuzreaktionen mit menschlichen Proteinen hat, was sich in einem günstigen Nebenwirkungsspektrum niederschlagen dürfte.

Nach einer subletalen Infektion mit *A.fumigatus* lässt sich im Tierversuch eine protektive Immunreaktion gegenüber einer folgenden, an sich letalen Infektion nachweisen [66,68]. Somit sollten von *A.fumigatus* Antigene während einer Infektion exprimiert werden, die in der Lage sind, eine solche schützende Immunantwort zu induzieren. Die Identifizierung dieser Antigene könnte die Grundlage für die Entwicklung eines Impfstoffes darstellen. Bislang konnten durch andere Arbeitsgruppen vier verschiedene Einzelantigene gefunden werden, welche im Mäuseversuch eine solche Protektion vermitteln (s. 1.6) [61-63]. Unser Ziel war es, weitere erfolgversprechende Antigene zu identifizieren. Zur Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Proteinen standen entsprechende Protein-Kandidaten aus Vorarbeiten zur Verfügung bzw. wurden selbst hergestellt. Insgesamt wurden im Zuge dieser Arbeit 31 Proteine (s. Tab. 11) an Mäuse verimpft. Diese Proteine wurden in Vorarbeiten als entweder mengenmäßig oder immunologisch dominant exprimiert vorgefunden und deshalb von uns ausgewählt (s. 1.7) [2,15,66].

Impfgruppe: Enolase, HSP90, TBP

Vergleicht man die Überlebenskurven von Impf- und Kontrollgruppe, wird deutlich, dass für die meisten Impfgruppen keine protektive Immunreaktion induziert werden konnte (s. 3.5). Allerdings wurde für die Impfgruppe 3 (Enolase, HSP90, TBP) im Vergleich zu der Negativ-Impfgruppe (Abb. 28) eine signifikante Protektion durch den Impfstoff erzielt (*P=0,0121). In diesem Versuch wurde zusätzlich eine Positiv-Kontrollgruppe mit Aspf3-Verimpfung mitgeführt. Mit Aspf3 ließ sich in einem analogen Versuchsaufbau von Ito et al. zuvor eine protektive Immunreaktion induzieren [63]. Diesen Effekt konnten wir auch in unserem Mausmodell bestätigen (*P=0,0412). Umso mehr wird dadurch die Wertigkeit der signifikant protektiven Immunreaktion der von uns getesteten Impfgruppe 3 betont, denn diese fiel im Gegensatz zu der Aspf3-Impfgruppe stärker aus (s. oben).

Die drei Proteine aus Impfstoff 3 wurden an verschiedene Mausgruppen vereinzelt verimpft (Abb. 32). Doch die Auswertung der Überlebenskurven der jeweiligen Impfgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte keine signifikante Protektion durch einen der Impfstoffe (Enolase: P=0,4379; TBP: P=0,1450; HSP90: P=0,0848). Jedoch starben in der Kontrollgruppe mehr Mäuse als in jeder der anderen Gruppen. Somit lässt sich

der signifikant protektive Effekt des Kombinationsimpfstoffes 3 keinem Einzelprotein dominierend zuordnen. Der Effekt der Protektion ist so nicht auf ein einzelnes Antigen zurückzuführen, sondern auf das Zusammenwirken von zwei oder vielleicht auch allen drei Impf-Antigenen des Kombinationsimpfstoffes. Bei einer abschließenden Wiederholung und Kontrolle des Kombinationsimpfstoffes 3 fand sich ebenfalls eine Protektion durch den Impfstoff. Diese war jedoch nicht mehr im Signifikanzbereich (P=0,2510). Jedoch imponiert diese fehlende Signifikanz möglicherweise durch statistische Ungenauigkeiten in der Negativ-Kontrollgruppe, die eine vergleichsweise geringe Sterblichkeit aufwies (Abb. 33).

Enolase

Enolase ist in allen Geweben und Organismen vorhanden, die Glykolyse oder Fermentation betreiben. Das Enzym katalysiert dabei die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat (2-PG) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) [93]. Enolase kann aber auch die Rückreaktion katalysieren. Dies hängt von der Konzentrationen der Substrate in der Umgebung ab [94].

Zu der Aspergillus-Enolase existiert ein homologes Molekül in z.B. Coccidioides posadasii [95] und Candida albicans (C.albicans). Li et al. konnten durch Verimpfung dieser Candida-Enolase Mäuse wirksam vor einer invasiven Candidose schützen. Dieser Schutz stand in Zusammenhang mit einer reduzierten Pilzbelastung, Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und einer effektiven Zerstörung phagozytierter Hefe durch Neutrophile [96]. Obwohl Enolase eine primäre intrazelluläre Lokalisation aufweist und ihrer Sequenz ein Signal zur Sekretion fehlt, kann Enolase-Aktivität auch auf der Zellwand von Pilzen und Bakterien nachgewiesen werden (zur Übersicht [66]). Nicht immer ist ein Signalpeptid für die Ausschleusung eines Proteins aus der Zelle notwendig. Es gibt eine wachsende Zahl von Hinweisen, dass einige Proteine mehr als eine Funktion und auch Lokalisation in einem Organismus innehaben [97]. Diese werden auch als "Mondschein-Proteine" bezeichnet [98,99]. In einer Arbeit von Denikus et al. [66] wurden Aspergillus-Antigene im Kanincheninfektionsmodell identifiziert, die während der Infektion eine starke Immunreaktion ausgelöst haben. Viele der gefundenen Antigene haben ebenfalls kein Signalpeptid. Ihre Homologe bei anderen Pilzen konnten zum Teil aber ebenfalls als Mondschein-Proteine charakterisiert werden [100].

<u>HSP90</u>

Hitzeschockproteine (HSPs) sind hochkonserviert und kommen in allen Organismen und dabei in allen Zellen der Organismen vor. Ausgewählte HSPs, auch Chaperone genannt, spielen unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Faltung bzw. Entfaltung von Proteinen, dem Aufbau von Multiproteinkomplexen und dem Transport bzw. der Sortierung von Proteinen in subzelluläre Kompartimente. Sie bilden eine große Familie von Proteinen, die oft, basierend auf ihrem Molekulargewicht, klassifiziert werden: z.B. HSP10, HSP40, HSP60, HSP70 und HSP90 [101]. Organismen reagieren stressbedingt auf erhöhte Temperaturen, sowie chemische und physiologische Einflüsse durch eine Erhöhung der Synthese von Hitzeschockproteinen [102].

HSP90 ist in allen Eukaryonten präsent [103]. In Pilzen wurde HSP90 vor allem in Hefen untersucht [104]. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde HSP90 als wichtiger Bestandteil des Zellmetabolismus mit Einfluss auf zahlreiche Schlüssel- und Signalkaskaden-Proteine sowie Transkriptionsfaktoren gefunden. Diese HSP90abhängigen Proteine repräsentieren teilweise mehr als 10% des gesamten Proteoms unterschiedlicher Wachstumsstadien [105]. HSP90, welches hoch konserviert ist, existiert auch in *C.albicans*, wo es zusätzlich zu einer intrazellulären Lage auch in der Zellwand lokalisiert vorliegt (zur Übersicht [66]). Bei *A.fumigatus* erbrachten Untersuchungen mit dem Protein HSP90, dass dieses unter anderem für Konidienbildung und Zellwand-Integrität erforderlich ist [106].

<u>TBP</u>

Thiamin (Vitamin B1) ist ein wasserlösliches Vitamin aus dem B-Komplex. Alle lebenden Organismen benötigen Thiamin, aber nur Bakterien, Pilze und Pflanzen können es selbst synthetisieren. Zu dem Thiamin-Biosyntheseprotein (TBP) existieren viele orthologe Moleküle in anderen Organismen, z.B. in den Pilzen *N.crassa* (nmt-1), *S.cerevisiae* (THI13) und *C.albicans* (THI13). Das TBP bei *A.fumigatus* ist möglicherweise involviert in das Hyphenwachstum und in den Thiamin-Stoffwechsel, wie es ebenfalls z.B. bei *N.crassa* der Fall ist [107].

Weitere Testungen mit Teilerfolgen

Ein weiterer Impferfolg konnte mit dem Impfstoff 7 (MIPS, PGM, PGM3/4) erzielt werden (Abb. 30). Auch die Verabreichung des Impfstoffs 7 wurde wiederholt (Abb. 33). Dabei erbrachte ein Vergleich der Überlebenskurven von Impfgruppe 7 und der Negativ-Kontrollgruppe keinen schützenden Effekt durch den Impfstoff (P=0,5785). Nicht erklärbar erscheint der unterschiedliche Kurvenverlauf nach Verabreichen der Impfgruppe 7 (Abb. 30 undAbb. 33) bei jeweils identischem Versuchsaufbau.

4.8 Einschränkungen und Verbesserungen bei der Impfstoffsuche

Nach Verimpfung von Impfstoff 3 wurden unterschiedliche Signifikanzlevel erreicht (s. oben). So war nach einer Wiederholung und Kontrolle des Kombinationsimpfstoffes 3 kein weiteres Mal eine Protektion im Signifikanzbereich gegeben. Allerdings fanden sich gleichgerichtete Effekte, aber leider ohne Erreichen der Signifikanz. Es lassen sich Vermutungen anstellen, wie eine Verbesserung durch konstantere Versuchsbedingungen erzielt werden könnte. Zudem kann nach Anhaltspunkten bezüglich der Frage, weshalb die Versuchsergebnisse nicht reproduzierbar waren, gesucht werden.

Unsichere Aufnahme der Infektionsdosis

Die Infektion mit den Konidien erfolgte intranasal, was dem natürlichen Infektionsweg entspricht. Allerdings beinhaltet diese Art der Verabreichung eine relativ große Fehlerbreite in der tatsächlichen wirksamen Infektionsdosis, denn ein Teil der Konidien wird von den Mäusen eventuell verschluckt. Somit ist die tatsächliche pulmonale Infektionsdosis gegebenenfalls sehr variabel. Infolgedessen kann dies eine breite Streuung im Schweregrad des Erkrankungsbildes verursachen, welche gegebenenfalls nur durch eine relativ hohe Anzahl von Versuchstieren statistisch ausgleichbar ist. Eine mögliche Modifikation der Versuchsbedingungen ist eine i.v.-Infektion der Mäuse mit den *A.fumigatus*-Konidien über die Schwanzvene. Bei dieser Art der Infektion sind auch bei kleineren Versuchsgruppen verlässlichere Ergebnisse möglich, da bei jeder Injektion eine definierte Konidienmenge sicher aufgenommen wird. Dies entspricht allerdings nicht dem natürlichen Infektionsweg, und sonst lokal in der Lunge agierende
Immunmechanismen kommen bei einer i.v.-Infektion nicht in natürlicher Weise zum Tragen, deswegen wurde das i.v.-Modell von uns nicht favorisiert.

Maskierung protektiver Immunreaktionen durch "Stille Feiung"

Im Verlauf der Versuche wurde deutlich, dass die fehlenden Signifikanz-Werte möglicherweise durch statistische Ungenauigkeiten in den Negativ-Kontrollgruppen, die zum Teil eine vergleichsweise geringe Sterblichkeit aufwiesen, entstanden sein können. Als "Stille Feiung" bezeichnet man eine Immunantwort nach Infektion mit einem Krankheitserreger, die symptomlos verläuft [108]. Der Unterschied bezüglich der Protektion zwischen Impfgruppe und Negativ-Kontrollgruppe wurde eventuell dadurch maskiert. Bereits Corbel und Eades haben gezeigt, dass ältere Mäuse eine zunehmend protektive Immunreaktion gegenüber Aspergillen ausbilden [51]. Diese könnte die an sich eindeutigen protektiven Immunreaktionen der Impfstoffkandidaten maskieren und Ergebnisse entsprechend verfälschen.

Zudem sind zwei Häufigkeitsgipfel der invasiven Aspergillose beim Menschen nach Stammzelltransplantation bekannt [109]. Der erste Gipfel ist unmittelbar vor und nach der Transplantation. Ursächlich wird ein Versagen der primären, angeborenen Immunität bedingt durch einen Mangel an Leukozyten und Makrophagen hervorgerufen durch die herabgesetzte Knochenmarkfunktion. Trotz des Anwachsens neuer Stammzellen in der Regenerationsphase kommt es ca. 3 Monate nach der Transplantation zu einem zweiten Gipfel spät auftretender Infektionen. Obwohl die Granulozyten-Funktion wiederhergestellt ist, ist das Risiko für eine IA zu dieser Zeit erhöht. Der Grund dafür ist die verzögerte Regeneration der T- und B-Zellen. Dies macht deutlich, dass auch die Störungen im Bereich der erworbenen Immunität beim Menschen (in diesem Fall die erworbene Immunität des Spenders, welche im Anschluss an die Transplantation medikamentös unterdrückt wird, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern) ein Risikofaktor für eine invasive Aspergillose darstellen. Erklärbar ist dieses Phänomen ebenfalls durch eine "Stille Feiung" der Mäuse (s. oben).

Es ist erst mit fortschreitender Versuchsdurchführung der Verdacht aufgetreten, dass die Mäuse während der Zeit zwischen Immunisierung und Infizierung (5 Wochen) eventuell zu großen und letztlich individuell unkontrollierbaren Mengen an Konidien ausgesetzt waren. Dieses mag neben dem Alter der Mäuse aber auch z.B. lokale oder gar Jahreszeit-bedingte Ursachen haben, denn in wärmeren Monaten kommt es

wahrscheinlich zu einer größeren Freisetzung an Aspergillen. In jedem Fall ist die Einatmung von Konidien und damit die "Stille Feiung" eine unkontrollierte Beeinflussungsgröße.

Ein veränderter Ansatz wäre die Verwendung von individuell ventilierten Käfigen, die den Partikelaustausch zwischen Käfiginnerem und der Umgebung verhindert. Die Aufnahme von Konidien aus der Raumluft wäre auf diese Weise auch unterbunden. Der Gebrauch von ventilierten Käfigen könnte der Schlüssel für eine Verbesserung der Versuchsbedingungen sein, dies war uns im Vorfeld jedoch nicht bewusst und in der zu Rate gezogenen Literatur, welche sich mit Impfstoffentwicklung bei Aspergillen befasst, auch so nicht beschrieben [41,64,75,76].

5 Zusammenfassung

A.fumigatus ist der häufigste Erreger invasiver, meist tödlich verlaufender Aspergillosen bei stark immunsupprimierten Patienten. Eine natürliche Resistenz gegen den Pilz wird durch das angeborene Immunsystem vermittelt, jedoch wurde im Tierversuch auch eine erworbene Immunität nach einer überlebten systemischen Infektion festgestellt. Deshalb sollten Antigene, die im Verlauf der Erkrankung vom Pilz exprimiert werden, eine spezifische und protektive Immunantwort hervorrufen können. Für die Entwicklung eines Impfstoffes ist die Identifikation solcher Antigene Voraussetzung. Im Mausmodell wurden insgesamt 31 rekombinante Aspergillus-Antigene in Kombinationen getestet. Als besonders erfolgversprechend stellte sich ein trivalenter Impfstoff, bestehend aus Enolase, HSP90 und TBP (Thiamin-Biosyntheseprotein), dar. Im Vergleich zu einer ungeimpften Kontrollgruppe fand sich bei der Impfgruppe eine signifikante Protektion gegenüber einer an sich letalen Aspergillus-Infektion. Bei einer Wiederholung des Versuchs ließ sich der Schutz bestätigen, war jedoch nicht mehr im Signifikanzbereich. Mögliche Gründe hierfür sind die unsichere Aufnahme der Infektionsdosis durch nasale Verabreichung oder auch eine "Stille Feiung" der Mäuse durch Einatmung von Konidien aus der Umgebung vor der eigentlichen Infektion. Eine Verbesserung der Versuchsbedingungen könnte durch die Verwendung individuell ventilierter Käfige (ohne Sporenbelastung aus der Raumluft) und/oder eine Vergrößerung der Versuchsgruppen erreicht werden.

Da die Konidienoberfläche den ersten Kontakt mit dem Wirt vermittelt, könnten Konidienoberflächenproteine sowohl vielversprechende Impfstoffkandidaten als auch Virulenzfaktoren sein. Im Tierversuch wurde hier nachgewiesen, dass das stark exprimierte Konidienoberflächenprotein HP16 entscheidend an der Virulenz von *A.fumigatus* beteiligt ist. Dabei stellte sich der Virulenzunterschied zwischen der Deletionsmutante Δ HP16 und dem Wildtyp D141 als hoch signifikant dar. Der Vergleich zwischen der Deletionsmutante Δ HP16^K erbrachte eine komplett restaurierte Virulenz. Da HP16 zumindest *in vitro* vorwiegend auf Konidien lokalisiert ist, könnte sich hier ein Angriffspunkt für eine präemptive Therapie bzw. für eine Prophylaxe der invasiven Aspergillose ergeben.

HP16 wurde auch als rekombinantes Protein hergestellt. Das rekombinante Antigen soll als Impfstoffkandidat in zukünftigen Projekten eingesetzt werden.

Letztlich wurde noch Aspf3, eine Peroxireduktase von *A.fumigatus*, als ein weiterer Target- und Impfstoffkandidat untersucht. Die stark verminderte Virulenz der Deletionsmutante Δ Aspf3 und eine zumindest teilrestaurierte Virulenz durch die hergestellte Komplementmutante Δ Aspf3^K lassen vermuten, dass Aspf3 während der Pathogenese ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Latge JP: Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999, 12:310-350.
- 2. Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Gross U, Reichard U: Analysis of the cellular Aspergillus fumigatus proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. Electrophoresis 2010, 31:1947-1958.
- 3. Rohde M, Schwienbacher M, Nikolaus T, Heesemann J, Ebel F: Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol Lett* 2002, **206**:99-105.
- Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latge JP, Denning DW, Dyer PS: Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. Curr Biol 2005, 15:1242-1248.
- 5. Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Basturkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, et al.: Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A.fumigatus and A.oryzae. Nature 2005, 438:1105-1115.
- 6. O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS: **Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen** *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009, **457**:471-474.
- 7. Rhodes JC: Aspergillus fumigatus: growth and virulence. Med Mycol 2006, 44 Suppl 1:S77-81.
- 8. Schmitt HJ, Blevins A, Sobeck K, Armstrong D: *Aspergillus* species from hospital air and from patients. *Mycoses* 1990, **33**:539-541.
- 9. Denning DW: Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998, 26:781-803; quiz 804-785.
- 10. Latge JP: The pathobiology of Aspergillus fumigatus. Trends Microbiol 2001, 9:382-389.
- 11. Balloy V, Chignard M: The innate immune response to Aspergillus fumigatus. Microbes Infect 2009, 11:919-927.
- 12. Park SJ, Mehrad B: Innate immunity to Aspergillus species. Clin Microbiol Rev 2009, 22:535-551.
- 13. Ruchel R, Reichard U: Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. *Contrib Microbiol* 1999, 2:21-43.
- 14. Pfaller MA, Diekema DJ: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2004, **42**:4419-4431.
- 15. Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U: Proteome of conidial surface associated proteins of Aspergillus fumigatus reflecting potential vaccine candidates and allergens. J Proteome Res 2006, 5:954-962.
- 16. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA: Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 1997, **175**:1459-1466.
- 17. Fridkin SK, Jarvis WR: Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996, **9**:499-511.
- 18. Binder U, Lass-Florl C: New insights into invasive aspergillosis--from the pathogen to the disease. *Curr Pharm Des* 2013, **19**:3679-3688.

- 19. Greenberger PA: Clinical aspects of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Front Biosci* 2003, 8:s119-127.
- Guazzelli LS, Severo CB, Hoff LS, Pinto GL, Camargo JJ, Severo LC: Aspergillus fumigatus fungus ball in the pleural cavity. J Bras Pneumol 2012, 38:125-132.
- 21. Soubani AO, Chandrasekar PH: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest* 2002, **121**:1988-1999.
- 22. Todea DA, Postolache P, Rosca LE, Coman AC: Pulmonary aspergilloma and pulmonary tuberculosis: is there a strong association? *Chest* 2014, 145:152A.
- 23. Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Ponton J, Garaizar J, Rementeria A: What makes Aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol 2010, 27:155-182.
- 24. Latge JP: The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol 2007, 66:279-290.
- 25. Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M, Latge JP: Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 2000, **275**:41528.
- 26. Bernard M, Latge JP: *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 2001, **39 Suppl 1**:9-17.
- 27. Latge JP, Mouyna I, Tekaia F, Beauvais A, Debeaupuis JP, Nierman W: Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2005, **43 Suppl 1**:S15-22.
- 28. Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, et al.: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009, 460:1117-1121.
- 29. Paris S, Debeaupuis JP, Crameri R, Carey M, Charles F, Prevost MC, Schmitt C, Philippe B, Latge JP: Conidial hydrophobins of Aspergillus fumigatus. Appl Environ Microbiol 2003, 69:1581-1588.
- Thau N, Monod M, Crestani B, Rolland C, Tronchin G, Latge JP, Paris S: rodletless mutants of Aspergillus fumigatus. Infect Immun 1994, 62:4380-4388.
- 31. Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latge JP: Proteome analysis of Aspergillus fumigatus identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. Electrophoresis 2001, 22:2812-2823.
- 32. Li H, Zhou H, Luo Y, Ouyang H, Hu H, Jin C: Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 2007, **64**:1014-1027.
- 33. Cao W, Maruyama J, Kitamoto K, Sumikoshi K, Terada T, Nakamura S, Shimizu K: Using a new GPI-anchored-protein identification system to mine the protein databases of Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, and Aspergillus oryzae. J Gen Appl Microbiol 2009, 55:381-393.
- Lass-Florl C, Roilides E, Loffler J, Wilflingseder D, Romani L: Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* 2013, 56:403-413.
- 35. Schaffner A: Macrophage-Aspergillus interactions. Immunol Ser 1994, 60:545-552.
- 36. Dagenais TR, Keller NP: Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 2009, 22:447-465.

- 37. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ: Aspergillus fumigatus evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4mediated signal transduction. J Infect Dis 2003, 188:320-326.
- 38. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA: Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. J Immunol 2006, **176**:3717-3724.
- 39. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latge JP: Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* 2003, **71**:891-903.
- 40. Hohl TM, Feldmesser M: *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:1953-1963.
- 41. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latge JP: Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect Immun 2003, 71:3034-3042.
- 42. Babior BM: The respiratory burst of phagocytes. J Clin Invest 1984, 73:599-601.
- 43. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000639.
- 44. Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J: Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:409-415.
- 45. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, Griffin GE, Taylor GP, Tough DF, Beverley PC, et al.: In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 2007, 121:258-265.
- 46. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T: **The trafficking of natural killer cells**. *Immunol Rev* 2007, **220**:169-182.
- 47. Weissler JC, Nicod LP, Lipscomb MF, Toews GB: Natural killer cell function in human lung is compartmentalized. *Am Rev Respir Dis* 1987, **135**:941-949.
- 48. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, Einsele H, Loeffler J: Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. J Immunol 2011, 187:1369-1376.
- 49. Polonelli L, Casadevall A, Han Y, Bernardis F, Kirkland TN, Matthews RC, Adriani D, Boccanera M, Burnie JP, Cassone A, et al.: The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol* 2000, 38 Suppl 1:281-292.
- 50. Lehmann PF, White LO: Acquired immunity to Aspergillus fumigatus. Infect Immun 1976, 13:1296-1298.
- 51. Corbel MJ, Eades SM: Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* 1977, **60**:79-85.
- 52. Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L: **T cell vaccination** in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* 2000, **165**:381-388.
- 53. Gastebois A, Clavaud C, Aimanianda V, Latge JP: Aspergillus fumigatus: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. Future Microbiol 2009, 4:583-595.

- 54. Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L: Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 2002, **168**:1362-1371.
- 55. Ito JI: **T cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases**. *Immunol Invest* 2011, **40**:825-838.
- 56. Sun Z, Zhu P, Li L, Wan Z, Zhao Z, Li R: Adoptive immunity mediated by HLA-A*0201 restricted Asp f16 peptides-specific CD8+ T cells against Aspergillus fumigatus infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012, 31:3089-3096.
- 57. Taylor PR, Leal SM, Jr., Sun Y, Pearlman E: *Aspergillus* and *Fusarium* Corneal Infections Are Regulated by Th17 Cells and IL-17-Producing Neutrophils. *J Immunol* 2014.
- 58. Reichard U, Herrmann, S., Asif, A. R.,: Vaccination Approaches Against Opportunistic Fungal Infections Caused by Aspergillus fumigatus. Current Protein and Peptide Science 2014, 15, in print.
- 59. de Repentigny L, Petitbois S, Boushira M, Michaliszyn E, Senechal S, Gendron N, Montplaisir S: Acquired immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infect Immun* 1993, **61**:3791-3802.
- 60. Ito JI, Lyons JM: Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 2002, **186**:869-871.
- 61. Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, Montagnoli C, Bacci A, Di Francesco P, Kurup VP, Wagner H, Romani L: Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect* 2002, **4**:1281-1290.
- 62. Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, D'Angelo C, Perruccio K, Bonifazi P, Zagarella S, et al.: Immune sensing of Aspergillus fumigatus proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. J Immunol 2009, 183:2407-2414.
- 63. Ito JI, Lyons JM, Hong TB, Tamae D, Liu YK, Wilczynski SP, Kalkum M: Vaccinations with recombinant variants of Aspergillus fumigatus allergen Asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. Infect Immun 2006, 74:5075-5084.
- 64. Diaz-Arevalo D, Bagramyan K, Hong TB, Ito JI, Kalkum M: **CD4+ T cells mediate the protective effect of the recombinant Asp f3-based anti-aspergillosis vaccine**. *Infect Immun* 2011, **79**:2257-2266.
- 65. Ito JI, Lyons JM, Diaz-Arevalo D, Hong TB, Kalkum M: Vaccine progress. *Med Mycol* 2009, **47 Suppl** 1:S394-400.
- 66. Denikus N, Orfaniotou F, Wulf G, Lehmann PF, Monod M, Reichard U: Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. Infect Immun 2005, 73:4704-4713.
- 67. Murphy K: Janeway's Immunobiology, vol Auflage: 8th edition.: Taylor & Francis Ltd.; 2011.
- 68. Smith GR: Experimental aspergillosis in mice: aspects of resistance. J Hyg (Lond) 1972, 70:741-754.
- 69. Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CA: Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from Escherichia coli. *Gene* 1987, 56:117-124.
- 70. Segal BH: Aspergillosis. N Engl J Med 2009, 360:1870-1884.
- 71. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, et al.: **Genomic sequence of the pathogenic**

and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005, **438**:1151-1156.

- 72. Suh MJ, Fedorova ND, Cagas SE, Hastings S, Fleischmann RD, Peterson SN, Perlin DS, Nierman WC, Pieper R, Momany M: Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the Aspergillus Fumigatus conidial proteome. Proteome Sci 2012, 10:30.
- 73. Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982, **157**:105-132.
- 74. Schneemann M, Schaffner A: Host defense mechanism in Aspergillus fumigatus infections. Contrib Microbiol 1999, 2:57-68.
- 75. Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, Ruppert T, Hartl A, Hof H, Brakhage AA: 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 2006, 62:292-302.
- 76. Behnsen J, Lessing F, Schindler S, Wartenberg D, Jacobsen ID, Thoen M, Zipfel PF, Brakhage AA: Secreted Aspergillus fumigatus protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. Infect Immun 2010, 78:3585-3594.
- 77. Schrettl M, Beckmann N, Varga J, Heinekamp T, Jacobsen ID, Jochl C, Moussa TA, Wang S, Gsaller F, Blatzer M, et al.: HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of Aspergillus fumigatus. PLoS Pathog 2010, 6:e1001124.
- 78. Liebmann B, Muhleisen TW, Muller M, Hecht M, Weidner G, Braun A, Brock M, Brakhage AA: Deletion of the Aspergillus fumigatus lysine biosynthesis gene lysF encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. Arch Microbiol 2004, 181:378-383.
- 79. Schobel F, Jacobsen ID, Brock M: Evaluation of lysine biosynthesis as an antifungal drug target: biochemical characterization of Aspergillus fumigatus homocitrate synthase and virulence studies. Eukaryot Cell 2010, 9:878-893.
- Stergiopoulou T, Meletiadis J, Roilides E, Kleiner DE, Schaufele R, Roden M, Harrington S, Dad L, Segal B, Walsh TJ: Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. Am J Clin Pathol 2007, 127:349-355.
- 81. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M: Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect Immun 2005, 73:494-503.
- 82. Ibrahim-Granet O, Jouvion G, Hohl TM, Droin-Bergere S, Philippart F, Kim OY, Adib-Conquy M, Schwendener R, Cavaillon JM, Brock M: In vivo bioluminescence imaging and histopathopathologic analysis reveal distinct roles for resident and recruited immune effector cells in defense against invasive aspergillosis. BMC Microbiol 2010, 10:105.
- 83. Mondon P, De Champs C, Donadille A, Ambroise-Thomas P, Grillot R: Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol* 1996, **45**:186-191.
- 84. Falkow S: Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* 1988, **10 Suppl 2**:S274-276.

- 85. Jana S, Deb JK: Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **67**:289-298.
- 86. Baneyx F: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 1999, **10**:411-421.
- 87. Schein C. H. NMHM: Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nature Biotechnology* 1988, 6:291-294.
- 88. Studier FW: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 2005, **41**:207-234.
- 89. Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA: **The** *Aspergillus fumigatus* **transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model**. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:2290-2302.
- 90. Hemmann S, Blaser K, Crameri R: Allergens of Aspergillus fumigatus and Candida boidinii share IgE-binding epitopes. Am J Respir Crit Care Med 1997, 156:1956-1962.
- 91. Crameri R: Epidemiology and molecular basis of the involvement of Aspergillus *fumigatus* in allergic diseases. *Contrib Microbiol* 1999, **2**:44-56.
- 92. Starokadomskyy PL: Protein Splicing. Molecular Biology 2007, 41: 278–293.
- 93. Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Alemany R: alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012, 2012:156795.
- 94. Pancholi V: Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**:902-920.
- 95. Champer J, Diaz-Arevalo D, Champer M, Hong TB, Wong M, Shannahoff M, Ito JI, Clemons KV, Stevens DA, Kalkum M: Protein targets for broad-spectrum mycosis vaccines: quantitative proteomic analysis of Aspergillus and Coccidioides and comparisons with other fungal pathogens. Ann N Y Acad Sci 2012, 1273:44-51.
- 96. Li W, Hu X, Zhang X, Ge Y, Zhao S, Hu Y, Ashman RB: Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine* 2011, **29**:5526-5533.
- 97. Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S: The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2005, 57:1318-1341.
- 98. Jeffery CJ: Moonlighting proteins. Trends Biochem Sci 1999, 24:8-11.
- 99. Jeffery CJ: Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* 2003, **19**:415-417.
- 100. Urban C, Sohn K, Lottspeich F, Brunner H, Rupp S: Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* 2003, 544:228-235.
- 101. Li Z, Srivastava P: Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol* 2004, Appendix 1:Appendix 1T.
- 102. Wu C: Heat shock transcription factors: structure and regulation. Annu Rev Cell Dev Biol 1995, 11:441-469.
- 103. Whitesell L, Lindquist SL: **HSP90 and the chaperoning of cancer**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:761-772.
- 104. Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC: Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev* 2006, **30**:53-88.

- 105. Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, et al.: Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 2005, **120**:715-727.
- 106. Lamoth F, Juvvadi PR, Fortwendel JR, Steinbach WJ: Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2012, **11**:1324-1332.
- 107. McColl D, Valencia CA, Vierula PJ: Characterization and expression of the *Neurospora crassa* nmt-1 gene. *Curr Genet* 2003, 44:216-223.
- 108. Hahn H. FD, Kaufmann S. H. E., Ulimann U. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Abschnitt 3.5 Lebendimpfstoffe. Springer, Berlin/Heidelberg 2005, 5. Auflage,:467.
- 109. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young JA, Boeckh MJ, Center for International B, et al.: Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. Biol Blood Marrow Transplant 2009, 15:1143-1238.

7 Anhang



7.1 Molekulargewichtsmarker

Abb. 40: a) MassRulerTM DNA ladder mix. b) GeneRulerTM 100bp DNA ladder. c) Bench Mark.

7.2 Vektoren



Abb. 41: pBlueskript II SK+PacI-Vektor.



Abb. 42: Plasmid psk397; Resistenz-lieferndes Insert der Deletionsplasmide.



Abb. 43: Plasmid psk275; Resistenz-lieferndes Insert der Komplementierunsplasmide.



Abb. 44: Linearisierter pUC19-Vektor zur Herstellung der Komplementierungsplasmide.



Abb. 45: Expressionsplasmid pET28aHT_Afu1g13670 mit a) kurzer Version des Proteins (AS 23-182) und b) langer Version des Proteins (AS 23-218) und der erwarteten Größe für das Protein einschließlich Tag.

Lebenslauf

Name	: Sahra Herrmann
Geburtsdatum	: 20. November 1984
Geburtsort	: Uslar
Staatsangehörigkeit	: deutsch

Schulbildung

08/91-06/95	Grundschule Schönhagen/ Sohlingen
06/95-07/97	Orientierungsstufe Uslar
07/97–06/04	Gymnasium Uslar,
	Abschluss: Abitur

Studium

10/04-09/10	Diplom- Biologie,
	Georg-August-Universität Göttingen
01-10-09/10	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie,
	Universitätsklinikum Göttingen
	Thema der Diplomarbeit: Der Einfluss der Wirtsadaptation
	von Campylobacter jejuni auf dessen Zellinvasivität

Auslandszeiten

08/07-06/08	Stipendium-Auslandssemester an der Lund University
	Department of Undergraduate Studies in Biologie,
	Lund/ Schweden

Arbeitsverhältnisse/ Promotion

01/11-12/13	Institut für Medizinische Mikrobiologie,
	Universitätsklinikum Göttingen
01/14-03/14	Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und
	Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in Jena

Thema der Doktorarbeit: Identifizierung schutzvermittelnder Antigene von *Aspergillus fumigatus* für eine Impfstoffentwicklung zur Verhütung invasiver Aspergillosen bei Leukämie-Patienten

Publikation

Utz Reichard, <u>Sahra Herrmann</u> and Abdul R. Asif, Vaccination Approaches Against Opportunistic Fungal Infections Caused by *Aspergillus fumigatus*, Current Protein and Peptide Science, 2014, 15(5):424-9

Kongressbeiträge

<u>Herrmann S.</u>, Iben I., Groß U., Reichard U., Untersuchung neuer Impfstoffkandidaten bei *Aspergillus fumigatus*, 45. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., 1.-3.9.2011 in Kiel, Posterpräsentation

Virulenztestung von Aspergillus fumigatus Mutanten nach Knock-out von Konidienoberflächenproteinen, 44. Jahrestagung der Arbeitsgruppe "Klinische Mykologie" der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, 10.-11.2.2012 in Göttingen, Vortrag

<u>Herrmann S</u>., Iben I., Groß U., Reichard U., Reduced virulence of *Aspergillus fumigatus* mutants after knock-out of conidial surface proteins, 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 11.-15.6.2012 in Berlin, Vortrag

<u>Herrmann S</u>., Iben I., Groß U., Reichard U., Testing the protective properties of vaccine candidates against *Aspergillus fumigatus* in animal trials, 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V., 30.09.-3.10.2012 in Hamburg, Posterpräsentation